

佛手茎尖玻璃化超低温保存和植株再生

张桂芳, 徐鸿华, 贺 红

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘 要:目的 为佛手种质资源的保存提供一条新途径。方法 对佛手茎尖进行了玻璃化超低温保存, 并对保存后的茎尖进行微嫁接试验, 获得再生植株。结果 佛手茎尖在含 5% DMSO 和 5% 蔗糖的 MS 培养基上预培养 48 h 后, 切取 3~4 mm 的茎尖, 室温(25 ℃)下装载液(60% PVS₂)预处理 30 min, 0 ℃下玻璃化液 PVS₂ 处理 80 min, 投入液氮保存 24 h 后取出, 在 40 ℃水浴快速化冻, 室温下分别用 1.2 mol/L 蔗糖和 MT 基本培养基洗涤 2 次, 每次 10 min。保存后的茎尖经 TTC 法检测, 成活率达 81.25%; 将茎尖嫁接到黑暗培养基的砧木上, 再生率可达 52.94%, 且再生植株生长和分化正常, 经 PCR 检测不含黄龙病病原。结论 玻璃化超低温保存方法可用于佛手种质资源保存。

关键词:佛手; 玻璃化法; 超低温保存; 茎尖微嫁接

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1806-05

Vitrified cryopreservation and regeneration of shoot-tips for *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

ZHANG Gui-fang, XU Hong-hua, HE Hong

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To provide a new approach of preservation for germplasm resources of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* (CMS). **Methods** A micrografting test was made on CMS shoot-tips after vitrified cryopreservation, resulting in living shoot-tip. **Results** First the CMS shoot-tip is inoculated in medium consisting of MS, 5% DMSO, and 5% sucrose for 48 h preincubation. Then the shoot-tips were cut off 3-4 mm long and fore-treated by 60% PVS₂ at room temperature (25 ℃) for 30 min. After that, they were treated by PVS₂ at 0 ℃ for another 80 min and conserved in liquid nitrogen for 24 h. Next the shoot-tips were defrosted by aqueous bath at 40 ℃ and cleaned twice at room temperature (25 ℃) by MT minimal medium with additive 1.2 mol/L sucrose, 10 min once. Finally data collected recorded a higher survival rate of 81.25% by TTC inspection and a better regeneration rate of 52.94% if the CMS shoot-tips had been grafted on darkly-cultured parental stock, growing, and differentiating normally afterwards. The plantlets detected by polymerase chain reaction (PCR) showed that the pathogens of Huanglong disease had been removed. **Conclusion** Therefore a conclusion is made that the approach of vitrified cryopreservation may be applied to the preservation of CMS germplasm resources.

Key words: *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle; vitrification; cryopreservation; shoot-tip micrografting

佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 为芸香科柑桔属植物, 以干燥果实入药, 具有疏肝理气、和胃止痛的功效^[1], 不仅为我国重要的出口创汇药材, 而且还具有较高的观赏价值, 开发利用前景广阔。佛手在我国一般无种子, 且种内变异较大, 病害严重, 生产上通常采用扦插和嫁接繁殖,

长期的无性繁殖, 病害逐代传递, 导致种质退化, 优良种质处于濒危^[2]。因此, 佛手种质保存对佛手资源的可持续利用具有重要意义。常规保存佛手种质的方法需要大量的人力和财力, 易受气候、栽培条件、病虫害的影响, 而且长期保存过程中会发生变异, 导致优良种质丢失。超低温保存是植物种质长

收稿日期: 2008-12-16

基金项目: 广东省科技计划项目“华南药用植物种质资源库建设”(2004B60302001)

作者简介: 张桂芳(1980—), 女, 河南开封人, 博士, 讲师, 从事中药资源研究与开发利用工作, 参与国家自然科学基金、广东省社会发展领域重点项目及广东省自然科学基金等省部级以上课题 8 项, 参编著作 2 部, 发表学术论文 10 余篇。

