

红花石蒜茎尖的玻璃化超低温保存

林田¹ 刘灶长^{1,*} 李天菲¹ 李锡香² 罗利军^{1,*}

¹上海市农业生物基因中心, 上海 201106; ²中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

摘要 2~3 mm 的石蒜茎尖放在 MS+0.4 mol·L⁻¹ 蔗糖的培养基上预培养 5 d, 在 25℃ 下用预处理液处理 20 min, 接着用冰浴的玻璃化保护剂 PVS2 在冰浴中处理 80 min 后, 换新鲜 PVS2 并迅速投入液氮。液氮保存 24 h 后, 于 40℃ 水浴中快速解冻 2 min, 用 MS+1.2 mol·L⁻¹ 蔗糖的液体培养基洗涤 20 min, 滤纸吸干后接种到恢复培养基中, 在 25℃ 下暗培养 7 d 后, 转入光照强度为 36 μmol·m⁻²·s⁻¹ 和光暗周期 12/12 h 条件下培养。2 周后的成活率最高可达 90%, 植株再生率达 53%。

关键词 红花石蒜; 茎尖培养; 玻璃化法; 超低温保存

Study on Cryopreservation of Shoot Tips of *Lycoris radiata* Herb by Vitrification *in vitro*

LIN Tian¹, LIU Zao-Chang^{1,*}, LI Tian-Fei¹, LI Xi-Xiang², LUO Li-Jun^{1,*}

¹Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106, China; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract An efficient cryopreservation procedure by vitrification was developed for long-term conservation of shoot tips of *Lycoris radiata* Herb *in vitro*. The procedure included 4 steps: at first, the shoot tips, 2-3 mm in length, were pre-cultured on MS medium enriched with 0.4 mol·L⁻¹ sucrose for 5 d; and second, pre-cultured shoot tips were treated for 20 min with a loading solution at 25℃; and then they were subjected to ice-cooled vitrification solution for 80 min and transferred to 2 mL cryotubes with fresh vitrification solution (PVS2) and plunged into liquid nitrogen; at last rapid thawing took place in 40℃ water bath for 2 min followed by the deloading step for 20 min in a deloading solution consisted of 1.2 mol·L⁻¹ sucrose liquid MS medium. Further recovery and growth took place on regeneration medium in the dark at 25℃ for 7 d and then with 36 μmol·m⁻²·s⁻¹ irradiance and light/dark cycle of 12/12 h. The highest survival rates of the shoot tips reached 90% after 2 weeks incubation and the regeneration rate reached 53%.

Key words *Lycoris radiata* Herb; *in vitro*-grown shoot tips; vitrification; cryopreservation

对于难以获得种子而以营养器官繁殖的植物, 一般通过繁种圃或保存圃的田间种植方式保存其资源。这种保存方法不仅占用耕地、耗时、费力, 还存在受干旱、洪涝、低温、热害和病虫害等自然灾害的影响而导致种质变异或种质毁灭的危险性, 不宜于长期保存。超低温保存是指在液氮(-196℃)下的低温保存。在此条件下, 植物的生理生化活动几近停止, 贮藏过程中的生理代谢活动和遗传变化能够控制在最低限度内, 具有长期和稳定保存的优点, 作为遗传资源的长期保存方法, 超低温保存技术被认为是克服上述问题的最佳选择(Engelmann 1997)。超低温保存有多种方法, 而近年发展起来的玻璃化法, 因其简易有效, 已广泛用于十种植物的种子、茎尖、胚性细胞的保存(Sakai和Nishiyama 1978; Niino和

Sakai 1992; Reed 1993; Engelmann 2004; Wang 等2005)。但迄今针对石蒜(*Lycoris*)的超低温保存技术尚未确立。为此, 本文采用玻璃化法对红花石蒜(*Lycoris radiata* Herb)茎尖的超低温保存技术进行了探索, 现报道如下。

材料与方法

取红花石蒜(*Lycoris radiata* Herb)的3~4年生鳞茎, 用70%酒精消毒1 min, 0.1%的升汞消毒15 min, 无菌水冲洗若干次后, 将带3~4层鳞片

收稿 2006-07-11 修定 2006-11-09
资助 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2005)第1-6号]。
致谢 浙江林业大学应雪宜先生提供部分试验材料。
通讯作者(E-mail: lzc@sagc.org.cn, lijun@sagc.org.cn;
Tel: 021-52230526; Fax: 021-62204010)。

