

中华猕猴桃愈伤组织细胞的超低温伤害研究*

郭延平 李嘉瑞

(西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 用 5%二甲基亚砷+10%葡萄糖或 5%二甲基亚砷+10%蔗糖作为冰冻保护剂,能有效减轻中华猕猴桃愈伤组织细胞的超低温伤害。以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 $-60\sim-75^{\circ}\text{C}$ 时,对愈伤组织细胞的伤害作用最小;以大于 $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率快速化冻,愈伤组织细胞的相对存活率最高。愈伤组织细胞伤害的主要温度区域为 $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$; $-60\sim-75^{\circ}\text{C}$ 为愈伤组织细胞投入液氮时的“安全温度区”, -60°C 和 -75°C 分别为“临界上限温度”和“临界下限温度”。

关键词 中华猕猴桃,愈伤组织细胞,超低温保存,液氮,种质保存

中图分类号 S129, S663.903.5

近 10 余年来,随着植物组织培养工作的迅速发展,一些研究者开展了植物组织细胞保存技术的研究,初步研究结果表明,植物组织或细胞置于超低温设施中保存,不仅可以长期保存在实际和研究中所需要的植物种质,而且可以避免组织的倍性因长期继代而发生变异。同时也节省了大量的人力物力^[1,2]。但是这项技术用于植物方面还不普遍,一方面是由于不同组织细胞所要求的超低温保存方法不同,另一方面是因组织细胞在超低温保存过程中受到伤害,细胞的生活力下降所致。为了避免或减少伤害,提高组织细胞的生活力,本研究以猕猴桃愈伤组织细胞为试材,对超低温伤害进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材 料

生长在 MS+ZT($1.0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)+1.0%琼脂+3.0%蔗糖培养基上,并在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 2000 lx 的条件下,培养了 18~24 d 的中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)愈伤组织。

1.2 预处理

将愈伤组织转接在附加 ZT($1.0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),1.0%琼脂及 10%蔗糖的 MS 培养基上, 5°C 下培养 2 d, 0°C 培养 6 d,然后仍在 0°C 条件下将愈伤组织切成 2~3 mm 大小,放入安瓿瓶中,加入保护剂 1 mL,平衡 30 min。

1.3 冰冻方法

将预处理好的材料放在冷冻室为 0°C 的微型程序冷冻机(法国制造)中,在不同的降温速率及预冻温度下投入液氮中。

1.4 化 冻

材料从液氮中取出后,在不同的条件下化冻,用去有机成份的 MS 培养液冲洗 3~5 次,4 次重复,SSR 测验。

收稿日期:1994-03-18

*国家自然科学基金资助项目

1.5 细胞活力检测

用 TTC 法测定^[3]。称取洗涤后的愈伤组织 300 mg,放入具有刻度的 10 mL 试管中,加入 5 mL TTC(氯化三苯基四氮唑)试剂,在 25℃的恒温培养箱中静止培养 20~24 h。吸取 TTC 溶液,用蒸馏水冲洗 3 次,加入 5 mL 95%乙醇,将试管放入 75℃水浴中,加热 30 min,提取红色的三苯基甲。用日产 UV-120 型分光光度计在 485 nm 处测试三苯基甲的吸收值,同时以新鲜的材料为对照。用相对存活率表示细胞的活力。

相对存活率=处理的 TTC 值 / 对照的 TTC 值 × 100

2 结果与分析

2.1 保护剂对愈伤组织细胞的保护作用

通过对猕猴桃愈伤组织细胞反复进行超低温冰冻试验发现,5% DMSO(二甲基亚砜)是效果最好的单一保护剂,这与 Nag^[4]和 Whithers 等^[5]报道的基本一致。为了进一步研究复合保护剂的保护效果,我们将 5% DMSO 与糖、糖醇、水解乳蛋白结合使用。从表 1 可以看出,5% DMSO 与糖、糖醇、水解乳蛋白混合使用的保护作用极显著大于 DMSO 的单独使用。但是 DMSO 与甘油的混合几乎没有加合作用。葡萄糖或蔗糖与 DMSO 结合效果最为理想。郑光植^[6]以三分三愈伤组织和悬浮培养细胞为试材的研究结果表明,水解乳蛋白的保护作用接近于 DMSO;我们将 DMSO 与水解乳蛋白混合,其保护效果并非最佳。三种保护剂组成的复合保护剂保护效果也并不理想。因此,葡萄糖或蔗糖与 DMSO 混合使用能够有效地减轻超低温伤害。

