

PiA 水稻悬浮细胞系的建立

张红宇^{1,2*}, 杨富云^{1*}, 高梅¹, 徐培洲¹, 张全芳¹, 徐建第¹, 吴先军^{1,2}

1 四川农业大学水稻研究所, 温江 611130

2 四川农业大学 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014

摘要: 本研究以抗稻瘟病的粳稻 PiA 开花后 12~15 d 的幼胚为材料, 将诱导 10~15 d 的愈伤不经固体培养基继代, 直接转到 AA 液体培养基上, 在较短时间内成功建立起了优良的水稻悬浮细胞系; 并测定了该悬浮细胞系不同时期的生长特性和分化情况, 结果表明悬浮培养适宜的继代天数是 7~10 d; 培养 30~120 d 的细胞分化能力和植株再生能力较好, 细胞分化率和成苗率分别为 57.1% 和 20%, 为进一步利用悬浮细胞进行遗传转化和原生质体分离奠定了基础。

关键词: 水稻, 悬浮细胞系, 细胞分化, PiA

Rapid establishment of suspension cell lines in japonica rice

Hongyu Zhang^{1,2*}, Fuyun Yang^{1*}, Mei Gao¹, Peizhou Xu¹, Quanfang Zhang¹, Jiandi Xu¹,
and Xianjun Wu^{1,2}

1 Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

2 Key Laboratory of Crop Gene Resources and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: With Jingkang No.5 (PiA), calli of the PiA induced for 10–15 days were transferred into amino acid liquid culture medium, to establish excellent rice suspension cell lines successfully in a relative short time. The growth characteristics and differentiation conditions of suspension cells were measured at different phases. Results revealed that the optimal subculture time was 7–10 days, and the cells cultured for 30–120 days had the best differentiation ability (57.1%) and regeneration ability (20%). This study is promising in further using the suspension cell for genetic transformation and protoplasm isolation.

Keywords: rice, suspension cell lines, cell differentiation, PiA

近年来随着生物技术的发展, 悬浮细胞培养体系已被广泛用于生理学、生物化学、细胞学、发育生物学、遗传学及分子生物学的研究^[1]。与动物细胞不同, 植物细胞悬浮培养能够被建立且没有恶性变异, 由于这些优势, 植物细胞培养已被用于研究新的化学物质的新陈代谢^[2,3]、细胞周期的规律^[4-7]以及其他与细胞相关的进程^[8,9]。水稻细胞悬浮系以

其繁殖速度快、颗粒均一、操作方便等优点而被认为是水稻转基因的理想受体之一, 也是水稻原生质体高效分离、体细胞融合和高效再生的关键, 是研究体细胞无性系变异, 进行突变体筛选的基础^[1]。本试验通过对 PiA 诱导愈伤省去继代而缩短了建立优良悬浮细胞系的进程, 为水稻悬浮细胞进一步研究利用奠定了良好的基础。

Received: April 25, 2008; **Accepted:** May 21, 2008

Supported by: The Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0453).

Corresponding author: Xianjun Wu. E-mail: wuxjsau@126.com

* These authors contribute equally to this study.

教育部长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT0453) 资助。

1 材料与方法

1.1 供试材料

PiA (抗稻瘟病的粳稻品种, 由四川农业大学水稻研究所保存)。

1.2 培养基

AA 液体培养基: AA 基本成分(肌醇改为 500 mg/L)+蔗糖 3% +(2, 4-D)2 mg/L, pH 5.8; NMB 固体培养基: N6 大量成分+MS 微量成分+B5 有机成分+肌醇 100 mg/L + L-脯氨酸 500 mg/L +水解酪蛋白 300 mg/L +蔗糖 3% +(2, 4-D)2 mg/L+ 琼脂 0.8%, pH 5.8; MS 分化培养基: MS 基本成分+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L+肌醇 100 mg/L +L-脯氨酸 500 mg/L +水解酪蛋白 300 mg/L +蔗糖 3%+琼脂 0.8%, pH 5.8。

1.3 愈伤组织的诱导

取 PiA 开花后 12~15 d 的未成熟颖果, 剥壳后在 75%酒精中浸泡 4 min, 无菌水冲洗 4 次, 0.1%升汞灭菌 18 min, 再用无菌水冲洗 3~4 次, 于超净工作台上风干, 用镊子剥取幼胚接种在 NMB 固体诱导培养基上, 于 28°C 黑暗条件下诱导愈伤。

