

软枣猕猴桃休眠芽超低温保存技术研究

白晓雪, 秦红艳, 韩先焱, 杨义明, 范书田, 路文鹏, 李昌禹*

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

摘要:【目的】探讨软枣猕猴桃种质资源的长期保存技术体系。【方法】以软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽为试材,研究了预培养液种类、预培养时间、装载时间、玻璃化保护液、恢复培养基等因素对玻璃化法超低温保存后休眠芽成活率的影响。【结果】休眠芽在 $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油的预培养液中震荡培养2 d,常温下用装载液($2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油 + $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS)处理20 min, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下用 PVS_2 (30%甘油 + 15%乙二醇 + 15%二甲基亚砷 + $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS)脱水120 min,换新鲜 PVS_2 后迅速投入液氮中冻存24 h以上。取出后立即用 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻2 min,用含 $1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的MS卸载液洗涤30 min,无菌滤纸吸干后接种到MS + $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA恢复培养基上,休眠芽成活率达86.30%。用流式细胞仪鉴定再生植株倍性,没有发现明显变化。【结论】建立了高效的软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽玻璃化超低温保存体系。

关键词:软枣猕猴桃;‘魁绿’;休眠芽;玻璃化法;超低温保存

中图分类号:S663.4

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)08-1247-09

Study on the cryopreservation of dormant buds by vitrification in *Actinidia arguta* ‘Kuilü’

BAI Xiaoxue, QIN Hongyan, HAN Xianyan, YANG Yiming, FAN Shutian, LU Wenpeng, LI Changyu*

(Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, Jilin, China)

Abstract: 【Objective】 *Actinidia arguta* is a precious resource of cold-resistant fruit tree in China. It is extremely resistant, and rich in nutrients and vitamin C, so it is of important nutritional and economic values. *A. arguta* is one of the important utilization values in the *Actinidia* and an important germplasm resource for variety improvement. Due to the increasing commercialization and large-scale production of *A. arguta*, resulting in a single variety and the disappearance of many excellent genetic resources, the research on ultra-low temperature preservation technology for kiwifruit germplasm resources is of great significance. The tara vine ‘Kuilü’ is an excellent variety that has been bred by the Institute of Special Wild Economic Animals and Plants of the Chinese Academy of Agricultural Sciences for more than 10 years. Using ‘Kuilü’ as a test material, the objective of this project is to study the ultra-low temperature preservation method, so as to provide a reference for the long-term preservation of kiwifruit germplasm resources. 【Methods】 The ‘Kuilü’ dormant branches were cut into single-bud stem sections with a length of about 2 cm. Firstly, the single-bud stem sections were peeled, then soaked in 75% alcohol for 30 s, and finally, sterilized by shaking with 0.1% HgCl_2 for 30 min. The dormant buds were peeled for ultra-low temperature preservation by vitrification. Basic procedure of dormant bud vitrification cryopreservation was as follows: the dormant buds soaked in preculture fluid containing $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose + $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycerol + MS were shaken and cultured for 2 d, and thereafter they were transferred into 2 mL cryopreservation tubes under sterile conditions, with 10 buds per tube, and repeated 3 times. Load-

收稿日期:2020-03-19 接受日期:2020-05-20

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20170203006NY);中国农业科学院科技创新工程(201409)

作者简介:白晓雪,女,在读硕士研究生,研究方向为果树种质资源。Tel:18404984114, E-mail:2429239371@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13844627046, E-mail:lichangyu@caas.cn

ing was made at room temperature for 20 min with loading solution ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS), dehydration was conducted with PVS₂ for 120 min at $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and then immediately put into liquid nitrogen to freeze for more than 24 h after they were changed to fresh PVS₂. The tubs were taken out, and thawed immediately in $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath for 2 min. Then they were washed 3 times for 10 min, each time using unloading solution including $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and MS, and the sterile filter paper was blotted and inoculated to MS + $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA recovery medium, the tubs were cultured for 3 d in the dark, and then placed under light. Single factor experiment was performed on this basis. There were 9 kinds of preculture medium, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS; the pre-cultivation time was 1, 2, 3, 4, 5 or 6 d; the loading time was divided into 10, 20, 30, 40, 50, 60 min; there were four kinds of plant vitrification solution, respectively: PVS₁ ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sorbitol + 22% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% polyethylene glycol + 7% dimethyl sulfoxide + MS), PVS₂ (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl sulfoxide + $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS), PVS₃ (50% glycerol + 50% sucrose + MS), PVS₄ (35% glycerol + 20% ethylene glycol + $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS); PVS₂ dehydration time was divided into 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 or 300 min; MS was used as the basic recovery medium, and 6-BA and NAA of different concentrations were added. Flow cytometry was used to identify ploidy of plants that were directly developed from dormant buds and regenerated plants that derived from dormant buds after cryopreservation. **【Results】** The results showed that the optimum treating conditions were: the dormant buds were shaken and cultured for 2 days in $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol preculture fluid, treated with the loading solution for 20 min at room temperature, and PVS₂ dehydrated for 120 min at $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and quickly put into liquid nitrogen (LN) after they were changed to fresh PVS₂. It was recommended to freeze the buds in LN for more than 24 hours, immediately take them out and transfer them in $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath for 2 min. The unloading solution containing $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and MS was used to wash the buds for 30 minutes, and then they were blotted dry using the sterile filter paper and inoculated onto MS + $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA recovery medium. The survival rate of dormant buds reached 86.30%. The ploidy of 23 regenerative plants was identified by flow cytometry, and there was no significant difference in ploidy among plants that developed directly from dormant buds. **【Conclusion】** The dormant buds of *A. arguta* ‘Kuilü’ had a higher survival rate after cryopreservation by vitrification method, and an efficient ‘Kuilü’ dormant bud ultra-low temperature storage system has been successfully established, which may provide a theoretical basis for the ultra-low temperature preservation of *A. arguta*.

