

水母雪莲愈伤组织超低温保存条件的初探

陈书安, 王晓东, 赵兵, 王玉春

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:初步研究了水母雪莲愈伤组织的超低温保存方法. 结果表明, 预培养、保护剂、预处理、冰冻后处理对愈伤组织存活率都有一定影响. 水母雪莲愈伤组织预培养基为添加 5% 二甲基亚砷的 MS 培养基, 优化的冰冻保护剂是 15% 二甲基亚砷+15% 乙二醇+30% 甘油的 0.4 mol/L 蔗糖液, 冰冻保护剂的预处理温度是 15°C, 时间为 10 min, 解冻温度 25~35°C; 在 25°C 水浴中含用 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 溶液反复洗 3 次, 每次 10 min. 用 TTC 法测定细胞存活率可达 58.5%.

关键词:水母雪莲; 超低温保藏; 愈伤组织

中图分类号: Q949.714 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2002)06-0539-05

1 前言

雪莲系菊科(Compositae)菜蓟族(Trib. Cynreae Lee)凤毛菊属(*Saussurea spp*)雪莲亚属或雪兔子亚属多年生草本植物, 是我国 3 类珍稀保护植物^[1]. 雪莲中含有黄酮、生物碱、多糖等多种药用成份, 具有抗炎、抗癌、抗疲劳等功效, 可以治疗风湿性关节炎、月经不调、高山不适应等症^[2]. 雪莲在我国甘肃、青海、西藏、新疆等地区均有分布, 一般生长于海拔 4000 m 以上的高山流石滩上, 在自然条件下生长缓慢, 人工种植困难, 长期的掠夺性采挖, 已经使雪莲成为濒危物种^[3].

应用细胞培养技术进行雪莲细胞培养既可以满足临床上对雪莲药物的需求, 又保护了自然资源, 维护了生态平衡^[4]. 但是在组织培养中发现雪莲细胞容易变异, 造成黄酮类物质含量下降. 超低温(-196°C)冰冻保存是解决种质退化和防止自然积累性突变的一种有效途径^[5], 但传统的超低温保存需要昂贵的程序降温仪器, 步骤繁琐^[6]. 完全玻璃化是低温保存的一种新方法, 即在高浓度保护剂下, 细胞连同保护剂于快速降温中都进入玻璃化状态, 避免胞内外冰晶形成, 使器官和组织各部分都进入相同的状态, 比其它超低温保存方法具有设备简单、程序简单和冻存效果好等优点, 在保存器官和组织的结构完整性方面有独到之处^[7, 12].

本工作采用一种简便的玻璃化途径, 初步研究了水母雪莲(*Saussurea medusa Maxim*)愈伤组织的超低温保存, 为雪莲种质保存研究奠定了基础.

2 材料与方法

2.1 实验材料

水母雪莲愈伤组织(本实验室诱导), 在加 0.5 mg/L 6-BA 和 2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基^[8]上继代培养, 取培养 15 d 或 20 d 的愈伤组织为实验材料.

2.2 实验方法

2.2.1 预培养

将培养 15 d 的水母雪莲愈伤组织转接于含 5% 二甲基亚砷的 MS 固体培养基上, 预培养 5 d 备

用；以培养 20 d 不经过预培养的水母雪莲愈伤组织为对照。

2.2.2 冻存保护剂浓度的选择

以 30%甘油、15%乙二醇为基本保护剂，添加不同浓度的二甲基亚砷和蔗糖配成不同的冻存保护剂。称取 150 mg 左右的水母雪莲愈伤组织，加入液氮保藏管，添加冻存保护剂至 1.8 ml。愈伤组织与保护剂在室温(27°C)下静置 15 min，投入液氮中 2 h 取出，在室温(27°C)下解冻后，用吸管移出冻存保护剂，以含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 培养基作洗涤剂在水浴中振荡洗涤 3 次，每次 10 min。

2.2.3 雪莲细胞存活率(TTC 法)的检测^[9]

