

技术与方法 Techniques and Methods

玻璃化法超低温保存蛇莓茎尖

薄涛, 王子成*, 柴星星

河南大学生命科学学院, 河南开封 475004

摘要: 本文采用玻璃化法对蛇莓离体茎尖超低温保存进行了初步探讨。研究了低温锻炼时间、预培养时间、预处理时间、玻璃化液处理时间和液氮保存时间对超低温保存后成活率的影响。经优化, 蛇莓的最高成活率可达(42.00±2.74)%。

关键词: 蛇莓; 茎尖; 超低温保存; 玻璃化; 成活率

Cryopreservation of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke Shoot-Tips by Vitrification

BO Tao, WANG Zi-Cheng*, CHAI Xing-Xing

College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

Abstract: A procedure had been studied on cryopreservation of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke shoot-tips *in vitro* by vitrification. The influence of the treatment periods of cold temperature acclimation, pre-culture, pretreatment, PVS₂ and cryopreservation in liquid nitrogen on survival rate after cryopreservation was studied. The best survival rate reached to (42.00±2.74)%.

Key words: *Duchesnea indica*; shoot-tip; cryopreservation; vitrification; survival rate

蛇莓为蔷薇科蛇莓属多年生宿根型双子叶草本植物, 最早的记载出现于《别录》, 别名宝珠草等(祝丽香 2004)。在我国东部、南部、西南部和中部等绝大区域都有分布(陈明 2008)。蛇莓的叶、花、果具有较高的观赏价值, 具有广泛的适应性和较强的抗逆性, 可被应用于城市园林绿化, 是公认的较有推广应用价值的野生花卉和乡土地被植物(叶嘉等 2008)。另外, 蛇莓常用作草药, 具有多种功效。除上述两方面外, 对蛇莓的研究还存在于化学成分分析、病理毒理研究等方面(王海英和张翠 2009)。但有关蛇莓种质资源保存的研究尚未见报道。本文采用玻璃化法对蛇莓离体茎尖的超低温保存技术进行了初步研究。

材料与方法

1 植物材料

供试材料蛇莓[*Duchesnea indica* (Andr.) Focke]采集于河南省宝天曼国家级自然保护区。

2 超低温保存条件的筛选

参照王子成和邓秀新(2001)的处理方法并稍加改动。每步处理均以上步最佳条件为基础。具体操作步骤如下。

2.1 低温锻炼时间的筛选 将继续代生长 30 d 的试管苗置于 4 °C 冰箱中低温锻炼 0、1、2、3、4、5 和 6 周。

2.2 预培养时间的筛选 取试管苗, 在无菌条件下切取 1~2 mm 茎尖, 置于固体预培养培养基中室温培养 1、2、3、4、5、6 和 7 d。固体预培养培养基为 MS+2 mol·L⁻¹ 甘油+0.4 mol·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂, pH 值为 5.8。

2.3 预处理时间的筛选 将经过预培养的材料转入无菌冷冻管中, 并加入液体预处理培养基, 在 20 °C 下处理 10、20、30、40、50、60 和 70 min。液体预处理培养基为 MS+2 mol·L⁻¹ 甘油+0.4 mol·L⁻¹ 蔗糖, pH 值为 5.8。

2.4 玻璃化保护剂处理时间的筛选 用无菌胶头滴管吸出液体预处理培养基, 加入玻璃化保护剂 2 (protection of vitrifiable solution 2, PVS₂)。在冰水混合物中处理 30、50、70、90、110、130 和

收稿 2010-05-21 修定 2010-06-18

资助 国家自然科学基金(30900973)。

* 通讯作者(E-mail: wzc@henu.edu.cn; Tel: 0378-2868833-3767)。

150 min后,换成新鲜PVS₂。PVS₂成分为MS+30% (W/V)甘油+15% (W/V)乙二醇+15% (W/V) DMSO+0.4 mol·L⁻¹蔗糖, pH值为5.8。

2.5 液氮处理时间的筛选 将装有新鲜PVS₂和材料的冷冻管装入自制纱布袋中,迅速投入液氮,保存1、12、24、48、72、96和120 h后,将冷冻管从液氮中取出。将冷冻管立即放入40℃水浴锅中,迅速化冻1 min。除去PVS₂,20℃下用含1.2 mol·L⁻¹蔗糖的MS盐洗涤液洗涤3次,每次10 min。然后取出茎尖,用无菌滤纸吸去残留在其表面的洗涤液,接种到再生培养基上。再生培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+30%蔗糖+0.7%琼脂, pH值为5.8。暗处理4 d后,转移到正常条件下,培养温度为(24±1)℃,光照周期为12 h·d⁻¹。7 d后统计成活率。成活率=(玻璃化超低温保存后成活的茎尖数/保存的总茎尖数)×100%。

