

水稻胚性悬浮细胞的包埋脱水法超低温保存

曾博雅, 王智, 张云峰, 杨清*, 陆巍*

南京农业大学生命科学学院, 南京 210095

Cryopreservation of Rice (*Oryza sativa* L.) Embryonic Cell Suspensions by Encapsulation-Dehydration

ZENG Bo-Ya, WANG Zhi, ZHANG Yun-Feng, YANG Qing*, LU Wei*

College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘要: 用包埋脱水法冷冻保存水稻胚性悬浮细胞。整个过程包括: 胚性悬浮细胞预培养、细胞包埋、二次预培养、包埋细胞脱水、液氮冰冻、细胞解冻和冷冻细胞恢复培养。结果表明, 在细胞水分含量为 25.17% 和蔗糖浓度依次递增以及第 2 次预培养 3~4 d 的存活率最好。在培养基中加 2.5 g·L⁻¹ 活性炭有利于细胞的恢复生长。细胞恢复培养后, 能再产生愈伤组织, 但生长变慢, 有约 5 d 的滞后期。

关键词: 水稻; 悬浮细胞系; 包埋脱水; 冰冻保存

植物胚性悬浮细胞系不仅是全能性原生质体的重要来源, 而且它本身也可作为植物基因转移的受体(黄纯农等 1994)。然而, 胚性细胞在长期继代培养过程中经常丢失潜在的形态发生能力, 或者分化出形态学上变态的小苗(Wang和Gafny 2002), 从而增加了遗传学上的不稳定性; 而且长期继代培养费时费事, 成本较高。因此, 胚性悬浮细胞系的长期保存是人们一直试图解决的问题。

超低温液氮保存是胚性悬浮细胞系保存的一种常用方法。迄今为止, 已经报道的适合于悬浮细胞系保存的方法有快速冷冻法(Meijer等1991; 黄纯农等 1994; 尹德东和胡宝忠 2006)、慢速和逐步冷冻法(严庆丰等1994; 章志宏和胡中立 2000; Jain等 1996; Cho等 2007)、干冻法、玻璃化法(黄纯农等 1994; 刘峰等 1998; Wang等 1997)和包埋脱水法(陈勇等 2002; Kobayashi等 2005; Shibli等 2001; Fang等 2008; Wang等 2006; Burritt 2008)等。采用这些方法, 一些植物的幼嫩外植体和全能性培养细胞能成功地贮存在液氮中, 为生物工程研究提供了优良的受体材料(王君晖等 1999)。在水稻中, Sala等(1979)曾报道水稻悬浮细胞超低温保存, 经冷冻的细胞能恢复生长。Meijer等(1991)从超低温保存后的水稻悬浮细胞制备原生质体, 经培养可分化出根和芽, 但植株不能正常结实。严庆丰等(1994)在超低温保存的水稻悬浮细胞系中采用复合保护剂二甲亚砜(DMSO)+山梨醇, 保存的水稻悬浮细胞系再生绿苗并长成正常结实的植株。王君

晖等(1996)用玻璃化法冰冻保存水稻悬浮细胞系, 从恢复生长的细胞再生获得了可育植株。虽然这些方法获得了较好的保存效果, 但还存在着设备昂贵、方法复杂和保护剂伤害等问题。

包埋脱水法是将样品用海藻酸钙包埋和脱水后, 投入液氮中保存的方法。该方法容易掌握, 可缓和脱水过程, 简化脱水程序, 减少环境因子的影响, 而且一次能处理较多的材料。用蔗糖作为保护剂和脱水剂, 可提高胞质浓度, 增加抗冻力和抗脱水力, 避免冰冻保护剂对细胞的毒害。该方法最早在拟南芥和长春花悬浮细胞的保存中成功得到应用(Bachiri等 1995)。此后, Wang和Gafny(2002)用此方法保存的葡萄悬浮细胞, 其细胞存活率达到78%, 并获得胚状体和绿芽。本文通过对包埋剂浓度和脱水时间的优化, 建立了一个便捷有效的适合水稻悬浮细胞的超低温保存方法。