Key words: *Actinidia arguta*; ‘Kuilü’; Dormant bud; Vitrification; Cryopreservation

软枣猕猴桃 [*Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.] 为我国珍贵的抗寒果树资源, 系猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属 (*Actinidia*) 的大型落叶藤本植物^[1]。软枣猕猴桃抗性极强, 且营养丰富, 富含维生素 C, 具有重要的营养价值和经济价值, 是猕猴桃属中具有重要利用价值的物种之一, 也是猕猴桃品种改良的重要种质资源^[2]。近年来由于清林抚育及人为掠夺式的采摘, 使得大量野生软

枣猕猴桃优异资源流失。为了保存珍贵的种质资源, 有些科研部门和生产单位相继建立了软枣猕猴桃种质资源圃, 进行圃地活体种植保存, 但是由于土地和资金有限, 保存的资源较少; 有些单位进行组织培养保存大量资源, 但是由于继代次数增加, 组培种质材料可能存在积累变异的风险^[3]; 而近年来发展起来的超低温保存技术, 设备简单, 保存材料数量大, 能避免产生积累变异的风险^[4], 建立了很

多植物的超低温保存库,保存了成千上万份的珍贵种质资源,因此开展软枣猕猴桃种质资源的超低温保存技术研究具有重要的意义。

超低温保存是在离体培养基础上发展起来的资源保存技术,指在液氮条件下(-196℃)对植物器官、组织、细胞等进行保存的一种生物学技术^[3,5]。在该温度条件下,植物材料细胞内的生长及代谢活动基本停止,处于一种相对稳定的生物学状态(“生机停顿”状态),这样可以极大程度地减缓甚至终止代谢衰老过程,并保持材料的遗传稳定性,从而达到长期保存的目的^[5-6]。因此,超低温保存被视为植物种质资源长期保存最理想、最有效的方法。Sakai等^[7]建立的玻璃化法是一种设备简单、材料处理步骤简便、效果和重复性好的简单高效的超低温保存方法^[8]。休眠芽是植物为适应严寒环境形成的一种保护性器官,经过自然的低温驯化,可提高超低温保存的成活率^[9-10]。迄今,利用玻璃化法已经成功保存了苹果^[11]、柿^[12]、扁桃^[13]等植物的休眠芽。关于软枣猕猴桃休眠芽的玻璃化超低温保存技术报道较少。1995年通过吉林省作物品种审定委员会审定的软枣猕猴桃品种‘魁绿’,是中国农业科学院特产研究所经过10余年选育的优良品种,抗逆性极强,

可在-38℃安全越冬,生长季无严重病虫害^[4]。笔者采用玻璃化法对软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽进行超低温保存研究,通过研究预培养、装载、玻璃化保护液、恢复培养基等超低温保存过程中的影响因素,建立了高效的软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽玻璃化法超低温保存体系,以期软枣猕猴桃种质资源的长期保存提供参考依据。

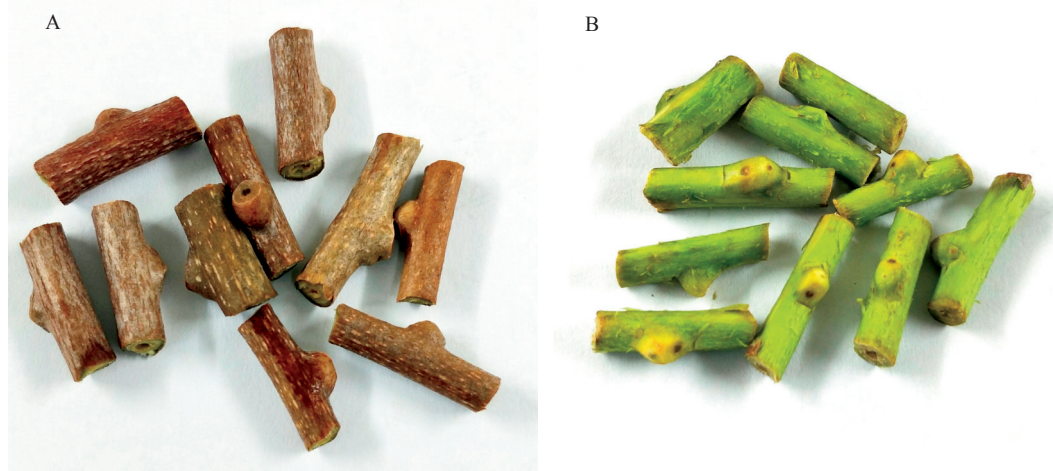
1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽,于2018年12月中下旬至2019年1月中下旬采自中国农业科学院特产研究所软枣猕猴桃种质资源圃,软枣猕猴桃树龄均为25 a(年),休眠枝条采后存放于4℃冰箱中备用(7 d内)。

