

# 谷子胚性细胞系的超低温冰冻保存

董晋江 夏镇澳

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

**摘 要** 超低温冰冻保存是保存生物材料的一种方法。目前禾本科植物原生质体培养的主要问题之一是胚性细胞系的状态不稳定。试验比较了影响谷子 (*Setaria italica* (L.) Beauv) 胚性细胞系超低温冰冻保存的因素如: 不同的冰冻保护液组成, 不同培养时间的胚性细胞系以及细胞系的恢复生长和原生质体培养。结果表明: 本实验采用超低温冰冻保存方法不会影响胚性细胞系原生质体的培养特性, 能够保持或提高原生质体培养的植板率。

**关键词** 超低温冰冻保存, 谷子, 胚性细胞系, 恢复增长率, 活力保持率, 细胞类型分布

超低温冰冻保存应用范围很广, 最初用于动物细胞, 微生物和整株植物的冰冻保存, 冰冻伤害及保存体外培养物的研究<sup>[1~4]</sup>。超低温冰冻保存在植物科学研究中已从种质保存发展到保存不同特性的细胞系<sup>[5,6]</sup>, 如: 产生次生代谢物质的细胞系, 原生质体<sup>[7,8]</sup>, 胚芽和细胞器<sup>[9,10]</sup>等。冰冻保存的方法也在不断地完善<sup>[11~14]</sup>。在原生质体培养的研究中, 我们发现即使在同样的培养基中继代培养的胚性细胞系, 也会因继代次数的增多而发生变化, 原生质体培养结果受到影响, 这是原生质体培养技术不稳定的主要原因之一。解决这个问题的方法有多种; 如采用合适的培养方法, 不断诱导愈伤组织, 用同样的方法培养以保持材料的连续性, 超低温冰冻保存等。超低温冰冻保存可以使细胞处于静止状态, 在合适的条件下解冻后, 能重新进入正常生长。胚性细胞系的培养时间不会因超低温冰冻保存而延长, 其再生植株能力得到保持。在谷子原生质体培养得到再生植株后<sup>[15]</sup>, 我们研究了影响谷子胚性细胞超低温冰冻保存的条件和恢复生长及其对原生质体培养植板率的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 胚性细胞系超低温冰冻保存

谷子胚性细胞系<sup>[15]</sup>在预培养基 (MS 培养基的大量元素, 微量元素, 维生素, 2.0mg/L 2, 4-D, 30g/L 蔗糖, 30g/L 甘露醇, 3g/L 琼脂糖, pH5.8) 中培养一周左右, 把细胞团转接到无菌的冰冻保存管内, 在冰浴中滴加冰冻保护液至细胞团被完全浸没, 在冰浴中平衡 1h, 置于 -40℃ 下约 40min, 然后浸入液氮中保存。

把冰冻保存的细胞系从液氮中取出立即浸入 60℃ 水浴中 1min, 然后放在冰浴中直到恢复到 0℃, 用无菌药勺把细胞团转接到恢复生长的培养基 (同预培养基)。如果需要洗涤, 液体洗涤培养基 (同固体预培养基组成, 但无琼脂糖) 需置于 0℃, 把细胞团放入洗 2~3 次然后转入恢复生长培养基 (同预培养基)。

## 1.2 细胞系的谷氨酸脱氢酶 (GDH) 细胞类型分布测定

利用显微光度图象分析系统 (MD-20, Image Analysis System, Leitz), 对经过组织化学染色的离析细胞进行染色分析。GDH 检测液: 0.1mol/L Tris-HCl pH7.5, 0.02mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 8mg/ml 谷氨酸单钠盐, 0.3mg/ml 辅酶 I, 0.2mg/ml NBT, 0.04mg/ml PMS。

细胞离析液: Cellulase Onozuka R-10 2%, Pectolyase Y-23 0.1%, CPW pH5.8。

细胞固定液: 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2), 2%多聚甲醛, 2.5%戊二醛酸 [汪德耀 1986]。

材料先用 0.1mol/L Tris-HCl pH7.5 浸泡 5min, 把材料取出放入 GDH 检测液, 在暗中 30℃下培养 1h, 去除 GDH 检测液加两倍材料体积的固定液, 在室温下放 30min, 蒸馏水冲洗至少 3 次。细胞离析液处理 (28℃) 2h 或到细胞离析为单细胞。取约 50 $\mu\text{l}$  的离析细胞溶液进行消除背景干扰, 测量染色密度, 按照不同的染色量把细胞分类, 类型 I 到类型 V 的单位细胞染色量 (单位为象数点 pixels/细胞) 分别为: 115-317, 318-517, 518-717, 718-917 和 918-1120。统计各类细胞所占的百分数, 不同类型细胞存在的百分数即为该细胞系的细胞类型分布。