材料与amp;方法

1 材料

粳稻(*Oryza sativa* L.)品种‘中花11’的胚性悬浮细胞由本实验室于2005年2月建立。我们实验

收稿 2009-03-25 修定 2009-05-04

资助 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室基金(HZHL0807)。

* 通讯作者(E-mail: qyang19@njau.edu.cn, luw@njau.edu.cn; Tel: 025-84395221)。

中采用2种培养基: AA (徐林林等2006)和MS。AA培养基中添加3%蔗糖和5 mg·L⁻¹ 2,4-D (固体培养基加0.8%琼脂), pH 6.1。MS培养基中添加3%蔗糖、5 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.8%琼脂, pH 5.8。两种培养基均在121 °C高温高压灭菌20 min。

2 方法

2.1 第1次预培养 继代培养3 d的胚性悬浮细胞,在添加了依次递增浓度为0.25、0.5、0.75和1 mol·L⁻¹蔗糖的AA液体培养基中培养(每个浓度培养12 h),培养在25 °C黑暗中进行,时间2 d。

2.2 细胞包埋 将预培养的细胞悬浮在含8% (W/V)海藻酸钠、1 mol·L⁻¹蔗糖和2 mol·L⁻¹甘油的混合液中。用灭菌的胶头滴管将混合液滴入0.1 mol·L⁻¹CaCl₂溶液(含1 mol·L⁻¹蔗糖和2 mol·L⁻¹甘油)中。在室温下停放30 min,形成小珠。

2.3 第2次预培养及脱水 包埋的小珠在包含1 mol·L⁻¹蔗糖的AA液体培养基中再次预培养3 d。小珠表面迅速用灭菌的滤纸干燥,放置在装有灭菌滤纸的培养皿(直径9 cm)中,在室温下采用超净工作台的层流空气脱水,时间20~200 min。放在烘箱中80 °C干燥6 h后测其含水量,以(小珠鲜重-干重)/鲜重的百分数表示。

2.4 冰冻保存 取10个脱水小珠转移到2 mL冻存管中,直接浸入液氮1 h。

2.5 恢复培养 将冻存管从液氮中取出,迅速在40 °C水浴中解冻3 min。小珠在AA固体培养基上置25 °C黑暗中培养,AA固体培养基(0.8%琼脂)含2.5 g·L⁻¹活性炭。分别将包埋脱水未冷冻与冷冻保存的细胞在4种培养基上恢复培养。这4种培养基为:AA固体培养基、添加了活性炭(AC)的AA固体培养基、AA液体培养基、添加了活性炭的AA液体培养基。

2.6 再生培养和液体培养的再建立 将小珠置于添加2.5 g·L⁻¹活性炭的MS固体培养基上,在25 °C黑暗条件下进行再生培养,时间为30 d,然后测定其生长量。

2.7 存活率的测定 细胞存活率的测定采用TTC法(Kalengamaliro等2000),取5个包埋小珠加入5 mL 0.4% TTC溶液与等量的0.05 mol·L⁻¹磷酸钠缓冲液中,25 °C中静置24 h,用分光光度计比色法测定细胞存活率。测定重复3次。

结果与讨论

1 脱水对冷冻细胞存活率的影响

为了分析脱水对冷冻细胞存活率的影响,比较10个脱水时间处理,冷冻后测定不同处理细胞存活率的结果(图1)显示,细胞内的含水量随着脱水时间的延长而呈下降趋势。在处理20 min含水量约为70%时,冷冻的脱水细胞存活率只有25%左右,随着处理时间的延长,存活率同步增加,处理120 min的含水量约为25%时,细胞存活率最高,达50%,但是,随着处理时间进一步延长,细胞存活率迅速下降。未经冷冻的脱水细胞存活率则随着脱水时间的延长而几乎是直线下降,在处理120 min时,细胞存活率约为55%。这表明处理120 min为合适的脱水时间。

