

# “童子一号”草莓玻璃化法超低温保存技术研究

徐启红, 任平国

(漯河职业技术学院, 河南 漯河 462000)

**摘要:**以玻璃化法进行“童子一号”草莓离体茎尖的超低温保存研究,探讨了低温锻炼时间、预培养时间、预处理时间、PVS2 处理时间等对存活率的影响。结果表明:将 4℃ 条件下低温锻炼 30 d 的健壮草莓苗茎尖,接种在固体预培养培养基中预培养 4 d,预处理 30 min 后,吸出预处理液,加入 PVS2,0℃ 处理 80 min 后,更换新鲜的 PVS2,并迅速投入液氮 60 min 后,置于 40℃ 快速化冻 1 min;室温洗涤 3 次并取出茎尖,接种到再生培养基恢复培养;成活率最高可达 43.00%,且再生植株分化正常。

**关键词:**草莓;超低温保存;玻璃化

**中图分类号:**S 668.409<sup>+</sup>.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0117-03

由天翼生物工程有限公司从美国引进的“童子一号”草莓,植株生长直立,花序发生量大,抗逆性和适应性强,开花期及结果期较长,因此也是目前日光温室栽培中较优的鲜食草莓品种<sup>[1-2]</sup>。利用组织培养技术,不仅可以快速繁殖大量优质草莓种苗,更有利于品种提纯和更新,加快新品种的推广。目前,有关草莓组培研究已取得了一定的进展,但不同品种特性不同,培养方法也有所不同。在组织培养过程中,常因多次继代而导致使再生植株的某些性状丢失,因而对其种植资源的保存十分必要。

超低温保存技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一项现代保存技术,最早成功报道的例子见于 1973 年 Nag 等<sup>[3]</sup>对胡萝卜悬浮细胞的保存。迄今为止,国内外已对近 200 种植物材料进行了超低温保存方面的研究。其理论基础是在超低温条件下,由于抑制了细胞内的物质代谢,使其生长减缓乃至停止<sup>[4]</sup>,使植物材料的生物学状态相对稳定<sup>[5]</sup>,这样不仅能够保持生物材料的遗传稳定性,又不会丧失其形态发生的潜能,因而被认为是当前实现永久保存生物种质的最佳方法,在植物种质的长期保存方面具有不可替代的优越性<sup>[6]</sup>。超低温保存的关键因素是如何避免细胞内结冰。由于材料主要是在冰冻过程中发生冻害,因此必须尽量阻止细胞内冰晶的形成,减少冻害发生,以使细胞进入玻璃化状态。

目前,有关“童子一号”草莓的超低温保存及保存后

的遗传稳定性检测报道甚少。现在前人研究基础上,以“童子一号”草莓茎尖为试材,初步研究了其玻璃化法超低温保存过程,以期“童子一号”草莓组织培养的进一步研究提供科学依据,也为建立草莓的种质资源保存提供切实可行的参考方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材为继代生长 30 d 的“童子一号”草莓试管苗。

### 1.2 试验方法

玻璃化法依照王子成等<sup>[5]</sup>的方法,并略加改动。

1.2.1 低温锻炼 将试管苗置于 4℃ 冰箱中低温锻炼 10、20、30、40 和 50 d。

1.2.2 茎尖预培养及预处理 取低温锻炼后的试管苗,切取 1~2 mm 大小的“童子一号”草莓茎尖,在固体预培养基(MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 5.8)中培养 1、2、3、4、5、6 和 7 d,预培养温度为 25℃。预培养后即转入无菌冷冻管中。向管中加入预处理培养液(MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖,pH 5.8),处理时间分别为 10、20、30、40、50 和 60 min,处理温度为 20℃。

1.2.3 脱水 吸出预处理培养液,并加入玻璃化保护剂 PVS2(MS+30% (w/v) 甘油+15% (w/v) 乙二醇+15% (w/v) DMSO+0.4 mol/L 蔗糖,pH 5.8)。在冰水混合物中依次处理 0、20、40、60、80、100 和 120 min 后,更换新鲜的 PVS2。