及部分茎盘的鳞茎切块(约1 cm大小)接种于含3 mg·L⁻¹ 6-BA及0.5 mg·L⁻¹ NAA的MS培养基上诱导小鳞茎。培养温度为(25±2)℃,光照12 h·d⁻¹,光照强度36 μmol·m⁻²·s⁻¹。

作预培养、玻璃化处理及冻存保存时,取继代培养20~30 d的小鳞茎(图4-a),切取1~5 mm不同大小的茎尖,接种到含0.3~0.7 mol·L⁻¹蔗糖的MS培养基内,25℃下暗培养3~7 d。将预培养后的茎尖放在预处理溶液(Matsumoto等1994)中,于室温下处理20 min后,转入玻璃化保护剂PVS2(Sakai等1990)中进行30~150 min的冰浴处理,再将茎尖转移至装有预冷过的新鲜PVS2的2 mL冷冻管中(10个茎尖·管⁻¹),迅速投入液氮中保存。

解冻和恢复培养时,从液氮中取出冻存24 h以上的冷冻管,立即放入40℃水浴中快速解冻2 min。茎尖在室温下用含1.2 mol·L⁻¹蔗糖的MS培养液洗涤2~3次,每次5~10 min。洗涤后的茎尖用滤纸吸干后,转移至含0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ GA₃的MS半固体培养基中暗培养7 d,再转入含3 mg·L⁻¹ 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA的MS固体培养基中,在同小鳞茎诱导的条件下培养,2周后计算成活率。已恢复生长(萌发根、芽或愈伤组织)的茎尖视为成活。成活茎尖数占整个处理茎尖数的百分率为成活率。每个处理有20个茎尖,重复3次。实验于2004~2006年在上海市农业生物基因中心进行。

实验结果

1 茎尖长度对超低温保存茎尖成活率的影响

超低温保存中,石蒜茎尖长度对超低温保存的成活率及恢复培养均有影响。材料体积小,在冻存中容易脱水,受冰晶伤害小,但在其后的恢复生长中不易成活,所以选用体积大小适当和成活率较高的茎尖,是应注意的问题。据报道,冻存中的百合茎尖长度,以2~3 mm为最佳(张玉芹等2004)。而在本文中,用长度<2、2~3和4~5 mm的茎尖在蔗糖浓度为0.4 mol·L⁻¹的MS培养基内预培养3 d后,用预处理液处理20 min,再以PVS2处理80 min,冻存后恢复培养其结果表明:茎尖为2~3 mm的成活率最高(可达80%)。茎尖小

于2 mm或大于4 mm的成活率仅为40%和33%(图1)。这可能是由于石蒜茎尖外层鳞片包裹紧密,保护剂渗入受阻,以及茎尖过大不利于保护剂和恢复培养时营养物质的渗入,以致成活率低;但茎尖过小,裸露的生长点直接接触高浓度的保护剂,可能会引起伤害,因而成活率下降。

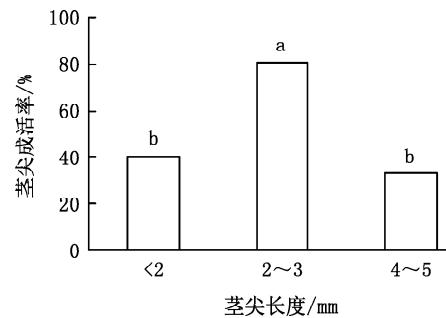


图1 茎尖长度对茎尖成活率的影响

Fig.1 Effect of shoot tip length on survival rate *in vitro*
不同字母表示在 $p < 0.05$ 水平具显著差异。图2~3 同此。

2 蔗糖浓度及预培养时间对茎尖成活率的影响

茎尖的生理状态对冻后成活率有显著影响。通过较长时期的继代培养和短期的高浓度蔗糖预培养后,组织可缓和地脱去部分水分,促使细胞分泌保护物质,从而有利于冻后存活。对此,一般是切取较大茎尖组织经预培养后,再切取适当大小的组织进行超低温保存。但由于石蒜茎尖外层鳞片包裹紧密,经高浓度的蔗糖预培养后,茎尖组织会变软,水渍化,这给之后的剥取操作造成很大不便。茎尖极易受到损伤,而且在其后的恢复培养中只能形成愈伤组织,分化比较困难。本实验先在解剖镜下仔细逐层剥去茎尖的鳞片,并切成适当大小组织块,经预培养后直接进行玻璃化处理。取2~3 mm的茎尖放在蔗糖浓度分别为0.3、0.4、0.5和0.7 mol·L⁻¹的MS培养基上预培养3 d,再用预处理液处理20 min,并以PVS2处理80 min。其冻后24 h进行恢复培养结果显示:含0.4 mol·L⁻¹蔗糖的培养基成活率最高,可达80%(图2);含0.5 mol·L⁻¹蔗糖的培养基次之,为64%;若蔗糖浓度高于0.7 mol·L⁻¹,茎尖在预培养时容易褐变,解冻后茎尖明显变软且呈水渍状,成活率降至21%。这可能是高渗透压对组织

