

罗汉果试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生

刘华英,覃灵华*

(广西师范大学生命科学学院,广西 桂林 541004)

摘要:目的 为罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 种质资源的保存提供一条新途径。方法 以继代 15 d 生长健壮的罗汉果试管苗 0.8~1 cm 长嫩梢进行预培养,剥取 2~3 mm 茎尖,25℃ 下 60% PVS₂ 装载,再用 100% PVS₂ 在 0℃ 脱水处理,更换新鲜 100% PVS₂ 后投入液氮保存 24 h,化冻,用 MS+1.2 mol/L 蔗糖的液体培养基洗涤,滤纸吸干后接种于 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃+0.8%琼脂粉+45 g/L 蔗糖的恢复培养基上,25℃ 暗培养 7 d,转入正常光下培养。再生苗生根培养基为 1/2 MS+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖。结果 嫩梢于 MS+0.7 mol/L 蔗糖的培养基上预培养 3 d,茎尖装载 40 min,脱水 50 min,液氮保存后于 40℃ 水浴中快速化冻,洗涤 40 min,恢复培养 1 周时存活率最高可达 100%,30 d 时再生率最高可达 78.33%。再生苗转入生根培养基可形成完整植株。结论 罗汉果种质资源的玻璃化法超低温保存操作简单、成活率高、再生植株正常。

关键词:罗汉果;茎尖;玻璃化法;超低温保存

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0293-04

Cryopreservation of test-tube shoot tips of *Siraitia grosvenorii* by vitrification and plant regeneration

LIU Hua-ying, QIN Ling-hua

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract : Objective To get a new approach for conserving the germplasm of *Siraitia grosvenorii*.

Methods Shoots, 0.8—1 cm in length, excised from test-tube plantlets which were subcultured 15 d, were precultured. Then its shoot-tips about 2—3 mm in length were dissected and loaded with 60% PVS₂ at 25℃, and dehydrated with 100% PVS₂ at 0℃, changed for fresh 100% PVS₂ prior to directly plunging into liquid nitrogen. After cryopreservation for 24 h, the shoot tips were thawed, rinsed in MS+1.2 mol/L sucrose medium, blotted with filter papers, then plated on the MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃+0.8% agar+45 g/L sucrose medium at 25℃ for 7 d in dark prior to exposure to the light. The root medium for regeneration plantlets was 1/2 MS+0.2 mg/L NAA+30 g/L sucrose. **Results** Shoots were precultured for 3 d on MS+0.7 mol/L sucrose medium, then its shoot-tips loaded for 40 min, dehydrated for 50 min. After cryopreservation, the shoot tips were rapidly thawed in water at 40℃, then rinsed for 40 min. The survival rate of shoot-tips plated on the recovering medium in one week was 100%, and regeneration rate after 30 d was 78.33%, which was the highest. The regeneration plantlets inoculated on root medium were reconstructed integrating plantlets. **Conclusion** The method of vitrification to cryopreserve the germplasm of *S. grosvenorii* is a simple way with high survival rate and normal regeneration plants.

Key words : *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey; shoot-tips; vitrification; cryopreservation

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey,又叫拉汗果、长寿果、神仙果、罗晃子、光果木鳖等,为葫芦科 (Cucurbitaceae) 罗汉果属 (*Sir-*

aitia Merr) 多年生草质藤本,雌雄异株植物,是广西最重要的特产中药材之一。罗汉果果实营养价值高,含有丰富的果糖、葡萄糖、蛋白质和多种维生素,

* 收稿日期:2008-05-03

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自 0542032);广西师范大学博士启动基金项目;广西研究生教育创新计划项目(2008106020710M255)

作者简介:刘华英(1971—),女,广西桂林人,副教授,博士,从事植物细胞生物学教学、科研工作。 Tel:13597325026

E-mail:hyliuchsh@yahoo.com.cn

其性凉味甘,具有清热解毒、止咳润肺等功效,已广泛应用于医药、饮料和调味品中。因此,在医疗与保健方面有很高的应用价值和广泛的开发前景^[1]。

由于长期的无性繁殖,不仅造成罗汉果品种退化,产量与品质下降,病虫害严重,而且还使一些野生种面临绝种的危险^[2]。目前,罗汉果种质资源通过组织培养不断继代得以保存下来,然而,组织培养仍存在不少问题,如组培苗遗传性状表现不稳定;组培苗容易感染病毒病等。因此,如何较好地保存罗汉果种质资源是一需深入研究的课题。