1.2 方法

1.2.1 材料灭菌 取出‘魁绿’休眠枝条,用自来水冲洗干净后,剪成长约2 cm的单芽茎段(图1-A),先用洗洁精浸泡清洗30 min,其间每10 min搅动1次,再用自来水冲洗30 min。转移到超净工作台上,单芽茎段先进行剥皮处理,将休眠枝条的外皮全部剥掉(图1-B),再用75%乙醇浸泡30 s进行表



A. 带皮单芽茎段; B. 剥皮后的单芽茎段。

A. Single bud stem segment with skin; B. Single bud stem segment after peeling.

图1 软枣猕猴桃单芽茎段

Fig. 1 Single bud stem segment of *Actinidia Arguta*

面消毒,无菌水冲洗4~5次,之后用0.1% HgCl₂震荡灭菌30 min,无菌水冲洗4~5次,剥取休眠芽利用玻璃化法进行超低温保存。

1.2.2 玻璃化超低温保存方法 休眠芽玻璃化法超低温保存的基本程序:剥取的休眠芽在0.3 mol·L⁻¹

蔗糖+1 mol·L⁻¹甘油的预培养液中震荡培养2 d,无菌条件下将休眠芽转入2 mL冻存管中,每管10芽,3次重复。常温下装载20 min,0℃条件下用PVS₂脱水120 min,换新鲜PVS₂后迅速投入液氮冻存24 h以上,取出后立即放入38℃水浴中解冻2 min,

用 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 卸载液洗涤 3 次,每次 10 min, 无菌滤纸吸干后接种到 $\text{MS} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 恢复培养基上, 暗培养 3 d 后置于

光下培养, 21 d 后统计成活率(以休眠芽出现明显绿色为标准)。单因素试验以基本程序为基础, 通过变化单因子进行试验(表 1)。

表 1 玻璃化法超低温保存‘魁绿’休眠芽单因素试验

Table 1 Single factor test for dormant buds of ‘Kuili’ by vitrification

单因子 Single factor	处理 Treatment
预培养液 Precultured fluids	(1) $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油 + MS, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油 + MS (1) $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS (2) $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油 + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油 + MS (2) $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS (3) $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油 + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油 + MS (3) $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS, $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol + MS
预培养时间 Precultured time/d	1、2、3、4、5、6
装载时间 Loading time/min	10、20、30、40、50、60
玻璃化液 Plant vitrification solutions	PVS ₁ : $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 山梨醇 + 22% 甘油 + 15% 乙二醇 + 15% 聚乙二醇 + 7% 二甲基亚砜 + $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS PVS ₁ : $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sorbitol + 22% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% polyethylene glycol + 7% dimethyl sulfoxide + $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS PVS ₂ : 30% 甘油 + 15% 乙二醇 + 15% 二甲基亚砜 + $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS PVS ₂ : 30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl sulfoxide + $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS PVS ₃ : 50% 甘油 + 50% 蔗糖 + MS PVS ₃ : 50% glycerol + 50% sucrose + MS PVS ₄ : 35% 甘油 + 20% 乙二醇 + $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + MS PVS ₄ : 35% glycerol + 20% ethylene glycol + $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + MS
PVS ₂ 处理时间 PVS ₂ treatment time/min	30、60、90、120、150、180、240、300
恢复培养基 Recovery medium	MS MS + $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA MS + $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA MS + $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA MS + $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA

1.2.3 再生植株的倍性鉴定 以未经超低温保存的‘魁绿’休眠芽发育成的植株为对照, 鉴定经玻璃化超低温保存后休眠芽再生植株的倍性水平。取 1 cm^2 的幼嫩叶片放在干净的培养皿中, 加入 0.4 mL Partec HR-A 裂解液, 用刀片切碎组织。5 min 后, 用 $100 \mu\text{m}$ 的滤网将样品过滤到小试管中, 然后加入 1.6 mL Partec HR-B 溶液。黑暗保存 2 min 后, 将样品放入 Partec 倍性分析仪进行分析。