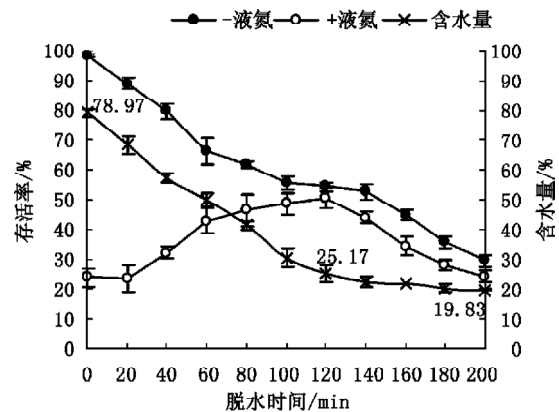


图1 脱水时间对包埋细胞含水量和细胞冷冻前后存活率的影响

2 预培养对冷冻细胞存活率的影响

预培养有利于保存细胞的生活力。在冷冻前,分别将包埋细胞预培养1~7 d,再进行冷冻处理,然后测其存活率的结果表明,预培养3~4 d的冷冻细胞存活率最高,达到55%,为未经过预培养细胞存活率的2.5倍,但低于未经冷冻的预培养细胞的存活率(89%) (图2)。

3 恢复培养基对冷冻细胞存活率的影响

恢复培养是冷冻细胞恢复正常状态的重要环节。比较4种培养基组分并检测冷冻小珠培养后成活率的结果表明,与液体培养基相比,固体培养基上的小珠存活率明显较高(图3)。在固体培养基中添加活性炭可提高冷冻小珠的存活率,存活率约为52%。这可能是固体培养基可提供更好的培养

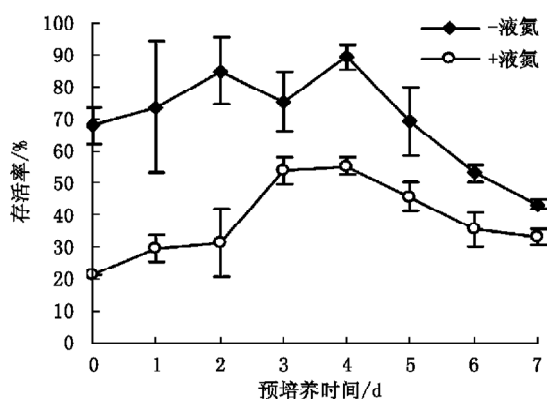


图2 预培养时间对包埋细胞存活率的影响

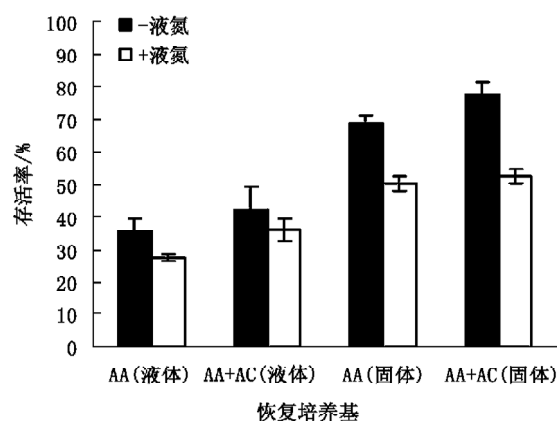


图3 恢复培养基对冷冻细胞存活率的影响

环境之果。活性炭对细胞生存能力之所以有益可能是其可通过减少坏死组织和吸附冰冻毒害后细胞产生的毒素物质所致(Dussert 等 1992; Wang 和 Gafny 2002), 因而冷冻小珠的存活率得到提高。

4 冷冻细胞的再生

为了检测冷冻细胞的再生能力, 包埋小珠置添加 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭的 MS 固体培养基, 然后进行再

生培养。结果表明, 培养 6 d 后, 从包埋小珠的周围生长出再生细胞, 并逐渐形成较大愈伤组织块, 质地疏松(图 4)。与包埋和包埋脱水未冷冻细胞相比, 冷冻细胞的生长推迟, 有 5 d 的滞后期(图 5)。培养 30 d 后, 冷冻细胞的鲜重增加量为正对照的一半。但所有的包埋珠几乎都能再生愈伤组织, 再生率达到 85%。这个结果高于鸢尾中获得 60% 的结