1.4 悬浮细胞系的建立

挑取诱导 10~15 d 的浅黄色、颗粒状、生长旺盛的胚性愈伤组织, 用 AA 培养液洗 2 次, 再转到装有 100 mL AA 培养液的 200 mL 三角瓶中, 每瓶约 5 g 愈伤组织, 于 28°C 黑暗条件下在 150 r/min 摇床上培养, 每 10 d 继代 1 次, 每次倒掉 3/4 的原液(大约 75 mL)后再加入等量新鲜培养液; 待瓶底出现细小颗粒状的细胞团时, 用长吸管将其吸到装有 100 mL 新鲜 AA 培养液的 200 mL 三角瓶中继续振荡培养(条件同前), 以后每次用长吸管吸取 5~7 管鲜嫩细小的细胞团到新鲜培养液中继代培养, 每 10 d 继代一次。

1.5 悬浮细胞生长特性的测定

根据向太和等^[10]的方法, 结合 PiA 胚性悬浮细胞系建立过程中细胞状态的变化, 将 PiA 悬浮细胞建立过程划分为前期 (EP, 0~30 d)、中期 (MP, 30~120 d)、后期 (LP, 120~180 d)。分别取悬浮培养 15、80、150 d 的细胞为试样进行继代, 再分别取继代后第 3、5、7、10、12 天的试样, 500 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液(用 pHS-25 型 pH 计测定其 pH 值)和沉淀。真空抽滤掉沉淀水分, 称其鲜重, 再将沉淀放入 60°C

烘箱中 12 h, 称其干重。分别计算鲜重和干重的相对生长量, 再进行平均。计算细胞的相对生长量:

$$P=(W_1-W_0)/W_0\times 100\%$$

式中: P 为相对生长量; W_1 为取样时重量; W_0 为初始重量。

1.6 悬浮细胞分化能力的测定

分别取与生长特性测定同步的 3 个时期的悬浮细胞到 NMB 固体培养基上继代培养, 20 d 后转到装有 MS 分化培养基的试管中进行分化培养, 观察并记录继代与分化情况。

2 结果与分析

2.1 悬浮培养细胞的生长特性

测定了 3 个不同时期的悬浮培养细胞的生长曲线, 如图 1 所示, 3 个时期的悬浮培养细胞在继代后前 5 天都保持缓慢的生长, 相对生长量在 100%~150%之间; 从第 5 天开始到第 10 天进入对数生长期, 最高相对生长量达到了 350%; 第 10 天到第 12 天趋于平缓。其中前期和中期的生长曲线靠得很近, 而后期要偏低些, 表明随着继代次数的增加, PiA 细胞活力在下降。

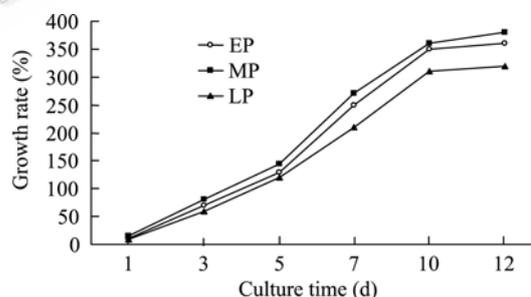


图 1 悬浮培养细胞不同时期的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of suspension culture cells at different phases. EP: early phase; MP: middle phase; LP: late phase.

对悬浮细胞培养 3 个不同时期的培养液进行 pH 值测定。如图 2 所示, 前期和中期在第 7 天降到最低值 4.2 左右, 从第 7 天起培养液的 pH 值又快速上升, 在第 10 天达到 5.0, 在第 10~12 天期间上升幅度较小, pH 值在 5.2 附近; 而后期在第 5 天降至最低 4.3, 第 7 天与其接近, 然后又快速上升, 到第 10 天为 5.0, 第 10~12 天减缓上升直到 5.2。3 个时期在继代后 5 d 以前的 pH 值都急剧下降, 在第 5~7 天期间为低谷, 然后快速回升, 到第 10 天后回升速度减缓。将此曲线与悬浮细胞的生长曲线相比较, 可以

看出细胞生长与培养液 pH 的变化有一定的相关性, 当细胞增长缓慢时, 培养液的 pH 值迅速下降; 而当细胞增长迅速时, 培养液的 pH 值也随着升高; 最后细胞的生长基本稳定时培养液的 pH 值也保持相对稳定。由此推测, 悬浮培养周期不宜过长, 7~10 d 之间继代一次较适宜。在不同植物的悬浮培养中也存在细胞增殖与 pH 值升降之间的关系, 但它们各具其特点^[11,12]。

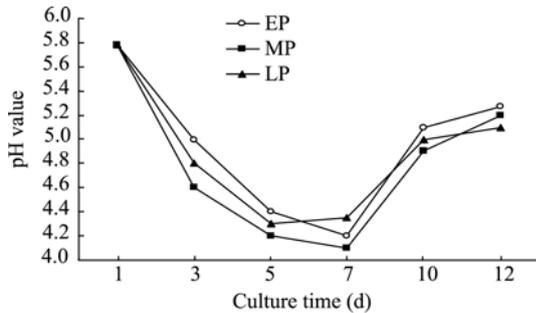


图 2 悬浮细胞培养液不同时期的 pH 变化曲线
Fig. 2 pH curves of suspension cells cultures at different phases.