1.3 数据统计与处理

成活率/% = (出现明显绿色的休眠芽个数/超低温保存的未污染休眠芽个数) $\times 100$

利用 Excel 软件进行数据统计, SAS9.2 进行数据分析, Duncan's 多重比较 ($\alpha = 0.05$) 进行显著性分析。

2 结果与分析

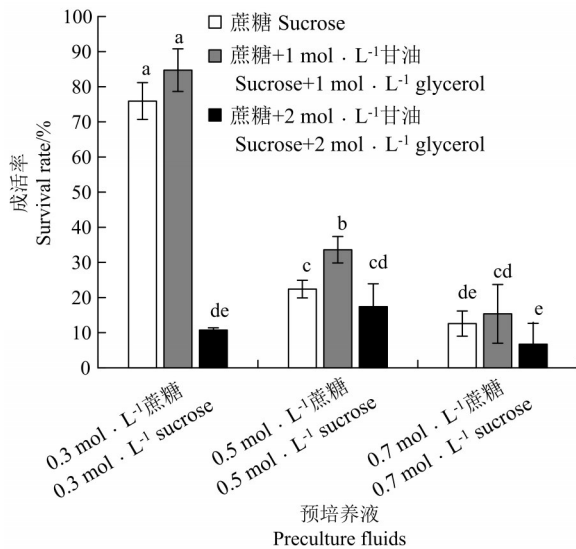
2.1 预培养液对超低温保存后‘魁绿’休眠芽成活率的影响

预培养液选择蔗糖和甘油为渗透保护物质, 将

休眠芽置于含不同浓度的蔗糖和甘油的 MS 预培养液中进行震荡培养, 结果如图 2 所示。不同浓度蔗糖和甘油的预培养液对‘魁绿’休眠芽的成活率影响较大, 随着预培养液中蔗糖浓度的增加, 休眠芽成活率呈下降趋势。在 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油的 MS 预培养液中培养的休眠芽成活率最高, 分别为 75.93% 和 84.72%, 两者之间无显著差异。含 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和不同浓度甘油的 MS 预培养液中培养的休眠芽成活率均较低。表明蔗糖浓度是影响休眠芽成活率的主要因素, 甘油作为渗透保护液起部分作用。 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘油和不同浓度蔗糖的 MS 预培养液中培养的休眠芽成活率较低, 原因可能是渗透保护物质浓度较高, 对休眠芽产生了渗透胁迫, 破坏了细胞结构, 使一部分细胞失去活力。

2.2 预培养时间对超低温保存后‘魁绿’休眠芽成活率的影响

预培养不同时间超低温保存后休眠芽的成活



不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。
Different letters indicate significant difference at the 0.05 level. The same below.

图2 不同预培养液对冻后休眠芽成活率的影响

Fig. 2 Effect of different precultured fluids on survival rate of dormant buds after cryopreservation

率存在差异(图3)。预培养 2 d 时,冻后休眠芽的成活率最高,达 74.24%,随着预培养时间的增加,休眠芽成活率逐渐降低,预培养 6 d,休眠芽成活率降低为 7.04%。预处理时间过长,细胞由于过度脱水导致损伤,从而成活率下降。在 0.3 mol·L⁻¹蔗糖 + 1 mol·L⁻¹甘油的 MS 预培养液中预培养 2 d 的休眠芽成活率最高,超低温保存效果最好。

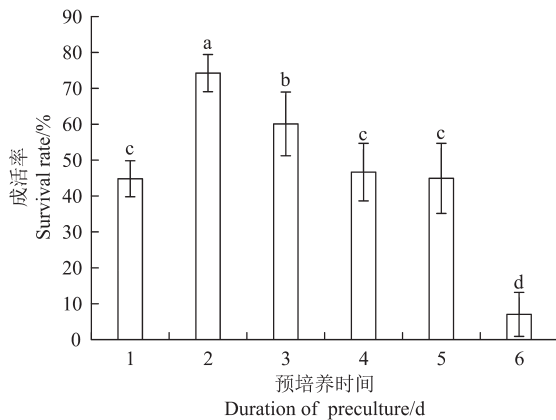


图3 预培时间对冻后休眠芽成活率的影响

Fig. 3 Effect of precultured time on survival rate of dormant buds after cryopreservation

2.3 装载时间对超低温保存后‘魁绿’休眠芽成活率的影响

为进一步对休眠芽进行保护性脱水,用装载液处理不同时间,结果见图4。装载液处理 10~50 min,

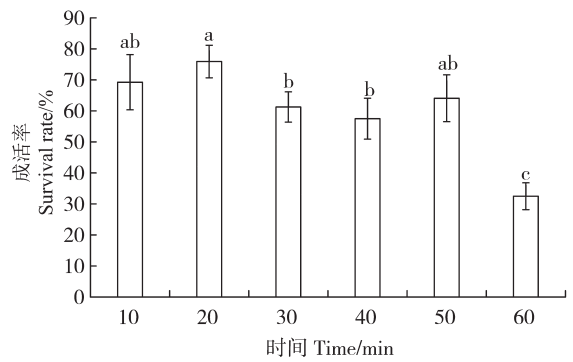


图4 装载时间对冻后休眠芽成活率的影响

Fig. 4 Effect of loading time on survival rate of dormant buds after cryopreservation

冻后休眠芽成活率均较高,处理 60 min,休眠芽成活率显著降低,降至 32.50%。装载液处理可降低冰点和水的过饱和点,从而使其避免冰冻过程中冰晶对细胞的伤害,但是过度脱水同样会对细胞产生伤害,从而降低冻后休眠芽的成活率。装载 20 min 时成活率高达 75.93%,效果较好。

2.4 玻璃化保护液对超低温保存后‘魁绿’休眠芽成活率的影响

玻璃化过程是超低温保存过程中的重要步骤,因此玻璃化液类型的选择及玻璃化液处理时间也至关重要。不同类型玻璃化液对‘魁绿’休眠芽超低温保存后成活率的影响见表2。PVS₂处理后休眠芽的成活率显著高于其他3种玻璃化液,PVS₁、PVS₃、PVS₄处理后休眠芽的成活率无显著差异。

表2 不同玻璃化液对休眠芽超低温保存后成活率的影响
Table 2 Effect of various plant vitrification solutions on survival rate of dormant buds after cryopreservation

玻璃化液 Plant vitrification solutions	成活率 Survival rate/%
PVS ₁	42.50±6.61 c
PVS ₂	84.72±6.05 a
PVS ₃	53.86±8.28 bc
PVS ₄	59.35±3.51 c

注:数值为平均值±SD,不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

Note: Values are means±SD, different letters indicate significant difference at the 0.05 level. The same below.

