

柿和君迁子试管苗缓慢生长法保存及其遗传稳定性研究

艾鹏飞 罗正荣*

(华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 对柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 和君迁子 (*D. lotus* L.) 试管苗缓慢生长法保存及其恢复生长植株的遗传稳定性进行了研究, 结果表明: 低温 (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 和光照 800 lx (12 h/d) 的条件下, 试管苗在添加有甘露醇 20 g/L 或 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 的 MS (1/2N) + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 7 g/L + PVP 500 mg/L 培养基上或在含有 CPPU 0.2 mg/L 的 1/2 MS (1/2N) + 蔗糖 15 g/L + 琼脂 7 g/L + PVP 500 mg/L 培养基上保存 18 个月, 平均存活率在 90% 以上; 上述 3 种方法保存后恢复生长的植株, 在核 DNA 含量和染色体数目上没有发生改变; RAPD 分析时表明, 只有在添加 PP₃₃₃ 的保存中, 次郎 3 个单芽姊妹系扩增出的 1827 条谱带中, 增加了 3 条新带, 变异率为 0.16%, 君迁子 3 个单芽姊妹系扩增出的 1736 条谱带中, 增加了 1 条新带, 缺失了 14 条带, 变异率为 0.86%。该结果为柿属植物种质资源缓慢生长法保存的有效性和可行性提供了理论依据。

关键词: 柿; 君迁子; 试管苗; 缓慢生长法; 遗传稳定性; 种质保存

中图分类号: S 665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 04-0441-06

Conservation of in Vitro Shoots of Persimmon and Date Plum by Slow Growth and Genetic Stability of Recovered Plantlets

Ai Pengfei and Luo Zhengrong*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, PRC, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Studies on conservation of in vitro shoots of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and date plum (*D. lotus* L.) by slow growth and genetic stability of recovered plantlets were carried out. Results showed that 90% of in vitro shoots conserved on MS (1/2N) supplemented with 20 g/L sucrose, 7 g/L agar and 500 mg/L soluble PVP added with 20 g/L mannitol or 1.0 mg/L PP₃₃₃ respectively or on 1/2MS (1/2N) supplemented with 15 g/L sucrose, 7 g/L agar and 500 mg/L soluble PVP added with 0.2 mg/L CPPU for 18 months at (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ and 800 lx (12 h photoperiod) maintained viability. Those recovered plantlets conserved with 3 methods above were analyzed on cytological and molecular levels respectively. Result showed both nuclear DNA content and chromosome numbers maintained as normal. And only few shoots cultivated with PP₃₃₃, in which existed 0.16% variation in Jirou persimmon owing to 3 distinct new bands appearing in 1827 amplified bands and 0.86% variation in Date plum for 1 distinct new band and absence of 14 bands existing in 1736 amplified bands when 3 single-bud sibling lines were analyzed by RAPD markers respectively. Thus, it suggested these procedures would be effective and viable to conserve *Diospyros* germplasm by slow growth as above.

Key words: Persimmon; Date plum; In vitro shoot; Slow growth; Genetic stability; Conservation of germplasm

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 和君迁子 (*D. lotus* L.) 是柿属植物中经济价值较高的种类, 田间种植保存费用高, 且损失严重。因此, 需要寻求经济、实用、安全的保存方法。最近几十年中, 随着离体培养技术的全面展开, 以之为基础的缓慢生长法离体保存技术也得到了迅猛发展, 目前已成功地应用于多种植物种质资源的离体保存^[1]。作者在已经建立起柿和君迁子离体培养技术体系的基础上,

收稿日期: 2003-10-14; 修回日期: 2003-12-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070529)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: luozhr@mail.hzau.edu.cn)