超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存比较理想的方法,在超低温(通常指液氮温度 -196°C)条件下,细胞的分化和全部代谢活动近于停止,因而可以保持种质的遗传稳定性,达到长期保存的目的^[3]。其中玻璃化法以其独特的优势备受人们推崇。玻璃化法超低温保存是目前植物细胞和组织长期稳定保存的理想方法,不仅能节省空间,无需继代,避免污染,而且设备简单,操作简便。运用该方法已成功地保存了柿和君迁子^[4]、木薯^[5]、怀山药^[6]、石楠^[7]。本研究采用玻璃化法对罗汉果离体茎尖进行超低温保存,拟建立罗汉果离体茎尖的超低温保存体系,为长期安全保存罗汉果种质资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:选取罗汉果青皮品种健康、无病毒的母株上成熟果实,取其种子在自来水下洗净,于超净工作台上除去外种皮后用 75 % 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 次后用 0.1 % 升汞灭菌 8 min,再用无菌水冲洗 4~5 次,放在无菌纸上吸干多余水分后进行无菌暗培养($\text{MS} + 30 \text{ g/L}$ 蔗糖 + 0.7 % 琼脂粉),萌发后转入正常光照培养。培养温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,每天 12 h 光照。长至 10 cm 长时切取茎段继代培养($\text{MS} + 0.5 \text{ mg/L}$ 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 0.7 % 琼脂粉)得无菌试管苗。

1.2 方法

1.2.1 茎尖的预培养:选取继代培养 15 d 生长健壮的罗汉果试管苗,切取 0.8~1 cm 长嫩梢,接种到分别添加 0.7 mol/L 蔗糖、5 % 二甲基亚砷(DMSO)、0.7 mol/L 蔗糖 + 5 % 二甲基亚砷的 MS 基本培养基上,于 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,正常光照下预培养不同天数。

1.2.2 装载与脱水:切取 2~3 mm 长的茎尖,放入 1.8 mL 冷冻管中(10 个/管),用 60 % PVS₂ (0.4 mol/L 蔗糖 MS 液体培养基与 PVS₂ 溶液体积比为

40:60)在 25 $^{\circ}\text{C}$ 装载不同时间,再经 100 % PVS₂ (30 % 甘油 + 15 % 乙二醇 + 15 % DMSO,以含 0.4 mol/L 蔗糖的 MS 液体培养基配制)于 0 $^{\circ}\text{C}$ 下处理不同时间,然后更换新鲜的 100 % PVS₂ 溶液,迅速将冷冻管投入液氮中保存。每处理 20 个茎尖,重复 3 次。

1.2.3 化冻、恢复培养与植株再生:液氮中保存 1 d 后取出茎尖,分别于不同温度下化冻,再用 MS 液体培养液(含 1.2 mol/L 蔗糖)洗涤 4 次,每次 10 min,滤纸吸干后接种在恢复培养基($\text{MS} + 1.0 \text{ mg/L}$ 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 0.1 mg/L GA₃ + 0.7 % 琼脂粉 + 45 g/L 蔗糖)上,25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 7 d,转入正常光下培养。生活力检测采用恢复生长法,即解冻后一周统计成活率(解冻后 1 周茎尖保持绿色,部分长芽或长愈伤组织的茎尖占全部实验茎尖数的比率),30 d 统计再生率(长芽、长愈伤组织的茎尖占全部实验茎尖数的比率)。将培养成活的材料接种于生根培养基(1/2 MS + 0.2 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖)上,诱导生根。

2 结果与分析

2.1 装载与脱水对冻后存活率与再生率的影响:在超低温保存过程中,水扮演着很重要的角色,它通过进出细胞以维持渗透压的平衡,从而减少冻存过程中低温对材料的伤害^[8]。一些植物用玻璃化溶液快速脱水前,用较高浓度的溶液进行预处理,即装载,以进一步降低组织含水量,避免由于渗透压变化剧烈对材料造成伤害^[3]。本实验用 60 % PVS₂ 进行装载,结果显示(表 1),与对照(预处理 0 min)比较,装载显著提高冻后存活率和再生率。材料装载后的存活率和再生率首先随装载时间的延长而提高,在处理 40 min 时达到最大值,然后逐渐降低。

