

梯度蔗糖诱导黄皮胚轴脱水耐性后超低温保存^{*}

黄雪梅¹, 傅家瑞², 宋松泉³

(1. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 51064 3;

2. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275;

3. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明)

摘 要: 梯度蔗糖预培养能增强黄皮胚轴的脱水耐性, 使胚轴含水量下降至 17.6% 仍保持活力, 在含 NAA 和 IAA 的 WPM 培养基上可诱导植株再生。黄皮胚轴脱水至 18% 后分别采用直接冻存法、抗冻剂冻存法、微滴冻法和玻璃化法超低温保存都不能复活。玻璃化冻存后的胚芽超微结构基本完整, 若能继续优化冻存和培养条件, 有望获得存活的胚芽及其再生植株。

关键词: 黄皮胚轴; 梯度蔗糖; 脱水耐性诱导; 超低温保存

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) S2-0231-05

顽拗性种子对脱水敏感, 贮藏时忌干燥和低温, 寿命极短。超低温 (LN_2) 保存被认为是长期保存顽拗性种质资源的最有希望的手段^[1], 人们一直对此寄予很大期望并对南洋杉、橡胶、龙眼、可可、茶、椰子和黄皮等顽拗性种子的超低温保存做了不懈的研究工作^[2-9], 但结果表明多数顽拗性种子未能成功保存, 主要原因是这些种子或胚轴经过超低温保存后受到低温伤害, 即使能存活其存活率也不高, 而且难于形成正常幼苗。

顽拗性种子在超低温保存中受到伤害的重要原因是含水量过高, 即使有冰冻保护剂存在, 也难以避免降温过程中的结冰和溶质伤害以及复温过程中的再结冰伤害。假若冻存材料投入液氮之前能提高脱水耐性和降低含水量, 则有可能避免或减少超低温伤害, 有利于细胞复活和生长。黄皮种子是典型的顽拗性种子, 本文以其胚轴为材料, 探讨脱水耐性诱导以及脱水后超低温保存的可能性, 为顽拗性种子种质资源保存提供参考。

1 材料与方法

供试材料为“鸡心”黄皮 (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels cv. Jixin), 发育期为花后座果 87 d。鲜果种子取出后立即清洗, 用 $w=6\%$ 百菌清拌种, 摊开晾干种子表面, 装入保鲜袋, $15\text{ }^\circ\text{C}$ 贮藏备用。

1.1 胚轴脱水耐性诱导

胚轴预培养: 参照黄雪梅等^[7] 的方法剥取胚

轴。胚轴在 WPM 培养基上培养 3 周, 露出绿色的胚芽。培养温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 光照强度 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

脱水耐性的诱导: 将预培养胚轴依次转移到含 $w=27\%$ 蔗糖的 WPM 上培养 5~8 d, 含 $w=55\%$ 蔗糖的 WPM 上培养 5 d, 含 w 为 60%、65% 蔗糖的 WPM 上培养 2 d, 取各阶段胚轴置硅胶干燥器中脱水 12 h, 测定含水量和成苗率。

含水量测定: $105\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干胚轴, 以鲜质量为基础计算含水量。

胚轴成苗情况测定: 将胚轴置 WPM 上培养 3 周至 1 个月, 统计各类成苗率。根和芽都生长正常者称为“全苗”; 胚芽生长正常而根干枯者称“枯根苗”。

诱导生根培养: 取枯根苗的芽切段接种于 $1/2\text{WPM}+6\text{-BA}$ ($0\sim2.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAA ($0\sim53.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + IBA ($0\sim49.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养基中培养, 统计生根率。

1.2 胚轴超低温保存

将经过脱水耐性诱导并脱水至含水量 18% 的胚轴作为超低温保存的材料。

直接冻存: 将胚芽或下胚轴置于 2 mL 冻存管内或用铝箔纸包装, 直接投入液氮, 24 h 后取出, $37\sim38\text{ }^\circ\text{C}$ 解冻。