表 1 保护剂对愈伤组织细胞的保护效果

冻 冻 保 护 剂	TTC 值	新 复 极 差 测 验		相对存活力 (%)
		0.05	0.01	
5%DMSO+10%葡萄糖	1.33	a	A	75.1
5%DMSO+10%蔗糖	1.29	a	A	72.9
5%DMSO+10%聚乙二醇 6000	1.07	b	B	60.5
5%DMSO+5%水解乳蛋白+10%山梨醇	1.06	b	B	59.9
5%DMSO+5%甘油+10%山梨醇	1.03	b	B	58.2
5%DMSO+10%山梨醇	0.89	c	C	50.3
5%DMSO+5%水解乳蛋白	0.86	c	C	48.6
5%DMSO+10%甘油	0.69	d	D	40.0
5%DMSO	0.64	d	D	36.2

2.2 降温速率和预冻温度对愈伤组织细胞超低温伤害的影响

猕猴桃愈伤细胞加入保护剂 5% DMSO+10%葡萄糖,以不同的降温速率降温,结果以-1℃/min 的速率降温保护效果最好(图 1),降温速率过快或过慢均对细胞产生严重伤害。但菊芽尖以-0.2℃/min 降温速率降温,有 87%的芽尖存活。草莓茎尖则以-0.85℃/min 降温速率降温,95%以上存活^[7]。这与不同的组织材料要求不同的降温速率有关。

为了研究预冻温度与超低温伤害的关系,我们将猕猴桃愈伤组织细胞仍加入 5% DMSO+10%葡萄糖,以-1℃/min 的降温速率分别降温至-30,-40,-60,-75,

-90℃,然后投入液氮中,结果如图 2.当预冻温度达到-60~-75℃时,投入液氮后的相

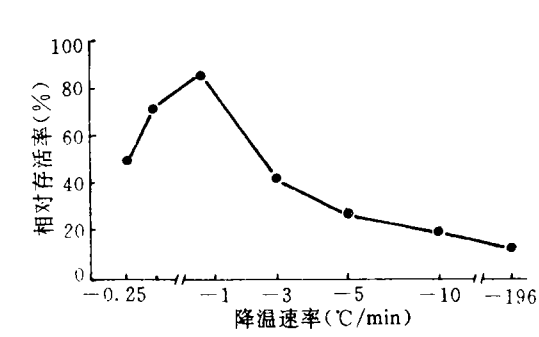


图 1 降温速率对愈伤组织细胞存活力的影响

对存活率较高,说明对猕猴桃愈伤组织细胞的伤害作用最小;当预冻温度过高或过低时,其相对存活率显著下降。一些研究者则认为预冻的终点温度以-30~-40℃较合适^[8]。这可能与组织的含水量不同有关。

为了进一步研究伤害猕猴桃愈伤组织细胞的温度范围,在不加保护剂的条件下,以-1℃/min 速率降温,每降温-10℃测定其 TTC 值,结果如图 3.图 3 表明,在-20~-40℃的温度区间内 TTC 值下降快,也就是说细胞受冻的关键在-20~-40℃的范围内。

2.3 化冻方式对愈伤组织细胞的伤害作用

表 2 表明,35~40℃水浴化冻,细胞活力最高,伤害作用最小;30℃水浴和 20℃空气中化冻对细胞伤害次之;在 5℃冰箱中和用微型程序降温机以 0.5℃/min 速率缓慢化冻

