

花烛胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存条件研究

王更亮, 许传营, 王广东^①

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为建立适宜的花烛(*Anthurium andraeanum* Lind.) 胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存技术, 采用单因素实验方法对影响玻璃化超低温保存后细胞相对存活率的主要因素进行了研究。结果表明, 经玻璃化超低温保存后花烛悬浮细胞的相对存活率与悬浮细胞的继代培养时间、渗透调节剂的种类和浓度及预培养时间、装载液种类和预处理时间、PVS2 脱水时间以及超低温保存后的化冻温度均有一定的关系。继代培养 3 和 5 d, 细胞的相对存活率较高(约 20%); 分别以 0.3、0.5、0.7 mol · L⁻¹ 山梨醇和 60、80、100、120 g · L⁻¹ 蔗糖为渗透调节剂预培养 0~4 d, 以 0.5 mol · L⁻¹ 山梨醇预培养 2 d 的效果最好, 细胞的相对存活率为 26.2%; 用体积分数 25% PVS2 预处理 15 min, 细胞的相对存活率最高(29.0%); 分别用体积分数 100% PVS2 脱水 0、5、10、15、20、25 和 30 min, 其中脱水 10 min 的悬浮细胞相对存活率最高(32.1%); 分别在 10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 水浴条件下进行化冻处理, 其中用 40 °C 水浴化冻的悬浮细胞相对存活率最高(32.1%)。花烛胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存和化冻的适宜流程为: 将继代培养 3~5 d 的胚性悬浮细胞团(直径 2 mm) 在含 0.5 mol · L⁻¹ 山梨醇的 1/2MS 液体培养基中预培养 2 d 后, 于 4 °C 条件下处理 24 h, 然后先用体积分数 25% PVS2 室温预处理 15 min, 再用体积分数 100% PVS2 在 0 °C 条件下脱水 10 min, 最后迅速投入液氮中冷冻保存; 将经过冷冻保存的细胞置于 40 °C 水浴中化冻 3 min, 用含 1.2 mol · L⁻¹ 蔗糖的 1/2MS^s 液体培养基洗涤 3 次(每次 10 min), 之后即可进行恢复培养。

关键词: 花烛; 胚性悬浮细胞; 玻璃化超低温保存; 相对存活率

中图分类号: Q943.1; S682.1¹⁴ 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)01-0026-06

Study on vitrification cryopreservation condition of *Anthurium andraeanum* embryonic suspension cells WANG Geng-liang, XU Chuan-ying, WANG Guang-dong^① (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(1): 26-31

Abstract: In order to establish suitable vitrification cryopreservation technology of *Anthurium andraeanum* Lind. embryonic suspension cells, the main factors effected relative survival rate of the cells after vitrification cryopreservation were studied by the single factor experiment. The results show that the relative survival rate of the embryonic suspension cells after vitrification cryopreservation has a certain relationship with subculture time, type and concentration of osmotic regulating agent and pre-culture time, loading solution type and pre-treatment time, dehydration time of PVS2 and thawing temperature. Relative survival rate of the suspension cells subcultured for 3 and 5 d is higher with a rate of about 20%. Among using 0.3, 0.5, 0.7 mol · L⁻¹ sorbitol and 60, 80, 100, 120 g · L⁻¹ sucrose as osmotic regulating agents and pre-culturing for 0-4 d, the effect with 0.5 mol · L⁻¹ sorbitol and pre-culturing for 2 d is the best with a relative survival rate of 26.2%. Relative survival rate of the cells is the highest with a value of 29.0% after pre-treating for 15 min with 25% PVS2. Dehydrating with 100% PVS2 for 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min, respectively, the dehydrating for 10 min has the highest relative survival rate of the cells with a value of 32.1%. Among using 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C water baths to thaw, relative survival rate of the suspension cells is the highest (32.1%) at 40 °C thawing condition. The suitable technology process of vitrification cryopreservation of *A. andraeanum* embryonic suspension cells is as follow: embryonic suspension cell mass (diameter 2 mm) subcultured

收稿日期: 2009-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300244)

作者简介: 王更亮(1982—), 男, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事园林植物与观赏园艺方面的研究。

^①通信作者 E-mail: gdwang@njau.edu.cn

for 3–5 d is pre-cultured in 1/2MS liquid medium containing $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sorbitol for 2 d, then treated for 24 h in $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and pre-treated with 25% PVS2 for 15 min in room temperature, dehydrated with 100% PVS2 for 10 min in $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, at last, rapidly put the cell mass into liquid nitrogen for cryopreservation. Put the cryopreservation cells in $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath to thaw for 3 min, then wash with 1/2MS liquid medium containing $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose for three times (each time for 10 min), afterward carry on renewal culture.

