

- [2] Cinatl J. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus [J]. *Lancet*, 2003, 361(9374): 2045.
- [3] Zhang P Y, Peng Z X. Northwest liquorice, a resource plant in the northwest [J]. *Lanzhou Univ J* (兰州大学学报), 1960 (1): 57-87.
- [4] Qiu M X, Liu J Q. Utility and protection of Chinese liquorice land resource in arid area [J]. *J Nat Res* (自然资源学报), 1993, 9(4): 314-321.
- [5] Fu K Z. *Tamed Planting of Chinese Glycyrrhiza from Wilderness* (中国甘草野生变家植) [M]. Harbin: Northeast Forestry University Press, 1999.
- [6] Qiao S Y, Cheng S C, Wang Z B. *Glycyrrhizae of China* (中国甘草) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2004.
- [7] Wang W Q. *Studies on Ecological Characters of Glycyrrhiza uralensis Fisch. and Effects of Ecological Environment on Its Medicinal Material Quality* (甘草生态学特性及生态环境对其药材质量影响的研究) [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2000.
- [8] Wang L, Li J H. Technical system of artificial cultivating *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in northwest region [J]. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 1999, 35(1): 129-132.
- [9] Yu L Q, He M T, Wang Z L. Study on techniques for rapid propagation of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) by tissue culture [J]. *Grassland China* (中国草地), 1999, 18(1): 12-14.
- [10] Guang G, Zheng N, Gu G L. Study on hairy root in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Med Plant Cult* (药用植物栽培), 1992, 15(10): 3-7.
- [11] Ceng L, Lou Z C. Quality appreciation of *Glycyrrhiza* planted in China [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1991, 26(10): 788-793.
- [12] Yang Y X, Bian R R, Yao X H. Selection of forest gray model in the period of seedlings [J]. *Forest Res* (林业科学研究), 1991, 4(2): 211-216.

玻璃化法超低温保存怀山药种质的技术研究

洪森荣^{1,2}, 李明军^{1,3*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 上饶师范学院 生命科学系, 江西 上饶 334001;

3. 华中农业大学 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 研究怀山药种质资源的玻璃化超低温保存技术。方法 以 B 号怀山药带芽茎段为材料进行玻璃化超低温保存, 并采用培养法检测保存后材料的成活率, 从而筛选出最佳的玻璃化超低温保存技术体系。结果 B 号怀山药带芽茎段玻璃化超低温保存较佳的技术体系是继代生长 60 d 的怀山药无菌苗置 4℃冰箱低温锻炼 7 d; 在无菌条件下切取 1~1.5 cm 的带芽茎段, 转至含 5%蔗糖+3%甘露糖的培养基内, 置 4℃冰箱预培养 2 d; 用 60%的 PVS₁ (22%甘油+13%乙二醇+13%聚乙二醇+10%二甲基亚砷) 在 0℃处理 60 min, 再用 100%的 PVS₁ 在 0℃条件下处理 60 min, 随即迅速投入液氮; 保存 24 h 后, 在 37℃水浴中快速化冻, 用含 7%蔗糖的 MS 培养液洗涤 4 次, 每次停留 10 min; 转至再生培养基 (MS+KT 2 mg/L+NAA 0.02 mg/L) 再培养, 成活率可达 75%以上, 再生苗与常温苗形态指标差异不大。结论 本试验成功地建立了怀山药种质资源玻璃化法超低温保存的技术体系, 为怀山药种质资源的长期保存提供了一条有效途径。

关键词:怀山药; 种质资源; 玻璃化法; 超低温保存

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)11-1715-04

Cryopreservation technique of *Dioscorea opposita* germplasm by vitrification

HONG Sen-rong^{1,2}, LI Ming-jun^{1,3}

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian 453007, China; 2. Department of Life Science, Shangrao Normal College, Shangrao 334001, China; 3. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology,

Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: **Objective** To study the cryopreservation technique of *Dioscorea opposita* germplasm resources by vitrification. **Methods** Stems with buds of B[#] *D. opposita* germplasm were used as materials for cryopreservation by vitrification and the survival rates were examined by culture method in order to optimize a cryopreservation by vitrification technical system for *D. opposita* germplasm. **Results** A best procedure of cryopreservation by vitrification was as below: At first, the aseptic plantlets of stems with buds of B[#] *D. opposita* subcultured *in vitro* for 60 d were treated at 4℃ for 7 d. The stems with buds of *D. op-*