分步降温: 胚芽或下胚轴加入各种抗冻剂 ($\varphi=10\%$ 二甲基亚砜、 $\varphi=10\%$ 二甲基亚砜 + $\varphi=10\%$ 甘油、 $\varphi=10\%$ 二甲基亚砜 + $w=10\%$ 蔗糖、

* 收稿日期: 2003-08-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (980360)

作者简介: 黄雪梅 (1969 年生), 女, 博士, 副研究员; 通讯联系人: 傅家瑞; E-mail: lssfir@zsu.edu.cn

$\varphi=10\%$ 二甲基亚砜 + $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨酸、 $\varphi=10\%$ 二甲基亚砜 + $w=8\%$ 葡萄糖、 $\varphi=10\%$ 二甲基亚砜 + $\varphi=10\%$ 甘油 + $w=8\%$ 葡萄糖) 后在室温平衡 20 min, 一半直接投入液氮, 另一半置 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中停留 60 min 中后投入液氮, 24 h 后取出, $37\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻, 用 $w=20\%$ 蔗糖洗涤。

微滴冻法: 将铝箔纸剪成 $5\text{ cm}\times 8\text{ cm}$ 大小滴加上述抗冻剂到铝箔纸上, 每滴 $2\sim 3\text{ }\mu\text{L}$, 间距约 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$, 然后将单枚胚芽或下胚轴轻轻移至单个微滴上, 由于水溶液的表面张力, 胚芽在垂直的铝箔纸上不会滑落, 室温平衡 20 min 后, 将整张铝箔纸投入液氮, 24 h 后取出, $37\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻, 用 $w=20\%$ 蔗糖洗涤胚芽。

玻璃化保存: 将胚芽或胚轴置 2 mL 容积的冻存管中, 加 1 mL $\varphi=60\%$ 的各种玻璃化液 (VS) (组成: $\varphi=30\%$ 二甲基亚砜 + $\varphi=15\%$ 乙二醇 + $\varphi=30\%$ 甘油、 $\varphi=35\%$ 二甲基亚砜 + $w=15\%$ 甘露醇 + $w=6\%$ 白蛋白、 $\varphi=50\%$ 二甲基亚砜 + $w=10\%$ 甘露醇 + $w=6\%$ 白蛋白、 $\varphi=50\%$ 乙二醇 + $w=15\%$ 甘露醇 + $w=6\%$ 白蛋白、 $\varphi=40\%$ 乙二醇 + $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $\varphi=20\%$ 二甲基亚砜 + $w=8\%$ PEG + $w=15\%$ 乙酰胺、 $\varphi=36\%$ 乙二醇 + $w=39\%$ 蔗糖、 $\varphi=15\%$ 二甲基亚砜 + $\varphi=15\%$ 乙二醇 + $\varphi=30\%$ 甘油、 $\varphi=10\%$ 二甲基亚砜 + $w=30\%$ 甘油 + $w=10\%$ 蔗糖), 室温下平衡 20 min, 移去平衡液, 加入 $\varphi=100\%$ 的 VS 在冰浴中放置 10 min, 直接投入液氮。24 h 后将胚芽或胚轴取出, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻, 吸去 VS 液, 加 1 mL 洗涤液 ($1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖) 洗涤, 30 min 换一次洗涤液, 共 3 次。

以上冻存处理均重复 3 次, 每次 20 枚胚芽或下胚轴。

超低温保存后胚芽活力测定: 冻存后胚芽接种于 WPM 中, 一周后统计存活率和生长情况。细胞超微结构观察: 将冻存后的胚芽和下胚轴切成约 1 mm 大小, 立即放入预冷的固定液 ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH7.2 磷酸缓冲液、 $\varphi=4\%$ 戊二醛) 中抽真空 20 min 固定, 其余步骤按张景强等^[8] 的方法。

