

小酸浆(*Physalis minima* L.)茎尖的玻璃化法超低温保存

曲先, 王子成*, 梁晨

河南大学生命科学学院农业生物技术研究所, 河南开封 475004

Cryopreservation of *Physalis minima* L. Shoot-tips by Vitrification

QU Xian, WANG Zi-Cheng*, LIANG Chen

Institute of Agricultural Biotechnology, College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

摘要: 用玻璃化法超低温保存小酸浆茎尖的结果表明, 1 cm的小酸浆茎段放在改良MS培养基上室温预培养3 d后, 切取2 mm长的茎尖放在0 °C条件下用100% PVS₂溶液中处理70 min, 快速投入液氮保存, 1 d后取出, 于40 °C恒温水浴中化冻2~3 min后用含1.2 mol·L⁻¹蔗糖的改良MS培养液洗涤30 min, 接种于再生培养基上暗培养7 d再转接至正常光照35 μmol·m⁻²·s⁻¹条件下, 成活率可达36.0%, 再生植株生长正常。

关键词: 小酸浆; 超低温保存; 玻璃化法

超低温保存技术可避免传统的种质保存过程中易染菌和易发生遗传变异等诸多不利因素, 种质保存具有长期性、稳定性、方便性等优势。目前, 有关芽及分生组织的超低温保存大致有5种方法: 慢冻法、快冻法、玻璃化法(vitrification)、包埋-脱水法(encapsulation-dehydration)和包埋-玻璃化法(encapsulation-vitrification)。其中, 玻璃化法具有设备简单、易操作、保存后再生率高和重演性好等优点而备受青睐, 已有很多成功的报道(王子成和邓秀新 2001; 张玉进等 2001; 何艳霞 2007)。玻璃化法是将生物材料以极高浓度的玻璃化溶液快速脱水后, 直接投入液氮, 使生物材料连同玻璃化溶液发生玻璃化转变, 进入玻璃态。其间水分子不发生重排和不形成冰晶, 也不产生结构和体积的改变, 因而不会对材料造成伤害(Brison 等 1997; Pennycooke 和 Towill 2000; Wang 等 2003)。

近年来, 超低温保存细胞培养物的应用越来越多, 但对小酸浆茎尖的超低温保存尚未见报道。本文以玻璃化法对小酸浆茎尖的超低温保存技术进行了初步探讨。

材料与amp;方法

1 材料

小酸浆(*Physalis minima* L.)材料取自河南省宝天曼国家级自然保护区的野生酸浆植株。选取酸浆的幼嫩叶片为外植体, 选用继代培养基: MS+2.0 mol·L⁻¹ 6-BA+0.5 mol·L⁻¹ IAA 进行增殖培养。培

养基pH 5.8, 培养室温度(25±1) °C, 光照强度30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间 12 h·d⁻¹。

2 方法

实验参考文献(王子成和邓秀新 2001; 张永卓和罗正荣2004)的方法对小酸浆茎尖进行超低温保存。

2.1 预培养和预处理 选取继代培养 15~25 d 植株上带顶芽的茎段(长 0.5~1.0 cm), 于预培养基中培养, 预培养时间分别设为 1、2、3、4、5 d, 预培养基为MS+2 mol·L⁻¹甘油+0.4 mol·L⁻¹蔗糖+0.7%琼脂。预培养后剥取茎段顶端 1.5~3 mm 长的茎尖, 置于 1.8 mL 冷冻管中, 每管 10 个茎尖, 加入预处理液在室温下处理 30 min。预处理液成分为: 2 mol·L⁻¹甘油+0.4 mol·L⁻¹蔗糖溶液。洗涤液成分为: MS+1.2 mol·L⁻¹蔗糖溶液。

2.2 玻璃化处理 用无菌枪头吸出预处理液, 加入玻璃化溶液 PVS₂ (protectant of vitrifiable solution)并置于 0 °C 冰水混合物中处理, 处理时间分别设为 0、50、60、70、80、90 min。PVS₂ 成分为: 30%甘油+15%乙二醇+15%二甲基亚砷+0.4 mol·L⁻¹蔗糖。

2.3 超低温保存 迅速将冷冻管投入液氮中进行保存, 保存时间分别设为 1、12、24、36、48、

收稿 2008-07-17 修定 2008-09-10

资助 河南大学校内基金(06ZDZR011)。

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

60 h。

2.4 化冻与恢复培养 茎尖分生组织细胞液泡小,含水量少,采取快速化冻法,即从液氮中迅速取出冷冻管,40℃水浴化冻处理2~3 min,除去保护液并用洗涤液将茎尖洗涤3次,每次10 min,取出茎尖置于无菌滤纸上以吸去残留在茎尖表面上的洗涤液,然后接种到恢复培养基上,为了减少再培养中的光抑制,利于离体材料恢复生长,暗培养7 d后再转移到正常光照条件下进行恢复培养。恢复培养基成分为:MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA,培养基pH为5.8。