将解冻并洗涤的愈伤组织立即投入 10 ml 试管中，加入 3 ml TTC 溶液，并以未受冻的健康样品作为对照；在 22°C 的水浴中培育 12~18 h，吸去 TTC 溶液，用蒸馏水清洗 2~3 次；3000 r/min 离心 5 min，收集细胞。加入 95%酒精 3 ml，在 60°C 恒温水浴中保温 10 min 左右。抽提酶活性反应生成的红色甲簪，冷却后，用 95%酒精定容到 3 ml，摇匀，取抽提液在 722 型分光光度计 485 nm 下测定吸收值；该吸收值显示细胞的相对活力，本文用保存材料的吸收值与对照样品吸收值的比值表示冰冻保存后细胞的存活率：

$$\text{存活率} = \frac{\text{冷冻后样品吸收值} \times \text{健康样品的质量}}{\text{健康样品吸收值} \times \text{冷冻品的质量}}$$

3 结果与讨论

3.1 不同保护剂对比对组织细胞的影响

保护剂种类和浓度以及组合方式对细胞的存活有很大影响^[10]。一般而言，高浓度的低温保护剂组合有利于玻璃化的形成，但加剧了对冻存材料的毒性。在实际应用中，通过调整保护剂的组合，达到多种效应的最佳状态，从而降低由于高浓度保护剂带来的毒性作用，增强保护效果。二甲基亚砷作为渗透型冻存保护剂，是生物学上可接受的玻璃化溶液的基本组份，其玻璃化形成能力相对较好，对细胞的渗透快且低毒，是复合保护剂中主要的低温保护剂^[11]。表 1 列出了预培养和冰冻保护剂对水母雪莲愈伤组织存活率的影响结果。

表 1 预培养和冰冻保护剂对愈伤组织存活率的影响
Table 1 Effect of cryoprotectant on the survival rate of callus

Concentration of cryoprotectant		Survival rate of <i>Saussurea medusa</i> callus (%)	
Dimethyl sulfoxide (%)	Sucrose (mol/L)	Indicates callus precultured	Indicates not precultured
5	0.2	34.7	20
	0.4	40.9	25.6
	0.8	35.2	18
10	0.2	42.3	30.2
	0.4	44.7	35
	0.8	42.8	24.3
15	0.2	41.3	34.1
	0.4	54.2	32
	0.8	50.7	35
20	0.2	30.5	24
	0.4	45.5	36.8
	0.8	43.0	32.5

在培养基中加入 5%二甲基亚砷对愈伤组织进行预培养，是为了增强组织细胞的抗寒力。表 1 数据明显表明，经过这样的预培养处理，能够大幅度地提高愈伤组织细胞的存活率，有利于玻璃化冻存。因此，预培养是水母雪莲愈伤组织玻璃化冻存中的重要环节。

此外,从表 1 的数据可以看出,随着二甲基亚砷浓度的提高,水母雪莲愈伤组织经冻存后的细胞存活率均有显著提高.当二甲基亚砷浓度达到 15%时,组织细胞的存活率达到最高.蔗糖属于非渗透型冻存保护剂,虽不能进入细胞,但在快速冷却时可使胞内水份部分渗出,缓解胞内的结冰情况,从而起到保护作用.在与二甲基亚砷配比中,蔗糖的最佳作用浓度是 0.4 mol/L.因此,本实验的最佳保护剂组合是 15%二甲基亚砷+15%乙二醇+30%甘油的 0.4 mol/L 蔗糖液,在该保护剂组合下,水母雪莲愈伤组织经玻璃化冻存后的存活率为 54.2%.本工作在此冰冻保护剂组合的基础上,研究保护剂处理温度、时间、解冻温度等对存活率的影响.

3.2 保护剂温度对愈伤组织存活率的影响

冰冻保护剂的温度会影响保护剂对细胞的毒性,进而影响细胞的存活率^[12].不同保护剂处理温度对水母雪莲愈伤组织存活率的影响见表 2.由表可知,处理温度较低时,雪莲细胞存活率较高,而在较高的温度(35°C)下,细胞存活率下降.原因是在低温下进行处理可减轻保护剂对组织细胞的毒性,高温下会增加保护剂对细胞的毒性^[13].

