江西农业大学学报　2024,46(1)　　http://xuebao.jxau.edu.cn
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis　　https://doi.org/10.3724/aauj.2024012

俞嘉卿,邱涵,余文捡,等.南方红豆杉悬浮细胞超低温保存体系的建立[J].江西农业大学学报,2024,46(1):118-127.
YU J Q,QIU H,YU W J,et al.Establishment of cryopreservation system of *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2024,46(1):118-127.

南方红豆杉悬浮细胞超低温保存体系的建立

俞嘉卿[1,2],邱　涵[1,2],余文捡[1,2],钱宇星[1,2],黄　林[1,2],魏赛金[1,2*]

(1.江西农业大学 生物科学与工程学院,江西 南昌 330045;2.江西农业大学 应用微生物研究所,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】紫杉醇具有广谱抗癌作用,但其在红豆杉中含量极低,已无法满足日益增长的临床需求。目前,红豆杉悬浮细胞培养技术被认为是解决紫杉醇稀缺的有效途径之一,然而细胞经过连续不断传代后容易发生遗传性变异,导致细胞生长状态不佳,合成紫杉醇的能力下降。研究提出一个优化的超低温保存南方红豆杉悬浮细胞的方法以解决这一难题。【方法】以南方红豆杉悬浮细胞为材料,采用单因素试验,研究预培养温度、预培养时间、预处理剂、脱水时间、冷冻保护剂及解冻温度对细胞存活的影响,并在此基础上以细胞存活率为优化目标对超低温保存条件进行响应面优化。【结果】根据单因素试验筛选出3个显著影响因素,分别为蔗糖浓度、脱水时间、解冻温度;通过响应面优化获得细胞最佳保存条件为:南方红豆杉悬浮细胞首先在B5培养基中预培养12 d,预培养温度为5℃,然后室温下用6.6%蔗糖预处理30 min,去除预处理剂,加入20%乙二醇+35%甘油+10%DMSO+10%山梨醇作为冷冻保护剂,在0 ℃条件下脱水处理31 min,0 ℃冰浴30 min,-20 ℃放置2 h,最后放入-80 ℃冰箱中保存14 d。冷冻后的悬浮细胞在41 ℃水浴60 s迅速解冻,接着用含1.2 mol/L蔗糖的B5培养基洗涤去除保护剂,最后在B5培养基上对悬浮细胞进行恢复性培养。经过上述冻存处理的南方红豆杉悬浮细胞存活率可达68.19%。【结论】建立了南方红豆杉悬浮细胞的超低温保存体系,并对其进行了优化,取得了一定的冻存效果,这为南方红豆杉及其他药用植物细胞的长期维持提供了技术参考。

关键词:南方红豆杉;悬浮细胞;超低温保存
中图分类号:S791.49　　**文献标志码:**A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID):**
文章编号:1000-2286(2024)01-0118-10

Establishment of cryopreservation system of *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells

YU Jiaqing[1,2], QIU Han[1,2], YU Wenjian[1,2], QIAN Yuxing[1,2], HUANG Lin[1,2], WEI Saijin[1,2*]

(1. School of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.Institute of Applied Microbiology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [**Objective**] Paclitaxel has a broad-spectrum anticancer effect, but its content in Taxus is extremely low, which was unable to meet the growing clinical needs. At present, *Taxus suspension* cell culture technology is considered to be one of the effective ways to solve the scarcity of paclitaxel. However, cells are

收稿日期:2023-10-05　　**修回日期:**2023-12-05
基金项目:江西省自然科学基金重点项目(20202ACBL205003)
Project supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Jiangxi Province(20202ACBL205003)
作者简介:俞嘉卿,硕士生,orcid.org/0000-0002-4294-1111,yujiaqing0825@163.com;*通信作者:魏赛金,教授,博士,主要从事微生物与植物相互作用研究,orcid.org/0000-0003-3529-7011,weisaijin@126.com。

prone to genetic variation after continuous passage, resulting in poor cell growth and decreased ability to synthesize paclitaxel. To solve this problem, this study proposes an optimized method for cryopreservation of *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells. [**Method**] The effects of preculture temperature, preculture time, pretreatment agent, dehydration time, cryoprotectant and thawing temperature on cell survival were investigated by single factor experiment with *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells as materials. On this basis, the response surface optimization of cryopreservation conditions was conducted with cell survival rate as the optimization objective. [**Result**] According to the single factor test, three significant influencing factors were selected, which were sucrose concentration, dehydration time and thawing temperature. By response surface optimization, the optimal preservation conditions of cells were obtained. *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells were first precultured in B5 medium for 12 days at a preculture temperature of 5 ℃, then pretreated with 6.6% sucrose for 30 min at room temperature, removed the pretreatment agent, added 20% ethylene glycol + 35% glycerol + 10% dimethyl sulfoxide + 10% sorbitol as cryoprotectant, dehydrated at 0 ℃ for 31 min, iced at 0 ℃ for 30 min, placed at −20 ℃ for 2 h, and finally placed in a refrigerator at −80 ℃ for 14 days. The frozen suspension cells were rapidly thawed in a water bath at 41 ℃ for 60 s, and then washed with B5 medium containing 1.2 mol/L sucrose to remove the protective agent. Finally, the suspension cells were resuscitated on B5 medium. The survival rate of *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells after the above cryopreservation treatment could reach 68.19%. [**Conclusion**] In this study, the cryopreservation system of *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells was established and optimized, and a certain cryopreservation effect was achieved, which provided a technical reference for the long-term maintenance of *Taxus wallichiana* var.*mairei* and other medicinal plant cells.