实验结果

1 预培养时间对超低温保存前小酸浆茎尖的影响

对预培养不同时间的材料进行观察分析,结果表明:茎尖存活率与培养时间具有一定的相关性。成活率随着预培养时间的延长而呈现下降趋势(图1),特别是预培养4 d之后,茎尖表现出枯黄,在6 d时茎尖干枯死亡。这可能是由于甘油的过度渗透造成细胞内环境的不良变化,影响了细胞自身的代谢活动,继而导致茎尖死亡。

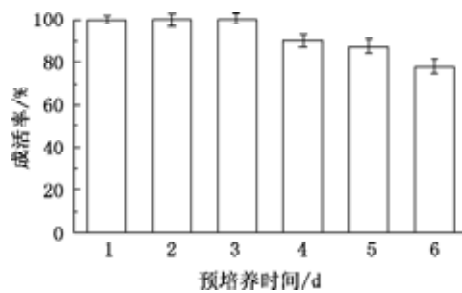


图1 预培养时间对超低温保存前小酸浆茎尖成活率的影响

2 预培养时间对超低温保存后茎尖再生率的影响

预培养后成活的茎尖进行超低温保存,观察其再生率的结果表明,成活率与预培养时间密切相关。其中,预培养3 d的茎尖的再生率最高,达到30%,而茎尖在预培养1和2 d的情况下几乎没有再生苗。随着预培养时间的延长,茎尖的再生率又逐渐呈下降趋势(图2)。其原因可能是预培养时甘油进入茎尖细胞内的同时也吸收细胞内的水分,细胞内的渗透压增高,冰点降低,从而起到保护作用,

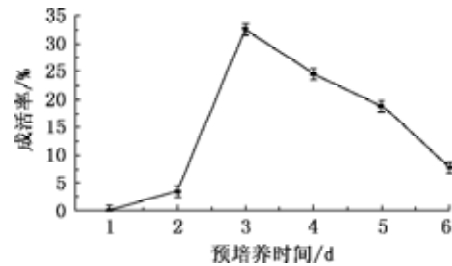


图2 预培养时间对超低温保存后小酸浆茎尖再生率的影响

提高存活率。但这一作用又有一定的时间限定,预培养时间过短会导致甘油渗透不充分,致使茎尖被冻死,预培养时间过长则导致细胞过度脱水死亡。

3 PVS₂处理时间对超低温保存结果的影响

先用处理液(60% PVS₂)对预培养的茎尖进行预处理,20~30 min后吸出处理液,然后在0℃用100% PVS₂处理,结果表明,处理70 min的茎尖成活率最高,达到36%,处理的时间更短或更长都不利于其成活和再生(如处理90 min时的成活率只有11%),而且往往会导致玻璃化不完全或PVS₂中毒(图3)。这可能说明,冰冻保护剂PVS₂的适时处理使茎尖内组织迅速形成玻璃化状态,从而避免了冰晶的形成和减轻了伤害,最终提高了保存后的成活率和再生率。

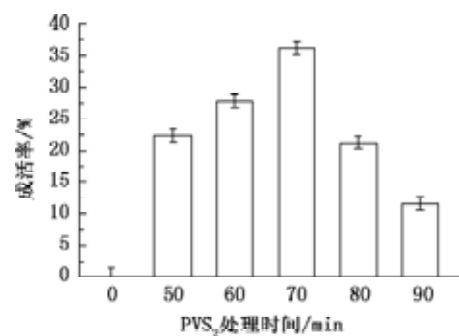


图3 PVS₂处理时间对茎尖成活率的影响

4 液氮处理时间对超低温保存结果的影响

茎尖分别用液氮处理1、12、24、36、48、60 h后,观察茎尖成活率,结果表明,液氮处理时间的长短对茎尖成活率的影响不大(图4)。这可能是由于在超低温状态下(-196℃)细胞生理代谢水平几乎降为零,时间梯度对实验结果已经没有意义所致。

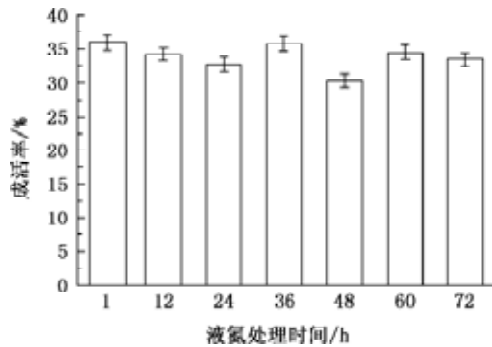


图4 液氮处理时间对成活率的影响

5 超低温保存后小酸浆的形态发生和再生

超低温保存后的茎尖洗涤后接种到恢复培养基上, 暗室培养7 d, 转移到正常光照条件下继续培养, 2周后成活的茎尖开始生长, 其长势良好, 没有经过愈伤阶段而直接成苗。再生苗没有直接生根, 也能正常分化(图5)。其他未成活的茎尖在暗培养

