

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)05-0268-03

基因库中马铃薯种质资源超低温保存技术研究

宋继玲¹, 刘长臣², 孙邦升¹, 刘喜才¹, 张丽娟¹, 张文英¹, 李 军¹

(1. 国家种质克山马铃薯试管苗保存库, 黑龙江 克山 161606; 2. 庆安县种子管理站, 黑龙江 庆安 151442)

摘 要: 以马铃薯克新4号试管苗的离体茎尖为试材, 通过正交设计试验对预培养培养基中蔗糖浓度、预培养时间和PVS₂处理时间等影响超低温保存存活率的主要因素进行了分析, 初步建立了马铃薯种质玻璃化超低温保存的技术方案。通过形态观察和同工酶检测, 冻存前后材料的遗传稳定性没有发生改变, 表明该方法对马铃薯的种质保存具有较强的实用意义。

关键词: 马铃薯种质资源; 正交设计; 超低温保存

我国的马铃薯资源收集整理等工作始于20世纪50年代, 随着历史的发展, 不断传入和引进, 现初具规模。到目前为止, 国家种质克山马铃薯试管苗库已收集保存了包括14个种的国内外马铃薯优良种质资源近1800份, 所有资源均采用试管苗库与田间圃双轨保存。然而, 随着数量的逐渐增加, 保存压力越来越大, 不仅需要耗费大量的人力和财力, 而且资源长期安全保存没有保证, 所以急需建立起新的安全、长期稳定的保存方法。

在液氮条件下, 活细胞内的物质代谢几乎完全停止, 植物材料处于相对稳定的生理状态^[1]。为了在液氮条件下保存种质资源, 人们进行了大量的试验研究, 取得了很大进展。其中, 近几年发展较快的玻璃化法以其设备要求简单、材料处理步骤简便、效果和重演性好等优点, 成为较理想的植物种质资源保存方法。本研究用玻璃化法进行马铃薯茎尖的超低温保存, 以建立起适于马铃薯资源长期安全保存的技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以马铃薯克新4号的无菌试管苗为试材。

收稿日期: 2009-02-19

基金项目: 国家科技支撑计划“农作物基因资源安全保存评价关键技术研究”(2006BAD13B10-05)。

作者简介: 宋继玲(1983-), 女, 硕士, 主要从事马铃薯种质资源研究。

1.2 试验方法

1.2.1 预培养

取克新4号试管苗, 采用单节茎切断在MS固体培养基上扩繁。然后将继代培养20d左右的试管苗置于4℃条件下低温锻炼2周, 无菌条件下剥取带有叶原基的茎尖分生组织, 约2~3mm接种于附加蔗糖的MS培养基中预培养1~5d。

1.2.2 装载和玻璃化液处理

将预培养的茎尖用MS + 0.4 mol·L⁻¹蔗糖 + 2 mol·L⁻¹甘油溶液装载20min后, 转入冰冻保护剂PVS₂(30%甘油 + 15%乙二醇 + 15%DMSO + 0.4 mol·L⁻¹蔗糖)中, 在0℃条件下分别处理不同时间(10min, 30min, 50min), 然后将茎尖转移至盛有新鲜PVS₂溶液的冷冻管中, 迅速投入液氮。

1.2.3 化冻与洗涤

在液氮中保存(1、7、15d)后, 取出冷冻管并迅速投入37℃水浴锅中解冻2min, 除去冰冻保护剂, 加入MS + 1.2 mol·L⁻¹蔗糖液体培养基洗涤2次, 每次10min。

1.2.4 接种

将经过水浴化冻和洗涤的茎尖接种到MS + 0.3 mg·L⁻¹GA₃ + 0.1 mg·L⁻¹NAA + 0.5 mg·L⁻¹6-BA + 30 g·L⁻¹蔗糖的恢复培养基中, 20℃下暗培养2周, 然后转置20℃, 光照强度为1500lx条件下, 培养2周后统计存活率。

1.2.5 L₉(3⁴)正交试验设计

以材料的冷冻保存时间(A)、预培养培养基中

蔗糖浓度(B)、预培养时间(C)和 PVS₂ 处理时间(D)作为试验因素, 每个因素取 3 个水平进行 L₉(3⁴) 正交试验, 具体设计见表 1。

表 1 正交试验 L₉(3⁴)

参选因素	代号	水平		
		1	2	3
冷冻保存时间 (d)	A	1	7	15
预培养培养基中蔗糖浓度 (mol·L ⁻¹)	B	0.3	0.5	0.7
预培养时间 (d)	C	1	3	5
PVS ₂ 处理时间 (min)	D	10	30	50

1.2.6 遗传稳定性检测

将超低温保存后存活的茎尖接种至正常的继代培养基上进行培养, 观察植株的形态变化。以再生植株为材料进行酯酶同工酶电泳, 以正常条件下生长的试管苗作为对照, 从蛋白质分子水平检测材料的遗传稳定性^[2]。

2 结果与分析

2.1 多因素综合作用对存活率的影响

2.1.1 试验结果

由于超低温保存的影响因素很多, 为了用较少的试验次数得到较好的结果, 以便从众多影响存活率的因素中选出主要因素及其最优组合, 本试验采用了 L₉(3⁴) 正交设计。试验结果见表 2。

表 2 正交设计 L₉(3⁴) 试验结果

代号	因素组合	存活率(%)
1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	23.53
2	A ₂ B ₁ C ₂ D ₂	43.24
3	A ₃ B ₁ C ₃ D ₃	27.27
4	A ₁ B ₂ C ₂ D ₃	0
5	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	0
6	A ₃ B ₂ C ₁ D ₂	0
7	A ₁ B ₃ C ₃ D ₂	0
8	A ₂ B ₃ C ₁ D ₃	0
9	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	0

