

桃离体茎尖的超低温保存及植株再生

赵艳华 吴雅琴

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北昌黎 066600)

摘要: 以简单玻璃化法为基本方法, 研究了影响桃离体茎尖超低温保存后存活率的因子——低温驯化时间、蔗糖预培养时间、玻璃化液处理时间及化冻后植株再生条件; 建立了较为适宜的超低温保存技术程序——选择继代培养 30 d 的试管材料, 5 低温驯化 3~4 周, 在含 0.7 mol/L 蔗糖的固体培养基预培养 2 d, 再经玻璃化液 PVS3 处理 100 min 后浸入液氮, 化冻后茎尖存活率可达 60% 以上。

关键词: 桃; 离体茎尖; 超低温保存

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1042-03

Cryopreservation of Shoot Tips from Peach and Its Regeneration

Zhao Yanhua and Wu Yaqin

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China)

Abstract: The current paper studied factors that effected the cryopreservation of peach in vitro shoot tips. By using simple vitrification technique, factors like, cold hardening, sucrose preculture and PVS3 treatment time and regeneration condition were all tested and a suitable procedure was established at last. The results showed that when shoot tips were excised from healthy in vitro plants of peach cultivars, which had been subcultured for 30 days and followed by 5 cold hardening for 3 - 4 weeks, precultured with 0.7 mol/L sucrose for two days, and dehydrated with PVS3 for 100 min before direct plunging into liquid nitrogen, the survival after cryopreservation was higher than 60%.

Key words: Peach; Shoot tip; Cryopreservation

1 目的、材料与方法

植物种质资源的离体保存作为田间圃地保存的一种辅助手段越来越受到重视, 但是, 由于桃继代周期较短, 一些品种继代 40 d 试管苗顶端开始出现黄化枯萎现象, 不久整株死亡, 因而桃的离体保存尚未进入真正实用阶段。1996 年, Marie 等首次利用超低温技术保存了桃的种子和胚轴, 并获得了成功^[1]。但以桃离体茎尖为材料的较为成熟的超低温保存技术程序尚未建立。因此, 作者以桃为试材, 以期建立简单、高效的超低温保存方法, 为桃种质的长期保存提供理论和技术依据。

供试的 2 个毛桃 (早美、早凤王) 和 3 个油桃 (早红珠、早红霞、瑞光 3 号) 品种均来源于河北省农林科学院昌黎果树研究所遗传育种实验室资源圃, 分别于 2002、2003 年春取多年生母株的芽进行离体培养, 建立试管无性系。继代培养基为 MS + BA 0.5 ~ 1.0 mg/L + IAA 0.5 ~ 1.0 mg/L + GA₃ 0.3 ~ 0.7 mg/L + 糖 30 g/L + 琼脂 5 g/L, pH 5.6, 培养温度 (25 ± 2), 光照强度 2 000 lx。

简单玻璃化法基本程序: 继代培养 30 d 的试管材料置于 5 光照培养箱低温驯化 3~4 周, 无菌条件下切取茎尖放在含 0.7 mol/L 蔗糖的固体 MS 培养基上预培养 2 d, 然后移入含 1.5 mL PVS3 (50% 甘油 + 50% 蔗糖) 的冷冻管中处理 100 min 后直接投入液氮。茎尖在液氮中保持 24 h 以上, 取出冷冻管放入水浴锅, 25 条件下化冻 1 min 后直接培养。在其它因素不变的前提下, 进行如下单因子试验 (试材

收稿日期: 2005 - 10 - 14; 修回日期: 2005 - 12 - 13

基金项目: 河北省农林科学院资助项目 (A03-2-01-08)

为早红珠试管无性系)：(1) 低温驯化时间，(2) 蔗糖预培养时间，(3) 玻璃化保护液处理时间，(4) 再生条件。每处理 20个茎尖，3次重复。存活率为化冻后形成新植株的茎尖数占茎尖总数的百分比。

2 结果与分析

2.1 离体培养

早红珠等 5个品种的继代培养周期为 30 d，每次继代需不断调整附加植物生长调节剂浓度及配比 (BA 0.5 ~ 1.0 mg/L, IAA 0.5 ~ 1.0 mg/L, GA₃ 0.3 ~ 0.7 mg/L)。否则，茎尖端枯萎甚至死亡，无法剥取茎尖进行正常试验。

