

玻璃化法超低温保存猕猴桃离体茎尖及其植株再生

徐小彪¹ 辜青青¹ 蔡祖国^{1*} 邓小梅² 张秋明³

(¹江西农业大学农学院, 江西南昌 330045; ²江西林业科学院生物技术研究所, 江西南昌 330032; ³湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 以中华猕猴桃矮型种质为离体培养材料, 建立试管无性系, 对其离体茎尖的玻璃化法超低温保存技术进行研究, 探讨猕猴桃种质长期保存的适宜途径。结果表明, 含 1~2 个叶原基 (1.5~2.5 mm) 的茎尖, 在 5% 二甲基亚砷 (DMSO) + 5% 蔗糖 + MS 培养基上预培养 4 d 后, 于室温下用 2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖预处理 30 min, 再在 0℃ 下用玻璃化液 (PVS₂) 脱水处理 40 min 并迅速投入液氮中, 保存 24 h 后接种至继代培养基上再培养, 成活率和再生率分别为 56.7% 和 51.6%。再生植株生根后可移栽成活。

关键词: 猕猴桃; 茎尖; 玻璃化法; 超低温保存

中图分类号: S 663.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0842-03

Cryopreservation of in Vitro Cultured Kiwifruit Shoot-tips by Vitrification and their Regeneration

Xu Xiaobiao¹, Gu Qingqing¹, Cai Zuguo¹, Deng Xiaomei², and Zhang Qiuming³

(¹Agronomy College of Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China; ²Institute of Biotechnology Research, Jiangxi Academy of Forestry Sciences, Nanchang, Jiangxi 330032, China; ³College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Experiments were conducted to provide an appropriate means for long-term preservation of kiwifruit germplasm using cryopreservation by vitrification. Shoot-tips of a dwarf genotype of kiwifruit were cultured in vitro to obtain aseptic clones. The results showed that shoot-tips 1.5 - 2.5 mm in length with one or two leaf primordium were precultured in 5% DMSO + 5% sucrose + MS medium for 4 days. Pretreated shoot-tips with 2 mol/L glycerol + 0.4 mol/L sucrose for 30 min at room temperature, followed by dehydration with PVS₂ (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.4 mol/L sucrose) for 40 min at 0℃ and rapidly put into liquid nitrogen for 24 h. The defrosted shoot-tips were then inoculated onto subculture medium. The survival and regeneration rate of shoot-tips treated in this way was 56.7% and 51.6% respectively. The plantlets could normally root and survive after transplanting.

Key words: Kiwifruit; Shoot-tip; Vitrification; Cryopreservation

1 目的、材料与方法

猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch) 以种子保存后代性状易发生分离; 田间活体保存难以避免自然灾害和病虫害; 常规的离体保存方法需经常继代, 容易污染和发生体细胞变异, 故选择超低温技术来保存猕猴桃种质具有实际意义。玻璃化法超低温保存已成功应用于柑橘^[1]、柿^[2]、番木瓜^[3]、扁桃^[4]、樱桃^[5]等组织和细胞保存。现以矮型中华猕猴桃特异种质为材料, 研究玻璃化法超低温保存离体茎尖的方法和途径, 以期猕猴桃资源的可持续利用提供借鉴。

供试材料为中华猕猴桃矮型种质 ‘赣猕 5 号’, 以离体培养的试管无性系为材料进行超低温保

收稿日期: 2005 - 05 - 24; 修回日期: 2005 - 09 - 19

基金项目: 江西省科技厅重点科研资助项目 (963007)

*现工作单位河南科技学院园艺系

存。于 7 月中旬选取生长健壮的当年生幼嫩茎段 (长约 10 cm), 4 ℃ 下保存 5 d 后用洗洁精溶液浸泡 5 min, 70% 的酒精漂洗 30 s, 无菌水冲洗 1 次, 用 0.1% 的升汞灭菌约 10 min 后无菌水冲洗 4~6 次, 置于无菌滤纸上, 将其切成 1.0~1.5 cm 的单芽茎段, 迅速接种于诱导培养基 (MS+BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L) 上, 每瓶接种 1~2 个外植体。增殖培养基为 MS+BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 生根培养基为 1/2 MS + BA 0.5 mg/L。

