

园艺植物茎尖玻璃化法超低温保存技术研究

高霞^{1,2}, 张盛林¹, 李锡香²

(1. 西南农业大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要:总结了国内外在园艺植物茎尖玻璃化法超低温保存方面的最新研究成果,从茎尖的选择、预处理、冰冻保护剂、冻存、解冻与洗涤、恢复培养及成活后检测等几个方面阐述了玻璃化法超低温保存的影响因素及操作关键技术,并对玻璃化法超低温保存的应用前景作了展望。

关键词: 园艺植物; 茎尖; 玻璃化法; 超低温保存
中图分类号: S603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2005)03-0077-02

在超低温条件(一般指液氮低温, -196℃)下几乎所有的细胞代谢活动和生长过程都停止进行,而细胞活力和形态发生的潜能可保存,这样植物材料处于相对稳定的生物学状态,从而达到长期保存种质的目的^[1]。溶液在降温时,如果缺乏均一晶核生长条件或生长所需的足够时间,就首先成为过冷的溶液,它是低于冰点而不结冰的液态。继续降温,均一晶核开始形成,此时的温度称为均一晶核形成温度,也称为过冷点。继续降温过程中如果降温速度不够快,则在保存的植物材料中形成尖锐的冰晶;若快速降温,植物材料中的均一晶核就很少或几乎没有形成,溶液就进入一种无定型的玻璃化状态。此状态下既没有溶液效应对细胞的损伤,也没有冰晶对细胞的损伤,因而植物材料的存活率大大提高。依此原理进行的保存方法称作玻璃化超低温保存^[2]。

玻璃化法超低温保存作为一种植物种质保存技术中理想的方法,以其设备要求简单,处理步骤简便,效果和重演性好等优点,倍受人们推崇。随着园艺产业的不断发展,种质资源的重要性越来越被重视。传统的种质资源保存方法即原境保存或在异境建立田间种质基因库及种子库的缺陷日益明显:首先,这种方法需要大量的土地和人力资源,管理费用也较高;其次,该方法仅能保存基因,而不能保存特定的基因型材料^[3];再次,在此过程中易遭受自然灾害的影响,从而发生自然变异和种质退化,影响种质的遗传稳定性。而超低温保存技术则克服了这些不足,显示了其广阔的前景,为种质在国际间的交换提供了更为理想的途径。而玻璃化法以其设备简单和操作程序简单等优点更是备受青睐。自从玻璃化法问世以来,该法在冻存园艺作物茎尖中取得了很大进展,尤其是近几年更是从成活后检测等角度作了深层次的研究,使该方法不断的趋于完善。

茎尖是园艺植物品种改良,快速繁殖和脱毒繁殖的重要

玻璃化法保存园艺作物茎尖的新报道表

植物(Plants)	材料(Materials)	参考文献(References)
草莓	茎尖	Ninno T, et al. 1997
甜菜	茎尖	Vandenbussche, B. 1998
柑桔	茎尖	王子成等, 2001
土豆	茎尖	Pennycooke et al. 2001
苹果	茎尖	刘云国等, 2004
魔芋	茎尖	张玉进等, 2001
櫻桃	茎尖	赵艳华等, 1999

手段。而且茎尖分生组织细胞分化程度小,在植物保存后的再生过程中比其它细胞培养物的遗传性相对稳定,所以茎尖分生组织是超低温保存的一种理想材料。

1 茎尖培养时期的选择

有试验表明,要成功地进行超低温保存,选择在最适生长阶段的材料是很重要的。茎尖细胞的生长年龄与抗冻性的提高有密切关系,而且也是决定冻存后细胞存活率的重要因素之一。赵艳华等在包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖时,发现茎尖的生理状态对存活率有非常显著的影响。诚然不同基因型植物材料的茎尖对超低温保存的反应各不相同,冻后存活率的显著差异不仅存在于种间,也存在于不同品系间。

2 预处理

对茎尖进行预处理是保证冻后存活率较高的关键步骤。因此超低温保存之前必须对材料进行预处理。其目的是提高细胞分裂与分化的同步化,减少细胞内自由水含量,增强抗寒力,使细胞能经受低温胁迫。

