

# 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生

王子成 邓秀新\*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** 采用玻璃化法对柑桔茎尖的离体超低温保存进行了研究。约 10 mm 长的柑桔茎尖于含 5 % 二甲基亚砜 (DMSO) 的培养基上预培养 3 d, 切取 2~2.5 mm 长的茎尖, 室温下 60 % 玻璃化溶液 2 (PVS<sub>2</sub>) 装载 20~30 min, 然后用 PVS<sub>2</sub> 于 0 °C 处理 50~60 min, 换入新鲜的 PVS<sub>2</sub>, 迅速投入液氮中, 24 h 后在 40 °C 水浴中迅速化冻, 再用 1.2 mol/L 蔗糖培养基洗涤 2 次, 接种于含 BA 1.0 mg/L 的 MT 培养基上, 26 °C 暗培养 1 周后转于正常光下培养。枳壳茎尖超低温保存后用氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法检测, 成活率为 100 %, 培养再生率达到 90 %, 再生后的苗能正常生根, 与对照没有形态上的变异, 移栽可成活。

**关键词:** 柑桔; 茎尖; 超低温; 玻璃化法

**中图分类号:** S 666; Q 813 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 04-0301-06

液氮超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存的最好方法。在液氮条件下, 活细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止, 植物材料处于相对稳定的生物学状态<sup>[1]</sup>。为了在液氮条件下保存种质资源, 人们已试验了很多种方法, 已有达百种以上的植物材料进行了超低温保存, 取得了很大进展。迄今, 尽管成功地保存了多种植物材料的许多细胞类型, 但其实际操作仅在较少情况下能够简易进行, 对体积较大的由已分化的多种细胞类型组成的组织和器官, 如茎尖的保存则常常难以奏效。而近几年发展较快的玻璃化法以其设备要求简单、材料处理步骤简便、效果和重演性好等优点<sup>[2,3]</sup>, 倍受人们推崇, 成为较理想的植物种质资源保存方法。利用玻璃化法已成功地保存了十种植物的茎尖<sup>[4]</sup>。柑桔胚性愈伤组织的玻璃化超低温保存前人已做了很多研究, 试验体系已基本完善<sup>[5]</sup>。本试验用玻璃化法进行柑桔茎尖的超低温保存, 以期建立起柑桔茎尖的超低温保存体系, 为长期稳定保存柑桔种质资源提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**品种或类型:** 枳壳 (*Poncirus trifoliata*), 439 [瓯柑 *Citrus suavisissima* Hort. et Tanaka × 改良橙 *C. sinensis* (L.) Osbesk cv. Gailiangcheng], 红肉脐橙 [*C. sinensis* (L.) Osbesk cv. Cara cara] 和椪柑 (*C. reticulata* Blanco cv. Ponkan)。

### 1.2 方法

收稿日期: 2000-12-12; 修回日期: 2001-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39830260)

\*通讯联系人。

1.2.1 再生无菌苗 从成熟果实中取未受精胚珠, 经表面消毒后<sup>[6]</sup>, 接种于 MT + SAD 40 mg/L + GA<sub>3</sub> 1 mg/L + ME 500 mg/L 的培养基 (胚状体诱导培养基) 上, 于 26 °C 暗培养箱中进行培养, 获得胚状体, 并再生成株。切取茎段, 每 40 d 继代 1 次。培养基为 MT 基本培养基附加 BA 0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L, GA<sub>3</sub> 0.3 mg/L 和蔗糖 30 g/L (生芽培养基), 培养温度 26 °C, 光照 12 h/d, 光照强度 2 000 lx。

1.2.2 保存方法 继代 20 ~ 30 d 的柑桔茎尖, 长度为 10 mm 左右, 于 5 % 二甲基亚砷 (DMSO) + 5 % 蔗糖 + MT 基本培养基上, 在上述培养条件下预培养不同天数, 然后再切取茎尖, 长度分别为 1 ~ 1.5 mm、2 ~ 2.5 mm、3 ~ 3.5 mm, 转移于 1.8 mL 冷冻管中, 每管 10 个茎尖。室温下 60 % 玻璃化溶液 2 (PVS<sub>2</sub>) (0.15 mol/L 蔗糖液体培养基与 PVS<sub>2</sub> 溶液体积比为 40 : 60)<sup>[5]</sup> 溶液处理不同时间, 再用 PVS<sub>2</sub> (30 % 甘油, 15 % 乙二醇, 15 % DMSO, 0.4 mol/L 的蔗糖) 于不同温度下处理不同时间, 移去原液, 装入新鲜的保护液, 将冷冻管装入自制的纱布袋中, 每袋 2 ~ 3 管, 然后迅速将冷冻管投入液氮中。每一处理 20 个茎尖, 3 次重复。

