

研究报告 Original Papers

水稻悬浮细胞系的建立及培养条件对生物产量的影响

徐林林¹ 芦笛² 陆巍^{2,*} 张荣铎² 杨清^{1,*}南京农业大学生命科学学院¹ 分子生物学实验室, ² 光合作用实验室, 南京 210095

摘要 在附加 2,4-D 的 MS 培养基上诱导水稻 ‘中花 11’ 的愈伤组织, 并用 AA 培养基建立了胚性悬浮细胞系。改变 AA 培养基中氮源、肌醇及 2,4-D 浓度的结果表明, 5 mg·L⁻¹ 2,4-D、100 mg·L⁻¹ 肌醇和 150% AAN (AAN 为 AA 培养基中的氮源浓度) 悬浮细胞系的生物产量最高。

关键词 水稻细胞; 悬浮细胞系; 生物产量; 培养基

Establishment of Suspension Cell Line of Rice (*Oryza sativa* L.) and Effects of Different Media on BiomassXU Lin-Lin¹, LU Di², LU Wei^{2,*}, ZHANG Rong-Xian², YANG Qing^{1,*}¹Molecular Biology Laboratory, ²Photosynthesis Laboratory, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Callus of *Oryza sativa* L. cv. ‘Zhonghua 11’ were induced on MS medium with different concentrations of 2,4-D and the suspension cell line was established in AA medium. The combinations of nitrogen, inositol and 2,4-D levels were set up to investigate their effects on the biomass production of rice cv. ‘Zhonghua 11’ suspension cell in AA medium. The results showed that the highest biomass measurement was obtained on the optimized medium with 5 mg·L⁻¹ 2,4-D, 100 mg·L⁻¹ inositol and 150% AAN.

Key words rice cell; suspension cell line; biomass; culture medium

植物细胞悬浮培养 (cell suspension culture) 在现代生物学研究中有广泛的应用, 研究者在已有的水稻悬浮培养研究 (杨金水等 1979; 赵成章等 1981; 叶和春 1984) 基础上建立了许多水稻品种的悬浮细胞系 (林拥军等 1995; 向太和等 1996; 王俊丽和宋陆铎 1999; 袁力勇等 2003; 王忠安 2005)。¹ ‘中花 11’ 是通过花药培养育成的品种, 在组织培养和基因转化中有较多的研究和应用 (谢道昕等 1991; 张玲等 2002; 王爱民等 2005), 但用 AA 培养基 (Toriyama 和 Hinata 1985) 将其建立成可体外连续培养的悬浮细胞系, 并通过改变培养条件提高悬浮细胞系生物产量的研究还未见报道。本文建立了稳定的 ‘中花 11’ 悬浮细胞系, 并找出可以提高其生物产量的培养条件, 可供今后的细胞学和分子生物学研究者参考。

材料与方

实验材料为粳稻 (*Oryza sativa* L.) ‘中花

11’, 由中国农业科学院作物研究所于 1989 年用花药培养技术育成。亲本为 (‘京丰 5 号’ × ‘Tetep’) × ‘福锦’; 其中 ‘京丰 5 号’ 和 ‘福锦’ 为日本粳稻改良品种, ‘Tetep’ 是越南地方品种 (金润州 2001)。

诱导愈伤组织的培养基为 MS 培养基, 加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂、0~5 mg·L⁻¹ 2,4-D, pH 5.8, 121℃ 高温高压湿热灭菌 20 min; 28℃ 暗培养。悬浮培养基为 MS 液体培养基和 AA 培养基, 加 3% 蔗糖、3 和 5 mg·L⁻¹ 2,4-D, pH 6.0, 121℃ 高温高压湿热灭菌 20 min, AA 培养基中谷氨酰胺溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤灭菌; 28℃ 下回旋振荡 (120 r·min⁻¹), 暗培养。

诱导愈伤组织时, 取 ‘中花 11’ 成熟种子

收稿 2005-12-12 修定 2006-05-19

资助 国家科技部作物转基因专项基金 (JY-03-A-11) 和南京农业大学 SRT 项目 (0506A08)。

*通讯作者 (E-mail: luw@njau.edu.cn, Tel: 025-84395423)。

人工去皮, 经70%酒精表面消毒1 min后再以40%次氯酸钠溶液避光浸泡30 min, 无菌水冲洗5遍, 接种在附加 $0\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D的MS培养基上。20 d后, 统计愈伤组织个数, 计算愈伤组织诱导率(诱导率=愈伤组织个数/接种外植体数)。在诱导的培养基上, 愈伤组织每20 d继代1次, 观察继代过程中2, 4-D对愈伤组织褐化和分散性的影响。

