科学通报
第 41 卷 第 22 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996 年 11 月

水稻胚性悬浮细胞的玻璃化法超低温保存和可育植株再生*

王君晖 郑 泳 严庆丰 颜秋生① 张雪琴① 黄纯农
(杭州大学生命科学学院, 杭州 310012; ①中国水稻研究所, 杭州 310006)

关键词 水稻胚性悬浮细胞 玻璃化 超低温保存 植株再生

玻璃化法超低温保存(Cryopreservation by vitrification)是 1980 年代兴起的一种冷冻保存新技术, 它的基本过程是将生物样品用一定配方的玻璃化法保护剂处理后快速投入液氮贮存. 描述离体培养物或再生小苗高度含水化时也用"玻璃化"一词, 但本文中的"玻璃化"是指一个生物物理学过程——细胞和溶液在快速降温时进入一种均一的无定形态, 细胞里的水不转变成冰, 而呈超冷液体状态, 一种对细胞冷冻损伤最小的状态[1]. 为了使细胞呈玻璃化, 首先要选择一种高效低毒的玻璃化冷冻保护剂, 其次是控制好冷冻和化冻的温度、气压等条件. 从 1989 年起至 1993 年, 用玻璃化法冻存成功的植物材料仅 10 多种[2], 至今已达 20 多种, 在园艺植物的种质保存中显示出很大潜力. 传统的二步冷冻法保存水稻、大麦以及其他禾谷类作物胚性培养物的研究已有不少[3~5], 但玻璃化法的应用才刚刚起步. 本文报道一个优化的玻璃化法冻存水稻胚性悬浮细胞的程序, 并从恢复生长的细胞再生了大量可育植株.

1 材料与方法

1.1 胚性悬浮细胞系

胚性悬浮细胞系源于水稻成熟胚培养, 品种 02428. 细胞系每周传代, 培养基为 AA 培养基附加 2.0 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L KT, 0.1 mg/L GA_3 和 30 g/L 蔗糖. 以下简称 AA2 培养基.

1.2 细胞的预培养处理

用指数生长期的细胞试验了下列预培养处理. P1(预培养 1): 细胞在含 60 g/L 蔗糖的 AA2 培养基中培养 10 d (第 7 天时需换液, 即先 7 d 后 3 d). P2: 细胞在含 0.4 mol/L 山梨醇的 AA2 培养基中培养 1 d. P3: 细胞在含 0.4 mol/L 山梨醇的 AA2 培养基中培养 2 d. P4: 细胞在含 0.8 mol/L 山梨醇的 AA2 培养基中培养 1 d. P1 + P2: 细胞在经历 P1 预培养后再经历 P2 预培养. P1 + P3, P1 + P4 和 P3 + P4 的含义类推.

1.3 玻璃化法的冷冻过程

一个完整的玻璃化法冷冻过程如下: (1)过渡. 3 mL 悬浮细胞放入 10 mL 离心管中, 待

1995-10-26 收稿
* 国家自然科学基金资助项目

细胞下沉后吸去培养基，加入 6 mL 25%的 PVS2 溶液，22℃下停留，试验了几个不同的停留时间. PVS2 的成分参照 Sakai 等的配方[6]，AA2 培养基中含有 30%(*W*/*V*)甘油，15%(*W*/*V*)乙二醇，15%(*W*/*V*)二甲亚砜和 0.4 mol/L 蔗糖. 25% PVS2 是将 PVS2 用含 0.4 mol/L 蔗糖的 AA2 培养基 1:3 稀释. (2)脱水. 吸去过渡液，加入 0℃3 mL 的 100% PVS2，混匀，冰浴停留，几个不同的时间被试验. 处理完毕后将离心管中的细胞分装于冷冻管，每管 0.75 mL，致密细胞体积约为 40%. (3)冷冻. 将冷冻管直接投入液氮. (4)化冻. 细胞在取用时，37℃水浴快速化冻. (5)洗涤. 吸去保护剂，向每个冷冻管中加入 1 mL 含 1.2 mol/L 山梨醇的 AA2 培养液，25℃停留 25 min，吸去洗涤液.

1.4 活性测定

TTC(Triphenyl tetrazolium chloride，氯化三苯四氮唑)法测定细胞活性[7]. 细胞活性用每克干重细胞处理和未经任何处理的 TTC 还原力相比的百分率表示，并称之为 TTC 存活率.

1.5 恢复培养

冻后细胞先接种在琼脂固化的 AA2 培养基上，分别含 1.2 mol/L 山梨醇，1.2 mol/L 蔗糖和 40%可溶性淀粉. 2 d 后，转移到正常的固体培养基上，均为暗培养.

1.6 细胞系重建和植株再生

恢复生长的细胞接种于液体 AA2 培养基悬浮培养，以重建细胞系.

恢复生长的细胞置于分化培养基上，以诱导细胞分化. 培养基成分为琼脂固化的 N6 培养基含 0.5 mg/L NAA，2 mg/L 6-BA 和 2 mg/L KT. 再生小苗在无激素的 N6 培养基上长大后移栽至温室中的盆钵和泥槽中.

2 结果与讨论

2.1 过渡时间和脱水时间对 TTC 存活率的影响

取 P2 + P4 预培养的细胞，用 25% PVS2 过渡不同时间，再用 100% PVS2 脱水 7.5 min，其 TTC 存活率列于表 1. 从表中可以看出，过渡有利于存活率的提高，较佳的过渡时间为 10 min.

取 P1 + P2 预培养的细胞，用 25% PVS2 过渡 10 min，再用 100% PVS2 脱水不同时间，其 TTC 存活率列于表 2，从表中可以看出，较佳的脱水时间为 7.5 min.

