

葡萄体细胞胚的保存

王雅梅¹, 刘媛¹, 马绍英^{1,2}, 张真^{1,2}, 李胜^{1,2,*}

¹甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州 730070; ²兰州汇通生物科技有限公司, 兰州 730000

摘要: 研究干化对酿酒葡萄品种‘神索’体细胞胚保存效应的结果表明, 葡萄体细胞胚失水量在40%~50%之间的萌发率较高, 达58%左右, 比未经干化的萌发率高9.4%; 在较高相对湿度的情况下, 体细胞胚失水速度变慢, 干化处理时间延长, 可以提高体细胞胚的存活率和萌发率; 相对湿度70%的情况下干化15 d的效果最好, 其萌发率从未经干化处理的33.5%提高到56.2%。

关键词: 葡萄; 体细胞胚; 干化; 保存

Preservation of Somatic Embryo from Grape (*Vitis vinifera* L.)

WANG Ya-Mei¹, LIU Yuan¹, MA Shao-Ying^{1,2}, ZHANG Zhen^{1,2}, LI Sheng^{1,2,*}

¹College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ²Lanzhou Huitong Biological Science & Technology Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: The effect of desiccation on embryoid preservation of grape (*Vitis vinifera*) cv ‘Sinsaut’ was studied. The results showed that when the water loss of somatic embryos reached 40%–50%, the germination rate was about 58%, and higher than that of undesiccated 9.4%. Under higher relative humidity, water loss of somatic embryos slowed, as the duration of desiccation prolonged, the embryo survival and germination rates increased. And the effect of 70% relative humidity and the desiccation duration for 15 d were best, its germination rate raised from 33.5% (control) to 56.2%.

Key words: *Vitis vinifera*; somatic embryo; desiccation; preservation

人工种子技术在快速繁殖优良品种与株系、固定杂种优势、简化育种程序, 特别是与基因工程和脱病毒生物技术相结合时的应用潜力很大。干化处理是超低温种质保存和人工种子技术应用中的关键问题。据报道, 干化处理对延长种质保存、人工种子贮藏时间、提高体细胞胚萌发率、植株再生率以及幼苗活力都有明显的效果(伊华林和邓秀新 1999; 吴立东等 1993)。有关人工种子或体胚干化研究的植物主要有胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa*)、紫苜蓿(*Medicago sativa*)、芹菜(*Apium graveolens* var. *dulce*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、鸭茅(*Dactylis glomerata*)、大豆(*Glycine max*)、黄连(*Pistacia chinensis*)等(柯善强等 1989; 侯嵩白等 1991; 李修庆 1990; 孙敏和陈安和 1995)。有试验表明, 葡萄体胚经过 7 d 和 21 d 干化处理后, 植株再生率分别为 28% 和 20% (崔凯荣和戴若兰 2000); 1989年, Gray在进一步研究葡萄体胚干化处理对体胚“休眠”、静止和萌发的影响中, 观察到干化处理能增强葡萄体胚幼苗活力。本文研究干化处理对酿酒葡萄体细胞胚提高体胚存活率的影响, 以期

为葡萄体细胞胚的长期种质保存提供理论参考。

材料与方法

试验材料是甘肃农业大学组织培养室保存 2 年的葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种‘神索(Sinsaut)’体细胞胚。胚状体保持培养基为 $NN_{69}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA (NN_2 培养基), 分化培养基 $GS+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+ $0.015 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素(GS1 培养基)。2 种培养基均附加 3.0% 蔗糖和 $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂。pH 调为 5.8, 在 50 mL 三角瓶中装入 20 mL 培养基, 于 121 °C 下高压灭菌 20 min。

测定体细胞胚失水量和萌发率, 操作程序为: (1)包扎三角瓶并灭菌; (2)灭好菌的三角瓶放入 80 °C 烘箱中烘 24 h 后, 自然冷却至室温; (3)用电子天平准确称取三角瓶的重量(W_0); (4)于超净工作台上将胚状体迅速从固体分化培养基中取出, 置入无菌干燥的三角瓶中, 测定三角瓶+体胚的重量(W_1); (5)

收稿 2008-03-13 修定 2008-06-06

* 通讯作者(E-mail: lish@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7631547)。

在超净工作台上取掉棉塞后,快速干化(0~10 h);(6)测定经灭菌烘干过的三角瓶重量(W_2);(7)每隔1 h,将干化的胚状体转入称过重量的三角瓶(6)中迅速称三角瓶+干化过的体细胞胚的重量(W_3);(8)将干化的体细胞胚转入GS1培养基中。30 d后统计萌发率,并观察体细胞胚失水量对其萌发率的影响。每1 h为一个处理,共11个处理,每处理3次重复,每重复10瓶。

