

青天葵组培物超低温保存研究

杜 勤, 王振华, 徐鸿华

(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 用超低温方法保存青天葵组培物。方法 采用单因子比较法、均匀设计法考察生长周龄、冷冻保护剂、预培养时间、降温方式、化冻方式等因素对青天葵组培物超低温保存后细胞生活力的影响。结果 青天葵组培物较佳的超低温保存程序为:5 周龄的组培物,在 4℃ 进行低温锻炼 12 d,以 12.5% DMSO + 0.25% LH 为冷冻保护剂,在 4℃ 静置处理 30 min,然后在 -18℃,停留 1 h 后投入液氮中保存,材料取出后,在 20℃ 化冻,无菌洗涤后,再接种,组培物能够存活并继续生长。结论 超低温保存方式可以成功保存青天葵组培物种质资源。

关键词:青天葵; 组培物; 超低温保存

中图分类号:R288 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2008)01-0067-02

Tissue Cultures Cryopreservation of *Nervilia fordii*

DU Qin, WANG Zhen-hua, XU Hong-hua

(Guangzhou University of TCM, Guangdong Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To preserve the tissue cultures of *Nervilia fordii* using cryopreservation method. **Methods** Suitable factors in cryopreservation (-196℃) were studied by monofactorial and uniform design. **Results** The experiments showed that five - weeked tissue cultures were the best material for cryopreservation . Tissue culures treated for 12days at 4℃ were the best cryotolerant. The optimal cyroprotectants was 12.5% DMSO + 0.25% LH. The best freezing procedure was to reduce the temperature from 0℃ to -18℃, and stay at that temperature for 1h, then drop them in liquid nitrogen(-196℃) to be preserved. 20℃ was good for melting the frozen material. Unfrozen tissue cultures survived when they were recultured . **Conclusion** Tissue cultures of *Nervilia fordii* can be preserved by cryopreservation method .

Key words: *Nervilia fordii*; Tissue cultures; Cryopreservation

青天葵别名独叶莲、青莲、天葵、芋兰等,来源于兰科多年生宿根草本植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr.,以叶或带块茎的叶入药^[1],有清肺止咳、健脾消积、镇静止痛、清热解毒、散结消癆之功效,主治肺癆、咳嗽咳血、瘰癧、肿毒、跌打损伤、小儿疳积、精神病、口腔炎、急性咽喉炎等,对小儿肺炎有特效。

由于青天葵种子无胚乳,仅靠无性繁殖,自然繁殖数量少,繁殖系数极低,资源分布极其有限。多年来,因乱采乱挖,多是连叶带块茎采挖加工,导致野生青天葵资源日益枯竭。

我们已经开展青天葵组织培养及植株再生的研究工作^[2],本研究青天葵组培物超低温保存的影响因素,为青天葵资源再生和种质保存提供技术资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验所用青天葵组培物是由青天葵球茎诱导产生的根状茎。在含有 6 - BA2 mg · L⁻¹ 的 MS 培养基上进行继代培养。培养温度(25 ± 2)℃,每天光照 12 h,光照强度 1200 Lx。经不同周龄对比试验后,采用 5 周龄的组培物作为超低温保存的试验材料。

1.2 方法

1.2.1 冷冻保护剂 考察 DMSO, Gly(甘油), PEG(聚乙二醇), Suc(蔗糖), Glu(葡萄糖), LH(水解酪蛋白) 6 种冷冻保护剂及其不同浓度配比的冷冻保护效果。

1.2.2 预培养 将组培物转至含 5% DMSO(二甲基亚砷)的 MS 培养基上,置于 4℃ 进行零下低温锻炼。考察在此条件下预培养时间对超低温保存后细胞生活力的影响。

1.2.3 冷冻程序 将组培物放入 5 ml 聚乙烯塑料冷冻管中,加入 0℃ 预冷的保护剂,使之淹没组培物,旋紧管塞,在 4℃ 静置处

理 30 min。然后将冷冻管放入 -18℃,停留一定时间后投入液氮中保存。考察在 -18℃ 温度下停留不同时间(0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h),对超低温保存后细胞生活力的影响。

1.2.4 化冻与洗涤 材料从液氮中取出化冻。考察不同的化冻方式:4℃ 零上低温, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70℃ 的化冻效果。

