

李 享, 苏 晴, 宋 红. 桃叶卫矛茎尖超低温保存及再生[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 140–143.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.037

桃叶卫矛茎尖超低温保存及再生

李 享¹, 苏 晴², 宋 红¹

(1. 东北林业大学园林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以桃叶卫矛(*Euonymus bungeanus* Maxim.)为材料,选用茎尖作为外植体进行超低温保存,以期探索桃叶卫矛种质资源保存的新途径。桃叶卫矛茎尖超低温保存中茎尖最适长度为 2~3 mm;在预培养阶段,预培养液中蔗糖最适浓度为 0.4 mol/L,最佳预处理时间为 2 d;在装载液处理阶段,最佳装载时间为 10 min;在 PVS2 溶液处理阶段,最佳处理时间为 60 min;在卸载液处理阶段,最佳处理时间为 10 min;当茎尖洗涤完毕后应将其接种于 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上进行恢复培养,暗培养 7 d 后转入正常光照下进行培养,茎尖成活率可达 70% 以上。

关键词:桃叶卫矛;种质资源;茎尖;组织培养;超低温;玻璃化法

中图分类号:S687.024 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)05-0140-04

桃叶卫矛(*Euonymus bungeanus* Maxim)不仅是华北地区良好的园林绿化观赏树种,而且在工业、食品、医疗等方面也具有一定的应用价值。为了能对桃叶卫矛的应用潜力有进一步的开发利用,对其种质资源的保护势在必行。

常规的离体保存须要经常继代,耗费大量人力、物力,而且易污染和变异。而玻璃化法超低温保存具有操作简单、效果和重演性好等优点^[1-2],是目前较为理想的植物种质资源长期稳定的保存方法。另外茎尖具有良好的分生能力,因此目前已经广泛地将其应用于植物种质资源的离体保存,同时玻璃化法是目前国内茎尖超低温保存采用的主要方法,在胚状体、悬浮细胞、原生质体的超低温保存中也有所报道^[3-5]。尹明华等采用包埋玻璃化法对江西山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)茎尖进行超低温保存并对其遗传稳定性进行检测^[6]。张艳秋等对菊花(*Dendranthema morifolium*)茎尖玻璃化法超低温保存技术进行了研究^[7]。韩丽对菊芋(*Helianthus tuberosus*)品种茎尖超低温保存进行了研究,最终建立了菊芋茎尖超低温保存体系^[8]。本试验以桃叶卫矛为研究材料,选用茎尖作为外植体进行超低温保存,以期探索桃叶卫矛种质资源保存的新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所采用的材料为桃叶卫矛的茎尖,采自东北林业大学园林学院苗圃内 3 年生桃叶卫矛树。

1.2 试验方法

1.2.1 超低温保存方法 无菌条件下剥取长度分别为 1~2、2~3、3~5 mm 的无菌组培苗的茎尖,分别放入装有不同浓度(0.1~0.5 mol/L)的蔗糖中进行预培养。预培养环境条件

为 25℃ 暗培养,培养时间为 0、1、2、3 d。茎尖经过预培养处理后再用无菌牙签将茎尖挑入装有 Loading 溶液的冷冻管中,室温下装载 0、10、20、30 min。然后转入在玻璃化溶液 PVS2 中,在 0℃ 冰盒中处理 0、20、40、60 min 后投入液氮中保存。有文献显示,保存 1 d 和保存 10 个月的樱桃(*Cerasus pseudocerasus*)在保存效果上没有明显区别^[9]。而茎尖在液氮中保存 1 h 以上后,其保存时间将不再影响保存效果,因此本试验中选择保存 1 h。

1.2.2 化冻、再培养 将装有茎尖的冷冻管从液氮中捞出后迅速投入 40℃ 水浴锅中化冻 70 s,然后转入 Uploading 溶液中处理 0、10、20、30 min,洗涤过程在无菌环境中进行。后接种在不同的恢复培养基上进行培养,培养条件为先在 25℃ 人工气候箱中暗培养 7 d,然后转入组培苗培养室进行培养。根据不同生长调节剂的配比将恢复培养基设置为:(1)MS;(2)MS+1.0 mg/L 6-BA;(3)MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。

1.3 试验数据的处理与分析

正交试验采用 Minitab 进行设计,并利用 Microsoft Office Excel 2007 和 SPSS 20.0 对试验数据进行统计、分析以及制图。

