

羽状鸡冠花无菌幼苗的超低温保存研究^①

李秉玲¹, 贾梦雪², 李珂珂¹, 刘燕¹

1. 北京林业大学 园林学院/花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室/
国家花卉工程技术研究中心/城乡生态环境北京实验室, 北京 100083;
2. 北京市花木有限公司, 北京 100061

摘要:以羽状鸡冠花无菌幼苗为材料, 研究建立了其玻璃化超低温保存技术程序. 具体为: 取胚根长 2~3 mm 的无菌幼苗, 25 ℃ 装栽 40 min, 0 ℃ 下 PVS2 脱水 60 min, 更新 PVS2 溶液并迅速投入液氮, 冻存 24 h 以上. 取出玻璃化幼苗, 用 40 ℃ 水浴化冻 60 s, 再用 Unloading 溶液处理 20 min, 然后将幼苗在恢复培养基上暗培养 7 d 后, 转入光照培养(光照强度约 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 14 h/d). 在此条件下, 幼苗再生率可达 60% 以上. 装栽时导入 0.1 mmol/L ASA, 卸载时导入 400 U/mL CAT 可提高无菌幼苗存活率.

关键词: 无菌幼苗; 超低温保存; 玻璃化; 抗氧化剂

中图分类号: Q949.745.2; S681.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)05-0059-07

超低温保存是在液氮(-196 ℃)或液氮蒸汽相(-150~-180 ℃)的超低温条件下保存生物材料, 被保存材料的物质代谢几乎停止, 处于“生机停顿”或“假死”状态. 经超低温保存后, 处于“假死”的植物材料能保持正常的细胞活性、形态发生潜能和遗传稳定性, 理论上可以永久保存种质资源^[1-2].

植物的基因型、繁殖特性、抗性不同, 适宜进行超低温保存的材料类型也有所不同. 目前成功进行超低温保存的材料类型有种子、休眠芽、茎段^[3]、茎尖分生组织、花粉、合子胚、体细胞胚、悬浮细胞、愈伤组织、原生质体及幼苗^[4]. 幼苗代谢活动旺盛, 含水量较高, 对胁迫响应敏感, 所以较难进行超低温保存, 研究报道也很少^[5]. 但是, 幼苗的超低温保存可以很好地揭示超低温保存过程中的代谢活动、胁迫响应和信号转导^[6-8], 对于促进超低温保存的机理研究有重要意义.

羽状鸡冠花(*Celosia plumose* Burv.)为苋科青葙属植物, 适应性强, 常采用种子繁殖, 广泛应用于园林绿化, 作花坛或盆栽栽植, 近年来其切花需求量也连续攀升. 羽状鸡冠花色彩艳丽、品种繁多, 有效保存栽培品种和野生近缘种的种质资源对于鸡冠花品种的国产化至关重要. 本试验以羽状鸡冠花无菌幼苗为材料, 研究超低温保存方法, 以期为其种质资源保存提供技术支持.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为羽状鸡冠花品种‘新视野’(*Celosia plumosa* ‘Fresh Look’). 种子购买于北京林业大学林业科

① 收稿日期: 2017-08-22

基金项目: 教育部博士点基金项目(20120014120009).

作者简介: 李秉玲(1982-), 女, 博士, 讲师, 主要从事园林植物种质资源保存与利用研究.

通信作者: 刘燕, 教授.

技股份有限公司. 种子用自来水冲洗 3~4 次, 滤干后置于超净工作台上, 用 75%酒精消毒 30 s, 2% NaClO 消毒 4 min, 无菌水冲洗 6 次, 吸干表面水分, 播种于 MS 固体培养基中培养. 培养温度(23±2) °C, 空气湿度 60%~80%, 光照强度 40 μmol/(m² · s), 14 h/d. 种子萌发 48~60 h 后, 取胚根长 2~3 mm 的无菌幼苗进行玻璃化超低温保存试验.

1.2 试验方法

无菌幼苗的玻璃化超低温保存参照 Liu 等^[5]和任丽^[8]的方法. 对装载、脱水处理和去装载时间 3 个影响因子设 3 水平, L₉(3⁴)正交设计见表 1. 每个处理 30 株幼苗, 重复 3 次.