在测定过程中, 可见光系统, 编辑处理过程完全相同, 包括: 光强, 光质, 放大倍数, 摄像机选择, 阈值的确定和测量染色特征的方法。

## 2 结果和讨论

### 2.1 结果

利用表 1 中所示的不同冰冻保护剂组成的 6 种冰冻保护液对继代培养 7d 的胚性愈伤组织进行超低温冰冻保存。结果证明: 保护于液氮和 -40℃下, V, VI 这两种冰冻保护液保存的细胞系的恢复生长率均高于其它冰冻保护液的 (图 1)。添加一定浓度的  $\text{CaCl}_2$  和脯氨酸有益于冰冻保存。并且从图 1 和图 2 可以看出, 经冰冻保存的细胞系其用于原生质体培养的特征与对照无明显差异。通过对不同继代培养时间的胚性细胞系进行超低温冰冻保存, 发现处于旺盛生长期 (继代培养后 6~12d) 的材料其冰冻保存的结果不如其它培养时期的 (图 3)。与保存前的细胞系细胞类型分布相比, 经过冰冻保存的细胞系

表 1 冰冻保护液组分

Table 1 Components of cryopreserve-solutions

Cryopreserve-solutions	Components					
	mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>				mg $\cdot$ L <sup>-1</sup>	
	Sucrose	Glucose	DMSO	Glycerol	$\text{CaCl}_2$	Proline
I	2.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0
II	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0
III	2.0	0.0	1.0	1.0	0.0	10.0
IV	2.0	0.0	1.0	1.0	20.0	0.0
V	2.0	0.0	1.0	1.0	20.0	15.0
VI	0.0	2.0	1.0	1.0	20.0	15.0

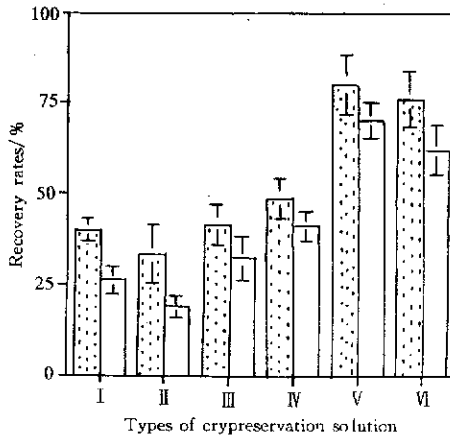


图 1 不同的冰冻保护液对胚性愈伤组织（继代培养 10d 的）恢复生长率的影响

Fig. 1 Effects of different cryopreservation solutions on recovery rates of embryogenic calli (10days subculture)

□ -196°C,      ▨ -40°C



图 2 经超低温保存恢复生长后的胚性愈伤组织

Fig. 2 Growth recovery of embryogenic calli after cryopreservation

恢复生长后的第一和第二代培养物的同步化程度增高，其 GDH 细胞类型分布更接近于胚性愈伤组织的（表 2），Ⅳ类细胞的百分数在冰冻保存前是 37.1%，冰冻保存处理后经几次继代培养Ⅳ类细胞的百分数从 75.3%，70.2%恢复到 39.6%，从其它类型百分数（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ和Ⅴ）也能看出类似的趋势。

表 2 超低温冰冻保存对胚性愈伤组织谷氨酸脱氢酶细胞类型分布的影响

Table 2 Effects of cryopreservation of embryogenic calli on glutamate dehydrogenase cell type compositions

Embryogenic calli	Glutamate dehydrogenase cell type compositions (pixels/cell)				
	I	II	III	IV	V
Pre-cryopreservation	28.7	6.4	7.6	37.1	20.2
after recovered growth					
1st subculture	2.3	4.6	8.9	75.3	9.1
2nd subculture	9.2	7.3	4.2	70.0	9.1
5th subculture	18.3	13.3	12.7	39.6	16.1

## 2.2 讨论

从试验所得结果可看出有以下一些问题值得注意。

（1）冰冻保护剂：糖类，二甲亚砜，甘油是必要的组分，蔗糖的保护效果优于其它糖类，添加脯氨酸和  $\text{CaCl}_2$  的冰冻保护剂效果比较好。不同冰冻保护剂和不同生理状态的细胞系冰冻保存的结果，主要差别是在恢复生长率上（图 1）。

