

黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存及遗传稳定性研究

尹明华, 洪森荣*

上饶师范学院生命科学院, 江西 上饶 334001

摘要:目的 对影响黄独 *Dioscorea bulbifera* 微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的多种因素进行探讨, 并从形态学、生理学、DNA 量以及光合特性参数和叶绿素荧光参数等方面对其冻后再生苗的遗传稳定性进行检测。方法 采用微型块茎及其胚性愈伤组织进行诱导, 小滴玻璃化法超低温保存, 通过检测包括总叶绿素量、可溶性蛋白量、可溶性总糖量以及超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性等植物生理指标, 并采用流式细胞术的方法对遗传稳定性进行考察。结果 最佳的黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存条件: 室温下将黄独微型块茎胚性愈伤组织块转入 MS+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D+0.3 mol/L 蔗糖的培养基中预培养 1 d。预培养后的胚性愈伤组织块在 (25±1) °C 下转入装载液 (MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖, pH 5.8) 中处理 20 min, 再用 100% PVS2 于 0 °C 脱水 40 min。脱水后将材料转入铝箔条上的 PVS2 小滴中, 液氮冰冻后迅速将材料转入冷冻管中 (装满液氮)。投入液氮罐保持 1 d 后, 取出铝箔条, 浸入 37 °C 洗涤液 (MS+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D+1.2 mol/L 蔗糖, pH 5.8) 中, 胚性愈伤组织块脱落后, 室温下再用新鲜洗涤液对其洗涤 3 次, 每次 10 min。洗涤后的材料接入分化培养基 (MS+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉) 中, 暗培养 2 d 后转到 12 h/d 的光周期中培养, 细胞存活率达 89% 以上。黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存后的再生苗与胚性愈伤组织常温再生苗在形态指标和生理指标等方面均无显著性差异 ($P>0.05$), 两者的 DNA 量也未发生显著变化 ($P>0.05$)。结论 建立了黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的技术体系, 其再生植株经检测无遗传变异, 为薯蓣属植物种质资源的长期保存提供了理论依据和技术基础。

关键词: 黄独; 微型块茎; 胚性愈伤组织; 小滴玻璃化法; 超低温保存

中图分类号: Q942; R282 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2623-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.020

Study on cryopreservation and genetic stability of embryogenic calli induced from *Dioscorea bulbifera* microtuber

YIN Ming-hua, HONG Sen-rong

College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

Abstract: Objective To discuss the influence of several factors on the cryopreservation of embryogenic calli induced from *Dioscorea bulbifera* microtuber by droplet-vitrification and to test the genetic stability of the regenerated plantlets after freezing from the aspects of morphology, physiology, DNA content, as well as the photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters in this paper. **Methods** Plant tissue culture (including microtuber induction and embryogenic callus induction), plant physiology index detection (including total chlorophyll, soluble protein, soluble sugar and superoxide dismutase enzyme and peroxide enzyme activity), and cell flow cytometry were applied. **Results** The best cryopreservation conditions of embryogenic callus of *D. bulbifera* microtuber were as following: Embryogenic calli were precultured in liquid media of MS + KT 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + 0.3 mol/L sucrose for 1 d and then treated in loading liquid (MS + 2 mol/L glycerol + 0.4 mol/L sucrose, pH 5.8) for 20 min. In order to dehydrate, embryogenic calli were transferred in 100% PVS2 at 0 °C for 40 min. After dehydration, the embryogenic calli were inoculated to PVS2 small drops in the aluminum foil strips and then dipped in liquid nitrogen (LN). Finally the aluminum foil strips were quickly transferred to freezing tube that filled with LN and then put into LN tank. After conserving for 1 d in LN, the aluminum foil strips were removed and the embryogenic calli were immersed into liquid washing media (MS + KT 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + 1.2 mol/L sucrose, pH 5.8) preheated in 37 °C warm water. After separated from the aluminum foil strips, the embryogenic calli were washed with fresh liquid washing media at room temperature for three times, 10 min each time. After washing, the embryogenic calli were transferred onto differentiation medium (MS + KT 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 30 g/L sucrose + 5

