

凹叶厚朴愈伤组织的超低温保存*

刘贤旺 杜勤

(江西中医学院,南昌 330006)

摘要 采用单因子比较和均匀设计法,研究凹叶厚朴(*Magnolia biloba* (Rehd et Wils) Cheng)愈伤组织超低温(-196℃)保存的影响因素。结果表明:超低温保存的适宜材料是4周龄的愈伤组织。经4~6℃低温下预培养12天的愈伤组织抗冻能力最强。较好的冷冻保护剂是12.5% DMSO+5% Suc+0.25% LH。较佳的冷冻程序是以0.5℃/min的降温速度从0℃降到-30℃,停留1h,然后浸入液氮中贮存。30℃水浴中化冻与自来水流水(18.5±1℃)冲洗化冻效果一样良好。化冻后的愈伤组织在黑暗中培养生长较好,存活率高。

关键词 凹叶厚朴;超低温保存;愈伤组织

Calli cryopreservation of *Magnolia biloba* (Rehd et Wils) Cheng Liu Xian-Wang and Du Qin (Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(1): 9~13

The suitable factors in cryopreservation (-196℃) of the calli of *Magnolia biloba* (Rehd et Wils) Cheng were studied by monofactorial and uniform design. The experiments showed that four-weeked calli were the best material for cryopreservation. Calli treated for 12 days at 4~6℃ were the best cryotolerant. The best cryoprotective was the mixture of 12.5% DMSO, 5% Suc and 0.25% LH. The best freezing procedure was to reduce the temperature from 0℃ to -32℃ at a stable speed by lowering 0.5℃ each minute, leave the calli at -32℃ for 1h, then drop them in liquid nitrogen (-196℃) to be preserved. Warm-water bath at 30℃ was as good as flowing-water wash at 18.5±1℃ for melting the frozen material. Unfrozen calli were then cultured in darkness and grew well with a high survival rate.

Key words *Magnolia biloba* (Rehd et Wils) Cheng; cryopreservation; calli

凹叶厚朴(*Magnolia biloba* (Rehd et Wils) Cheng)是一种常用名贵中药材^[1]。以皮入药,药材名“温朴”。皮部含有厚朴酚、和厚朴酚、 α 和 β 桉叶醇等多种成分^[5]。具有温中、行气、燥湿、消炎等功效。

凹叶厚朴是我国特产树种,主要分布于江西、福建、浙江等省,为高大乔木,寿命可达百年以上^[4]。自然繁殖困难,生长缓慢,种群稀少,野生资源破坏严重,药材供需矛盾日趋尖锐,国家已将其列入濒危植物和二级保护药材^[2,3]。迄今,凹叶厚朴愈伤组织超低温保存的研究尚未见报道。本文研究了影响凹叶厚朴愈伤组织超低温保存的各种因素,为其资源再生和种质保存提供技术资料 and 理论依据。

1. 材料和方法

1.1 材料

四叶厚朴愈伤组织由芽诱导产生。在含有 2,4-D 1(mg/L, 下同)+6-BA 1.5 的 B₅培养基上进行继代培养, 28~30 天转移 1 次。培养温度 20±2℃, 光照强度约 1 500 Lx。经不同培养周龄对比试验后, 确定采用 4 周龄的愈伤组织作为超低温保存的试验材料。

1.2 方法

1.2.1 预培养 将愈伤组织转至含有 5% DMSO(二甲基亚砷)的 B₅培养基上, 置于 4~6℃ 进行低温锻炼。采用单因子比较法, 考察在此条件下预培养时间(0, 3, 6, 12, 18, 24, 30 天)对超低温保存后细胞生活力的影响。

1.2.2 冷冻保护剂 采用均匀设计法考察 DMSO、Gly(甘油)、PEG(聚乙二醇)、Glu(葡萄糖)、Suc(蔗糖)、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应。

1.2.3 冷冻程序 选直径 0.5 cm 的愈伤组织块, 放入 4 ml 聚乙烯塑料冷冻管中, 加入经 0℃ 预冷的保护剂, 使之淹没愈伤组织, 旋紧管塞, 在 0℃ 静置处理 30 min。然后将冷冻管放入低温冰箱, 以约 0.5℃/min 的冷却速度, 从 0℃ 降温至 -32℃, 停留一定时间, 再投入液氮中保存。采用单因子比较法考察在 -32℃ 停留不同时间(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 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 材料在液氮中贮存 15 天后取出化冻。考察 4~6℃ 低温、自来水(18.5±1℃)冲洗及 30℃、40℃、50℃ 水浴化冻的效果。