将培养4个月的愈伤组织转移到液体培养基中悬浮培养, 每瓶培养基为50 mL, 接种愈伤组织为1 g, 初期继代用200目不锈钢筛过滤, 10代后直接倾倒1/3原培养物至新培养基。用AA培养基建立悬浮细胞系并测定培养物的密实体积和细胞干重(中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会1999)。用双醋酸盐荧光素(FDA)染色法鉴定细胞活力, 用丙酮制备0.5%的FDA贮液, 加入量至终浓度为0.01%, 室温下作用5 min, 荧光显微镜下观察。产生荧光的是有活力的细胞, 不产生荧光的是死细胞(中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会1999)。细胞活力以发绿色荧光的活细胞数占总观察细胞数的百分比表示。

进行影响生物产量因素实验时, 增加25%、不变、减去25% AA培养基中的基本氮源(AAN, 包括天冬氨酸、甘氨酸、精氨酸和谷氨酰胺, 这4种氨基酸浓度同比例改变)、肌醇和2, 4-D, 组合为 $3\times 3\times 3$, 共27种(即表1中组合编号为1~27); 进行提高氮源浓度对生物产量影响实验时, 基本氮源、肌醇和2, 4-D的浓度如表1中组合编号为28~33所示。

悬浮培养物以 $2\ 000\times g$ 离心, 弃去上清液, 取1 g鲜重培养物接种到表1中不同组合的培养基里, 于同样条件下培养。4 d后, 以 $2\ 000\times g$ 离心收集培养物, 于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重, 并称干重。生物产量的增加以干重增长率=干重增长量/接种干重 $\times 100\%$ 计算。所有实验均重复3次, 用SPSS 10.0软件中的Duncan's测验对所得数据进行单因素方差分析, 并用Excel 2000软件进行计算制成图表, 图中具有相同小写字母者为 $\alpha=0.05$ 水平差异不显著, 不同者为差异显著。

表1 不同培养基中2, 4-D、肌醇和基本氮源的浓度

Table 1 Concentrations of 2, 4-D, inositol and nitrogen in different medium

组合编号	基本氮源浓度 (AAN)/%	肌醇浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2, 4-D浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	75	75	3.75
2	75	75	5.00
3	75	75	6.25
4	75	100	3.75
5	75	100	5.00
6	75	100	6.25
7	75	125	3.75
8	75	125	5.00
9	75	125	6.25
10	100	75	3.75
11	100	75	5.00
12	100	75	6.25
13	100	100	3.75
14	100	100	5.00
15	100	100	6.25
16	100	125	3.75
17	100	125	5.00
18	100	125	6.25
19	125	75	3.75
20	125	75	5.00
21	125	75	6.25
22	125	100	3.75
23	125	100	5.00
24	125	100	6.25
25	125	125	3.75
26	125	125	5.00
27	125	125	6.25
28	75	100	5.00
29	100	100	5.00
30	125	100	5.00
31	150	100	5.00
32	175	100	5.00
33	200	100	5.00

AAN: AA标准培养基中的天冬氨酸、甘氨酸、精氨酸和谷氨酰胺的浓度。

结果与讨论

1 愈伤组织的诱导

接种于诱导培养基上的去皮水稻种子, 7 d后胚部位开始膨大和形成愈伤组织。20 d后, 不加2, 4-D的不能诱导出愈伤组织; 加 $1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D的培养基上均诱导出不同颜色和质地的愈伤组织(表2)。加 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D的诱导率最高, 但结构紧密, 不利于悬浮培养; 加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D诱

表2 不同浓度2,4-D对愈伤组织诱导率的影响
Table 2 Effects of different concentrations of 2,4-D on callus induction

2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	愈伤组织数/个	诱导率/%
0	0	0
1	9	30
2	16	53
3	22	73
4	13	43
5	8	27

接种的外植体数均为30个。

诱导的愈伤组织结构较为松散,呈小颗粒状,符合悬浮培养的要求。

2 愈伤组织的继代培养

将愈伤组织在诱导的培养基上继代。前几代中各培养基上都有褐化现象,但程度不同,随着继代次数的增加,褐化率都逐渐减少或消失;不同培养基上愈伤组织的分散性随着继代次数的增加而有明显差异(表3)。