收稿日期: 2015-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360072); 江西省教育厅 2014 年度科学技术研究一般项目 (GJJ14713)

作者简介: 尹明华, 硕士, 副教授, 研究方向为生物技术。E-mail: yinminghua04@163.com

*通信作者 洪森荣 (1974—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为植物生物技术。E-mail: hongsenrong@163.com

g/L agar), and cultured in dark for 2 d and then cultured in 12 h/d photoperiod, the cell survival rate reaches above 89%. The morphological and physiological indexes and the content of DNA of two kinds of plantlets, which regenerated from cryopreserved and non-cryopreserved embryogenic calli induced from *D. bulbifera* microtuber by droplet-vitrification, showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Cryopreservation technology system of embryogenic calli induced from *D. bulbifera* microtuber by droplet-vitrification is established and the regeneration plants have no genetic variation, which provides the theoretical basis and technical basis for the long-term preservation of germplasm resources in the plants of *Dioscorea* L.

Key words: *Dioscorea bulbifera* L.; microtuber; embryogenic callus; droplet-vitrification; cryopreservation

黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 隶属于薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 *Dioscorea* L.^[1], 其地下块茎可入药, 主治甲状腺肿大、咽喉肿痛、咯血、百日咳等病, 也可抑制肿瘤生长。因此, 保存黄独的种质资源具有重要意义。

目前, 保存植物种质资源的方法主要有田间保存和离体保存的方法。田间保存需要大量的人力、物力和财力, 而且容易受到自然灾害的侵袭。而离体保存是利用植物组织培养的方法对植物材料进行保存, 可分为一般保存、超低温保存和缓慢生长法离体保存^[2]。一般保存和缓慢生长法离体保存需经常继代, 容易污染和发生体细胞变异, 且变异的可能性将随着保存时间的增加而增大^[3]。超低温保存是一种安全、有效的种质资源保存途径, 可长期保存种质资源^[4]。小滴玻璃化法超低温保存是在滴冻法和玻璃化法基础上发展起来的用于植物种质资源保存的新技术, 其主要优点是高存活率、高再生率以及广适性, 而且处理量大、操作简易^[5]。目前, 利用小滴玻璃化法已成功保存了蔷薇茎尖^[6]、芋头茎尖^[7]、香草茎尖^[8]、阿月浑子树茎尖^[9]、樱桃砧木茎尖^[10]、桃棕体细胞胚^[11]、鳄梨胚性培养物^[12]、枣椰树分生组织^[13]、葡萄茎尖^[14]、巢蕨原叶体和绿色球状体^[15]、*Byrsonima intermedia* A. Juss. 茎尖^[16]、百合茎尖^[17]、油棕多胚体^[18]、月季芽^[19]、茜草毛状根^[20]、香蕉分生组织^[21]、菊花茎尖^[22]、犬蔷薇和锈红蔷薇茎尖^[23]、弥勒苣荬茎尖^[24]等多种植物材料。而关于黄独的研究多集中于组织培养^[25]、遗传多样性^[26]、珠芽形成^[27]、药理学^[28]、基因表达^[29]以及药用成分分析^[30]等方面, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的研究尚未见报道。本实验将对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存进行研究, 旨在为其种质资源的长期保存提供理论依据和技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

样品由上饶师范学院生命科学院植物组织培

养室提供, 经上饶师范学院生命科学院洪森荣副教授鉴定为黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 试管苗诱导的微型块茎。

1.2 方法

1.2.1 胚性愈伤组织诱导 将黄独试管苗诱导的成熟微型块茎切成片状 (1~2 mm 厚), 分别接种到诱导培养基上。诱导培养基为 MS+TDZ 2 mg/L+6-BA 1 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉, pH 5.8~6.0。接种完后置于黑暗条件下培养, 温度为 (25±1) °C。60 d 后, 取其胚性愈伤组织于上述诱导培养基上继代 2 次, 每次 30 d, 然后将其应用于黄独小滴玻璃化法超低温保存实验。

