

柑桔裂皮病类病毒-爪哇三七悬浮细胞的生长特性

熊翠英 丁达明 周咏芝 陈雅丽

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

侯嵩生

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉)

爪哇三七 (*Gynura aurantiaca* DC) 是柑桔裂皮病类病毒 (Citrus Exocortis Viroid 简称 CEV) 敏感的指示植物。用 CEV 感染的柑桔叶研磨汁液机械接种健康爪哇三七植株, 以此作为 CEV 感染的外植体来源。在 MS 和 B₅ 琼脂培养基上诱导和继代培养健康、CEV 感染的爪哇三七叶片的愈伤组织, 在 MS、B₅ 液体培养基中建立健康、CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞系统。从愈伤组织和悬浮细胞培养物中抽提核酸, 经 5% 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染分析: 在健康爪哇三七愈伤组织和悬浮细胞中不出现特异的 CEV 电泳带, 而 CEV 感染的爪哇三七的所有培养物中都含有类病毒。CEV 可在有丝分裂旺盛的爪哇三七悬浮细胞中复制。愈伤组织和悬浮细胞很容易继代培养和保存。

关键词 柑桔裂皮病类病毒; 爪哇三七悬浮细胞

类病毒是现已知的最小的植物病原, 本文报道的柑桔裂皮病类病毒侵染柑桔树后, 可在宿主细胞中自主复制, 导致树干矮化, 砧木裂皮, 生长缓慢, 果实产量下降^[1]。

国外一些科学家开展了类病毒研究^[2-6]。作者首次用爪哇三七愈伤组织、悬浮细胞离体培养柑桔裂皮病类病毒, 此项工作目前在国内外尚未见报道。周咏芝等亦相继进行了 CEV 体外人工培养的研究^[7]。

材料与方 法

(一) 爪哇三七叶片

1. 健康爪哇三七叶片: 取自武汉岩土力学研究所花圃。

2. CEV 感染爪哇三七叶片: 用剪刀将 CEV 感染的柑桔叶片剪碎, 加适量磷酸缓冲液研磨, 取汁液机械接种生长在武汉病毒所亚病毒室温室的健康爪哇三七, 以此作为 CEV 感染的爪哇三七外植体来源。

(二) 培养基

1. B₅ 培养基 (L): B₅ 无机盐, 盐酸硫胺素 10 mg, 烟酸 1 mg, 盐酸吡哆素 1 mg, 肌醇 100 mg, 蔗糖 20 g, 激动素 0.1 mg, 2, 4-二氯苯氧乙酸 1 mg, pH 5.8, 固体培养基加琼脂 7 g, 液体培养基不加琼脂。

2. MS 培养基 (L): MS 无机盐, 甘氨酸 2 mg, 盐酸硫胺素 0.4 mg, 盐酸吡哆素 0.5 mg, 烟酸 0.5 mg, 肌醇 100 mg, 蔗糖 30 g, 激动素 0.1 mg, 2, 4-二氯苯氧乙酸 1 mg, pH 5.8, 固体培养基加琼脂 7 g。

(三) 方法

1. 爪哇三七愈伤组织的诱导和继代培养: 摘取爪哇三七植株顶端部位的嫩叶, 用自来水冲洗尘土, 将叶片表面水份用吸水纸吸干, 70% 酒精漂洗 30 秒, 0.1% 氯化汞消毒 8 分钟, 无菌蒸馏水冲洗 3—4 次。叶片表面消毒完毕, 将叶片剪成 1—1.5 cm² 大小, 置 B₅ 和 MS 琼脂培养基上诱导愈伤组织。愈伤组织形成十几天后, 将愈伤

本文于 1986 年 12 月 12 日收到。

组织转接新鲜培养基进行第一次培养,以后愈伤组织隔 30 天左右换一次培养基进行继代培养。以上培养均在完全黑暗条件下进行,培养温度 28℃。

2. 细胞悬浮培养: 挑选经过三次继代培养,质地疏松的爪哇三七愈伤组织 3—4g (鲜重),接种到装有 60 ml 培养液的 250 ml 三角瓶中,置 PYB 旋转摇床振荡培养,得到第一代悬浮培养物。悬浮细胞继代培养时,先将培养物静置几分钟,以使大细胞块和组织块沉积于三角瓶底部,倒出上部悬浮液进行接种,以提高下一代培养物中单细胞的比例。每隔 15—20 天,将悬浮细胞继代培养一次。摇床转速: 110 r/min,培养温度 28℃,光照强度: 140 lux。