表3 不同浓度2,4-D对愈伤组织褐化及分散性的影响
Table 3 Effects of different concentrations of 2,4-D on browning rates and disperse of callus

2,4-D浓度/ mg·L ⁻¹	褐化率/%		分散性
	第1次继代	第6次继代	
1	27	7	差
2	23	3	差
3	17	0	差
4	27	3	较好
5	30	0	最好

分散性好是指愈伤组织结构疏松,呈细小颗粒状,放到液体培养基中后,轻轻摇动三角瓶,小颗粒状愈伤可很快分散开。接种的外植体数均为30个。

3 悬浮细胞系的建立

悬浮细胞系建立的关键是挑选适合于悬浮培养的愈伤组织和选用合适的液体培养基。将继代在加3和5 mg·L⁻¹ 2,4-D的MS固体培养基上的愈伤组织转移到附加3和5 mg·L⁻¹ 2,4-D的MS和AA液体培养基中,MS液体培养基中的愈伤组织生长都很缓慢,且不分散开。而AA液体培养基中的愈伤组织生长旺盛,颗粒细小,分散性好,尤其是加5 mg·L⁻¹ 2,4-D的生长更快,分散性更好。

因此认为,以氨基酸为唯一氮源的AA培养基附加5 mg·L⁻¹ 2,4-D更适合于建立水稻‘中花11’的悬浮细胞系。

一般认为,悬浮细胞体系中细胞密实体积是细胞生长情况的反映,而细胞干重在一定程度则反映细胞的质量(杨远媛等2005),因此我们以干重增长率(即生物产量)衡量培养条件对悬浮细胞系的影响。将1g鲜重培养物接种在50mL液体培养基中悬浮培养,水稻悬浮细胞的密实体积和干重变化均呈“S形”,明显分为3个阶段即延迟期(0~2d)、指数生长期(3~4d)和静止期(5~6d)(图1)。指数生长期的悬浮细胞分散性好,活力高,活细胞占80%以上(图2)。在整个生长周期中,悬浮细胞生长速度较快,4d时的干重增长近1倍,第5天生长开始变慢,死亡率开始升高,因此我们认为悬浮培养的较好继代时间为4d。

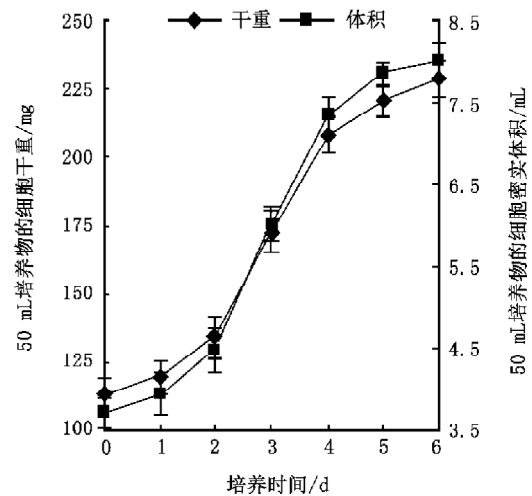


图1 ‘中花11’悬浮细胞的生长
Fig. 1 Growth of suspension cells of *O. sativa* cv. 'Zhonghua 11'

向太和等(1995)根据悬浮细胞系建立过程中细胞状态的变化,把胚性悬浮细胞系建立过程划分为前期、中期和后期。前期细胞为长条形、不规则形、近椭圆形,具有明显的大液泡,细胞质透明。中期细胞为椭圆形,细胞团周缘细胞的细胞质透明,具有明显的大液泡;而中央部位细胞的细胞质较浓厚,颗粒状内含物较丰富。后期细胞为椭圆形,细胞质浓厚,无明显的液泡,颗粒状内含物丰富;后期细胞系为胚性悬浮细胞