Keywords: *Taxus wallichiana* var. *mairei*; suspension cell; cryopreservation

【研究意义】南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var.*mairei*)是红豆杉科的裸子植物,广泛分布于全球各地。紫杉醇是有史以来第一个用于抗癌的药物,主要存在于红豆杉的树皮中[1]。然而植物源性紫杉醇由于在红豆杉中的含量较低而供不应求,限制了其临床应用[2]。植物细胞培养技术具备零污染、生产成本低、繁殖效率高等系列优点,可用于大规模生产紫杉醇[3]。然而,在离体培养过程中,频繁继代会使细胞遭受细菌和真菌的污染,并且容易让细胞出现变异导致合成代谢产物的能力下降[4]。因此,为了更好的保存南方红豆杉高产细胞系,有必要对其保存方法进行探究。【前人研究进展】超低温冷冻保存是指植物在超低温条件下,细胞中的酶活性受到抑制,降低其新陈代谢,而经过解冻后又能恢复到原来的生理状态,从而使种质资源得以长期保存[5]。通常不同的植物材料需要选择不同的冷冻方法,主要包括慢冻法、快冻法、玻璃化法、包埋玻璃化法、小滴玻璃化法和包埋脱水法等[6]。当前,许多研究表明已经成功对植物材料包括器官、组织和细胞等进行超低温冷冻保存[7-8]。Sakai 等[9]通过玻璃化法成功冷冻保存了脐橙(*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka)的珠心细胞,经恢复培养后表现出较高的成活率。Fenning 等[10]评估了北美云杉(*Picea sitchensis*(Bong.)Carr.)199 个细胞系的超低温保存能力,结果成功建立了 45 个细胞系。【本研究切入点】目前,本实验室已经建立了稳定的南方红豆杉细胞悬浮培养体系,而对于该细胞的超低温保存技术还鲜有报道,因此有必要开发出一种适合南方红豆杉悬浮细胞超低温保存的技术以保存优良高产细胞系。【拟解决的关键问题】研究将以南方红豆杉悬浮细胞为材料,从预培养、预处理、脱水、冷冻、解冻等方面进行单因素试验并进行响应面优化,旨在建立南方红豆杉悬浮细胞超低温保存的技术体系,为长期稳定保存南方红豆杉细胞资源奠定重要基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *mairei*)两年生嫩茎采自江西农业大学生工院实训基地(28.76°N, 115.83°E),以两年生的南方红豆杉嫩茎通过组织培养诱导获得愈伤组织,继代培养至 5 代[11]。选取颗粒

疏松，黄白色、生长良好的愈伤组织进行悬浮黑暗培养，获得红豆杉悬浮细胞[12]。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验

（1）预培养。选取悬浮培养 14 d的细胞为试验材料，接种到B5培养基上进行预培养。预培养进行2次单因素试验：①预培养温度0，5，10，15，20，25 ℃；②预培养时间0，3，6，9，12，15 d，以未经预培养为对照，分别比较不同预培养温度和时间对悬浮细胞超低温保存后存活率的影响。

（2）预处理。将悬浮细胞离心后去除上清液，加入不同浓度的蔗糖（4%、6%、8%）以及海藻糖（4%、6%、8%）作为预处理剂处理30 min，以未经预处理为对照，比较不同预处理剂对悬浮细胞超低温保存后存活率的影响。

（3）脱水。将预处理后的细胞离心去除预处理剂，然后加入冷冻保护剂，该溶液由35%甘油、20%乙二醇、10%DMSO和10%山梨醇组成，并在0 ℃下脱水0，10，20，30，40，50 min，比较不同脱水时间对悬浮细胞超低温保存后存活率的影响。

（4）冷冻。使用20%乙二醇和35%甘油作为基础保护剂，再将二甲基亚砜DMSO（5%、10%）分别同蔗糖（5%、10%）或山梨醇（5%、10%）混合以配置成不同的冷冻保护剂。将脱水后的细胞放入冷冻管中，加入不同浓度组合的冷冻保护剂，然后通过逐级降温法进行冷冻保藏（0 ℃冰浴30 min，−20 ℃，2 h，最后放入−80 ℃冰箱中保存14 d）。上述冷冻保护剂通过单一或组合使用共设计成14种处理，以不加保护剂为对照，比较不同冷冻保护剂对悬浮细胞超低温保存后存活率的影响。

（5）解冻温度。将冻存后的细胞置于不同温度（10，20，30，40，50，60 ℃）水浴中化冻，然后立即使用含有1.2 mol/L蔗糖的B5培养基将细胞在25 ℃下洗涤3次，每次10 min。

以上试验待考察参数初始值为：预培养温度4 ℃，预培养时间12 d，预处理剂选择6%蔗糖，冷冻保护剂组合为35%甘油+20%乙二醇+10%DMSO+10%山梨醇，脱水时间30 min，解冻温度37 ℃。以初始值为基础，针对每个参数对冻后细胞存活率的影响，确定最优值。

1.2.2 响应面优化

综合上述单因素试验的结果，以细胞存活率作为优化目标，选择蔗糖浓度、脱水时间和解冻温度3个因素为自变量，进行三因素三水平Box−Behnken响应面优化，设计因素及水平如表1所示，并根据软件预测出的最佳保存条件进行验证试验。

表1 Box−Behnken设计因素水平及编码

Tab.1 Codes and levels of factors in Box−Behnken experiment

水平 Levels	因素 Factors		
	A：蔗糖浓度/% Sucrose concentration	B：脱水时间/min Dehydration time	C：解冻温度/℃ Thawing temperature
1	5	25	35
0	6	30	40
−1	7	35	45