1.2.3 化冻、成活检测与再培养 保存 24 h 后, 从液氮中取出冷冻管, 在 40 °C 下迅速化冻, 分别用无菌水、蔗糖 1.2 mol/L + MT 基本培养基洗涤 2 次, 每次 10 min。氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法检测成活率<sup>[7]</sup>, 或转入继代培养基进行培养, 以检测再生率。将培养成活的材料接种于生根培养基 (1/2 MT + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖 25 g/L) 进行生根培养, 生根以后移栽至温室。

## 2 结果与分析

### 2.1 未受精胚珠培养

未受精胚珠在胚状体诱导培养基上培养 2 个月内均可获得再生胚状体, 除 439 外, 其它 3 个品种或类型胚状体发生率均超过 50 %, 其中红肉脐橙胚状体发生率最高, 达 80 %。如表 1 所示, 红肉脐橙和椪柑在胚状体诱导培养基上经过连续培养, 还获得了胚性愈伤组织。将获得的胚状体接种于生芽培养基上, 能够再生出苗。将这些小苗在生芽培养基上进行扩繁, 获得大量材料, 供超低温保存研究。

### 2.2 预培养对超低温保存后成活率的影响

前人研究表明, 预培养对提高植物材料超低温保存的成活率具有很大的影响<sup>[8]</sup>。通过试验发现, 所试品种茎尖用低温预培养和山梨醇预培养, 均未能提高超低温保存后材料的成活率, 而用 5 % DMSO 进行预培养, 则可大幅度提高, 而且预培养时间对成活率具有决定性的影响。随着预培养时间的延长, 超低温保存后成活率有升高的趋势。从表 2 中看出, 预培养 3 d 后, 枳壳和红肉脐橙的超低温保存后成活率均达到 100 %, 分别预培养 4 d 和 6 d 后, 椪柑和 439 亦有 100 % 的成活率。但预培养时间超过 3 d, 材料的下部有黄化脱

表 1 不同基因型未受精胚珠胚状体发生率及出愈率

Table 1 The percentage of embryogenesis and embryogenic calli derived from unfertilized ovules of different genotype

品种或类型 Cultivars or types	接种数 No. of inoculation	产生胚状 体数 No. of induced embryoid	胚状体发 生率 Percent of embryoids (%)	出愈率 Percent of callus (%)
枳壳 <i>Poncirus</i>	60	30	50	0
红肉脐橙	60	48	80	25
Cara cara				
椪柑 Ponkan	60	33	55	25
439	60	15	25	0

叶现象发生，4 d 后则有部分材料开始死亡，原因是 DMSO 对材料生长有毒害作用。随预培养时间增加，一方面可能使细胞的生理状态发生利于超低温保存的变化，使胞内保护性物质增多，另一方面也可能起到一种筛选作用，使较弱的材料受不了 DMSO 的毒害而死亡，而能经受起 DMSO 毒害的材料较强壮，因此超低温保存后成活率较高。总的情况是随预培养时间的延长，预培养成活率降低，但超低温保存后成活率升高。综合考虑，预培养时间以 3~6 d 为好，最多不能超过 1 周。

表 2 柑桔经 5 %二甲基亚砷不同预培养时间对超低温保存后成活率的影响

Table 2 Effect of different time of preculture in 5 %DMSO medium on the survival rate after cryopreservation

品种或类型 Cultivars or types	预培养时间 Preculture time (d)	成活率 Survival rate (%)	品种或类型 Cultivars or types	预培养时间 Preculture time (d)	成活率 Survival rate (%)
枳壳 Poncirus	0	50.00	椪柑 Ponkan	0	33.33
	1	80.00		1	80.00
	2	95.00		2	86.67
	3	100.00		3	90.00
	4	100.00		4	100.00
	5	100.00		5	100.00
	6	100.00		6	100.00
红肉脐橙 Cara cara	10	100.00	439	10	100.00
	0	13.33		0	10.00
	1	66.67		1	18.33
	2	95.00		2	26.67
	3	100.00		3	33.33
	4	100.00		4	50.00
	5	100.00		5	70.00
	6	100.00		6	100.00
	7	100.00		10	100.00

注：表中所列为 TTC 法检测结果。

Note: The result in the table were obtained from TTC examination.