实验结果

1 低温锻炼对超低温保存离体茎尖成活率的影响

经过超低温保存后发现,适当低温锻炼能显著影响保存后茎尖的存活率。由图1可知,未经低温锻炼的茎尖保存后存活率仅为(7.00±2.74)%;锻炼4周时达到最高,成活率达到(28.00±5.70)%。随锻炼时间继续延长,保存后茎尖存活率呈现下降趋势。当锻炼达到5~6周时,试管苗逐渐变黄脱叶,

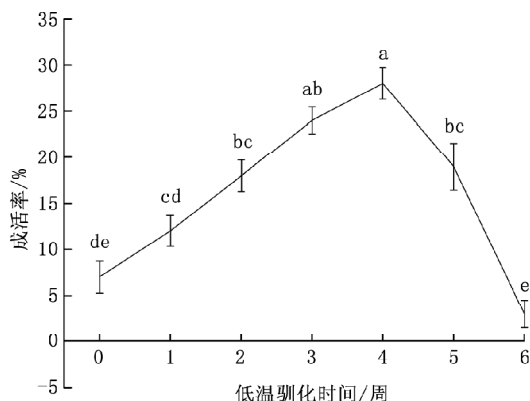


图1 低温锻炼对离体茎尖超低温保存成活率的影响
Fig.1 The effect of acclimation periods on survival rate of cryopreserved shoot-tips *in vitro*

图中不同小写字母表示0.05水平的显著性,下同。

保存后的成活率显著下降,分别降至(19.00±6.52)%和(3.00±4.47)%。低温锻炼属于胁迫的一种,能够诱导一些和抗冻有关的基因表达,产生抗冻蛋白和其他保护机制,提高植物的抗冻性(李广武等1998)。试验时,低温锻炼是在4℃冰箱内进行的,随着时间的延长,蛇莓得不到充足的光照,使得其生活力减弱,可能是造成超低温保存后成活率降低的因素。

2 预培养时间对超低温保存离体茎尖成活率的影响

从锻炼4周的蛇莓上切去1~2 mm长的茎尖,将其转入固体预培养培养基,观察不同处理时间对茎尖存活率的影响。发现室温条件下,预培养对提高超低温保存后茎尖的成活率有显著作用。在预培养过程中发现,随着时间的延长保存前茎尖的生活力已经出现变化。预培养3 d时,开始有个别茎尖变成黄绿色;到7 d时只有个别茎尖呈黄绿色,大部分变为褐色。结果表明,茎尖成活率随预培养时间的延长呈现先升高后降低的趋势(图2)。预培养4 d后,超低温保存效果最好,成活率达到(33.00±5.70)%。

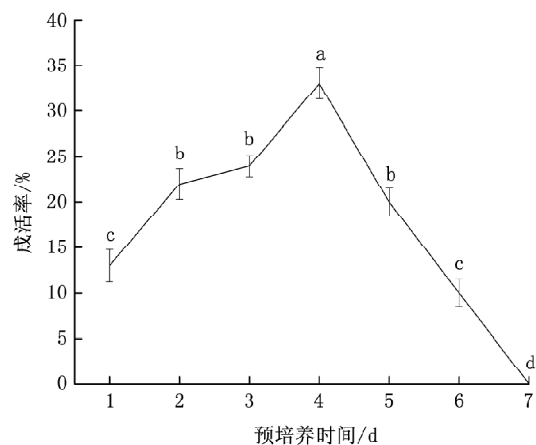


图2 预培养时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响
Fig.2 The effect of pre-culture periods on survival rate of cryopreserved shoot-tips *in vitro*

3 预处理时间对超低温保存离体茎尖成活率的影响

将低温锻炼4周,预培养4 d的材料用于试验。将液体预处理培养基装入灭菌的冷冻管中,实验材料在其中处理不同的时间。由图3可知,随着处理时间的延长,成活率呈现先增加后减小的趋