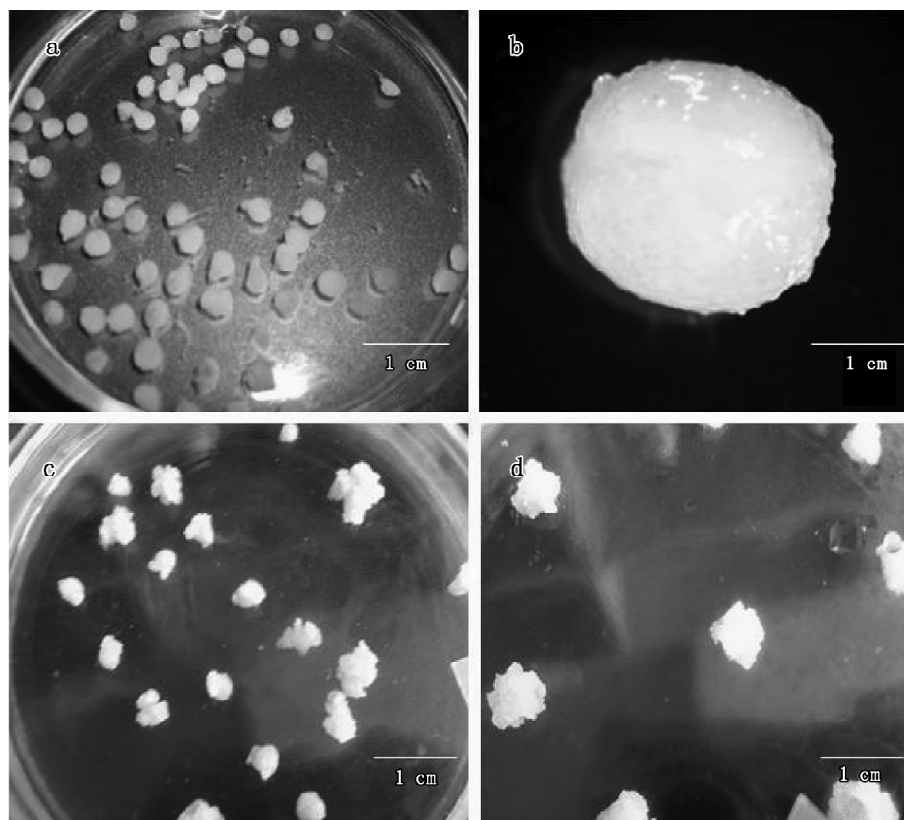


图4 冷藏细胞的培养与再生

a: 多个包埋的小珠; b: 体视镜下包埋的单个小珠, 内包含细胞; c: 冷冻细胞的再生长; d: 生长 1 个月后的再生细胞。

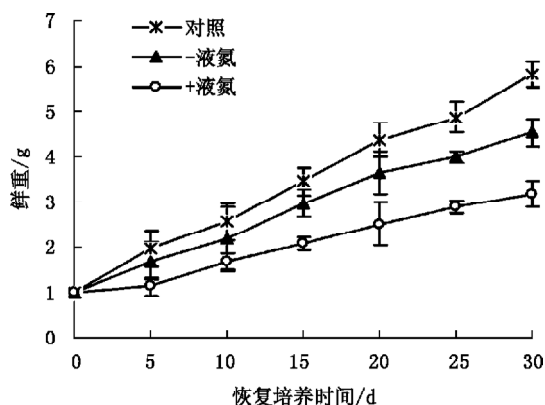


图5 包埋、包埋脱水未冷冻和包埋脱水冷冻细胞再生的比较

果(Shibli 2000), 与用同法保存的紫花苜蓿细胞存活率 84% 相近(Shibli 等 2001)。

参考文献

- 陈勇, 王君晖, 黄纯农(2002). 胡萝卜悬浮培养细胞和原生质体的玻璃化法超低温保存. 浙江大学学报(理学版), 29 (1): 94~98
- 黄纯农, 王君晖, 严庆丰(1994). 玻璃化法液氮冻存大麦和水稻的胚性悬浮培养细胞. 浙江大学学报(自然科学版), 21 (1): 114~115
- 刘峰, 王君晖, 黄纯农, 颜秋生, 张雪琴(1998). 水稻胚性悬浮细胞玻璃化冻存中的超微结构变化. 中国水稻科学, 12 (1): 17~20
- 王君晖, 郑泳, 颜秋生(1996). 水稻胚性悬浮细胞系的玻璃化法超低温保存和可育植株再生. 科学通报, 41 (22): 2801~2804
- 王君晖, 边红武, 黄纯农(1999). 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. 植物学通报, 16 (5): 582~586
- 徐林林, 芦笛, 陆巍, 张荣铨, 杨清(2006). 水稻悬浮细胞系的建立及培养条件对生物产量的影响. 植物生理学通讯, 42 (4): 612~616
- 严庆丰, 王君晖, 黄纯农(1994). 水稻悬浮细胞的超低温保存研究. 实验生物学报, 27 (4): 399~404
- 尹德东, 胡宝忠(2006). 日本晴水稻悬浮细胞系的建立和保存. 东北农业大学学报, 37 (6): 750~754
- 章志宏, 胡中立(2000). 水稻单倍体不定芽超低温保存和植株再生及其遗传稳定性研究. 武汉植物学研究, 18 (3): 169~173
- Bachiri Y, Gazeau C, Hansz J, Morisset C, Dereuddre J (1995). Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. Plant Cell Tiss Org Cult, 43: 241~248
- Burritt DJ (2008). Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia×erythrophylla* using encapsulation-dehy-

- dration requires pretreatment with both ABA and praline. Plant Cell Tiss Org Cult, 95: 209~215
- Cho JS, Hong SM, Joo SY, Yoo JS, Kim DI (2007). Cryopreservation of transgenic rice suspension cells producing recombinant hCTLA4Ig. Appl Microbiol Biotechnol, 73: 1470~1476
- Dussert S, Mauro MC, Engelmann F (1992). Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions influence of post-culture conditions and application to different strains. Cryo Lett, 13: 15~22