2 结 果

2.1 梯度蔗糖对黄皮胚轴脱水敏感性的影响

新鲜胚轴经 $w=27\%$ 蔗糖培养和脱水至 31.3% 含水量后, 下胚轴部分 100% 存活, 胚芽部分全部死亡, 完全失去成苗能力^[7]; 预培养 3 周的胚轴经 $w=27\%$ 蔗糖培养和脱水至 20.9% 后, 53.3% 的胚轴可存活, 28.2% 胚轴能长成的枯根苗 (表 1), 表明预培养胚轴对脱水和蔗糖处理的忍受能力提高。

在本实验中胚轴先经过预培养 3 周后再进行脱水耐性诱导和超低温保存。

表 1 $w=27\%$ 蔗糖对黄皮胚轴脱水敏感性的影响
Tab 1 Effect of $w=27\%$ sucrose on desiccation-sensitivity of wampee axes

干燥时间 h	含水量 %	存活率 %	全苗率 %	枯根苗率 %
0	69.4	100	100	0
12	46.6	100	100	0
15	35.7	95.0	0	95.0
19	29.7	96.6	0	76.7
22	25.6	93.3	0	53.6
26	20.9	53.3	0	28.2

$w=27\%\sim 60\%$ 梯度蔗糖培养都可有效地诱导黄皮胚轴的脱水耐性。将各阶段梯度蔗糖培养的胚轴置硅胶中干燥脱水, 得到系列含水量及活力的胚轴 (表 2)。继续经 $w=55\%$ 和 $w=60\%$ 高浓度蔗糖培养和硅胶脱水的胚轴, 含水量分别下降至 25.3% 和 17.6%, 枯根苗率分别 64.3% 和 57.1%, 其诱导脱水耐性的效果明显优于 $w=27\%$ 蔗糖。胚轴继续在高于 65% 的蔗糖中培养后进行硅胶脱水, 培养后无一存活, 表明其脱水耐性丧失。

表 2 梯度蔗糖对黄皮胚轴脱水敏感性的影响
Tab 2 Effect of gradient sucrose on desiccation-sensitivity of wampee axes

最终蔗糖 质量分数/%	硅胶干燥时间 h	含水量 %	全苗率 %	枯根苗率 %
27	26	20.9	0	28.2
55	12	25.2	0	64.3
60	12	17.6	0	57.1
65	12	16.8	0	0

2.2 胚轴经诱导脱水耐性后的植株再生

黄皮胚轴经过脱水耐性诱导和脱水后, 相当一部分只能长成枯根苗, 需要将其诱导生根成为完整的植株。

枯根苗芽切段在诱导培养基中的生根情况见表 3。6-BA ($2.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可诱导丛生芽或不定芽, 但不利于不定根的形成。采用含 NAA ($2.7\sim 53.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 IBA ($2.5\sim 49.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 WPM, 一个月后就诱导长出不定根, 其中以 $53.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $49.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 的出根率最大, 达 68.7% (图 1 (a))。3 个月后, 长出不定根的胚芽再生为植株 (图 1 (b))。

表 3 枯根苗芽切段的再生根情况

Tab 3 Regeneration of adventitious root from shoot sections of withered root plantlets

NAA ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定根 再生率/%	不定芽或丛 生芽再生率/%
0.5	0	2.2	0	71.1
2.7	0	2.2	0	66.7
10.7	0	2.2	0	61.7
0	0	2.2	0	58.3
2.7	2.5	0	16.7	0
10.7	9.8	0	53.8	0
53.7	49.2	0	68.7	0

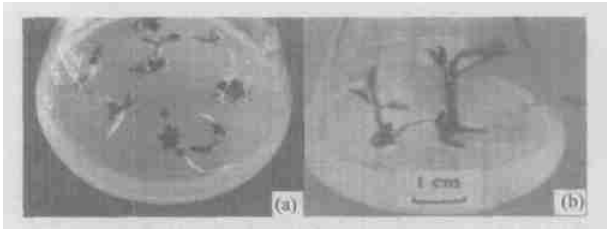


图 1 脱水至含水量 18% 的

黄皮胚轴芽切段诱导不定根 (a) 及植株再生 (b)