低温锻炼: 选取继代 20 d 的猕猴桃嫩梢 (长约 1 cm), 继代到含蔗糖 3% 的 MS (1/2N) 培养基上, 5 ℃ 低温下锻炼 6 周; 经低温锻炼的猕猴桃嫩梢, 在解剖镜下切取含有 1~2 个叶原基的茎尖 (长 1.5~2.5 mm), 于 5% DMSO + 5% 蔗糖 + MS 培养基上进行预培养^[1,3], 预培养时间依处理不同而异。每处理 20 个茎尖, 3 次重复。预培养后的茎尖转移到 1.8 mL 的冷冻管中, 每管 10 个, 室温下加入装载液 (2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖) 处理 30 min^[2,3]之后用 PVS₂^[6]溶液于 0 ℃ 下处理不同的时间。移去原液, 换 1 次新鲜的 PVS₂溶液, 然后将冷冻管装在金属套 (2 管) 上迅速投入到液氮中。每处理 2 管共 20 个茎尖, 3 次重复; 保存 24 h 后, 从液氮中取出冷冻管, 于 40 ℃ 下迅速化冻 1 min, 用 1.2 mol/L 的蔗糖 + MS 培养基洗涤 2 次, 每次 10 min。然后取出茎尖转入继代培养基上进行再培养, 1 周后统计其成活率 (茎尖颜色恢复为绿色, 部分长芽的茎尖占总茎尖数的百分率), 1 个月后统计其植株再生率 (再生成嫩梢的茎尖数占总茎尖数的百分率)^[3]。转入到生根培养基上诱导生根后移入温室炼苗。

2 结果分析与讨论

2.1 预培养对猕猴桃茎尖超低温保存效果的影响

预培养对提高超低温保存后的成活率有较大的影响。本试验表明, 猕猴桃离体茎尖于 5% DMSO + 5% 蔗糖 + MS 培养基上分别预培养 0~7 d 对超低温保存后的效果有显著影响 (表 1)。在预培养初期 (1~4 d), 成活率逐渐增加, 但后期 (5~7 d) 迅速下降。预培养 4 d 以后, 由于 DMSO 的毒害作用, 材料叶片开始变黄、脱落, 7 d 后叶片全部变黄, 此时剥下茎尖进行再培养, 不能再生。预培养以 4 d 最佳, 成活率和再生率分别达 52.4% 和 50.2%。

表 1 不同预培养时间对猕猴桃茎尖超低温保存效果的影响

Table 1 Effect of different preculture time on cryopreservation of kiwifruit shoot-tips (%)

预培养时间 Preculture time (d)	成活率 Survival rate	再生率 Regeneration rate
1	12.2 ±6.1a	8.7 ±4.9a
2	8.7 ±8.9b	25.3 ±7.3b
3	43.6 ±9.5d	40.9 ±9.2d
4	52.4 ±9.8e	50.2 ±9.6e
5	42.5 ±9.7d	39.7 ±7.7d
6	31.7 ±8.7c	28.5 ±6.4c
7	26.6 ±7.6b	23.8 ±5.3b

表 2 不同 PVS₂ 处理时间对猕猴桃茎尖超低温保存效果的影响

Table 2 Effect of different treatment time with PVS₂ on cryopreservation of kiwifruit shoot-tips (%)

PVS ₂ 处理时间 PVS ₂ treatment time (min)	成活率 Survival rate	再生率 Regeneration rate
10	11.5 ±6.8a	9.2 ±4.3a
20	16.8 ±7.5b	14.6 ±5.7b
30	49.2 ±9.2d	46.8 ±7.8d
40	56.7 ±9.6e	51.6 ±9.0e
50	46.6 ±9.8d	43.5 ±7.8d
60	21.9 ±7.8c	18.7 ±5.7c

2.2 PVS₂ 处理对猕猴桃茎尖超低温保存效果的影响

PVS₂ 溶液处理可以进一步使组织脱水, 由于 DMSO 等对脂溶性物质有很大的穿透力, 使一些易形成玻璃化状态的分子 (DMSO、EG、Gly) 很快进入到茎尖组织, 一旦快速冷冻, 茎尖组织形成玻璃化状态, 可以减轻伤害, 成活率得以提高^[1]。但 DMSO 等会对材料造成伤害, 不同程度地降低成活率, 低温 (0 ℃) 比室温可以减少该溶液对材料的毒害^[2]。由表 2 可知, 将预培养 4 d 的经 2 mol/L Gly + 0.4 mol/L 蔗糖预处理 30 min 的茎尖, 置于 PVS₂ 溶液中处理, 40 min 的最佳, 成活率和再生率分别为 56.7% 和 51.6%。