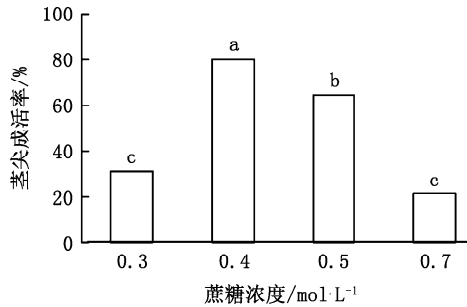


图2 预培养基中的蔗糖浓度对茎尖成活率的影响
Fig. 2 Effect of sugar concentration in the pre-culture medium on survival rate

造成伤害的结果。

从最佳预培养时间来说, 茎尖在 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 培养基上分别预培养 1、3、5 和 7 d 后, 再冷冻保存和恢复培养的结果显示: 预培养时间 1 d 的成活率仅为 18%。预培养 3 和 5 d 的效果较好, 成活率分别可达 80% 及 90%。预培养时间长于 7 d, 则可能由于茎尖外围的鳞片过度闭合, 以致外植体不易玻璃化, 所以其成活率仅为 33%。

3 PVS2处理时间对茎尖成活率的影响

经 PVS2 处理的组织会脱去水份, 这样在冻存中可进入玻璃化状态, 从而有效地保护细胞活性。但由于 PVS2 成份中含有毒性及导致变异的物质, 所以必需严格掌握, 在保证有足够高的成活率的前提下, 尽量缩短处理时间。取 $2\sim 3 \text{ mm}$ 的石蒜茎尖放入蔗糖浓度为 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上培养 5 d 后, 用预处理液处理 20 min 并以预冷过的 PVS2 分别处理 30、60、80、120 和 150 min。恢复培养的结果表明: 处理时间为 30 min, 由于时间过短, 材料脱水不够, 不能成活; 之后随着处理时间的延长, 成活率上升, 80 min 时最高可达 90%; 但若延长至 150 min 时, 成活率反而降为 20% (图 3)。

4 茎尖恢复培养与植株再生

茎尖解冻后接种在培养基上 $5\sim 7 \text{ d}$ 后, 未成活的茎尖发生褐变或漂白, 而成活的茎尖则转成淡黄至黄褐色(图 4-b)。继续培养 $14\sim 28 \text{ d}$ 后便恢复生长, 但最长需 $40\sim 60 \text{ d}$ 才能在茎尖见到有芽萌动, 再生率可达 53%。茎尖恢复生长时会出现

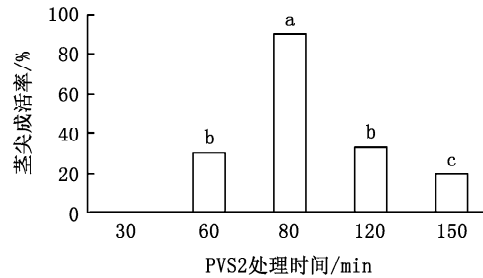


图3 PVS2处理时间对茎尖成活率的影响
Fig. 3 Effect of time in PVS2 on survival rate

3 种情况: (1) 直接在茎尖上长出苗; (2) 从茎尖基部长出根, 但不能分化成苗; (3) 茎尖形成愈伤组织并膨大(图 4-c)。后两种情况可能是茎尖剥取中的机械损伤所致。在恢复培养中, 根比芽更易再生, 且恢复生长较快, 14 d 后根长可达 $0.5\sim 1 \text{ cm}$ 。这与在百合超低温保存中的结果一致, 可能是根对高渗透压保护剂的耐受性较强所致 (Bouman 等 2003)。我们还见到, 带有根原基和芽原基的茎尖也能在长根时萌芽, 且恢复生长快, 约 2 个月的再生植株可长达 4 cm, 植株强健(图 4-d), 这样的结果和冷冻前茎尖结构的完整性有关。

讨 论

石蒜为营养繁殖的球宿根植物, 其组织含水量较多, 易结冰, 所以其超低温保存难度较大。本文成功进行了石蒜茎尖的超低温保存, 并在解冻和恢复培养后可以分化成再生植株, 这对鳞茎和球宿根类植物的超低温保存来说, 具有一定的参考价值。