2.1 继代培养

通过继代培养可以增加植物细胞有丝分裂的数目。L. A. Withers 指出,有丝分裂前后的细胞抗冻能力强,该时期的细胞在超低温保存后的存活率较高。

2.2 低温锻炼

低温锻炼是一种常用的预处理方法,对低温敏感材料的超低温保存更是尤为重要。降低温度时,细胞膜结构发生改变,蛋白质分子间双硫键减少,硫氢键含量提高。膜脂发生由液晶态转向凝胶态的相变,相变温度越低抗寒力越强。低温锻炼可提高膜磷脂的不饱和度,也使其抗寒力增强。这种抗力的改变使基于膜结构、酶活性与生理生化深层次的变化。一般来说,植物细胞含有大量的水分,低温冰冻会使水结冰,



第一作者简介:高霞,女,1978年生,西南农业大学园艺园林学院在读硕士,现为中国农业科学院蔬菜花卉研究所客座研究生。主要研究方向为种质资源及植物细胞工程。

收稿日期: 2004-12-21

造成细胞结构不可逆的破坏,从而导致死亡。但是经过低温锻炼,细胞发生保护性脱水,从而避免了细胞内大量结冰引起的细胞死亡。此外,林善枝等指出,低温还可引起膜蛋白的变化。低温锻炼可以提高 ATPase 活性或促进其合成,从而释放出更多的能量(主要以热能的形式)来抵御低温的侵袭^[3],因此提高了抗寒力。而且,在抗寒小苹果类如黄海棠等体内已发现低温诱导产生的抗冻蛋白,其抗冻机理是当细胞内水分形成冰核后,抗冻蛋白与冰核结合从而阻止其扩大,产生抗冻的作用。乌饭树茎尖经过 5 周的低温锻炼后,进行超低温保存,其存活率比对照提高一倍,达到最大值。李嘉瑞等发现正常温度下培养的猕猴桃愈伤组织在 5℃、0℃以及-1℃~-3℃下分别培养 1 d(天)、3 d(天)和 2 d(天)后,超低温保存存活率大大提高。

2.3 预培养

预培养是预处理的一个非常重要的步骤。在培养基中加入某些非渗透性物质、冰冻保护剂或诱导抗寒力的物质,如:蔗糖、甘露醇、二甲亚砜、脱落酸(ABA)等,可以提高材料的存活率^[4]。Niino 等在 MS+0.7 mol/L(摩尔/升)蔗糖培养基上 5℃条件下预培养的离体樱桃茎尖冻存后存活率达 80%以上。白花三叶草茎尖预培养时在 B5 培养基上附加 5%葡萄糖和 5%DMSO 在 4℃预培养 2 d(天),可提高存活率及苗的再生。而 Leena 发现在附加 10^{-4} mol/L(摩尔/升)ABA 的 WPM 培养基上预培养银杏离体茎尖,5℃条件下低温锻炼 28 d(天),亦有非常显著的优良效果。

3 冰冻保护剂

除一些对脱水不敏感的材料外,几乎所有的植物材料都需经过冰冻保护剂处理。理想的冰冻保护剂应能在超低温保存过程中都能保护组织免受冰冻伤害,而且应极易溶于水,化冻后容易从组织中清除。目前常用的冰冻保护剂包括渗透性物质和非渗透性物质两类。渗透性物质包括甘油、乙二醇、二甲亚砜等,这些物质在溶液中易结合水分子发生水合作用,增强溶液的粘性,弱化水的结晶过程,从而起到了保护作用。而渗透性物质如蔗糖、聚乙二醇等虽然不能进入细胞,但可以溶于水,使溶液呈过冷状态,也起到了保护作用。此外,脯氨酸也可作为冰冻保护剂起到稳定冻存细胞中的蛋白质结构的作用。试验发现,复合冰冻保护剂能充分发挥各种成分的保护作用,从而产生累加效应。