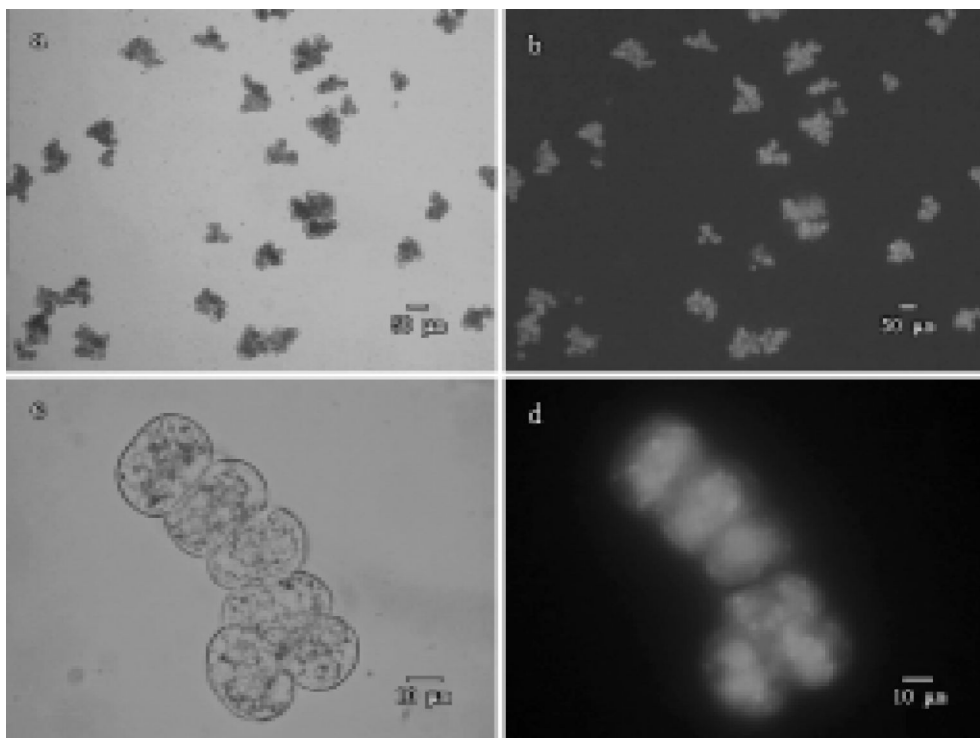


图2 ‘中花11’悬浮细胞系

Fig. 2 The suspension cell line of *O. sativacv.* ‘Zhonghua 11’

a: 普通光下悬浮细胞; b: 经蓝光激发, 发出荧光的活细胞; c: 高倍镜下的悬浮细胞; d: 高倍镜下发出荧光的活细胞。

系, 适合于进行原生质体培养。他们用这样的胚性悬浮细胞制备原生质体进行培养, 得到了以胚状体形式再生的植株。本文中的悬浮细胞系是每4 d继代1次, 经过多次继代培养后, ‘中花11’悬浮系中的细胞团大小和细胞形态已趋于稳定。细胞团是由几个到几十个细胞组成, 细胞形态与向太和等(1995)对后期胚性悬浮细胞系的描述相似(图2-c、d), 可能是胚性悬浮细胞系。

4 不同培养基对悬浮细胞系生物产量的影响

图3~5显示:

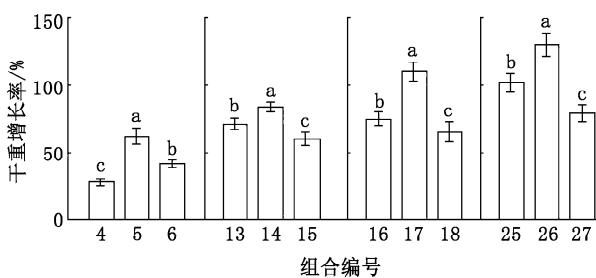


图3 不同浓度2,4-D对生物产量增长率的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of 2,4-D on the biomass increase

(1) 2,4-D浓度从 $3.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 升高到 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 干重增长率随之提高; 当2,4-D浓度增加到 $6.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 干重增长率都下降。 $6.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的干重增长率在75% AAN时的比 $3.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的高, 在100% AAN和125% AAN时的比 $3.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的低(图3)。

(2) 随着肌醇浓度的增加, 在AAN为75%和100%时, 干重增长率增加。但AAN为125%时, 干重增长率不受肌醇浓度变化的影响(图4)。

(3) AAN为75%~125%时, 干重增长率都随

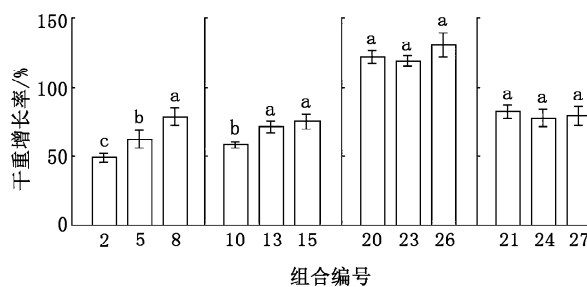


图4 不同浓度肌醇对生物产量增长率的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of inositol on the biomass increase

