

‘品丽珠’葡萄离体茎尖超低温保存的研究

赵艳华 吴永杰

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600)

摘要: 研究了包埋干燥法超低温保存‘品丽珠’葡萄离体茎尖的影响因素——芽的位置、干燥时间、预冰冻温度及材料生理状态。选继代培养4个月以上的侧芽, 蔗糖预培养3 d、干燥5 h, 两步降温和直接在MS培养基上培养, 存活率达40%。

关键词: 葡萄; 茎尖; 超低温

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 01-0062-03

1 目的、材料与方法

超低温保存作为植物种质长期保存的方法越来越受到人们的重视^[1,2]。1989年 Ezawa 研究了葡萄休眠枝的超低温保存, 认为经过冬季冷驯化的休眠枝经干燥处理后, 超低温保存可以存活。采用‘霞多丽’葡萄离体茎尖进行超低温保存, 获得了较高的存活率(40%~60%)^[3,4]。但目前葡萄离体茎尖的超低温保存仍仅限于对一个品种的固定程序的研究。为进一步扩大试材范围, 提高其实用性, 我们对影响葡萄离体茎尖超低温保存因素进行了研究。

试材来源于河北省农林科学院昌黎果树研究所无病毒苗木实验室, ‘品丽珠’试管无性系建立于1994年, 超低温保存试验时间为1998年11月~1999年12月。试管无性系继代培养基为 B₅ + IAA 0.1 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 4.5 g/L。100 mL 的三角瓶中加入 60 mL 培养基, 培养温度 (25 ± 2) °C, 光照 16 h/d, 光照强度 2 000 ~ 3 000 lx。茎尖再生培养基 MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.0 g/L, 培养条件同上。

基本程序: 将继代培养 120 d 的试管材料置于 5 °C 光照培养箱低温驯化 30 d, 无菌条件下切取其茎尖, 分别放在 0.3、0.7、1.0 mol/L 蔗糖溶液中预培养各 1 d, 之后移入 3% 藻酸钠中, 用取液器吸取含一个茎尖的藻酸钠液体滴入 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液中, 30 min 后取出凝固的包埋丸, 放入无菌硅胶中干燥 5 h, 装入冷冻管以 0.2 °C/min 的降温速率降至 -40 °C, 浸入液氮。25 °C 水浴快速化冻 2 min, 然后接种到再生培养基上。在其它因素不变的前提下进行如下单因子试验: (1) 蔗糖预培养, (2) 干燥, (3) 预冰冻温度, (4) 芽着生位置, (5) 继代培养时间, (6) 超低温保存方法。每处理 20 个茎尖, 3 次重复。存活率为化冻后形成新的植株或叶片的茎尖数占茎尖总数的百分比。

2 结果分析与讨论

2.1 蔗糖预培养对茎尖存活的影响

切取离体培养的茎尖直接接种在 MS 培养基上 (对照), 90% 以上的茎尖能够再生,

收稿日期: 2000-06-26; 修回日期: 2000-09-19

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (399485); 国际植物遗传资源研究所自然科学基金资助项目

并形成丛状芽。为使茎尖达到逐渐脱水的目的,对包埋的茎尖进行了蔗糖预培养处理。由表 1 可见,在经验浓度及处理时间范围内,7 种处理对茎尖的存活没影响,存活率均在 90% 以上。在以后的试验中采用 0.3、0.7、1.0 mol/L 蔗糖处理各 1 d。

2.2 干燥时间对茎尖存活的影响

预培养后的包埋丸分别干燥处理 1、2、4、5、6 和 8 h,结果表明(表 2),干燥时间在 1~5 h 范围内,差异不显著($P < 0.05$),茎尖存活率均在 60% 以上,随着干燥时间的延长,存活率急剧下降,干燥 6 h 时为 33.3%,8 h 仅为 10%。经方差分析($P < 0.01$),后 2 种处理与前 4 种处理间差异极显著。以下研究各影响因素,均以 5 h 为临界。

2.3 芽的着生位置对超低温保存后茎尖存活的影响

取不同着生位置的顶芽和侧芽,采用相同的处理:包埋 0.3、0.7、1.0 mol/L 蔗糖预培养各 1 d 干燥 两步降温 ($0.2 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$, $-40 \text{ } ^\circ\text{C}$) 液氮保存。化冻后于 MS 培养基上再培养,20 d 后观察,顶芽无一存活,侧芽存活率为 38.7%。在以后的研究中全部采用侧芽。

2.4 预冰冻温度对超低温保存后茎尖存活的影响

将预培养和干燥后的包埋茎尖,按两步降温法进行预冰冻处理,其温度分别为 0、-10、-20、-40,前三者超低温保存后茎尖无存活,而后者,即 -40 预冰冻处理超低温保存后存活率可达 23%。

2.5 继代培养时间对超低温保存效果的影响

继代培养 20、60 和 120 d 3 种处理的对照茎尖再生率均为 100%。将上述材料放入 5 培养箱驯化 30 d,继代培养 20 d 的茎尖无一存活,其他两种存活率为 100%。将低温驯化 30 d 的后两种材料用于超低温保存,在程序相同的情况下,继代培养 60 d 的茎尖经超低温保存后无一存活;而继代培养 120 d 的茎尖超低温保存后存活率 40% (两步降温法)。

2.6 超低温保存方法对茎尖存活的影响

比较极慢速降温法、玻璃化法和包埋干燥法 3 种方法对葡萄茎尖存活的影响,结果前二者超低温保存后茎尖无一存活,而后者茎尖存活率为 35%,因此认为包埋干燥法适宜于品丽珠离体茎尖的超低温保存。

