

苹果休眠茎尖的超低温保存研究^{*}

吴永杰

(河北省农林科学院昌黎果树研究所

赵艳华

河北果树无病毒苗木研究室, 昌黎 066600)

周明德

(国际植物遗传资源研究所驻东亚地区办事处, 北京)

摘 要 苹果金冠品种的休眠茎尖经 3 种不同方法(玻璃化法、包埋-干燥法和两步降温法)超低温保存后,均获得成功,存活率达到了 83%。休眠茎尖由于经受了冬季的深冷驯化和具有较低的含水量,因而成为超低温保存的良好试材。经过玻璃化液(PVS3: 50% 甘油 + 50% 蔗糖)预处理 80min (25℃ 条件下)后或经蔗糖溶液预培养并于无菌空气中干燥脱水至含水量 30% 左右后,休眠茎尖可直接投入液氮进行超低温保存。保存后的休眠茎尖经离体培养后可直接再生植株。试验进一步验证了试材生理状态的选择是超低温保存成功的一个关键因素,这不仅可以简化超低温保存的程序,而且可以提高此方法的实用性,为早日建立植物种质的超低温保存库奠定了基础。

关键词 苹果 休眠茎尖 超低温

从 Quatrano^[1]首次报道植物细胞的超低温保存取得成功后,超低温保存技术以其特有的安全、稳定和低消耗等特点,在植物种质的长期保存上逐渐显示出其不可替代的优越性。至今此技术已在约 70 种植物的组织或器官上获得应用。就苹果而言,虽然种子和花粉的超低温保存技术已取得较大进展,然而其茎尖分生组织的超低温保存技术仍须进一步研究。Sakai^[2]等首先研究了苹果休眠枝的超低温保存。指出深冷驯化(采于 12 月份)的苹果休眠枝条经过液氮(-196℃)保存后仍能存活。在此基础上,Stushnoff 等^[3],Tyler 等^[4~6]进一步研究了影响苹果休眠枝超低温保存的因素。他们认为,苹果休眠枝超低温保存成功与否与休眠枝冷驯化程度及枝条含水量相关,经过深冷驯化(12 月后)和低温干燥至一定的含水量(约 20% ~ 30%)是休眠枝超低温保存成功的关键。Manabu 等^[7]在超低温保存试验中,为了克服休眠枝超低温保存后存活率检测上的缺陷,首次以苹果休眠芽为试材,将液氮保存后的休眠芽接种在无菌培养基上再培养。Kuo 等^[8]将离体培养的 Jonathan 苹果茎尖做为试材进行了超低温保存的研究,使超低温保存技术开始在苹果种质的长期保存上得到应用。Niino 和 Sakai 等^[9,10]报道了苹果离体茎尖的玻璃化法和包埋-干燥法超低温保存。保存后离体茎尖的存活率达到了 80%。我们也将极慢速降温法^[11]和玻璃化法^[12]用于 10 个苹果品种(种)离体茎尖的超低温保存上。保存后离体茎尖的存活率为 70% ~ 90%。在试验中我们发现,超低温保存前离体材料的生理状态与保存后茎尖的存活率有直接关系。其中离体材料的含水量和冷冻驯化程度是两个重要因素。因此我们认为,在苹果离体茎尖超低温保存中,存在着这样一种可能,即离体材料的生理状态达

到一定的指标(较低的含水量和一定程度的冷驯化),是获得较理想结果的基础。为了验证此设想,我们以苹果休眠茎尖为试材进行了超低温保存试验研究。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 1997 年 2 月~5 月在本实验室进行。苹果休眠枝采自本所苹果种质资源圃 20 年生的金冠苹果树上。于 2 月下旬从田间采集有饱满芽的一年生枝条,在试验室内剪成 20~30cm 长的小段用塑料袋封装后保存于 5℃ 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 休眠茎尖的制备 将休眠枝剪成含一个休眠芽的小段,剥去 1~2 层鳞片后,于清水中冲洗 3~4 遍。将休眠枝段于无菌操作台上消毒。消毒过程为:75%酒精浸泡 30s,倒去酒精,用无菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1%升汞浸泡 10min,弃去升汞用无菌水清洗 4~5 次。消毒后于无菌操作台上剥取 2 mm 大小的休眠茎尖备用。