2.3 预处理时间对超低温保存后成活率的影响

据研究，有些植物茎尖在用玻璃化溶液（PVS）快速脱水之前，有一个所谓装载（loading）的过程，即用一个较高浓度的冷冻保护剂混合液于室温下预处理一定时间，以进一步降低组织含水量，避免由于渗透压变化剧烈对材料所造成的伤害。本试验用 60 % PVS<sub>2</sub> 进行装载，成活率与对照（预处理 0 min）相比有较大提高（表 3）。所试 4 个品种或类型均在 30 min 的预处理中获得最大的成活率，TTC 检测成活率达到 100 %；低于 20 min，由于装载时间过短而未能完全达到缓冲的作用，材料不易成活；超过 40 min，则由于溶液对材料的毒害而使成活率又有所下降。一般来讲，室温较高时 20 min 较为适宜，室温低时（冬季）可适当延长为 30 min。

2.4 PVS<sub>2</sub> 处理时间对超低温保存后成活率的影响

PVS<sub>2</sub> 处理的目的是脱去材料中过多的水分，使材料能够完全达到玻璃化，并使冷冻保护液渗入细胞，减轻在超低温保存过程中细胞所受到的伤害。试验发现，由于 PVS 的毒害作用较大，在室温下用 PVS<sub>2</sub> 处理，材料容易死去，故在 0 用 PVS<sub>2</sub> 处理。枳壳和 439 在 50 和 60 min 两个处理时间内都达到 100 %的成活率，而红肉脐橙和椪柑也在 60 min

的处理时间下达到最高的成活率。如表 4 所示, 处理时间少于 50 min, 则材料脱水不够, 在降温过程中不能迅速达到玻璃化状态, 因而不易成活; 处理时间超过 60 min, 材料由于受 PVS 的毒害, 成活率反而又有所降低。不同材料对 PVS 的忍受力不同, 其中枳壳较能忍受, 时间延长至 80 min 仍有 88.67 % 的成活率。

表 3 柑桔经 60 %玻璃化溶液 2 不同装载时间  
对超低温保存后成活率的影响

Table 3 Effect of time of loading with 60 % PVS<sub>2</sub>  
on the survival rate after cryopreservation

品种或类型 Cultivars or types	装 载 时 间 Loading time (min)	成 活 率 Survival rate (%)
枳 壳 <i>Poncirus</i>	0	38.33
	10	50.00
	20	86.67
	30	100.00
	40	90.00
红肉脐橙 <i>Cara cara</i>	0	18.33
	10	48.33
	20	83.33
	30	100.00
	40	83.33
椪柑 <i>Ponkan</i>	0	36.67
	10	45.00
	20	90.00
	30	100.00
	40	71.67
439	0	33.33
	10	43.33
	20	91.67
	30	100.00
	40	76.67

注：同表 2。Note：Same with Table 2.

表 4 柑桔经玻璃化溶液 2 处理不同时间  
对超低温保存后成活率的影响

Table 4 Effect of time of treatment with PVS<sub>2</sub>  
on the survival rate after cryopreservation

品种或类型 Cultivars or types	处 理 时 间 Treatment time (min)	成 活 率 Survival rate (%)
枳 壳 <i>Poncirus</i>	10	18.33
	20	81.67
	30	86.67
	40	95.00
	50	100.00
	60	100.00
	70	93.33
	80	88.67
红肉脐橙 <i>Cara cara</i>	10	13.33
	20	23.33
	30	58.33
	40	85.00
	50	96.67
	60	100.00
	70	91.67
	80	76.67
椪柑 <i>Ponkan</i>	10	23.33
	20	28.86
	30	73.33
	40	85.00
	50	93.33
	60	96.67
	70	90.00
	80	76.67
439	10	20.00
	20	71.67
	30	81.67
	40	86.67
	50	100.00
	60	100.00
	70	88.33
	80	73.33

注：同表 2。Note：Same with Table 2.