主要探讨改变培养条件和修改培养基组分对其试管苗生长的影响,并进一步对保存后再生植株进行了遗传稳定性评价,以期建立起柿属植物种质离体保存库。

1 材料与方 法

君迁子 1 个单株;柿选用 4 个品种:次郎、阳丰、富有、罗田甜柿。按前报^[2]建立试管苗无性系。

单芽姊妹系的建立:参照 Hao 等^[3]建立各基因型单芽姊妹系。即试管苗一个侧芽按前报^[2]培养,所得试管苗进行第二次侧芽培养,得到的试管苗为单芽姊妹系。

温度和光照试验:温度为培养箱 (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 或组培室 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光照为暗处理或弱光照 800 lx (12 h/d)。取试管苗梢端 5 mm 转接到含有培养基 MS (1/2N) + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 7 g/L 的三角瓶中,一层牛皮纸外加双层耐高温聚乙烯薄膜封口。正常条件下先期培养 5 d 后分别置于不同温度和光照下,每两个月调查一次存活率和生长高度(存活的嫩茎)。每瓶 3~4 株,重复 3 次。

保存试验:取试管苗梢端 5 mm 转接到添加有生长抑制剂 ABA 或生长延缓剂 PP₃₃₃ 或渗透调节剂甘露醇的 MS (1/2N) + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 7 g/L + PVP 500 mg/L 培养基上或 CPPU 的 1/2MS (1/2N) + 蔗糖 15 g/L + 琼脂 7 g/L + PVP 500 mg/L 培养基中,正常条件下先期培养 5 d 后直接置于 (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 和 800 lx (12 h/d) 的培养箱中保存。6 个月后,每 3 个月调查一次存活率。每处理 5 瓶,每瓶 3~4 株。

恢复培养:对保存 18 个月后存活的试管苗恢复培养和诱导生根^[2],6 周后调查恢复生长情况。

遗传稳定性检测:测定再生植株流式细胞仪 DNA 含量^[4]。检测生根植株根尖细胞染色体数^[5]。CTAB 法提取植株叶片 DNA 进行 RAPD 分析^[6]。对照为保存前的单芽姊妹系。

2 结果与分析

2.1 温度和光照对试管苗保存的影响

表 1 表明,次郎试管苗在不同温度和光照条件下保存时,温度对存活率影响较大,光照对生长高度影响较大。前 4 个月试管苗 100% 成活;延长到 6 个月时, (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 下开始出现了枯死,存活率降低,同时试管苗高度也出现了负增长;而在 (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下仍保持 100% 成活,苗高也一直在缓慢增长,且 800 lx 弱光照时苗生长缓慢、健壮,暗培养时苗纤细、黄化。综上所述, (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 和 800 lx 条件下保存试管苗,存活率高,苗生长缓慢。因此,在以后的保存试验中均采用这个条件。

表 1 温度和光照对次郎试管苗保存的影响

Table 1 Effects of temperature and light on the survival and growth of Jirou shoots in vitro

温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	光照 Light (lx)	存活率 Survival rate (%)			生长高度 Growth height (mm)		
		2 M	4 M	6 M	2 M	4 M	6 M
25 ± 2	800	100.0 a	100.0 a	83.7 b	13.6 b	18.4 b	16.1 b
25 ± 2	暗 Dark	100.0 a	100.0 a	87.6 b	19.6 a	25.1 a	21.3 a
6 ± 1	800	100.0 a	100.0 a	100.0 a	6.2 c	7.1 c	8.5 d
6 ± 1	暗 Dark	100.0 a	100.0 a	100.0 a	7.8 c	8.5 c	11.4 c

注: M 代表月; 同列内相同字母示邓肯氏新复极差法检验在 0.05 水平上差异不显著,下同。Note: M: Months; Means within columns followed by the same letter are not significantly different at $P=0.05$ level by Duncan's new multiple test. The same below.