收稿日期: 2006-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670208); 河南省重点科技攻关项目 (0623030700)

作者简介: 洪森荣 (1974-), 男, 江西永新人, 讲师, 硕士, 主要从事细胞生物学和植物生物技术方面的教学、科研工作。

* 通讯作者 李明军 Tel: (0373) 3328189 E-mail: limingjun2002@263.net

posita about 1—1.5 cm in length were cut and precultured at 4 °C for 2 d in 5% sucrose and 3% mannose media, they were dehydrated with 60% vitrification solution (PVS₁: 22% glycerol + 13% glycol + 13% polyethyleneglycol + 10% dimethyl sulfoxide) at 0 °C for 60 min and then dehydrated with 100% vitrification solution at 0 °C for 60 min. At last, the stems were immersed immediately into liquid nitrogen directly and conserved for 24 h. After rapidly thawing in a water bath at 37 °C, the stems were washed four times with MS medium supplemented with 7% sucrose and 10 min each time, then transferred and re-cultured on the MS medium supplemented with KT 2 mg/L and NAA 0.02 mg/L. The survival rate was up to 75%. The regenerated plantlets of *D. opposita* showed no more difference than the normal plantlets in morphology. **Conclusion** This test sets up successfully a cryopreservation by vitrification system technique for *D. opposita* germplasm, which provides an effective way for long-lasting conservation *in vitro* of *D. opposita* germplasm resources.

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb.; germplasm resources; vitrification; cryopreservation

怀山药 *Dioscorea opposita* Thunb. 又名薯蓣, 是薯蓣科薯蓣属多年生缠绕性藤本植物, 主产于河南省焦作市的温县、武陟、沁阳等地(古怀庆府所辖), 药食兼优。入药, 具有健脾、补脾、固肾、益精、助五脏、强筋骨、益力气之功效^[1]; 食用, 营养价值高, 为滋补佳品, 故素有“怀参”之称, 其产品不仅畅销国内各地, 还远销港澳地区和东南亚以及欧、美等地。目前对怀山药主要开展了栽培管理、组织培养、药用成分、加工工艺、药理作用以及病毒病和脱毒快繁等一系列研究工作, 而关于种质资源则主要采用田间保存法, 不仅需要大量的人力、物力和财力, 而且还不可避免地受到病虫害和各种自然灾害的影响。因此, 进行怀山药种质资源的离体保存研究就具有十分重要的意义。

玻璃化法超低温保存是植物细胞和组织长期稳定保存的较好方法, 可以节省空间, 避免继代、病虫害和气候等因素造成的种质丢失, 并且设备简单, 操作简便, 已经成功地应用于苹果^[2]、甘薯^[3]、紫罗兰^[4]等植物种质资源的保存。有关山药的超低温保存国外已有研究^[5], 近年来本研究室对怀山药种质资源的超低温保存也进行了系统的研究^[6], 本实验报道该研究的部分内容。

1 材料与方法

1.1 材料: 试验材料为河南师范大学“四大怀药”组织培养室继代培养的 B 号怀山药无菌苗。

1.2 方法: 以怀山药带芽茎段为材料进行玻璃化法超低温保存, 并采用培养法检测保存后材料的成活率, 从而筛选出最佳的玻璃化法超低温保存技术体系。该方法包括以下程序。

1.2.1 低温锻炼: 继代生长 60 d 的怀山药的试管苗分别置于 4、7、9 °C 冰箱中低温锻炼 0~30 d。

1.2.2 预培养: 在无菌条件下切取 1~1.5 cm 的带芽茎段, 转至含 5% 蔗糖 + 3% 甘露糖的培养基内, 置 4 °C 冰箱预培养 2 d。

1.2.3 玻璃化保护剂处理: 本实验采用的玻璃化保护剂(PVS)是参考刘云国^[2]对苹果茎尖进行玻璃化超低温保存的方法设置的 PVS₁。其主要成分为 22% 甘油 + 13% 乙二醇 + 13% 聚乙二醇 + 10% 二甲亚砜。预培养后的茎段先用 60% 的 PVS₁ 在 0 °C 下处理 60 min, 再用 100% 的 PVS₁ 在 0 °C 下处理 60 min。