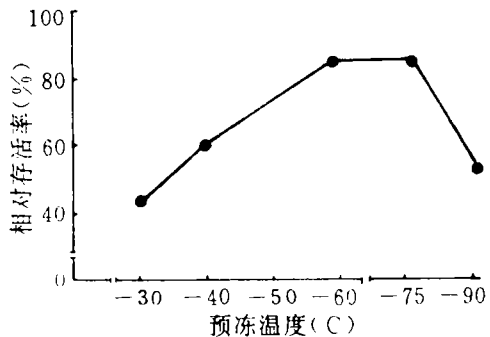


图 2 预冻温度对愈伤组织细胞伤害的影响

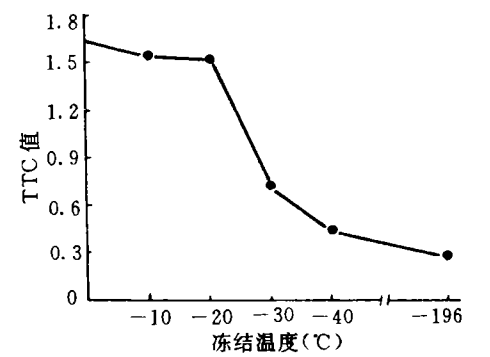


图 3 冻结温度对不加保护剂组织细胞的影响

表 2 化冻方法和化冻速率对愈伤组织细胞活力的影响

化冻方法	化冻速率 (°C/min)	TTC 值	新复极差测验		相对存活率 (%)
			0.05	0.01	
40℃水	226	1.40	a	A	85.9
35℃水浴	160	1.34	a	A	82.2
30℃水浴	120	1.11	b	B	68.1
20℃空气中	8	0.97	b	BC	59.5
5℃冰箱	3	0.81	c	C	49.7
-40~0℃ 程序降温机	0.5	0.56	d	D	34.4

细胞活力最低,伤害最严重。Bajaj^[2]和 Finkle^[9]也认为 35~40℃水浴快速化冻对材料的伤害作用较小;但 Withers^[10]却认为 20℃室温下慢速化冻与 40℃水浴快速化冻对细胞活力没有影响。从化冻速率来看,每分钟超过 160℃才能使猕猴桃愈伤组织细胞活力最高,伤

害最小,当化冻速率低于 $120^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,对细胞的伤害显著增加。但 Nag^[4]在胡萝卜培养细胞的超低温试验中发现,化冻速率每分钟超过 120°C 就可获得满意的冰冻效果。这说明不同的组织材料要求不同的化冻方法和化冻速率。

3 讨论

本试验发现,若不加入保护剂,只冷冻至 $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$,猕猴桃愈伤组织细胞就会大量死亡;反之,若加入合适的保护剂,愈伤组织细胞的相对存活率就会显著提高。深尾伟晴等^[11]认为保护剂的作用机制是增大膜对水分的通透性,促进细胞外冰冻造成的脱水效果,细胞内水分冰点降低,保护蛋白质和酶类。我们认为,冰冻保护剂还可以降低细胞内结冰对膜产生机械伤害。Sakai^[12]也认为,选好冰冻保护剂是保证细胞进行超低温处理成功的关键。

缓慢降温的过程实际上就是细胞内水分连续不断地被排除到细胞外的过程。罗士韦等^[13]认为,如果降温速率过快,细胞内水分来不及排除,而形成大的冰晶对细胞内部结构产生伤害;反之,降温速率过慢会造成细胞过度脱水,而引起 pH 值变化,有害物质积累,对细胞产生伤害。近年来,美国科学家 P. Mazur 提出慢速冷冻伤害的主要原因是细胞内不冻水份额的过度减少。这一观点提出,使降温速率对细胞产生伤害的原因明确化。不同的组织材料要求不同的降温速率,猕猴桃愈伤组织细胞要求以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温,其活力最高,降温速率过快过慢均对愈伤组织细胞产生严重伤害。我们认为用上述观点解释这一现象比较合理。