1.2.3 细胞存活率的检测

采用TTC法检测细胞存活率[13−14]。具体操作如下：称取200 mg洗涤后的细胞于10 mL试管中，分别加入2.5 mL 0.4% TTC溶液和磷酸缓冲液，置于25 ℃黑暗条件16 h后除去TTC溶液，用蒸馏水洗涤3次，之后加入95%乙醇5 mL，然后将试管置于60 ℃水浴中脱色30 min，室温静置至细胞完全无色。取上清液，用紫外分光光度计测定其在485 nm下的吸光度值。

细胞存活率（%）=冻存后细胞TTC值/冻存前细胞TTC值×100%

1.3 分析方法

每组试验均重复3次，采用Origin 2021进行整理和绘图，使用SPSS 26软件进行组间方差分析及显著性检验，$P<0.05$为差异显著。

2　结果与分析

2.1　单因素试验结果

2.1.1　不同预培养温度对细胞存活率和细胞活力的影响

未经预培养就进行超低温保存的细胞存活率最低,仅为25.03%,此时大多数细胞处于死亡状态。将红豆杉悬浮细胞在不同温度下进行预培养,由图1可知,随着预培养温度的升高,超低温冷冻保存的细胞存活率和细胞活力均先升高再降低。当预培养温度为5 ℃时,南方红豆杉细胞存活率和细胞活力达到最大值,分别为54.7%、0.75。当以25 ℃的温度进行预培养时,细胞存活率仅为32.71%,这说明适当的低温锻炼有利于细胞的冻存。因此,本试验选取5 ℃作为悬浮细胞超低温保存的预培养温度。

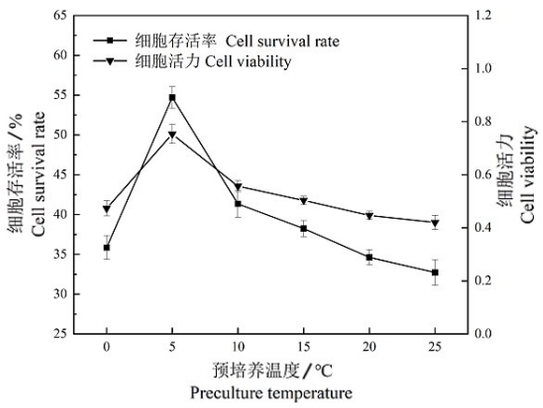


图1　不同预培养温度对细胞存活率及活力的影响

Fig.1　Effect of different preculture temperature on cell survival rate and viability

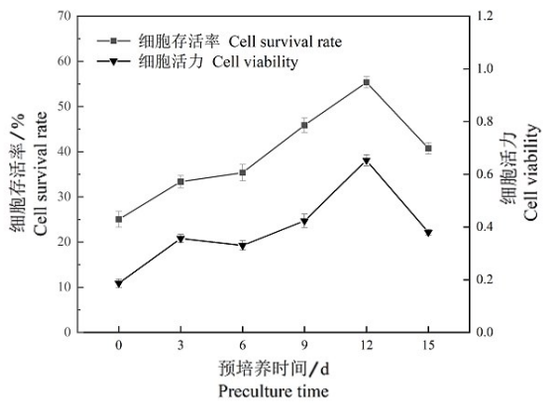


图2　不同预培养时间对细胞存活率及活力的影响

Fig.2　Effect of different preculture time on cell survival rate and viability

2.1.2　不同预培养时间对细胞存活率和细胞活力的影响

由图2可知,随着预培养时间的延长,细胞活力和存活率呈现先上升再下降的趋势。当预培养时间为12 d时,细胞存活率和细胞活力均显著(P<0.05)高于其他组,分别为55.36%和0.65,这表明悬浮细胞经过一定时间的预培养能有效抵抗超低温环境给细胞带来的损伤。因此,本试验选取12 d作为悬浮细胞超低温保存的预培养时间。

2.1.3　不同预处理剂对细胞存活率和细胞活力的影响

不同预处理剂对细胞存活率和细胞活力的影响如图3所示,细胞在使用预处理剂进行处理后,其细胞活力及存活率明显提高,但是不同浓度预处理剂对细胞存活的影响不同。在使用6%蔗糖作为预处理剂处理细胞时,细胞冻存后存活率最高,达到61.82%。与对照组相比,细胞活力及存活率均有显著提高,这是由于预处理剂能脱去细胞部分自由水,减少冻伤。因此,本试验选择6%蔗糖作为悬浮细胞的预处理剂。

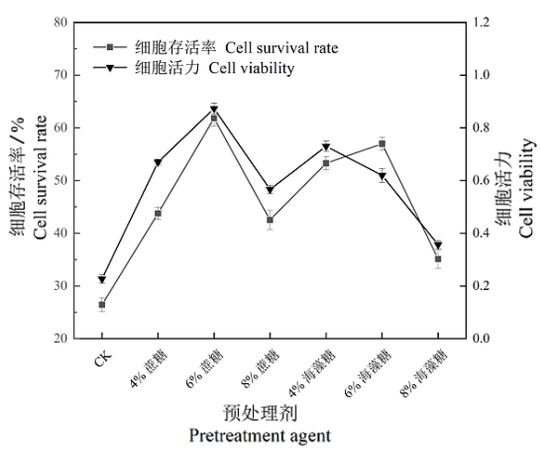


图3 不同预处理剂对细胞存活率及活力的影响

Fig.3 Effect of different pretreatment agent on cell survival rate and viability

2.1.4　不同冷冻保护剂对细胞存活率和细胞活力的影响

由表2可知,加入冷冻保护剂的细胞活力及存活率都高于对照组,这说明冷冻保护剂有利于细胞的超低温保存。就单一保护剂而言,无论是DMSO还是蔗糖和山梨醇,10%的浓度对于细胞的超低温保存的效果更好;而在组合保护剂中,10% DMSO+10%山梨醇对细胞的保存效果要优于其他组合保护剂,在该保护剂作用下,南方红豆杉细胞存活率可达64.26%,细胞活力为0.92。