2.2 CPPU 对试管苗保存的影响

表 2 表明, CPPU 为 0.2 mg/L 时,次郎和罗田甜柿试管苗缓慢生长保存 18 个月后仍保持较高的存活率,浓度过低或过高时保存期相应缩短。分析其原因,发现 CPPU 浓度过低,保存的试管苗几乎停止生长,逐渐黄化死亡,浓度过高时苗也停止生长,且产生大量愈伤,最后连同愈伤一起变褐死亡。

2.3 甘露醇对试管苗保存的影响

甘露醇能够提高培养基渗透压,从而抑制试管苗的生长。本试验用甘露醇保存得到了较好的结果(表 3),浓度为 20 g/L 时,次郎和阳丰试管苗保存 18 个月后存活率仍保持在 95% 以上。

表 2 CPPU 浓度对柿试管苗保存后存活率的影响
Table 2 Effect of CPPU concentration on the survival of conserved persimmon shoots in vitro (%)

CPPU (mg/L)	次郎 Jirou					罗田甜柿 Luotiantianshi				
	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M
0.0	100.0	84.3	60.5	<50	<50	98.4	70.3	<50	<50	<50
0.05	100.0	93.2	85.4	61.2	<50	100.0	85.2	62.1	<50	<50
0.1	100.0	100.0	100.0	94.6	82.9	100.0	95.4	80.1	72.8	63.4
0.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.2	92.3	85.6	79.5
0.5	81.3	53.1	<50	<50	<50	73.5	<50	<50	<50	<50

表 3 甘露醇浓度对柿试管苗保存后存活率的影响
Table 3 Effect of mannitol concentration on the survival of conserved persimmon shoots in vitro (%)

甘露醇 Mannitol(g/L)	次郎 Jirou					阳丰 Youhou				
	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M
0	100.0	80.9	64.2	<50	<50	98.2	75.4	53.7	<50	<50
5	100.0	90.1	80.3	53.2	<50	100.0	89.6	78.3	<50	<50
10	100.0	100.0	96.4	92.7	90.9	100.0	100.0	100.0	90.3	85.4
20	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.8
50	100.0	92.3	79.4	61.4	<50	97.8	89.6	65.4	<50	<50

2.4 ABA 对试管苗保存的影响

ABA 能有效的抑制植物茎的伸长生长, 可用于试管苗保存^[7]。本试验发现, ABA (0、0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg/L) 处理的次郎和富有试管苗保存到 18 个月时, 存活率都低于 50%, 且当浓度大于 2.0 mg/L 时, 试管苗顶芽及上部叶易枯死, 下部叶缘发红, 枯死现象严重。因此, ABA 不太适宜于柿试管苗缓慢生长法保存。

2.5 PP₃₃₃ 对试管苗保存的影响

由表 4 可知, PP₃₃₃ 浓度对次郎和君迁子试管苗保存的影响较大, 浓度为 1.0 mg/L 时, 保存 18 个月的次郎试管苗 90.6% 存活, 君迁子试管苗没有出现死亡; 浓度为 0.5 和 2.0 mg/L 的处理次之; 浓度为 5.0 mg/L 时表现出对试管苗的毒害作用, 死苗现象严重。因此, PP₃₃₃ 最佳处理浓度为 1.0 mg/L。

表 4 PP₃₃₃ 浓度对次郎和君迁子试管苗保存后存活率的影响
Table 4 Effect of PP₃₃₃ concentration on the survival of conserved Jirou and Date plum shoots in vitro (%)

PP ₃₃₃ (mg/L)	次郎 Jirou					君迁子 Date plum				
	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M
0.0	100.0	83.5	59.4	<50	<50	100.0	90.6	82.3	69.8	<50
0.5	100.0	90.5	83.2	53.2	<50	100.0	100.0	100.0	93.2	78.1
1.0	100.0	100.0	100.0	95.7	90.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2.0	100.0	100.0	85.4	71.3	64.1	100.0	98.3	80.2	71.4	51.6
5.0	86.5	62.1	<50	<50	<50	69.1	<50	<50	<50	<50

2.6 保存后的试管苗恢复培养

对上面 3 种较好的方法保存 18 个月的次郎试管苗恢复培养时进行了比较 (表 5), 在保存期间, 试管苗伸长生长量从大到小依次为甘露醇 20 g/L、CPPU 0.2 mg/L、PP₃₃₃ 1.0 mg/L; 增殖倍数从大到小依次为 CPPU 0.2 mg/L, 甘露醇 20 g/L, PP₃₃₃ 1.0 mg/L (图版 I, 2a~2c); 恢复培养时, 3 种方法保存后存活的试管苗都迅速生长, 且生长

