

422931

环境因子与试管苗的保存

兰芹英 何惠英

(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

摘要 本文就不同环境因子对种质资源试管苗保存的影响作了一些讨论。对试管苗而言,环境因子分为外环境因子和内环境因子。外环境因子包括温度、湿度、光照强度和空气洁净度,内环境因子主要指培养基质、生长抑制剂等。一般情况下,热带植物适宜的保存T是15~20℃,温带植物为0~12℃,光照为500—1000lux,时间为8h,RH控制在50—60%,库内空气要保持清洁。培养基质一般用MS培养基,3%的蔗糖,生长抑制剂用ABA、ccc、KT、B₉、PP₃₃₃、MH、甘露醇、甲基丁二酸等。

关键词 环境因子;试管苗;保存

由于人口的迅速增长,人类经济活动的不断加剧,人们赖以生存的环境越来越受到威胁,很多物种资源面临消失的危机。所以妥善保存种质资源是为人类提供原始材料的重要措施。种质资源保存(germplasm resource conservation)从大方面可分为就地保存(in situ conservation)和异地保存(es situ conservation)。异地保存的主要形式有:1. 植物园、种质圃;2. 种质基因库;3. 试管保存(或叫试管苗基因库);4. 超低温保存(-196℃)。目前研究试管保存的材料主要是一些不用种子繁殖的作物如:木薯、马铃薯和一些在失水、低温条件下不能成活的顽拗型种子植物、花粉和愈伤组织等。研究较多和比较成功的是试管保存作物品种。1996年国际热带农业研究中心(CEAT)建立了木薯试管苗保存库,收集了3500份木薯,已有50%以上材料贮藏在生长缓慢的试管苗基因库中。试管保存具备以下优点:

- (1) 材株较小,发育缓慢,占空间小;
- (2) 小植株容易繁殖,需要时可以在一个较短的时间内提供大量的苗子,供田间种植或供国际国内种质资源交换;
- (3) 它们很容易避开病毒、真菌、细菌,以及虫害寄生的威胁,这种不带病虫的健康植株有利于妥善保存种质和种质资源交换。

一、外环境因子对试管保存的影响

1. 温度

在常温下培养的试管苗,在一定范围内,植株的生长量随温度的长高而增加,如香荚兰,光照为400lux时,生长量为30℃ > 28℃ > 26℃。所以低温可以减缓植株的生长速度。很多研究表明,在一定的温度范围内试管苗保存成活率随保存温度的降低而提高,国际马铃薯中心用于保存种质试管苗的培养基为MS,加4%的甘露醇和3%的蔗糖,将培养在

这同一培养基上的试管分别置于 25℃ 和 8℃ 下保存, 25℃ 下的试管苗可以保存 1 年, 而 8℃ 下的试管苗可保存 2—3 年, 这说明降低 T 是保存种质资源的重要因素, 同时, 也可防止病原菌的滋生, 减少贮存材料污染。

2. 湿度(RH)

保存种质试管苗一般 RH 控制在 50—60% 范围内, 空气湿度超过 65% 时, 散布在空气中的真菌孢子都要萌发, 细菌易滋生。西双版纳地处热带地区, 气候特点是高温、高湿, 尤其是雨季时间较长, 温度较高。实验室内夏季每月灭菌次数比冬季多 1—1.5 倍, 可污染率却比冬季高 1 倍多。

3. 光照强度

植物的生长离不开光照, 在保存种质试管苗的培养中, 适当减弱光照强度、缩短光照时间也能减缓试管苗的生长。但光照过弱不利于试管苗的中、长期保存, 如马铃薯保存在 100—200lux 的光照强度下, 植株生长纤细、苗弱, 到后期不能维持自身生长, 存活率显著低于 500—1000lux 光照强度下的存活率。

4. 空气洁净度

空气洁净度主要是指无性繁殖库内空气中病原菌的含量。常温下, 常采用的消毒方法是: 薰蒸消毒和紫外灯消毒相结合。薰蒸剂是 KMnO_4 少量加 HCHO。对于试管保存而言, 空气的洁净度是保存工作中较基础而关键的因素。

5. 管口封装

管口的封装对保存种质存活率的高低和存活期的长短有很大影响, 是防止污染、保持培养基湿度的重要关口。常温下, 用橡皮塞和塑料纸相比, 前者的污染率小于后者。若瓶口封装不好, 将导致严重污染, 培养基水分蒸发, 试管苗难以维持生长而死亡, 影响其保存效果。现在认为较好的封口材料是 0.01mm 厚度的二层铝箔。