在 0 °C 条件下,采用 PVS₂ 玻璃化保护液处理不同时间对超低温保存后休眠芽成活率的影响如图 5 所示。随着 PVS₂ 处理时间的增长,超低温保存后休眠芽的成活率呈先升高后降低的趋势。PVS₂ 脱水时间每加 30 min,成活率显著提高,脱水时长为

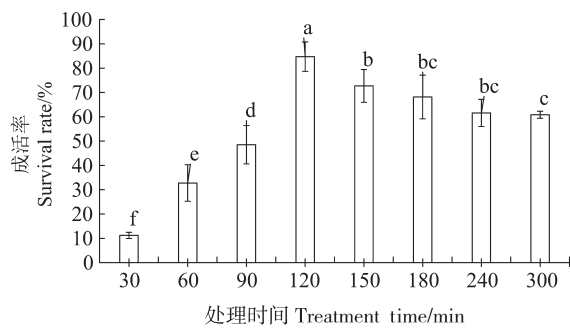


图5 PVS₂处理时间对冻后休眠芽成活率的影响

Fig. 5 The effect of PVS₂ treatment time on survival rate of dormant buds after cryopreservation

120 min 时成活率最高达 84.72%，超过 120 min 后，由于 PVS₂ 的毒害作用，休眠芽成活率逐渐下降。

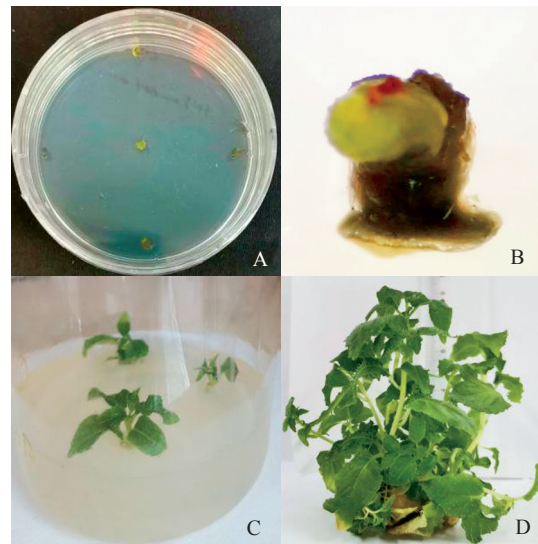
2.5 恢复培养基对超低温保存后‘魁绿’休眠芽成活率的影响

‘魁绿’休眠芽经过 0.3 mol·L⁻¹蔗糖 + 1 mol·L⁻¹甘油的 MS 预培养液培养 2 d, 装载 20 min, PVS₂ 脱水处理 120 min, 换新鲜 PVS₂ 浸入液氮超低温保存, 化冻后转入不同的恢复培养基中结果见表 3。在不含激素的培养基中成活率最低为 28.33%, 加入不同浓度的 NAA 和 6-BA, 成活率显著提高。当加入 0.01 mg·L⁻¹NAA 时, 6-BA 的浓度对成活无显著影响; 恢复培养基中 6-BA 定量时, 加入 0.02 mg·L⁻¹NAA 休眠芽成活率显著高于加入 0.01 mg·L⁻¹NAA。在恢复培养基 MS + 0.02 mg·L⁻¹NAA + 2 mg·L⁻¹6-BA 上, 超低温保存后“魁绿”休眠芽的成活率最高, 达 86.30%。在该培养基上, 休眠芽超低温保存 7 d 后开始吐绿成活(图 6-A、B), 10 周后成活休眠芽可长成正常植株(图 6-C)。试验也发现休眠芽再生时直接发育为植株, 未经过愈伤组织等阶段, 这样大大降低了遗传变异的概率。图 6-D 是正常光照下未经超低温保存的‘魁绿’休眠芽发育的

表3 恢复培养基对休眠芽超低温保存后成活率的影响

Table 3 Effect of recovery medium on survival rate of dormant buds after cryopreservation

恢复培养基 Recovery medium	成活率 Survival rate/%
MS	28.33±10.41 d
MS + 0.01 mg·L ⁻¹ NAA + 1 mg·L ⁻¹ 6-BA	55.56±9.62 c
MS + 0.01 mg·L ⁻¹ NAA + 2 mg·L ⁻¹ 6-BA	61.67±12.58 bc
MS + 0.02 mg·L ⁻¹ NAA + 1 mg·L ⁻¹ 6-BA	80.46±15.57 ab
MS + 0.02 mg·L ⁻¹ NAA + 2 mg·L ⁻¹ 6-BA	86.30±5.48 a



A. 解冻后休眠芽开始复活; B. 冻后成活的休眠芽; C. 冻后休眠芽发育成植株; D. 未经超低温保存的休眠芽发育成的植株。

A. Dormant buds start to relive after cryopreservation; B. Survival dormant buds after cryopreservation; C. Dormant buds develop into plants after cryopreservation; D. Plants developed from dormant buds without cryopreservation.