表 5 不同缓慢生长法保存次郎试管苗 18 个月的结果比较

Table 5 Comparison of Jirou shoots in vitro conserved for 18 months by different slow-growth methods

添加物 Addition	生长高度 Growth height(mm)	增殖倍数 Multiple	恢复增长率 Recovery rate(%)
PP ₃₃₃ 1.0 mg/L	9.5 c	1.4 c	100.0 a
甘露醇 Mannitol 20 g/L	21.3 a	1.7 b	100.0 a
CPPU 0.2 mg/L	13.2 b	3.5 a	100.0 a

势强 (图版 I, 1, 3)。6 周后, 恢复生长苗在生根处理时, 生根率高, 根条数多 (图版 I, 4)。

2.7 再生植株遗传稳定性检测

恢复保存后再生植株遗传稳定性分析结果表明, 在 DNA 含量和染色体数目上表现出与保存前的对照一致, 没有发生变异 (图 1; 图版 II, 1~5)。分别对添加 CPPU 0.2 mg/L、甘露醇 20 g/L 和 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 的 3 种方法保存 18 个月后的次郎再生植株进行 RAPD 分析 (每种保存方法随机选取保存后的 3 个单芽姊妹系, 以保存前的 1 个单芽姊妹系为对照), 112 条随机引物的扩增谱带中, 在 CPPU 0.2 mg/L 和甘露醇 20 g/L 上保存的没有出现缺失带或新增带 (图版 II, 6, 7), 而在 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 上保存的出现了 3 条新带 (图版 II, 9), 变异率为 0.16%。同样的方法对罗田甜柿在 CPPU 0.2 mg/L、君迁子在 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 上保存 18 个月后的再生植株遗传变异分析, 结果罗田甜柿在所检测的范围内没有发现变异 (图版 II, 8), 而君迁子共出现了 14 条缺失带和 1 条新带 (图版 II, 10a~10d), 变异率为 0.86%。分析在保存过程中引起变异的可能原因主要与保存方法, 即保存培养基中不同的添加物有关。

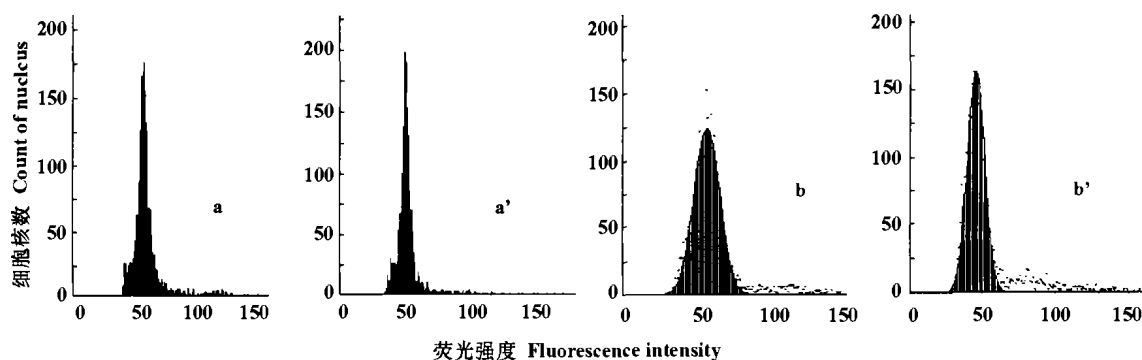


图 1 试管苗核 DNA 流式细胞光度法分析

a, a'. 保存前和保存后的君迁子; b, b'. 保存前和保存后的次郎。

Fig. 1 Analysis by flow cytometry of nucleus DNA of in vitro shoots

a, a'. Date plum before-conserved and conserved; b, b'. Jirou before-conserved and conserved.

