

文章编号: 1003-8701(2001)04-0054-03

园艺植物种质资源试管保存与鉴定

汤青林, 宋 明

(西南农业大学园艺系, 四川 重庆 400716)

摘 要: 试管保存是种质资源的重要保存方式之一, 目前已广泛应用到植物种质保存中。综述了园艺植物试管保存方法、影响因素及保存后存活率和遗传性的鉴定等, 并分析了当前存在的问题及解决策略。

关键词: 园艺植物; 种质资源; 试管保存; 鉴定; 组织培养

中图分类号: S602.4

文献标识码: A

试管保存就是在人为控制条件下, 利用组织培养技术, 保存种质资源。它打破了植物生长季节限制, 可随时提供材料, 方便了科研人员的研究工作。同时具有节省贮存空间, 便于运输和交流等优点。对于营养器官繁殖的材料, 可防止多代繁殖种性退化及病毒感染, 保证了种质的优良性和纯洁性。对于珍贵、稀有、濒临灭绝的资源, 种质试管保存有着尤其重要的意义。

迄今为止, 试管保存已在 1 000 多种植物和品种上得到应用, 并获得了很好的效果。园艺植物种质资源的保存需要考虑遗传均一的自交植物、遗传质常有变化的异交植物以及遗传质复杂通常以嫁接来繁殖的果树植物。世界各国包括联合国粮农组织在内的国际遗传委员会都非常重视园艺植物种质的收集和保存工作。试管保存被认为是园艺植物种质保存中最有效的方法之一。目前, 已对园艺植物的多种材料进行了试管保存, 如愈伤组织、幼胚、胚状体芽、茎尖分生组织、茎段、试管苗、悬浮细胞培养、花药、花粉、原生质体和短命种子(*recalcitrant seed*)等。多种类型的保存材料满足了科研和生产的需要。

1 试管保存方法

试管保存的方法已从限制生长保存和低温保存, 演化到超低温保存。不定芽、试管苗采用限制生长和低温保存较为普遍; 茎尖、幼胚等较多采用超低温保存; 愈伤组织和悬浮细胞培养在超低温保存的早期阶段曾有使用, 目前有关这方面的报道较少。可能是因为愈伤组织形态发生本身具有不确定性, 超低温保存后改变其发生途径, 降低了分化率。

1.1 限制生长保存及低温保存

限制生长保存常用脱落酸(ABA)、青鲜素(MH)、矮壮素(CCC)、多效唑(PP₃₃₃)以及 6-BA、B₉ 等化学抑制剂, 或者通过提高蔗糖浓度或加入甘露醇、山梨醇调节培养基的渗透压, 也有降低培养基中某些营养物质的浓度来保存种质。有的还与控制光照和降低瓶内氧分

收稿日期: 2000-05-15

作者简介: 汤青林(1976-), 男, 重庆市人, 学士, 现在西南农业大学攻读硕士学位。

压相结合。低温保存常用的温度范围有 3 种,即常温(20 ± 5) $^{\circ}\text{C}$,常低温 $15\sim 0^{\circ}\text{C}$ 和低温 $0\sim -80^{\circ}\text{C}$ 。它们常与限制生长保存配合使用。限制生长保存和低温保存操作简便,属中短期种质保存,但需多次继代培养才能延长保存期。多次继代,会引发染色体和基因型的变异,如产生多倍体、非整倍体、染色体缺失和易位等结构变异,从而导致两种危害:①培养细胞全能性丧失,失去形态发生的潜能;②一些具有特殊产物的细胞系以及具有某种抗逆性的细胞系,有可能在继代培养中丢失这些十分重要的性状。

1.2 超低温保存

超低温保存解决了以上问题。超低温(*ultra-low temperature*)通常指低于 -80°C 的低温。主要是液氮(-196°C)及液氮蒸汽相,属种质的长期保存。其步骤有:材料选择、预处理、冷冻及保存、融化、后处理、活力评价和再生等。Nag 和 Street (1973)对胡萝卜悬浮培养细胞液氮保存,这是超低温保存的首次报道。迄今为止,已对 100 多种植物材料进行了超低温保存。

超低温保存降温方式有缓慢降温、分步降温和快速降温等几种。前两种适于单个细胞材料(悬浮细胞、胚性愈伤组织)的保存,需昂贵的程序降温仪等设备,操作繁琐,有时结果不稳定。早期的园艺植物超低温保存多采用这两种方法,目前逐步被快速冷冻法所取代。按保存方式划分,超低温保存可分为玻璃化法、包埋脱水法、干燥法和驯化冰箱法等。

1.2.1 玻璃化法^[1]