Key words: *Anthurium andraeanum* Lind.; embryonic suspension cell; vitrification cryopreservation; relative survival rate

花烛(*Anthurium andraeanum* Lind.)又名红掌、安祖花,为天南星科(Araceae)花烛属(*Anthurium* Schott)多年生常绿草本植物^[1],因其花型独特、花色艳丽、周年开花而备受人们喜爱,是具有较高观赏和经济价值的花卉之一。花烛属植物种类丰富(约550余种),且经过长期的种间杂交已培育出大量栽培品种,截至20世纪90年代已培育出100余个优良的花烛栽培品种^[2]。目前,花烛种质资源的保存主要采用传统的田间资源圃和组织培养保存法。传统的种质资源保存方法不仅需要大量的人力、物力及土地,还受到栽培环境的影响,在保存过程中易发生变异进而导致花烛种性退化和丢失,最终影响优良种质资源的利用。因此,建立一种操作简便并能长期稳定保存花烛种质资源的方法至关重要。

超低温保存是植物种质资源保存的有效方法之一。常规超低温保存多采用两步法,但需要程序降温仪等专业设备,且保存效果不稳定、存活率低,不同种类间的保存效果存在差异,在实际应用过程中存在较多问题^[3]。玻璃化超低温保存技术则克服了上述缺点,植物材料经冷冻保护剂处理后可以直接于液氮中保存,无论是成本还是冻后存活率均有较大改进,是目前植物种质资源长期保存最为有效而简便的方法,具有较广的应用前景^[4]。目前采用玻璃化超低温保存法已成功保存了荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)^[5]、枇杷(*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.)^[6]及长鞭红景天(*Rhodiola fastigiata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu)^[7]等多种植物的悬浮细胞系。

在已获得花烛胚性悬浮细胞培养体系的基础上,作者对花烛胚性悬浮细胞的玻璃化超低温保存条件(包括继代培养时间、渗透调节剂种类和浓度及预培养时间、装载液种类和预处理时间、冷冻保护剂PVS2脱水时间和超低温保存后的化冻温度)进行了比较研究,筛选出适宜的保存条件,以期在花烛种质资源的长期保存提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

以花烛品种‘Amigo’叶片为外植体,采用辛伟杰等^[8]的方法诱导形成胚性愈伤组织;将胚性愈伤组织接种于250 mL三角瓶中,参照文献^[9]的液体培养方法进行增殖培养;用机械方法将增殖状态良好的胚性愈伤组织细胞团破碎成颗粒状,网筛过滤,筛选出2 mm的悬浮细胞团作为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 基本培养流程 选取继代培养3 d的直径2 mm的花烛胚性悬浮细胞团(0.2 g),用1/2MS液体培养基(含 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖,pH 5.8)预培养2 d后,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中低温处理24 h;参照Sakai等^[10]的配方配制装载液PVS2,在室温条件下用体积分数25%的PVS2预处理10 min,然后用预冷至 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的体积分数100%的PVS2在 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下脱水7.5 min,随即投入液氮中冷冻保存;冻存6 h后,将细胞团置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中化冻。

化冻后,迅速移除PVS2,室温条件下用1/2MS液体培养基(含 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖,pH 5.8)将细胞洗涤3次,每次10 min,然后将细胞首先转移到含 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的1/2MS液体培养基(pH 5.8)中,置于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中暗培养3 d后,转到含 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的1/2MS液体培养基(pH 5.8)中继续暗培养2 d,最后转移至正常液体继代培养基(含 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的1/2MS培养基,pH 5.5)中振荡培养,转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,散射光,培养温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。恢复培养5 d后测定细胞的相对存活率。