Tel: (020) 35855285 E-mail: zhanggf1026@yahoo.com.cn

期稳定保存的较理想方法,其中玻璃化冻存法易于操作,成活率高,具有很大的应用潜力。目前已成功保存了柑桔^[3]、怀山药^[4]、柿^[5]等多种植物,但尚未见到佛手种质资源保存的报道。

佛手成年材料离体培养较为困难,本实验对佛手茎尖进行玻璃化超低温保存方法的探索和研究,然后通过茎尖微嫁接获得再生完整植株,并对再生植株进行黄龙病病原的PCR检测,初步建立起玻璃化超低温保存的方法,为佛手种质资源的长期保存奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料:所用的材料为佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle (CMS) 成年树茎尖,由广州中医药大学张丹雁教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 预培养:取佛手成年树茎尖,自来水冲洗后用0.1%氯化汞溶液灭菌6 min,无菌蒸馏水冲洗4~5次,在无菌条件下切取6~8 mm的茎尖,接种在含0.5%二甲基亚砷(DMSO)和5%蔗糖的MS培养基上,于20℃和光照1 000 lx(12 h/d)下预培养不同天数。

1.2.2 装载与脱水:切取不同长度预培养后的茎尖,转移到1.8 mL冷冻管中,每管10~20个茎尖。室温下用60%PVS₂(0.15 mol/L蔗糖液体培养基-PVS₂溶液40:60)溶液预处理不同时间,再在0℃下用PVS₂(30%甘油,15%乙二醇,15%DMSO,0.4 mol/L的蔗糖)进行玻璃化处理不同时间,移去原液,装入新鲜的PVS₂后,迅速投入液氮中,保存24 h以上。

1.2.3 化冻洗涤、成活率和再生率检测:从液氮中取出冷冻管,分别于4~50℃水浴解冻(冻存管中的PVS₂刚好全部呈液态状)后吸去PVS₂,再转到室温下用1.2 mol/L蔗糖+MT基本培养基洗涤2次,每次10 min。

茎尖成活率检测:采用TTC法检测茎尖成活率^[6]。

茎尖再生率检测:采用已建立的佛手茎尖微嫁接方法^[7],并加以改进。将超低温保存后的茎尖嫁接到黑暗培养的柠檬砧木上,移入以MT为基本培养基,附加6-BA 0.5 mg/L和7.5%的蔗糖的固体培养基中培养;培养温度为(26±1)℃,每天光照12 h,光照强度为2 000 lx。一般每个实验处理,嫁接的苗数为15个。观察嫁接苗的长势,记录恢复生长的时间及30 d后嫁接成活率。再生率=(玻璃化超低温保存后的茎尖嫁接苗成活数/保存的总茎尖数)×

100%。

本试验为单因素试验,每次处理10~15个茎尖,重复3次。试验结果应用SPSS11.0统计软件进行Duncan新复极差法数据分析。

1.2.4 再生植株的黄龙病病原检测:采用上海申能博彩公司的3 s柱离心式植物基因组DNA试剂盒提取样品总DNA。紫外分光光度法检测DNA纯度和浓度,并以1.5%琼脂糖凝胶电泳观察提取结果。根据法国Villechanoux教授发表的黄龙病部分DNA序列(基因序号为M94319)设计引物。引物P1(TCTGTTTTCTTCGAGGTTGGTGAG)与黄龙病DNA序列的37~60位核苷酸同源,引物P2(ACCGCAAGACTCCTTACCAGGAAG)与462~485位核苷酸互补,PCR产物的分子量为570 bp。