1.2.2 两步降温法 休眠茎尖于含 1.5 ml 冰冻保护剂的冷冻管中,在 0℃ 条件下平衡 1 h。然后在程序降温仪中以 0.1℃/min 的降温速率降至 -40℃ 后,直接投入液氮或于 25℃ 水浴中化冻进行再培养。

1.2.3 玻璃化法 休眠茎尖(约 20 个)放入含 1.5 ml 冰冻保护剂的冷冻管中,在 25℃ 条件下预处理 80 min。其间每 20 min 用取液器换取新鲜保护液。预处理后将冷冻管直接投入液氮。

1.2.4 包埋-干燥法 休眠茎尖于不同浓度的蔗糖溶液中,在 5℃ 条件下预培养(0.1 mol/L, 1 d; 0.3 mol/L, 1 d; 0.7 mol/L, 1 d)。预培养后的休眠茎尖于 3%藻酸钠和 0.1 mmol/L CaCl_2 溶液中包埋 30 min(包埋丸直径约 4~5 mm,含 1~2 个茎尖)。包埋丸再于 1.0 mol/L 蔗糖溶液中预培养 1 d(5℃)后在超净工作台上干燥脱水 4 h,并放入冷冻管中直接投入液氮。

1.2.5 存活率检测 在程序降温仪中以 0.1℃/min 的速率降温至 0℃、-10℃、-20℃、-40℃(-LN)或于液氮中保存 1 d(+LN)的休眠茎尖,取出后在 25℃ 水浴中化冻,用取液器吸去保护剂,将茎尖(或包埋丸)放在 MS+0.5 mg/L BA+0.5%琼脂+20 g/L 蔗糖培养基中,在 25℃ 和 1600 lx 光照条件下再培养。40 d 后检查存活率,存活率为 3 次处理的平均值(每次处理 20 个休眠茎尖)。存活率=再生出叶片的芽数/总芽数×100%。

1.2.6 枝条含水量测定 将经不同处理后的枝条用滤纸吸干表面水分后,于 120℃ 烘箱中烘干 48 h,测定含水量。含水量=干重/湿重×100%。

2 结果与分析

2.1 污染率常数的调查测定

由于田间试材本身带菌,离体培养休眠茎尖的污染会给试验设计带来影响(如表 1,去除污染材料后计算再生率)。结果表明,以田间外植体在试验无菌条件下,其灭菌效果可保持在 50%的水平上。则以此为经验指标常数,在以后的试验处理中,增加外植体处理量,以保持试验

设计的可比性。同时可以看出不同的 BA 浓度对再生率无明显影响,可按最低加入量(0. 5mg/L) 确定通用培养基组成。

表 1 休眠茎尖接种于培养基后的污染率
及培养基中 BA 浓度对茎尖再生的影响

| BA 浓度(mg/L) | 污染率(%) | 再生率(%) |
|-------------|----------|----------|
| 0. 5 | 50 | 100 |
| 1. 0 | 47 | 100 |
| 2. 0 | 50 | 100 |

表 2 休眠枝在不同处理条件下的含水量比较

| 处 理 | 含水量(%) |
|------------------------------------|---|
| 对照 未采用任何护剂 | 52. 7 田间采集枝条后所测含水量 |
| A 采用冰冻保护剂 A (10% 蔗糖+ 10% DMSO) | 51. 2 在 0 条件下处理休眠枝段(含 1 个休眠茎尖) 1h 所测含水量 |
| B 采用冰冻保护剂 B (50% 蔗糖+ 50% 甘油) | 50. 1 在 0 条件下处理休眠枝段(含 1 个休眠茎尖) 1h 后的水量 |

2. 2 休眠枝含水量的测定

Stushnoff^[3]等在休眠枝试验中指出较低的含水量(48% ~ 60%) 可能是超低温保存后存活的一个关键因素。为验证这一结果, 我们测定了休眠枝经不同处理后的含水量(表 2)。由于休眠枝的含水量在一定程度上反映着休眠茎尖的含水量, 因此, 可以认为休眠茎尖的含水量约为 52. 7%。同时休眠枝在经过不同的保护剂处理后其含水量未发生明显变化。

2. 3 保存方法和保护剂的添加对茎尖存活率的影响

由于休眠茎尖经过了冬季的深冷驯化和具有较低的含水量, 可视为超低温保存的良好试材, 因此我们对休眠茎尖进行了不同的超低温保存方法的试验(表 3)。虽然试验采用的 3 种方法的所有步骤, 均未经试验证明在金冠苹果休眠茎尖的超低温保存上是最优的, 但却都获得了较好的试验结果。这说明休眠茎尖确实为超低温保存的良好试材。