Fig 1 Induction of adventitious roots (a) and regeneration of plantlets (b) of plumule sections from wampee axes which were desiccated to 18% moisture content

2.3 黄皮胚轴脱水耐性提高后超低温保存

本实验结果表明，经过诱导和脱水处理的胚轴（胚芽或下胚轴），无论采用直接冻存、抗冻剂保护、微滴法，还是用玻璃化法进行超低温处理，复温后一周内保持绿色，但在 WPM 培养中逐渐变为褐色，最后所有胚芽和下胚轴全部死亡。

取玻璃化液（ $\varphi=15\%$ 二甲基亚砜 + $\varphi=15\%$ 乙二醇 + $\varphi=30\%$ 甘油）冻存的胚芽和下胚轴做切片，发现胚芽细胞基本保持完整，细胞质浓缩，发生明显的质壁分离，叶绿体中的基粒和淀粉粒结构清楚，其它亚细胞结构边界也较明显，只是细胞膜局部有破损，见图 2（a），（b）；而下胚轴细胞严重受伤，除了个别叶绿体的结构还可辨别外，其它亚细胞结构几乎全部消失，见图 2（c），（d）。

3 讨论

许多证据表明，正常性种子发育和成熟过程中积累大量的非还原性糖与脱水耐性的形成有关^[9]，但顽拗性海榄雌种子在发育过程中也能积累非还原性糖如蔗糖和其他寡糖^[10,11]，因此对于非还原性糖与脱水耐性的关系还需进一步证明。蔗糖预培养被证明可提高油棕（*Elaeis guineensis* Jacq.）体胚、木波罗和 *Trichilia dregeana* 种子胚轴，以及用海藻酸

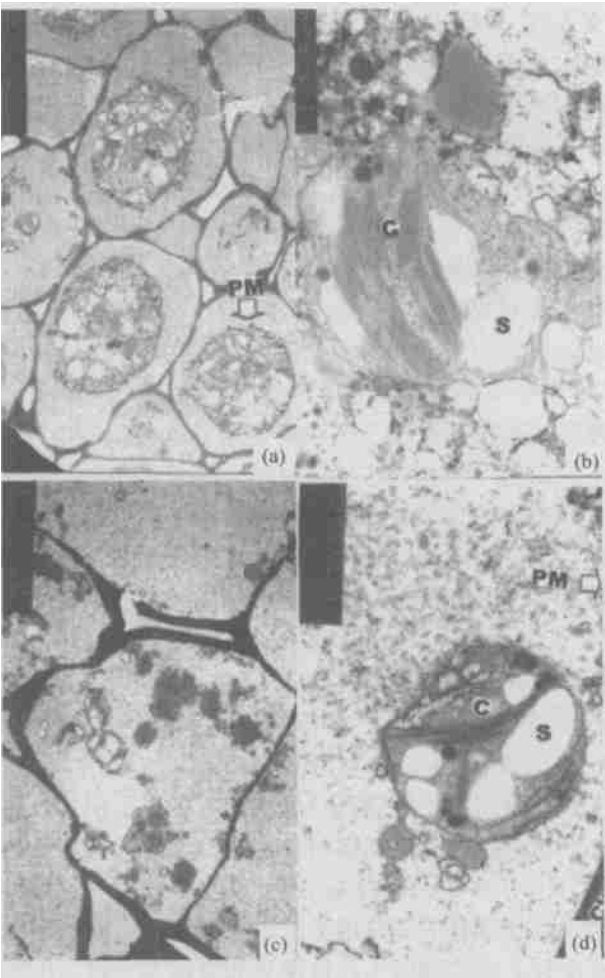


图 2 含水量为 18% 的黄皮胚轴玻璃化超低温保存后的超微结构

Fig 2 Ultrastructures of wampee axes which were desiccated to 18% moisture content and cryopreserved by vitrification cryopreservation