（2）保存在  $-40^\circ\text{C}$  的不如在  $-196^\circ\text{C}$  的，可能的原因是  $-40^\circ\text{C}$  时细胞内仍然能形成冰晶从而影响细胞的恢复生长率（图 1），而在  $-196^\circ\text{C}$  下不能形成冰晶<sup>[16]</sup> 所以影响较小。

（3）通过对不同继代培养时间的细胞系进行冰冻保存，可见生长最旺盛时期的冰冻保存结果不如其它时期的。随着进入对数生长期，经冰冻保存的细胞系其活力保持率和恢复生长率也在不同程度地降低（图 3）。在生长最旺盛时期的细胞增殖速度大，对逆境的反应比较强烈，而不在生长最旺盛时期的细胞所受的伤害小。

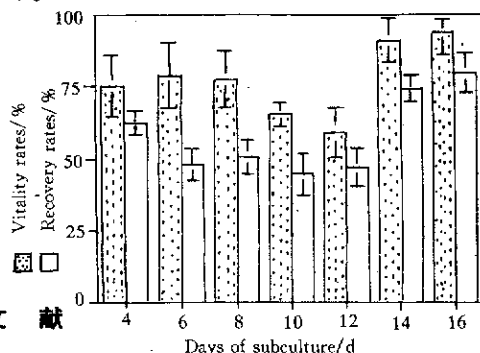
（4）超低温冰冻保存影响了愈伤组织的各类细胞发生变化。试验观察到不同液泡化

程度的细胞在保持过程中受到的影响有差异。液泡化大的较易受到伤害。在恢复生长后继代培养第一、第二代时, 其谷氨酸脱氢酶细胞类型分布与冰冻保存前有明显差异; 而到第五代时才逐渐恢复到类似冰冻保存前 (表 2)。

图 3 超低温冰冻保存对胚性愈伤组织活力保持率和恢复生长率的影响

Fig. 3 Effects of cryopreservation on vitality and recovery rates of embryogenic calli

Cryopreservation solution type V in Table 1.



### 参 考 文 献

- [1] 唐定台, 杨志琦, 山田康之. 植物学报, 1988, 30: 357.
- [2] Nag K K, Street H E. Nature, 1973, 245: 270.
- [3] Withers L A. Plant Physiol. 1979, 63: 460.
- [4] Leverone L, Pence V C. Amer J Bot, 1994, 81 (6 suppl.): 9.
- [5] Withers L A. In: Kartha K K (ed), Cryopreservation of plant cell and organs, CRC Press Boca Raton, Florida, 1985, 243.
- [6] Klimaszewka K, Ward C, Cheliak W M. J Exp Bot, 1992, 43: 73.
- [7] Langis R, Steponkus P L. Plant Physiol. (Bethesda) 1990, 92: 666.
- [8] 张士波, 钱迎倩. 植物原生质体培养 (孙勇如, 安锡培主编), 北京: 科学出版社, 1991, p. 45.
- [9] Yuan J, Cline K, Theg S M. Plant Physiol. (Bethesda), 1991, 95: 1259.
- [10] Brison M, de Boucaud M, Dosba F. Plant Sci, 1995, 105: 235.
- [11] 简令成. 植物学报, 1987, 29: 123.
- [12] Withers L A. Plant Physiol. 1979, 63: 460.
- [13] Kuwano K, Aruga Y, Saga N. J Phycol, 1994, 30: 566.
- [14] Percy R E, Livingston N, Von Aderkas P. Plant Physiol. (Rockville) 1994, 105: (1 suppl.) 120.
- [15] 董晋江, 夏镇澳. 科学通报, 1990, 35: 538.
- [16] Toner M, Rinkes I H M B, Karlsson J O M, Tompkins R G et al. FASEB Journal 1994, 8 (4-5), A409.

## Ultra Low Temperature Cryopreservation of Embryogenic Cell Lines of Foxtail Millet (*Setaria italica* L. Beauv)

Dong Jinjiang Xia Zhenao

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

**Abstract** One of the main problems of protoplast culture of cereal crops is that the state of embryogenic cell lines is not stable. To preserve the embryogenic cell lines of foxtail millet, we tested the feasibility of applying and modifications (components of cryopreservation solutions, and cell lines of different subculture times) of the ultra low temperature cryopreservation, which being reported to successfully preserve various kinds of biological materials. Results showed that the optimized cryopreservation methods could preserve the cell lines without changing their property of tissue cultures, and the plating efficiencies of protoplast culture could be maintained or enhanced after the cryopreservation.

**Key words** Cryopreservation, embryogenic cell lines, foxtail millet (*Setaria italica* L. Beauv), recovery percentage, vitality retaining percentage, GDH cell type compositions