表 3 不同超低温保存方法对休眠茎尖存活率的影响

| 保存方法 | 存活率(%) | | 处 理 |
|-------|----------|----|---|
| | 对照 | 液氮 | |
| 玻璃化法 | 100 | 60 | 对照为休眠茎尖经保护剂 B(50% 甘油+ 50% 蔗糖) 预处理 80min 后(25) 条件下的存活率 |
| 包埋干燥法 | 100 | 33 | 对照为包埋的休眠茎尖在无菌空气 干燥脱水 4 h(含水量约 30%) 后的存活率。 |
| 两步降温法 | 100 | 83 | 对照为休眠茎尖经保护剂 A(5% DM SO+ 5% 蔗糖) 预处理 1 h(0 条件下) 并以 0. 1 /min 的降温速率降至- 40 后的存活率。 |

为进一步验证休眠茎尖的这种生理状态宜于超低温保存, 我们测定了不同保护剂的添加对休眠茎尖超低温保存后存活率的影响(表 4)。结果表明, 虽然休眠茎尖不经任何保护剂处理, 直接采用两步降温法降至- 40 后不能存活, 但只需添加保护剂(5% 蔗糖+ 5% DM SO) 便可使休眠茎尖的存活率提高到 16%。在超低温条件下, 保护剂可使存活率提高到 83%。

表 4 保护剂的添加对休眠茎尖存活率的影响(%)

| 保护剂 | 0 | - 40 | 液氮 |
|------------------|-----|------|----|
| 对照 | 100 | 0 | 0 |
| 5% DM SO+ 5% 蔗糖 | 98 | 16 | 16 |
| 10% DMSO+ 10% 蔗糖 | 100 | 25 | 16 |
| 50% 甘油+ 50% 蔗糖 | 100 | 85 | 83 |

注: 1. 方法采用两步降温法; 2. 对照为休眠茎尖未经任何保护剂处理, 直接采用两步降温法超低温保存。

表 5 预冰冻温度对休眠茎尖存活率的影响

| 保护剂 | 0 | | - 10 | | - 20 | | - 40 | |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | - LN | + LN | - LN | + LN | - LN | + LN | - LN | + LN |
| 5% 蔗糖+ 5% DM SO | 100 | 0 | 100 | 0 | 85 | 0 | 40 | 16 |
| 50% 甘油+ 50% 蔗糖 | 100 | 0 | 85 | 5 | 80 | 38 | 83 | 75 |

注: 1. 采用两步降温法。2. - LN 为未经超低温保存的休眠茎尖的存活率; + LN 为经超低温保存后休眠茎尖存活率。

2.4 预冰冻温度对休眠茎尖存活率的影响

虽然预冰冻温度较明显的提高了休眠茎尖的存活率(0~16%或0~75%)(表5),但同前述试验(表3)相比,预冰冻处理已不再是休眠茎尖超低温保存的关键因素。

2.5 休眠茎尖和休眠枝对超低温保存的影响

休眠枝和休眠茎尖经超低温保存均能获得一定存活率。但休眠茎尖以其体积小和便于操作处理等优点做为超低温保存试材明显优于休眠枝。

3 讨论

Sakai 等在休眠枝和离体茎尖的超低温保存试验中,指出一定程度的低温冷驯化是保存成功的关键。Stushnoff^[4]等甚至依据休眠枝的不同抗冷冻能力而将不同的果树树种列为不同的冷驯化级别,并以此判断其超低温保存的难易。在我们的试验中,采用冷驯化3~4个月的休眠茎尖,超低温保存后存活率达到了83%。这进一步验证了冷驯化在离体材料超低温保存上的重要性。

无论超低温保存的方法如何不同,但超低温保存过程中材料必需降至一定的含水量却是其共性。两步降温法通过逐步的降温过程,以达到脱水目的,从而避免胞内结冰。我们认为可以通过对试材生理状态的选择,简化超低温保存中的脱水过程。即选 择具有较低含水量(52.7%)的休眠茎尖,不仅采用两步降温法可获得较高的超低温保存存活率,而且采用简单的玻璃化法和包埋-干燥法,超低温保存后也得到了较好的结果。今后的试验须深入研究材料生理状态对超低温保存的影响,并进一步完善超低温保存程序。