根据Kim和Janick(1989)以及Tang(2001)文中的方法,以饱和的盐溶液控制稳定的相对湿度(relative humidity, RH),即RH 30%用 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;RH 40%用 $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$;RH 50%用 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;RH 61%用 NH_4NO_3 ;RH 70%用 $\text{NaCl} + \text{KCl}$;RH 80%用 Na_2CO_3 ;RH 87%用 K_2SO_4 ;RH 90%用 BaCl_2 。配制时将盐溶解在煮沸的蒸馏水中,转入带塞玻璃瓶后,放入冰箱中保存待用。实验时挑选体细胞胚,在室温20℃下于RH为30%、40%、50%、61%、70%、80%、90%中干化6、12、24、48、96和192 h后,转入GS1培养基上,30 d后统计萌发率,每处理10瓶。

在研究体细胞胚干化时间对胚状体萌发的影响时,相对湿度设为70%,挑选体细胞胚,干化0~40 d,每5 d为一个处理,每处理10瓶,然后接种在GS1培养基上,30 d后统计萌发率。

数据按以下公式计算,即:胚状体鲜重(g)= $W_1 - W_0$;胚状体干重(g)= $W_3 - W_2$;失水量=(鲜重-干重)/鲜重 $\times 100\%$;采用Microsoft Excel进行数据分析和作图。

结果与讨论

1 体细胞胚失水量对萌发率的影响

从图1可见,葡萄体细胞胚失水量和萌发率都随干化时间的变化而变化,干化0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h的体细胞胚失水量分别为0、10.3%、26.9%、41.7%、52.5%、59.1%、67.4%、76.3%、78.5%、79.2%和79.9%,在干化的前4 h,胚状体失水量差异很大;4 h以后,失水速度开始减慢,9和10 h之间的失水量没有多大变化。失水量从0~50%之间的体细胞胚萌发率随着失水量的升高而增大,其中失水量在40%~50%之间的萌发率较高,也就是说以干化3~4 h效果较好,但失水量高于50%以后,体细胞胚萌发率而急剧下

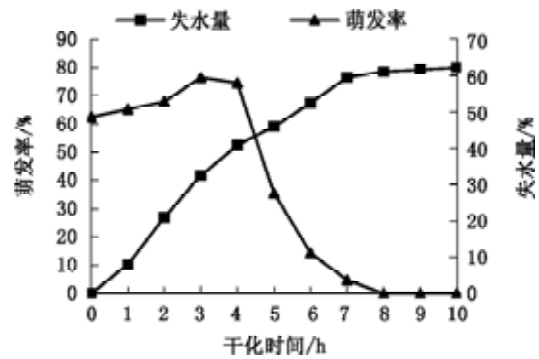


图1 失水量对体细胞胚萌发率的影响

Fig.1 Effect of loss water on germination of somatic embryos

降,高于76%以后的体细胞胚就不萌发。在试验中还观察到适度的干化可以减少畸形苗的生成。表明葡萄体胚的失水量在一定范围内能提高其萌发率,失水量过高后萌发率会降低,这与Gray(1987)报道的葡萄体胚干化处理后,含水量保持在12%,即接近天然种子在相同条件下贮藏时的含水量,体胚含水量下降且低于这个限度时,体胚活力急剧下降的结果基本上一致,表明葡萄体细胞胚的失水量以及干化的相对湿度和时间均与其萌发率有密切关系。

2 体细胞胚干化过程中的相对湿度对胚状体萌发的影响

从图2可以看出:在一定温度下,相对湿度高,体细胞胚失水速度慢,存活率高,萌发率也高,反之亦然。在RH为30%时,干化处理6 h的萌发率最好,为30.1%,与其余干化处理的结果差异达极显著水平,在此条件下干化时间大于48 h时胚状体无存活的;相对湿度在61%~90%,在干化6~192 h之间,随着干化时间的增加,萌发率都呈缓慢上升趋势;总体来说,在RH为50%,干化时间为48 h的条件下,胚状体的存活率最高。相对湿度是通过影响体细胞胚失水速度而起作用的,在一定温度和较高相对湿度下干化处理的体细胞胚失水速度变慢,延长干化处理时间可提高体细胞胚的存活率和萌发率,这与吴立东等(1993)和Janick和Kitto(1989)的结果是保持一致的,但干化处理失水速度过快,对体细胞胚的组织结构或其内部的物质状态、体细胞胚的存活和萌发影响如何值得探究。

