

## 研究简报

# 仙客来愈伤组织的超低温保存

卞福花<sup>1,2</sup>, 龚雪琴<sup>2</sup>, 由翠荣<sup>2</sup>, 郑彩霞<sup>1</sup>, 曲复宁<sup>2</sup>

1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

2 烟台大学化学生物理工学院, 烟台 264005

**摘要:** 为了避免连续继代造成仙客来愈伤组织的变异, 对仙客来愈伤组织进行了超低温冷冻保存研究。以继代后处于对数生长期的愈伤组织为实验材料, 首先在含有不同蔗糖浓度的培养基上预培养不同时间, 转至不同的冰冻保护剂中直接液氮冷冻或 $-20^{\circ}\text{C}$ 预冷冻2 h, 然后液氮超冷冻保存,  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴迅速解冻, 并用相应蔗糖浓度的液体培养基洗涤, 以中性红染色测定细胞的存活率, SPSS13.0软件进行统计学分析。结果表明: 预培养基中蔗糖浓度、预培养时间、降温方式、冷冻保护剂等对解冻后材料相对存活率存在不同程度的影响, 筛选出4%蔗糖浓度预培养3 d、9号保护剂、 $0^{\circ}\text{C}$ 停留30 min后直接冷冻为超低温保存的最佳方案, 通过简单的方法获得了较好的愈伤组织保存效果。

**关键词:** 仙客来, 愈伤组织, 低温保存, 存活率

## Cryopreservation of *Cyclamen persicum* Mill. Callus

Fuhua Bian<sup>1,2</sup>, Xueqin Gong<sup>2</sup>, Cuirong You<sup>2</sup>, Caixia Zheng<sup>1</sup>, and Funing Qu<sup>2</sup>

1 College of Life Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 College of Chemistry and Biology Technology, Yantai University, Yantai 264005, China

**Abstract:** In this paper we studied cryopreservation of *Cyclamen persicum* Mill. callus to avoid variations produced by sub-culture. The callus in the logarithmic phase after sub-culture were used for experiments. Firstly, the callus were pre-cultured in culture-medium containing 4%, 6% or 8% sucrose for different time periods, transferred to different cryoprotectants to directly cryopreserve or incubated for 2 hours at  $-20^{\circ}\text{C}$ , then submersed in liquid nitrogen, lastly thawed rapidly in a waterbath at  $37^{\circ}\text{C}$ , and washed with liquid culture-medium containing the corresponding concentration of sucrose. Cell survival rate was computed after stained by Neutral Red, and SPSS 13.0 software was used for statistical analysis. The results showed that sucrose concentration, pre-culture time, cryoprotectants had various impacts on cell survival rate. We have developed a simple but effective protocol for the cryopreservation of callus of *C. persicum*. Of the different protocols tested, 4% sucrose, pre-culturing for 3 days, No. 9 cryoprotectant and freezing directly after 30 minutes at  $0^{\circ}\text{C}$  results in the highest cell survival rate.

**Keywords:** *Cyclamen persicum* Mill., callus, cryopreservation, survival rate

超低温冷冻保存生物材料从理论上可以降低甚至完全抑制其生活力及基因变异的可能性, 从而可以保持生物材料的遗传稳定性, 在解决组织、细胞继代培养造成的变异及自然界中积累性的突变、保

存和抢救物种等方面都可发挥重要的作用<sup>[1]</sup>。近年来随着植物组织培养工作广泛迅速的发展, 对植物组织细胞离体系统保存技术的研究也日益引起人们的重视, 目前已有多种植物的器官、组织和细胞培

Received: September 30, 2007; Accepted: November 12, 2007

Supported by: the Key Technologies Program of Office of Science and Technology of Shandong Province (No.2004GG4202010).