1.2.2 单因素实验设计 在预实验基础上,采取逐步优化方法对影响超低温保存效果的各种因素(包括继代培养时间、渗透调节剂的种类和浓度及预培养

时间、装载液种类及预处理时间、PVS2 脱水时间和化冻温度)进行单因子实验,除对待优化因素进行不同设置外,其他条件均与基本培养流程相同。

继代培养时间设置 5 个处理:1、3、5、7 和 9 d;预培养过程中的渗透调节剂分别为蔗糖和山梨醇,蔗糖质量浓度设置 4 个梯度:60、80、100 和 120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,山梨醇浓度设置 3 个梯度:0.3、0.5 和 0.7 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,二者均分别设置 5 个预培养时间:0、1、2、3 和 4 d;预处理中使用的装载液分别为体积分数 25%、60% 和 80% 的 PVS2 以及混合液(包含 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油和 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖),处理时间分别设置为 0、5、10、15 和 20 min;用体积分数 100% PVS2 脱水的时间设置 7 个处理:0、5、10、15、20、25 和 30 min;化冻温度设置 6 个处理:10 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 。各处理的悬浮细胞团用量均为 0.2 g,各 3 次重复。

1.2.3 细胞活力测定 采用氯化三苯四氮唑(TTC)法检测恢复培养 5 d 后花烛胚性悬浮细胞的细胞活力,用吸收值(TTC 值)表示超低温保存后细胞的存活率^[11-12],并据此计算细胞的相对存活率,计算公式为:细胞相对存活率=(处理后细胞的 TTC 值/未处理细胞的 TTC 值) $\times 100\%$ 。

2 结果和分析

2.1 继代培养时间对悬浮细胞相对存活率的影响

对于玻璃化超低温保存技术来说,保存材料的生理状态与其抗寒性、耐干燥及脱水能力有关,是影响玻璃化超低温保存效果的重要因素之一。继代培养时间不同的花烛悬浮细胞经玻璃化超低温保存后的相对存活率见表 1。由表 1 可看出,继代培养 1 d 的花烛悬浮细胞经冷冻保存后的相对存活率较低,仅为 13.5%;继代培养时间延长,细胞相对存活率也逐渐提高,细胞的抗冻能力有所增强。继代培养 3 d 的悬浮细胞相对存活率最高,达到 20.4%;继代培养 5 d 的细胞相对存活率也较高,为 19.7%。继代培养时间超过 5 d 后,随继代培养时间的进一步延长,悬浮细胞的相对存活率呈下降趋势,继代培养 9 d 的花烛悬浮细胞的相对存活率最低,仅为 8.7%,细胞的抗冻能力最差。造成这一现象的原因可能是培养 3~5 d 的悬浮细胞正处于指数生长期,处于此时期的细胞冻存后能保持分裂能力的细胞占有较高比例,并且

大部分细胞体积较小、细胞质较浓、细胞壁较薄、无液泡,比具有液泡或细胞壁较厚的悬浮细胞更耐冻。差异显著性分析结果表明,经冷冻保存后,继代培养 3 和 5 d 的悬浮细胞的相对存活率极显著高于继代培养 1、7 和 9 d 的悬浮细胞($P < 0.01$),因而,继代培养 3~5 d 的花烛胚性悬浮细胞是玻璃化超低温保存的理想材料。

表 1 不同继代培养时间对玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞相对存活率的影响¹⁾

Table 1 Effect of different subculture times on relative survival rate of embryonic suspension cells of *Anthurium andraeanum* Lind. after vitrification cryopreservation¹⁾

继代培养时间/d Subculture time	相对存活率/% Relative survival rate
1	13.5 \pm 0.6Bb
3	20.4 \pm 0.2Aa
5	19.7 \pm 0.2Aa
7	11.2 \pm 0.3Cc
9	8.7 \pm 0.4Dd

¹⁾ 同列中不同的大写和小写字母分别表示在 1% 和 5% 水平上差异显著 Different capitals and small letters in same column indicate the significant differences at 1% and 5% levels, respectively.