PCR扩增反应:反应体系为10×buffer缓冲液5 μL, dNTPs 5 μL(2 mmol/L), MgCl₂ 3 μL(25 mmol/L), Taq酶0.5 μL(5 U/μL), 引物各0.5 μL(30 μmol/L), DNA模板100 ng, 加入灭菌纯水至50 μL。循环参数为94℃ 5 min, 随后94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35个循环, 最后72℃延伸10 min。反应完毕后,取扩增产物10 μL经1.5%琼脂糖电泳后在凝胶分子成像仪上检测并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 预培养对佛手茎尖超低温保存的影响:在预培养试验中发现,佛手茎尖用低温锻炼和山梨醇进行预培养,均未能提高冻后材料的成活率,而用5%DMSO进行预培养,则明显提高了冻后成活率。茎尖在MS+5%DMSO+5%蔗糖的培养基上预培养0~72 h后,再切取3~4 mm左右的茎尖,室温下60%PVS₂预处理30 min,0℃下用PVS₂溶液处理60 min,投入液氮保存24 h后取出,40℃水浴快速化冻,洗涤,检测成活率及再生率。结果表明(表1),用5%DM-SO进行预培养对提高材料冻后成活率和再生率效果明显。在预培养初期(0~48 h),随着预培养时间的延长,成活率和再生率明显提高,预培养48 h保存的成活率和再生率均达最高,分别为58.49%和35.30%。这可能是因为预培养使细胞的生理状态发生有利于超低温保存的变化,使胞内保护性物质增多,成活率提高;但预培养60 h后,茎尖变黄较多,成活率明显下降,可能是较弱的材料受不了DMSO的毒害而死亡,较强壮的材料才能经受住DMSO的毒害作用。综合考虑,预培养时间以48 h为好。

表 1 预培养时间对佛手茎尖超低温保存的影响
Table 1 Effects of different pre-culture time periods on vitrified cryopreservation of CMS shoot-tips

预培养时间/h	成活率/%	再生率/%
0	0.00±0.00 D	0.00
12	28.59±3.13 C	6.67
24	41.39±4.90 E	18.75
36	54.29±4.17 A	30.00
48	58.49±1.44 A	35.30
60	53.66±3.57 A	21.05
72	39.59±6.07 B	7.69

采用 Duncan 新复极差法进行方差分析,表 1、2、3 中不同字母表示两均值间差异显著($\alpha=0.01$)。

Different letters in column of survival rate respectively in Table 1, 2, 3 represent significant difference among treatments at 0.01 level by Duncan test

2.2 预处理时间对茎尖超低温保存的影响:据研究,植物茎尖在用玻璃化溶液(PVS)快速脱水之前,有一个所谓装载>Loading)的过程,即用一个较高浓度的冷冻保护剂混合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材料所造成的伤害^[8]。本试验预培养 48 h 后的茎尖,室温下用 60%PVS₂ 预处理不同时间,0℃下用 PVS₂ 处理 60 min,投入液氮保存 24 h 后取出,40℃水浴快速化冻,检测成活率及再生率。由表 2 可以看出,用 60%PVS₂ 进行装载,成活率与对照(预处理 0 min)相比有较大提高,预处理时间 30 min 时成活率最高,达 69.80%,再生率为 42.86%;低于 20 min,由于装载时间过短而未能完全达到缓冲的作用,材料不易成活;超过 40 min,则由于装载液对材料的毒害而使成活率有所下降。预处理时间的长短与处理时的温度也有一定的关系,在室温较低的冬季,处理时间以 30 min 为好,而在室温较高的夏季,可适当缩短至 20 min。

表 2 60%PVS₂ 预处理时间对佛手茎尖超低温保存的影响
Table 2 Effects of 60% PVS₂ pretreatment time on vitrified cryopreservation of CMS shoot-tips

预处理时间/min	成活率/%	再生率/%
0	8.19±0.98 E	0.00
10	25.12±2.10 D	15.38
20	58.14±3.50 B	30.00
30	69.80±3.03 A	42.86
40	52.39±2.09 B	33.33
50	37.91±3.27 C	18.18