通过此项研究建立了较好的超低温保存技术程序:继代培养 4 个月的侧芽 蔗糖预培养 3 d 干燥 5 h 两步降温。同时利用所建的超低温保存技术程序保存了 'LN33' 和

表 1 蔗糖预培养对茎尖存活的影响

Table 1 The effect of sucrose on the shoot tip regeneration rate

蔗糖预培养浓度 Sucrose preculture (mol/L)	存活率 Regeneration rate (%)
0.3, 1 d	100
0.5, 1 d	95
0.7, 1 d	90
1.0, 1 d	97
1.0, 2 d	90
0.3, 1 d+0.7, 1 d	95
0.3, 1 d+0.7, 1 d+1.0, 1 d	100
CK	90

表 2 干燥时间对茎尖存活的影响

Table 2 The effect of dehydration time on the shoot tip regeneration rate

干燥时间 Dehydration time (h)	存活率 Regeneration rate (%)
1	71.4
2	66.8
4	60.0
5	66.8
6	33.3
8	10.0

‘霞多丽’葡萄，也分别获得了 10% 和 29.5% 的存活率，初步验证了其可行性。今后需进一步研究地域之间、品种和砧木之间、基因型之间的差异，以期建立完善的、具有广泛适应性的超低温保存技术程序，为建成超低温种质库奠定基础。

参考文献：

- 1 赵艳华, 吴永杰, 陈霜莹, 等. 包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖. 园艺学报, 1998, 25 (1): 93~95
- 2 T Niino, A Sakai. Cryopreservation of alginate-coated shoot tips of apple, pear and mulberry, Plant Science, 1992, 87: 199~206
- 3 Pascale Plessis, Claude Leddet, Jean Dereuddre. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate-coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). C. R. Acad. Sci. Paris, 1991, 313: 373~380
- 4 Plessis P, Leddet C. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pre-treatment, cooling and postculture conditions. Cryo-Letter, 1993, 14: 309~320

Study on Cryopreservation of in Vitro Cultured Cabernet France Shoot Tips

Zhao Yanhua and Wu Yongjie

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academic of Agriculture and Forestry Sciences Institute, Changli 066600)

Abstract: Bud location, dehydration, prefreezing and subculture time were studied on grapevine Cabernet France shoot tip cryopreservation by the encapsulation-dehydration process. Best result (40%) was obtained in the following procedure: 70 select lateral buds after four months' subculture as explants, preculture them for 3 days, dehydrate for five hours then cool them in two steps and finally subculture them on standard culture medium.

Key words: Grape; Cryopreservation; Shoot tips

(上接 30 页)

10. 早熟无核葡萄——希姆劳特无核 欧美杂交种, 6 月底成熟, 平均粒重 8g, 平均穗重 750g, 完全无核, 果粒金黄透明, 品质极上等, 高抗黑痘病、霜霉病, 用药量和喷药次数不到巨峰的 1/5, 丰产, 大面积栽培平均亩产 4 000~6 000 kg, 是南方无核葡萄商品化栽培的代表品种。年育苗量 40 万株。

11. 核桃和美国黑核桃 主要品种有漾濞核桃、薄壳香、中林 1 号等, 年育苗量 25 万株。另可提供部分美国黑核桃苗。

12. 大枣 主要品种有梨枣、牛奶枣、鸡蛋枣、大雪枣等, 年育苗量 20 万株。新引进品种有台湾大青枣高朗一号、二十一世纪等, 年育苗 5~10 万株。

13. 杏 主要品种有红丰、新世纪、凯特杏等。年育苗量 15 万株。

14. 蟠桃 拥有国内 12 个优良蟠桃品种。

还可提供猕猴桃、板栗、银杏、杨梅、荔枝、龙眼、苹果、杜仲、桑、松、杉、小叶榕等苗木。

以上品种苗木健壮, “三证”齐全, 无检疫性病虫害, 保证品种纯度达 98% 以上。若品种不纯, 我方负责赔偿 全部购苗款 (含运费), 3 年土地占用费和管理费, 每年每亩土地占用费按 500 kg 干稻谷的当年当地价折价计算 (北方以小麦折价), 管理费以实际发生额计算。凡发展 200 亩以上的客户, 我方派专家免费规划和进行现场技术指导, 直到挂果为止; 发展 1 000 亩以上的客户, 我方派专家长期驻园指导。我所育苗数量大, 价格优惠, 经营灵活, 拟在全国范围内寻求地区代理, 欢迎有识之士加盟和前来实地考察。有关品种资料、价格等详情, 请来函附 3 元邮票索取彩印《高新果树品种汇编》一册。

联系方式: 重庆市铜梁县果树研究所 邮编: 402560 胡平正 陈小平

电话: (023) 45632497 45633089 (昼夜) 传呼: (023) 191-8304600

成都市龙泉园艺科学研究所 (区邮政局二楼) 邮编: 610100 杨邦伦 陈贵虎

电话: (028) 4878788 4863888 (昼夜) 自动传呼: 1928352218

苗木销售负责人: 胡平正 13808326283 杨邦伦 13509426609

中国果业网网址: <http://www.zhbg.com> 电子信箱: sxs@zhbg.com

广西总代理: 广西来宾县桂蜀水果联合开发公司 (县邮政局内) 刘学元

自动传呼: 19977210749 邮编: 546100