(a) 胚芽细胞，×2000；(b) 胚芽细胞，×1400；
(c) 下胚轴细胞，×1400；(d) 下胚轴细胞，×20000

钠包被的橡胶合子胚的脱水耐性^[12-14]。陆旺金和傅家瑞^[6]用梯度蔗糖预培养诱导黄皮胚轴的脱水耐性，降低其致死含水量。

本实验采用 $w=55\% \sim 60\%$ 高浓度蔗糖成功地诱导提高黄皮胚轴的脱水耐性，使胚轴含水量降低至 17.6% 仍可保持成苗或再生植株的能力。这些事实表明，蔗糖参与了脱水耐性的形成机制。

黄皮胚轴的存活和成苗是两个不同的概念，胚轴成苗的先决条件是胚芽存活。胚芽可以诱导植株再生，本实验成功地利用存活胚芽诱导不定根和植株再生。前人的实验采用存活或者活力指数（存活率×生长量）作为指标^[6]，只考虑下胚轴的伸长，没有注重胚芽是否存活。本实验诱导黄皮胚轴脱水耐性和超低温保存的最终目的是胚轴长成幼苗，所以重点是提高胚芽的脱水耐性，保护胚芽存活。本

文发现, 新剥取胚轴的胚芽极其不耐受蔗糖和干燥脱水, 而预培养 3 周胚轴的胚芽则可被蔗糖诱导提高脱水耐性, 大大提高了胚轴的成苗率。

胚轴的脱水耐性随着蔗糖浓度的增加而增强。 $w=27\%$ 的蔗糖可明显地诱导发芽胚轴的脱水耐性, w 为 $55\% \sim 60\%$ 高浓度蔗糖的诱导效果更好, 分别使含水量下至 25.2% 和 17.6% 时仍保持 64% 和 57% 的成苗率。Yap 等^[14] 的实验结果也表明, 若以活力 (Viability) 为指标, $0.7 \sim 0.9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $w=25\% \sim 33\%$) 的蔗糖浓度对提高用海藻酸钠包被的橡胶合子胚的脱水耐性效果较 $0.3 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $w=11\% \sim 18\%$) 好。

蔗糖诱导黄皮胚轴的脱水耐性提高为超低温保存提供了重要的基础, 蔗糖预培养能提高一些顽拗性种子胚轴的脱水耐性并提高超低温存活率。油棕体胚经过蔗糖预培养后进行脱水和超低温保存, 存活率高达 57% ^[13]; 橡胶包被胚经 $0.3 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖预培养后脱水耐性提高, 脱水至 $16\% \sim 18\%$ 后超低温保存, 有 $43.3\% \sim 60.0\%$ 的存活率^[14]。本实验将脱水耐性提高且脱水的胚轴, 采用加入抗冻剂法、微滴冻法和玻璃化法进行超低温保存, 取出后仍不能存活。值得注意的是, 尽管不能存活, 经玻璃化冻存的胚芽细胞基本保持完整, 说明超低温保存之前进行脱水耐性诱导和降低含水量, 可有效地减少黄皮胚轴在超低温中的结冰和溶质伤害。通过对黄皮胚轴脱水耐性诱导研究, 获得了黄皮种质保存的有利材料即胚芽, 它个体小, 玻璃化溶液渗透容易和降温和解冻速率快, 具有较高的脱水耐性和成苗能力。黄皮胚芽未能在复温后存活可能有以下原因: ①冻存材料的特殊性, 诱导后的黄皮胚轴虽具有一定的脱水耐性, 但不耐低温。萌发 $0 \sim 2 \text{ d}$ 的拟南芥幼苗可通过玻璃化法超低温保存, 但萌发超过 2 d 的拟南芥幼苗不论采取何种玻璃化方法进行超低温保存都不能存活^[15]; ②本实验只是对黄皮胚轴的超低温保存作探索性研究, 尚未找到最佳的冻存条件, James Wesley Smith 等 (2001) 研究发现, 冻存降温速度会影响欧洲七叶树种子胚轴的存活^[16]; ③对复苏培养基的研究不足。从超低温保存后的胚芽亚细胞结构完好情况看来, 如果能继续优化冻存步骤和培养条件, 有希望获得存活的胚芽及其再生植株。

参考文献:

[1] ROBERTS E H, KING M N, ELIS R H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage // HOLDEN J A, WILLIAMS J T. Crop genetic resources: conservation and evaluation [M].