2 结果与分析

2.1 桃叶卫矛茎尖长度对超低温保存后茎尖成活率的影响

在桃叶卫矛茎尖剥离的过程中,通过体视显微镜可以观察到桃叶卫矛茎尖部位是对称型,因此在剥离过程中可以依据所剩幼叶的对数来确定茎尖长度。本次试验中共设置 1~2 mm(不包含叶原基)、2~3 mm(包含 1 对叶原基)、3~5 mm(包含 2 对叶原基)3 个梯度。试验结果表明,桃叶卫矛茎尖长度对超低温保存后茎尖成活率有显著影响。当茎尖长度为 2~3 mm 时,超低温保存后茎尖成活率可达 83.33%,远大于长度为 1~2、3~5 mm 的茎尖(图 1)。当茎尖长度为 1~2 mm 时,由于茎尖分生组织外面没有幼叶包被,使得分生组织承受较大损害,最终失活;而当茎尖长度为 3~5 mm 时,虽然茎尖分生组织得到良好的保护,但是由于茎尖体积过大,导致在玻璃化过程中茎尖分生组织部位脱水不彻底,进而使得在超低

收稿日期:2017-05-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31670344)。

作者简介:李 享(1994—),女,黑龙江林口人,硕士研究生,研究方向为植物种质资源保护。E-mail:460704921@qq.com。

通信作者:宋 红,高级工程师,研究方向为植物种质资源保护。E-mail:851100942@qq.com。

温保存过程中形成结晶破坏细胞结构,最终使得茎尖失活。

2.2 预培养液蔗糖浓度对超低温保存后茎尖成活率的影响

将剥离的茎尖放入不同蔗糖浓度的预培养液中进行预培养后,茎尖经过超低温保存后的成活率各有不同,试验结果如图 2 所示。当蔗糖浓度在 0.1~0.2 mol/L 范围内时,超低温保存后茎尖的成活率不足 10%;而随着蔗糖浓度的进一步升高,茎尖成活率逐渐增加;当蔗糖浓度增至 0.4 mol/L 时,茎尖成活率最高可达 60%;当蔗糖浓度为 0.5 mol/L 时,茎尖成活率降至 10%。由此可以看出,预培养液中蔗糖浓度过低或过高都会导致茎尖成活率不高。

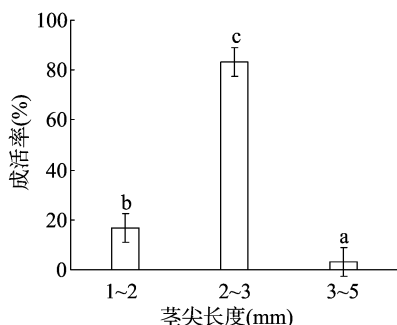


图1 桃叶卫矛茎尖长度对超低温保存后茎尖成活率的影响

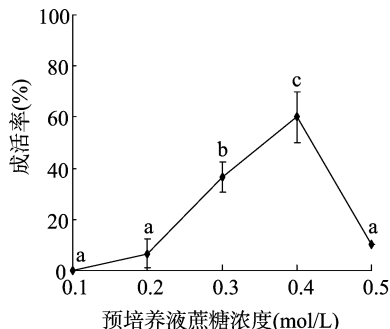


图2 预培养液蔗糖浓度对超低温保存后茎尖成活率的影响

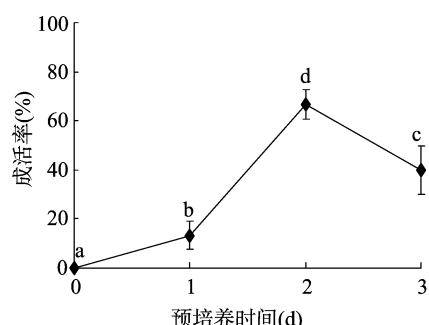


图3 预培养时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

2.4 装载液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

为了减少 PVS2 对茎尖的损害,所以采用 2 mol/L 丙三醇 (甘油) + 0.4 mol/L 蔗糖组成的装载液对茎尖进行处理,装载液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响如图 4 所示。结果表明,茎尖经过装载液处理和对照组之间存在显著差异,当茎尖不经装载液处理直接进行 PVS2 脱水处理时,茎尖成活率仅为 6%;当装载液处理时间为 10 min 时,茎尖成活率可达 70%;而随着装载时间的进一步延长,处理 10 min 的成活率与处理 20、40 min 的结果没有显著性差异,因此装载液最佳处理时间为 10 min。