2.2 渗透调节剂对悬浮细胞相对存活率的影响

用含不同渗透调节剂(蔗糖和山梨醇)的 1/2MS 液体培养基对继代培养 3 d 的花烛胚性悬浮细胞进行不同时间的预培养,悬浮细胞的相对存活率见表 2。结果表明,未经预培养的悬浮细胞活性极低,抗冻能力较弱,恢复培养后的生长状态较差,细胞相对存活率仅约 5%;而用含有不同质量浓度蔗糖或山梨醇的 1/2MS 液体培养基预培养的悬浮细胞活性明显增强,细胞相对存活率显著增加,但预培养超过一定时间后,相对存活率开始下降。总体来说,经含有不同浓度蔗糖或山梨醇的 1/2MS 液体培养基预培养 2 d,悬浮细胞的抗冻能力最强,相对存活率最高。

2.2.1 蔗糖的影响效应 由表 2 可见,用含有不同质量浓度蔗糖的 1/2MS 液体培养基对花烛胚性悬浮细胞进行预培养,经过玻璃化超低温冷冻保存后花烛胚性悬浮细胞的相对存活率有一定的波动。用含 80 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 1/2MS 液体培养基预培养的悬浮细胞相对存活率大幅度增加,用含 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 1/2MS 液体培养基预培养的花烛胚性悬浮细胞相对存活率较高,而用含 120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 1/2MS 液体培养基预培养的悬浮细胞相对存活率则有所降低。

表2 渗透调节剂和预培养时间对玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞相对存活率的影响

Table 2 Effects of osmotic regulating agents and pre-culture time on relative survival rate of *Anthurium andraeanum* Lind. embryonic suspension cells after vitrification cryopreservation

渗透调节剂 Osmotic regulating agent	经不同时间预培养后的相对存活率/% Relative survival rate after pre-culturing for different times				
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
蔗糖 Sucrose					
60 g · L ⁻¹ sucrose	5.2±0.4	9.6±0.4	15.3±0.5	17.3±0.2	9.8±0.6
80 g · L ⁻¹ sucrose	4.7±0.4	13.2±0.4	19.1±0.4	12.8±0.4	7.7±0.5
100 g · L ⁻¹ sucrose	6.2±0.3	16.2±0.3	22.9±0.5	11.3±0.4	6.5±0.3
120 g · L ⁻¹ sucrose	5.2±0.4	11.4±0.5	8.4±0.3	6.2±0.3	4.9±0.4
山梨醇 Sorbitol					
0.3 mol · L ⁻¹ sorbitol	4.1±0.6	17.4±0.5	20.8±0.8	18.3±0.4	11.7±0.5
0.5 mol · L ⁻¹ sorbitol	5.9±0.4	20.6±0.7	26.2±0.3	19.3±0.4	13.7±0.5
0.7 mol · L ⁻¹ sorbitol	4.5±0.5	13.3±0.5	16.3±0.5	11.3±0.6	6.5±0.3

在蔗糖质量浓度相同的条件下,延长预培养时间,各处理组悬浮细胞的相对存活率并不因预培养时间的延长而增加,预培养2或3 d的悬浮细胞相对存活率最高,超过适宜的预培养时间,各处理组花烛悬浮细胞的相对存活率均下降。用含60 g · L⁻¹蔗糖的1/2MS液体培养基预培养3 d,悬浮细胞的相对存活率最高;分别用含80和100 g · L⁻¹蔗糖的1/2MS液体培养基预培养2 d,悬浮细胞的相对存活率最高;而用含120 g · L⁻¹蔗糖的1/2MS液体培养基预培养1 d,悬浮细胞的相对存活率即达到最大值。这可能是由于蔗糖质量浓度的升高和培养时间的延长均可导致细胞过度脱水,产生渗透胁迫,不利于花烛悬浮细胞的生长。实验结果表明,用含100 g · L⁻¹蔗糖的1/2MS液体培养基预培养2 d,经过玻璃化超低温保存后,花烛胚性悬浮细胞恢复活力的效果较好。

2.2.2 山梨醇的影响效应 由表2还可看出,预培养基中添加的山梨醇浓度与预培养时间对经过玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞的相对存活率也有较大影响。预培养时间相同,花烛悬浮细胞的相对存活率随山梨醇浓度的提高表现出一定的波动变化趋势,其中,用含0.5 mol · L⁻¹山梨醇的1/2MS液体培养基进行预培养,悬浮细胞的相对存活率最高。