4 冻存

由于材料的最佳脱水时间具有种的特异性,所以玻璃化法冻存的关键在于严格控制玻璃化保护剂中的脱水时间。例如在 25℃时脱水,不同的材料所用的时间显著不同。苹果和梨的茎尖为 80 min~90 min(分钟),而脐橙细胞为 3 min(分钟)。当然材料的大小也是影响脱水时间的因素之一。Niino 等研究离体樱桃茎尖超低温保存时就发现,茎尖长度增加时脱水时间也应相应延长。

5 解冻及洗涤

植物的冻害常常是发生在冻存和化冻两个过程中,因此解冻时应尽量避免在化冻过程中产生细胞内的次生结冰,防止在化冻吸水过程中水的渗透冲击对细胞膜体系的破坏。一

般来讲,快速冷冻法对大多数材料都较为适合,即将样品放入 25℃~40℃水浴中解冻,这种快速化冻能使材料迅速通过再次结冰的危险区域,从而可以避免细胞内的次生结冰。当然不同的材料进行处理的具体程度和时间也不尽相同。柑桔茎尖在 40℃下迅速化冻,葡萄离体茎尖在 25℃水浴快速化冻 2 min(分钟),而刘云国等发现苹果茎尖则是在 37℃水浴中迅速化冻 1 min(分钟),冻存后的洗涤也很重要,它的主要目的是除去细胞内的保护剂,以防渗透损伤。柑桔茎尖化冻后分别用无菌水、蔗糖 1.2 mol/L+MT 基本培养液洗涤 3~4 次,并在此溶液中保持 30 min(分钟)。

6 活性检测和恢复培养

通常采用 TTC 法(氯化三苯四氮唑还原法)。如果是原生质体或单细胞也可采用活性荧光素染色法,显示活细胞,统计存活率。根据材料的不同选择不同的恢复培养基进行恢复培养。

7 冻存成活后遗传稳定性的检测

超低温保存前处理步骤涉及到一系列胁迫过程,包括渗透胁迫,低温胁迫等,这些胁迫可能作为一种选择压对不同基因型的植物材料产生选择效应,有研究表明超低温保存导致了一些细胞系的次生代谢合成能力以及胚性和恢复生长能力的变化,可能是种选择效应造成的。对于组成均一的材料,超低温保存种一般不会发生遗传变异,张玉进等在研究魔芋的超低温保存时利用 RAPD 检测植株遗传稳定性发现没有发生变异,刘云国等在研究苹果种质资源玻璃化超低温保存时发现,超低温保存后再生植株的遗传性稳定。Ahuja, S 等在研究山药超低温保存后再生植株的稳定性时也没有发现变异。

8 玻璃化法超低温保存的发展前景展望

20 世纪 70 年代以来,超低温保存的研究已取得了很大进展,为园艺作物的品种改良,快速繁殖和脱毒繁殖奠定了基础,国内应用玻璃化法保存的园艺作物已百余种,包括苹果、葡萄、魔芋等,但至今却未建立起专有物种的种质资源库,所以建立种质资源库已成为超低温保存的趋势,也为园艺学研究和种质改良提供便利。玻璃化法超低温保存必将有着广阔的发展前景。

参考文献:

- [1] 肖洁凝,黄学林.茎尖和芽的超低温保存[J].生物工程进展,1999,9(5):46~48.
- [2] 徐刚标.植物种植资源离体保存研究进展[J].中南林学院学报,2000,20(4):81~87.
- [3] 林善枝,陈晓敏,蔡世英等.低温锻炼对香蕉幼苗能量代谢和抗冷性效应的研究[J].热带作物学报,2001,22(2):17~22.
- [4] 刘云国,王晓云.果树种质资源超低温保存研究进展[J].生命科学研究,2001,5(3):227~232.
- [5] 王子成,邓秀新.玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J].园艺学报,2001,28(4):301~306.
- [6] 赵艳华,吴永杰,吕丽珠.葡萄离体茎尖超低温保存的研究[J].园艺学报,2001,28(1):62~64.
- [7] Yunguo Liu, Xiaoyun Wang, Lingxiao Liu. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification[J]. Plant Science 166(2004), 677~685.