2.3 猕猴桃超低温保存后再生植株的形成

离体茎尖液氮中保存 24 h 后, 于 40 ℃ 下迅速化冻。用 1.2 mol/L 的蔗糖 + MS 培养基洗涤 2 次,

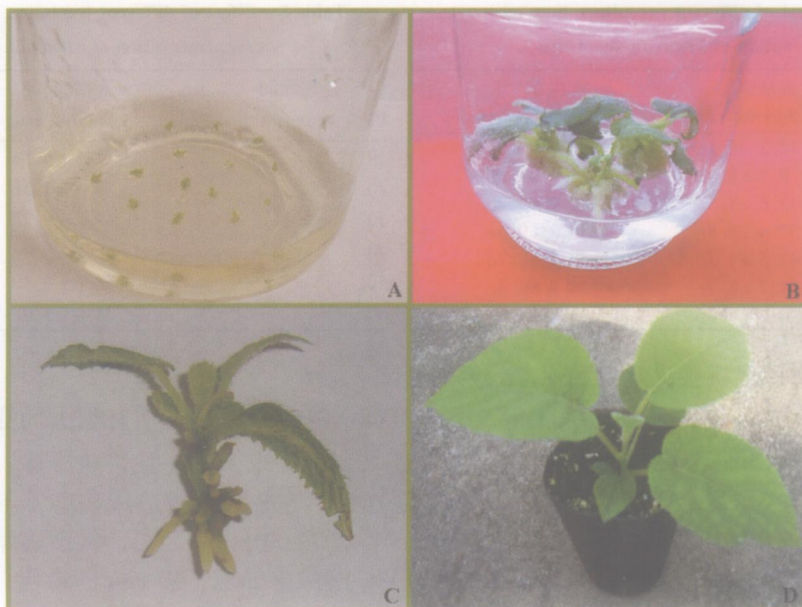
每次 10 min。然后转入继代培养基上进行再培养, 1 周后可获得 56.7% 的成活率, 1 个月后其植株再生率为 51.6%。解冻后进行恢复培养 2 周, 茎尖叶原基处长出新芽 (图版, A)。继代培养 12 周, 大部分茎尖萌发幼苗 (图版, B), 几乎没有愈伤组织的形成。最后将再生植株转入到生根培养基上进行生根培养 (图版, C), 生根后移入到温室中炼苗 (图版, D)。

猕猴桃茎尖超低温保存较适宜的程序为: 继代 20 d 的 1 cm 长嫩梢, 接种到含蔗糖 3% 的 MS 培养基上, 5 ℃ 低温下锻炼 6 周。切取 1.5 ~ 2.5 mm 的茎尖, 于 5% DMSO + 5% 蔗糖 + MS 基本培养基上预培养 4 d, 在室温下用 2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖预处理 30 min, 再于 0 ℃ 下用 PVS₂ 脱水处理 40 min, 换一次新鲜的 PVS₂ 溶液后, 迅速投入到液氮中。保存 24 h 后, 在 40 ℃ 水浴中化冻, 用 3% 蔗糖 + MS 基本培养基洗涤两次后接种到恢复培养基上, 可获得 56.7% 的成活率和 51.6% 的再生率。

体细胞无性系变异在组织培养中常常存在, 因此, 有必要进一步从染色体倍性、细胞的超微结构和 DNA 分子标记等对超低温保存后的体细胞无性系变异进行探讨。

参考文献:

- 1 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生. 园艺学报, 2001, 28 (4): 301 ~ 306
Wang Z C, Deng X X. Cryopreservation of in vitro *Citrus* shoot-tips by vitrification and its regeneration. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28 (4): 301 ~ 306 (in Chinese)
- 2 艾鹏飞, 罗正荣. 柿休眠芽茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生. 中国农业科学, 2003, 36 (5): 553 ~ 556
Ai P F, Luo Z R. Cryopreservation of dormant shoot-tips of persimmon by vitrification and plant regeneration. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36 (5): 553 ~ 556 (in Chinese)
- 3 曾继吾, 易干军, 张秋明. 番木瓜茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生. 园艺学报, 2004, 31 (1): 29 ~ 33
Zeng J W, Yi G J, Zhang Q M. Cryopreservation of in vitro papaya shoot-tips by vitrification technique and its regeneration. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (1): 29 ~ 33 (in Chinese)
- 4 Chockisit C, Graham C, Terry B. Cryopresevation of in vitro almond shoot tips by vitrification. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2000, 75 (2): 228 ~ 232
- 5 Niino T, Tashiro K, Suzuki M, Ohuchi S, Magoshi J, Akihama T. Cryopresevation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. Scientia Horticulturae, 1997, 70: 155 ~ 163
- 6 Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. Plant Cell Reports, 1990, 9: 30 ~ 33



图版说明: A. 超低温保存后茎尖直接成芽; B. 丛生幼苗; C. 生根苗; D. 再生苗炼苗。

Explanation of plates: A. Buds regenerated from cryopreserved shoot-tips; B. Cluster seedlings; C. Rooted plantlet; D. Regenerating plantlets in green-house