

# 李离体茎尖的超低温保存

赵艳华<sup>1</sup>, 吴雅琴<sup>1</sup>, 程和禾<sup>1</sup>, 李春敏<sup>1</sup>, 陈晓玲<sup>2\*</sup>, 卢新雄<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北昌黎 066600; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 以简单玻璃化法为基本方法, 研究了影响李离体茎尖超低温保存的因子——继代培养时间、低温驯化时间、PVS3处理时间以及化冻后茎尖存活检测。建立了较为简单的李离体茎尖超低温保存技术程序: 即选择继代培养 120 d 的试管材料, 经过 5 低温驯化 21 d, 0.7 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖预培养 1 d, PVS3处理 100 min, 浸入液氮。化冻后茎尖存活率可达 60%以上。

**关键词:** 李; 离体茎尖; 超低温保存

**中图分类号:** S 662.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 03-0423-04

## Cryopreservation of Shoot Tips from *Prunus*

ZHAO Yan-hua<sup>1</sup>, WU Ya-qin<sup>1</sup>, CHENG He-he<sup>1</sup>, LI Chun-min<sup>1</sup>, CHEN Xiao-ling<sup>2\*</sup>, and LU Xin-xiong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China;

<sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The current paper studied factors that effect the cryopreservation of *Prunus salicina* Lindl *in vitro* shoot tips. By using simple vitrification technique, factors like, culture time, PVS3 treatment time and cold hardening were all tested, the rapid examination method of shoot tips survival was studied, and a sample procedure was established at last. When shoot tips were excised from healthy *in vitro* plants of *Prunus* cultivars, that have been subcultured for 120 d and followed by 5 cold hardening for 21 d, and precultured with 0.7 mol·L<sup>-1</sup> sucrose for 2 d, treated with PVS3 for 100 min before direct plunging into liquid nitrogen, the survival after cryopreservation was higher than 60.0%.

**Key words:** *Prunus*; shoot tips; cryopreservation

李 (*Prunus salicina* Lindl) 育种工作中, 有大量的无性系或杂种作为遗传资源需要被安全保存。Brisson等 (1995, 1997) 先后报道了利用两步降温法结合玻璃化法保存两个杂交李砧木获得成功。本试验的目的在于建立较为简单, 且适宜范围广泛的李离体茎尖超低温保存技术程序, 以实现李种质资源超低温保存技术的实用化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材

供试的 6 个李品种 (大实早生、来客、澳李 14、尤萨李、红宝石、罗马尼亚李) 均来源于河北省农林科学院昌黎果树研究所资源圃, 分别于 2002 年和 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 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 5 g·L<sup>-1</sup>, pH 5.6, 培养温度 (25 ±2) °C, 光照强度 2 000 lx。

收稿日期: 2007-11-18; 修回日期: 2008-01-24

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xlchencaas@126.com)

## 1.2 简单玻璃化法基本程序

将继代培养一定时间的试管材料置于 5 ℃ 光照培养箱低温驯化一定时间后, 在无菌条件下切取其茎尖放在含  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖的固体 MS 培养基上预培养 1 d, 然后移入装有 1.5 mL PVS3 (50% 甘油 + 50% 蔗糖) 的冷冻管中处理一定时间后, 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 (赵艳华 等, 1999)。

在其他因素不变的前提下, 以大石早生品种为试材进行如下单因子试验: (1) 继代培养时间; (2) 低温驯化时间; (3) 玻璃化保护液处理时间。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。

## 1.3 茎尖含水量测定

称 50 个新鲜茎尖的质量, 之后放在 80 ℃ 烘箱干燥 4 h, 再称其干质量, 计算含水量。

## 1.4 茎尖存活快速检测

经超低温保存的茎尖化冻后在浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FDA 染液中染色 30 min 以上, 在 -15 ℃ 温度下冷冻 10 min, 切片, 在荧光显微镜下观察并照相。

# 2 结果与分析

## 2.1 继代培养时间对李离体茎尖超低温保存效果的影响

选不同继代培养时间的试材, 低温驯化 21 d,  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖预培养 1 d, PVS3 处理 80 min 后进行超低温保存。结果表明: 未经超低温保存的 4 个处理茎尖存活率均为 100%; 继代培养 30、60、90 和 120 d 的材料经超低温保存后, 茎尖存活率依次升高。培养 120 d 的试材显著高于 30、60 和 90 d 的。经含水量测定发现, 随培养时间的延长, 试管苗茎尖含水量逐渐降低, 当培养 120 d 时含水量达 51%。此种材料用于超低温保存较好, 存活率可达 75% (图 1)。如继续延长培养时间, 存活率可能会提高, 但是培养瓶中培养基已近耗干, 部分材料萎蔫, 不便于茎尖剥取。