表 1 过渡时间对细胞 TTC 存活率的影响

过渡时间/min	TTC 存活率/% ± S.E
0	10.1 ± 2.3
10	26.8 ± 5.9
20	20.5 ± 4.4

表 2 脱水时间对细胞 TTC 存活率的影响

脱水时间/min	TTC 存活率/% ± S.E
0	5.9 ± 0.7
2.5	15.2 ± 1.5
5.0	39.0 ± 3.7
7.5	45.0 ± 5.0
10.0	30.2 ± 5.2

细胞在玻璃化保护剂中的脱水时间极为重要，太短，保护性成分渗入不足；太长，保护剂对细胞的化学损伤增加. 不同植物对同一玻璃化保护剂的最佳脱水时间不一. 同一植物对不同玻璃化保护剂的最佳脱水时间不一. 预培养和过渡的程序不同，其最佳脱水时间也不同.

过渡处理能增加保护性成分向细胞渗入，减轻细胞在脱水时的损伤. 有些植物材料在玻

璃化冻存中不需这一步.

2.2　预培养对细胞 TTC 存活率的影响

预培养对细胞的存活至关重要,不经预培养的细胞不能存活. 取不同预培养的细胞,用 25% PVS2 过渡 10 min,再用 100% PVS2 脱水 7.5 min,其 TTC 存活率列于表 3. 从表中可以看出,单预培养效果不及双预培养,双预培养中又以 P1 和其他几个预培养的组合为佳. 一般认为,含 60g/L 糖醇类物质的较长时间的预培养(如文中的 P1)能改变细胞的大小,增加细胞壁厚度和柔韧性[8]. 含较高浓度糖醇类物质的较短时间的预培养(如文中的 P2, P3, P4)能降低胞内自由水,使液泡变小. 理论上,前者主要是通过改变细胞生长提高抗冻力,而后者主要是调节渗透压提高抗脱水力. 本文中,把这两种预培养组合,得到了较好的效果. 当然,抗冻力和抗脱水力是不能绝然分开的.

P1 + P2 的存活率不仅大于 P1 和 P2,也大于 P1 和 P2 存活率的和,说明这两个预培养间有相互作用,这在 P1 + P3, P1 + P4 中也可发现. 同一类型预培养组成的双预培养,一般观察不到这种相互作用(表 3).

表 3　预培养对细胞 TTC 存活率的影响

预培养	TTC 存活率/1% ± S.E
单预培养	
P1	16.6 ± 3.9
P2	13.3 ± 4.6
P3	21.3 ± 7.8
P4	12.2 ± 4.9
双预培养	
P1 + P2	45.0 ± 5.1
P1 + P3	44.2 ± 6.6
P1 + P4	41.1 ± 8.4
P2 + P3	26.8 ± 5.9
P2 + P4	34.5 ± 8.4

2.3　恢复培养的最佳条件

冻后细胞被接种在含山梨醇、蔗糖和淀粉的培养基上,2 d 后转移到正常的固体培养基上. 观察发现,接种在淀粉培养基上效果最好,细胞恢复生长的延滞较短,为 2～4 d,细胞生长迅速. 其他两个处理,许多细胞团要先变成黄褐色,经过 9～14 d 的延滞后才开始生长. 直接接在正常培养基上,许多团块变成白色,不能生长.

把化冻后的细胞先接种在高渗培养基上能减小去质壁分离损伤,保护细胞膜. 有些植物样品经玻璃化冻存后可直接接在正常培养基上.

在许多情况下,培养物接种到培养皿中的固体培养基上之后,由于水分的蒸发和凝聚,培养物周围往往有水渍,呈湿润状. 湿润现象不利于冻后大麦细胞的存活[9]. 本文中,淀粉的加入能消除湿润现象,使细胞在进行渗透平衡等过程时损伤最小.

2.4　细胞系重建和植株再生

2～3 周内可从恢复生长的细胞重建细胞系,新细胞系的分散度和细胞质量均与未冻对照相似.

恢复生长的细胞能在1～2个月内再生小苗. 恢复生长的细胞在几次继代后仍能再生小苗. 再生小苗在无激素培养基上继续生长,随后被移栽至温室. 移栽的28株植株均正常结实. 本研究首次报道从玻璃化法冻存的水稻胚性悬浮细胞再生大量植株,这是植物细胞超低温保存和植物细胞工程研究和应用中有意义的尝试. 关于细胞玻璃化超低温保存的深入机理研究正在进行中.

参 考 文 献

1 Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at －196℃ by vitrification. Nature, 1985, 313:573～575

2 王君晖,黄纯农. 玻璃化法-园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述. 园艺学报,1994,21(3):277～282

3 严庆丰,王君晖,黄纯农等. 水稻悬浮细胞的超低温保存研究. 实验生物学报,1994,27(4):399～409

4 黄纯农,王君晖,颜秋生等. 大麦胚性悬浮细胞系的快速建立及其超低温保存. 中国农业科学,1995,28(3):21～27

5 Fretz A, Lorz H. Cryopreservation of in vitro cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L. and *H. murinum* L.) and transgenic cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). J Plant Physiology, 1995, 146:489～496

6 Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange(*Citrus sinenesis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports, 1990, 9:30～33

7 Langis R, Sohnabel B, Earle E D *et al*. Cryopreservation of *Brassica compestris* L. cell suspensions by vitrification. Cryo-letters, 1989, 10:421～428

8 Withers L A. Long-term preservation of plant cells, tissues and organs. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, 1987, 4:221～272

9 Fretz A, Jahne A, Lorz A. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Botanica Acta, 1992, 105(3):140～145