1.2.4 材料的冷冻保存: 将玻璃化保护剂处理过的材料迅速放入液氮中, 保存 24 h。

1.2.5 材料的化冻洗涤: 将材料从液氮中取出, 采用 37 °C 水浴快速化冻, 化冻后用含 1%~10% 蔗糖的 MS 培养液洗涤 4 次, 每次停留 0~30 min。

1.2.6 成活率检测: 将玻璃化超低温保存化冻洗涤后的怀山药茎段接种到再生培养基上进行培养, 记录成活率及恢复生长的时间, 并在 60 d 时测定超低温保存后的再生苗与常温保存试管苗的各项形态指标和生理指标。

成活率 = 玻璃化超低温保存后成活的茎段数 / 保存的总茎段数 × 100%

本试验均为单因子试验, 每次处理 25 个带芽茎段, 实验重复 4 次。试验结果应用 SPSS10.0 统计软件进行 Dunnett 法数据分析。实验中所使用的培养基均为 MS + KT 2 mg/L + NAA 0.02 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.5% 琼脂, 培养温度为 (25 ± 2) °C, 光照 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 低温锻炼温度和低温锻炼时间对怀山药玻璃化超低温保存的影响: 取继代培养 60 d 的 B 号怀山药,

在 4、7、9℃ 的低温条件下分别锻炼 0、1、3、5、7、10、15、30 d 后,投入液氮保存,其冻后成活率见表 1。

从表 1 可以看出:(1)怀山药茎段经过一定时间的低温锻炼,其冻后成活率都比对照要高,并且随着低温锻炼时间的延长,其成活率也得到不同程度的提高,当低温锻炼时间达到 7 d 时,成活率都达到最大。但当低温锻炼超过 7 d 时,其成活率开始下降。可见,怀山药茎段的低温锻炼时间以 7 d 为好;(2)低温锻炼温度对怀山药茎段冻后成活率也有显著影响,在 4℃ 低温下进行锻炼后,怀山药茎段的成活率都高于在 7 和 9℃ 低温下锻炼的效果,而 7℃ 低温锻炼的效果又优于 9℃ 低温锻炼的效果。在进行怀山药茎段的玻璃化超低温保存时,试管苗应先在 4℃ 低温下锻炼 7 d,这样可获得较高的成活率。

2.2 洗涤液蔗糖质量分数和洗涤时间对怀山药玻璃化超低温保存的影响:玻璃化超低温保存后的材料,用 MS 附加 1%~10% 蔗糖的洗涤液洗涤 4 次,

表 2 洗涤液蔗糖质量分数和洗涤时间对 B 号怀山药茎段玻璃化法超低温保存的影响

Table 2 Effect of sucrose concentration and washing time on cryopreservation of B [#] <i>D. opposita</i> stems by vitrification					
洗涤时间/ min	不同质量分数蔗糖的洗涤液洗涤后成活率/%				
	1%	3%	5%	7%	10%
对照(CK)	0	0	0	0	0
1	26.66±0.77**	33.07±0.88**	38.84±1.35**	41.77±1.03**	34.62±0.70**
3	31.51±0.74**	40.98±1.33**	45.08±1.07**	49.41±0.89**	40.14±0.86**
5	35.92±0.89**	45.96±1.02**	52.13±1.30**	60.15±1.19**	46.21±0.99**
7	41.08±0.81**	52.07±1.29**	59.51±0.55**	65.07±1.11**	55.35±2.10**
10	43.76±1.27**	57.10±1.24**	64.94±0.99**	76.99±1.18**	63.27±2.78**
15	38.16±0.97**	49.63±1.06**	57.02±1.09**	59.64±1.10**	53.22±2.33**
30	33.32±1.05**	35.46±0.76**	41.56±1.66**	45.22±0.82**	35.85±1.31**

与对照组比较:***P*<0.01
***P*<0.01 vs control group

山药的玻璃化超低温保存有显著影响。怀山药茎段冻后的成活率随蔗糖质量分数的增大而增大,当蔗糖质量分数为 7% 时,成活率达到最大。但当蔗糖质量分数超过 7% 时,其成活率则开始下降。可见,怀山药茎段超低温保存最佳的洗涤液以 MS+7% 蔗糖为好;(2)洗涤时间对怀山药冻后成活率也有显著影响,其中以每次洗涤 10 min 的效果最好,怀山药茎段成活率可达 76.99%。可见,在进行怀山药茎段的玻璃化超低温保存时,应用 MS+7% 蔗糖洗涤 4 次,每次洗涤 10 min,这样可获得较高的成活率。