势。在处理 30 min 时, 成活率最高, 达 $(38.00 \pm 4.47)\%$ 。预培养和预处理的目的都是使茎尖脱水, 增加含糖量, 提高胞液的渗透势, 降低冰点, 这样能够减少冻存过程中水分结冰对细胞膜的伤害; 但过量的脱水同样会对细胞造成伤害, 降低存活率(王子成和邓秀新 2004)。

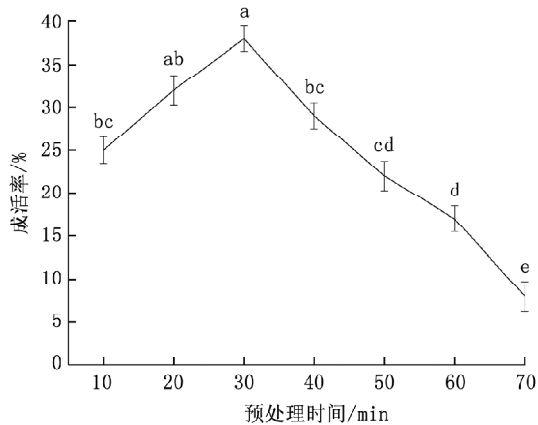


图3 预处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响
Fig.3 The effect of pretreatment periods on survival rate of cryopreserved shoot-tips *in vitro*

4 玻璃化保护液处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

将低温锻炼4周, 预培养4 d, 预处理30 min 的材料用于试验。由图4可知, 随 PVS₂ 处理时间

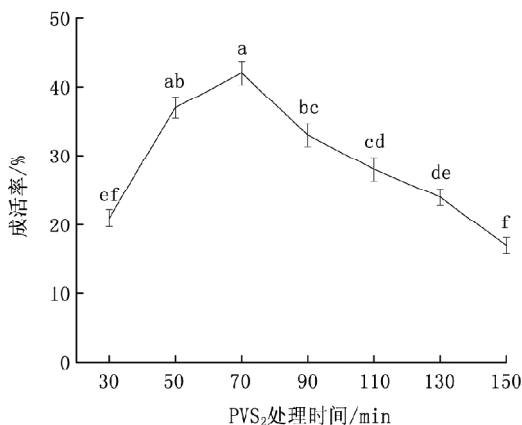


图4 PVS₂ 处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响
Fig.4 The effect of PVS₂ treatment periods on survival rate of cryopreserved shoot-tips *in vitro*

的延长, 保存后茎尖存活率逐渐提高。70 min 时最高, 由最初处理 30 min 的 $(21.00 \pm 2.24)\%$ 提高到 $(42.00 \pm 2.74)\%$ 。随处理时间的继续延长, 成活率又逐渐下降, 150 min 时成活率下降到 $(17.00 \pm 5.70)\%$ 。由于 DMSO 具有很强的毒性, 可对茎尖造成伤害, 所以处理时间长短是影响保存后成活率的关键因素。时间过短起不到保护效果, 时间过长毒害作用严重, 两者都可以造成保存后成活率的降低(张玉进等 2001)。

5 液氮处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

将低温锻炼4周, 预培养4 d, 预处理30 min, PVS₂ 处理70 min 的蛇莓用于试验。观察液氮冻存时间对茎尖成活率的差别。结果表明, 冻存时间对超低温保存后离体茎尖成活率无明显影响, 成活率均在40%左右(图5)。方差分析发现, 各处理间不存在统计学差别。在液氮冻存过程中, 茎尖的代谢过程处在几乎停滞状态, 不会对起产生巨大影响, 因此, 冻存时间不会影响最终的成活率。

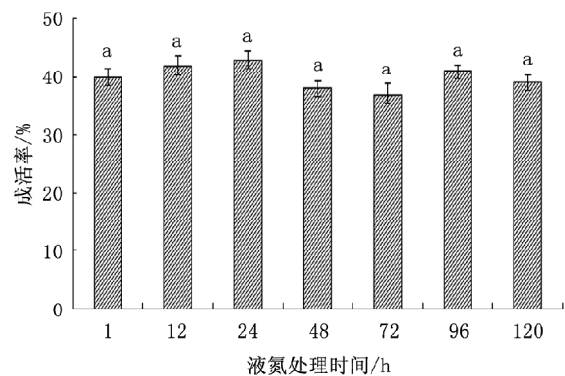


图5 液氮处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响
Fig.5 The effect of liquid nitrogen treatment periods on survival rate of cryopreserved shoot-tips *in vitro*

