

大叶黑桫欏孢子超低温保存

徐艳^{1,2} 刘燕^{1,*} 石雷²

¹北京林业大学园林学院, 国家花卉工程中心, 北京100083; ²中国科学院植物研究所, 北京100093

提要 大叶黑桫欏孢子在液氮中长期保存的结果表明: (1)大叶黑桫欏孢子可以保存于液氮中; (2)液氮保存后的孢子萌发率比未用液氮保存的普遍下降, 保存90 d的用室温慢速化冻的孢子萌发率最高(65.3%), 相对保持率最高可达79.3%; (3)采用室温(22~25℃)慢速化冻的效果优于37℃温水浴快速化冻的。据此认为, 液氮超低温长期保存大叶黑桫欏孢子是可行的。

关键词 大叶黑桫欏; 孢子; 超低温保存

Cryopreservation of Spores of *Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex Hook.

XU Yan^{1,2}, LIU Yan^{1,*}, SHI Lei²

¹College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Flower Engineering Center, Beijing 100083, China;

²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract The results of the long-term storage of *Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex Hook. in the liquid nitrogen (LN) showed that: (1) Spores of *A. gigantea* var. *gigantea* could successfully survive the liquid nitrogen. (2) After thawing, the spore germination rate was comparatively lower than that of the control, the maximum germination (65.3%) was obtained from the spores cryopreserved for 90 d upon air thawing at room temperature, and the relative maintenance percentage reached 79.3%. (3) Air thawing at room temperature (22~25℃) resulted in a higher percentage of spore germination than upon rapid thawing in 37℃ water. The results demonstrated the feasibility of cryopreservation for the long-term storage of spores of *A. gigantea* var. *gigantea*.

Key words *Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex. Hook.; spores; cryopreservation

大叶黑桫欏(*Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex Hook.)是桫欏科(Cyatheaceae)大型树蕨(夏群1989),为国家二级保护植物和国家限制出口树种。该种对生境要求较严,种群一般较小,分布零星;又由于观赏价值较高,人为破坏很大,种质资源急需保护。因此,研究其保存方法有重要意义。

孢子是大叶黑桫欏的主要繁殖器官,也是其离体保存的理想材料,容易大量获得,且保存所需空间小。大叶黑桫欏孢子的寿命有多长,还未见报道。程治英等(1991)报道的同属桫欏[*Alsophila spinulosa* (Wall. ex Hook.) Tryon]的新鲜孢子在室温下的寿命只有8 d, 10℃下贮存时,寿命可达1年以上。因此,探讨大叶黑桫欏孢子的保存方法很有必要。作为目前能够长期而稳定地保存植物种质资源的液氮(liquid nitrogen, LN)超低温(-196℃)保存方法已在许多植物中得到广泛应用,

但多限于农作物和园艺作物(Touchell 2002; Leunufna和Keller 2003),在观赏植物中的应用较少,尤其是蕨类植物。Agrawal等(1993)报道了*Cyathea spinulosa* Wall. ex. Hook. f. 孢子可以用超低温进行保存,说明用超低温保存蕨类植物材料是可行的。本文在我们建立的大叶黑桫欏孢子无菌培养技术体系基础上(徐艳等2004),进一步研究了大叶黑桫欏孢子的超低温保存技术,以期对桫欏科这一珍贵蕨类植物资源的长期保存和利用提供参考。

材料与方法

大叶黑桫欏(*Alsophila gigantea* var. *gigantea*)

收稿 2005-06-28 修定 2005-12-07

资助 国家自然科学基金资源平台项目(2004DKA30430)。

致谢 香港嘉道理农场暨植物园李添进先生惠赠孢子材料。

*通讯作者(E-mail: chbly@sohu.com)。

Wall. ex Hook.)孢子于2004年2月采自香港嘉道理农场暨植物园。将带有成熟孢子的叶片从植物体上剪下,置洁净、密封的纸袋中,放在干燥、通风处让孢子自然散落,7~10 d后将孢子收集于硫酸纸袋中。