表 2 冻存保护剂处理温度对愈伤组织存活率的影响
Table 2 Effect of treatment temperature on the survival rate of callus

Treatment temperature (°C)	5	15	25	30	35
Survival rate of <i>Saussurea medusa</i> callus (%)	50.5	56.1	54.5	48.6	32.0

3.3 保护剂处理时间对愈伤组织存活率的影响

15°C 温度下,保护剂处理时间的影响结果见表 3.由表可见,过长的处理时间不利于细胞存活率的提高,水母雪莲愈伤组织的适宜处理时间为 5~15 min.此条件下细胞存活率为 53.2%~54.2%.

表 3 保护剂处理时间对愈伤组织存活率的影响
Table 3 Effect of treatment time on the survival rate of callus

Treatment time (min)	5	10	15	20
Survival rate of <i>Saussurea medusa</i> callus (%)	53.2	53.6	54.2	45.5

3.4 解冻温度对愈伤组织存活率的影响

植物冻害发生在冰冻和解冻两个过程中,在解冻过程中会发生玻璃化逆转,当进一步升温时,小的冰晶开始融化,水份重新分配,形成大冰晶,对细胞有机机械损伤.因此,欲使植物组织的超低温保存获得成功,不仅需要合适的降温冰冻程序,而且还要求采取合适的解冻方法,以避免在解冻过程中产生细胞内的次生结冰,并防止在解冻吸水过程中的渗透冲击对细胞膜体系的破坏.因此,可采用迅速解冻方法解决这一问题.另外,超低温材料解冻时,再次结冰的危险温度区域约为 -50~-10°C,从理论上说,可借助迅速的解冻速度通过此温度区,避免细胞内次生结冰^[14].在预处理温度和时间分别是 15°C 和 10 min 的条件下,对冰冻水母雪莲愈伤组织进行了不同解冻温度实验,结果见表 4.从表来看,在常温(25°C)和较高温度(35~40°C)下解冻,水母雪莲愈伤组织细胞存活率都较高,且差别不大,因此,25~40°C 是较理想的解冻温度.

表 4 解冻温度对愈伤组织存活率的影响
Table 4 Effect of recovery temperature on the survival rate of callus

Recovery temperature (°C)	5	15	25	35	40	50
Survival rate of <i>Saussurea medusa</i> callus (%)	36.8	41.6	54.2	55.6	56.8	38.6

3.5 洗涤剂中蔗糖浓度对存活率的影响

解冻后残留于细胞内外的冰冻保护剂会影响细胞的恢复和生长, 冻存后细胞的洗涤可除去高浓度的保护剂, 但是没有必要将保护剂彻底除去, 因为连续的洗涤会进一步损伤细胞^[12]. 在冰冻保护剂的预处理温度和时间分别是 15°C 和 10 min、解冻温度 25°C, 洗涤 3 次每次 10 min 条件下, 洗涤液中蔗糖浓度对存活率的影响见表 5. 由表可知, 蔗糖浓度以 1.0 和 1.2 mol/L 为宜, 过高或过低都对细胞存活不利. 其它研究也表明洗涤液中蔗糖浓度的高低直接关系到洗涤效果的好坏^[15], 这可能是因为洗涤液中渗透压的高低主要受到蔗糖浓度的影响, 若蔗糖浓度过低, 洗涤液的渗透压也过低, 细胞由于膨胀而受伤; 反之, 若蔗糖浓度过高, 则渗透压过高, 而高渗溶液本身对细胞就是一种伤害.

表 5 糖浓度对愈伤组织存活率的影响

Table 5 Effect of sucrose concentration on the survival rate of callus

Sucrose concentration (mol/L)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
Survival rate of <i>Saussurea medusa</i> callus (%)	40.4	48.7	54.2	46.0	36.2

3.6 洗涤时间对愈伤组织存活率的影响

洗涤时间直接影响冰冻保护剂的洗脱效果和水母雪莲愈伤组织的存活率. 在冰冻保护剂预处理温度 15°C、时间 10 min、解冻温度 25°C、在 25°C 水浴中用含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 溶液反复洗涤 3 次的条件下, 考察了洗涤时间对细胞存活率的影响, 结果见表 6. 由表可见, 洗涤时间为 10 min 时, 水母雪莲愈伤组织的存活率最高(58.5%). 在相同情况下, 每次洗 5~10 min, 细胞的存活率差别不大, 均可达到较好的洗涤效果, 而过长的洗涤时间不利于水母雪莲愈伤组织的存活.