2.5 PVS2 溶液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

PVS2 溶液具有良好的脱水效果,它可以缓慢渗入植物材料,使植物组织脱水水分呈玻璃化状态,从而在超低温环境下保护植物细胞结构不受损害。但由于 PVS2 溶液中含有二甲基亚砷等有毒物质,会对植物组织造成损害,因此在对植物材料进行 PVS2 脱水处理时,须要严格控制处理时间。本次试

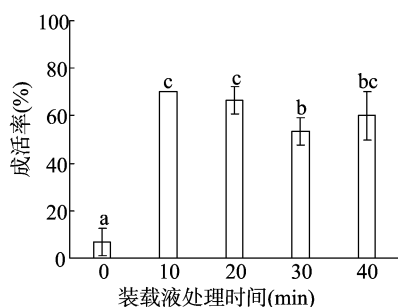


图4 装载液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

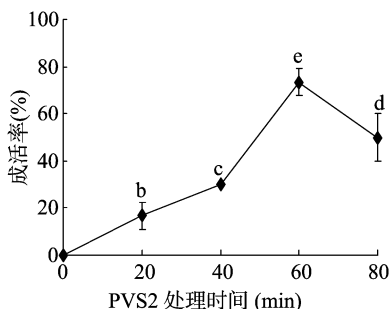


图5 PVS2 溶液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

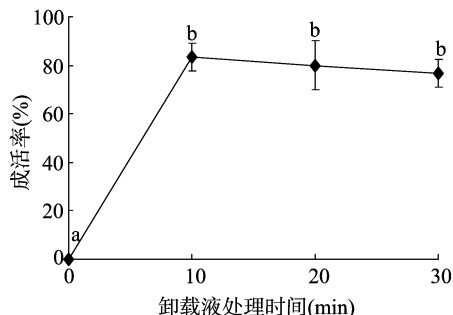


图6 卸载液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

2.7 恢复培养基对超低温保存后茎尖成活率的影响

经过卸载液洗涤后的茎尖应立即转入预先配制的恢复培养基中进行培养,本试验中共设置 3 种不同的恢复培养基。结

2.3 预培养时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

将茎尖放入 0.4 mol/L 蔗糖预培养液中培养不同时间,超低温保存后茎尖成活率如图 3 所示。当茎尖未经预培养阶段直接进行下一程序时,茎尖全部失活,由此可知,桃叶卫矛茎尖超低温保存中预培养步骤是至关重要的;随着预培养时间的增加,茎尖成活率呈现出先升高后降低的趋势,预培养时间为 2 d 时,茎尖成活率升至最高,可达 66.67%;而随着预培养时间的进一步延长,茎尖成活率出现下降趋势,当预培养时间为 3 d 时,茎尖成活率下降 26.67 个百分点。由此可知,最佳的预培养时间为 2 d。

实验将装载液处理过的茎尖转入装有 PVS2 溶液的冷冻管中并于 0℃ 环境下处理不同时间,茎尖成活率如图 5 所示。当茎尖未经 PVS2 溶液处理直接投入液氮中保存后,茎尖在恢复培养时全部失活变白;当 PVS2 处理时间为 60 min 时,茎尖成活率最高可达 73.3%,而当处理时间进一步延长至 80 min 时,成活率降低至 50%。

2.6 卸载液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

当茎尖从液氮中取出化冻后,为了避免 PVS2 溶液对茎尖造成二次毒害,所以应立即对茎尖进行洗涤。卸载液中高浓度的蔗糖有助于去除茎尖外部残留的 PVS2 溶液,减少茎尖受到的毒害,提高成活率。试验结果表明,当不经过卸载液处理的茎尖直接进行恢复培养时,茎尖全部死亡,说明茎尖外部仍有残留的 PVS2 溶液;利用含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 盐溶液对化冻后的茎尖洗涤 10 min 后,茎尖成活率可达 80% 以上,洗涤时间对茎尖成活率的影响不显著 (图 6)。

果 (表 1) 表明,茎尖在不添加激素的培养基中的成活率低于添加激素的培养基;此外还可以看出,在只添加 6-BA 的恢复培养基中,茎尖恢复效果优于添加 6-BA 和 NAA 的恢复培养基,