超低温保存孢子时,称取5 mg成熟、洁净的大叶黑桫欏孢子,置于1.5 mL离心管内,并迅速投入液氮中,分别于1、15、30、90、180和360 d后取出,采用室温(22~25℃)下化冻30 min(慢速化冻)和37℃温水浴中化冻30 s(快速化冻)2种方法化冻,然后接种至琼脂固体培养基中培养(徐艳等2004)。光强为35.7~41.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (光源为荧光灯),光照时间12 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,培养室温度为25℃。30 d后,于显微镜下检测孢子的萌发率。以孢子壁破裂,具有1个含叶绿素的绿细胞和1条不含叶绿素的假根时,定为孢子已萌发。以刚收集的新鲜孢子在无菌培养条件下的萌发率为对照。

结果与讨论

1 超低温保存后大叶黑桫欏孢子的萌发率

在超低温保存技术的研究中,以实验材料进入液氮一定时间,取出后根据材料所具有的一定的生活力判断保存方法的成功与否(Touchell和Dixon 1993),存入液氮的时间从几分钟到几天甚至几年不等(刘燕等2001;尚晓倩等2004)。表1

表1 大叶黑桫欏孢子超低温保存后的萌发率

Table 1 The spore germination rate of *A. gigantea* var. *gigantea* after LN storage

保存时间/d	萌发率 / %	
	室温化冻	37℃温水浴化冻
1	51.4±2.7 ^{cd} (62.5%)	30.5±3.7 ^c (37.1%)
7	47.6±4.5 ^d (57.8%)	26.9±3.3 ^c (32.7%)
15	49.7±5.5 ^{cd} (60.4%)	28.3±3.1 ^c (34.4%)
30	61.3±4.2 ^{ab} (74.5%)	47.7±1.4 ^a (58.0%)
90	65.3±5.1 ^a (79.3%)	48.2±2.9 ^a (58.6%)
180	57.2±3.2 ^{bc} (69.5%)	45.6±5.5 ^{ab} (55.4%)
360	52.5±5.8 ^{cd} (63.8%)	39.2±5.5 ^b (47.6%)

采用Duncan检测方法($\alpha=0.05$),字母相同者表示差异不显著,字母不同者表示差异显著。括号中的数值为相对保持率,即LN保存后的萌发率/LN保存前的萌发率(刘燕和张亚利2004)。

表明,大叶黑桫欏的孢子经液氮保存不同时间,采用不同方法化冻后均有一定的萌发率(26.9%~65.3%),与未经液氮保存孢子的萌发率(83.2%)相比虽然有些降低,但并未完全丧失,相对保持率为32.7%~79.3%,显示此法尚有一定的应用性。蕨类植物孢子的超低温保存可采用的程序为:孢子的采集—室温干燥—孢子去杂—液氮保存—室温化冻。

2 化冻方法对超低温保存下大叶黑桫欏孢子萌发率的影响

化冻方法是超低温保存研究中的关键步骤,不同植物材料超低温保存后最佳化冻方式不同。从表1可以看出,室温下化冻的孢子萌发率(47.6%~65.3%)普遍高于37℃温水浴中化冻的孢子萌发率(32.7%~58.6%)。这与Agrawal等(1993)报道的*C. spinulosa*孢子超低温保存的结果一致。但也有相反的报道,如尚晓倩等(2004)在研究不同化冻方式对牡丹花粉超低温保存效果的影响时观察到,30℃温水浴化冻的花粉萌发率普遍高于室温(24℃)慢速化冻等化冻方式的。他们认为这可能是30℃温水浴可以帮助花粉快速通过再次结冰的危险温度区(-50~-10℃),从而避免细胞内次生结冰对细胞的致死性破坏所致。刘燕等(2001)对18个科47种花卉种子进行超低温保存研究后观察到,花卉种子超低温保存中,快速化冻(40℃水浴6~7 min)的效果优于慢速化冻[室温,即(25±2)℃放置30 min左右]的。据此可以推测,液氮超低温保存后蕨类植物孢子的最佳化冻方式可能与种子植物的有区别。