表 6 洗涤时间对愈伤组织存活率的影响

Table 6 Effect of washing time on the survival rate of callus

Washing time (min)	5	8	10	20	30
Survival rate of <i>Saussurea medusa</i> callus (%)	56.0	54.0	58.5	49.7	40.5

4 结论

预培养和保护剂的选择是水母雪莲愈伤组织超低温保存的关键, 冰冻后的解冻温度、洗涤液的浓度和洗涤时间对愈伤组织的存活率也有一定的影响. 在本研究的条件范围内, 水母雪莲愈伤组织的存活率最高可达 58.5%, 为雪莲的种质保藏及防止种质退化打下了基础.

参考文献:

- [1] 赵德修. 雪莲花组织培养的初步研究 [J]. 中草药, 1997, 28(11): 682-683.
- [2] 赵德修, 赵丽丽. 雪莲研究进展 [J]. 中草药, 1996, 27(2): 220-222.
- [3] 陈金瑞, 王叶富, 邱林刚, 等. 藏药雪莲花的化学成分 [J]. 云南植物研究, 1989, 11(3): 271-275.
- [4] 邢建民, 赵德修, 李茂寅, 等. 水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮类活性成分合成 [J]. 植物学报, 1998, 40(9): 836-841.
- [5] Ulrich J E, Finkle P H, Ginoza H. Effect of a Mixture of Cryoprotectants on Liquid Nitrogen Survival of Callus Culture of a Tropical Plant [J]. Cryobiology, 1979, 16: 550-556.
- [6] Kartha K K, Engelmann F. Plant Cell and Tissue Culture [M]. Netherlands: Kluwer Academic Pub., 1994. 198-221.
- [7] Martinez-montero M E. Cryopreservation of Sugarcane Embryogenic Callus Using a Simplified Freezing Process [J]. Cryo-Letter, 1998, 19: 171-176.
- [8] Madan C C L, Skoog F A. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture [J]. Physiol. Plant, 1962, 15: 473-479.
- [9] Towill L E, Mazur P. Study on the Reduction of 2,3,5-triphenyl Tetrazolium Chloride as a Viability Assay for Plant Tissue Culture [J]. Can. J. Bot., 1975, 53: 1097-1102.

- [10] 罗士韦, 唐惕. 植物组织和细胞的超低温保藏及其种质库建立的研究现状 [J]. 细胞生物学杂志, 1983, 5(1): 1-7.
- [11] Finkle B J, Ulrich J M. Effect of Cryoprotectants in Combination on the Survival of Frozen Sugarcane Cells [J]. Plant Physiol., 1979, 63: 598-605.
- [12] 王君琿, 黄纯农. 玻璃化法—园艺作物茎尖和分生组织超低温保存新途径 [J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 227-228.
- [13] 陈品良. 植物组织培养的超低温保存 [J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(4): 390-398.
- [14] 梁永恒, 黄上志, 傅家瑞. 植物种质资源的保存 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 224-227.
- [15] Saklai A, Kobayashi S. Cryopreservation of Nuclear Cell of Navel Orange by Vitrification [J]. Plant Cell Report, 1990, 9(1): 30-33.

Preliminary Research on Cryopreservation of *Saussurea medusa* Maxim Callus

CHEN Shu-an, WANG Xiao-dong, ZHAO Bing, WANG Yu-chun

(Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Proc. Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The cryopreservation condition of *Saussurea medusa* callus was studied. The results indicated that preculture, cryoprotectant, pretreatment, recovery and washing conditions affected the survival rate of *Saussurea medusa* callus. The preculture medium was MS solid culture medium supplemented with 5% dimethyl sulfoxide. The optimum composition of cryoprotectant was 15% ethyleneglycol, 15% simethyl sulfoxide, 30% glycerol and 0.4 mol/L sucrose. The pretreatment temperature and time were 15°C and 10 min, respectively. The recovery temperature was 25~40°C. The survival rate of *Saussurea medusa* callus was 58.5% after washed by MS liquid medium with 1.2 mol/L sucrose for 3 times (10 min for each time) at 25°C.

Key words: *Saussurea medusa*; cryopreservation; callus