表 2 不同冷冻保护剂对细胞存活率及活力的影响

Tab.2 Effect of different cryoprotectant on cell survival rate and viability

编号 Number	DMSO浓度/% DMSO concentration	蔗糖浓度/% Sucrose concentration	山梨醇浓度/% Sorbitol concentration	细胞存活率/% Cell survival rate	细胞活力 Cell viability
1	0	0	0	17.51±1.29^{g}	0.12±0.03^{h}
2	5	0	0	29.68±1.37^{c}	0.44±0.02^{c}
3	10	0	0	30.62±1.33^{c}	0.57±0.03^{b}
4	0	5	0	24.11±1.43^{d}	0.46±0.02^{c}
5	0	10	0	28.62±1.11^{c}	0.40±0.02^{d}
6	0	0	5	37.06±1.61^{b}	0.56±0.03^{b}
7	0	0	10	42.02±1.21^{a}	0.63±0.02^{a}
8	5	5	0	31.79±2.94^{e}	0.32±0.02^{ef}
9	5	10	0	32.40±2.42^{e}	0.30±0.03^{f}
10	10	5	0	25.42±1.92^{f}	0.22±0.02^{g}
11	10	10	0	31.60±2.52^{e}	0.35±0.02^{e}
12	5	0	5	41.10±2.38^{d}	0.52±0.03^{d}
13	5	0	10	51.83±2.28^{b}	0.66±0.01^{b}
14	10	0	5	46.61±1.73^{c}	0.60±0.03^{c}
15	10	0	10	64.26±3.20^{a}	0.92±0.03^{a}

2.1.5 不同脱水时间对细胞存活率和细胞活力的影响

细胞在不同脱水时间的存活率和细胞活力如图 4 所示，随着脱水时间的增加，细胞活力和存活率都呈现先上升后下降的趋势，当脱水时间达到 30 min 时，这二者的值最高，为 65.22% 和 0.92。继续增加脱水时间，细胞存活率和细胞活力逐渐降低，这可能是因为冷冻保护剂对细胞造成了毒害作用使其过度脱水死亡。因此，本试验选择 30 min 作为细胞的脱水时间。

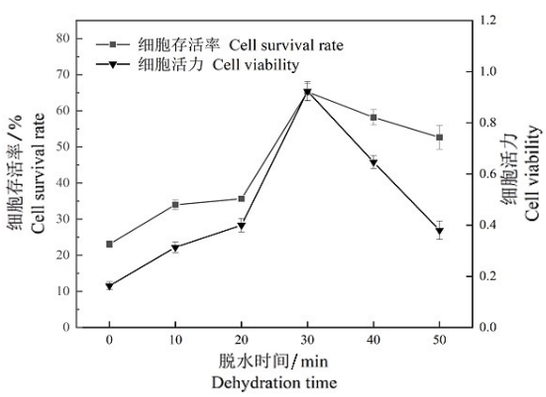


图 4 不同脱水时间对细胞存活率及活力的影响

Fig.4 Effect of different dehydration time on cell survival rate and viability

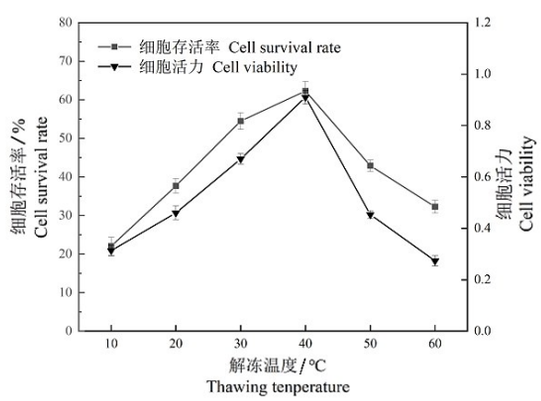


图 5 不同解冻温度对细胞存活率及活力的影响

Fig.5 Effect of different thawing temperature on cell survival rate and viability

2.1.6 不同解冻温度对细胞存活率和细胞活力的影响

如图 5 所示，过低或过高的解冻温度都会对细胞存活产生显著影响，温度过低会使细胞因升温过慢而导致死亡，温度过高则在冰晶融化后直接造成细胞死亡。试验结果显示，在 40 ℃的水浴中化冻更有利于细胞的存活，该温度下细胞的存活率达到 61.99%，细胞活力达到 0.82。因此，本试验选择 40 ℃作为冻存细胞的解冻温度。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计与结果

根据以上单因素试验结果，选取对细胞存活率影响最大的 3 个因素（蔗糖浓度、脱水时间、解冻温度）进行响应面设计，结果如表 3。

表 3　Box-Behnken 试验设计及试验结果

Tab.3　Design and results of Box-Behnken experiment

试验号 Test number	A:蔗糖浓度/% Sucrose concentration	B:脱水时间/min Dehydration time	C:解冻温度/℃ Thawing temperature	细胞存活率/% Cell survival rate
1	1	1	0	64.32
2	−1	1	0	58.65
3	1	−1	0	62.11
4	−1	−1	0	62.94
5	1	0	1	60.83
6	−1	0	1	57.34
7	1	0	−1	60.30
8	−1	0	−1	59.96
9	0	1	1	58.82
10	0	−1	1	60.51
11	0	1	−1	61.27
12	0	−1	−1	62.00
13	0	0	0	70.52
14	0	0	0	70.15
15	0	0	0	69.93
16	0	0	0	70.80
17	0	0	0	71.73