1.2.4 液氮保存 将装有新鲜 PVS2 和材料的冷冻管浸入液氮,60 min 后取出。

1.2.5 化冻与洗涤 将从液氮中取出的冷冻管迅速放入水浴锅中,40℃ 条件下快速化冻 1 min。在 20℃ 条件

**第一作者简介:**徐启红(1973-),女,河南沈丘人,硕士,副教授,现主要从事植物生理生化的教学与研究工作。E-mail: xqhryf@126.com.

**基金项目:**河南省高等学校青年骨干教师计划资助项目(2011GGJS-278)。

**收稿日期:**2012-05-18

下用 MS 洗涤液(含 1.2 mol/L 蔗糖)洗涤 3 次,每次洗涤时间为 10 min,以除去 PVS2。

1.2.6 超低温保存后恢复生长 用无菌滤纸吸去残留在茎尖表面的洗涤液,并接种到再生培养基上(MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 30% 蔗糖 + 7 g/L 琼脂, pH 5.8)。暗培养 4 d 后,即转入到正常培养,培养温度为  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照时间 12 h/d。10 d 后记录成活率。茎尖存活率 = (经超低温保存后成活的茎尖数/保存的总茎尖数)  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温锻炼对超低温保存离体茎尖成活率的影响

由图 1 可知,未经低温锻炼的“童子一号”草莓茎尖,其存活率仅为  $(10 \pm 2.27)\%$ ;锻炼 30 d 时成活率达到最高,为 29.00%。然而伴随着锻炼时间的延长,保存后茎尖的存活率下降趋势较为明显。当锻炼时间为 40~50 d 时,试管苗成活率下降显著,变黄脱叶,由于低温锻炼是在  $4^\circ\text{C}$  冰箱进行的,虽然能够诱导一些和抗冻有关的基因表达,产生抗冻蛋白并提高植物的抗冻性<sup>[7]</sup>,但由于得不到充足的光照,生活力随锻炼时间延长而逐渐下降,这可能是造成“童子一号”草莓茎尖超低温保存后成活率降低的因素之一。

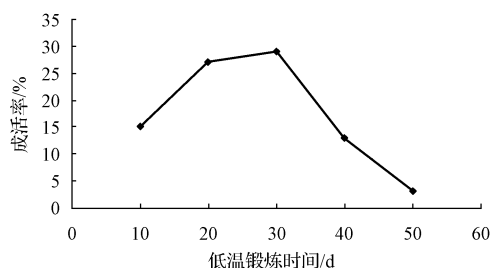


图 1 低温锻炼时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

Fig. 1 Effect of low temperature acclimatization time on *in vitro* shoot tips by cryopreservation

### 2.2 预培养时间对超低温保存离体茎尖成活率的影响

从锻炼 30 d 左右的“童子一号”草莓苗上切取 1~2 mm 大小的茎尖,并将其转入固体预培养基进行预培养,观察并记录不同处理时间对“童子一号”草莓茎尖存活率的影响。由图 2 可知,在  $25^\circ\text{C}$  条件下,茎尖成活率随着预培养时间的延长逐渐增高。预培养 3 d 时,个别茎尖的颜色呈黄绿色,成活率达到 23%;预培养 4 d 时大部分茎尖呈黄绿色,且成活率最高达 33%;到 7 d 时大部分茎尖褐化,成活率几乎为 0。由此可知,预培养对提高超低温保存后茎尖的成活率有着显著的影响。