2.3 PVS₂ 处理时间对超低温保存后材料成活率的影响:PVS₂ 处理是玻璃化超低温保存的关键步骤,其目的是脱去材料中过多的水分,使材料能够完全达到玻璃化,减轻在超低温保存过程中细胞所受

到的伤害^[9]。本试验将预培养的茎尖,室温下用 60%PVS₂ 预处理 30 min,再在 0℃下用 PVS₂ 处理不同时间,投入液氮保存 24 h 后取出,在 40℃水浴快速化冻、洗涤,然后检测成活率及再生率,结果见表 3。PVS₂ 处理对保存后的茎尖成活率和再生率有明显的影响,没有这一步处理,保存后茎尖全部死亡;用 PVS₂ 处理 80 min,可显著提高成活率和再生率,分别为 76.27%和 52.38%;当处理时间为 100 min 时,成活率和再生率明显降低,分别为 39.12%和 27.27%。这可能是因为随着处理时间延长,一部分冰冻保护剂渗透到材料内,对材料造成伤害。用 PVS₂ 处理使茎尖内组织进一步脱水,一些易形成玻璃化状态的分子(DMSO、EG、Gly)很快进入到茎尖组织,一旦快速冷冻,茎尖组织形成玻璃化状态,可以减轻对材料的伤害,从而提高冻存后的成活率和再生率,而选择低温(0℃)比在室温下可以减少保护剂对材料的伤害^[9]。在本试验中,佛手茎尖在 0℃下用 PVS₂ 处理 80 min 时获得了较高的成活率和再生率。

表 3 PVS₂ 处理时间对佛手茎尖超低温保存的影响
Table 3 Effects of PVS₂ treatment time on vitrified cryopreservation of CMS shoot-tips

处理时间/h	成活率/%	再生率/%
0	0.00±0.00 D	0.00
20	34.28±3.06 C	23.08
40	55.58±2.41 B	36.36
60	69.80±3.03 A	42.85
80	76.27±2.68 A	52.38
100	39.12±3.07 C	27.27

2.4 茎尖大小对超低温保存后成活率和再生率的影响:茎尖大小对脱水的难易影响很大,茎尖大不利于脱水,玻璃化程度不够而影响成活率,但再生容易;体积小,易于脱水,但不易再生,而且,冷冻保护剂对材料的毒害较大,从而影响成活率。佛手茎尖预培养后,分别切取 2~3 mm、3~4 mm、4~5 mm、5~6 mm 的茎尖,室温下用 60%PVS₂ 预处理 30 min,再在 0℃下用 PVS₂ 处理 80 min,投入液氮保存 24 h 后取出,在 40℃水浴快速化冻、洗涤,然后检测成活率及再生率。由图 1 可知,不同大小的茎尖其成活率和再生率差异很大。茎尖长度在 3~4 mm,成活率和再生率均较高,分别为 81.25%和 52.94%,而茎尖长度过大或过小时成活率和再生率均有所下降。因此,在进行佛手茎尖超低温保存时,茎尖大小以 3~4 mm 较合适。

2.5 化冻温度对佛手茎尖玻璃化超低温保存的影响:化冻温度是影响材料超低温保存效果的重要环

节,本试验设置了 5 个化冻温度(4、20、30、40、50℃),结果表明(图 2),随着化冻温度的升高,成活率相应增高,但过高的化冻温度会导致成活率下降,用 40℃水浴化冻佛手茎尖冻后成活率明显较其他组别高,故化冻温度采用 40℃较好。

