

浙贝母愈伤组织的超低温(-196°C)保存

浙江省中药研究所 苏 新

提要 取培养30~35天的浙贝母愈伤组织为冷冻材料,通过含5% DMSO(二甲基亚砷)的培养基预培养7天和10% DMSO+5%甘油的冷冻保护剂处理,能显著提高冷冻后愈伤组织的存活率。而且分步冷冻比快速冷冻效果更好。经过冷冻后的愈伤组织成功地得到增殖和再生鳞茎。

关键词: 愈伤组织 低温保存 浙贝母

随着植物组织培养工作广泛迅速地展开,关于植物组织细胞离体系统超低温保存技术的研究也在逐渐兴起,因为超低温保存不仅能长期保存无性繁殖植物的优良品种和育种工作所需要的纯系,还可解决组织和细胞继代培养中的变异,保存稀有和濒危的种质资源,有利于国内外种质交换。^[1-2]目前超低温保存已在40多种植物中获得成功。^[3-4]本文简要报道浙贝母愈伤组织超低温保存后,再经培养获得增殖,并长出新的小鳞茎。

材料与方 法

一、材料培养

浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq.)愈伤组织是由鳞茎芽诱导而来,在MS培养基中附加NAA 1.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+300 mg/L水解酪蛋白,蔗糖40 g/L进行培养。温度 $18^{\circ}\sim 20^{\circ}\text{C}$,光照1000~1500 Lx, pH5.8,采用培养30~35天迅速生长的愈伤组织为冷冻材料,分化诱导鳞茎用MS培养基附加6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L蔗糖30 g/L。

二、预处理及冷冻方法^[6]

预处理选择2~4 mm大小的愈伤组织块,在含5% DMSO的MS培养基中培养7天,置于聚乙烯小试管中,加入不同配比

的冷冻保护液,浸没愈伤组织,密封试管,在 0°C 冰中静止30分钟。将预处理后的材料,分别采用快冻法及分步冷冻法冷冻。

1. 快冻:将预处理后的材料直接从 0°C 投入液氮中保存。

2. 分步冷冻:预处理后的材料放入液氮以前,以 $-1\sim -5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷冻,温度降至 -18°C 时停留一小时,再以 $-1\sim -5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷冻,温度降至 -40°C 时,停留二小时,以达到适应冷冻处理的目的。然后投入液氮中保存。

三、解冻

浙贝母冷冻材料在液氮中保存18天后,取出立即投入 40°C 水溶中解冻。解冻时,操作时需要特别仔细,因为冷冻后的组织脆弱,极易受到损害,解冻后的愈伤组织用液体培养基冲洗,去除冰冻保护剂。

四、冷冻后材料活力的测定及愈伤组织再生能力的测定

解融后的材料用液体培养基冲洗后,分别用TTC(三苯基四氮唑氯化物)法^[6]测定其存活率,测定后转接入新鲜培养基中诱导增殖,观察生长及分化情况。

结果与讨论

一、愈伤组织冷冻后的存活率与预培养的关系

冷冻前, 将愈伤组织转入含 5%DMSO 的 MS 培养基中进行 7 天的预培养, 对愈伤组织进行预培养的目的是提高分裂细胞的比例和减少细胞内自由水的含量, 以此来增加细胞对低温条件的适应能力。把经过预培养的愈伤组织与不经过预培养而直接冷冻的愈伤组织相比较, 结果表明, 经过预培养的愈伤组织存活率比未经过预培养的愈伤组织高, 为 71%, 而不经预培养的愈伤组织存活率只有 42%。由此可知, 经过含 5%DMSO 培养基预培养能增加冷冻后浙贝母愈伤组织的存活率。

二、愈伤组织保存后的存活率与培养时间及冷冻保护剂的关系

将不同培养时间的愈伤组织放入冷冻保护剂中进行冷冻, 实验结果表明, 培养 30~35 天的愈伤组织存活率最高, 因为此时愈伤组织质地致密, 再生能力强。

在冷冻过程中, 由于脱水作用引起细胞内电解质浓度的提高, 这样对细胞具有一定的毒害作用, 冷冻保护剂的一种作用就是把这种毒害作用减到最少。此外, 冷冻保护剂的加入可增加细胞内液体的粘度, 减弱结冰过程, 保护细胞免遭冷冻的损害。对浙贝母愈伤组织低温保存的实验表明, 虽然葡萄糖, 蔗糖, 山梨醇、甘露醇具有一定的冷冻保护作用, 但最有效的冷冻保护剂是 10%DMSO

+ 5% 甘油, 材料存活率为 73%, 同时使用 2 种或 2 种以上的冷冻保护剂, 既可以提高细胞存活率, 还可以降低药物的毒害作用。

三、愈伤组织冷冻后的存活率与冷冻方法的关系

实验结果表明二种方法经解冻后都可以存活。快速冷冻的材料是从 0℃ 直接投入液氮中, 冷冻速率约为 200℃/分, 其存活率为 43%, 分步冷冻的方法, 是使活细胞较缓慢地进行保护性失水而冷冻, 解冻后可提高存活率, 其存活率为 78%, 由此可见, 分步冷冻对浙贝母愈伤组织的保存较为适合。

四、愈伤组织冷冻后的增殖与分化

经过冷冻后的愈伤组织, 用液体培养基冲洗几次后, 转到 MS 培养基中, 大约 7 天左右开始增殖, 新生愈伤组织呈白色及淡黄色, 待生长旺盛后转入分化培养基中, 20 天左右即分化出小鳞茎, 把诱导出的小鳞茎与栽培浙贝母鳞茎比较, 没有发现差异。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦等, 细胞生物学杂志 1983, 5:1
- [2] 简令成等, 植物学报 1987, 29(2):123
- [3] Bajaj Y. P. S 1983, Cryopreservation and international exchange of germplasm In: "Plant cell culture in crop improvement" (S. K. Sen and K. L. Giles eds) Plenum Press New York pp. 19-41
- [4] Kartha, K. K. 1985. Cryopreservation of plant Cells and Organs, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- [5] 谢启昆: 药用植物组织培养 上海科学技术出版社 1986。

Preservation of the Callus Tissues under the Condition of Superlower Temperature (-196°C) in *Fritillaria thunbergii* Miq.

Su Xin

(Zhejiang Institute of Chinese Materia Medica)

Abstract

Put the callus tissues in *Fritillaria thunbergii* Miq. which had been cultured for 30-35 days in the medium containing 5% DMSO to be precultivated for 7 days, then process them with the protective freezer containing 10% DMSO+5% glycerine. It is found that the subsistence-reat of the callus tissues was considerably raised due to the freezing measure and that the effect of the gradational freezing were much better than that of the fast freezing. Besides, the callus tissues succeeded in reproducing bulbs after receiving the freezing measure.

Key words Callus Tissues, Superlower Temperature, *Fritillaria thunbergii*