

木本性植物遗传资源超低温保存法

李思义(译)

利用超低温保存,细胞的生物化学活性几乎停止,贮藏中的生理、遗传变化被抑制到最小限度,可用于维持遗传资源的长期保存。本文对桑、果树等木本性植物遗传资源的几种超低温保存方法作一介绍。

一、利用冬芽的超低温保存

据 Sakai · Nishiyama 报告,把液氮(LN)浸渍的苹果冬芽融解后,在砧木上接芽,能够再生,提示了利用冬芽进行遗传资源保存的可能性。Yakuwa · Oka、Tyler · Stushnoff 明确采用桑、苹果的冬芽能够实用于遗传资源的保存。利用赋予耐冻性的冬芽是不使用防冻剂与高价机器,简单保存其特征的超低温保存的一个有力的方法。为使此法更加实用化,作者等对预备冻结条件、冬芽的水分含量及采取时间等研究表明,在LN保存后融解,采取茎顶培养,大约70%的种苗形成。具体方法是把冬芽水分含量约下降到40%,在0~20℃,每隔5℃预备冻结1日,用LN浸渍、融解、灭菌后,从冬芽切出茎顶,培养,再生个体。

超低温保存能够长时间维持活性,但是否发生遗传变异呢?据对桑冬芽在-40、-70、-135℃的冷藏库及LN中保存3.5年结果,在-40℃均生存,在-70℃种苗形成率低,在-135℃或者LN中,形成率几乎没有变化,能够稳定地保存。在-135℃或者LN中保存的3.5年间,冬芽再生个体的染色体数正常。白田等报告,把LN保存的桑冬芽茎顶进行再生,在田间变异解析结果,再生个体的形态没有变异,同工酶图形也无差异。用这种方法现已能保存苹果、梨、杏、樱桃、浆果类,可进一步应用于其他植物。

二、利用培养茎顶的超低温保存

培养茎顶的超低温保存可在无菌盆中保存,既可大量繁殖,也能控制成长。

1. 缓慢预备冻结法:此法是利用冻害防御剂处理

茎顶,在给与冻结耐性中,到约-40℃缓慢冷却,组织脱水后,在LN中急速冷却保存。以桑的培养茎顶为例,把培养茎顶在2.5~5℃进行20~40日硬化。切出茎顶,在0.5M的山梨糖醇液浸渍1晚后,用10%DM-SO与0.5M山梨糖醇的冻害防御剂液浸茎顶,用到-42℃的程序冷冻机,以0.5℃/min的冷却速度预备冻结。其后,在LN中浸渍,保存。融解在37℃温水中,浸渍2分钟,在培养基栽培茎顶,使其再生。用这种方法,在LN中保存的茎顶种苗形成率约是50%。用这种方法在苹果、日本梨、西洋梨、树莓类、越柑类等的培养茎顶也取得成功。

2. 简易冻结法(浸透脱水——预备冻结法):此法是用包含1~3M甘油与糖的冻害防御剂浸透脱水后,在-20~-30℃的冷藏库冻结脱水,在LN中保存。以梨的培养茎顶为例,把在5℃,3周以上硬化的培养茎顶,在5℃,0.4M山梨糖醇和1.25M甘油的冻害防御剂浸渍约18小时,经过浸透脱水,再在-30℃的冷藏库进行1小时补足冻结脱水,然后在LN中保存。用这种方法保存,使急速融解再生的梨茎顶种苗形成率约70%。用同样方法,苹果、榎楂、桑等的培养茎顶的LN中保存也是可能的。

3. 比特利菲约翰法:此法是对茎顶进行高浓度冻害防御剂混合液(晶体化液、PVS₂液)处理,浸透脱水后,在LN中浸渍,急速冷却,使茎顶及媒液晶体化的超低温保存方法。以苹果培养茎顶为例,把在5℃,3周以上硬化的培养茎顶放在添加0.7M蔗糖的培养基进行5℃,1日间前培养。在25℃,PVS₂液(包含30%甘油、15%乙基乙二醇、15%DMSO的MS培养液)浸渍处理80分钟,立即在LN中浸渍、保存。再生在25℃水中加温,把茎顶在添加1M蔗糖的MS液洗净后,栽植于培养基。用这种方法,在LN中冷却的

“富士”的培养茎顶的种苗形成率约 80%。这种方法能否成功,与 DVS₂ 液的处理时间有很大关系,还须注意,材料的茎顶形态或者大小不同,最适处理的时间也不同。这种方法也能对梨、桑等的培养茎顶保存。