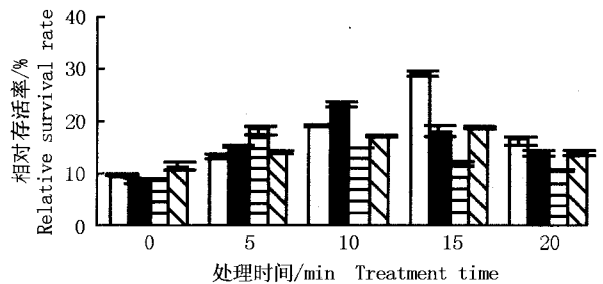
在山梨醇浓度相同的条件下,延长预培养时间,花烛悬浮细胞的相对存活率并不因预培养时间的延长而提高,而是在适宜预培养时间达到最高,超过该时间则降低。经过2 d的预培养,在玻璃化超低温保存后花烛悬浮细胞的相对存活率均最高。

综合分析后可看出,以山梨醇作为渗透调节剂对花烛悬浮细胞进行预培养,经玻璃化超低温保存后悬

浮细胞的相对存活率优于以蔗糖作为渗透调节剂进行预培养的细胞,最高可达26.2%。因而,在花烛悬浮细胞玻璃化超低温保存过程中,适宜的预培养基为含0.5 mol · L⁻¹山梨醇的1/2MS液体培养基,最佳预培养时间为2 d。

2.3 装载液预处理对悬浮细胞相对存活率的影响

用不同装载液对花烛胚性悬浮细胞进行不同时间的预处理,经过玻璃化超低温保存后悬浮细胞的相对存活率见图1。由图1可见,未经装载液预处理的悬浮细胞经玻璃化超低温保存后的相对存活率较低。而用装载液预处理不同时间,经玻璃化超低温保存后悬浮细胞的相对存活率有一定的差异,基本变化趋势是在一定时间内预处理时间越长悬浮细胞的相对存活率越高,但超过适宜预处理时间,悬浮细胞的相对



□: 25% PVS2; ■: 60% PVS2; ▨: 80% PVS2; ▩: 2 mol · L⁻¹甘油和0.4 mol · L⁻¹蔗糖混合液 Mixture solution of 2 mol · L⁻¹ glycerol and 0.4 mol · L⁻¹ sucrose.

图1 装载液种类及预处理时间对玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞相对存活率的影响

Fig. 1 Effects of loading solution types and pre-treatment time on relative survival rate of *Anthurium andraeanum* Lind. embryonic suspension cells after vitrification cryopreservation

存活率则降低,这可能是由于预处理时间过长,装载液则对悬浮细胞产生毒害作用,致使悬浮细胞的相对存活率下降。

用不同装载液对悬浮细胞进行相同时间的预处理,悬浮细胞的相对存活率有一定的差异,其中,用体积分数 25% PVS2 处理 15 min,经玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞的相对存活率最高,达到 29.0%。因此,用装载液对花烛悬浮细胞预处理的最适条件为用体积分数 25% PVS2 室温预处理 15 min。

2.4 脱水时间对悬浮细胞相对存活率的影响

以体积分数 100% PVS2 为冷冻保护剂,对花烛胚性悬浮细胞进行不同时间的脱水处理,经过玻璃化超低温保存后悬浮细胞的相对存活率见图 2。结果表明,未经体积分数 100% PVS2 脱水处理的悬浮细胞相对存活率较低,仅为 7.7%;用体积分数 100% PVS2 处理 10 min 的胚性悬浮细胞相对存活率最高,达到 32.1%;处理时间超过 10 min,悬浮细胞相对存活率呈现下降趋势。这可能是因为处理时间低于 10 min,细胞脱水不充分,在降温过程中不能迅速达到玻璃化状态,因而不易成活;而处理时间超过 10 min,细胞受到 PVS2 的毒害作用,相对存活率也有所下降。