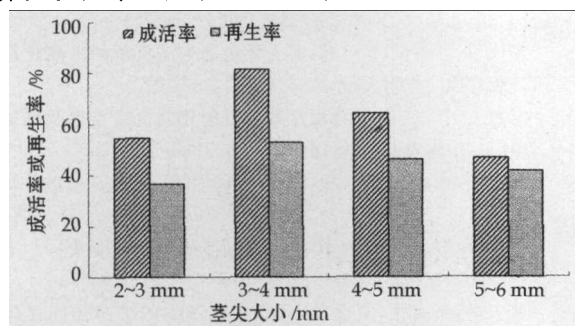


图 1 茎尖大小对超低温保存的影响

Fig. 1 Effects of shoot-tips size on vitrified cryopreservation

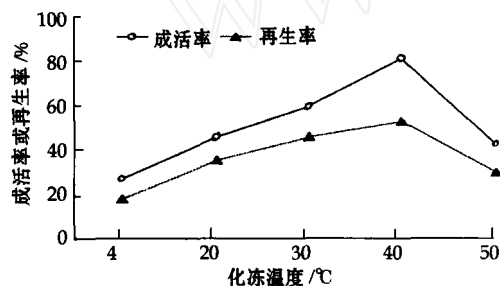


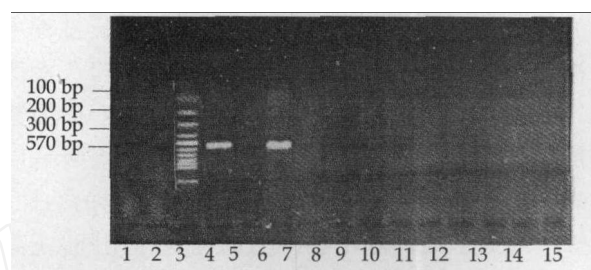
图 2 化冻温度对佛手茎尖玻璃化超低温保存的影响

Fig. 2 Effects of defrosting temperature on vitrified cryopreservation of CMS shoot-tips

2.6 超低温保存后茎尖微嫁接苗与常温嫁接苗形态指标的比较:超低温保存后的茎尖嫁接到砧木上后,1 d 后部分茎尖开始变黄,12 d 后,有些茎尖仍保持绿色,开始恢复生长,30 d 后成活苗可长出 5~6 片新叶,叶色浅绿色。而常温嫁接 3 d 后部分茎尖开始变黄,7 d 后保持绿色的恢复生长,30 d 后成活苗可长出 8~10 片新叶,叶色较深。超低温再生苗与常温嫁接苗在植株和叶片的形态上无差异,仅在生长势、株高、叶片数和茎节长度上有差异,但不显著,这可能是因为超低温保存对材料有一定的伤害,其恢复生长需要一定时间,也初步表明用玻璃化超低温保存技术保存佛手茎尖是合适的。茎尖微嫁接再生植株是通过器官发生途径,未经过愈伤组织阶段,因此发生变异的机率很小,理论上能够保证遗传资源的稳定性。目前,再生植株生长和分化正常,进一步遗传稳定性检测在进行中。

2.7 再生植株的 PCR 检测:在 98 株再生植株中随机选取 10 株进行黄龙病病原 PCR 检测,以感染黄龙病的甜橙叶片作为正对照,健康一年生柠檬实生

菌作为负对照,同时检测表现黄龙病症状的佛手叶片。结果表明,感染了黄龙病病原的甜橙及表现黄龙病症状的佛手,在预计的 570 bp 扩增出特异的电泳谱带,而健康柠檬实生苗及超低温保存后佛手茎尖微嫁接苗均未扩增出特征谱带(图 3),表明茎尖微嫁接技术可以脱除佛手黄龙病病原体。



1-水(空白对照) 2-健康一年生柠檬实生苗

3-100 bpDNA 标准相对分子质量(中部最浓带为 500 bp)

4-感染黄龙病的甜橙 6-表现黄龙病症状的佛手

5,7~15-超低温保存后的佛手茎尖微嫁接苗

1-water of control group 2-one-year limon seedling 3-DNA Marker with 100 bp ladders (middle intensive band is 500 bp)

4-orange infected by Huanglong disease 6-CMS with Huanglong disease syndrome 5,7-15-micro-grafted plantlet with vitrified cryopreservation of CMS shoot-tips

图 3 PCR 检测佛手黄龙病病原

Fig. 3 CMS Huanglong disease detected by PCR

3 讨论

目前长期稳定保存植物种质资源的最好方法是进行玻璃化超低温保存,在液氮低温下(-196℃),所有的细胞分裂和代谢活动几乎完全停止,植物材料处于相对稳定的生物学状态,因而从理论上来说,材料保存时间长短不会影响保存效果,比如樱桃在液氮中保存 1 d 和 10 个月,其保存效果没有明显差别^[10]。在本课题组实验中也发现,佛手茎尖超低温保存 6 个月与保存 24 h,其成活率和再生率无显著差异,有关佛手种质资源的长期保存,目前还在深入研究中。