Corresponding author: Funing Qu. Tel: +86-535-6901995; Fax: +86-535-6902063; E-mail: qfnzp@ytu.edu.cn

养物的超低温保存获得成功<sup>[2-4]</sup>。

仙客来 *Cyclamen persicum* Mill. 为报春花科仙客来属植物, 是一种重要的观赏花卉, 自然界通过种子繁殖和通过扦插、嫁接等营养繁殖, 后代都表现出很大变异, 通过组织培养获得再生器官和体细胞胚胎可以达到增殖快繁的目的, 但是随着愈伤组织继代次数的增加, 导致后代变异的几率加大<sup>[5]</sup>。为了避免仙客来愈伤组织继代过程中产生变异, 同时也减少连续继代带来的劳动力和资金的浪费, 本实验对仙客来的愈伤组织进行了冷冻保存研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

仙客来品种 1505 F<sub>1</sub> 代种子购自山东莱州仙客来研究所, 温水浸泡 24 h, 流水冲洗 3~5 h, 转入无菌空瓶, 0.1% 升汞灭菌 15 min, 无菌水漂洗 5 次, 每次 5 min。接种到 1/2MS 基本培养基中, 25°C、黑暗条件

下进行种子萌发。种苗长到 3~5 cm 时, 切取球茎, 纵切为 3~4 块, 接种在愈伤组织诱导培养基上, 基本培养基为 1/2MS, 附加 2 mg/L 的 2,4-D 和 0.2 mg/L 的 6-BA, 肌醇和酪蛋白分别为 100 mg/L, 蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 温度 25°C, 黑暗培养。20 d 继代 1 次, 10~12 d 处于对数生长期的愈伤组织作为实验材料。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 预培养

将处于对数生长期的愈伤组织分别转入含有 4%、6%、8% 蔗糖的培养基(其余成分同诱导培养基)中预培养 3 d、5 d、7 d, 以 3% 蔗糖浓度不进行预培养为对照。

#### 1.2.2 脱水及冷冻

以 1/2MS 为基础液体培养基、10% 二甲亚砜(DMSO)为基本保护剂, 添加不同浓度的蔗糖和山梨醇, 配制成为不同的保护剂(见表 1), 除 DMSO 外, 各类保护剂先溶于 1/2MS 液体培养基, 高温高压灭

表 1 保护剂  
Table 1 Cryoprotectants

Components of cryoprotectants	6% sucrose	12% sucrose	18% sucrose
10% DMSO +6% sorbitol			
10% DMSO +12% sorbitol			
10% DMSO +18% sorbitol			

菌后, 无菌条件下加入 DMSO。取适量预培养的愈伤组织放入装有预冷至 0°C 保护剂的离心管中, 0°C 停留 30 min, 直接投入液氮冷冻, 或 -20°C 预冷冻 2 h 后投入液氮中冻存, 以不加冷冻保护剂为对照。

#### 1.2.3 解冻与洗涤

取出液氮中冷冻的愈伤组织于 37°C 水浴快速解冻, 解冻后迅速用相应蔗糖浓度的 1/2MS 液体培养基洗涤 3 次, 每次 5~8 min。

#### 1.2.4 存活率测定

以 0.03% 的中性红染色测定细胞存活率, 显微镜下观察并计数, 无色或仅有液泡呈淡红色的为活细胞, 核被染成鲜红色或整个原生质呈鲜红色的为死细胞, 统计总细胞数 1000 个以上, 存活率=活细胞数/总细胞数×100%。

#### 1.2.5 实验结果的统计分析

实验数据利用 SPSS13.0 分析软件进行相关性和均值比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 各因素对细胞存活率的相关性