London: George Allen & Unwin.
[2] PENCE V C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao* [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10, 144—147.
[3] FU J R, HUANG S Z, YANG X Q, et al. physiological studies on desiccation, wet storage, cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species and their excised embryonic axes [J]. Seed Science & Technology, 1990, 18, 747—754.
[4] CHAUDHURY R, RADHAMANI J CHANDEL K P S. Preliminary observations on the cryopreservation of desiccation embryonic axes of tea(*Camellia sinensis* L. Kuntze) seeds for genetic conservation [J]. Cryo-Letters, 1991, 12, 31—36.
[5] ENGELMANN F. Cryopreservation of embryos // DATTEE Y, DUMAS C, GALLAIS Y. Reproductive biology and plant breeding [M]. Berlin: Springer Verlag, 1992: 281—290.
[6] 陆旺金, 傅家瑞. 黄皮表轴耐脱水性的诱导 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36(4): 118—120.
[7] 黄雪梅, 傅家瑞, 宋松泉. 黄皮胚轴脱水敏感性与成苗 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(5): 87—90.
[8] 张景强, 朴英杰, 蔡福筹, 等. 生物电子显微技术 [M]. 第 2 版. 广州: 中山大学出版社, 1993: 1—28.
[9] 黄雪梅, 傅家瑞, 宋松泉. 种子脱水敏感性的成因及人工诱导 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 5: 464—469.
[10] LEOPOLD A C, VERTUCCI C W. Physical attributes of desiccated seeds // LEOPOLD A C. Membranes, the role of membranes, metabolism and dry organisms [M]. New York: Cornell University Press, 1986: 22—34.
[11] FARRANT J M, PAMMENTER N W, BERJAK P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types [J]. Seed Science Research, 1993, 3: 1—13.
[12] DUMET D, ENGELMANN F, CHABRILLANGE N, et al. Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures [J]. Seed Science Research, 1994, 4: 307—313.
[13] DUMET and BERJAK P. Desiccation tolerance and cryopreservation of embryonic of recalcitrant species // ELLIS R H, BLACK M, MURDOCH A J, et al. Basic and applied aspects of seed biology [M]. Kluwer Academic Publishers, 1997: 771—776.
[14] YAP L V, HOR Y L, NORMAH M N. Effects of sucrose preculture and subsequent desiccation on cryopreservation of alginate-encapsulated *Hevea brasiliensis* embryo // MARZALINA M. IUFRO Seed Symposium 1998 “Recalcitrant Seeds”, Proceedings of the Conference, 1998: 140—145.
[15] 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.
[16] JAMES W S, CHRISTINA W, PAMMENTER N W, et al.

Interactions among water content, rapid (nonequilibrium) cooling to $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, and survival of embryonic axes of *Aesculus hippocastanum* L. seeds [J]. Cryobiology, 2001, 42: 196–206.

Cryopreservation of Wampee (*Clausena lansium*) Axes after Induction of Desiccation tolerance by Gradient Sucrose

HUANG Xue mei¹, FU Jia rui², SONG Song quan³

- (1.College of Horticulure, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
3. Xishangbanna Tropical Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: Pretreatment with gradient sucrose significantly enhanced desiccation tolerance of wampee axes which could survival under the moisture of 17. 6%. Plantlets could be regenerated from the dried axes on woody plant medium contented homones of α naphthaleneacetic acid and indole 3 butyric acid. These axes with moisture content of 18% could not survival liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) even if by using cryoprotectants, droplet freezing and vitrification. However, substructure of plumule were almost intact during cryopreservation of the axes by vitrificating. The present technique of cryopreservation and reculture should by improved for the successful cryopreservation of wampee axes.

Key words: wampee axes; gradient sucrose; induction of desiccation tolerance; cryopreservation