3 讨论

缓慢生长法是一种中期的保存方法, 影响其保存效果的因素很多, 但主要是培养条件 (如培养温度和光照等) 和培养基组分^[8,9]。本试验以柿和君迁子试管苗为外植体, 对影响保存的培养温度、光照和培养基组分 3 个主要因子进行了研究, 结果在低温 (6 ± 1) °C 和光照 800 lx (12 h/d) 条件下, 试管苗在添加有甘露醇 20 g/L 或 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 的 MS (1/2N) 培养基或含 CPPU 0.2 mg/L 的 1/2MS (1/2N) 培养基上不需继代保存 18 个月后, 存活率最高可达 100%。在添加有 ABA 的培养基中保存效果不甚理想, 这可能与 ABA 是一种生长抑制剂, 在抑制试管苗伸长生长的同时加速了其衰老进程有关, 具体原因待进一步探讨。

离体保存的非常态, 是否已引起保存后再生材料遗传物质的改变, 是该种保存方法的有效性和可行性的依据。本研究分别对甘露醇 20 g/L 或 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 的 MS (1/2N) 培养基上或 CPPU 0.2 mg/L 的 1/2MS (1/2N) 培养基上保存后的再生植株进行了遗传稳定性分析。结果, 在核 DNA 含量和染色体数方面, 没有发生改变, 这可能与柿是一种多倍体植物, 在缓慢生长的特殊环境中, DNA 或基因拷贝数的多倍性有利于其细胞生存有关。DNA 水平上的分析发现, 前两种方法保存的材料在所检测的位点没有出现变异带, 而在 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 的培养基上保存的材料中, 次郎 3 个单芽姊妹系中有 1 个出现了 1 条新增带, 1 个出现了 2 条新增带, 君迁子 3 个单芽姊妹系中 1 个出现了 6 条缺失带, 1 个出现了 5 条缺失带, 1 个出现了 3 条缺失带和 1 条新增带。同时, 在整个 RAPD 分析中, 偶

尔也能看到与对照相比时弱带的存在。在同一保存条件下, 君迁子共出现了 1 条新带和 14 条缺失带, 而次郎只出现了 3 条新带, 没有缺失带, 笔者认为这一现象除了与外植体的基因型有关外, 还与倍性有较大关系, 君迁子为 2 倍体 ($2n=2x=30$), 次郎是 6 倍体 ($2n=6x=90$), 这样, 在低倍体上发生的 DNA 某位点的改变较易检测到, 而在高倍体上发生的某位点改变不易被检测到, 尤其是那些发生改变后不能与随机引物结合的位点 (其实这些位点的改变应该出现带的缺失)。因为多倍体含有较多的染色体组数, 比低倍体具有更强的基因位点补偿能力^[10]。长期使用缓慢生长法保存柿试管苗, 或多或少有部分材料死亡和丢失, 这就难免产生了选择作用, 但只要维持无性系个体间和个体内细胞间的遗传基础同一性, 这种选择将是无效的, 不具有积累性。