表 1 恢复培养基对超低温保存后茎尖成活率的影响

培养基编号	成活率 (%)	茎尖生长状况
1	25.7 ± 2.08a	少数变绿,无愈伤组织形成
2	75.00 ± 5.00c	茎尖大部分转绿,多数形成愈伤组织
3	57.33 ± 2.52b	茎尖大部分转绿,部分形成愈伤组织

由此可知 6-BA 对于超低温保存后茎尖成活率具有显著影响。

3 讨论

茎尖的剥离是获得茎尖超低温保存材料的必经途径。茎尖剥离时,茎尖长度直接影响茎尖超低温保存后的成活率。试验结果表明,长度为 1~2、3~5 mm 的茎尖超低温保存后的成活率远小于长度为 2~3 mm 的茎尖,这与王贞等在研究扶芳藤 (*Euonymus fortunei*) 茎尖玻璃化超低温保存时的研究结果^[10]一致。原因在于茎尖长度过小时虽然脱水程度彻底,但成活率低;而茎尖长度过长又会使细胞内残留水分,进而在液氮中形成冰晶破坏细胞结构,影响最终成活率。由此可见,适当的茎尖长度是影响茎尖超低温保存的重要因素之一。

茎尖预处理是为了提高茎尖对超低温环境的耐受性。常见的预处理方式主要有低温锻炼和预培养。低温锻炼主要是针对茎尖取自无菌苗的试验,由于本试验中茎尖取自实生苗,所以仅对茎尖进行预培养。试验结果表明,最佳的预培养方式为将茎尖投入蔗糖浓度为 0.4 mol/L 的 MS 盐溶液中暗培养 2 d。前人研究表明,预培养对提高植物材料超低温保存的成活率具有很大的影响^[11]。王贞等在研究扶芳藤茎尖玻璃化超低温保存时对茎尖直接进行装载液处理^[10],而韩丽在研究菊芋品种茎尖超低温保存时用含有 0.4 mol/L 蔗糖的液体 MS 培养基预培养 3 d,2 种植物的茎尖超低温保存后的效果均表现良好^[8],所以针对不同的植物是否需要茎尖预处理以及如何处理是因植物材料而异的。

装载液处理是为了进一步降低细胞内自由水的含量,平衡细胞内外的渗透压。本试验采用含 2 mol/L 甘油和 0.4 mol/L 蔗糖的 MS 盐溶液装载 10 min,结果表明,茎尖成活率为 70% 左右,而对于不经过装载液处理的试验组,茎尖最终全部死亡,由此可见,装载阶段对于桃叶卫矛茎尖超低温保存具有显著影响。

利用 PVS2 溶液对茎尖进行脱水处理是茎尖超低温保存过程中的关键步骤。由于 PVS2 溶液中的二甲基亚砜 (DMSO) 既是一种渗透性保护剂,又存在一定的毒性作用,因此,探究 PVS2 溶液处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响是必不可少的。Sakai 等的研究表明,茎尖在 0℃ 条件下与 PVS2 溶液接触所受到的毒害要小于在 25℃ 条件下所受毒害^[5],因此本试验研究了 0℃ 条件下利用 PVS2 溶液对桃叶卫矛茎尖处理不同时间,结果显示,适当的 PVS2 溶液处理时间对超低温保存后茎尖成活率影响较大,在 0~60 min 内,随着 PVS2 溶液处理时间的延长,茎尖成活率在逐渐升高,并在 60 min 时茎尖成活率达到最高;当处理时间进一步延长时,茎尖受到的毒性也在不断增大,使得茎尖成活率开始下降。不同植物茎尖进行 PVS2 溶液脱水处理的时间也各有不同,如柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 茎尖超低温保存中 PVS2 处理时间为 60 min^[12],另外菊花^[13]和白苜蓿草 (*Trifolium*

repens)^[14]经过 PVS2 处理 15 min,欧洲板栗 (*Castanea sativa*) 经过 PVS2 处理 120 min 才能达到最高存活率^[15],Niino 等认为处理时间与材料的大小也有关系^[16]。