表 1 无菌幼苗超低温保存 L₉(3⁴)正交试验设计表头

水 平	因 素		
	装载时间/min	PVS2 处理时间/min	去装载处理时间/min
1	20	20	20
2	40	40	40
3	60	60	60

具体步骤为: ① 装载(Loading 溶液处理): 在超净工作台上, 将幼苗用镊子从 MS 基本培养基上取出, 放入 2 mL 冷冻管中, 加入 2 mL Loading 溶液(MS 液体培养基+2 mol/L 丙三醇+0.4 mol/L 蔗糖, pH=5.7)室温处理 20,40,60 min; ② PVS2 脱水: 将 loading 溶液换成预冷(0 °C)的 PVS2 溶液(MS 液体培养基+30%丙三醇+15%乙二醇+15%二甲基亚砷+0.4 mol/L 蔗糖, pH=5.7)0 °C 下处理 20, 40, 60 min; ③ 冷冻: 吸出冻存管中的 PVS2 溶液, 再加入 PVS2 溶液 0.5 mL, 迅速投入液氮, 保存 24 h; ④ 解冻: 从液氮中取出冷冻管, 在 40 °C 水浴锅中快速解冻 60 s, 并不断晃动. ⑤ 去装载(Unloading 处理): 用 unloading 溶液(PVS3 溶液=1.2 mol/L 蔗糖+MS 液体培养基, pH=5.7)洗涤 20, 40, 60 min, 每 10 min 换一次洗涤液; ⑥ 恢复培养: 用无菌滤纸吸干洗涤液, 将冻存后的幼苗接种到 MS 固体培养基上, 暗培养 7 d 后转入光照培养(条件同种子萌发). 1 周后统计存活率. 幼苗存活以观察到幼苗有明显生长为准.

将浓度为 100, 200, 400 U/mL 的外源抗氧化酶 CAT(过氧化氢酶, Sigma 公司)和浓度为 0.1, 0.2, 0.4 mmol/L 的外源非酶抗氧化剂 ASA(抗坏血酸, 北京欣经科生物技术有限公司)分别导入超低温保存程序中的装载、PVS2 处理和去装载过程, 以不导入抗氧化剂为对照, 统计超低温保存后的存活率, 研究外源抗氧化剂在超低温保存中的作用. 每个处理 30 株幼苗, 重复 3 次.

1.3 指标测定与数据分析

无菌幼苗存活率以氯化三苯基四氮唑(TTC)法测得的存活率和恢复培养 15 d 后的再生率表示. TTC 法: 取去装载后幼苗 15 株, 加入 0.4%TTC : 0.05 mol/L 磷酸缓冲液=1 : 1(V : V)的混合液, 40 °C 水浴避光静置 3 h, 取出, 置于滤纸上, 观察幼苗染色情况. 幼苗主要结构完整并染成有光泽的鲜红色, 为有生活力的幼苗; 幼苗的主要结构缺失、不染色或染成无光泽的淡红色、灰白色或其它异常颜色, 为无生活力幼苗. 每个处理重复 3 次.

$$x = \frac{a_1}{b} \times 100\%$$

$$y = \frac{a_2}{b} \times 100\%$$

式中: x 为存活率; y 为再生率; a_1 为有生活力幼苗数; a_2 为存活幼苗数; b 为冻存幼苗总数.

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据处理, SPSS Statistics 18.0 软件进行方差分析和多重比较(Duncan 新复极差法), 显著水平 $p<0.05$.

2 结果与分析

2.1 羽状鸡冠花无菌幼苗玻璃化超低温保存程序的建立

装载时间、PVS2 处理时间及去装载处理时间对羽状鸡冠花无菌幼苗存活率的影响见表 2.

表 2 结果表明, 羽状鸡冠花无菌幼苗超低温保存存活率最高试验号为 6, 冻存后的 TTC 法检测存活率为 66.67%, 再生率为 57.78%. 极差分析结果表明, 3 个因素对羽状鸡冠花无菌幼苗超低温保存均有较大影响.

方差分析结果(表 3)表明, 鸡冠花无菌幼苗超低温保存受到装载时间、PVS2 溶液处理时间和去装载处理时间 3 个因素的显著影响, 其中装载时间影响最大. 实际恢复生长的再生率结果显示, 去装载处理时间与 PVS2 处理时间对超低温保存后存活率的影响几乎没有差异.