2.2 玻璃化保护液处理时间对离体茎尖超低温保存的影响

选择株龄 30 d、低温驯化 3周的试管材料为试材，经 0.7 mol/L蔗糖预培养 2 d后，分别用玻璃化保护液 (PVS3) 处理 40、60、80、100、120 min。如图 1所示，随着玻璃化保护液处理时间的延长，超低温保存后茎尖存活率逐渐提高，处理 40 min时为 35%，100 min时达其峰值 88%，但如延长至 120 min，其存活率反而下降。经测定，PVS3处理 100 min时，茎尖含水量达到 22.8%，为适宜含水量，处理至 120 min，茎尖含水量下降至 16%，因而影响茎尖超低温保存后的存活率。100 min的处理效果与其它各处理之间的差异显著，故桃离体茎尖超低温保存中 PVS3处理时间应为 100 min。

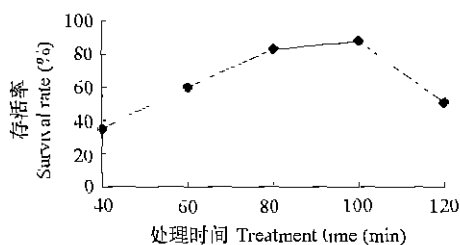


图 1 玻璃化保护液处理时间的影响

Fig. 1 Effect of PVS3 treatment time on survival

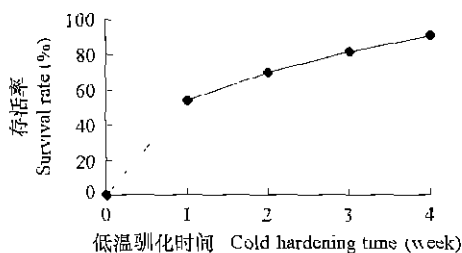


图 2 低温驯化对离体茎尖超低温保护的影响

Fig. 2 Effect of cold hardening on survival

2.3 低温驯化对离体茎尖超低温保存的影响

以往的多项研究表明低温驯化可提高超低温保存后材料的存活率。本试验选株龄 30 d的早红珠试管无性系，置于 5℃低温箱中驯化 1、2、3和 4周 (对照为室温) 后，0.7 mol/L蔗糖预培养 2 d，PVS3处理 100 min。经超低温保存后的结果如下：低温驯化时间显著影响茎尖存活率，未经低温驯化的茎尖超低温保存后存活率为 0，随着驯化时间的延长，茎尖存活率直线上升 (图 2)。方差分析结果表明低温驯化 4周后进行超低温保存茎尖存活率极显著高于对照和其它 3个处理。如继续延长驯化时间试管苗因受冻而变黄脱叶，故在以后的试验中驯化时间以 3~4周为准。

2.4 蔗糖预培养对超低温保存后茎尖存活的影响

以株龄为 30 d的试管无性系为试材，低温 3周后分别进行 0.7 mol/L蔗糖预处理 0、1、2、3、4 d，培养后存活率分别为 40.0%、65.0%、72.0%、50.0%和 23.0%，因此预培养时间应为 2 d。

2.5 培养条件对超低温保存后茎尖存活的影响

茎尖化冻后接种在再生培养基中置于培养室条件下，10 d后观察发现，超低温保存后的桃离体茎尖对光照非常敏感，化冻后直接在光照条件下培养，不仅存活率低，少数存活的茎尖 10 d后也会死掉。对化冻后的茎尖进行 15 d的暗培养再移至光照下培养可显著提高其存活率，存活的茎尖可继续生长。另外，化冻后的茎尖接种在附加植物生长调节剂的 MS培养基中，或变褐死亡，或愈伤组织化，茎尖很少正常生长。接种在 GS⁽²⁾培养基上，不仅存活率高且存活的茎尖可形成正常植株，繁殖较快。苗高 2 cm后插入 1/2MS培养基生根率达 100%。现有部分超低温保存的植株经驯化后移入温室，生长状况与对照相比无明显差异 (图版，A~D)。