3. 褐变及其防止: 健康的、CEV 感染的愈伤组织和悬浮细胞在培养过程中,固体培养的琼脂培养基变成棕褐色,液体培养的培养液变黑,并可能导致愈伤组织和悬浮细胞死亡。这种褐化现象是由于外植体中的多酚化合物在多酚氧化酶作用下氧化的结果。我们采用了两种防止褐变的方法:

(1) 将外植体不断地转移到新鲜培养基中。

(2) 加抗氧化剂: 在琼脂培养基中,加 0.4% 聚乙烯吡咯烷酮。在液体培养基中,加 0.6% 聚乙烯吡咯烷酮,或加 0.25% 抗坏血酸溶液。

4. 爪哇三七悬浮细胞的生长曲线、pH 曲线: 取对数生长期的悬浮细胞接种,每 250 ml 三角瓶中加入 100 ml 细胞悬液,50 ml B₅ 或 MS 液体培养基,每批接种 10—15 瓶,置摇床振荡培养。每隔一或二天取一瓶悬浮细胞经 400 r/min 离心 15 分钟,倒出上清液,置 S-3 数字式精密酸度计测定培养液 pH,在天平上称出离心管底细胞沉淀的重量,处理所得数据,绘出生长曲线和 pH 曲线。

5. 组织培养物中 CEV-RNA 的提取和 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳:

(1) 组织培养中 CEV-RNA 的提取按修改的 Semancik^[11] 方法: 每克愈伤组织或悬浮细胞加二倍体积抽提液 (0.8% SDS, 17 mM EDTA, 5% β -巯基乙醇, 130 mM Tris, 5% 聚乙烯吡咯烷酮, 1M LiCl, pH 7) 和三体积水饱和酚,置研钵中研磨,然后置转速为 250 r/min 摇床上两小时

破碎细胞,经 3000 r/min 离心 30 分钟,小心吸取上层水相,加苯酚-氯仿抽提水相一次,离心吸取上清液,加 2.5 倍 95% 乙醇,置冰箱沉淀过夜,将乙醇沉淀的核酸 3000 r/min 离心 30 分钟,弃上清液,抽干核酸沉淀物,加 TKM 缓冲液 (100 mM Tris, 100 mM KCl, 10^{-4} M MgCl₂, pH 7.4) 溶解沉淀物,然后对 TKM 缓冲液透析 24 小时,中间换二次透析液。透析完毕经离心吸取上清液,加甲氧基乙醇去多糖,加 2M LiCl 沉淀大分子核酸,离心吸取上清,加 2.5 倍体积的 95% 乙醇沉淀核酸,最后经离心,弃上清液,将沉淀的核酸抽干备用。

(2) 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染分析方法见文献[9]。

结 果

(一) 愈伤组织的生长情况

经表面消毒后接种于琼脂培养基的健康、CEV 感染的爪哇三七叶片,分别在接种 15、18 天后启动,叶片由紫色渐退成为绿色。经一个月左右,爪哇三七外植体经细胞脱分化启动进入分裂和形成棕黄色或棕色的愈伤组织,其质地有的疏松,有的较紧密。健康爪哇三七叶片比 CEV 感染的叶片启动稍快。前者愈伤组织比后者愈伤组织生长快。

(二) 爪哇三七悬浮细胞的生长曲线、pH 曲线

在 B₅ 和 MS 培养基中,健康爪哇三七悬浮细胞比 CEV 感染的悬浮细胞的延迟期短,而对数生长期则比后者长,CEV 的持续性感染在一定程度上影响了爪哇三七悬浮细胞的生长速率。在 B₅ 液体培养基中悬浮细胞的延迟期比在 MS 培养基短,而对数生长期较后者长, B₅ 培养基较 MS 培养基更适应于悬浮细胞的生长 (图 2、3)。