由表 2 可以看出, 代号为 2 的处理组合存活率最高, 达到 43.24%; 代号为 1、3 的处理组合次之, 分别为 23.53% 和 27.27%。其他处理组合存活率均小于以上 3 个处理组合。

2.1.2 试验结果的直观分析

以存活率为统计指标, 对数据进行直观分析, 结果见表 3。从表 3 看出, 预培养培养基中蔗糖浓度对存活率影响最大。根据各水平均值的大小, 可得最优水平组合为 A₂B₁C₂D₂, 即选用蔗糖浓度为 0.3 mol·L⁻¹ 的预培养基中预培养 3 d, PVS₂ 处理 30 min, 保存 7 d。

表 3 L₉(3⁴) 试验结果直观分析

因素	水平			极差(R)
	1	2	3	
A	7.84	14.41	9.09	6.57
B	31.35	0	0	31.35
C	7.84	14.41	9.09	6.57
D	7.84	14.41	9.09	6.57

2.1.3 试验结果的方差分析

以存活率为观测指标, 对数据进行方差分析的结果见表 4。分析结果表明, 因素 B 对存活率的影响最大, 达到极显著水平。因素 D、A、C 三者对存活率影响不显著。各个水平的效应值可以得出最佳的处理组合方案为 A₂B₁C₂D₂, 这与直观分析的结果一致。

表 4 L₉(3⁴) 试验结果方差分析

因素	各水平的效应			显著性
A	a ₁ = -2.61	a ₂ = 3.96	a ₃ = -1.36	
B	b ₁ = 20.90	b ₂ = -10.45	b ₃ = -10.45	**
C	c ₁ = -2.61	c ₂ = 3.96	c ₃ = -1.36	
D	d ₁ = 2.61	d ₂ = 3.96	d ₃ = -1.36	

** 表示极显著水平(P<0.01)

2.2 超低温保存后植株再生及遗传稳定性

玻璃化法超低温保存后存活的茎尖经恢复培养生成再生植株(图 1), 由于再生培养时茎尖直接萌发成株, 没有经过愈伤组织阶段, 减少了引起遗传变异的几率, 在一定程度上保证了再生植株的遗传稳定性。再生植株的形态特征及生长发育没有发生变化。通过酯酶同工酶电泳图谱分析(图 2), 未发现超低温保存前后材料在蛋白质分子水平上的遗传差异。



图1 超低温保存的再生植株

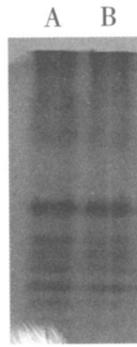


图2 酯酶同工酶电泳图谱 (A为对照, B为处理)

3 讨论

3.1 预处理对茎尖超低温保存存活率的影响

蔗糖对于提高植物组织的抗寒性有着重要作用^[3]。因此,用含有高浓度蔗糖的预培养培养基对材料进行预培养会使超低温保存后的存活率明显提高。本研究结果表明,对于马铃薯茎尖,用含有 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基进行预培养可提高冻存后的存活率。

3.2 PVS₂处理时间对茎尖超低温保存存活率的影响

冷冻保护剂处理的目的是脱去材料中过多的水分,使材料能够完全达到玻璃化状态,并使冷冻保护剂渗入细胞,减轻在超低温保存过程中细胞所受到的伤害^[4]。但保护剂本身也有一定的毒性,所以,要求精确控制其浓度和脱水的时间,有研究发现低温能减轻这种毒性的伤害^[5]。不同材料要求用保护剂

处理时间不同,一般为 $20 \sim 120 \text{ min}$ ^[6-8],PVS₂处理马铃薯茎尖的最佳条件是 0°C 、 30 min 。

3.3 茎尖在液氮中保存时间长短对存活率的影响

液氮超低温保存是植物种质资源长期保存的理想方法,液氮中保存不同时间对相对存活率没有影响,因为在 -196°C 情况下,生命活动基本停止。本试验又做了验证,经各处理的马铃薯茎尖经液氮保存1 d、7 d和15 d后,各组存活率无明显差异。

[参 考 文 献]

- [1] 肖洁宁,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] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985.
- [3] 刘祖祺,张石城.植物抗性生理学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [4] 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,2001,28(4):301-306.
- [5] 赵艳华,吴永杰,陈霜莹,等.包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖[J].园艺学报,1998,25(1):93-95.
- [6] Bouman H, Tiekstra A, Petutschnig E, et al. Cryopreservation of Liliium species and cultivars[J]. Acta Horticulture, 2003, 612: 147-154.
- [7] Takagi H, Islam O M, Senboku T, et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] by vitrification. I. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16: 594-599.
- [8] 殷晓辉,舒理慧.植物种植资源的超低温保存研究进展[J].热带亚热带植物学报,1996,4(3):75-82.

Cryopreservation of *in vitro* Plants of Potato Germplasm by Vitrification Method

Song Jiling¹, Liu Changchen², Sun Bangsheng¹, Liu Xicai¹, Zhang Lijuan¹, Zhang Wenyong¹, Li Jun¹

(1. National Store of *in vitro* Potato Germplasm, Keshan, Heilongjiang 161606, China;

2. Seed Administrative Station, Qingan, Heilongjiang 151442, China)

Abstract: Shoot tips from *in vitro* plants of the potato cultivar Kexin No.4 were cryopreserved by vitrification method. Orthogonal design was used to analyze the effects of dominant parameters on survival rates of the shoot tips, including sucrose concentration of preculture medium, duration of preculture and duration of exposure to PVS₂. There were no variations in the regenerated plants for morphology and isoenzyme zymogram after cryopreservation. This vitrification method appears promising for cryopreservation of the *in vitro* potato germplasm resources.

Key Words: potato germplasm resources; orthogonal test; cryopreservation