1.2.2 小滴玻璃化法超低温保存 在 (25±1) °C 下, 约 0.2 g 黄独微型块茎胚性愈伤组织转入预培养基中进行预培养。预培养分 2 种方式进行处理: (1) 将胚性愈伤组织转入 MS+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D+0~0.4 mg/L 蔗糖的液体培养基中, 预培养 5 d; (2) 将胚性愈伤组织块转入 MS+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D+0.3 mg/L 蔗糖的液体培养基中, 预培养 0~10 d。考察预培养液蔗糖浓度和预培养时间, 以上 2 种预培养方式的条件均为: 光照时间 12 h/d; 光照强度 1 000~2 000 lx; 温度 (25±1) °C。

预培养后, 将胚性愈伤组织在 (25±1) °C 下转入装载液 (MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖, pH 5.8) 中处理 0~50 min。考察装载时间, 取出材料后, 用无菌滤纸吸去胚性愈伤组织块表面附着的装载液。

装载后, 胚性愈伤组织用 100% PVS2 [300 g/L 甘油+150 g/L 乙二醇+150 g/L 二甲亚砜 (DMSO)+0.4 mol/L 蔗糖, pH 5.8] 于 0 °C 脱水 0~50 min。

脱水完成后, 用移液枪吸取 5 滴 PVS2 (每滴 15 μL) 滴到铝箔条上 (0.8 cm×4 cm, 0.03 mm), 然后将脱水后的胚性愈伤组织转入到铝箔条上的 PVS2 小液滴中。材料浸入液氮中冰冻后迅速将其转入 2 mL 装满液氮的冷冻管中, 然后投入液氮保持 24 h。取出冷冻管中的铝箔条, 分别浸入用 4、

25、37、45 °C 恒温预热过的洗涤液 (MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+0~1.6 mol/L 蔗糖的液体培养基, pH 5.8) 中。考察化冻温度和洗涤液中蔗糖浓度, 胚性愈伤组织脱落后再用新鲜洗涤液在 (25±1) °C 下洗涤 3 次, 每次 10 min。

洗涤后, 将胚性愈伤组织转入分化培养基 (MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉) 上, 然后置于 2 种培养条件下进行恢复培养。(1) 将洗涤后的胚性愈伤组织块直接置于光周期中培养, 光照 12 h/d; 光照强度 1 000~2 000 lx; 温度 (25±1) °C; (2) 先将洗涤后的胚性愈伤组织块暗培养 2 d, 温度 (5±1) °C, 再转到光周期中培养, 光照 12 h/d; 光照强度 1 000~2 000 lx; 温度 (25±1) °C。

1.2.3 超低温保存细胞存活率检测 解冻后的胚性愈伤组织用氯化三苯基四氮唑还原法 (TTC) 法测定其生活力。按 Towill 等方法^[31], 称取 100 mg 洗涤后的愈伤组织, 加入 0.4% TTC 试剂和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7) 各 2.5 mL, 在黑暗下于 27 °C 放置 24 h 后倒掉 TTC 液, 用蒸馏水洗涤 3 次。再加入 95%乙醇 5 mL, 于 60 °C 水浴 30 min, 用 731 型紫外分光光度计在 485 nm 处测其吸光度 (A) 值。用 A 值表示胚性愈伤组织在超低温保存后的细胞活力。细胞存活率=超低温保存后细胞的 A 值/超低温保存前细胞的 A 值。

1.2.4 再生苗的遗传稳定性检测 将超低温保存的胚性愈伤组织块以及未进行超低温保存处理的胚性愈伤组织块 (CK) 同时接入分化培养基 (MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉) 上, 40 d 后将分化的胚状体再次转入分化培养基 (MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂粉), 60 d 形成完整植株后对以上 2 种再生苗进行形态学、生理学、流式细胞术检测以及光合特性参数和叶绿素荧光参数的测定。形态学检测包括株高、新生叶数、新生芽数、新生根长等。

(1) 生理学检测包括总叶绿素量、可溶性蛋白量、可溶性总糖量以及超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性。总叶绿素量的测定采用丙酮比色法^[31], 可溶性蛋白量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[31], 可溶性总糖量的测定采用蒽酮比色法^[31], POD 活性的测定采用愈创木酚法^[32],