### 2.3 预处理时间对超低温保存离体茎尖成活率的影响

将低温锻炼 30 d,预培养 4 d 的“童子一号”草莓茎尖依次进行不同时间的处理。由图 3 可知,随处理时间的延长,成活率呈现先升后降的趋势。其中在处理时间

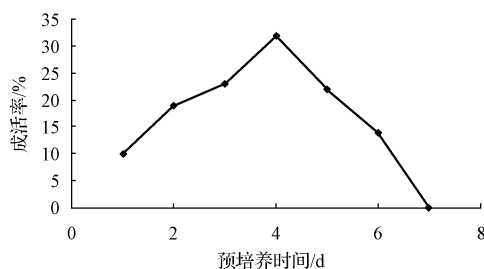


图 2 预培养时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

Fig. 2 Effect of pre-culture time on *in vitro* shoot tips by cryopreservation

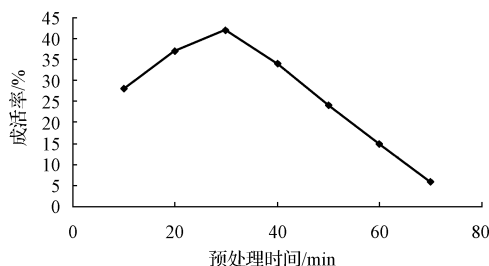


图 3 预处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

Fig. 3 Effect of pretreatment time on *in vitro* shoot tips by cryopreservation

为 30 min 时,效果较好,成活率达 43%。

### 2.4 PVS<sub>2</sub> 处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

将低温锻炼 30 d,预培养 4 d,预处理时间为 30 min 的“童子一号”草莓茎尖作为试材。由图 4 可知,伴随着 PVS<sub>2</sub> 处理时间的延长,保存后茎尖的存活率也逐渐呈现先增加后降低的趋势。其中处理时间为 80 min 时最高,达 43.00%,且再生植株分化正常,160 min 时成活率下降到 17.00%。

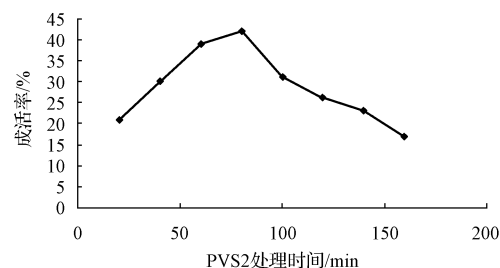


图 4 PVS<sub>2</sub> 处理时间对离体茎尖超低温保存成活率的影响

Fig. 4 Effect of PVS<sub>2</sub> treatment time on *in vitro* shoot tips by cryopreservation

## 3 讨论与结论

超低温保存技术同其它保存技术相比具有保存时间长、操作方便、遗传稳定性好等优点<sup>[8-10]</sup>。目前常用的超低温保存方法有慢冻法,快冻法,玻璃化法,包埋-脱水法和包埋玻璃化法等<sup>[11-14]</sup>。其中玻璃化法操作相对简

便,设备要求简单,应用也最为普遍<sup>[15]</sup>。

低温锻炼、预培养和预处理是影响“童子一号”草莓茎尖存活率的关键因素。研究发现,伴随着低温锻炼时间的延长,保存后的茎尖存活率呈现上升趋势。30 d效果最佳,之后成活率逐渐下降。这可能与试验中草莓得不到充足的光照,生活力下降,从而造成其存活率降低有关。预培养的目的是减少冻存过程中对细胞膜的伤害;然而过度脱水也会影响草莓茎尖的存活率,这与王子成等<sup>[5]</sup>的报道相一致。研究表明,若在处理前,用较高浓度的冷冻保护剂混合液经过一定时间的预处理,可避免由于渗透压剧烈变化而对材料造成的伤害。该试验选择了超低温保存中常用的玻璃化保护剂 PVS2,但由于 DMSO 毒性较强,因此处理时间过长则加剧毒害作用的发生,降低成活率<sup>[16]</sup>。冻存时间、解冻、洗涤和后处理也是影响存活率的重要因素。结合试验材料特性,选择了冻存 60 min;40℃ 条件下快速解冻 1 min;20℃ 条件下用洗液洗涤 3 次,每次时间 10 min;暗培养时间 4 d 等条件。但这些是否为最佳选择还需要今后进一步研究。