2.2 不同时期悬浮培养细胞的分化表现

从表 1 可知, 3 个不同时期的悬浮培养细胞在 NMB 固体继代培养基上都形成了愈伤组织, 数量上都差不多, 但前期和中期的愈伤质量比后期好; 在分化上 3 个时期都有绿点和苗形成(图 3d, e)。其中, 前期和中期的分化率分别为 57.1%和 47.6%, 没有太大差异, 而后期的分化率相对低得多, 仅为 12.5%; 从成苗率来看, 3 个时期的都较低, 最高的中期也只有 20%, 前期为 14.3%, 而后期最低, 只有 2.5%。将此表与生长曲线图比较一下也可看出之间有一定关系, 后期细胞生长力和再生能力都很低。所以认为在用悬浮细胞做遗传转化和获取原生质体时, 取前期和中期的较适宜, 尤其是中期的细胞。

表 1 不同时期悬浮培养细胞的分化表现

Table 1 Manifestation of differentiation of suspension culture cells at different phases

Phase	Inoculation amount (mL)	Subculture performance (callus amount and state)	Differentiation green spot	Amount of regenerated plantlet	Differentiation rate (%)	Regeneration rate (%)
EP	20	42 pieces of callus tissue light yellow granula, with water stain on the surface	20	6	47.6	14.3
MP	20	49 pieces of callus tissue light yellow, loose granula with white surface	28	10	57.1	20
LP	20	40 pieces of callus tissue milk white, loose granula, dispersed with dry surface	5	1	12.5	2.5

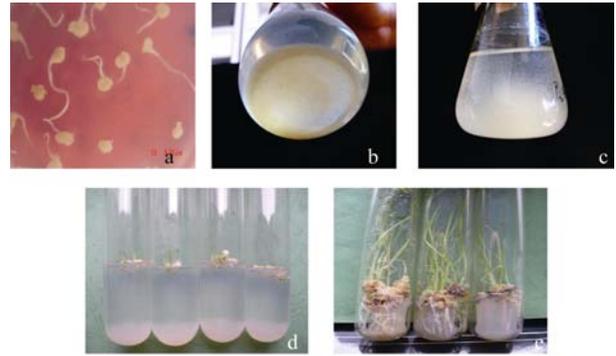


图 3 悬浮细胞系建立过程中的愈伤组织和悬浮培养细胞以及悬浮细胞的分化苗

Fig. 3 Calli and suspension culture cells during the process of the establishment of suspension cell lines, and the differentiation seedlings from suspension culture cell. a: the calli of induction; b, c: suspension culture cell lines; d, e: differentiation of seedlings.

3 讨论

3.1 悬浮培养细胞继代时间对其活力的影响

植物细胞液体培养有聚集倾向, 使原来的小细胞团逐渐变大, 所以要及时继代培养, 不断地选择那些新长出的小细胞团, 以保持培养细胞处于旺盛生长状况, 这是水稻细胞悬浮培养的关键技术之一。生长曲线可以直观地反映悬浮细胞的生长动态, 根据 PiA 愈伤悬浮细胞的生长曲线, 用于继代培养的悬浮细胞系可选择在 7~10 d 继代一次, 这样可以保持其旺盛的生长力。进行原生质体培养、继代筛选等可以在此期间进行, 否则时间过长, 细胞衰老, 活力下降。

3.2 悬浮培养液 pH 值的变化

Amino & Tazawa^[13]报道在水稻悬浮细胞中早期蔗糖的快速水解会导致培养液的 pH 值相应下降; 向太和等^[14]也报道在水稻悬浮细胞培养前 5 天 pH 值快速下降, 第 5~7 天时趋于平稳; 本实验中培养液

pH 值在开始培养时迅速下降, 与向太和等^[10]的报道相符合, 但之后又快速回升。可能是随着细胞的快速增殖培养液中的酸性氨基酸被吸收后所引起的。本研究表明在一个继代周期内随着细胞的生长, pH 值的变化趋势是先迅速下降, 再上升, 最后基本趋于稳定。这也与陈琰等在小麦悬浮细胞培养中的报道一致^[15]。对于 pH 值呈“V”字型变化的具体原因还不清楚, 还需要做进一步的研究。