在光学显微镜下观察,悬浮细胞由细胞团、细胞球和单细胞混合物组成。细胞

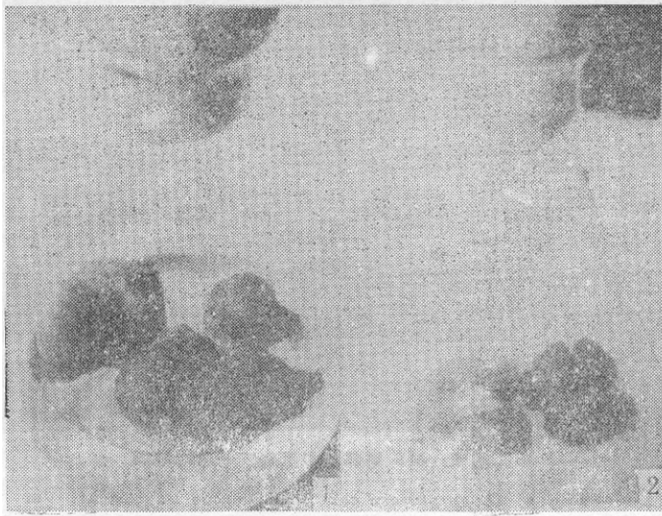
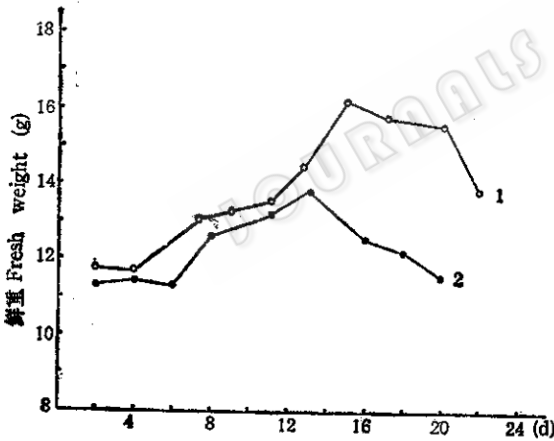


图1 爪哇三七愈伤组织

Fig. 1 Callus of *G. aurantiaca*

1. 传代三次的健康爪哇三七愈伤组织;
2. 传代一次的 CEV 感染的爪哇三七愈伤组织。

1. The third subculture of healthy *G. aurantiaca* callus;
2. The first subculture of CEV-infected *G. aurantiaca* Callus.

图2 B₂ 培养基中爪哇三七悬浮细胞的生长曲线Fig. 2 Growth curve of *G. aurantiaca* cell suspensions in B₂ medium