玻璃化溶液处理是超低温保存的关键步骤。玻璃化溶液能很快渗入到细胞,使材料完全达到玻璃化状态,进一步使组织脱水,减轻伤害,提高存活率^[8]。本实验结果(表 1)表明,脱水时间对经过装载处理 40 min 的罗汉果茎尖冻后存活率和再生率也有显著影响。茎尖不经过脱水处理,保存后不能存活;随脱水时间的延长,存活率与再生率先升高然后逐渐降低,脱水 50 min 时达峰值,存活率与再生率分别为 91.67 % 和 46.67 %。脱水时间少于 50 min,材料脱水不够,不能迅速达到玻璃化状态,对存活率的影响较大;脱水时间超过 50 min,由于玻璃化溶液对材料的毒害作用增强,造成存活率又有所降低。

表 1 装载、脱水时间对冻后存活率和再生率的影响

Table 1 Effect of different loading times and exposing times on survival rate and regeneration rate after cryopreservation

时间/ min	装 载		脱 水	
	存活率/ %	再生率/ %	存活率/ %	再生率/ %
0 (CK)	0. 0 a	0. 0 a	0. 0 a	0. 0 a
10	8. 33 ±2. 89 b	1. 67 ±2. 89 b	11. 67 ±2. 89 b	3. 33 ±2. 89 b
20	30. 00 ±5. 0 c	13. 33 ±2. 89 c	30. 00 ±5. 0 c	8. 33 ±2. 89 bc
30	43. 33 ±2. 89 de	25. 00 ±5. 0 de	43. 33 ±2. 89 d	21. 67 ±2. 89 d
40	88. 33 ±2. 89 f	43. 33 ±2. 89 f	56. 67 ±2. 89 e	28. 33 ±2. 89 e
50	70. 00 ±5. 0 g	28. 33 ±2. 89 d	91. 67 ±2. 89 f	46. 67 ±2. 89 f
60	48. 33 ±2. 89 d	20. 0 ±0. 0 e	70. 00 ±5. 0 g	13. 33 ±2. 89 c
70	38. 33 ±2. 89 e	11. 67 ±2. 89 c	38. 33 ±2. 89 d	8. 33 ±2. 89 bc

同列内不同字母表示在 0. 05 水平上差异显著 (下同)
Means within same columns followed by same letter are not significantly different at 0. 05 level , followings are same

2. 2 预培养对冻后存活率与再生率的影响:见表 2。植物细胞内含有大量的水分,在低温冰冻过程会使水结冰,造成对细胞结构的损伤,可导致细胞死亡。用高浓度的冰冻保护剂预培养诱导组织细胞进行保护性脱水对提高超低温保存的成活率有较大的影响^[9]。本实验中,在不同培养基上预培养后的罗汉果嫩梢变结实,利于切取茎尖,但随预培养时间的延长,嫩梢逐渐变黄甚至枯死。MS + 0. 7 mol/L 蔗糖的效果最好,存活率与再生率最高,分别达到 100 %和 78. 33 %,MS + 0. 7 mol/L 蔗糖 + 5 % DMSO 次之,MS + 5 % DMSO 对罗汉果毒害最大,3 者间差异显著(表 2)。使用 DMSO 预培养 1 d,罗汉果嫩梢即开始变黄,预培养 3 d 以上,嫩梢出现枯黄,部分茎尖枯死,预培养 5 d,再生率为 0。加入 0. 7 mol/L 蔗糖可能缓解了 DMSO 的毒害,所以存活率与再生率比单独使用 DMSO 高。

表 2 不同培养基上预培养的最大冻后存活率与再生率

Table 2 Maximum survival rate and regeneration rate after cryopreservation on different preculture media

培养基	存活率/ %	再生率/ %
MS + 0. 7 mol/L 蔗糖	100. 0 ±0. 0 a	78. 33 ±7. 64 a
MS + 0. 7 mol/L 蔗糖 + 5 %DMSO	93. 33 ±2. 89 b	51. 67 ±2. 89 b
MS + 5 %DMSO	73. 33 ±7. 64 c	21. 67 ±2. 89 c