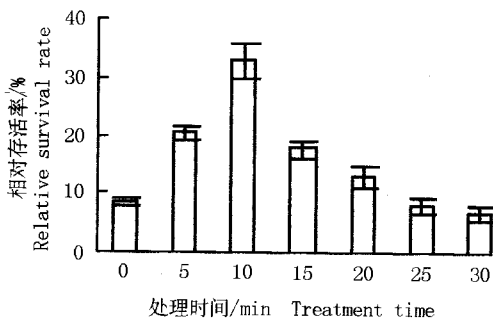


图2 体积分数 100% PVS2 处理不同时间对玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞相对存活率的影响
Fig. 2 Effect of different treatment times of 100% PVS2 on relative survival rate of *Anthurium andraeanum* Lind. embryonic suspension cells after vitrification cryopreservation

2.5 化冻温度对悬浮细胞相对存活率的影响

经过玻璃化超低温保存后再用不同温度水浴化冻,花烛胚性悬浮细胞的相对存活率见图 3。结果表明,化冻温度低,悬浮细胞的相对存活率也较低;化冻温度为 40 ℃,悬浮细胞的相对存活率最高,达到 32.1%;化冻温度超过 40 ℃,悬浮细胞的相对存活率则逐渐下降。造成这一现象的原因可能是因为化冻温度过低时细胞易发生次生结冰现象,致使细胞受到

伤害;而化冻温度过高又易使悬浮细胞受到化学毒害。所以,经过玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞水浴化冻的最适温度为 40 ℃。

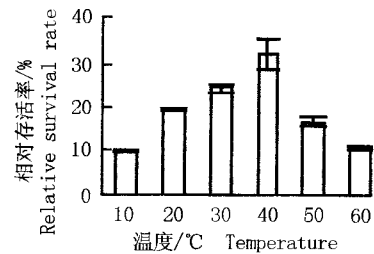


图3 化冻温度对玻璃化超低温保存后花烛胚性悬浮细胞相对存活率的影响
Fig. 3 Effect of thawing temperature on relative survival rate of *Anthurium andraeanum* Lind. embryonic suspension cells after vitrification cryopreservation

3 讨论和结论

通过上述实验,对花烛胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存过程中各步骤的适宜条件进行了比较分析,初步建立的适宜于花烛品种‘Amigo’胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存和化冻流程为:将继代培养 3~5 d、直径 2 mm 的悬浮细胞团在含 0.5 mol · L⁻¹ 山梨醇的 1/2MS 液体培养基中悬浮培养 2 d 后,置于 4 ℃ 条件下处理 24 h,然后用体积分数 25% PVS2 预处理 15 min,再于 0 ℃ 条件下用体积分数 100% PVS2 脱水 10 min,迅速投入液氮中冻存;冻存后的悬浮细胞在 40 ℃ 水浴中化冻 3 min,然后用含 1.2 mol · L⁻¹ 蔗糖的 1/2MS 液体培养基洗涤 3 次,每次 10 min,洗涤后的悬浮细胞即可转至恢复培养基中进行恢复培养。

实验结果显示,细胞的生理状态、预培养、预处理和脱水处理是决定花烛胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存能否成功的重要因素。其中,预培养可以减少细胞内的自由水含量,提高细胞的束缚水含量,增强细胞抗冻性。此外,用适宜浓度的山梨醇进行预培养,其效果优于蔗糖,这可能与“在液体培养基中添加山梨醇可以极大地降低冰晶的形成温度和形成速率”^[13]有关。

花烛悬浮细胞的含水量较大,预培养后仍需经过脱水处理以降低细胞内的含水量,而用高浓度冷冻保护剂直接进行脱水容易对细胞造成物理和化学毒害,因此,如何减少高浓度冷冻保护剂对细胞的伤害是玻璃化超低温保存成功与否的关键^[14]。研究结果表

在,在用冷冻保护剂脱水前采用低浓度保护剂进行预处理,可以获得较好的效果。可能的原因是在急速脱水前用冷冻保护剂进行预处理具有一定的缓冲效果,减轻了剧烈脱水对细胞的伤害,保持了细胞膜的完整性^[15-16];预处理后的悬浮细胞再经脱水处理,可以进一步降低细胞含水量,促进低温时玻璃化状态的形成,从而减少冰晶形成过程中对细胞膜造成的伤害^[17]。但关于预处理的作用机制目前尚未见相关报道。

