

枇杷茎尖二步玻璃化法超低温保存的研究

王家福¹, 刘月学², 林顺权²

(1. 福建农林大学园艺学院园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

A study on cryopreservation of *Eriobotrya japonica* shoot-tips by two steps vitrification WANG Jia-fu¹, LIU Yue-xue², LIN Shun-quan² (1. Horticultural College, Bio-engineering Institute of Horticultural Plants, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Horticultural College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(2): 75-76

Abstract: A procedure on cryopreservation of shoot-tips of *Eriobotrya japonica* Lindl. had been studied *in vitro* by two steps vitrification. The effects of cold-hardening, preculture, cryoprotectant treatment, thawing and reculture on survival rate of the shoot-tips were tested. Optimal media for shoot-tip induction and propagation were 1/2 MS + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L⁻¹ NAA and MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ NAA. Preculture for 30 min with 60% PVS₂ (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.4 mol · L⁻¹ sucrose) and treatment for 50 min by PVS₂ were suitable to shoot-tip cryopreservation. After cryopreservation some shoot-tips could regenerate plantlets, the regenerate rate was 46.8%. There was no difference in regenerating plantlets and tube plantlets not stored by cryopreservation.

关键词: 枇杷; 茎尖; 超低温保存; 玻璃化法

Key words: loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.); shoot-tip; cryopreservation; vitrification

中图分类号: S667.3; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)02-0075-02

超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存最理想的方法,而近几年发展的玻璃化超低温保存法具有设备要求简单、材料处理步骤简便及效果和重演性好等特点,倍受人们的青睐。国内外用玻璃化法成功地保存许多果树的种质资源^[1-4]。在对枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)花粉超低温保存取得成功^[5]的基础上,作者进行了枇杷茎尖玻璃化超低温保存的研究,以期建立枇杷茎尖超低温保存体系,为长期稳定保存枇杷种质资源提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

供试枇杷品种为‘解放钟’,取自福建农林大学园艺学院果树基地。

1.2 方法

1.2.1 取材与培养 取健康成年枇杷树的嫩梢,除去叶片,用饱和漂白粉溶液处理 30 min,再用 0.1% 升汞消毒 8 min,无菌水冲洗,接种至诱导培养基上,待茎尖抽芽至一定高度后,转移到增殖培养基上,4 周后取其茎尖进行保存实验。

1.2.2 预培养 切取长约 10 mm 的幼芽,接种于含 5% DMSO(二甲亚砷)、2 mg · L⁻¹ 6-BA 和 5% 蔗糖的 MS 培养基上,于 12℃ 条件下预培养 2 周。

1.2.3 保存 切取长约 2~4 mm 的茎尖,室温条件下加入 60% 的玻璃化保护剂 PVS₂(0.15 mol · L⁻¹ 蔗糖液体培养基与 PVS₂ 溶液的体积比为 40:60),处理不同时间,吸去保护剂后再加入 PVS₂(含 30% 甘油、15% 乙二醇、15% 二甲亚砷和 0.4 mol · L⁻¹ 蔗糖),于 0℃ 下处理不同时间后,吸去保护

剂,再重新加入 PVS₂ 保护剂,立即置于 -17℃ 处理若干小时至过夜,然后用纱布包裹后投入液氮保存。

1.2.4 化冻 经上述处理的茎尖于液氮中保存 24 h 后取出,立即于 37℃ 恒温水浴中化冻 2~3 min。化冻后用含 1.2 mol · L⁻¹ 蔗糖的 MS 培养液小心洗涤 2 次,每次 10 min。

1.2.5 再生培养 将化冻后的茎尖转入含 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.5 mg · L⁻¹ NAA 的 MS 培养基中继代培养。第 1 周暗培养,后转入正常光照条件下培养,茎尖逐渐恢复生长,部分茎尖可形成小苗,再生植株。实验重复 5 次。

2 结果和分析

2.1 消毒方法对枇杷茎尖超低温保存的影响

枇杷茎尖的消毒处理方法对茎尖成活率影响很大。只用升汞消毒的茎尖成活率很低,仅为 10% 左右。如果采用二步消毒法,在升汞消毒前,用漂白粉溶液处理,可显著提高茎尖成活率,成活率可达 70% 以上。用漂白粉溶液进行处理,可抑制茎尖褐化,同时 2 种消毒剂互相配合,消毒更彻底,从而降低了污染率。

茎尖在不加植物生长调节剂的培养基上很难生长,加入适量的 6-BA 和 NAA 可促进茎尖生长,而且,在茎尖培养中,无机盐浓度也不宜太高,因而,最适合枇杷茎尖诱导的培养基为含 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.5 mg · L⁻¹ NAA 的

收稿日期: 2005-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970528)