二、内环境因子对试管保存的影响

1. 培养基质

用于保存材料的培养基质主要是改变了的基本培养基, 即低于或高于正常的效性营养性质, 不加入或减少一般正常生长所必需的某一成分。目前保存成功的材料, 培养基质用得较多是基本培养基(MS), 有少量是 1/2MS。糖主要是 3% 的蔗糖。培养基有固体和液体两种, 一般用固体。在常温下我们用相同的成分, 分固体培养和液体培养, 保存兰花品种(石斛)。培养在液体培养基的保存 3—4 个月后将开始发黄, 5—6 个月后全部死去, 但在固体培养基中培养的无此现象。

2. 生长抑制剂

为了降低保存材料的生长量, 使其达到最小量的生长, 另一措施是在培养基中加入生长抑制剂, 生长抑制剂有 ABA、ccc、KT、麟甘酸甘露醇、甲基丁酸、青鲜素、 B_9 、PP₃₃₃、山梨醇、MH、福斯方 D 等。在选用生长抑制时, 首先要考虑的因素是选择哪些对保存材料遗传稳定性无影响, 在保存过程中不因该种抑制剂的使用而引起遗传变化的试剂。不同的抑制

剂对不同的材料产生的效果不同。如甘露醇、青鲜素、 B_9 和甲基丁二酸都没有影响马铃薯的遗传稳定性。江苏徐州甘薯研究室和 K. M. M. Templetonsomers 以及 W. W. Collins (1986) 用甘露醇 1—1.5% 对于甘薯种质保存都比较理想。中国水稻研究所用 PP₃₃₃ 在水稻试管保存中取得了较好效果。广州师范学院生物系通过试验得出 PP₃₃₃ 能延缓香蕉试管苗的生长速度。我园在 1987—1988 年曾将千年健茎段培养在常温、无糖、无生长抑制剂的分化培养基上, 半年未分化, 当要启用它时, 再转入正常培养基, 仍有分生能力。这种方法为试管保存提供了另一途径。

3. 抗氧化剂

在微繁殖中, 经常会遇到一些材料, 在培养中发生褐变。主要原因是由于组织中多酚氧化酶被激活, 使细胞中的代谢发生变化, 酚类物质被氧化后产生醌类物质, 这类物质是棕褐色, 它们会逐渐扩散到培养基中, 抑制其它酶的活性, 毒害整个外植体组织。在发生褐变的材料中, 不同植物发生褐变的程度不同, 如龙脑香科的望天树, 发生褐变较严重(种子); 兰科植物中的蝴蝶兰比其它品种发生褐变重一些。象卡特兰、假万带兰和鹅距兰的杂交种发生褐变轻一些, 短期内不会毒害整个外植体。采取的措施有:

- (1) 用液体培养基比固体培养基好;
- (2) 将培养的材料置于黑暗中;
- (3) 经常更换培养基;
- (4) 在培养基中加入抗氧化剂, 或用抗氧化剂进行材料的预处理或预培养。抗氧化剂包括抗坏血酸、活性碳等。

在试管保存过程中, 除了选择好合适的保存条件外, 库房的管理也是一个重要的方面。主要应注意以下方面的工作:

- (1) 库内的清洁;
- (2) 温、湿度的控制;
- (3) 防止贮存种质的老化;
- (4) 种质存放位置;
- (5) 定期检查, 每月至少 1 次, 发现污染的及时清除;
- (6) 应用电子计算机管理信息资料。

参考文献

- [1] 马缘生. 作物种质资源保存技术. 北京: 学术书刊出版社
- [2] 许再富. 抓住生物多样性保护新动向向西园逐步加强保护生物学的研究. 植物园通讯 1995; (6): 6—8
- [3] 马克平. 试论生物多样性的概念. 生物多样性 1993; (1): 20—22
- [4] 王正询. 多效唑对香蕉试管苗生长的影响. 植物生理学通讯 1994; 30(5): 346—348
- [5] 赵成章等. 水稻试管苗保存技术. 植物生理学通讯 1991; 27(2): 103—104
- [6] 程治英等. 药用阴生植物千年健的快速繁殖. 云南植物研究 1990; 12(1): 115—116
- [7] 兰芹英等. 香荚兰的快速繁殖. 亚热带植物通讯 1994; 23(1): 52—55