讨 论

结果表明, 切取4℃低温锻炼3~4周, 生长健壮的蛇莓茎尖1~2 mm, 在室温下固体预培养培养基上培养4 d后, 转入无菌冷冻管。向冷冻管中加入液体预处理培养基, 于20℃处理20~30 min; 用PVS₂取代液体预处理培养基, 于0℃处理50~70 min

后, 换成新鲜 PVS₂, 快速投入液氮中保存 1 h, 于 40 °C 水中快速解冻 1 min, 洗液洗涤 3 次, 每次 10 min, 取出茎尖, 接种到再生培养基。暗培养 4 d 后, 转入光照培养, 7 d 后统计存活率, 最高存活率可达 (42.00±2.74)%。

超低温保存技术与其他保存技术相比具有明显的优点, 如保存时间长, 遗传稳定性好, 操作方便等。常用的超低温保存方法有 5 种: 慢冻法, 快冻法, 玻璃化法, 包埋-脱水法和包埋玻璃化法。其中, 玻璃化法操作相对简便, 设备要求简单而倍受青睐。运用玻璃化法已有保存成功的例子, 如小酸浆 (*Physalis minima*, 曲先等 2008)、罗汉果 (*Siraitia grosvenori*, 刘华英和覃灵华 2009)、月季 (*Rosa chinensis*, 王秋竹等 2009)、树莓 (*Rubus swinhoei*, 娄汉平等 2009)、银条 (*Stachys floridana*, 宋尚伟等 2009)、甘薯 (*Dioscorea esculenta*, 张江丽等 2008) 等 30 多种植物。玻璃化法是将材料经高浓度玻璃化溶液脱水后, 直接将生物材料和玻璃化溶液投入液氮, 使其进入玻璃化。此过程中水不会形成冰晶对细胞造成伤害 (Brison 等 1997; Pennycooke 和 Towill 2000)。超低温保存的茎尖经后处理直接成苗, 本研究结果表明, 蛇莓玻璃化法保存后的成活率最高可到 (42.00±2.74)%, 与已报道的其他植物相比还存在一定差距 (Brison 等 1997; 王子成和邓秀新 2001), 这种差距存在的原因是由于不同物种的差别所致, 还是超低温保存操作所致, 或是后处理条件不合适所致, 还有待进一步研究。

参考文献

- 陈明 (2008). 蛇莓观赏性与繁殖习性研究. 林业实用技术, (2): 42~43
- 李广武, 郑从义, 唐兵 (1998). 低温生物学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 30~33
- 刘华英, 覃灵华 (2009). 罗汉果试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生. 中草药, 40 (2): 293~296
- 娄汉平, 郭修武, 代汉萍, 吴丽敏, 焦岩 (2009). 树莓茎尖玻璃化法超低温保存及植物恢复培养研究. 中国果树, (5): 33~35
- 曲先, 王子成, 梁晨 (2008). 小酸浆茎尖的玻璃化法超低温保存. 植物生理学通讯, 44 (5): 981~984
- 宋尚伟, 苗红霞, 胡青霞, 王娟 (2009). 银条茎尖玻璃化法超低温保存及其植株再生. 园艺学报, 36 (12): 1810~1815
- 王海英, 张翠 (2009). 蛇莓的药用研究进展. 上海医药, (2): 67~69
- 王秋竹, 林丽华, 董文轩 (2009). 月季茎尖玻璃化法超低温保存技术研究. 沈阳农业大学学报, 40 (2): 156~159
- 王子成, 邓秀新 (2001). 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生. 园艺学报, 28 (4): 301~306
- 王子成, 邓秀新 (2004). 柑橘体细胞杂种超低温保存后的植株再生. 园艺学报, 31 (2): 215~216
- 叶嘉, 付伟, 王福明, 张会敏 (2008). 蛇莓的引种栽培技术及园林应用. 邯郸学院学报, (3): 95~98
- 张江丽, 贾永红, 赵美英, 冯庆敏, 陈彩娟 (2008). 玻璃化法超低温保存甘薯茎尖. 江苏农业科学, (1): 243~245
- 张玉进, 张兴国, 庞杰, 刘佩瑛 (2001). 魔芋茎尖玻璃化冻存研究. 作物学报, 27: 97~102
- 祝丽香 (2004). 蛇莓. 植物杂志, (1): 17
- Brison M, de Boucaud MT, Pierronnet A, Dosba F (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. Plant Sci, 123: 189~196
- Pennycooke JC, Towill LE (2000). Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. Plant Cell Rep, 19 (7): 733~737