SOD 活性的测定采用 NBT 光还原法^[32]。

(2) 流式细胞术检测: 全部操作均在冰浴中进行, 所用溶液均预冷。将黄独再生苗叶片置于溶液 A (0.25 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 3 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物) 中剪碎, 研磨。用 400 目滤筛将匀浆液滤过, 以 2 000×g 离心 (美国贝克曼高速冷冻离心机) 10 min。沉淀物悬浮于溶液 B, 含 0.1% Triton×100 的溶液 A 中, 以 2 000×g 离心 10 min。弃上清, 沉淀物悬浮于溶液 C (2.2 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 3 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L PMSF) 中, 取超速离心管, 每管加 2 mL 溶液 C, 然后把细胞核悬液铺在溶液 C 上层, 以 25 000 r/min 离心 60 min。弃上清, 用溶液 A 轻轻荡洗管壁及沉淀物表面 2 次, 将离心管倒置, 用滤纸擦干管口。向离心管底部滴加几滴溶液 A, 用玻璃棒轻轻搅匀, 然后补加 1 mL 溶液 A。再以 2 000×g 离心 20 min, 弃上清, 沉淀物为纯化的细胞核。加 0.2 mL PI 溶液在暗处染色 10 min, 然后置流式细胞仪 (BD FACSCalibur, 美国 BD 公司) 测试。

(3) 光合特性参数的测定: 用 Li-6400 便携式光合仪于 9:00~11:00 测定完全展开的第 3 片叶的净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、细胞间 CO₂ 浓度 (C_i)、蒸腾速率 (T_r) 等参数, 以及环境 CO₂ 浓度 (仪器进气口的 CO₂ 浓度), 并计算气孔限制值 (L_s)、水分利用效率 (WUE) 和瞬时羧化速率 (CUE), 其公式分别为 $L_s=1-C_i/C_a$, $WUE=P_n/T_r$, $CUE=P_n/C_i$, CUE 用于估测 RuBPCase (1,5-二磷酸核酮糖羧化酶) 的活性。使用开放式气路, 光量子通量密度 (PPFD) 设定为 1 000 μmol/(m·s), CO₂ 浓度 (C_a) 为 400 μmol/mol。

叶绿素荧光参数的测定: 在同一叶片上用上述 Li-6400 便携式光合仪的荧光叶室测定荧光参数。叶片充分暗适应 20 min 后设置原初的荧光参数, 关闭光化学光和远红光, 打开测量光测定初始荧光 (F_0), 再用饱和的脉冲闪光 [8 000 μmol/(m·s)] 测定最大荧光 (F_m), 然后打开光化学活性光 [PPFD=450 μmol/(m·s)] 照射叶片, 当稳态荧光 (F_s) 出现后, 再打开一个饱和脉冲闪光 [6 000 μmol/(m·s)] 测定光适应后的最大荧光 (F_m'), 最后, 关闭光化学活性光, 再施加远红光以测量光适应的最小荧光 (F_0')。PSII 最大光化学效率 [$F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$], PSII 潜在光化学效率 [$F_v/F_0=(F_m-F_0)/F_0$], PSII 实际光化学效率 [$\Phi_{PSII}=(F_m'-F_s)/F_m'$], 开放的

PSII 反应中心捕获激发能效率 $[F_v'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m']$ 计算, 光化学荧光猝灭系数 $[qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')]$, 非光化学猝灭系数 $[NPQ = 1 - (F_v'/F_v) = 1 - (F_m' - F_o')/(F_m - F_o)]$ 根据文献测定^[33]。

1.2.5 统计方法 以上实验均重复 3 次, 本实验所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。以上实验数据均用 SPSS 19.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析, 再进行 LSD 法检验。

2 结果与分析

2.1 预培养时间和预培养液蔗糖浓度对超低温保存的影响

表 1 表明, 预培养时间过短或过长, 均不利于黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存后的成活。而 1 d 的预培养可以显著提高细胞存活率。表 1 也表明, 预培养液中蔗糖的浓度不能过低或过高, 否则将会显著降低细胞存活率。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的预培养条件为 MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+0.3 mol/L 蔗糖的液体培养基中预培养 1 d。

2.2 装载时间对超低温保存的影响

表 2 表明, 装载时间过短或过长, 均不利于黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存后的成活。而 20 min 的装载可以显著提高细胞存活率。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的装载条件为 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖装载 20 min。