茎尖从液氮中取出并化冻,由于仍然处于 PVS2 溶液中,此时如果直接将茎尖接种在恢复培养基上,那么残留的 PVS2 溶液会继续对茎尖造成毒害。因此,须要使用卸载液对茎尖进行洗涤。本试验研究了不同洗涤时间对茎尖成活率的影响,结果表明,对于桃叶卫矛茎尖最佳的洗涤方法为 25℃ 条件下用含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 盐溶液洗涤 10 min,茎尖成活率可达 80% 以上。石茹等研究发现的最佳洗涤方法为用含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 盐溶液在 20~25℃ 条件下洗涤 2~3 次,每次 10 min。

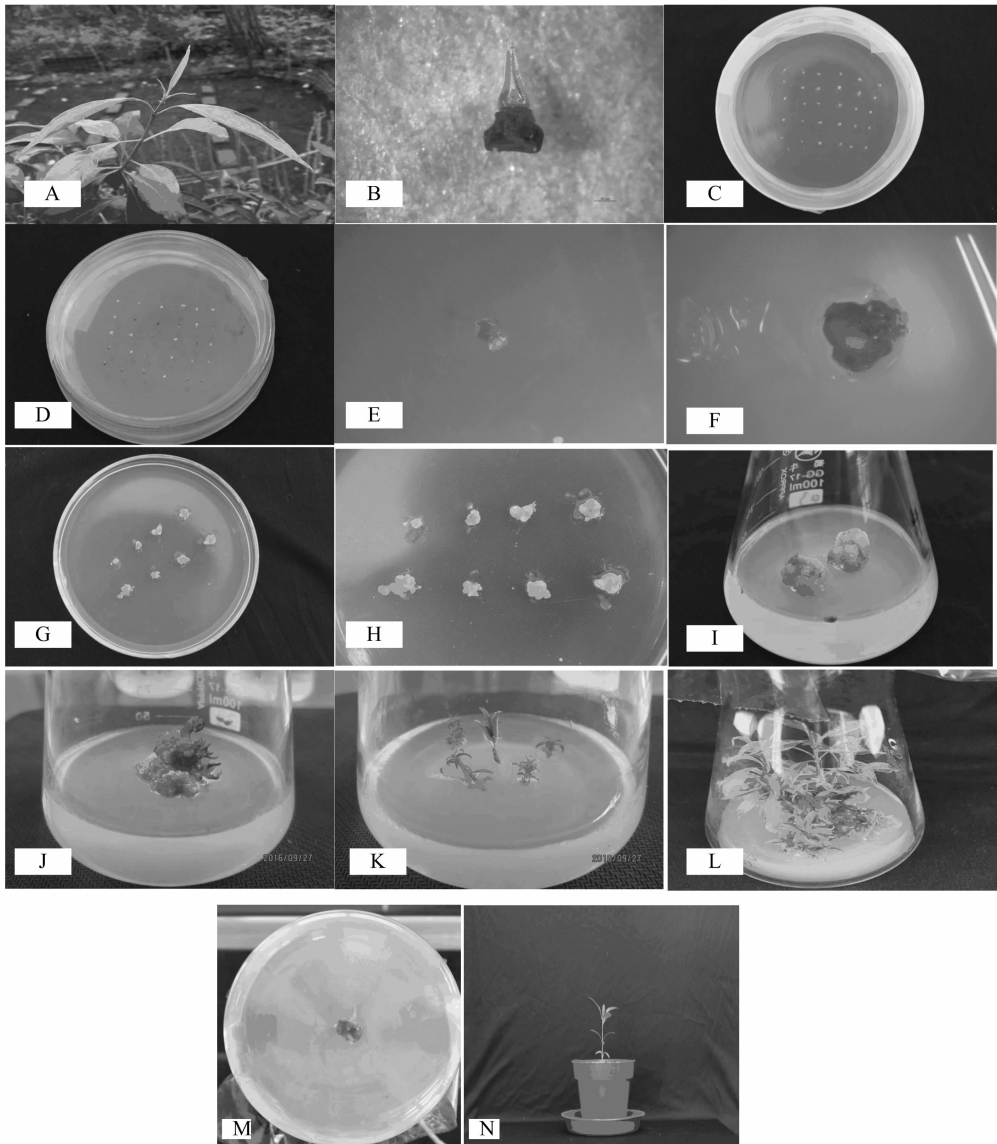
将茎尖接种于培养基上进行恢复培养,是检测茎尖超低温保存效果的直接而高效的方法,而恢复培养的环境条件以及培养基的配方对于茎尖能否成活显得尤为重要。在恢复培养的条件下,在试验过程中发现当茎尖处于正常光照条件下时,全部变白死亡。因此参照矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 茎尖超低温保存恢复培养过程中的方法^[17],先将茎尖放入人工气候箱中,25℃ 条件下暗培养 7 d 后,转入正常光照条件下培养,7 d 后发现茎尖开始逐渐变绿。而对于恢复培养基的配方,本试验共设置了 3 组培养基,试验结果表明,茎尖在含有 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上成活率较高,因此桃叶卫矛茎尖超低温保存后恢复培养最佳方案为:在 MS + 1.0 mg/L 6-BA 培养基上暗培养 7 d 后转入正常光照条件下进行培养。