玻璃化法是新近发展起来的一种理想的保存方法。是指以足够快的降温速度,使液相固化成无定形的玻璃化状态而非尖锐的冰晶形式。玻璃化状态是一种透明的“固态”,没有冰晶和溶液效应对细胞造成损伤。在超低温保存中,玻璃化分成部分玻璃化和完全玻璃化。部分玻璃化仅指胞内玻璃化,完全玻璃化是细胞连同保护剂本身都进入玻璃化。1985 年 Rall 首次运用玻璃化法成功保存小鼠胚胎,1989 年 Langis 等和 Uragami 等相继证实了玻璃化冻存植物材料同样可行。目前已有多种园艺植物做过玻璃化冻存尝试^[2]。而有的材料只能用玻璃化法才能保存成功。玻璃化保存的最大难题是玻璃化冰冻保护剂的化合物组成及配制浓度。目前,日本北海道国家农业实验站作物育种部的 Sakai, A 等(1991)所推出的保护剂 PVS₂[30%甘油+15%乙二醇+15%DMSO+0.4 mol/L 蔗糖 MS-NH₄⁺无激素、培养基]已在多种园艺植物材料玻璃化冻存研究中获得成功,并有较高的再生率。

1.2.2 包埋脱水法^[3]

包埋脱水法最早出现在法国学者保存马铃薯的研究中(Fabre 和 Dereuddre, 1990),目前已应用到梨、苹果、柑桔、百合和胡萝卜等园艺植物中。包埋脱水法是将包含有样品的褐藻酸盐溶液滴向高钙溶液,因褐藻酸钙的生成而固化成球状颗粒,然后在高浓度蔗糖液体培养基中预培养几小时或几天,再经无菌空气或硅胶部分脱水后,进行慢速或快速冷冻。常用的褐藻酸钠浓度 3%,氯化钙浓度 100 nmol/L,固化时间 30 min,蔗糖浓度 0.3~0.75 mol/L。高浓度的蔗糖预处理样品,避免了二甲基亚砷和甘油的化学毒性,对低温保护剂敏感的植物样品有很大的应用潜力。包埋脱水法最大的优点是使样品获得较高的抗冻力,提高了保存效果,使保存后样品不经愈伤组织直接成苗,降低了遗传变异的可能性。

1.2.3 干燥法

干燥法是控制脱水速度和脱水程度,干燥预处理植物材料,增强抗冻性,然后液氮保存。干燥法对材料的脱水主要有以下几个方法:①直接干燥脱水。Shiminoshi 等(1991)将香瓜体细胞胚不以任何冰冻保护剂处理,直接在无菌空气流中干燥后,液氮保存,有一定效果。此

法由于保存材料再生力减弱较大而应用不多。②高浓度蔗糖预处理。此法的关键是蔗糖浓度及处理时间。1993年, Uragami 用 $0.5\sim 0.75$ mol/L 的蔗糖处理石子柏腋芽, 取得成功。Panis 等(1996)用 MS 培养基(含 0.5 mol/L 蔗糖)预培养香蕉茎尖 $2\sim 4$ 周, 然后液氮保存, 获得较高存活率。③高浓度蔗糖预处理后再用无菌空气流或硅胶干燥脱水。Dumet 等(1993)用含 0.75 mol/L 蔗糖培养基预培养油棕榈 7 d 后, 干燥脱水 10 h, 其液氮保存存活率高达 70% 以上, 若只用蔗糖处理, 存活率仅在 10%~20%。

1.2.4 驯化冰箱法及其他

驯化冰箱法是材料经高浓度蔗糖预处理后, 置于冰箱中预存一段时间, 然后投入液氮保存。此外, Suzuki 等(1997)将 12 个梨品种休眠芽部分脱水(含水量为 41% 左右), 逐步预冷至 $-30^{\circ}\text{C}\sim -40^{\circ}\text{C}$, 再在超低温冰箱(-150°C)中保存, 60% 以上可直接再生或微嫁接发芽。

2 影响试管保存的因素

2.1 限制生长和低温保存的影响因素

一是培养基中抑制生长的物质种类或浓度不适宜。例如苹果试管苗保存中^[4], 不加 BA 或添加 ABA 的处理, 存活率较低。而四季柑胚培养离体种质中^[5], 加入低浓度 CCC 和 ABA 等生长延缓剂可适当降低生长速度。因此, 不同材料需用相应的抑制物, 并非所有的生长抑制物对所有的材料均起到抑制作用。同样, 不同材料所用抑制物浓度亦不同。常温下, 高浓度的细胞分裂素 BA (MS+BA 8 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 8 g/L)可离体保存芽 370 d^[6], 而苹果试管苗仅需 BA 0.5 mg/L 即可^[4]。二是培养基中营养物质枯竭和培养基失水干裂, 保存材料得不到营养补充, 长期处于“饥饿”状态而死亡。三是培养基中有毒物质的积累, 可能是琼脂不纯, 含有对植物材料有毒的杂质, 也可能是在培养过程中, 植物材料产生的有害物质(如多酚化合物的氧化褐变)得不到及时清除。四是培养器皿的封口材料的影响^[7]。柑桔试管苗保存时^[8], 分别以棉塞、棉塞加聚乙烯膜和橡胶塞等作封口材料, 发现用棉塞加聚乙烯膜保存效果最好。五是离体保存中低温伤害, 包括低温破坏细胞膜系统及酶活性。以上因素均会影响保存后的存活率。