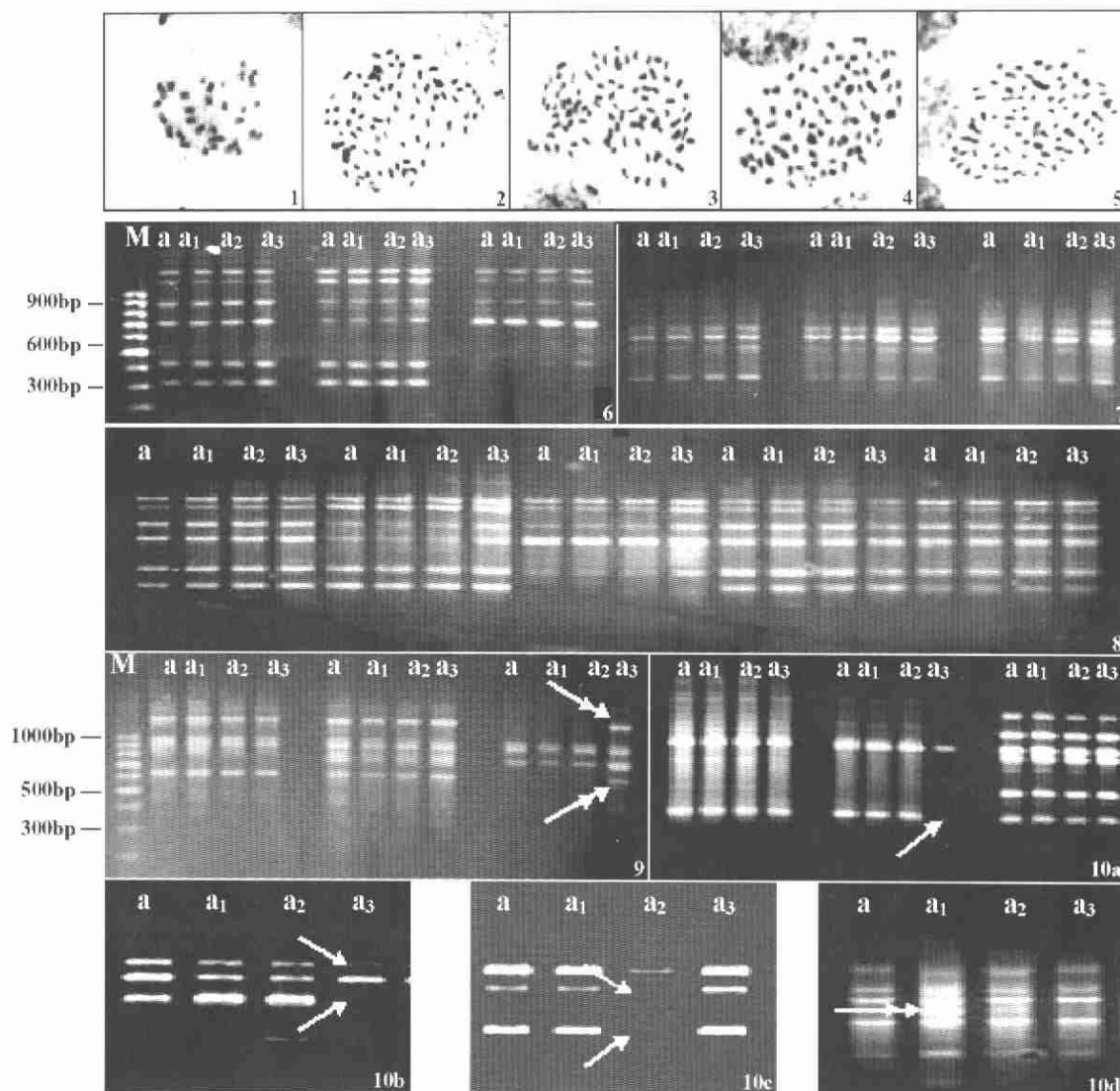
参考文献:

1. Rajora O P, Mosseler A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. *Euphytica*, 2001, 118: 197-212
2. 艾鹏飞, 罗正荣. CPPU 在柿试管繁殖中的应用. *果树学报*, 2002, 19 (4): 272-274
3. Hao Y J, Liu C X, Deng X X. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal and molecular levels. *Cryobiology*, 2001, 43: 45-53
4. 张俊娥, 刘继红, 邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异. *遗传学报*, 2003, 30 (2): 169-174
5. 唐仙英, 罗正荣. 部分中国柿品种及其胚培养后代的染色体倍性研究. *园艺学报*, 2000, 27 (4): 235-239
6. 罗正荣, 李发芳, 蔡礼鸿. 部分中国原产甜柿种质的分子系统学研究. *园艺学报*, 1999, 26 (5): 297-301
7. 郭延平, 李嘉瑞. ABA 对猕猴桃种质离体保存的生理效应. *西北农业学报*, 1995, 4 (1): 84-87
8. Negash A, Krens F, Schart J, et al. In vitro conservation of enset under slow-growth condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, 66: 107-111
9. Sarkar D, Chakrabarti S K, Naik P S. Slow-growth conservation of potato microplants; efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro. *Euphytica*, 2001, 117: 133-142
10. 王正询, 刘鸿先, 周伯春. 香蕉试管苗混倍性变异的研究. *遗传学报*, 2000, 27 (3): 257-269