2.3 玻璃化超低温保存后怀山药再生苗与常温保存苗形态指标的比较:将经过玻璃化超低温保存后的怀山药带芽茎段与常温保存的怀山药带芽茎段同时接种到培养基上,前者 10 d 开始恢复生长,15 d 茎段开始长出新芽,20 d 长出新叶,而后者 7 d 即可恢复生长,13 d 长出新芽,18 d 长出新叶。60 d 时测

表 1 低温锻炼温度和低温锻炼时间对 B 号怀山药茎段玻璃化法超低温保存的影响

Table 1 Effect of temperature and time of low temperature culture on cryopreservation of B[#] *D. opposita* stems by vitrification

低温锻炼 时间/d	不同低温锻炼温度冻后成活率/%		
	4℃	7℃	9℃
对照(CK)	16.83±0.18	16.83±0.18	16.83±0.18
1	33.95±0.48**	30.87±0.46**	27.49±0.65**
3	53.48±0.71**	50.46±0.59**	47.54±0.79**
5	64.04±0.44**	60.02±0.55**	57.34±1.06**
7	75.39±1.34**	70.70±0.81**	66.64±0.47**
10	69.57±1.27**	62.91±0.60**	60.38±1.14**
15	61.05±0.99**	58.97±0.58**	55.77±0.69**
30	56.84±0.64**	54.23±0.25**	50.30±0.45**

与对照组比较:***P*<0.01
***P*<0.01 vs control group

每次洗涤 0、1、3、5、7、10、15、30 min,其洗涤后成活率见表 2。

从表 2 可以看出:(1)洗涤液蔗糖质量分数对怀

定再生苗的形态指标,结果见表 3。

从表 3 可以看出,超低温再生苗与常温苗的形态指标基本一样,经 Dunnett 法检验,其株高、叶片数、芽数和茎节长虽有差异,但未达显著水平。

表 3 怀山药超低温保存后再生苗与常温保存苗形态指标的比较(60 d)

Table 3 Comparison of morphological indexes of *D. opposita* regenerated plantlets after cryopreservation by vitrification with normal plantlets (cultured for 60 d)

方 法	平均株 高/cm	平均叶片 数/片	平均芽 数/个	平均茎 节长/cm
超低温保存后再生苗	7.03±0.16	6.06±0.17	3.73±0.10	1.81±0.08
常温保存苗(CK)	6.99±0.21	6.10±0.29	3.74±0.08	1.79±0.09

2.4 玻璃化超低温保存后怀山药再生苗与常温苗生理生化指标的比较:将经过玻璃化超低温保存后的 B 号怀山药带芽茎段与常温保存的 B 号怀山药

带芽茎段同时接种到培养基上。60 d 时测定再生苗和常温苗的生理生化指标,结果见表 4。

从表 4 可以看出,B 号怀山药超低温再生苗与其常温苗的生理生化指标基本一样,经 Dunnett 法

检验,其叶绿素和可溶性蛋白的量以及 POD 活力虽有差异,但未达到显著性水平。结合表 3 可以知道,玻璃化超低温保存技术用来保存怀山药种质资源是合适的,能够保证遗传资源的稳定性。

表 4 怀山药玻璃化法超低温保存后再生苗与常温苗生理生化指标的比较(60 d)

Table 4 Comparison of physiological and biochemical characters of *D. opposita* regenerated plantlets after cryopreservation by vitrification with normal plantlets (cultured for 60 d)

处理组别	叶绿素 a/ (mg · g ⁻¹)	叶绿素 b/ (mg · g ⁻¹)	总叶绿素/ (mg · g ⁻¹)	可溶性蛋白/ (μg · g ⁻¹)	POD 活力/ (ΔA · min ⁻¹ · g ⁻¹)
常温保存苗(CK)	1.088 ± 0.006	0.238 ± 0.005	1.326 ± 0.011	1.195 ± 0.004	0.095 ± 0.004
冻后再生苗	1.084 ± 0.003	0.238 ± 0.009	1.315 ± 0.006	1.189 ± 0.002	0.091 ± 0.003