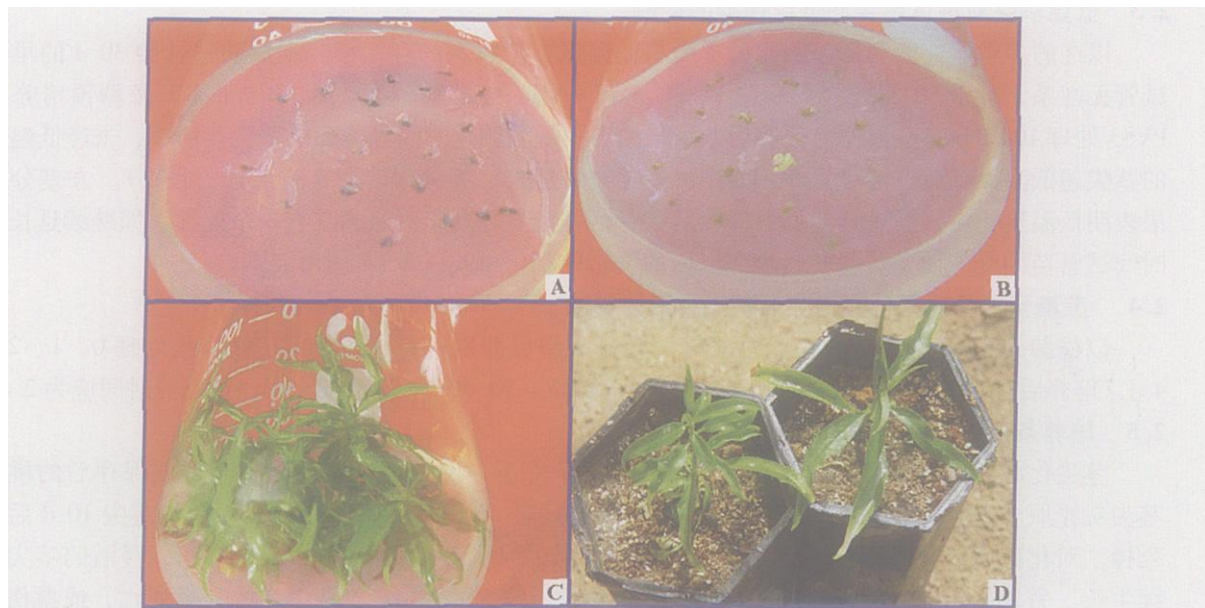
2.6 桃离体茎尖超低温保存技术程序

综上桃离体茎尖超低温保存技术程序, 株龄 30 d 试管无性系 5 低温驯化 3~4 周 0.7 mol/L 蔗糖预培养 2 d 玻璃化液处理 100 min 液氮保存 化冻后 GS 培养基中暗培养 15 d 光照培养。为了验证此技术程序的适应性, 还保存了早美、早凤王、早红霞、瑞光 3 号等 4 个毛桃和油桃品种, 茎尖存活率分别为 60%、85%、68% 与 93%。此结果仅为一次试验所得, 存活率是否与基因型有关需进一步研究。

由于桃的继代周期较短, 供试茎尖含水量较高 (株龄 40 d, 含水量 67%), 故其超低温保存与苹果、梨相比存在一定难度, 因而对超低温保存过程中前处理的各个环节要求比较严格。其中低温驯化是不可缺少的一步。另外, 蔗糖预培养和玻璃化保护液处理也是降低细胞含水量、增强茎尖耐冻性的关键因素, 但要因材料而异。在本试验中应该强调的是化冻后茎尖的再培养条件。桃与杏、樱桃、李和苹果等树种相比^[3~6], 有其较为特殊的要求, 即化冻后的茎尖需 15 d 左右的暗培养, 且再生培养基不同于继代增殖培养基, 因而形成了其独特的超低温保存技术程序。

参考文献:

- 1 Marie T B, Bertrand H, Marthe B. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of peach Cryo-Letters, 1996, (17): 379~390
- 2 曹孜义, 刘国民主编. 实用植物组织培养技术教程. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996 100~105
Cao Z Y, Liu G M. Textbook of practical techniques on plant tissue culture, Lanzhou: Gansu Publishing House of Science and Technology, 1996 100~105 (in Chinese)
- 3 Mohamad A, Shatnawi, Florent E, Andrea F, Camine D. Cryopreservation of in vitro plantlets of almond Cryo-Letters, 1999, 20: 13~20
- 4 赵艳华, 吴永杰, 周明德. 马哈利离体茎尖超低温保存的研究. 园艺学报, 1999, 26 (6): 402~403
Zhao Y H, Wu Y J, Zhou M D. Cryopreservation of in vitro culture shoot tips of *Prunus mahaleb* Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26 (6): 402~403 (in Chinese)
- 5 Marthe B. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks Plant Science, 1995, 105: 235~242
- 6 赵艳华, 周锡明, 吴永杰. 苹果离体茎尖超低温保存方法的比较, 园艺学报, 2003, 30 (6): 719~721
Zhao Y H, Zhou X M, Wu Y J. Comparison of four methods for apple shoot tips in vitro freezing Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30 (6): 719~721 (in Chinese)



图版说明: A. 超低温保存后死亡的桃茎尖; B. 超低温保存后存活的桃茎尖; C. 超低温保存后桃的繁殖情况; D. 超低温保存后的移栽苗。

Explanation of plates: A. Died shoot tips after cryopreservation; B. Survival shoot tips after cryopreservation; C. Growth of shoot tips after cryopreservation; D. Planting of seedlings after cryopreservation