待冷冻管中的冰融化后,立即加入 MS 培养液(大量元素 + 3% 蔗糖),轻轻振摇,停留 10 min,倾出溶液,如此反复洗涤 3 ~ 5 次。

1.2.5 细胞生活力的检测 按筒令成^[3]报道的方法:称取洗涤后的组培物 200 mg,加入 5ml 氯化三苯四氮唑(TTC)液,在黑暗条件下静置染色 20 h。吸去 TTC 液,用蒸馏水洗涤 3 次。加入丙醇研磨提取 TTC 被脱氢酶还原后生成的红色甲臢。用 755 型分光光度计,在 490 nm 处测试丙醇提取液的吸收值。用这个吸收值(TTC)值表示各处理的愈伤组织经超低温保存后的细胞生活力。

2 结果分析

2.1 组培物生长周龄对超低温保存后细胞生活力的影响 细胞抗冻能力的提高与其分裂和生长活动等生理状态密切相关。取转移到新鲜培养基上的组培物,考察不同的生长周龄(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 周)对组培物经超低温保存后的细胞生活力。结果见图 1。

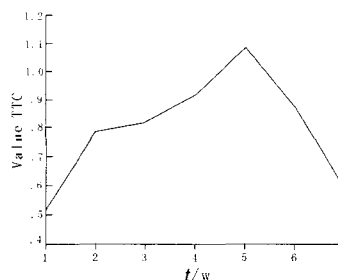


图 1 组培物生长周龄对冷冻后细胞生活力的影响

收稿日期:2007-03-23; 修订日期:2007-07-20

基金项目:广东省科技计划项目(No. 2004B330001009);

广东省自然科学基金项目(No. 5004249)

作者简介:杜 勤(1969-),女(汉族),河南开封人,现任广州中医药大学副教授,博士学位,主要从事药用植物的再生和开发利用研究工作。

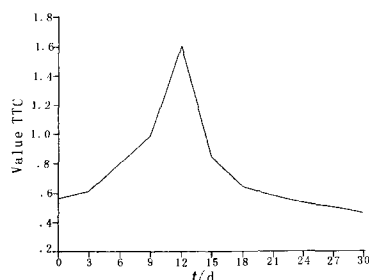


图2 预培养时间对超低温保存后细胞生活力的影响

由图1知,将组培物转移至新鲜培养基上,开始1周,冷冻后细胞的TTC值较低,说明细胞的抗冻能力弱,培养至第2周时,TTC值迅速升高,细胞抗冻能力显著增强,第5周的TTC值最高,此时细胞的抗冻能力最强,此后,随着培养周龄的增加,TTC值呈下降趋势,细胞抗冻能力逐渐减弱。因此选择5周龄的组培物作为超低温保存的材料是适宜的。

2.2 冷冻保护剂对超低温保存后细胞生活力的影响 结果见表1~2。

表1 $U_{12}(12)^{12}$ 均匀设计因子水平

水平	1 DMSO	2 Gly	3 PEG	4 Glu	5 Scu	6 LH
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	2.5	2.5	0	0	2.5	0.05
4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.05
5	5	5	2.5	2.5	5	0.10
6	5	5	2.5	2.5	5	0.10
7	7.5	7.5	5	5	7.5	0.15
8	7.5	7.5	5	5	7.5	0.15
9	10	10	5	5	10	0.20
10	10	10	7.5	7.5	10	0.20
11	12.5	12.5	7.5	7.5	12.5	0.25
12	12.5	12.5	7.5	7.5	12.5	0.25

按表1均匀设计搭配,组合成12种方案进行试验,结果见表2。

表2 $U_{12}(12)^{12}$ 均匀设计实验安排及结果

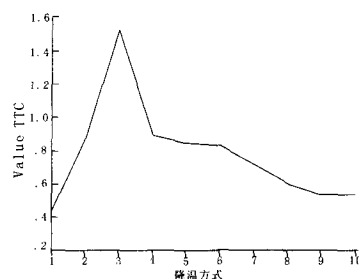
实验号	X1 DMSO	X2 Gly	X3 PEG	X4 Glu	X5 Scu	X6 LH	Y TTC值
1	0	0	2.5	5	10	0.2	0.554
2	0	2.5	7.5	0	5	0.15	0.504
3	2.5	5	2.5	7.5	0	0.05	0.396
4	2.5	7.5	7.5	2.5	10	0	0.506
5	5	10	2.5	0	5	0.25	0.669
6	5	12.5	7.5	5	0	0.15	0.471
7	7.5	0	0	2.5	12.5	0.1	0.617
8	7.5	2.5	5	7.5	7.5	0	0.589
9	10	5	0	5	2.5	0.25	1.267
10	10	7.5	5	0	12.5	0.2	0.765
11	12.5	10	0	7.5	7.5	0.1	0.900
12	12.5	12.5	5	2.5	2.5	0.05	1.110