待冷冻管中的冰融化后, 立即加入 B₅培养液(大量元素+3% 蔗糖), 轻微振摇, 停留 10 min, 倾出溶液, 如此反复洗涤 3~5 次。

1.2.5 细胞生活力检测 按简令成报道的方法^[6]: 称取洗涤后的愈伤组织 200 mg, 加入 5 ml TTC(氯化三苯四氮唑)液, 在 22℃ 黑暗条件下静置染色 20 h, 吸去 TTC 液, 用蒸馏水洗涤 2~3 次, 加入丙酮研磨提取 TTC 被脱氢酶还原后生成的红色甲臜。用 721 型分光光度计, 在 490 nm 处测试丙酮提取液的吸收值。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。

1.2.6 再培养 经化冻洗涤后的愈伤组织, 立即转移到含 2,4-D 1 和 6-BA 1.5 的 B₅培养基上, 分为两组, 一组置于光照(约 1 500 lx)下培养, 另一组在黑暗中培养, 温度均为 20±2℃。在培养过程中, 观察愈伤组织恢复生长情况, 30 天后统计存活率, 测定鲜重的增长量。

当愈伤组织恢复生长到一定程度时, 将其转至含 NAA 1+6-BA 2.5 的 B₅培养基上, 进行光照培养, 检测其形态发生能力。

2. 结果和讨论

2.1 愈伤组织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^[8]。从图 1 可见, 当将愈伤组织转至新鲜培养基上, 开始 2 周, 冷冻后细胞的 TTC 值较低, 说明细胞的抗冻能力弱,

不宜作冷冻材料;培养至第3周时,TTC值迅速升高,细胞抗冻能力显著增强;第4周的细胞冷冻后TTC值最高,此时细胞抗冻能力最强;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4周龄的愈伤组织作为超低温保存材料是适宜的。

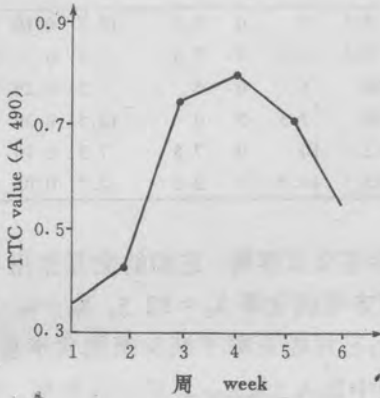


图1 愈伤组织的生长周龄对冷冻后细胞生活力的影响

Fig 1 The influence of calli week-age on cell vitality

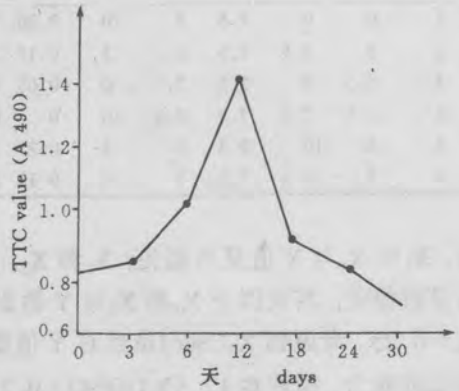


图2 预培养时间对超低温保存后细胞生活力的影响

Fig 2 The influence of pre-culture period on cell vitality

2.2 愈伤组织预培养时间对超低温保存后细胞生活力的影响

图2表明:未经预培养的愈伤组织,细胞TTC值最低,抗冻能力较弱;预培养3天后,TTC值开始上升,细胞抗冻能力逐渐增强;预培养6天后,TTC值呈直线上升趋势,直至12天达到最高值,细胞抗冻能力最强;此后,继续延长预培养时间,TTC值急剧下降。因此,选择在4~6℃预培养12天的愈伤组织作为超低温保存的材料是合适的。

2.3 冷冻保护剂对超低温保存后细胞生活力的影响

表1 U₁₂(12¹²)均匀设计因子水平表

Tab 1 U₁₂(12¹²) factors and standards

水平 Standard	因子 Factor						水平 Standard	因子 Factor					
	1 DMSO (%)	2 Gly (%)	3 PEG (%)	4 Glu (%)	5 Suc (%)	6 LH (%)		1 DMSO (%)	2 Gly (%)	3 PEG (%)	4 Glu (%)	5 Suc (%)	6 LH (%)
1	0	0	0	0	0	0	7	7.5	7.5	5	5	7.5	0.15
2	0	0	0	0	0	0	8	7.5	7.5	5	5	7.5	0.15
3	2.5	2.5	0	0	2.5	0.05	9	10	10	5	5	10	0.20
4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.05	10	10	10	7.5	7.5	10	0.20
5	5	5	2.5	2.5	5	0.10	11	12.5	12.5	7.5	7.5	12.5	0.25
6	5	5	2.5	2.5	5	0.10	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。