相关性统计分析结果见表 2, 预培养蔗糖浓度、预培养时间对细胞存活率的 Pearson 相关系数分别为 -0.224、-0.302, 表明他们之间分别呈负相关, Sig. (2-tailed) 分别为 0.004 和 0.000 均小于 0.01, 表明显著相关。SPSS13.0 统计学软件要求变量为数字形式, 所以将直接冷冻定义为 1、预冷冻定义为 2 进行相关性分析, 所得 Pearson 相关系数为 -0.129, Sig. (2-tailed)=0.102>0.01, 表明二者不相关, 冷冻保护剂为复合型, 将九种保护剂以阿拉伯数字形式表示, 分析结果为: 与细胞存活率的 Pearson 的相关系数为 0.069, Sig. (2-tailed)=0.386>0.01, 表明呈显著不相关。由此冷冻方法和保护剂的显著性水平不具有统计学意义, 主要原因在于降温方法、保护剂种类不属于正态分布, 所以此法不适合于它们的相关分

表 2 各因素对存活率的相关性分析

Table 2 Relevant analysis on various factors and survival rate

Items	Survival rate	
Sucrose concentration	Pearson Correlation	-0.224(**)
	Sig. (2-tailed)	0.004
	N	162
Pre-culture time	Pearson Correlation	-0.302(**)
	Sig. (2-tailed)	0.000
	N	162
Freezing	Pearson Correlation	-0.129
	Sig. (2-tailed)	0.102
	N	162
Cryoprotectant	Pearson Correlation	0.069
	Sig. (2-tailed)	0.386
	N	162

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

析。另外由于各项对照实验得到的细胞存活率太低,影响同组实验的数据分析,故在用 SPSS 软件分析时只考虑不同因素对细胞存活率的影响,不考虑对照实验结果。

## 2.2 预培养蔗糖浓度对冷冻后细胞活力的影响

预培养的主要目的是减少细胞内自由水含量、提高愈伤组织的抗冻能力、减少或避免冷冻伤害,常用的方法有高渗处理、冷驯化。本研究对仙客来愈伤组织进行不同浓度蔗糖的高渗处理,均值和标准差比较分析见表 3 和图 1,结果显示 4%蔗糖浓度

表 3 不同蔗糖浓度细胞存活率的均值及标准差

Table 3 The means and Std. deviation of survival rate produced by different sucrose concentration

Concentration of sucrose/%	Mean	N	Std. Deviation
4.00	81.1944	54	15.77507
6.00	73.1648	54	18.43241
8.00	70.8426	54	20.86385
Total	75.0673	162	18.89059

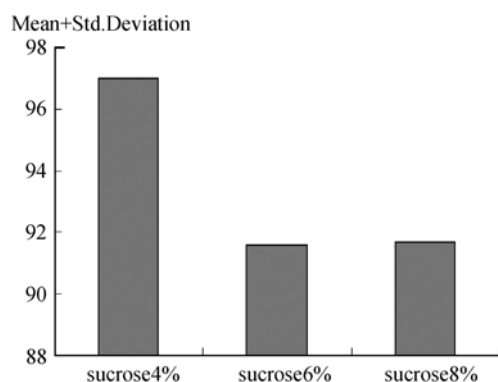


图 1 蔗糖浓度比较

Fig. 1 Comparison of different sucrose concentration

对愈伤组织进行预培养,细胞的抗冻能力明显高于 6%和 8%。仙客来愈伤组织继代培养我们一直选用 3%蔗糖浓度,而进行冷冻保存前预培养的蔗糖浓度为 4%、6%、8%,浓度越高,细胞的渗透压越大,可以减少细胞内更多的自由水含量,但是偏离细胞生存已适应的蔗糖浓度越多,内环境改变较大,对细胞的破坏程度加大,最终导致较高蔗糖浓度预培养的细胞存活率低于低浓度预培养的存活率。

## 2.3 预培养时间对冷冻后细胞活力的影响

愈伤组织细胞的抗冻力一方面受预培养基中蔗糖浓度的影响,同时预培养时间长短同样具有非常重要的影响。通过对不同预培养时间的细胞存活率均值及标准差的统计分析(表 4、图 2),结果表明预培养 3 d 的均值+标准差为最高 95.73024,抗冻力最强,预培养 7 d 最低为 89.32235,表明随着预培养时间的延长,细胞的活力下降,尤其是高浓度蔗糖培养基进行预培养,时间越长,细胞存活率越低,表明长时间高浓度蔗糖培养对细胞会造成一定程度的伤害。叶芳等认为高蔗糖浓度的预培养基对愈伤组织超低温保存比较合适<sup>[6]</sup>,与本研究结果不一致,