作者简介: 王家福(1947-),男,福建福清人,大学,研究员,主要从事园艺植物生物技术的教学和研究。

1/2MS培养基,小芽增殖培养基为含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基。

2.2 预培养对枇杷茎尖超低温保存后成活率的影响

预培养对超低温保存后植物的成活率有很大的影响^[4]。枇杷茎尖在含5% DMSO、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和5%蔗糖的MS培养基上于 12°C 预培养约1周,可明显提高超低温保存后的成活率,而且预培养时间对成活率具有决定性的影响。从表1可看出,预培养3 d,成活率仅10.1%;预培养7 d,成活率最高达到52.3%;但预培养超过7 d,成活率不再升高,且有部分茎尖死亡,原因是DMSO对植物的生长有毒害作用。综合考虑,预培养时间以5~7 d为好,最多不超过10 d。

表1 不同预培养时间对枇杷茎尖超低温保存后成活率的影响
Table 1 Effect of different times of preculture on the survival rate of shoot-tip of *Eriobotrya japonica* Lindl. after cryopreservation

预培养时间/d	Preculture time	成活率/%	Survival rate
3		10.1	
4		18.3	
5		25.2	
6		35.9	
7		52.3	
8		44.3	

2.3 预处理时间对枇杷茎尖超低温保存后成活率的影响

有些植物茎尖在用玻璃化液(PVS)快速脱水之前,需要用较高浓度的冷冻保护剂混和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植物细胞所造成的伤害^[6]。表2结果表明,用60% PVS₂预处理,枇杷茎尖的成活率明显高于对照,预处理30 min成活率最高;低于20 min,由于预处理时间过短而未能完全达到缓冲作用,茎尖不易成活;超过40 min,则由于溶液对茎尖的毒害而使成活率有所下降。一般来讲,室温较高时以20 min较为适宜,室温低时可适当延长至30 min。

表2 60% PVS₂预处理对枇杷茎尖超低温保存后成活率的影响
Table 2 Effect of pretreatment with 60% PVS₂ on the survival rate of shoot-tip of *Eriobotrya japonica* Lindl. after cryopreservation

预处理时间/min	Pretreatment time	成活率/%	Survival rate
0		15.2	
10		18.3	
20		35.7	
30		52.3	
40		40.1	

2.4 PVS₂处理时间对枇杷茎尖超低温保存后成活率的影响

用PVS₂处理植物材料的目的是脱去细胞中过多的水分。控制脱水温度和脱水时间是非常重要的,直接影响植物的存活率^[9]。实验结果表明, 0°C 的长时间处理可以充分发挥保护剂的脱水作用和降低其负面影响。枇杷茎尖PVS₂处

理时间以50 min为宜,最高成活率可达50.3%(表3);少于50 min,则茎尖脱水不完全,在降温过程中,不能迅速达到玻璃化状态,茎尖不易成活;超过50 min,茎尖受到PVS₂的毒害,茎尖也不易成活。

表3 PVS₂处理时间对枇杷茎尖超低温保存后成活率的影响
Table 3. Effect of different times of treatment with PVS₂ on the survival rate of shoot-tip of *Eriobotrya japonica* Lindl. after cryopreservation

处理时间/min	Treatment time	成活率/%	Survival rate
10		15.9	
20		23.4	
30		35.6	
40		48.9	
50		50.3	
60		45.3	
70		43.6	

2.5 枇杷茎尖的解冻与再培养

枇杷茎尖于液氮中保存24 h后取出,立即于 37°C 恒温水浴中化冻2~3 min。由于解冻速度快,对茎尖的损伤较轻,存活率也较高。

化冻后需用含 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的MS培养液小心洗涤茎尖,这一过程不仅可除去高浓度保护剂对细胞的毒害,而且也是一个后过渡过程,以防渗透损伤。

经洗涤后的茎尖转入含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基中培养,茎尖可逐渐恢复生长。少数茎尖有愈伤组织生成,但未能直接长成苗,茎尖成活率为53.2%;部分茎尖可形成小苗,再生植株,再生率为46.8%。实验结果表明,保存的茎尖在恢复生长初期,在黑暗或弱光条件下培养一段时间,有利于茎尖恢复生长。再生植株移栽成活后,生长正常,未发现变异现象,与未经超低温保存的试管苗没有差异,染色体检查也未发现染色体异常。

参考文献:

- [1] Niino T, Yakuwa H. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 28: 261-266.
- [2] 赵艳华, 吴永杰. “品丽珠”葡萄离体茎尖超低温保存的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 62-64.
- [3] 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[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 553-556.
- [4] 王子成, 邓秀新. 玻璃化超低温保存柑橘茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306.
- [5] 王家福, 刘月学, 林顺权. 枇杷干冻法超低温保存研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(1): 1-2, 20.
- [6] 王君晖, 黄纯农. 玻璃化法——园艺植物茎尖和分生组织超低温保存的新途径[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 277-282.