休眠茎尖和休眠枝的超低温保存虽然有其不可避免的缺陷(如污染率难以控制等),但对保存后的材料可以通过嫁接法进行繁殖。因此对于那些目前仍难于进行离体培养的果树种质来说仍不失为一可行的途径。同时本试验以较成熟的离体培养技术程序,把存活率的判断定在有应用价值的形态标准上,因此可做为建库的技术依据。

表6 休眠茎尖和休眠枝超低温保存后的存活率

| 材 料 | 0 | - 40 | 液氮 |
|------|-----|------|------|
| 休眠茎尖 | 93 | 85.7 | 70.0 |
| 休眠枝 | 100 | 28.6 | 15.8 |

注 1. 方法采用两步降温法;
2. 保护剂: 50% 甘油+ 50% 蔗糖。

参 考 文 献

- 1 Quatrano RS. Freeze preservation of cultured flax cells using dimethylsulfoxide. *Plant Physiol*, 1968, 43: 257
- 2 Sakai A, *et al.* Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *Hort science*, 13(3): 225 ~ 227
- 3 Stushnoff C. Can J. Cryopreservation of germplasm for genetic resources. *Plant Sci*, 1987, 67: 1151 ~ 1154
- 4 Tyler N J, Stushnoff C. Genetic considerations for germplasm preservation of clonal materials. *Can J Plant Sci*, 1988, 68: 1169 ~ 1176
- 5 Tyler N J, Stushnoff C. The effects of prefreezing and controlled dehydration on cryopreservation of dormant vegetative apple buds. *Can J Plant Sci*, 1988, 68: 1163 ~ 1167
- 6 Tyler N J, Stushnoff C. Dehydration of dormant apple buds at different stages of cold acclimation to induce

- cryopreservability in different cultivars. *Plant Physiol*, 1988, 87: 201 ~ 205
- 7 Manabu K, Aiya I. Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen. *Hortscience*, 1983, 18(5): 707 ~ 708
- 8 Kuo C C, Lineberger R D. Cryopreservation of in vitro grown apple shoot tips. *Hortscience*, 1985, 20(4): 764 ~ 767
- 9 Niino T, Sakai A. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28: 261 ~ 266
- 10 Niino T, Sakai A. Cryopreservation of alginage coated in vitro grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Science*, 1992, 87: 199 ~ 206
- 11 常永健, 陈霜莹, 赵艳华 等. 苹果茎尖超低温保存的研究. 见: 中国科学技术协会首届青年学术年会论文集(农科分册). 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 461 ~ 464
- 12 赵艳华, 陈霜莹, 吴永杰. 玻璃化法超低温保存苹果离体茎尖. 见: 中国科学技术协会第二届青年学术年会园艺学论文集. 北京: 北京农业大学出版社, 1995. 406 ~ 409
- 13 陈霜莹, 常永健, 赵艳华. 果树花粉的超低温保存. *华北农学报*, 1993, 8(增): 60 ~ 64
- 14 Stushnoff C. Cryopreservation of fruit crops genetic resources. *Hortscience*, 1991, 26(5): 518 ~ 523

A Study on Cryopreservation of Dormant Apple Shoot Tips

Wu Yongjie Zhao Yanhua

(Changli Institute of pomology, Hebei Academy of
Agricultural and Forestry Sciences, Changli 066600)

Zhou Mingde

(IPGRI Office for East Asia c/o Chinese
Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Abstract Shoot tips of apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Golden Delicious) dormant buds were successfully cryopreserved by using three different methods(vitrification, encapsulation-dehydration and two-step freezing), the regeneration rate arrived to 83% after cooling to liquid nitrogen. As the dormant shoot tips have been cold hardened in winter and have lower water content, it became the value materials of cryopreservation. After pretreated in vitrification solution(PVS3: 50% glycerol+ 50% sucrose) for 80 min at 25 °C or desiccated in air-flow for 4 h (the water content is about 30%) by using encapsulation-dehydration method, the shoot tips can be plunged into LN directly. The dormant shoot tips could regrow directly after cryopreservation. The experiments demonstrated that the selecting of material physical state is a very important factor during cryopreservation, which could not only simplify the cryopreservation protocols, but also improve the practical useness of cryopreservation, in order that to establish the cryopreservation genebank of plant germplasm earlier.

Key words: *Malus domestica*; Dormant shoot tips; Cryopreservation