3 体细胞胚干化时间对胚状体萌发的影响

如图3所示,体细胞胚不经干化处理的萌发率

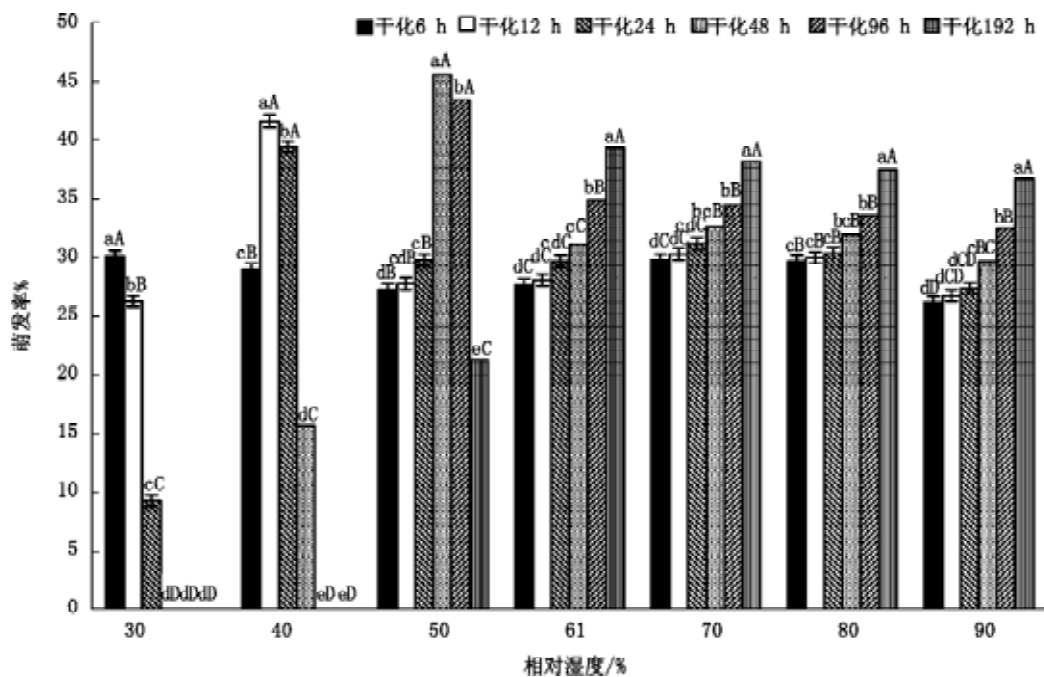


图2 不同相对湿度对体细胞胚萌发率的影响

Fig.2 Effects of different relative humidity on germination of somatic embryos
图中小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 大写字母表示差异达极显著($P < 0.01$).

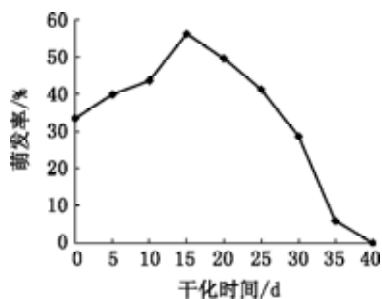


图3 干化时间对体细胞胚萌发率的影响

Fig.3 Effects of desiccation time on germination of somatic embryos

为33.5%; 随着干化时间的增加, 萌发率也逐渐增加, 干化15 d的萌发率最高, 为56.2%。此后, 随着干化时间的进程, 萌发率有下降趋势, 干化时间长于25 d的萌发率开始急剧下降, 直至干化40 d时萌发率为0, 说明在一定的相对湿度和室温(20)条件下, 干化一定时间可明显提高胚状体的萌发率。

参考文献

崔凯荣, 戴若兰(2000). 植物体细胞发生的分子生物学. 北京: 科学出版社, 50~171

侯高白, 柯善强, 吴玉兰, 李洪林, 桂耀林, 郭仲琛(1991). 黄连体细胞胚胎发生及植株再生. 武汉植物学研究, 9: 199~200
柯善强, 桂耀林, 郭仲琛(1989). 植物人工种子的研究. 植物学通报, 6: 205~210
李修庆(1990). 植物人工种子研究. 北京: 北京大学出版社, 1~18
孙敏, 陈安和(1995). 植物人工种子制作技术与应用前景. 渝州大学学报, 12 (4): 69~72
吴立东, 柯善强, 桂耀林(1993). 植物体细胞胚干化处理研究述评. 植物学通报, 10 (1): 22~26, 53
伊华林, 邓秀新(1999). 植物种质离体保存技术研究进展. 植物学通报, 16 (5): 574~581
Gray DJ (1987). Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. HortScience, 22: 810~814
Gray DJ (1989). Effects of dehydration and exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryos. In Vitro Cell Dev Bio, 25: 1173~1178
Kim YH, Janick J (1989). ABA and polyox-encapsulation or high relative humidity increases survival of desiccated somatic embryos of celery. HortScience, 24: 674~676
Janick JS, Kitto SL, Kim YH (1989). Production of synthetic seed by desiccation and encapsulation. In Vitro Cell Dev Bio, 25: 1167~1172
Tang W (2001). Somatic embryogenesis and peroxidase activity of desiccation tolerant mature somatic embryos of loblolly pine. J Forest Res, 12 (3): 147~152