2.2.2　模型建立及方差分析

对细胞存活率的结果进行拟合,得到细胞存活率对蔗糖浓度(A)、脱水时间(B)和解冻温度(C)的二次多项式回归方程模型:

$$Y=70.63-1.08A+0.562\ 5B+0.753\ 8C+1.62AB+0.787\ 5AC-0.24BC-4.83A^2-3.79B^2-6.19C^2$$

由表 4 可知,模型的 F=117.92,P<0.000 1,表明该模型极显著。失拟项 P=0.770 3>0.05,失拟项不显

表 4　回归模型方差分析

Tab.4　Analysis of variance of regression model

Source	Sum of squares	*df*	Mean square	*F* value	*P* value	
Model	385.26	9	42.81	117.92	<0.000 1	**
A	9.40	1	9.40	25.88	0.001 4	**
B	2.53	1	2.53	6.97	0.033 4	*
C	4.55	1	4.55	12.52	0.009 5	**
AB	10.56	1	10.56	29.10	0.001 0	**
AC	2.48	1	2.48	6.83	0.034 7	*
BC	0.230 4	1	0.230 4	0.634 7	0.451 8	
A^2	98.30	1	98.30	270.78	<0.000 1	**
B^2	60.46	1	60.46	166.54	<0.000 1	**
C^2	161.16	1	161.16	443.95	<0.000 1	**
Residual	2.54	7	0.363 0			
Lack of fit	0.569 8	3	0.189 9	0.385 4	0.770 3	
Pure error	1.97	4	0.492 8			
Cor total	387.80	16				
R^2	0.993 4					
R^2_{Adj}	0.985 0					

*为差异显著(P<0.05);**为差异极显著(P<0.01)。

* is significant difference(P<0.05);** is highly significant difference(P<0.01).

著，表明方程拟合程度比较好。模型的R^2=0.993 4，R^2_{Adj}=0.985 0，表明该拟合的模型可以解释99.34%的细胞存活率变化，预测结果与实际结果的一致性较好。因此，可用该模型对南方红豆杉悬浮细胞的超低温保存的最优条件进行分析和预测。

由表计算各因素的P值，P_A=0.001 4，P_B=0.033 4，P_C=0.009 5。P值越小，影响越明显，所以各因素对细胞存活率的影响程度为蔗糖浓度(A)>解冻温度(C)>脱水时间(B)。蔗糖浓度与脱水时间的交互作用AB以及所有二次项的P值均小于0.01，达到了极显著水平，蔗糖浓度与解冻温度的交互作用P_{AC}=0.034 7<0.05，交互作用显著，脱水时间与解冻温度交互作用P_{BC}=0.451 8>0.05，交互作用不显著。

2.2.3 响应面分析

各因素之间交互作用对细胞存活率影响的等高线和响应曲面图如图6所示。若等高线越接近椭圆形，说明两个因素的交互作用越显著；若接近圆形，说明交互作用不显著。响应面图中曲线越弯曲说明