预冻温度也是组织材料成活的一个重要因素,我们将猕猴桃愈伤组织细胞加入合适的保护剂,以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 $-60\sim-75^{\circ}\text{C}$ 的区间内投入液氮,愈伤组织细胞的活力最高;而在高于 -60°C 或低于 -75°C 的条件下投入液氮,细胞活力显著下降。因此,我们把 $-60\sim-75^{\circ}\text{C}$ 的区间温度称为“安全温度区”, -60°C 和 -75°C 分别称为“临界上限温度”和“临界下限温度”。

保存于液氮中的猕猴桃愈伤组织细胞,其细胞内的水分可能以微小的冰晶形式存在,当缓慢升温($<120^{\circ}\text{C}/\text{min}$)时,这些微小的冰晶就会再结晶形成大的冰晶,对细胞产生伤害;当快速化冻($>160^{\circ}\text{C}/\text{min}$)时,细胞内微小的冰晶来不及形成大的冰晶而变成溶液,从而避免了冰晶对细胞的伤害。这可能是猕猴桃愈伤组织细胞快速化冻相对存活率高的一个主要原因。不同的组织材料要求不同的化冻方法和化冻速率,这可能与不同材料的含水量、导热性能等有关。

总之,低温科学是一门只有一二十年历史的新学科,其作用机理非常复杂,还有许多问题有待于进一步探索。

参 考 文 献

- 1 郭延平,李嘉瑞.超低温保存技术在果树种质保存中的应用.果树科学,1993,10(增):1~5
- 2 Bajaj Y P S. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica*, 1979,28:267~282
- 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.植物学报,1987,29(2):123~131
- 4 Nag K K, Street H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 1973,245:270~272

- 5 Withers L A, Siceet H E. Freeze preservation of cultured plant cells. *Physiol plant*, 1977, 39: 171~178
- 6 郑光植, 何静波, 王世林. 三分三愈伤组织及其悬浮培养细胞的冰冻贮藏. *植物学报*, 1983, 25(6): 512~517
- 7 Kartha K K, Leung N L, Pahl K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J Amer Soc Hort Sci*, 1980, 105: 481~484
- 8 柯善强. 草莓愈伤组织超低温贮藏及植株再生研究. *武汉植物学研究*, 1986, 4(3): 231~238.
- 9 Finkle B J, Ulrich J. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugar cane cells. *Plant Physiol*, 1979, 63: 598~604
- 10 Withers L A, Wheelans S K. In vitro conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica*, 1990, 45: 9~22
- 11 深尾伟晴, 森川弘道著, 周荣仁译. 保藏技术与冰冻保存. *细胞生物学杂志*, 1989, 11(2): 74~77
- 12 Sakai A. Cryopreservation of apical meristems. *Horticultural Reviews*, 1984, 6: 375~382
- 13 罗士韦, 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. *细胞生物学杂志*, 1983(1): 1~7

The Injury of *Actinidia chinensis* Callus Cells in Super-low Temperature

Guo Yanping Li Jiarui

(Department of Horticultural, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Being as cryoprotectants, 5% DMSO—10% glucose or 5% DMSO—10% sucrose could greatly reduce the injury of *Actinidia chinensis* callus cells. The injury of callus cells was minimal when freezed at the rate of $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. to $-60\sim-70^{\circ}\text{C}$. The survival rate of the callus cells was maximal when rewarmed at the rate of more than $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$. $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$ was the major temperature scope of the callus cell injury; $-60\sim-75^{\circ}\text{C}$ was the security temperature scope when callus cells were immersed in liquid nitrogen; -60°C and -75°C were the upper and lower limits of critical temperatures respectively.

Key words *Actinidia chinensis*, callus cell, super low temperature preservation, liquid nitrogen, germplasm preservation