图6 冻后休眠芽恢复培养及正常组育苗

Fig. 6 Recovery culture of dormant buds after cryopreservation and normal tissue culture seeding

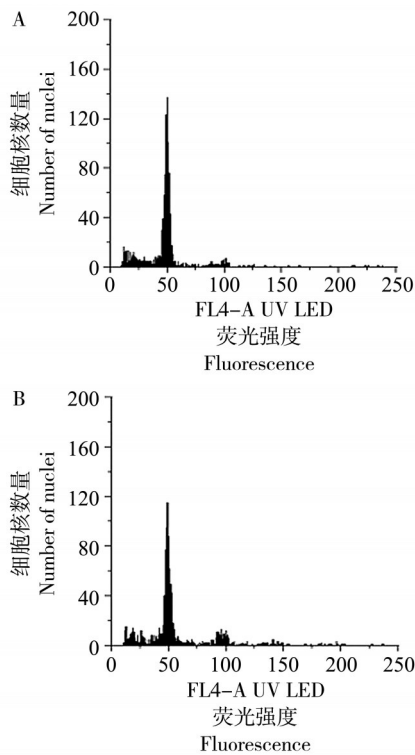
植株, 二者形态上无明显差异。

2.6 超低温保存后休眠芽再生植株倍性鉴定

以未经超低温保存的‘魁绿’休眠芽发育成的植株为对照, 利用流式细胞仪对 23 株经超低温保存后获得的再生植株的染色体倍性进行检测, 结果如图 7 所示。23 株植株的荧光曲线与对照一致, 表明冻后休眠芽再生植株的染色体倍性没有发生变化。

3 讨论

材料的选择对超低温保存后植物的成活率起着决定性作用^[15]。与组培苗茎尖相比, 休眠芽经过冬季自然环境的严寒驯化, 在进行超低温保存时可减少低温驯化过程, 同时可减少培养组培苗这一步骤, 使操作更为简便。Tyler 等^[10]认为由于处于休眠期的芽经过了抗寒锻炼, 已经发生了保护性脱水及其他提高抗寒力的变化, 故休眠芽茎尖经过超低温保存后易于成活。艾鹏飞^[16]研究也证实了超低温保存后休眠芽茎尖的成活率高于试管苗茎尖。而不同采样时间和生理状态也会影响休眠芽的保存效果, 张延红^[17]研究发现秦艽休眠芽需要经过一段时间的严冬锻炼, 即 11 月到次年 3 月初采样处理的休



A. 未经超低温保存的休眠芽发育的植株;B. 超低温保存后休眠芽的再生植株。

A. Plants with dormant buds developed without cryopreservation; B. Regenerating plants of dormant buds after cryopreservation.

图7 ‘魁绿’休眠芽超低温保存后再生植株的倍性鉴定
Fig. 7 Ploidy identification of ‘Kuilü’ dormant buds regenerated plants after cryopreservation

眠芽成活率较高。艾鹏飞^[16]在柿休眠芽超低温保存中采集于12月下旬, Tyler等^[10]在苹果休眠芽超低温保存研究时采集于2月,均经历了抗寒锻炼,成活率超过70%。本试验选用的软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽试材采集于12月中下旬到次年1月中下旬,此时也经历自然的低温锻炼,在玻璃化法超低温保存后获得了较高的成活率,成活率可高达86.30%。

玻璃化法是植物材料经过预培养、装载、玻璃化液处理一系列的保护性脱水过程,最后换新鲜的玻璃化保护液直接投入液氮冻存的超低温保存方法,该方法处理步骤简便,广泛应用于植物材料的超低温保存^[12-13]。预培养能够增强植物材料的抗冷冻能力,是超低温保存技术成功的关键步骤^[18]。预培养一般采用渗透物质蔗糖,加入冷冻保护剂可提高冻存后材料的成活率。常用的冷冻保护剂有二甲基亚砷、甘油等,冯超红^[19]在苹果超低温保存时证明甘油对超低温保存后材料的再生率有很大提

高,一些试验^[20-21]在预培养液中也添加了二甲基亚砷以提高成活率。由于二甲基亚砷对休眠芽有毒害作用,本试验选用蔗糖和甘油起渗透保护作用。试验表明在 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油的MS预培养液中预培养均可以获得较高的休眠芽冻后成活率。甘油未显著提高冻后休眠芽的成活率,只起到轻微提高作用,与冯超红^[19]在苹果茎尖超低温保存中的研究结果有差异,可能是不同基因型的材料造成的。预培养时间也对超低温保存效果有较大的影响。预培养液通过渗透浸入细胞,使细胞发生保护性脱水,预培养时间不充分,细胞脱水程度不够,易发生冻伤,而预培养时间过长,脱水过度会损伤细胞,也会影响成活率,因此筛选合适的预培养时间,对提高保存效果很重要。扁桃休眠芽玻璃化法保存时在 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖培养基上预培养1 d冻后成活率较高^[13],而麻花秦艽休眠芽玻璃化法保存时则需在 0.3 、 0.5 和 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖培养基上各培养1 d效果较好^[22]。本试验研究表明2 d是最佳的预培养时间。软枣猕猴桃与麻花秦艽、扁桃预培养时间不同,可能是因为休眠芽中含水量和可溶性糖等物质的含量不同造成的。