表 4 不同预培养天数细胞存活率的均值及标准差

Table 4 The means and Std. deviation of survival rate produced by different pre-culture time periods

Pre-culture time Periods/d	Mean	N	Std. Deviation
3.0	83.2204	54	12.50984
5.0	72.6852	54	20.47071
7.0	69.2963	54	20.02605
Total	75.0673	162	18.89059

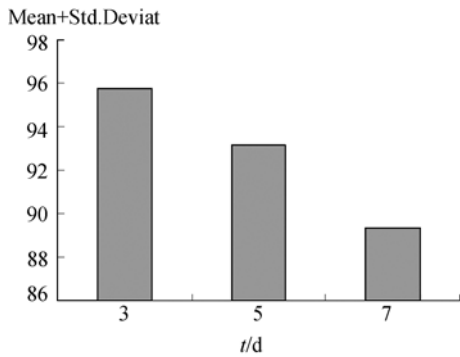


图 2 预培养时间比较

Fig. 2 Comparison of different pre-culture time

笔者认为可能是由物种本身的特性造成的。

#### 2.4 不同冷冻方式对冷冻后细胞活力的影响

为有效的阻止细胞液或液泡结冰，同时为防止预培养后胞质中溶液浓度过高，有害物质积累太多，破坏膜结构，常采用的降温方式有快速(直接)冷冻法、慢速冷冻法和分级冷冻法，本实验参考前人的经验和本实验室条件，将几种冷冻方式结合起来，首先 0°C 停留 30 min，接着直接液氮冷冻或 -20°C 预冷冻 2 h，然后转入液氮冷冻，统计分析结果(表 5、图 3)表明直接冷冻的效果明显好于预冷冻的效果，与杨文等的结果一致<sup>[7]</sup>，与简令成等的结果不相符

表 5 不同降温方式下存活率的均值及标准差

Table 5 The means and Std. deviation of survival rate produced by different methods of dropping in temperature

Dropping in temperature	Mean	N	Std. Deviation
Freeze directly	77.4938	81	16.58830
Pre-freeze	72.6407	81	20.76233
Total	75.0673	162	18.89059

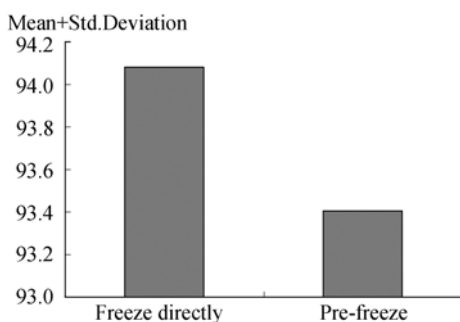


图 3 降温方式比较

Fig. 3 Comparison of different methods of dropping in temperature

合<sup>[8]</sup>。一般情况下，为了避免化冻时细胞内重结晶，产生大冰晶对细胞造成机械损伤，快速冷冻的材料

需要快速解冻、慢速冷冻需要慢速解冻，但是快速解冻较高的温度虽然升温足够快，但是细胞中的冰晶融化后容易导致细胞因温度过高而死亡，本研究采用 37 °C 快速解冻的方法，既可以使细胞快速解冻又不至于导致细胞死亡，是快冻比慢冻效果好的原因之一，同时快速冷冻可以使细胞迅速通过冰晶产生的危险温度区(-10°C~140°C)，减小对细胞损伤。