在 MS + 0. 7 mol/L 蔗糖培养基上预培养 0 ~ 7 d 的结果显示(图 1),预培养 1 ~ 6 d,存活率显著高于无预培养,最高达到 100 % (1 ~ 5 d),超过 6 d 则显著降低。再生率则随预培养时间延长而升高,预培养 3 d 时,再生率最高,达 78. 33 %,超过 3 d,再生率逐渐降低,6 ~ 7 d 时显著低于对照,可能蔗糖处理过长,引起细胞内严重脱水,甚至造成质壁分离,导致再生困难。因此,预培养时间以 3 d 为宜。

2. 3 化冻方式对冻后存活率与再生率的影响:化冻

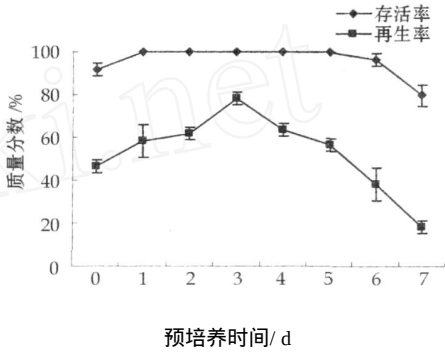


图 1 预培养时间对冻后存活率与再生率的影响

Fig 1 Effect of preculture time on survival rate and regeneration rate after cryopreservation

的速度也是玻璃化冻存的关键环节。化冻温度过低,容易出现次生结冰,对组织、细胞造成伤害,伤害程度与冻存降温时的同样严重^[10]。本实验结果(表 3)显示,不同化冻温度对冻后存活率和再生率影响显著,随化冻温度的升高,存活率与再生率逐渐升高,40 ℃水浴快速化冻效果最好。0 ℃时存活率与再生率比较低,可能因为化冻温度低,化冻速度较慢,所以化冻过程出现次生结冰,化冻后温度维持较长时间在 0 ℃,同样对茎尖造成伤害。

表 3 化冻方式对冻后存活率与再生率的影响

Table 3 Effect of different thawing models on survival rate and regeneration rate after cryopreservation

化冻温度/ ℃	存活率/ %	再生率/ %
0	71. 67 ±2. 89 a	33. 33 ±2. 89 a
25	93. 33 ±2. 89 b	56. 67 ±5. 77 b
40	100. 0 ±0. 00 c	78. 33 ±7. 64 c

2. 4 茎尖恢复培养与植株再生:茎尖超低温保存化冻后接种于恢复培养基上。恢复培养 1 周,存活的茎尖仍然为绿色或长出绿色的芽点,不存活的茎尖变枯黄或褐色(图 2-A)。1 周后,不存活的茎尖不再变化,存活的茎尖部分形成愈伤组织(图 2-B),部

分直接成苗并进一步形成丛生芽(图 2-C,D),待植株生长到一定高度后,转到生根培养基上,诱导生根

容易,根数较多(图 2-E)。再生植株在形态上与常规培养苗无异。



A-冻存后存活茎尖(恢复培养 1 周) B-冻存后茎尖形成愈伤组织 C-冻存后茎尖直接成苗

D-冻存后茎尖形成丛生芽 E-冻存后再生苗生根

A-survival shoot-tips after cryopreservation (1 week) B-callus derived from cryopreserved shoot-tips C-regeneration plantlets from cryopreserved shoot-tips D-cluster buds derived from cryopreserved shoot-tips E-rooting of plantlets after cryopreservation

图 2 超低温保存后罗汉果茎尖培养和植株再生

Fig 2 Shoot-tips culture of *S. grosvenorii* and plant regeneration after cryopreservation

3 讨论

超低温保存成功与否,与材料的生理状态有关。预培养是改变保存材料生理状态的重要步骤。预培养的目的是增加细胞分裂与分化的同步性,减少细胞内自由水的量,提高细胞的抗冻性,使材料冷冻后仍能保持较高的生活力^[11]。不同材料需要不同的预培养条件,5%DMSO 适合柑桔茎尖的预培养^[12],高浓度蔗糖则适合柿和君迁子^[4],而石楠^[7]不需要预培养。本实验中,预培养可提高存活率和再生率,高浓度蔗糖较适合。