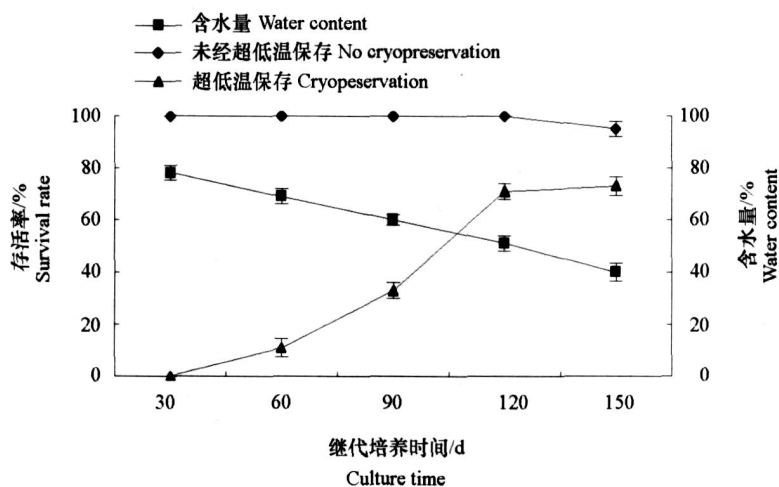


图 1 继代培养时间对李离体茎尖超低温保存效果的影响

Fig. 1 The effect of culture time on cryopreservation of *Prunus* shoot

## 2.2 低温驯化时间对超低温保存效果的影响

低温驯化是超低温保存中不可缺少的一步。选用继代培养 120 d 的材料, 经 5 ℃ 驯化不同时间后,  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖预培养 1 d, 再用 PVS3 处理 100 min 进行超低温保存。未经超低温保存的处理间无明显区别, 驯化 0、7、14 和 21 d 的材料经超低温保存后茎尖存活率依次增加, 21 ~ 28 d, 存活

率无明显升高。故认为李离体茎尖超低温保存过程中低温驯化 21 d即可 (图 2)。

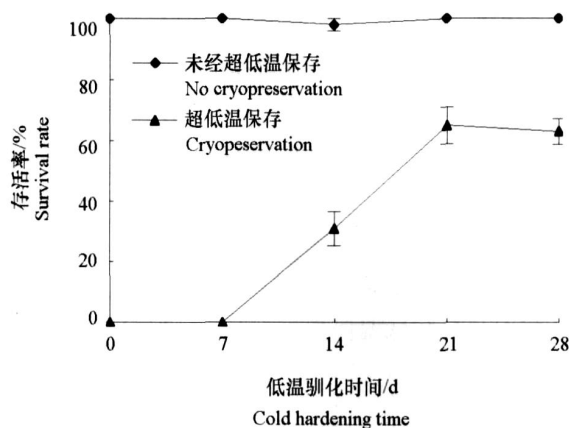


图 2 低温驯化时间对李离体茎尖超低温保存效果的影响

Fig 2 The effect of cold hardening time on cryopreservation of Prunus shoot tips

### 2.3 PVS3处理时间对超低温保存效果的影响

根据上述试验, 选取继代培养 120 d 的试材低温驯化 21 d,  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖预培养 1 d, PVS3 分别处理 20、40、60、80、100、120 和 140 min 后进行超低温保存。由图 3 可知: 未经超低温保存的茎尖存活率变化较小, 随 PVS3 处理时间的延长存活率略有降低; 经超低温保存的茎尖随 PVS3 处理时间的延长存活率明显上升, 100 min 达峰值, 之后下降。因此认为 PVS3 处理 100 min 对李离体茎尖超低温保存较为适宜, 时间过长会导致过度脱水。

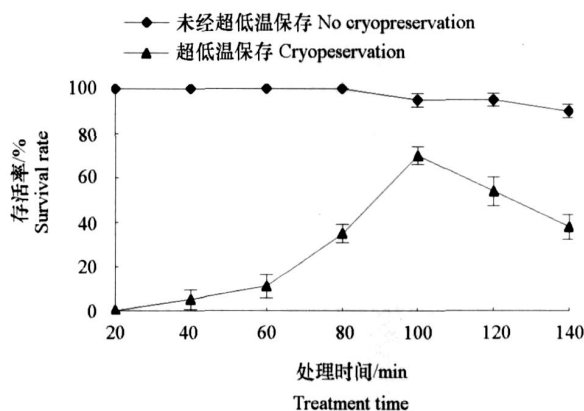


图 3 PVS3 处理时间对李离体茎尖超低温保存效果的影响

Fig 3 The effect of PVS3 treatment time on cryopreservation of Prunus shoot tips

### 2.4 超低温保存程序的建立

综合以上影响因子, 建立李离体茎尖超低温保存技术程序: 取继代培养 120 d 的试材 5 低温驯化 21 d, 取其茎尖  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖预培养 1 d PVS3 处理 100 min 液氮保存 25 快速化冻 植株再生。