#### 2.5 不同保护剂对冷冻后细胞活力的影响

选择合适的冷冻保护剂对冻存愈伤组织细胞是最为关键的因素，高浓度的保护剂有利于保护效果，但同时也加剧了对细胞的毒性。常用的有蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇等多种糖、醇类非渗透性保护剂，具备高溶解度、毒性小、易从组织细胞中洗掉等特性，一定程度上可以降低甚至抵消渗透型保护剂对细胞产生的毒性，渗透性保护剂 DMSO 应用广泛，作用稳定，两类结合使用可以最大限度的降低对细胞的毒性<sup>[9]</sup>。本研究以 10% 的 DMSO 为基本保护剂，有报道表明复合型的保护剂对细胞的毒性比单一型保护剂小，所以选择山梨醇和蔗糖配成复合型保护剂，以最大限度提高细胞的抗冻能力，同时降低对细胞的毒性。均值和标准差比较分析见表 6 和图 4，细胞存活率 9 号>2 号>6 号>3 号>7 号>8 号>1 号>5 号>4 号，9 号保护剂最好，冻存后细胞的绝对存活率达 90% 以上，4 号最差，符合理论和实际情况。

表 6 不同保护剂下存活率的均值及标准差

Table 6 The means and Std. deviation of survival rate produced by different Cryoprotectants

Cryoprotectants	Mean	N	Std. Deviation
1	80.5556	18	10.97710
2	70.6389	18	24.67423
3	75.9278	18	17.05354
4	69.1833	18	20.21311
5	63.5000	18	26.25553
6	82.1222	18	11.69256
7	77.3889	18	15.07292
8	76.8722	18	15.03485
9	79.4167	18	18.91953
Total	75.0673	162	18.89059

### 3 讨论

Winkelmann T 等研究了仙客来悬浮培养细胞的冷冻保存，细胞的最高再生率为 75%<sup>[10]</sup>，本文首次对仙客来固体培养基上的愈伤组织进行了冷冻保存

研究, 筛选出了最佳保存方案, 细胞存活率达 90% 以上, 方法简便、廉价。既保持了该种植物的遗传稳定性, 为其后续的研究工作提供材料保障, 降低了由于继代造成的人力和物力的浪费, 同时也为其它植物愈伤组织的冷冻保存提供技术参考。

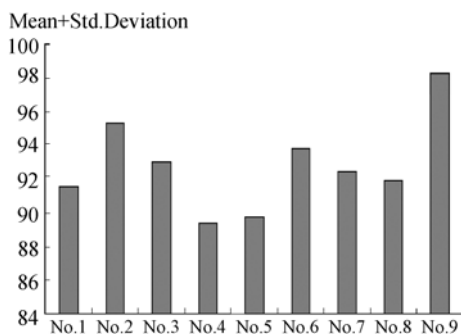


图 4 不同冷冻保护剂的比较

Fig. 4 Comparison of different Cryoprotectants

冻存后细胞活力的测定, 随着相关研究的不断深入, 出现了多种染色方法, 如 Evan's 蓝法、FDA 法、TTC 还原法、FDA-酚藏红花双染色法等, 采用哪种方法进行生活力测定一般依据外植体种类而定。国内多数研究者采用 TTC 还原法<sup>[6, 9, 11]</sup>, TTC 溶液渗入活细胞内, 产生红色的 TTF(三苯甲月替), 由颜色的深浅程度推知细胞生活力强弱, 与细胞呼吸作用直接相关, 呼吸作用容易受环境温度、空气、水份等的影响, 造成结果误差较大, 需要多次试验来验证。本研究实验材料为固体培养基上获得的愈伤组织, 通过 TTC 法和本研究采用方法的比较发现(未显示), 后者更适合于此类细胞存活率的测定, 简单易操作、误差小, 为细胞存活率测定的一个新尝试。