茎尖的生理状态和完整性对其成活及再生的影响至关重要。已有报道认为, 大蒜超低温保存时, 将 $5\sim 8 \text{ mm}$ 的茎尖于含 $0.7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基上预培养 7 d 后, 切取 $3\sim 3.5 \text{ mm}$ 的茎尖作超低温保存的成活率可达到最高(王艳军等 2005)。Bouman 等(2003) 在百合种质超低温保存中也指出, 预培养除了提高抗冻性外, 还可促进切取过程中伤口的修复, 进而促进成活。本文结果进一步表明, 将仔细剥取后的石蒜茎尖预培养后直接进行玻璃化处理, 也可以得到较好的结果。此外, 我们还观察到, 恢复生长时, 带有根芽原

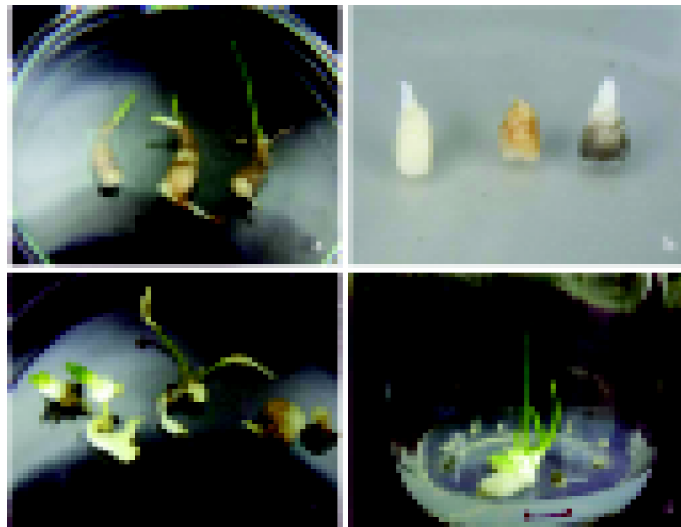


图4 超低温保存阶段的茎尖状态与变化

Fig. 4 Morphological status and change of shoot tips during cryopreservation

a: 继代 20~30 d 的小鳞茎; b: 冻后成活(中间的)与未成活茎尖(两侧的, 可见颜色差异); c: 茎尖恢复培养的 3 种类型; d: 恢复培养 60 d 后的再生植株。

基的茎尖再生较快。据此可以推测, 如能诱导出胚状体, 则由于其体积小、数量多, 并有分化再生成完整植株的能力, 因而可能是超低温保存的良好材料, 这方面工作我们正在探索之中。

冻后植株成活的快速鉴定, 一般采用 TTC 法, 但也有研究指出, TTC 法检测的只是脱氢酶的活性, 并不能准确反映成活率的高低(王子成和邓秀新 2001)。在本文的预备试验中, 曾将未经任何处理的茎尖直接投入液氮中, 解冻后以 TTC 法检验的成活率达 100%, 但茎尖在其后的恢复培养中均死亡。石蒜茎尖在恢复培养时, 有的茎尖需经 6~8 周才能萌动再生, 且死亡的茎尖并不明显发生褐变, 因而造成成活率鉴定中的困难。在我们的多次试验中, 观察茎尖颜色变化也可在较短时间(3~7 d)内判断茎尖的成活与否, 这也可以作为一种辅助方法使用。

参考文献

王艳军, 李锡香, 向长萍, 沈镛, 宋江萍(2005). 大蒜茎尖玻璃化超低温保存技术研究. 园艺学报, 32 (3): 507~509
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
张玉芹, 李锡香, 马庆, 王海平, 沈镛(2004). 食用百合种质的玻璃

化法超低温保存技术初探. 中国蔬菜, (4): 11~13
Bouman H, Tiekstra A, Petutschnig E, Homan M, Schreurs R (2003). Cryopreservation of *Lilium* species and cultivars. Acta Hort, 612: 147~154
Engelmann F (1997). *In vitro* conservation methods. In: Callow JA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (eds). Biotechnology and Plant Genetic Resources. Oxford: CAB International, 119~161
Engelmann F (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 40: 427~433
Matsumoto T, Sakai A, Yamada K (1994). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Rep, 13: 442~446
Niino T, Sakai A (1992). Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. Plant Sci, 87: 199~206
Reed BM (1993). Responses to ABA and cold acclimation are genotype dependent for cryopreserved blackberry and raspberry meristems. Cryobiology, 30: 179~184
Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep, 9: 30~33
Sakai A, Nishiyama Y (1978). Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. Hort Sci, 13: 225~227
Wang Q, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JPT (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell Rep, 24: 280~288