2.5 材料大小对超低温保存后成活率的影响

材料大小对脱水的难易影响很大。材料体积大, 不利于脱水, 但容易再生; 体积小, 易于脱水, 但不易再生, 而且冷冻保护剂对材料的毒害较大, 从而影响成活率。本研究试 4 个品种或类型茎尖长度在 2 ~ 2.5 mm 范围内均得到较高的成活率, 平均达 96.25 % (表 5); 而茎尖长度在 1 ~ 1.5 mm 时, 成活率平均为 41.89 %, 3 ~ 3.5 mm 时平均成活率为 51.25 %。因此, 在进行保存时, 一定要注意材料的大小。

2.6 材料培养再生及其形态发生

材料成活和再生率因品种不同差异很大。一般来说, 同一品种比较健壮的材料较易成

活和再生。进行再生培养时, 如果保存后未用蔗糖 1.2 mol/L 洗涤, 则材料全部死亡, 如用无菌水洗, 则再生率较用蔗糖洗涤的低。如果培养基中不加细胞分裂素, 则再生率很低。保存后暗培养一段时间, 有利于材料的恢复生长。对培养成活的植株形态发生进行观察, 调查了 50 个再生植株, 发现 50 % 是从茎尖萌发成株, 10 % 侧芽再生, 40 % 的顶芽和侧芽均萌发, 大部分材料除芽成活外, 其它部分在培养过程中褐化死亡, 这与在用 TTC 检测时发现有的茎尖只是顶芽或侧芽的部位变红, 而其它部分仍保持绿色相一致。再生是通过器官发生途径, 未经过愈伤阶段, 因此发生变异的机率较小。按优化的方法, 即预培养 3 d, 取 2.5 mm 长的茎尖, 用 60 % PVS<sub>2</sub> 装载 30 min, PVS<sub>2</sub> 处理 60 min, 换上新鲜的 PVS<sub>2</sub>, 然后投入液氮中, 24 h 后化冻, 用蔗糖 1.2 mol/L 培养基洗涤, 进行再生培养, 实际培养再生率, 枳壳 90 %, 红肉脐橙 30 %, 椪柑 25 %, 439 为 20 %。再生苗移入生根培养基后能正常生根, 尚未观察到形态变异的发生, 再生苗移栽于温室后能够成活。

### 3 讨论

许多柑桔品种的种子不能进行长期保存, 并且很多品种的种子败育, 成年态柑桔芽的离体培养存在再生难的问题。这就要求在进行离体保存时找到一种合适的途径获得离体培养材料, 既要易于获得, 又要保持品种的遗传特性。大多数柑桔品种的成熟果实中都有未受精胚珠存在, 通过培养这些未受精胚珠获得离体材料, 利于种质的采集和交流<sup>[6]</sup>, 而且未受精的胚珠是通过体细胞胚胎发生途径再生植株, 能够保持原来品种的特性。前人研究和本试验结果表明, 通过未受精胚珠离体培养, 大多数柑桔品种能够通过胚状体途径获得再生材料, 且不携带病毒。所以, 用成熟果实未受精胚珠培养获得胚状体并再培养成株, 是进行柑桔离体保存时获得离体材料理想途径。

柑桔离体材料的超低温保存研究多集中在胚性愈伤组织的保存上。多数研究表明, 愈伤组织中存在着很多变异, 不是种质保存最理想的材料<sup>[9]</sup>, 而通过茎尖培养再生成株, 不经愈伤组织阶段, 减少了发生变异的机率, 因此茎尖可作为种质保存的理想材料。Gonzalez-Arno 用包埋干燥法进行了枳壳茎尖的超低温保存, 成活率最高可达 50 %, 而且需要程序控温仪<sup>[10]</sup>。本研究用玻璃化法对柑桔茎尖进行超低温保存, 枳壳茎尖保存后再生率达到 90 %, 而且不需程序控温仪, 方法简便, 易于操作。本研究结果表明, 不同品种再生情况差异较大, 除枳壳外, 所试验的其它 3 个品种, 虽然 TTC 染色检测成活率达

表 5 柑桔茎尖大小对超低温保存后成活率的影响

Table 5 Effect of size of the shoot-tips on the survival rate after cryopreservation