4. 利用干燥法的超低温保存:具有干燥耐性或者能够诱导的茎顶,在干燥处理后能在 LN 中冷却。硬化、前培养的苹果的培养茎顶,通过干燥处理,水分量约下降到 22%,在 LN 中冷却,加温后培养,种苗形成率约是 50%。但是,干燥的茎顶要保持原状,存在作业难、适切干燥处理难等问题。为此,用精氨酸空粒包茎顶干燥。即,把硬化、前培养的苹果培养茎顶包入添加蔗糖的精氨酸空粒,进行干燥,到水分含量约 30%时,放在 LN 中冷却保存。再生加温后,在培养基置床。用这种方法的苹果培养茎顶种苗形成率约是 80%。这种方法对梨、桑、葡萄、中华猕猴桃等的茎顶超低温保存也取得成功。

茎顶的超低温保存,即使茎顶部分细胞发生变异,大部分组织仍留存,在发育过程,这些细胞也有可能被淘汰,变异难遗留。为此,对于遗传资源保存,茎顶是最适合的一种材料。上述保存方法,大部分场合,写面全部留存,确保一定程度的生存率,变异概率少。对于形态,有可能发生不知的变异,须对 DNA 与染色体水平加以研究。

三、其他的超低温保存

就维持 Embryogenic 愈伤组织、茎干原基(多芽体)、不定胚等植物体再生可能性系、有用物质生产系、形态转换细胞、悬浊培养细胞等来说,超低温保存令人注目。小林、酒井用由来自于脐橙的“珠心”培养细胞,用上述简易冻结法、比特利菲约翰法进行超低温保存,从细胞成功地个体再生。罔等对葡萄的 Embryogenic 愈伤组织,用缓速预备冻结法进行 LN 保存,从愈伤组织得到再生个体。今后,超低温保存用作利用不定胚、茎干原基(多芽体)的遗传资源保存、尖端技术育种、有用物质生产的细胞系的维持越来越重要。

现在日本作为营养体保存的植物遗传资源,包含木本性遗传资源,大部分以场圃为中心,约有 36000 个点。今后,如考虑这些遗传资源稳定的保存,超低温保存是一个有力的方法。近来,并在部分地区,运用尖端技术开发了培养苗的超低温保存技术。在某种程度上植物营养体的超低温保存进入实用化阶段,希望进一步促进早期组织的超低温保存体制的整備、超低温保存、技术开发,使用超低温安全保存营养繁殖性遗传资源。〔摘译《农业技术》(日)1995.50(2)30-33〕(江苏省大丰县农业局 邮编:224100)

基础研究以认识客观世界的物质结构、各种基本运动形态和运动规律为己任,它正着眼于当前的应用。基础研究在重大发现常常带来生产的性变化。它的工作基本上在科学前沿,并在实验室中进行。

应用研究一般有明确的目的,是为了进一步发展某门技术,提高生产效率,拓宽应用领域;我国基础研究的新发现开辟新的生产力和新的生产方向;它还要研究合理使用和节约资源,保护环境和生态等。在 100 年前,在实验室里发现了放射,在 99 年前,在实验室里发现了电子和本世纪初发现了相对论;放射和相对论导致了今天整个原子能产生和原子武器的诞生;与电子和本世纪初诞生的量子论及在本世纪中诞生的半导体、三极管产生了现在的整个电子工业,应用研究也要从认识规律出发,只有认识了才能更好地运用出去解决生产中的实际问题。所以,在应用研究中间,有一部分,我们叫它应用基础研究,指的就是认识客观现象中运动规律的研究。

开发研究也叫技术开发,是指从事生产的技术改造,工艺更新、产品更新等,是科技转化的重要环节。

应用研究,开发研究的成果,不断推动生产进步,使生产过程合理,效率提高,产品更新,成本降低,它的发展受到社会要求的强烈推动。

现在基本发展趋势是:研究成果转化为生产力的周期越来越短,速度越来越快。由基础研究带来的新兴产业和产业论将继续发生,由应用研究和开发研究带来的技术进步和产品更新将持续不断。在 21 世纪,科学研究的将决定一个国家的实力和一个社会的精神文明水平。科学研究的成就有赖创新,要创新则要求很高的理论水平。恩格斯在《自然辩证法》中说,一个想要站在科学的最高峰,就一刻也不能没有理论思维。(本刊引周光昭语)

科学·技术

科学是人类在认识世界和改造世界过程中形成的,是正确反映客观世界的现象、内部结构和运动规律的系统理论知识。科学还向人们提供认识世界和改造世界态度和方法,提供科学世界观和处世科学精神。

技术是在科学的指导下,总结实践的经验,告诉人们在生产实践和其他实践过程中,从设计、装备、方法、规范到管理等的系统知识。技术直接指导生产,是现实的生产力。(本刊引周光昭语)