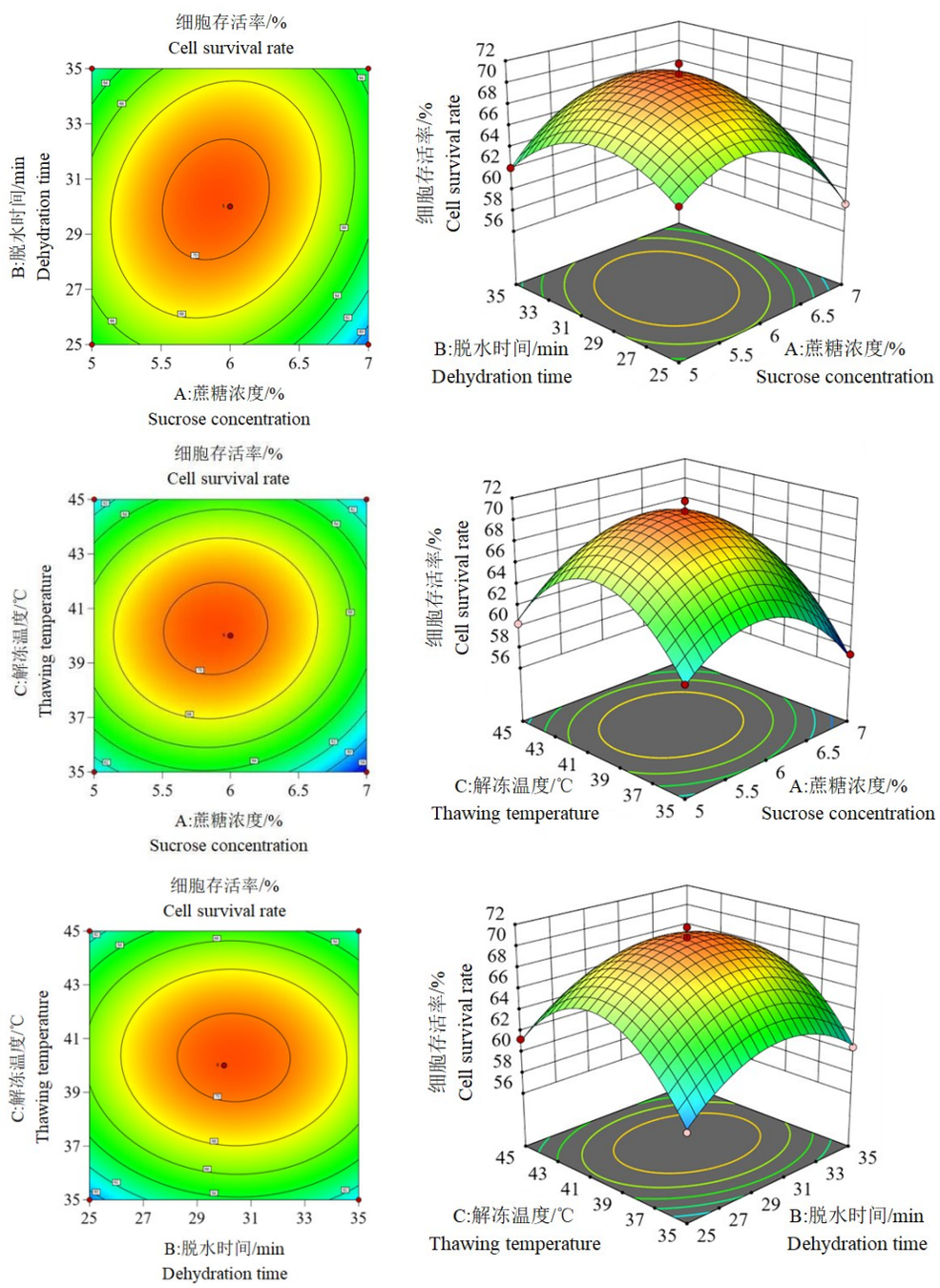


图6 各因素之间交互作用对细胞存活率影响的等高线及响应面分析

Fig.6 The contour map and response surface map of the interaction between various factors on cell survival rate

研究因素对结果影响越大,颜色变化的越快表明坡度越大,即对结果影响更为显著[15]。因此,综上分析可知:蔗糖浓度和脱水时间这两因素交互作用极为显著(P<0.01),蔗糖浓度与解冻温度的交互作用显著(P<0.05),而脱水时间和解冻温度的交互作用则不显著,这与方差分析结果一致。

2.2.4　最佳保存方案预测及验证

通过对试验数据的分析预测,得到细胞存活率最佳保存条件为:蔗糖浓度为6.63%,脱水时间为31.03 min,解冻温度为40.48 ℃,此时细胞存活率为68.27%。根据实际的操作条件,将最优条件参数进行修正,选择细胞存活率最优的条件为:蔗糖浓度为6.6%,脱水时间为31 min,解冻温度为41 ℃。为了验证上述响应面法优化结果,选用修正的最佳保存条件,进行3次验证试验,测得细胞存活率为(68.19±1.12)%,说明试验值与理论值没有显著差别。

3　结论与讨论

在冷冻保存前,通常对细胞和组织进行预培养,以降低细胞内的自由水含量,增强细胞的抗寒性,主要包括低温锻炼和高渗培养两种方法。一般来说,低温锻炼是在2~5 ℃进行培养,在这个温度范围内植物材料具有较好的内在适应机制。洪森荣等[16]对野葛种质的超低温保存进行研究时发现,试管苗经4 ℃低温锻炼5 d,其茎段恢复培养后成活率可达45%~47%。Sharma等[17]采用玻璃化冷冻和V型冷冻板技术对茶叶[*Camellia sinensis*(L.)O. Kuntze]的茎尖进行冷冻保存,发现茎尖在4 ℃下低温锻炼可以提高冻存后的存活率和再生率。本研究将细胞置于5 ℃冰箱进行预培养,结果表明预培养时间对细胞的冻存也具有显著的影响。郁金香球茎经过10周的预培养,其超低温保存效果最好[18],黄独胚性细胞经过4 d预培养后,其相对存活率最高[19],而红豆杉愈伤组织在预培养6 d后再进行冷冻保存,解冻后细胞活力可保持最高[14],本研究中细胞预培养12 d解冻后存活率显著高于其他处理。

预处理一般是利用低浓度的冷冻保护剂使细胞进一步脱水,同时诱导细胞对渗透胁迫产生一定的适应性,减少对细胞的损伤。李佳瑞等[20]研究了罗汉果细胞超低温保藏的方法,试验表明,当使用0.2 mol/L蔗糖作为预处理剂处理细胞时,冷冻细胞的存活率和细胞活力较高。Yi等[21]对柑橘[*Citrus limon*(L.)Burm. F]茎尖的超低温冷冻保存研究中发现,使用17.5%甘油和17.5%蔗糖组成的MS培养基进行预处理有利于茎尖的冻后存活率和恢复生长。Gowthami等[22]开发出一种高效的小滴玻璃化冷冻保存技术以保存大丽花(*Dahlia germplasm*)种质,研究表明经过含有2.0 M甘油和0.4 M蔗糖的MS液体培养基预处理的茎尖在解冻后平均再生率为44.44%,且各品种间无显著差异。本研究发现南方红豆杉细胞在室温下用6.6%蔗糖预处理30 min后,细胞活力和存活率最高。