时褐化, 移至光照条件下后变黑死亡。超低温保存后的再生苗与常温苗的形态指标一致, 表明玻璃化法超低温保存技术保存小酸浆种质资源是合适的, 能够保证遗传资源的稳定性。

讨 论

20世纪70年代以来, 超低温保存的研究已取得很大进展。它为植物种质资源的保存开辟了广阔的前景, 为园艺作物的品种改良、植物脱毒、快速繁殖等方面奠定了基础(薛建平等2003; Wang等2003; 高霞等2005)。超低温保存的茎尖恢复后可直接生长成苗, 本研究结果表明, 小酸浆玻璃化法保存后的成活率达到36%, 与其他植物相比还存在着一定的差距(王子成和邓秀新2001; 张永卓和罗正荣2004), 这种成活率的差异是物种间的区别所致, 还是低温保存方法所致, 还有待于我们进一步研究。

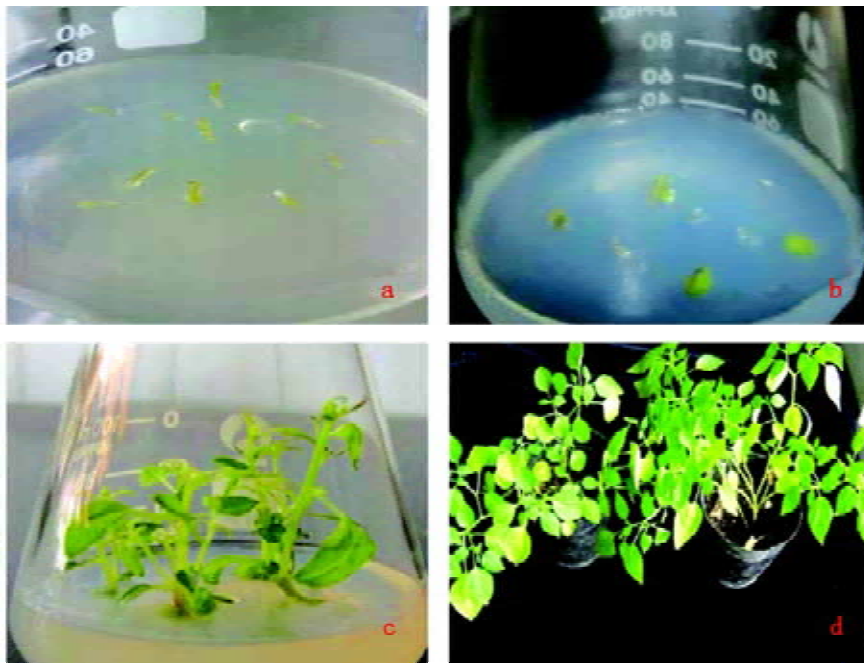


图5 小酸浆超低温保存过程

a: 恢复1周后的茎尖; b: 恢复6周后的茎尖; c: 经过继代的小酸浆; d: 移栽成活的小酸浆。

此外, 目前保存的材料多限于茎尖或芽, 其应用范围有待于进一步扩大(吴雪梅和汤浩茹2005)。相信今后的研究中, 超低温保存技术将会同低温生物学、表观遗传学、医学生物技术等学科交叉渗

透, 并取得更大的进展。

参考文献

高霞, 张盛林, 李锡香(2005). 园艺植物茎尖玻璃化法超低温保存技术研究. 北方园艺, (3): 77-78

- 何艳霞(2007). 拟南芥幼苗的超低温保存及其遗传变异研究[硕士学位论文]. 开封: 河南大学
- 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
- 吴雪梅, 汤浩茹(2005). 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展. 植物学通报, 22 (2): 238~245
- 薛建平, 张爱民, 柳俊, 石乐义(2003). 玻璃化法超低温保存地黄茎尖. 农业生物技术报, 11 (4): 430~431
- 张永卓, 罗正荣(2004). 甜柿休眠芽茎尖包埋 - 玻璃化法超低温保存及植株再生. 中国农业科学, 37 (12): 2019~2022
- 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 (1): 97~102
- Brison M, de Boucaud M-T, 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: 733~737
- Wang Q, Mawassi M, Li P, Gafny R, Sela I, Tanne E (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci*, 165: 321~327