玻璃化是将植物细胞内的自由水由液态转变为玻璃化状态,此时细胞黏性增加,可避免冰晶的形成,从而提高细胞的抗冻能力^[23]。玻璃化液浓度高,容易对细胞造成伤害,因此玻璃化前需要进行加载处理使细胞适应玻璃化液^[24]。本试验研究表明装载时间为20 min效果较好。在用玻璃化液处理时,玻璃化液类型和玻璃化液处理时间都是影响超低温保存效果的重要因素。玻璃化保护液一般是由两种以上的低温保护剂组成,常用的有4种: PVS₁、PVS₂、PVS₃、PVS₄。同许多研究结果一致^[22,25],本研究表明,PVS₂作为玻璃化保护液应用于软枣猕猴桃休眠芽超低温保存效果最好。PVS₂是一种基于甘油的复合性超低温保护剂,其中DMSO、甘油和乙二醇为渗透保护剂,可以进入植物细胞膜,使细胞质的浓度增加,从而减轻脱水带来的细胞过度收缩伤害,在脱水和冷冻过程中起到稳定细胞结构的作用;同时也降低了细胞的冰点,利于材料的保存。而蔗糖作为非渗透保护剂起降低细胞自由水含量的作用^[26]。不同材料的PVS₂脱水时间有一定差异,且DMSO毒性较大,因此需要筛选适

宜的玻璃化保护液处理时间,一般在 20~100 min,甚至更长^[22]。如柿休眠芽处 20 min 效果较好^[27],扁桃休眠芽需要处理 70 min^[13],而甜柿休眠芽处理 2 h 成活率最高^[28]。本试验研究表明软枣猕猴桃休眠芽用 PVS₂ 处理 120 min 效果较好。

本试验通过研究恢复培养基对超低温保存后休眠芽成活率的影响,发现休眠芽在 MS + 0.02 mg·L⁻¹ NAA + 2 mg·L⁻¹ 6-BA 的恢复培养基上能够正常吐绿成活,并直接再生为植株,未经愈伤组织等阶段,与艾鹏飞等^[12]的研究结果一致。恢复培养基再生的植株苗与组培苗形态无明显差异,通过流式细胞仪鉴定,再生植株倍性未发生变化,基因是否突变需进一步进行遗传鉴定。

4 结 论

适宜软枣猕猴桃‘魁绿’休眠芽玻璃化法超低温保存体系是:灭菌后的休眠芽在 0.3 mol·L⁻¹ 蔗糖 + 1 mol·L⁻¹ 甘油的预培养液中培养 2 d,常温下装载 20 min,0 °C 条件下用 PVS₂ 脱水 120 min,换新鲜的 PVS₂ 保护液后迅速投入液氮冻存。取出后浸入 38 °C 水浴中解冻 2 min,用 1.2 mol·L⁻¹ 蔗糖的 MS 卸载液洗涤 30 min,接种到 MS + 2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.02 mg·L⁻¹ NAA 恢复培养基上,暗培养 3 d,转到正常光照下培养,成活率达 86.30%。

参考文献 References:

- [1] 朴一龙,赵兰花. 软枣猕猴桃研究进展[J]. 北方园艺,2008(3): 76-78.
PIAO Yilong, ZHAO Lanhua. Research progress of *Actinidia arguta*[J]. Northern Horticulture, 2008(3): 76-78.
- [2] 巩文红,李志强,李汉友. 我国猕猴桃优异资源的评价[J]. 山西果树,2005(5):23-24.
GONG Wenhong, LI Zhiqiang, LI Hanyou. Evaluation of kiwifruit excellent resources in China[J]. Shanxi Fruits, 2005(5): 23-24.
- [3] 陈晓玲,张金梅,辛霞,黄斌,卢新雄. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):414-427.
CHEN Xiaoling, ZHANG Jinmei, XIN Xia, HUANG Bin, LU Xinxiong. Progress on cryopreservation state and research of plant germplasm resources[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(3): 414-427.
- [4] REED B M, DENOMA J, LUO J, CHANG Y, TOWILL L. Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm[J]. In Vitro Cellular Development Biology Plant, 1998, 34(3): 256-260.
- [5] 刘月学,王家福,林顺权. 超低温保存技术在果树种质资源保存中的应用[J]. 东南园艺,2001(3):25-27.
LIU Yuexue, WANG Jiafu, LIN Shunquan. Application of cryopreservation technology in preservation of germplasm resources of fruit trees[J]. Southeast Horticulture, 2001(3): 25-27.
- [6] HARDING K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review[J]. Cryo Letters, 2004, 25(1): 3-22.
- [7] SAKAI A, KOBAYASHI S, OIYAMA I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(1): 30-33.
- [8] 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)[J]. 园艺学报,1994,21(3):277-282.
WANG Junhui, HUANG Chunnong. Vitrification: A new approach to cryopreservation of stem tips and meristems of horticultural crops(A literature review)[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1994, 21(3): 277-282.
- [9] 闵卓,房玉林. 葡萄芽休眠研究进展[J]. 北方园艺,2016(2): 182-188.
MIN Zhuo, FANG Yulin. Research progress of grapevine bud dormancy[J]. Northern Horticulture, 2016(2): 182-188.
- [10] TYLER N J, STUSHNOFF C. The effects of prefreezing and controlled dehydration on cryopreservation of dormant vegetative apple buds[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1988, 68(4): 1163-1167.
- [11] 吴永杰,赵艳华,周明德. 苹果休眠茎尖的超低温保存研究[J]. 华北农学报,1999,14(1):129-133.
WU Yongjie, ZHAN Yanhua, ZHOU Mingde. A study on cryopreservation of dormant apple shoot tips[J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica, 1999, 14(1): 129-133.
- [12] 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.
AI Pengfei, LUO Zhengrong. Cryopreservation of dormant shoot-tips of persimmon by vitrification and plant regeneration[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2003, 36(5): 553-556.
- [13] 姜喜,张琦,赵书珍,焦培培,庞新安,陈家力. ‘矮丰’扁桃休眠芽玻璃化超低温保存条件优化[J]. 北方园艺,2018(1): 62-66.
JIANG Xi, ZHANG Qi, ZHAO Shuzhen, JIAO Peipei, PANG Xin'an, CHEN Jiali. Cryopreservation of dormant buds by vitrification in almond cultivars ‘Aifeng’[J]. Northern Horticulture, 2018(1): 62-66.
- [14] 赵淑兰. 软枣猕猴桃新品种魁绿[J]. 中国果业信息,2000(1): 207-208.
ZHAO Shulan. A new variety of *Actinidia arguta* Kuilü[J]. China Fruit News, 2000(1): 207-208.
- [15] 姜喜,赵书珍,党艳青,张琦,焦培培,庞新安,陈家力. 扁桃小滴玻璃化超低温保存研究[J]. 果树学报,2018,35(3):367-375.
JIANG Xi, ZHAO Shuzhen, DANG Yanqing, ZHANG Qi, JIAO