4 结论

本研究建立了桃叶卫矛茎尖超低温保存体系(图 7)。结果表明,桃叶卫矛茎尖超低温保存中茎尖最适长度为 2~3 mm;在预培养阶段,预培养液中蔗糖最适浓度为 0.4 mol/L,最佳预处理时间为 2 d;在装载液处理阶段,最佳装载时间为 10 min;在 PVS2 溶液处理阶段,最佳处理时间为 60 min;在卸载液处理阶段,最佳处理时间为 10 min;当茎尖洗涤完毕后应将其接种于 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上进行恢复培养,培养环境为暗培养 7 d 后转入正常光照下进行培养,茎尖成活率可达 70% 以上。随后再利用茎尖组织培养体系将其培养成苗。

参考文献:

[1] 王君晖,黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述[J]. 园艺学报,1994(3):277-282.
[2] Yakai H, Thinh N T, Kyesmu P M. Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification[J]. Acta Hort, 1998, 461: 485-490.
[3] Uragami A, Sakai A, Nagai M, et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8(7): 418-421.
[4] Towill L E. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(4): 178-180.
[5] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama A I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196℃ [J]. Journal of Plant Physiology, 1991, 137(4): 465-470.



A—桃叶卫矛实生苗顶芽；B—桃叶卫矛离体茎尖；C—超低温保存后转入恢复培养基的桃叶卫矛茎尖；D—暗培养 7 d 后桃叶卫矛茎尖存活情况；E—超低温保存后存活的茎尖；F—超低温保存后死亡的茎尖；G、H—超低温保存后桃叶卫矛茎尖形成的愈伤组织；I—超低温保存后桃叶卫矛茎尖愈伤组织的增殖；J—超低温保存后桃叶卫矛茎尖愈伤组织的分化；K—分化芽的增殖；L—分化芽成苗；M—超低温保存后桃叶卫矛再生苗的生根；N—超低温保存后桃叶卫矛再生苗的移栽

图7 桃叶卫矛茎尖超低温保存体系流程

- [6]尹明华,徐志坚,章省琴,等. 江西山药茎尖包埋玻璃化法超低温保存及其遗传稳定性检测[J]. 浙江农业学报,2016(6):984-991.
- [7]张艳秋,屈连伟,苏君伟,等. 菊花茎尖玻璃化法超低温保存技术研究[J]. 北方园艺,2016(5):128-132.
- [8]韩 丽. 菊芋品种茎尖超低温保存研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2014.
- [9]Niino T,TashiroK,Suzuki M. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one step vitrification[J]. Scientia Horticulturae,1997,70:155-163.
- [10]王 贞,高健洲,刘 燕. 玻璃化保存扶芳藤茎尖再生苗夏季适应性研究[J]. 林业科学,2007(9):150-154.
- [11]Tskagi H,Tinh N,IslamOM,et al. Cryopreservation of *in vitro* -grown shoot tips of vitrification procedure[J]. Plant Cell Reports,1997,16:594-599.
- [12]王子成,邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生[J]. 园艺学报,2001(4):301-306.
- [13]刘艳霞,刘灶长,林 田,等. 菊花茎尖的玻璃化超低温保存研究[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):249-254.
- [14]Yamada T,Sakai A,Matusumura T. Cryopreservation of apical meristems of white clover[J]. Plant Science,1991(78):81-87.
- [15]Vidal N,Sánchez C,Jorquera L,et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro* -grown shoot tips[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant,2005,41(1):63-68.
- [16]Niino T,Sakai A,Yakuwa H,et al. Cryopreservation of *in vitro* -grown shoot tips of apple and pear by vitrification[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1992,28:261-266.
- [17]黄 斌. 超低温技术保存矮牵牛种质资源的研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.