1. 健康爪哇三七悬浮细胞;
2. CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞。

1. Healthy *G. aurantiaca* cell suspensions;
2. CEV-infected *G. aurantiaca* cell suspensions.

形态不均一,为圆形、椭圆、长杆形等(图4)。在液体培养基中悬浮细胞的生长速率比培养在琼脂培养基上的愈伤组织快得多。

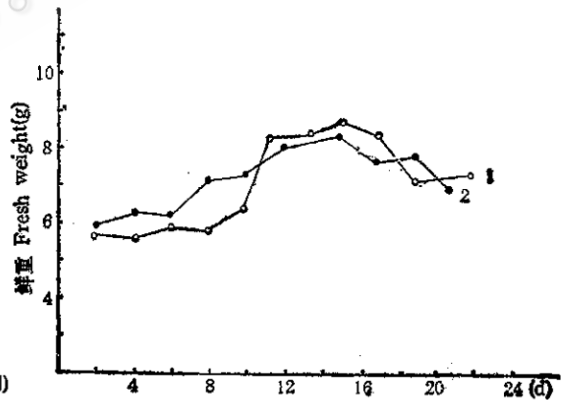


图3 MS 培养基中爪哇三七悬浮细胞生长曲线

Fig. 3 Growth curve of *G. aurantiaca* cell suspensions in MS medium

1. 健康爪哇三七悬浮细胞;
2. CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞。

1. Healthy *G. aurantiaca* cell suspensions;
2. CEV-infected *G. aurantiaca* cell suspensions.

pH 曲线: 离体植物细胞所生存的 pH 范围是 5.5—6.2。最适 pH 因细胞种类不同而异。爪哇三七悬浮细胞在培养过程中

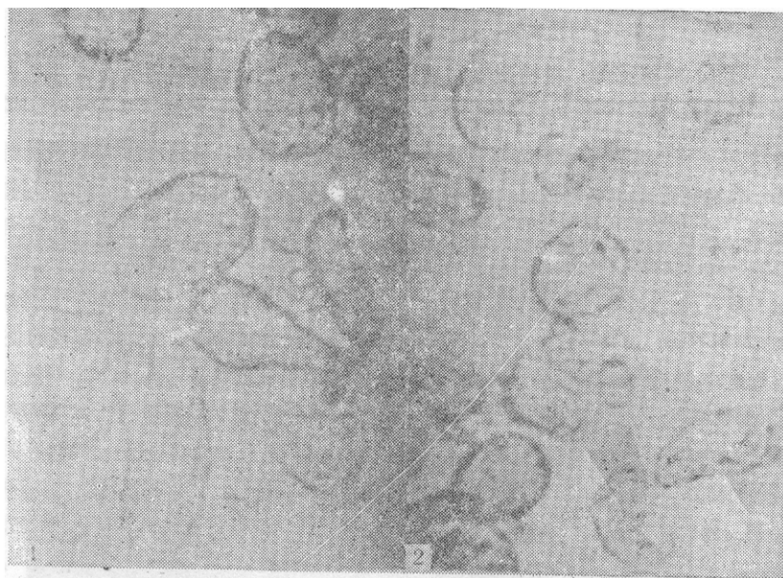


图4 MS培养基中爪哇三七悬浮细胞

Fig. 4 *G. aurantiaca* cell suspensions in MS medium

1. 传代7次的健康爪哇三七悬浮细胞 ($\times 250$);

2. 传代3次的 CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞 ($\times 250$).

1. Seven-passage healthy *G. aurantiaca* suspension cells;

2. Three-passage CEV-infected *G. aurantiaca* suspension cells.

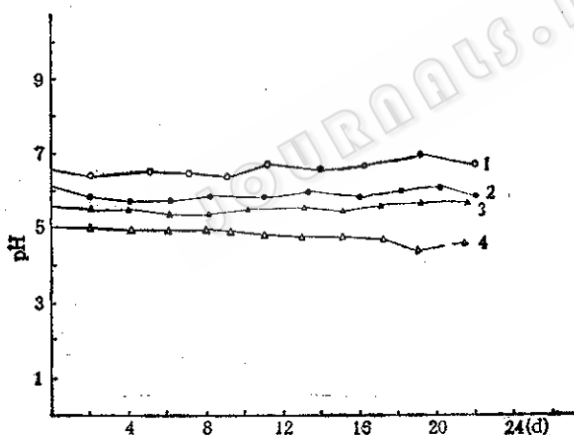


图5 爪哇三七悬浮细胞的 pH 曲线

Fig. 5 pH curve of *G. aurantiaca* cell suspensions

1. B₂ 培养基中健康爪哇三七悬浮细胞;

2. B₂ 培养基中 CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞;

3. MS 培养基中 CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞;

4. MS 培养基中健康爪哇三七悬浮细胞。

1. Healthy *G. aurantiaca* cell suspensions in B₂ medium;

2. CEV-infected *G. aurantiaca* cell suspensions in B₂ medium;

3. CEV-infected *G. aurantiaca* cell suspensions in MS medium;

4. Healthy *G. aurantiaca* cell suspensions in MS medium.

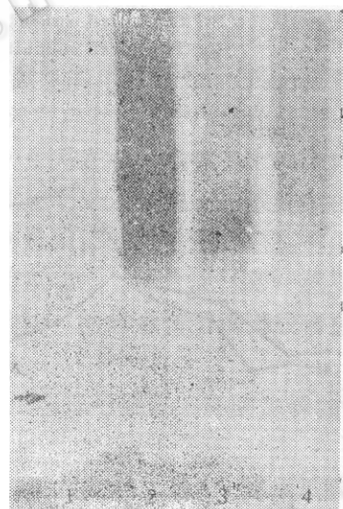


图6 银染,5%双向 PAGE 图谱;箭头示 CEV 带

Fig. 6 Silver staining, 5% bidirectional PAGE patterns, CEV band was marked by an arrow

1. 健康的爪哇三七悬浮细胞核酸提取物;

2, 4. CEV 感染的爪哇三七愈伤组织核酸提取物;

3. CEV 感染的爪哇三七悬浮细胞核酸提取物。

1. Nucleic acid was extracted from healthy *G. aurantiaca* cell suspensions;

2, 4. Nucleic acid was extracted from CEV-infected *G. aurantiaca* callus;