一般来说,保存材料在高浓度糖中长期培养会产生高渗伤害,悬浮细胞长时间浸于玻璃化溶液中也会造成脱水过度,因此保存材料的耐胁迫性及适宜的处理时间对植物悬浮细胞玻璃化超低温保存至关重要^[18]。而保存材料对环境胁迫的耐受能力与植物的基因型以及不同阶段的生理状态等因素有关^[17],尤其是对不耐寒的热带和亚热带植物进行玻璃化超低温保存时,更应选择生理状态最佳的材料。

超低温保存过程中,保存材料在液氮中保存时间的长短对保存效果影响较小,例如:保存1 d和保存10个月的樱桃[*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don]在保存效果上无明显区别^[19]。目前,多采用5℃~40℃水浴对超低温保存材料进行化冻,花烛胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存后需要经过40℃水浴快速化冻才能保持较高的相对存活率,但木本植物冬芽超低温保存后必须在0℃低温下慢速化冻才能达到最好的效果^[20]。可见,冷冻保存的植物种类不同,其化冻温度也不同。

值得注意的是,恢复生长后花烛胚性悬浮细胞的实际再生率低于用TTC法检测的悬浮细胞的相对存活率。一方面可能是由于TTC法检测是以脱氢酶的能力为标准,不能完全反映保存材料经超低温处理后损伤程度;另一方面也可能是在超低温保存后细胞未达到恢复生长的要求。此外,超低温保存后保存材料的再生能力也可能与植物本身的抗寒性有关,因此,不同品种花烛胚性悬浮细胞的适宜保存条件有一定的差异,应分别进行进一步的深入研究。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第十三卷第二分册[M]. 北京:科学出版社,1979:9-10.
[2] 毛洪玉. 花烛[M]. 北京:中国林业出版社,2004:1-14.
[3] 陈勇,陈娴婷,王君晖. 甾甘愈伤组织的玻璃化法超低温保

存研究[J]. 浙江大学学报:理学版,2004,31(2):197-201.
[4] Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects[J]. In *Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant*, 2004, 40(5): 427-433.
[5] 谢玉明,曾继吾,张秋明,等. 玻璃化法超低温保存荔枝胚性悬浮细胞[J]. 热带作物学报,2008,29(5):622-625.
[6] 王家福,刘月学,林顺权. 枇杷茎尖二步玻璃化法超低温保存的研究[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(2):75-76.
[7] 郭燕霞,刘玉军. 长鞭红景天悬浮培养细胞的玻璃化法超低温保存研究[J]. 西北植物学报,2006,26(8):1605-1611.
[8] 辛伟杰,徐彬,王广东,等. 花烛体细胞胚胎发生及植株再生研究[J]. 园艺学报,2006,33(6):1281-1286.
[9] 许传营. 花烛体胚液体培养体系建立及体胚发生相关生理特征研究[D]. 南京:南京农业大学园艺学院,2008:31-41.
[10] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 9(1): 30-33.
[11] 刘贤旺,杜勤. 杜仲愈伤组织超低温保存的研究[J]. 生物学杂志,1996,13(4):21-24.
[12] 罗士伟,唐惕. 植物组织和细胞的超低温保存及种质库建立的研究现状[J]. 细胞生物学杂志,1983,5(1):1-7.
[13] Chen T H H, Kartha K K, Constabel F, et al. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation[J]. *Plant Physiology*, 1984, 75: 720-725.
[14] Matsumoto T, Sakai A, Yamada K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration[J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(8): 442-446.
[15] Jitsuyama Y, Suzuki T, Harada T, et al. Ultrastructural study on mechanism of increased freezing tolerance due to extracellular glucose in cabbage leaf cells[J]. *Cryo-Letters*, 1997, 18: 33-44.
[16] Steponkus P L, Langis R, Fujikawa S. Cryopreservation of plant tissue by vitrification[M] // Steponkus P L. *Advances in Low Temperature Biology: Vol. 1*. London: JAI Press, 1992: 1-61.
[17] Niino T, Sakai A, Yakuwa H, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28(3): 261-266.
[18] Takagi H, Thinh N T, Islam O M, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure[J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16(9): 594-599.
[19] Niino T, Tashiro K, Suzuki M, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification[J]. *Scientia Horticulturae*, 1997, 70(2/3): 155-163.
[20] 王君晖,黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述[J]. 园艺学报,1994,21(3): 277-282.