- Fang JY, Wetten A, Johnston J (2008). Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. Plant Cell Rep, 27: 453~461
- Jain S, Jain RK, Wu R (1996). A simple and efficient procedure for cryopreservation of embryogenic cells of aromatic Indica rice varieties. Plant Cell Rep, 15:712-717
- Kalengamaliro NE, Gana JA, Cunningham SM, Volenec JJ (2000). Mechanisms regulating differential freezing tolerance of suspension cell cultures derived from contrasting alfalfa genotypes. Plant Cell Tiss Org Cult, 61: 143~151
- Kobayashi T, Niino T, Kobayashi M (2005). Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell cultures. Plant Biotech, 22: 105~112
- Meijer EGM, Van IE, Schrijnemakers E, Hensgens LAM, Zijderfeld M, Schilperoort RA (1991). Retention of the capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Rep, 10: 171~174
- Sala F, Cella R, Rollo F (1979). Freeze-preservation of rice cells grown in suspension culture. Plant Physiol, 45: 170~176
- Shibli RA (2000). Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. Cryo Lett, 21 (1): 39~46
- Shibli RA, Haagenon DM, Cunningham SM, Berg WK, Volenec JJ (2001). Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. Plant Cell Rep, 20: 445~450
- Wang JH, Zheng Y, Yan QF, Yan QS, Zhang XQ, Huang CN (1997). Vitrificational cryopreservation and subsequently fertile plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells. Chin Sci Bull, 42 (5): 422~426
- Wang QC, Gafny R (2002). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. Plant Sci, 162: 551~558
- Wang QC, Liu Y, Xie YH, You M (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). Potato Res, 49: 119~129