该试验以玻璃化法进行“童子一号”草莓离体茎尖的超低温保存研究,探讨了低温锻炼时间、预培养时间、预处理时间、PVS2 处理时间等对存活率的影响。研究发现,将继代 30 d,4℃ 条件下低温锻炼 30 d 的健壮草莓苗茎尖,接种在固体预培养培养基(MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 5.8)中预培养 4 d,预处理(MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖,pH 5.8)30 min 后,吸出预处理培养液,并加入 PVS2,在冰水混合物中处理 80 min 后,更换新鲜的 PVS2,并迅速投入液氮,60 min 后将从液氮中取出的冷冻管迅速放入 40℃ 水浴锅中,快速化冻 1 min。在 20℃ 条件下用含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 洗涤液洗涤 3 次,每次洗涤时间为 10 min。取出茎尖,接种到再生培养基(MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+30%蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 5.8),

经 4 d 暗培养后,即转入正常条件下培养,培养温度为(25±2)℃,光照时间 12 h/d。10 d 后记录成活率,成活率最高可达 43.00%,且再生植株分化正常。

### 参考文献

- [1] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学出版社,2003:34-51.
- [2] 薛庆善. 体外培养的原理和技术[M]. 北京:科学出版社,2001:1173-1179.
- [3] Nag K K, Street H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells[J]. Nature, 1973, 245: 270-272.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [5] 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306.
- [6] 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.
- [7] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 湖南:科学技术出版社,1998.
- [8] 肖洁凝, 黄学林. 茎尖和芽的超低温保存[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 46-51.
- [9] 赵云, 潘涛, 王茂林. 组织培养技术在植物种质保存中的应用[J]. 种子, 1995(6): 58-60.
- [10] 马锋旺, 李嘉瑞. 杏原生质体的超低温保存[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 329-332.
- [11] 简令成, 孙龙华. 猕猴桃茎段的超低温保存[J]. 植物学报, 1989, 31(1): 66-68.
- [12] Sakai A. Development of cryopreservation techniques. Florent E, Hiroko T. Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and application[C]. Tsukuba: Japan International Research Center for Agriculture Sciences, 2000: 1-7.
- [13] 王君晖, 边红武, 黄纯农. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 582-585.
- [14] 赵艳华, 吴永杰, 陈霜莹, 等. 包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 93-95.
- [15] 吴雪梅, 汤浩茹. 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展[J]. 植物学通报, 2005(22): 238-245.
- [16] 王君晖, 张毅翔, 刘峰, 等. 铁皮石斛种子、原球茎和类原球茎体的超低温保存研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(1): 59-61.

## Study on Cryo-preservation Technology with Vitrification of ‘Tongzi No. 1’ Strawberry

XU Qi-hong, REN Ping-guo

(Luohe Vocational Technology College, Luohe, Henan 462000)

**Abstract:** Researching on the ‘Tongzi No. 1’ strawberry meristem-tip cryo-preservation with vitrification, the effect of various factors of vitrification, such as, low temperature acclimatization time, pre-culture time, pretreatment time, PVS2 treatment time, were studied on survival rate of strawberry meristem-tip after cryo-preservation. The results showed that after 30 d and acclimatizing strawberry meristem-tips at 4℃, they were cultured in solid preculture medium after 4 d; pretreat for 30 min, suck up the pre-culture medium, and then put them into PVS2 at 0℃ for 80 min; then put them in the fresh PVS2, pre-serve in LN for 1 h; and then throw them rapidly into water at 40℃ for 1 min; wash the shoot tips 3 times at room temperature and then plant the tips to regeneration medium. The survival rate could reach the highest about 43% and regenerative plants become divided regularly.

**Key words:** strawberry; cryopreservation; vitrification