脱水处理是植物超低温保存的关键,而最重要的环节就在于控制植物材料的脱水时间。若处理时间较短,可能无法完全除去细胞中的自由水,导致细胞在降温过程中产生大量冰晶伤害细胞;若处理时间过长,会对细胞产生毒害作用和过度脱水,直接造成细胞活性降低甚至死亡。因此,脱水时间的选择要根据植物的基因型、抗冻性、细胞年龄和生理状态等方面综合考虑。根据已有的报道来看,不同植物材料的最佳脱水时间各有不同,如水曲柳合子胚细胞经干燥脱水120 min结合快冻法处理后,超低温保存处理后的合子胚及体胚的存活率可达62.26%和51.68%[23]。4种月季离体植株茎尖使用PVS2脱水处理20 min或30 min,其细胞存活率为78.3%~95.1%,茎尖再生率分别为50.5%、63.2%、71.4%和78%[24]。Panis等[25]研究表明,芭蕉茎尖在0 ℃下PVS2的最佳处理时间为30~50 min,其冷冻效率提高了23%~46%。从本试验结果来看,在0 ℃下将南方红豆杉悬浮细胞在冷冻保护剂下脱水处理31 min,可获得较高的冻后细胞存活率。

冷冻保护剂对植物组织和细胞的超低温保存有较大影响,根据其是否穿透细胞膜可分为渗透性和非渗透性两类。有研究[26]表明将不同类型的保护剂组合使用可以提升保护效果,降低毒害作用。Varis等[27]比较了不同冷冻保护剂对挪威云杉(*Picea abies* L. Karst)胚性组织冷冻保存的影响,结果发现组合使用PEG6000、葡萄糖和DMSO作为冷冻保护剂能显著提高胚性组织的回收率。Cameras等[28]研究了不同冷冻保护剂处理对意大利松(*Pinus pinea* L.)胚系恢复和成熟能力的影响,结果显示使用5% PEG-蔗糖-DMSO可以显著提高胚性系的恢复。本研究选择了DMSO、蔗糖和山梨醇这3种不同浓度冷冻保护剂进行组合试验,发现单独使用DMSO、蔗糖和山梨醇处理的细胞在解冻后活性不强,而组合使用时细胞

解冻后存活率较高，进一步说明组合型冷冻保护剂更适合于南方红豆杉悬浮细胞的冷冻保存。

在冷冻细胞的解冻过程中，由于玻璃化的逆转，自由水在升温过程中重新分布，形成的大冰晶会对细胞造成损害。因此，选择适宜的解冻温度是细胞超低温保存的关键。陈晓艺等[29]研究表明37 ℃水浴是华北落叶松胚性组织最佳解冻方式，杨帆等[30]经试验发现对冻存后的松针褐斑病湿地松胚性愈伤组织选取32 ℃水浴解冻最为适宜。本研究中，南方红豆杉冻存细胞的最佳解冻温度为41 ℃，该温度条件下解冻后的细胞存活率最高。

本试验探究了南方红豆杉悬浮细胞的超低温保存条件并进行优化，成功建立了南方红豆杉悬浮细胞的超低温保存体系，为长期保存南方红豆杉悬浮细胞提供了技术参考，然而冻后细胞产紫杉醇能力和遗传稳定性仍需进一步评估。

参考文献 References：

[1] HANANO A，PEREZ-MATAS E，SHABAN M，et al.Characterization of lipid droplets from a *Taxus media* cell suspension and their potential involvement in trafficking and secretion of paclitaxel[J].Plant cell reports，2022，41(4)：853-871.

[2] 唐荣，李帅锋，苏建荣.云南红豆杉的保护和开发利用[J].应用与环境生物学报，2021，27(3)：705-715.
TANG R，LI S F，SU J R.Advances in conservation，development，and utilization of *Taxus yunnanensis*[J].Chinese journal of applied and environmental biology，2021，27(3)：705-715.

[3] BARRALES-CUREÑO H J，RAMOS VALDIVIA A C，SOTO HERNáNDEZ M.Increased production of taxoids in suspension cultures of *Taxus globosa* after elicitation[J].Future pharmacology，2022，2(1)：45-54.

[4] BRETON D，HARVENGT L，TRONTIN J F，et al.High subculture frequency，maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine[J].In vitro cellular & developmental biology-plant，2005，41(4)：494-504.

[5] AHN C H，HAN J Y，KIM Y S，et al.Propagation and cryopreservation of Ulleungdo hemlock(*Tsuga ulleungensis*)via somatic embryogenesis[J].Trees，2018，32(6)：1801-1808.

[6] 陈礼光，陈羡德，林国新，等.LN_2处理板栗种子和离体胚保存的效果分析[J].江西农业大学学报，2005，27(6)：890-894.
CHEN L G，CHEN X D，LIN G X，et al.Analysis of the storage effects of *Castanea mollissima* seeds and excised embryos treated by liquid nitrogen[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis，2005，27(6)：890-894.

[7] MATSUMOTO T，SAKAI A，NAKO Y.A novel preculturing for enhancing the survival of in vitro-grown meristems of wasabi(*Wasabia japonica*)cooled to -196 ℃ by vitrification[J].Cryo-letters，1998，19(1)：27-36.

[8] 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.

[9] 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.

[10] FENNING T，O'DONNELL M，CONNOLLY T.An assessment of somatic embryogenesis and cryo-preservation methods with a wide range of *Sitka spruce* breeding material from the UK[J].Plant cell，tissue and organ culture，2017，131(3)：483-497.

[11] 徐志荣，赵英杰，王婷，等.真菌诱导子对南方红豆杉细胞生长及紫杉醇合成的影响[J].湖北农业科学，2017，56(17)：3283-3286.
XU Z R，ZHAO Y J，WANG T，et al.Effects of fungal elicitors on cell growth and paclitaxel synthesis of *Taxus chinensis* var. *mairer*[J].Hubei agricuitural science，2017，56(17)：3283-3286.