3 讨论

在植物种质资源超低温保存过程中,低温锻炼和预培养是保证成活率的重要步骤。低温锻炼可提高植物体内脯氨酸、多胺的量及胞液的渗透势等,从而增加植物的抗冻性。本实验发现,在怀山药茎段的玻璃化超低温保存中,4℃低温处理效果最好。可见,低温锻炼可以提高怀山药带芽茎段的耐冻力。刘云国等^[2]将培养 60 d 的苹果无菌苗分别转入 0~7℃下,培养 1~42 d,发现,随着低温锻炼时间延长,存活率增加,但 28 d 之后存活率基本保持不变,不同的低温(0~7℃)处理中,4℃处理得到最高的存活率;周小梅等^[7]将玉米幼胚在 4℃冰箱中放置 7 d 也获得较好的效果,玻璃化超低温保存后能诱导出良好的愈伤组织;赵艳华等^[8]认为马哈利樱桃离体茎尖随低温处理时间的延长,其冻后存活率逐渐提高,与 CK 相比,处理 90 d 的材料玻璃化超低温保存后茎尖存活率提高了 60.8%。

对于玻璃化超低温保存材料,化冻后的洗涤被认为很重要,这一过程不仅可除去高含量玻璃化保护剂对细胞的毒性,而且也是一个后过渡,以防渗透损伤,影响材料恢复和继续生长,因此需要除去玻璃化保护剂。陈勇等^[9]发现,用含 1.2 mol/L 山梨醇的 MS 培养基对胡萝卜悬浮培养细胞和原生质体进行洗涤能减轻细胞的复水损伤,提高其存活率。本实验也表明,怀山药茎段经玻璃化超低温保存后,用 MS+7%蔗糖的培养液洗涤 4 次,每次洗涤 10 min,存活率显著提高,达 75%~77%。这是因为蔗糖质量分数过低、洗涤时间过短或不洗涤,容易导致玻璃化保护剂对怀山药茎段细胞的伤害,而蔗糖质量分数过高或洗涤时间过长,则容易损伤细胞,这可能与质壁分离和溶质平衡失调有关。但在某些材料研究中发现,玻璃化超低温保存后的材料不经洗涤直接转入再生培养基,数天后即可恢复生长,洗涤反

而有害^[10]。可见,在玻璃化超低温保存中,洗涤与否以及洗涤液的质量分数和洗涤时间的长短必须依保存材料的种类和特性而定。

本试验为怀山药玻璃化法超低温保存提供了一个较佳的技术体系,不仅保持了较高的成活率,而且设备简单、操作简便、节省空间和遗传变异机率极小,是怀山药种质资源离体保存的一条有效途径。

References:

- [1] Nie G H. Advances of research of *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(3): 158-160.
- [2] Liu Y G, Wang X Y. Study of cryopreservation technique of apple germplasm by vitrification [J]. *J Shandong Agric Univ; Nat Sci* (山东农业大学学报:自然科学版), 2002, 33(1): 32-36.
- [3] Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 19(7): 733-737.
- [4] Shibli R A, Moges A D, Karam N S. Cryopreservation of Africa violet (*Saint paulia ionantha wendl.*) shoot tips [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2004, 40(4): 389-395.
- [5] Leunufina S, Keller E R J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(12): 1159-1166.
- [6] Li M J, Hong R, Xu X, et al. Cryopreservation technique of *Dioscorea opposita* Thunb. germplasm resources by vitrification [J]. *Acta Agronomica Sin* (作物学报), 2006, 32(2): 288-292.
- [7] Zhou X M, Wang G Y, Ao G M, et al. Cryopreservation of maize immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures by vitrification [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2001, 9(4): 355-358.
- [8] Zhao Y H, Wu Y J, Zhou M D. Cryopreservation of *in vitro* cultured shoot tips of *Prunus mahaleb* [J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), 1999, 26(6): 402-403.
- [9] Chen Y, Wang J H, Huang C N. Cryopreservation by vitrification of carrot (*Daucus carota* L.) suspension cells and protoplasts [J]. *J Zhejiang Univ; Sci Ed* (浙江大学学报:理学版), 2002, 29(1): 94-98.
- [10] Zheng J W, Yi G J, Zhang Q M, et al. Advances in research of *in vitro* conservation of fruit germplasm [J]. *J Fruit Sci* (果树学报), 2002, 19(5): 302-306.