生物材料在液氮条件下,其生理代谢基本停止,所以保存时间长短不会影响保存结果,如广东粉蕉一号(ABB)茎尖^[13]保存 1 h、1 d、1 周、10 周的存活率都在 60%以上,彼此之间差异不显著;大蒜^[14]茎尖在液氮保存 2 d 和 1 个月茎尖存活率没有差别,均可达 100%。因此,本实验仅对茎尖在液氮中保存 24 h 的存活和再生进行研究,结果在实际应用上也是可行的。

玻璃化法超低温保存是一个连续过程,化冻后的洗涤也是很重要的一个环节,这一过程不仅可除去高含量玻璃化溶液对细胞的毒性,而且也是一个后过渡,以防渗透损伤,影响材料恢复和继续生长,因此需要除去玻璃化溶液^[6]。一般用含 1.2 mol/L 蔗糖的培养液洗涤 2 次,每次 10 min。本实验发现,罗汉果茎尖经玻璃化超低温保存后,洗涤 4 次,每次洗涤 10 min,效果好于洗涤 2 次或超过 4 次,表明洗涤次数少,则去除玻璃化溶液不彻底,洗涤次数多,则容易损伤细胞,都会影响茎尖存活。

影响超低温保存材料遗传稳定性的因素很多,主要是材料和保存方法。通过茎尖培养再生植株,不经过愈伤组织阶段,可减少发生变异的机率。木薯茎尖用 5%DMSO + 5%蔗糖 + 5%甘油脱水^[15],恢复培养时产生愈伤组织,而用 0.3 mol/L 蔗糖预

培养 16 h,2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖室温下装载 20 min,然后在 PVS₂ 室温下脱水 45 min,恢复培养时茎尖可以直接再生成苗^[5]。白杨树^[16]恢复培养时添加 BA 3.0 μmol/L + GA₃ 1.0 μmol/L 产生大量愈伤组织,添加 BA 1.5 μmol/L + GA₃ 0.5 μmol/L 时茎尖直接再生成植株。本实验中,存活后的罗汉果茎尖直接再生成苗占再生率的 30.77%,部分形成愈伤组织。应尽量避免愈伤组织的产生,上述方法是否可行,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 李峰. 罗汉果栽培与开发利用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [2] 何康. 中国农业百科全书 [M]. 农作物卷, 上. 北京: 农业出版社, 1984.
- [3] Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects [J]. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 2004, 40: 427-433.
- [4] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿和君迁子试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及再生植株遗传稳定性研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2023-2027.
- [5] Charoensub R, Phansiri S, Sakai A, et al. Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196 by vitrification [J]. *Cryo Lett*, 1999, 20: 89-94.
- [6] 洪森荣, 李明军. 玻璃化法超低温保存怀山药种质的技术研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1715-1718.
- [7] 王越, 刘燕. 玻璃化法超低温保存石楠茎尖的初步研究 [J]. 林业科学, 2006, 42(12): 134-136.
- [8] Mazur P. Principles of Cryobiology. In: Fuller B J, Lane N, Benson E E (eds) *Life in the Frozen State* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [9] Maria T G, Ana P, William M, et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008, 92: 1-13.
- [10] Benson E E, Johnston J, Muthusamy J, et al. Physical and Engineering Perspectives of *in vitro* Plant Cryopreservation. In: Gupta S, Ibaraki Y (eds) [M]. Berlin: Springer Verlag, 2006.
- [11] Pence V C. Desiccation and survival of Aesculus, Castanea and quercus embryoaxes through cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 1992, 29: 391-399.
- [12] 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.
- [13] 吴黎明, 曾继吾, 彭抒昂. 香蕉茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生 [J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 501-506.
- [14] 王艳军, 李锡香, 向长萍, 等. 大蒜茎尖玻璃化法超低温保存技术研究 [J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 507-509.
- [15] Bajaj Y P S. Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years [J]. *Field Crops Res*, 1983, 7: 161-167.
- [16] Lambardi M, Fabbri A, Caccavale A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 213-218.