表 2 不同超低温保存程序对羽状鸡冠花无菌幼苗存活率的影响

试验号	因 素			存活率/%	
	装载时间/	PVS2 处理时间/	去装载处理时间/	TTC 法检测	再生
	min	min	min		
1	20	20	20	8.89±1.81	4.45±1.82
2	20	40	40	11.11±1.81	4.45±1.82
3	20	60	60	20±3.14	11.11±1.81
4	40	20	40	35.55±1.82	33.33±3.14
5	40	40	60	40±3.14	28.89±1.81
6	40	60	20	66.67±3.14	57.78±1.82
7	60	20	60	20±3.14	11.11±1.81
8	60	40	20	53.33±3.14	48.89±3.63
9	60	60	40	48.89±3.63	40±3.14
CK	0	0	0	100±0	100±0
TTC 法检测 极差	34.08	23.71	16.29	—	—
再生检测 极差	33.33	20.00	20.00	—	—

表 3 试验各因素对鸡冠花无菌幼苗存活率影响的相关性分析

因 素	自由度	F 值	
		TTC 法	再生
装载时间	2.00	79.950**	75.617**
PVS2 溶液处理时间	2.00	34.617**	24.405**
去装载处理时间	2.00	16.997**	24.408**

注: * 代表具有统计学意义($p<0.05$), ** 代表极具有统计学意义($p<0.01$).

对各因素水平幼苗存活率及再生率均值(图 1)进行比较, 结合上述分析可知, 羽状鸡冠花幼苗玻璃化超低温保存主要因素的最佳水平为: 装载时间为 40 min, PVS2 溶液处理时间为 60 min, 去装载处理时间为 20 min. 本试验中的处理 6 恰为最佳水平组合, 试验结果确实最佳(表 2).

采用本超低温保存程序进行检验, 冻存后幼苗的存活率为 66.67%, 再生率为 62.22%, 与原处理 6 没有显著差异, 表明本超低温保存方法重复性好.

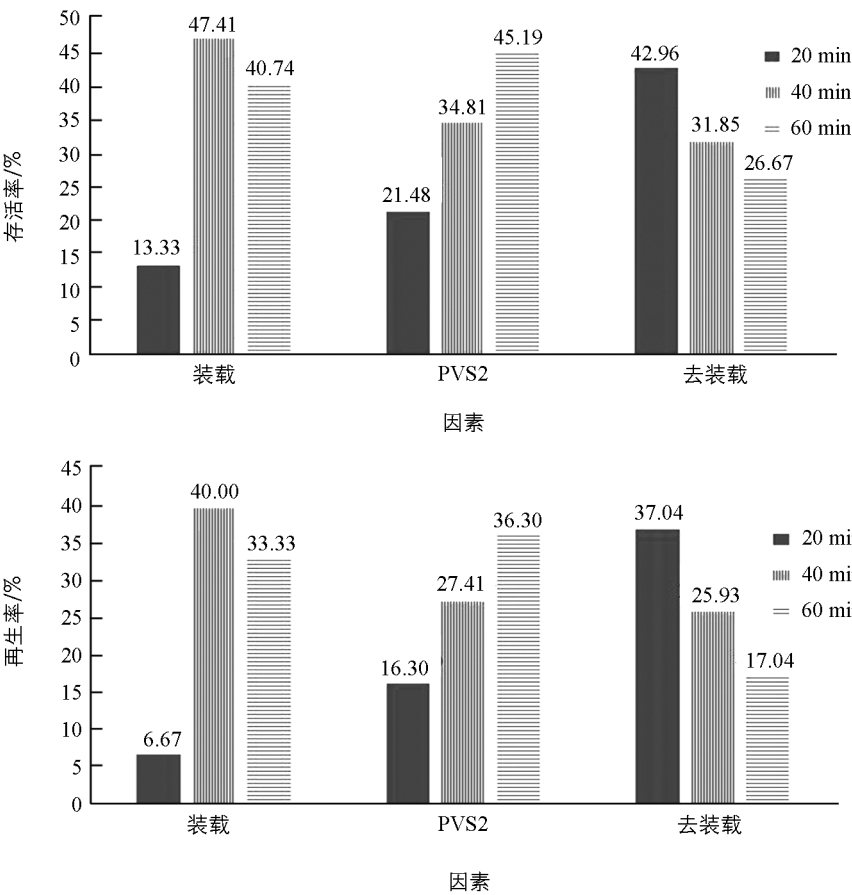
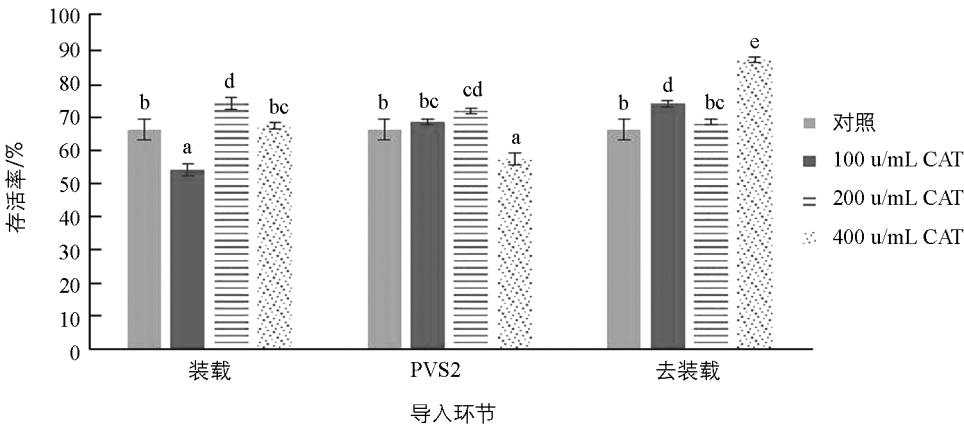