着氮源浓度增加而增加。当2,4-D为5 mg·L⁻¹, 肌醇为100 mg·L⁻¹时, 氮源浓度提高到150% AAN时的干重增长率达到高峰, 175% AAN时的干重增长率则开始下降, 200% AAN时的干重增长率比75% AAN时的还低(图5)。

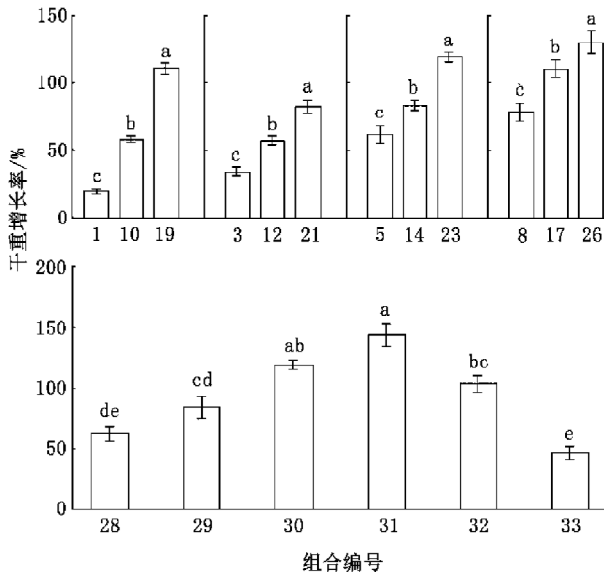


图5 不同浓度氮源对生物产量增长率的影响
Fig. 5 Effects of different concentrations of nitrogen on the biomass increase

总之, 不同种类和不同品种植物细胞培养的最佳培养条件不同。本文建立的可体外连续培养的稳定‘中花11’悬浮细胞系, 以培养基中附加5 mg·L⁻¹ 2,4-D、100 mg·L⁻¹ 肌醇和150% AAN为最适合, 可以得到较高的生物产量。

参考文献

- 金润州(2001). 粳稻花培育种. 见: 李梅芳, 周开达主编. 水稻生物技术育种. 北京: 中国农业科技出版社, 27~29
- 林拥军, 邹玉兰, 傅世耀(1995). 高效水稻细胞悬浮系建立的研究. 江西农业大学学报, 17 (4): 410~413
- 王爱民, 陈石燕, 沈革志, 王新其, 鞠丹花, 王钟林, 王宗阳, 蔡秀玲(2005). Ac/Ds (GUS)结构介导的水稻启动子捕获系统的建立. 植物生理与分子生物学学报, 31 (6): 575~580
- 王俊丽, 宋陆铨(1999). 水稻悬浮系细胞的建立及植株再生. 河北大学学报, 19 (4): 363~365
- 王忠安(2005). 水稻佳辐占成熟种胚培养及其悬浮细胞系的建立. 厦门大学学报, 44 (6): 180~181
- 向太和, 杨剑波, 吴家道(1996). 水稻、玉米胚性悬浮细胞系的有效建立. 安徽农业科学, 24 (1): 1~3, 8
- 向太和, 钟华鑫, 梁海曼(1995). 水稻胚性悬浮细胞系建立过程中的生理生化变化. 作物学报, 21 (2): 223~229
- 谢道昕, 范云六, 倪丕冲(1991). 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花11号获得转基因植株. 中国科学B辑, 8: 830~834
- 杨金水, 李美华, 蔡以欣(1979). 杂交水稻的悬浮培养及细胞分化变异的研究. 遗传学报, 1: 15
- 杨远媛, 贺窑青, 郑彩霞(2005). 油松胚珠愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立. 植物生理学通讯, 41 (5): 591~594
- 叶和春(1984). 水稻细胞悬浮培养及再生植株的研究. 植物学报, 26 (1): 52~59
- 袁力勇, 李绍清, 李阳生, 冯双华, 戴长柏, 李达模(2003). 水稻悬浮细胞系的建立. 云南大学学报, 25 (4): 373~376
- 张玲, 谢崇华, 李卫锋(2002). 水稻成熟胚组织培养研究. 杂交水稻, 2002, 17 (2): 44~46
- 赵成章, 郑康乐, 戚秀芳, 孙宗修, 傅亚萍(1981). 不同类型水稻的组织培养和细胞悬浮培养. 植物生理学报, 3: 287~290
- 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编(1999). 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 38~40
- Toriyama K, Hinata K (1985). Cell suspension and protoplast culture in rice. Plant Sci, 41 (3): 179~183