数据经微机处理,得到多元回归方程 $Y = 1.0904 + 0.1152X_1 - 0.0189X_2 - 0.0749X_4 + 16.94X_6 - 0.048X_1 \cdot X_2 - 0.0141X_1 \cdot X_6 - 52.36X_6^2$, $R = 0.9999 > 0.9$, $F = 3257.63 > F_{(7,4)} \cdot 0.01 = 14.98$ 。由方程知,因子 X_1, X_2, X_4 和 X_6 对Y值有显著影响,其中 X_1 和 X_6 与Y值呈正相

表2 U₁₂(12¹²)均匀设计试验安排及结果
Tab 2 U₁₂(12¹²) Uniform design experiments and results

实验号 Test number	因子 Factor						Y TTC 值 TTC value	实验号 Test number	因子 Factor						Y TTC 值 TTC value
	1 DMSO (%)	2 Gly (%)	3 PEG (%)	4 Glu (%)	5 Suc (%)	6 LH (%)			1 DMSO (%)	2 Gly (%)	3 PEG (%)	4 Glu (%)	5 Suc (%)	6 LH (%)	
1	0	0	2.5	5	10	0.20	1.168	7	7.5	0	0	2.5	12.5	0.10	1.825
2	0	2.5	7.5	0	5	0.15	2.243	8	7.5	2.5	5	7.5	7.5	0	0.388
3	2.5	5	2.5	7.5	0	0.05	0.863	9	10	5	0	5	2.5	0.25	2.061
4	2.5	7.5	7.5	2.5	10	0	0.283	10	10	7.5	5	0	12.5	0.20	1.796
5	5	10	2.5	0	5	0.25	1.869	11	12.5	10	0	7.5	7.5	0.10	1.315
6	5	12.5	7.5	5	0	0.15	1.772	12	12.5	12.5	5	2.5	2.5	0.05	1.882

关, X₂和 X₄与 Y 值呈负相关; X₁和 X₂, X₁和 X₆之间存在交互作用, 它们的交互作用与 Y 值均呈负相关, 其余因子 X₃和 X₅对 Y 值影响不显著。对方程优化得 X₁ = 12.5, X₂ = 0, X₄ = 0, X₆ = 0.25。考虑到 X₅(Suc)虽然对 Y 值影响不显著, 但它可能有助于减少细胞含水量, 增强细胞抗寒力, 因此在 12.5% DMSO + 0.25% LH 保护液中加入 5% Suc 共同作保护剂。将 X₁ = 12.5, X₆ = 0.25 代入方程, 得到优化值 $\hat{Y} = 3.052$, 按公式 $Y = \hat{Y} \pm U_{\alpha} \cdot S$ 。当 $\alpha = 0.10$ 时 $U_{\alpha} = 1.6448$, 计算优化值区间估计为 $Y = 3.052 \pm 1.6448 \times 0.12$, 即 2.85 ~ 3.25。按照优化条件进行试验, 得到 TTC 值为 2.87, 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 + 5% Suc + 0.25% LH 是凹叶厚朴愈伤组织超低温保存的最适冷冻保护剂。

2.4 降温方式对超低温保存后细胞生活力的影响

降温方式主要有快冻法、慢冻法和两步冷冻法^[7]。快冻法是从 0℃ 直接投入液氮中保存; 慢冻法是以某一恒定的降温速度(例如 1℃/min)从 0℃ 缓慢降温至 -196℃; 两步冷冻法是先以某一恒定的降温速度从 0℃ 降温至某一特定温度, 如 -20℃ 和 -30℃ 等, 在此温度下停留一段时间, 然后投入液氮中保存。比较快冻法与两步冷冻法的冷冻效果, 着重考察以 0.5℃/min 的降温速度从 0℃ 降至 -32℃ 时, 停留不同时间对冷冻保存后细胞生活力的影响, 结果见图 3。