图 1 试验各因素水平对鸡冠花无菌幼苗存活率及再生率的影响

2.2 外源抗氧化剂在超低温保存中对羽状鸡冠花无菌幼苗存活率的影响

2.2.1 外源 CAT 导入对鸡冠花无菌幼苗冻后存活率的影响

外源抗氧化剂 CAT 有助于提高春石斛类原球茎^[9]、百子莲胚性愈伤组织^[10]的超低温保存效果. 本试验导入外源 CAT 后, 无菌幼苗冻后的存活率见图 2.



不同小写字母代表不同处理之间的差异有统计学意义($p < 0.05$). 图 3 同.

图 2 外源 CAT 对羽状鸡冠花无菌幼苗冻后存活率的影响

结果表明, 在超低温保存的 3 个主要环节导入 CAT 普遍可提高无菌幼苗存活率, 但浓度不同效果不

同. 装载和 PVS2 处理环节导入 200 U/mL CAT 效果最佳, 无菌幼苗存活率分别比对照显著提高 7.78% 和 5.55%; 去装载环节导入 400 U/mL CAT 效果最佳, 无菌幼苗存活率高达 87.78%, 比对照提高 21.11%. 以最佳导入条件, 即在“新视野”羽状鸡冠花无菌幼苗超低温保存的去装载环节导入浓度为 400 U/mL 外源 CAT, 对其进行实际恢复生长试验, 冻存后再生率为 $83.33 \pm 1.57\%$.

2.2.2 外源 ASA 导入对羽状鸡冠花无菌幼苗冻后存活率的影响

外源抗氧化剂 ASA 有助于拟南芥无菌幼苗^[8]、春石斛类原球茎^[9]和美洲榆茎尖^[11]的超低温保存. 本试验导入外源 ASA 后, 无菌幼苗的冻后存活率见图 3. 结果表明, 在不同环节导入 ASA 总体上可提高幼苗存活率, 具体效果与导入浓度有关. 在装载环节, 导入 0.1 mmol/L ASA 效果最好, 幼苗存活率比对照显著提高 16.66%; 在 PVS2 处理和去装载环节导入 0.4 mmol/L ASA 效果最好, 使幼苗存活率显著提高的幅度最大.