3. Nucleic acid was extracted from CEV-infected *G. aurantiaca* cell suspensions.

pH 变化不大,健康的悬浮细胞比 CEV 感染的悬浮细胞 pH 变化要大一些,爪哇三七悬浮细胞进入延迟期时的 pH 变化为 0.1—0.3。进入静止期时 pH 变化最大,为 0.65。在 MS 培养基上 pH 变化为 0.03—0.65,在 B₅ 培养基上 pH 变化范围为 0.02—0.45 (图 5)。

(三) CEV 在组织和细胞培养中的复制

健康: CEV 感染的愈伤组织和悬浮细胞核酸抽提物,经 5% 双向 PAGE、银染分析,结果表明:在健康爪哇三七愈伤组织和悬浮细胞中均无 CEV 特异带,而 CEV 感染的愈伤组织和悬浮细胞中出现 CEV 特异电泳带。电泳结果表明:CEV 在愈伤组织和细胞悬浮培养中保持了自主复制能力,并通过继代培养而维持复制。

讨 论

根据美国 Cornell 大学 Aaron Zelcer^[10] 等报道,他们用蕃茄悬浮细胞系长期继代培养,维持 PSTV 复制已五年多,通过电泳可随时检测到悬浮细胞中存在 PSTV。在旺盛分裂的细胞中,通过 ³H 尿嘧啶标记后 1 小时即可检测到新合成的带放射性标记的 PSTV RNA。因为有些植物病毒在长期的植物组织培养中丧失,类病毒是否与传统的植物病毒不同?在我们

进行爪哇三七组织培养的一年多工作中,不论在愈伤组织还是在悬浮细胞内 CEV 均可复制。CEV 复制与细胞分裂时期有关,随悬浮细胞呈指数生长的同时,CEV 的量得以扩增。由于在继代培养中均可检测到 CEV,因而可以推断:这不是外植体接种时带有的有限量的 CEV,而是通过在爪哇三七悬浮细胞中扩增后产生的 CEV。由于目前积累的经验有限,CEV 在爪哇三七悬浮细胞长期继代培养中是否丧失,还有待于进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Diener, T. O. 著(刘勇等译):类病毒和类病毒病,科学出版社,北京,1985。
- [2] Conejero, V. et al.: *Virology*, 37: 454—456, 1979.
- [3] Marton, L. et al.: *Virology*, 122: 229—238, 1982.
- [4] Takabashi, T. et al.: *Virology*, 64: 106—114, 1975.
- [5] Muhlbad, H-P. et al.: *J. Gen. Virol.*, 35: 377—386, 1977.
- [6] Schumacher, J. et al.: *Analytical Biochemistry*, 135: 288—295, 1983.
- [7] 周咏芝等:病毒学报,3(3): 277—281, 1987。
- [8] Semancik, J. S. et al.: *Virology*, 80: 218—221, 1977.
- [9] 周咏芝等:中国柑桔,1: 15—16, 1986。
- [10] Zelcer, A. et al.: *Virology*, 109: 314—322, 1981.
- [11] 桂耀林等编著:植物组织培养,科学出版社,北京,1985。

GROWTH PROPERTIES OF CEV-GYNURA AURANTIACA CELL SUSPENSION SYSTEM

Xiong Cuiying Ding Daming Zhou Yongzhi Chen Yali

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Hou Songsheng

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan)

Gynura aurantiaca DC is a sensitive indicator plant of Citrus Exocortis Viroid (CEV). Healthy *G. aurantiaca* plants inoculated mechanically with ground CEV preparation from infected citrus leaves were used as the source of CEV-infected explant, we induced and subcultured healthy and CEV-infected *G. aurantiaca* leaflet callus in MS and B₅ agar media, and established healthy and CEV-infected cell suspension culture in MS and B₅ liquid media. Nucleic acid extracted from healthy and CEV-infected callus and suspension cell was analyzed on bidirectional

5% polyacrylamide gel, silver staining demonstrated that the characteristic CEV band does not present in extracts from healthy *G. aurantiaca* callus and suspension culture, but all culture derived from CEV-infected *G. aurantiaca* contained the viroid. CEV can replicate in mitotically active dividing cell of suspension culture, callus and cell suspensions can be easily subcultured and maintained.

Key words

Citrus Exocortis Viroid; *Gynura aurantiaca* cell suspension