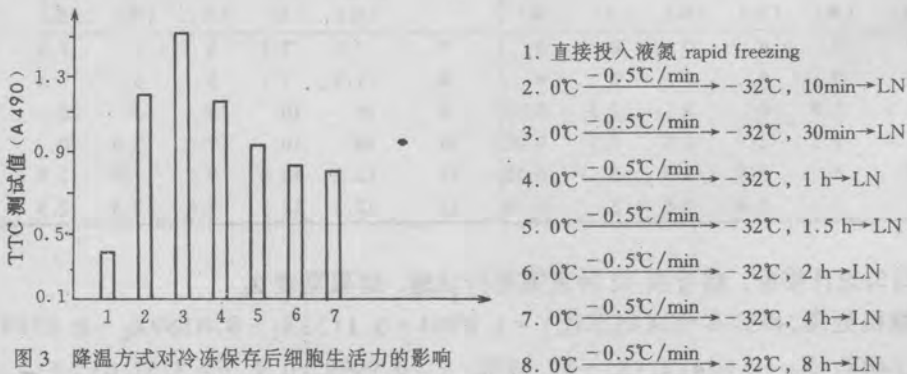


图3 降温方式对冷冻保存后细胞生活力的影响
Fig 3 The influence of freezing method on cell vitality

实验结果表明,两步冷冻法的效果明显优于快速冷冻法。图 3 显示,采用两步冷冻法从 0℃ 缓慢降温至 -32℃,不立即投入液氮中而在此温度下停留 1 h,则冷冻保存后细胞的生活力明显提高。因此认为凹叶厚朴愈伤组织超低温保存,较为适宜的降温方式是以 0.5℃/min 的降温速度从 0℃ 降至 -32℃,停留 1 h,然后投入液氮中保存。

2.5 化冻方式对超低温保存后细胞生活力的影响

图 4 显示,在 4~6℃ 冰箱内慢速化冻和 40℃ 及 50℃ 温水浴化冻的 TTC 值较低,细胞生活力较弱;自来水流水(18.5±2℃)冲洗化冻和 30℃ 水浴化冻的 TTC 值相近,均为最高

值,说明化冻后细胞保持了较高的生活力。因此,自来水流水(18.5±2℃)冲洗化冻和 30℃ 温水浴化冻是凹叶厚朴愈伤组织超低温保存后较好的化冻方式。

2.6 光照对超低温保存后愈伤组织恢复生长的影响

将化冻后的愈伤组织转至 B₅ + 2,4-D 1 + 6-BA 1.5 的新鲜培养基上,在同样的温度(20±2℃)下,分别进行光照(约 1 500 lx)和黑暗培养,结果愈伤组织生长出现明显差异:暗培养的愈伤组织恢复生长和再生长的速度均较快,存活率高达 75%;而光照培养的愈伤组织恢复生长速度较慢,存活率仅为 32%。实验结果表明,植物细胞组织在遭受冻害后回复到正常温度生长时,黑暗有利于冻害的恢复,而光照对损伤的修复不利。

当超低温保存后的愈伤组织恢复生长到一定程度时,将其转至 B₅ + 6-BA 2.5 + NAA 1 的培养基中进行光照培养,约经 3 周,生长速度加快,愈伤组织致密且表面逐渐变绿,出现许多绿色小突起。培养至约 35 天,绿色突起分化出丛生芽。将丛生芽切割转至 B₅ + IBA 0.5 ~ 1 的生根培养基上诱导生根,但未见发生不定根,有待今后进一步探索。

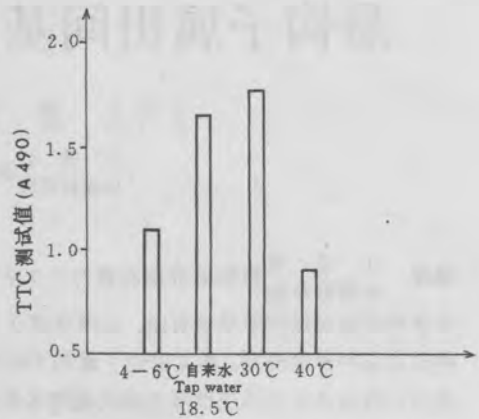


图 4 解冻方式对冷冻后细胞生活力的影响

Fig 4 The influence of melting method on cell vitality

参 考 文 献

- 1 江苏新医学院. 1986: 中药大辞典(下册), 上海科技出版社, 上海. 1629.
- 2 宋朝枢, 徐荣华, 张清华. 1989: 中国珍稀保护植物, 中国林业出版社, 北京. 161.
- 3 国家环境保护局自然保护司, 保护局与物种管理处. 1991: 珍稀濒危植物保护与研究, 中国环境科学出版社, 北京. 166.
- 4 周荣汉主编. 1993: 中药资源学, 中国医药科技出版社, 北京. 192.
- 5 宋万志. 1984: 中草药 15(10): 18~19.
- 6 简令成, 孙德兰, 孙龙华. 1987: 植物学报 29(2): 123~131.
- 7 罗士韦, 唐 惕. 1983: 细胞生物学杂志 5(1): 117~122.
- 8 Mantell S H *et al.* 1983: Plant Biotechnology, Cambridge University Press, Cambridge. 163~186.

(责任编辑: 许定发)