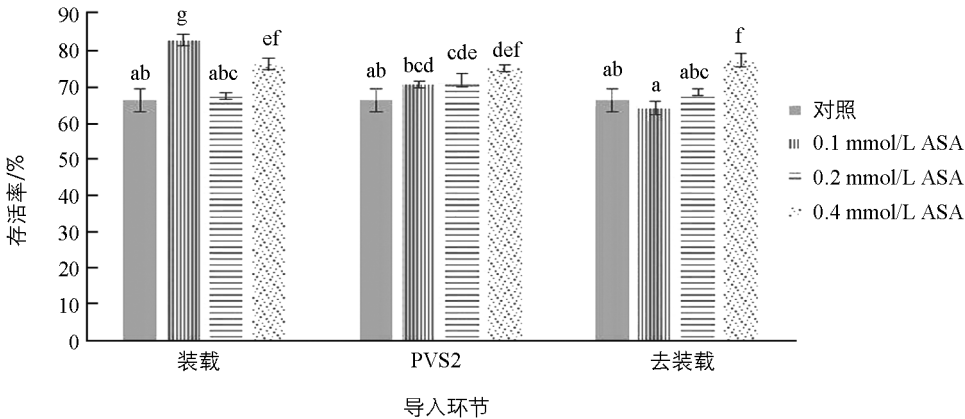


图 3 外源 ASA 对羽状鸡冠花无菌幼苗冻后存活率的影响

3 结论与讨论

试验表明, 羽状鸡冠花无菌幼苗可采用如下程序进行超低温保存: 种子无菌萌发 48~60 h 后, 取胚根长 2~3 mm 的无菌幼苗, 25 ℃ 下用 loading 溶液装载 40 min, 0 ℃ 下用 PVS2 溶液处理 60 min, 更新 PVS2 溶液, 投入液氮, 冻存 24 h 以上; 取出, 40 ℃ 水浴化冻 60 s, 去装载处理 20 min; 再生培养. 在此条件下, 幼苗再生率可达 60% 以上. 装载时导入 0.1 mmol/L ASA, 卸载时导入 400 U/mL CAT 均可提高幼苗存活率.

超低温保存的基本程序为: 材料选择与准备→预处理→降温冷冻→化冻→存活鉴定. 材料对保存效果影响很大. 研究表明, 适宜大小(多为 2~3 mm)的植物材料有利于提高超低温保存后的存活率^[12-13]. 刘燕^[14]发现, 拟南芥种子和萌发 1~2 d 的幼苗均能进行玻璃化法超低温保存, 但萌发 3 d 的幼苗超低温保存后不能成活. 任丽^[8]发现, 拟南芥的苗龄与恢复增长率存在显著负相关, 并确定时间拐点为 58.74 h, 但幼苗的生长可能出现速度的快慢差异. 因此, 本试验根据文献及预实验结果选取萌发 48~60 h、胚根长度在 2~3 mm 的无菌幼苗为材料进行超低温保存, 获得了 62.22% 的再生率.

目前已有近千种植物成功实现了超低温保存, 但仍有部分种质冻后无法成活或存活率较低, 添加一定的外源物质有利于提高超低温保存恢复增长率. 如何从众多可添加的外源物质中筛选出效果较好的, 是保存体系优化的关键点. 在超低温保存众多的损伤学说中, 氧化损伤被证明是影响超低温保存效果的重要原因之一^[15-18]. 超低温保存过程中, ROS 过量产生时, 细胞处于生理应激状态, 自身的抗氧化系统如 SOD、CAT、POD 等酶类以及 ASA、GSH 等非酶类会协同作用抵抗 ROS 可能带来的伤害, 但当细胞抗氧化能力

不足以清除过量 ROS 时,就会阻碍细胞正常的生理进程,导致持久伤害^[19]. 使用外源抗氧化剂以提高超低温保存效果得到了一定的发展和应用^[20]. 酶类抗氧化剂如 CAT^[8-9, 21]、SOD^[20]、谷胱甘肽过氧化物酶^[20]等在动物精子和植物超低温保存中被证明可减少氧化应激的发生,提高材料的冻存存活率. 非酶类抗氧化剂如 PVP^[22]、外源抗坏血酸^[8-9]、谷胱甘肽^[20]、褪黑素、甜菜碱和维生素 E 等均有效提高了多种植物材料冻后存活率和再生率^[20]. 本试验结果也显示,外源抗氧化剂 CAT 和 ASA 可显著提高羽状鸡冠花无菌幼苗冻后的存活率,这与狄玮^[9]、Uchendu 等^[23]的研究结果相似. 在本试验中,超低温保存过程中幼苗细胞内 ROS 及其清除系统的相互作用值得进一步研究.

参考文献:

- [1] REED B M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide [M]. New York: Springer, 2008.
- [2] OZUDOGRU E A, PREVIATI A, LAMBARDI M. In Vitro Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants [J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 589: 303—324.
- [3] 蔡月琴,王艳平,庄君娥,等. 紫参薯的包埋玻璃化超低温保存 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(9): 58—64.
- [4] 陈晓玲,张金梅,辛霞,等. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 414—427.
- [5] 刘燕,高荣孚,周晓阳. 玻璃化超低温保存中拟南芥幼苗细胞膜 ATPase 的变化 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(5): 1—3.
- [6] 徐艳. 观赏蕨类植物种质超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [7] 何艳霞. 拟南芥幼苗的超低温保存及其遗传变异研究 [D]. 郑州: 河南大学, 2007.
- [8] 任丽. 拟南芥幼苗对玻璃化法超低温保存的逆境响应机制 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [9] 狄玮,贾梦雪,刘燕. 外源抗氧化剂对春石斛类原球茎超低温保存的影响 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(11): 1880—1886.
- [10] 陈冠群. 基于拟南芥抗氧化机制优化百子莲胚性愈伤组织超低温保存体系 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [11] UCHENDU E E, SHUKLA M R, REED B M, et al. Melatonin Enhances the Recovery of Cryopreserved Shoot Tips of American Elm (*Ulmus americana* L.) [J]. J Pineal Res, 2013, 55(4): 435—442.
- [12] 刘佩佩. 大花蕙兰‘幻影’组培再生体系建立及离体保存技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [13] 王贞. 扶芳藤茎尖玻璃化超低温保存及其效果评价 [D]. 北京: 北京林业大学, 2007.
- [14] 刘燕. 拟南芥幼苗玻璃化超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2000.
- [15] TATONE C, DI EMIDIO G, VENTO M, et al. Cryopreservation and Oxidative Stress in Reproductive Cells [J]. Gynecol Endocrinol, 2010, 26(8): 563—567.
- [16] CHEN G Q, REN L, ZHANG J, et al. Cryopreservation Affects ROS-Induced Oxidative Stress and Antioxidant Response in Arabidopsis Seedlings [J]. Cryobiology, 2015, 70(1): 38—47.
- [17] 张洁. ROS 诱导的氧化胁迫与细胞凋亡对百子莲愈伤组织超低温保存细胞活性的影响机制 [D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [18] 石印,贾梦雪,狄玮,等. 芍药花粉超低温保存前后氧自由基变化研究 [J]. 西北林学院学报, 2015, 30(5): 86—90.
- [19] 徐瑾,刘芊,李秉玲,等. 超低温保存中的氧化应激和细胞凋亡 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(4): 543—548.
- [20] REED B M. 4. Are Antioxidants a Magic Bullet for Reducing Oxidative Stress During Cryopreservation [J]. Cryobiology, 2012, 65(3): 340—340.

[21] KOBORI Y, KATHRINS M, NIEDERBERGER C, et al. Supplementation of Cryobuffer with Catalase and N-Acetyl Cysteine Improves Human Sperm Post-Thaw Motility, Viability and DNA Integrity [J]. Fertility and Sterility, 2015, 104(3): e289.

[22] UCHENDU E E, MUMINOVA M, GUPTA S, et al. Antioxidant and Anti-Stress Compounds Improve Regrowth of Cryopreserved Rubus, Shoot Tips [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2010, 46(4): 386—393.

[23] UCHENDU E E, LEONARD S W, TRABER M G, et al. Vitamins C and E Improve Regrowth and Reduce Lipid Peroxidation of Blackberry Shoot Tips Following Cryopreservation [J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(1): 25—35.

Cryopreservation of *Celosia plumosa* ‘Fresh Look’ Aseptic Seedlings by Vitrification

LI Bing-ling¹, JIA Meng-xue², LI Ke-ke¹, LIU Yan¹

1. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University/Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation and Molecular Breeding/National Engineering Research Center for Floriculture/Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing 100083, China;
2. Beijing Florascape Co. Ltd., Beijing 100061, China

Abstract: A procedure has been developed for vitrification cryopreservation of plumed cockscomb (*Celosia plumosa* ‘Fresh Look’) aseptic seedlings. First, aseptic seedlings with a radicle 2—3 mm in length were loaded at 25 °C for 40 min and then dehydrated in a vitrification solution (PVS2) at 0 °C for 60 min. Next, the PVS2 solution was replaced by a fresh PVS2 solution and the seedlings were directly immersed into LN2 and frozen for more than 24 hours. Then the vitrified seedlings were taken out and thawed in a water bath at 40 °C for 60 s, and washed twice (10 min each time) with an unloading solution. Finally, the vitrified seedlings were recultured on MS medium in darkness for 7 days prior to exposure to the light. Under the above conditions, the regeneration rate was as high as 60% or more. Addition of 0.1 mmol/L ASA in the loading solution or 400 U/mL CAT in the unloading solution helped to increase the regeneration rates of the aseptic seedlings.

Key words: aseptic seedling; cryopreservation; vitrification; antioxidant

责任编辑 欧 宾