利用所建技术程序保存了国内外 6 个不同的基因型, 均获得了较高的存活率, ‘大实早生’ 65%, ‘来客’ 60%, ‘澳李 14’ 73%, ‘尤萨李’ 52%, ‘红宝石’ 75%, ‘罗马尼亚李’ 59%。

## 2.5 超低温保存后茎尖存活的快速检测

通常确定超低温保存茎尖是否存活都是化冻后再培养,绝大多数树种需要 7 d 以上。本试验中利用冷冻切片技术实现了茎尖的快速检测,仅需 1 h 即可完成。经超低温保存的茎尖化冻后在浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FDA 染液中染色 30 min 以上,在  $-15^\circ\text{C}$  温度下冷冻 10 min 切片,在荧光显微镜下观察。未经超低温保存的茎尖整个出现绿色荧光(图版, 1),表明其为活体,完全冻死的茎尖则没有荧光(图版, 2)。超低温保存后存活的茎尖外部叶原基冻死无绿色荧光,而分生组织出现绿色荧光(图版, 3),说明其存活,经培养后可形成植株。

试验中发现有两个方面值得注意:一是染色时间少于 30 min,荧光太弱,超过 60 min,荧光也减弱,因此染色时间应在 30 ~ 50 min 之间;二是染色后的茎尖在  $-15^\circ\text{C}$  温度下冷冻时间不要超过 10 min,否则茎尖被冻坏,难以确定材料是在超低温保存过程中冻坏还是在冷冻切片机中受冻。

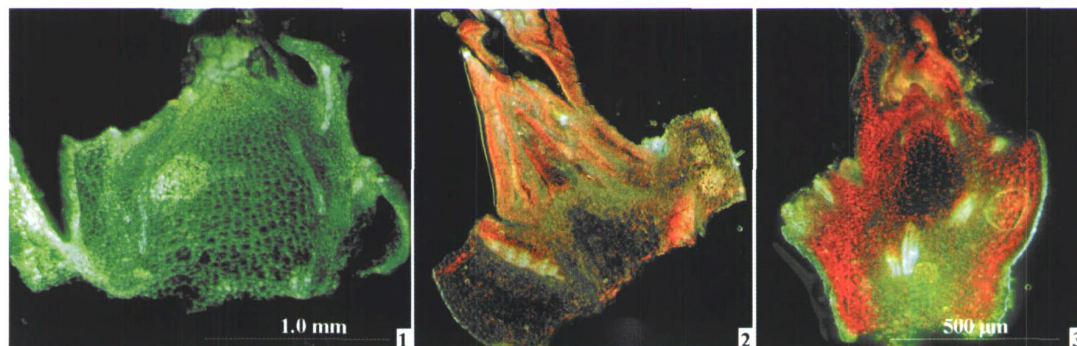
## 3 小结

试验表明:李离体茎尖的超低温保存受低温驯化时间和玻璃化液处理时间的影响。当低温驯化 21 d, PVS3 处理 100 min 时,可获得较高存活率。另外,超低温保存存活率与材料生理状态直接相关,继代培养时间 120 d 的材料,在培养室条件下经自然脱水后茎尖含水量降低,超低温保存后茎尖存活率较高。

简单玻璃化法超低温保存略去了装载、卸载及化冻后高浓度蔗糖洗涤等过程,与 Marthe Brism 的方法相比,在保持较高存活率的前提下程序简单,容易操作,此程序的建立为保存健康的李遗传资源提供了简单可行的途径;荧光纤维技术的应用为检测茎尖存活提供了简便快捷的手段。

## References

- Brison M, de Boucaud M T, Dosba F. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Science*, 105 (2): 235 - 242.
- Brison M, de Boucaud M T, Pierronnet A, Dosba F. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus. *Plant Science*, 123 (1): 189 - 196.
- Zhao Yan-hua, Wu Yong-jie, Zhou Ming-de. 1999. Cryopreservation of *in vitro* culture shoot tips of *Prunus mahaleb*. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (6): 402 - 403. (in Chinese)
- 赵艳华, 吴永杰, 周明德. 1999. 马哈利离体茎尖超低温保存的研究. *园艺学报*, 26 (6): 402 - 403.



图版说明: 1. 未超低温保存的茎尖; 2. 超低温保存后分生组织冻死的茎尖; 3. 超低温保存后分生组织存活的茎尖。

**Explanation of plates:** 1. Shoot tips of no cryopreservation; 2. Shoot tips with death meristems after cryopreservation; 3. Shoot tips with survival meristems after cryopreservation.