- Peipei, PANG Xin'an, CHEN Jiali. A study on the cryopreservation of almond buds by droplet-vitrification[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(3):367-375.
- [16] 艾鹏飞. 部分柿属植物种质资源离体保存及其遗传稳定性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2004.
- AI Pengfei. Studies on *in vitro* conservation of some *Diospyros* germplasm and genetic stability of regenerants[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004.
- [17] 张延红. 秦艽和党参的休眠芽培养与玻璃化超低温保存研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2013.
- ZHANG Yanhong. *In vitro* culture and vitrification cryopreservation of dormant buds of *Gentiana straminea* Maxim. and *Codonopsis pilosula* Franch. Nannf. [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013.
- [18] 严庆丰, 黄纯农. 植物组织和细胞的玻璃化冻存研究[J]. 细胞生物学杂志, 1994, 16(3):117-122.
- YAN Qingfeng, HUANG Chunnong. Research on vitrification of plant tissues and cell[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 1994, 16(3):117-122.
- [19] 冯超红. 苹果茎尖超低温保存技术及脱毒效率的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- FENG Chaohong. Cryogenic techniques for germplasm conservation and virus eradication in apple(*Malus*) [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University, 2014.
- [20] 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4):301-306.
- WANG Zicheng, DENG Xiuxin. Cryopreservation of citrus shoot-tips by vitrification and regeneration[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28(4):301-306.
- [21] 徐小彪, 辜青青, 蔡祖国, 邓小梅, 张秋明. 玻璃化法超低温保存猕猴桃离体茎尖及其植株再生[J]. 园艺学报, 2006, 33(4):842-844.
- XU Xiaobiao, GU Qingqing, CAI Zuguo, DENG Xiaomei, ZHANG Qiuming. Cryopreservation of *in vitro* cultured kiwifruit shoot-tips by vitrification and their regeneration[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(4):842-844.
- [22] 晋玲, 刘进, 张延红, 朱田田, 陈红刚. 麻花秦艽休眠芽的玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中药材, 2012, 35(9):1374-1377.
- JIN Ling, LIU Jin, ZHANG Yanhong, ZHU Tiantian, CHEN Honggang. Cryopreservation and plantlet regeneration of dormant buds of *Gentiana straminea* by vitrification[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(9):1374-1377.
- [23] 王仁睿. 菊花、枣和马铃薯种质资源超低温保存技术与脱毒的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- WANG Renrui. Cryopreservation for germplasm conservation and pathogen eradication in chrysanthemum, Chinese jujube and potato[D]. Yangling : Northwest Agriculture & Forestry University, 2014.
- [24] SARKAR D, NAIK P S. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification[J]. Annals of Botany, 1998, 82(4):455-461.
- [25] KIM H H, YOON J W, PARK Y E, CHO E G, SOHN J K, KIM T S, ENGELMANN F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification [J]. Cryo Letters, 2006, 27(4):223-234.
- [26] 毕文璐. 葡萄茎尖超低温保存及超低温疗法脱毒研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2017.
- BI Wenlu. Cryopreservation of shoot tips of grapevine(*Vitis* spp.) and cryotherapy for eradication of grapevine leafroll-associated virus 3[D]. Yangling : Northwest Agriculture & Forestry University, 2017.
- [27] MATSUMOTO T, MOCHIDA K, ITAMURA H, SAKAI A. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20(5):398-402.
- [28] 张永卓, 罗正荣. 甜柿休眠芽茎尖包埋-玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12):2019-2022.
- ZHANG Yongzhuo, LUO Zhengrong. Cryopreservation of dormant shoot tips of non-astringent types of Chinese persimmon by encapsulation-vitrification and plantlets regeneration[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2004, 37(12):2019-2022.