2.2 超低温保存影响因素

①超低温保存材料大小会影响保存效果。材料太小, 切取困难, 而且加大切取时对材料的伤害; 材料太大, 影响预培养效果, 冻存中易受结晶伤害。②材料生理状态是影响超低温保存的又一重要因素。细胞分裂旺盛、细胞体积小、原生质稠密、液泡小而少和含水量少, 利于超低温保存。因为此种生理状态的细胞冻存时结冰小而少, 化冻时再结冰的危险性小, 故冻存存活率高。③材料的预培养。其目的是在最短时间内有效提高材料组织细胞的抗寒力。预培养的方式主要有冷驯化和在培养基中添加保护性物质(蔗糖、ABA、山梨醇、DMSO 等)两种方式。一些本身具有较强抗寒力的植物材料经零上低温冷驯化, 可明显提高存活率。预培养中更常用的方法是在培养基中添加 1 至几种保护性物质, 其中, 高蔗糖培养基预培养最多, 一般用 $0.3\sim 0.7$ mol/L 蔗糖 MS 培养基。此外, DMSO 用得也较多, 因为 DMSO 冰点低, 它进入细胞后, 不仅降低材料含水量, 而且可降低细胞结冰点。④降温和化冻方式。液泡小和含水量少的细胞(如茎尖分生组织)可采用快速降温方式。液泡大和含水量高的细胞宜用慢速冰冻方式。生长季节中的材料, 一般 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水浴中快速化冻比在室温下慢速化冻要好, 而果树植物的冬芽在超低温保存后却必须在 0°C 低温下进行慢速化冻。化冻速度与降温冰冻速度也有一定关系, 一般样品脱水程度愈高, 对化冻速度愈不敏感。此外,

光照对恢复生长也有影响。大多实验表明:超低温保存材料恢复生长初期,在黑暗或弱光下培养效果较理想。

3 试管保存的鉴定

存活率的鉴定主要有:①形态颜色观察。如离体保存的试管苗,生活力下降时会出现叶片皱缩或者萎蔫症状。②再培养。保存材料转到新鲜培养基上,考查细胞增生能力与数量,愈伤组织形成能力和再生植株分化能力等。③FDA法(双醋酸荧光素染色)和TTC法(氯化三苯四氮唑还原法)。在FDA法中,只有活细胞才表现荧光;TTC法测细胞内脱氢酶活性。④色谱分析。通过对冰冻组织产生的挥发性碳氢化合物(乙烯、乙烷)的检测,推断材料的存活情况,这是一种不破坏材料而能测知细胞存活率的方法(Benson, E E等,1987)。

遗传性分析可在以下方面进行:①细胞全能性的保持,形态发生能力的表达情况。②后代形态特征及生长发育状况。③后代染色体分析。④蛋白质及同工酶谱分析。⑤特殊产物分析。⑥抗逆性分析。⑦分子标记分析(如RFLP)。

4 问题及展望

在试管苗的保存中,由于有些培养物容易发生体细胞变异,因此,最好保存由植物的茎尖或顶端分生组织再生的试管苗。

多方面、多角度综合研究影响存活率的因素及超低温保存的机理。保存中认真筛选存活率高的最优条件,同时兼顾保存材料遗传物质的稳定性,加大超低温保存后再生植株遗传稳定性研究力度。

选用合适的冰冻保护剂,研究存活率测定新方法。高浓度的冰冻保护剂比单一保护剂更易进入玻璃化,利于试管保存,但保护剂浓度太高会损伤细胞。因此,研制新的保护性药物或设计新的复合保护剂意义重大。同时,寻找一种快速、准确而又不破坏材料存活率的测定方法,避免材料的浪费也很有必要。

参考文献:

- [1] 王君辉,黄纯安. 玻璃化法—园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径[J]. 园艺学报,1994,21(3):277—282.
- [2] 严庆丰,黄纯安. 植物组织和细胞的玻璃化冻存研究[J]. 细胞生物学杂志,1994,16(3):117—122.
- [3] 王君辉,边红武,黄纯安. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展[J]. 植物学通报,1999,16(5):582—586.
- [4] 史永忠,等. 苹果种质资源的离体保存[J]. 作物品种资源,1996,(4):42—43.
- [5] 赖钟雄,等. 四季桔胚培养离体种质保存研究[J]. 作物品种资源,1997,(4):44—46.
- [6] 吴丁,卢翠乔. 植物生理学与跨世纪农业研究[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [7] 黄菊辉. 生姜种质资源的离体繁殖和保存[J]. 中国农业科学,1995,24(2):24—30.
- [8] 权银,等. 柑桔种质的离体保存[J]. 中国南方果树,1996,25(4):3—5.