图版 1 说明: 1. 保存前的次郎试管苗。2a~2c. 依次为在添加有 CPPU 0.2 mg/L、甘露醇 20 g/L、PP₃₃₃ 1.0 mg/L 的条件下保存 18 个月后的次郎试管苗。3. 保存后恢复生长的次郎试管苗。4. 恢复生长的次郎试管苗生根。

Explanation of plates 1: 1. Shoots of Jirou before in vitro conservation by slow growth. 2. Shoots of Jirou after in vitro conservation for 18 months by slow growth on medium added with CPPU 0.2 mg/L (2a), mannitol 20 g/L (2b) or PP₃₃₃ 1.0 mg/L (2c). 3. Shoots of Jirou regrown after in vitro conservation by slow growth. 4. Rooting of shoots regrown after in vitro conservation by slow growth in Jirou.



图版 II 说明: 1-5. 依次为保存后的君迁子 ($2n=2x=30$)、次郎 ($2n=6x=90$)、富有 ($2n=6x=90$)、阳丰 ($2n=6x=90$)、罗田甜柿 ($2n=6x=90$) 细胞染色体数。6. 保存在 CPPU 0.2 mg/L 上的次郎 RAPD 带型 (左至右引物为 OPA-12, OPA-15 和 OPB-01)。7. 保存在甘露醇 20 g/L 上的次郎 RAPD 带型 (左至右引物为 S-05, S-08 和 S-19)。8. 保存在 CPPU 0.2 mg/L 上的罗田甜柿 RAPD 带型 (左至右引物为 S-02, S-09, S-11, S-33 和 S-98)。9. 保存在 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 上的次郎 RAPD 带型 (左至右引物为 S-06, S-10 和 S-11)。10a~10d. 保存在 PP₃₃₃ 1.0 mg/L 上的君迁子 RAPD 带型 (10a 左至右引物为 S-06, S-10 和 S-11; 10b~10d 引物依次为 OPA-11, OPA-16 和 S-33)。图中 M 为 100 bp marker, a 为保存前的 1 个单芽系, a₁~a₃ 为保存后的 3 个单芽系, 单箭头示缺失的带, 双箭头示增加的新带。

Explanation of plates II: 1-5. Chromosome number of plantlets after conservation, which were Date plum ($2n=2x=30$), Jirou ($2n=6x=90$), Fuyu ($2n=6x=90$), Youhou ($2n=6x=90$) and Luotiantianshi ($2n=6x=90$) in turn. 6. RAPD patterns of Jirou conserved on medium added with CPPU 0.2 mg/L (Primers were OPA-12, OPA-15 and OPB-01 from left to right). 7. RAPD patterns of Jirou conserved on medium added with mannitol 20 g/L (Primers were S-05, S-08 and S-19 from left to right). 8. RAPD patterns of Luotiantianshi conserved on medium added with CPPU 0.2 mg/L (Primers were S-02, S-09, S-11, S-33 and S-98 from left to right). 9. RAPD patterns of Jirou conserved on medium added with PP₃₃₃ 1.0 mg/L (Primers were S-06, S-10 and S-11 from left to right). 10a-10d. RAPD patterns of Date plum conserved on medium added with PP₃₃₃ 1.0 mg/L (10a. Primers were S-06, S-10 and S-11 from left to right. 10b-10d. Primers were OPA-11, OPA-16 and S-33 in turn). M was 100 bp marker. Lane a was 1 single-bud sibling line before conservation. Lane a₁ to a₃ were 3 single-bud sibling lines after conservation. The single arrowhead indicated absent band and the double arrowhead indicated new band.