数据经逐步回归处理,得到方程 $Y = 0.369 + 0.004X_1^2 + 4.495X_6^2$, $R = 0.907 > 0.9$, $F = 20.925 > F_{(7,4)} = 14.68$,方程有显著性意义。由方程知, X_1^2 和 X_6^2 对Y值有显著影响,均与Y值呈正相关。对方程优化得 $X_1 = 12.5$, $X_6 = 0.25$,将其代入方程,得到优化值1.275,按公式 $Y = \hat{Y} \pm U_\alpha \cdot S$ 。当 $\alpha = 0.10$, $U_\alpha = 1.6448$,计算优化值区间估计为 $Y = 1.275 \pm 1.6448 \times 0.12$,即1.078~1.472。按照优化条件进行试验,得到TTC值为1.281,在Y值区域内,且比12次均匀试验Y值都高,说明所得结果是正确的,因此认为12.5%DMSO+0.25%LH是青蒿组织培养物

较佳的冷冻保护剂。

2.3 组培物预培养时间对超低温保存后细胞生活力的影响 结果见图2。图2表明,未经预培养的组培物,细胞TTC值最低,抗冻能力较弱,预培养3d后,TTC值开始上升,细胞抗冻能力逐渐增强,到12d时TTC值达最大,此时细胞抗冻能力最强,此后延长预培养时间,TTC值呈下降趋势,因此试验材料应在4℃预培养12d后再进行超低温保存。

2.4 降温方式对超低温保存后细胞生活力的影响 实验比较快速冷冻法(从0℃直接投入液氮中保存)和两步冷冻法的冷冻效果,着重考察两步法中在-18℃停留不同时间(0.5,1,2,3,4,5,6,7,8h)对冷冻保存后细胞生活力的影响。结果见图3。



1. 直接投入液氮 rapid freezing 2. 0℃→-18℃,0.5h→LN
3. 0℃→-18℃,1h→LN 4. 0℃→-18℃,2h→LN
5. 0℃→-18℃,3h→LN 6. 0℃→-18℃,4h→LN
7. 0℃→-18℃,5h→LN 8. 0℃→-18℃,6h→LN
9. 0℃→-18℃,7h→LN 10. 0℃→-18℃,8h→LN

图3 降温方式对冷冻后细胞生活力的影响

图3表明,两步冷冻法的效果优于快速冷冻法,采用两步冷冻法从0℃缓慢降温至-18℃时,不立即投入液氮中而在此温度下停留1h,冷冻后细胞生活力明显提高,因此降温方式以从0℃降温至-18℃,停留1h,然后投入液氮保存。

2.5 化霜冻方式对超低温保存后细胞生活力的影响 结果见图4。图4表明,冰箱内4℃化冻和40℃以上高温化冻的TTC值较低,细胞生活力较弱,10℃和30℃化冻效果接近,20℃化冻TTC值最高,说明化冻后细胞保持了较高的生活力,因此20℃化冻是较好的化冻方式。

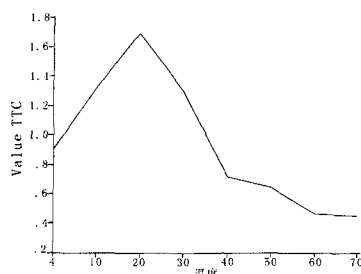


图4 化冻方式对冷冻后细胞生活力的影响

2.6 超低温保存后组培物的再生长 将化冻后的组培物,用无菌的MS液冲洗后,转移至新鲜培养基上,先黑暗培养2周,后进行光照培养,组培物能够存活,统计存活率为66.7%,将其转移至新的培养基上根状茎可以继续生长并有新的根状茎从节的部位生出。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典,上册[M]. 上海:上海科技出版社,1993:1231.
- [2] 杜勤,陈文利,王振华,等. 青蒿组织培养和植株再生研究[J]. 中国中药杂志,2005,3(1):812.
- [3] 简令成,孙德兰,孙龙华. 甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究[J]. 植物学报,1987,29(2):123.