3.3 在固体培养基上继代的次数对悬浮细胞质量的影响

良好的细胞悬浮系是进行遗传转化、原生质体获取以及植株再生的根本保证。有报道认为, 在建立悬浮细胞时, 愈伤组织先要在固体培养基上继代 4~7 次较好, 随着继代次数的增加, 愈伤组织转入液体培养后形成的悬浮系的质量越来越高, 固体继代 7 次后形成的悬浮系其鲜重增长率、分散程度、圆细胞率都明显地好于固体继代 2 次后形成的悬浮系^[16]。但本试验的固体愈伤没有经过继代, 直接将诱导 10~15 d 的愈伤(图 3a)转到 AA 液体培养基中, 也建立了较好的悬浮细胞系(图 3b, 3c), 在建立悬浮细胞系后 120 d 内, 悬浮细胞的分化能力都较强(表 1)。而且从时间上看, 继代 4 次后再建立悬浮细胞系要花至少 120 d, 在本研究中只需要 40 d, 缩短了大约 80 d 的时间建立悬浮细胞系。

REFERENCES

- [1] Sun JS, Gui YL. Laboratory Techniques of Plant Cell Engineering. Beijing: Science Press, 1995: 36.
孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995: 36.
- [2] Davey MW, Gilot C, Persiau G, et al. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiol*, 1999, **121**: 535-143.
- [3] Meyer AJ, Fricker MD. Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiol*, 2002, **130**: 1927-1937.
- [4] Fabian-Marwedel T, Umeda M, Sauter M. The rice cyclin-dependent kinase-activation kinase R2 regulates S-phase progression. *Plant Cell*, 2002, **14**: 197-210.
- [5] Magyar Z, Bako L, Bogre L, et al. Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J*, 1993, **4**: 151-161.
- [6] Menges M, Murray JA. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J*, 2002, **30**: 202-212.
- [7] Menges M, Hennig L, Gruissem W, et al. Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Mol Biol*, 2003, **53**: 423-442.
- [8] Fukuda H, Ito M, Sugiyama M, et al. Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell suspension systems. *Int J Dev Biol*, 1994, **38**: 287-299.
- [9] Hosseini R, Mulligan B. Application of rice (*Oryza Sativa* L.) suspension culture in studying senescence *in vitro* (I) single strand preferring nuclease activity. *Electron J Biotechnol*, 2002, **5**: 42-54.
- [10] Xiang TH, Yang JB. Cytology study during the process of establishment of suspension cell lines of rice. *J Anhui Agr Sci*, 1993, **21**(1): 1-6.
向太和, 杨剑波. 水稻胚性悬浮细胞系建立的细胞学研究. 安徽农业科学, 1993, **21**(1): 1-6.
- [11] Tu YS, Jiang HR, Wang BQ. Studies on the suspension cell cultures of *Sarcandra glabra*. *Jiangxi Sci*, 1994, **12**(3): 162-166.
涂艺声, 江洪如, 王碧琴. 草珊瑚细胞悬浮培养之研究. 江西科学, 1994, **12**(3): 162-166.
- [12] Mei XG, Yu F, Zhang Z. Research of structured kinetic model for *Taxus chinensis* cell suspension culture. *Biotechnology*, 2000, **10**(3): 8-11.
梅兴国, 余斐, 张姝. 红豆杉细胞悬浮培养结构化数学模型的探讨. 生物技术, 2000, **10**(3): 8-11.
- [13] Amino S, Tazawa M. Uptake and utilization of sugars in cultured rice cells. *Plant Cell Physiol*, 1988, **29**(3): 483-487.
- [14] Xiang TH. Physiological and biochemical changes during the establishment of embryogenic suspension cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sini*, 1995, **21**(2): 223-229.
- [15] Chen Y, Zhang J, Wang DM. Primary study on establishment of cell suspension culture of wheat lovrin 10. *J Agr Univ Hebei*, 2005, **28**(4): 68-70.
陈琰, 张洁, 王冬梅. 建立小麦洛夫林 10 悬浮系初探. 河北农业大学学报, 2005, **28**(4): 68-70.
- [16] Yin QL, Liu SQ. Studies on suspension lines and single cell culture of rice. *J Shenyang Agr Univ*, 1994, **25**(4): 366-372.
尹庆良, 刘世强. 水稻细胞悬浮系及其单细胞培养的研究. 沈阳农业大学学报, 1994, **25**(4): 366-372.