超低温保存前必须经过预培养,以提高植物材料的抗冻性,减少或避免冷冻伤害^[9]。不同的植物材料,预培养方式也不相同。柑桔试管苗茎尖超低温保存中,5%DMSO 预培养 3 d 成活率最高^[3];柿茎尖超低温保存中,103、171、239 g/L 蔗糖各 1 d 的效果最好^[5]。本研究用 5%DMSO 和 5%蔗糖预培养,明显提高了冻后成活率。其原因可能是不同材料对预培养保护性脱水的“敏感度”不一样,DMSO 属于渗透性保护剂,易渗透到细胞内使其脱水不彻底;蔗糖是非渗透大分子物质,能让细胞胁迫脱水,二者组合处理更能达到保护性脱水的目的。

经过超低温保存的茎尖, TTC法检测成活率在80%左右, 而微嫁接再生率仅52%左右(采用优化的茎尖微嫁接方法, 一般嫁接成活率可达75%以上), 即再生率低于成活率。这可能是因为, 在进行超低温保存时, 保存的材料因受到伤害的程度不同, 有些材料完全没有受到伤害, 所以很快就恢复生长; 有的材料受到了稍重的伤害, 但在恢复生长过程中又被修复, 最终也恢复了生长, 这与在用TTC检测时, 发现有的茎尖只是顶芽或侧芽的部位变红, 而其他部分仍保持绿色相一致, 因为TTC法检测是以过氧化氢酶的活力为标准, 反映的是细胞内的活性, 而真正的细胞或许除了各种酶的综合作用外, 还需要保持细胞结构的完整性^[8]; 另一方面, 也可能在进行超低温保存后再培养时, 培养条件未能达到材料超低温冻存后恢复的要求。

本研究采用玻璃化超低温保存佛手茎尖, 获得了较高的成活率, 并结合茎尖微嫁接技术获得再生脱病原体植株, 为佛手种质资源的保存和可持续利

用开辟了一条新的途径。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 张桂芳, 徐鸿华. 佛手种质资源研究概况[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(1): 69-72.
- [3] 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.
- [4] 李明军, 洪森荣, 徐鑫, 等. 怀山药种质资源的玻璃化超低温保存[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 288-292.
- [5] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿休眠芽茎尖玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 553-556.
- [6] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998.
- [7] 张桂芳, 贺红, 徐鸿华. 佛手茎尖微嫁接技术研究[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1081-1084.
- [8] 张玉进, 张兴国, 刘佩英, 等. 植物茎尖的玻璃化冻存研究[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(增刊): 78-82.
- [9] 梁宏. 植物种质的玻璃化超低温保存[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27: 43-45.
- [10] Helliot B, Swennen R, Poumay Y, et al. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristems [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21: 690-698.

白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

王文燕¹, 赵强², 张铁军¹, 朱宏吉², 黎阳³

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 研究白芍药材的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立了白芍药材的 HPLC 的指纹图谱, 收集了不同批次的 47 批样品进行测定, 并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 主成分分析和聚类分析结果一致, 样品分为药材和饮片两类。结论 该方法可用于白芍质量控制及综合评价。

关键词:白芍; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)11-1810-05

HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition method of *Radix Paeoniae Alba*

WANG Wen-yan¹, ZHAO Qiang², ZHANG Tie-jun¹, ZHU Hong-ji², LI Yang³

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for quality control of *Radix Paeoniae Alba*. **Methods** A high performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of *Radix Paeoniae Alba* and 47 samples from various batches were analyzed. Cluster analysis and principal component analysis (PCA) were applied to study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition method. **Results** The result of PCA and cluster analysis showed that the samples were divided into two types. The HPLC fingerprinting of *Radix Paeoniae Alba*, showing 10 characteristic peaks, was established from 47 batches of *Radix Paeoniae Alba*. **Conclusion** The method provides an academic reference for the quality