3 保存时间对超低温保存下大叶黑桫欏孢子萌发率的影响

孢子经超低温保存不同天数后,其萌发率普遍下降,但都保持了相对较高的保持率(32.7%~79.3%)。其中,保存7 d的孢子下降最多,采用37℃温水浴化冻后孢子萌发率为26.9%,下降56.3%,相对保持率为32.7%;保存90 d的孢子下降最少,22~25℃下化冻的孢子萌发率为65.3%,下降17.0%,相对保持率为79.3%;保存360 d,22~25℃下化冻的孢子萌发率仍可达52.5%,相对保持率达63.8%(表1)。以上结果说明超低温保

存方法是适合大叶黑桫欓孢子保存的。

从理论上讲, 在 -196°C 下, 活细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止, 细胞、组织和器官在超低温保存过程中不会引起遗传性状的变化, 也不会改变形态发生的潜能, 可以无限长期保存种质(简令成 1998)。但植物种质的超低温保存结果表明, 液氮保存前后, 不同植物材料的反应不同。Pence (2000)认为蕨类植物配子体经液氮短暂保存(1 h和保存过夜)后的成活率没有显著差异。张玉进等(2001)观察到, 魔芋(*Amor phophallus*)茎尖在液氮保存7、30、90、180 d后, 其成活率也没有显著差异。但本文观察到, 液氮超低温保存1~360 d后, 大叶黑桫欓孢子萌发率有显著差异(表1); 比较有趣的是, 较短时间(1~30 d)保存的孢子萌发率降低得较多, 保存30~180 d的萌发率有所升高, 而长时间保存(360 d)的萌发率又趋于下降。另外, 我们在超低温保存的芍药和梅花花粉中也观察到类似现象。据此我们推测, 孢子在液氮超低温保存过程中可能受到不同程度的伤害, 但这种伤害与保存时间之间的具体关系还不清楚, 有待进一步研究。

参考文献

程治英, 张风雷, 兰芹英, 许再富, 陶国达(1991). 桫欓的快速繁殖

- 与种质保存技术的研究. 云南植物研究, 13 (2): 181~188
- 简令成(1998). 低温生物学与植物种质的长期保存. 植物学通报, 5 (2): 65~68
- 刘燕, 张亚利(2004). 梅花花粉超低温保存研究. 北京林业大学学报, 12 (增刊): 22~25
- 刘燕, 周慧, 方标(2001). 园林花卉种子超低温保存研究. 北京林业大学学报, 23 (4): 39~44
- 尚晓倩, 陶清波, 刘燕(2004). 牡丹花粉超低温保存技术研究. 见: 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 193~199
- 夏群(1989). 中国桫欓科植物的分类. 植物分类学报, 27 (1): 1~16
- 徐艳, 石雷, 刘燕, 李东(2004). 大叶黑桫欓孢子的无菌培养. 植物生理学通讯, 40 (1): 72
- 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
- Agrawal DC, Pawar SS, Mascarenhas AF (1993). Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex. Hook. f.—an endangered tree fern. J Plant Physiol, 142: 124~126
- Leunufna S, Keller ERJ (2003). Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). Plant Cell Rep, 21: 1159~1166
- Pence VC (2000). Cryopreservation of *in vitro* grown fern gametophytes. Am Fern J, 90 (1): 16~23
- Touchell DH, Ching VL, Tsai CJ (2002). Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. Plant Cell Rep, (21): 118~124
- Touchell DH, Dixon KW (1993). Cryopreservation of seed of Western Australian native species. Biodivers Conserv, 2: 594~602