品种或类型 Cultivars or types	茎尖大小 Size of shoot-tips (mm)	成活率 Survival rate (%)
枳壳 <i>Poncirus</i>	1 ~ 1.5	43.33
	2 ~ 2.5	100.00
	3 ~ 3.5	53.33
红肉脐橙 <i>Cara cara</i>	1 ~ 1.5	41.67
	2 ~ 2.5	91.67
	3 ~ 3.5	58.33
椪柑 <i>Ponkan</i>	1 ~ 1.5	33.33
	2 ~ 2.5	93.33
	3 ~ 3.5	51.67
439	1 ~ 1.5	48.33
	2 ~ 2.5	100.00
	3 ~ 3.5	41.67
平均 <i>Average</i>	1 ~ 1.5	41.89
	2 ~ 2.5	96.25
	3 ~ 3.5	51.25

注: 同表 2。Note: Same with Table 2.

100%，但再生率却很低。一方面，可能是 TTC 检测只是以过氧化脱氢酶的活力为标准，而材料的损伤程度不能仅以此为准；另一方面，也可能是在进行超低温保存后培养时，材料未达到超低温保存后恢复生长的要求。另外，超低温保存后再生能力也可能与品种抗寒性有关，所试 4 个品种中，枳壳是柑桔类植物中最抗寒的类型，而其它 3 个品种抗寒性均不强。因此，还需要进行深入研究优化条件，最终达到实用化。另外，液氮超低温保存时间长短可能不是影响超低温保存效果的因素，在液氮条件下保存 2 个月，解冻后再生率与保存 24 h 没有显著差异，这和前人的研究结果相同。这是因为在液氮条件下，生命活动几乎完全停止，处于相对稳定状态，这也是超低温保存得以应用的主要依据。

### 参考文献：

- 1 肖洁凝, 黄学林. 茎尖和芽的超低温保存. 生物工程进展, 1999, 19 (5): 46 ~ 51
- 2 Takagi H, Thinh N T, Kyesmu P M. Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification. Acta Hort., 1998, 461: 485 ~ 490
- 3 王君晖, 黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述. 园艺学报, 1994, 21 (3): 277 ~ 282
- 4 张玉进, 张兴国, 刘佩瑛, 等. 植物茎尖的玻璃化冻存研究. 武汉植物学研究, 1999, 17 (增刊): 78 ~ 82
- 5 Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* sb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports, 1990, 9: 30 ~ 33
- 6 霍合强, 郝玉金, 邓秀新. 宽皮柑橘品种的胚性愈伤组织诱导. 实验生物学报, 1999, 32 (3): 289 ~ 295
- 7 李广武, 郑从义, 唐 兵. 低温生物学. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1997. 300 ~ 304
- 8 Tskagi H, Tinh N, Islam O M, et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of vitrification procedure. Plant Cell Reports, 1997, 16: 594 ~ 599
- 9 Peschke V M, Phillips R L. Genetic implication of somaclonal variation in plants. Adv. Genet., 1992, 30: 41 ~ 75
- 10 Gonzalez-Arnavo M T, Engelmann F, Urra C, et al. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. Proc. Barcelona: Cryo 97 34th Annual meeting of society for cryobiology, 1997. 8 ~ 12

## Cryopreservation of Citrus Shoot-tips by Vitrification and Regeneration

Wang Zicheng and Deng Xiuxin

(National Key Laboratory of Crops Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract :** A procedure had been studied on cryopreservation of citrus shoot-tips in vitro by vitrification. Shoot-tips of citrus about 10 mm were precultured for 3 days in MT medium supplemented with 5 % DMSO. The excised shoot-tips, 2 - 2.5 mm in length, were loaded with 60 % PVS<sub>2</sub> for 20 - 30 min at room temperature, and were exposed to PVS<sub>2</sub> at 0 °C for 50 - 60 min. Followed by changing the solution with fresh PVS<sub>2</sub>, the shoot-tips were immersed into LN directly, and kept for 24 h. After rapid thawing in a water bath at 40 °C, the shoot-tips were washed with 1.2 mol/L sucrose solution for twice and transferred onto MT medium supplemented with BA 1.0 mg/L. The cultures were kept in dark for one week prior to exposure to the light. Survival rate of shoot-tips of *Poncirus trifoliata* was 100 % by TTC examination, and regeneration rate reached to 90 %. The plantlets rooted normally and survived after transplantation. No morphological difference between the regenerated plantlets and the control was observed.

**Key words :** Citrus; Shoot-tips; Cryopreservation; Vitrification