超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存的理想方法, 可以保持种质的遗传稳定性, 达到长期保存的目的。但是影响植物组织冻存效果的因素很多, 除了受预培养、脱水、冷冻、保护剂、解冻等因素的影响外, 还与细胞的分裂状态有关, 一般处于旺盛对数分裂期的细胞抗冻力强、存活率高。此外冻存后细胞的存活率因植物基因型、抗冻性、器官、组织和细胞的年龄、生理状态而不同, 因此难以用一种方法或体系保存同一种或不同种的植物材料, 必须根据其生活特性, 研究并建立与之相适应的保存方案或体系。

## 4 结论

本实验比较成功地保存了仙客来的愈伤组织, 并建立了一套简单、高效、切实可行的超低温冷冻

保存程序, 首先将处于对数生长期的愈伤组织在含有 4%蔗糖浓度的继代培养基中预培养 3 d, 转入 9 号保护剂(1/2MS+10%DMSO+18%山梨醇+18%蔗糖), 0°C 停留 30 min, 直接于液氮中冷冻保存, 冷冻后的愈伤组织 37°C 快速解冻, 迅速用相应蔗糖浓度的 1/2MS 液体培养基洗涤 3 次, 每次 5~8 min, 进行恢复培养。

## REFERENCES

- [1] Ulrich JM, Ginoza H. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of tropical plant. *Cryobiology*, 1979, **16**: 550-556.
- [2] Laniné E, Bade P, David A. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Rep*, 1992, **11**: 295-298.
- [3] Häggman HM, Rynänen LA, Aronen TS, et al. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell Rep*, 1998, **18**: 863-867.
- [4] Mathur G, Alkutar VA, Nadgauda RS. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Pinus roxburghii*. *Biol Plant*, 2003, **46**: 205-210.
- [5] Bian FH, Qu FN, Zheng CX, You CR, Gong XQ. Recent advances in *Cyclamen persicum* Mill. somatic embryogenesis. *Northern Horticulture*, 2007, **8**: 70-72.  
卞福花, 曲复宁, 郑彩霞, 由翠荣, 龚雪芹. 仙客来体胚发生的研究进展. *北方园艺*, 2007, **8**: 70-72.
- [6] Ye F, Xia S, Mei XG. Studies on factors in cryopreservation of *Taxus callus*. *J Wuhan Bot Res*, 2001, **19**(4): 327-331.  
叶芳, 夏胜, 梅兴国. 红豆杉愈伤组织超低温保存有关因素的研究. *武汉植物学研究*, 2001, **19**(4): 327-331.
- [7] Yang W, Liu CY, Bu XL, Luan HC, Wang L. Study on callus cryopreservation of *Freesia refracta* Klatt. *J Northeast Normal University(Natural Science Edition)*, 1999, **4**: 70-72.  
杨文, 刘春艳, 卜秀玲, 栾恒淳, 王丽. 香雪兰愈伤组织的超低温保存研究. *东北师大学报(自然科学版)*, 1999, **4**: 70-72.
- [8] Jian LC, Sun DL, Sun LH. Studies on factors in cryopreservation of sugarcane calluses. *Acata Bot Sin*, 1987, **29**(2): 123-131.  
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.
- [9] Xu GB, Yi W, Li ME, Zheng CY. The studies of cryopreservation of callus for maidenhair tree(*Gibgko biloba* L.). *Scientia Silvae Sinicae*, 2001, **37**(3): 30-34.  
徐刚标, 易文, 李美娥, 郑从义. 银杏愈伤组织超低温保存的研究. *林业科学*, 2001, **37**(3): 30-34.
- [10] Winkelmann T, Mußmann V, Serek M. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Rep*, 2004, **23**: 1-8.
- [11] Ge F, Wang XD, Zhao B, Wang YC. Cryopreservation of *Cistanche deserticola* Callus. *Chinese Journal of Process Engineering*, 2006, **6**(5): 794-798.  
葛锋, 王晓东, 赵兵, 王玉春. 肉苁蓉愈伤组织的超低温保藏方法. *过程工程学报*, 2006, **6**(5): 794-798.