[12] AMINI S A，SHABANI L，AFGHANI L，et al.Squalestatin-induced production of taxol and baccatin in cell suspension culture of yew(*Taxus baccata* L.)[J].Turkish journal of biology，2014，38(4)：528-536.

[13] 刘华，梅兴国.TTC法测定红豆杉细胞活力[J].植物生理学通讯，2001，37(6)：537-539.
LIU H，MEI X G.Examining cell viabifity of *Taxus chinensis* with TTC(2，3，5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride)[J].Plant physiology communications，2001，37(6)：537-539.

[14] 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[J].武汉植物学研究，2001，19(4)：327-331.
YE F，XIA S，MEI X G.Studies on factors in cryopreservation of *Taxus* callus[J].Journal of Wuhan botanical research，2001，19(4)：327-331.

[15] 张光辉,刘靖丽,龙旭,等.响应面法优化桑白皮黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2023,40(3):44-48.
ZHANG G H,LIU J L,LONG X,et al.Optimization in extraction process of flavonoids from *Morus alba* L.by response surface methodology and its antioxidant activity *in vitro*[J].Chemistry & bioengineering,2023,40(3):44-48.

[16] 洪森荣,尹明华,邵兴华.野葛种质的超低温保存研究[J].江西农业大学学报,2007,29(4):545-549.
HONG S R,YIN M H,SHAO X H.A study on cryopreservation technique for *Pueraria lobata* Germplasm[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2007,29(4):545-549.

[17] SHARMA S,MUKHERJEE P.Improved cryopreservation protocol for tea(*Camellia sinensis*(L.)O.Kuntze)using preconditioning of shoot tip donor plants and V cryo-plate technique[J].In vitro cellular & developmental biology-plant,2023,59(3):285-297.

[18] MAŚLANKA M,SZEWCZYK A.Droplet-vitrification cryopreservation of *Tulipa tarda* Stapf.apical meristems[J].Plant cell,tissue and organ culture,2021,144(1):91-95.

[19] 尹明华,李诚欣,李祥媛,等.黄独胚性悬浮细胞的小滴玻璃化法超低温保存[J].西南农业学报,2021,34(11):2332-2339.
YIN M H,LI C X,LI X Y,et al.Cryopreservation of embryogenic suspension cells of *Dioscorea bulbifera* L.by droplet-vitrification[J].Southwest China journal of agricultural sciences,2021,34(11):2332-2339.

[20] 李佳瑞,王泽建,郭美锦,等.基于电容测定的罗汉果细胞超低温保藏快速方法[J].生物工程学报,2017,33(5):817-827.
LI J R,WANG Z J,GUO M J,et al.Rapid cryopreservation for *Siraitia grosvenorii* cells based on cells' capacitance detection[J].Chinese journal of biotechnology,2017,33(5):817-827.

[21] YI J Y,BALARAJU K,BAEK H J,et al.Cryopreservation of *Citrus limon*(L.)Burm. F shoot tips using a droplet-vitrification method[J].Korean journal of plant resources,2018,31(6):684-694.

[22] GOWTHAMI R,CHANDER S,PANDEY R,et al.Development of efficient and sustainable droplet-vitrification cryoconservation protocol for shoot tips for long-term conservation of *Dahlia* germplasm[J].Scientia horticulturae,2023,321:112329.

[23] 任悦,魏骋,徐添添,等.超低温保存处理对水曲柳胚胎生理生化特征的影响[J].植物研究,2023,43(3):396-403.
REN Y,WEI C,XU T T,et al.Effects of cryopreservation on physiological and biochemical characteristics of *Fraxinus mandshurica* embryos[J].Bulletin of botanical research,2023,43(3):396-403.

[24] PAWŁOWSKA B,SZEWCZYK-TARANEK B.Efficient cryopreservation by droplet vitrification of pentaploid roses and the phenotype of regenerated plants[J].Acta societatis botanicorum poloniae,2015,84(4):439-442.

[25] PANIS B,PIETTE B,SWENNEN R.Droplet vitrification of apical meristems:a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*[J].Plant science,2005,168(1):45-55.

[26] MARUM L,ESTÊVÃO C,OLIVEIRA M M,et al.Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine - Effect of cryoprotectant and suspension density[J].Cryo-letters,2004,25(5):363-374.

[27] VARIS S,AHOLA S,JAAKOLA L,et al.Reliable and practical methods for cryopreservation of embryogenic cultures and cold storage of somatic embryos of Norway spruce[J].Cryobiology,2017,76:8-17.

[28] CARNEROS E,HERNÁNDEZ I,TORIBIO M,et al.Effect of different cryoprotectant procedures on the recovery and maturation ability of cryopreserved *Pinus pinea* embryogenic lines of different ages[J].In vitro cellular & developmental biology-plant,2017,53(5):469-477.

[29] 陈晓艺,江帅菲,代剑峰,等.华北落叶松胚性组织超低温保存技术研究[J].北京林业大学学报,2021,43(10):47-53.
CHEN X Y,JIANG S F,DAI J F,et al.Cryopreservation of embryogenic callus for *Larix gmelinii* var.*principis-rupprechtii*[J].Journal of Beijing forestry university,2021,43(10):47-53.

[30] 杨帆,夏馨蕊,沈李元,等.抗松针褐斑病湿地松胚性愈伤组织的超低温保存[J].分子植物育种,2020,18(15):5097-5105.
YANG F,XIA X R,SHEN L Y,et al.Cryopreservation of embryogenic callus of *Pinus elliottii* with resistance to brown spot needle blight[J].Molecular plant breeding,2020,18(15):5097-5105.