表 1 蔗糖浓度和预培养时间对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的影响

Table 1 Effect of suerose concentration and preculture time on cryopreservation of *D. bulbifera* microtuber embryogenic callus by droplet-vitrification

蔗糖浓度/ (mg·L ⁻¹)	细胞存 活率/%	预培养 时间/d	细胞存 活率/%
0	35.6± 5.6 eE	0	42.5± 11.4 eE
0.056	64.3± 8.4 dD	1	94.6± 3.1 aA
0.100	80.5± 9.7 bBC	2	80.2± 14.5 bB
0.200	85.2± 10.1 bB	5	83.4± 8.6 bB
0.300	92.8± 2.5 aA	7	70.5± 12.6 cC
0.400	75.9± 12.4 cC	10	59.8± 9.5 dD

同一列中大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上的差异性, 下同
The capital and small letters in the same volume stand for the signification on 0.01 and 0.05 level, the same as below

表 2 装载时间对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的影响

Table 2 Effect of loading time on cryopreservation of *D. bulbifera* microtuber embryogenic callus by droplet-vitrification

装载时间/min	细胞存活率/%
0	42.6± 8.5 eE
10	72.4± 6.4 cC
20	89.6± 4.3 aA
30	80.2± 12.3 bB
40	69.5± 9.7 cC
50	60.4± 10.4 dD

2.3 脱水时间对超低温保存的影响

表 3 表明, 脱水时间过短或过长, 均不利于黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存后的成活。而 40 min 的脱水可以显著提高细胞存活率。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的脱水条件为 100% PVS2 (300 g/L 甘油+150 g/L 乙二醇+150 g/L DMSO+0.4 mol/L 蔗糖) 脱水 40 min。

2.4 化冻温度对超低温保存的影响

表 4 表明, 化冻温度过低或过高, 均不利于黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存后的成活。而 37 ℃ 的化冻温度可以显著提高细胞存活率。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的化冻温度为 37 ℃。

表 3 脱水时间对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的影响

Table 3 Effect of dehydration on cryopreservation of *D. bulbifera* microtuber embryogenic callus by droplet-vitrification

脱水时间/min	细胞存活率/%
0	28.9± 15.6 eE
10	46.4± 14.3 dD
20	61.6± 9.5 cC
30	81.5± 5.8 bB
40	92.8± 3.2 aA
50	80.5± 9.6 bB

表 4 化冻温度对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的影响

Table 4 Effect of thawing on cryopreservation of *D. bulbifera* microtuber embryogenic callus by droplet-vitrification

化冻温度/℃	细胞存活率/%
4	50.8± 8.6 cC
25	65.4± 13.6 bB
37	88.9± 8.9 aA
45	62.7± 5.4 bB

2.5 洗涤液中蔗糖浓度对超低温保存的影响

表 5 表明, 洗涤液中比较适合蔗糖浓度为 1.2 mol/L, 而洗涤液中蔗糖浓度过低或过高, 均不利于黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存后的成活。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的洗涤中液蔗糖浓度为 1.2 mol/L。

表 5 洗涤液中蔗糖浓度对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的影响

Table 5 Effect of suerose concentration in washing solution on cryopreservation of *D. bulbifera* microtuber embryogenic callus by droplet-vitrification

洗涤液中蔗糖浓度/(mol·L ⁻¹)	细胞存活率/%
0	65.7±14.2 dC
0.4	72.6±10.5 cC
0.8	83.5± 8.4 bB
1.2	90.8± 5.2 aA
1.6	81.6± 8.9 bB

2.6 冻后培养条件对超低温保存的影响

表 6 表明, 冻后直接转入光周期 (12 h 光/暗) 中培养不利于黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存后的成活。而冻后先暗培养 2 d 再转到光周期 (12 h 光/暗) 中培养可以显著提高细胞存活率。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的冻后培养条件为暗培养 2 d 后转入光周期中培养 (12 h 光/暗)。

表 6 冻后培养条件对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的影响

Table 6 Effect of culture condition after freezing on cryopreservation of *D. bulbifera* microtuber embryogenic callus by droplet-vitrification

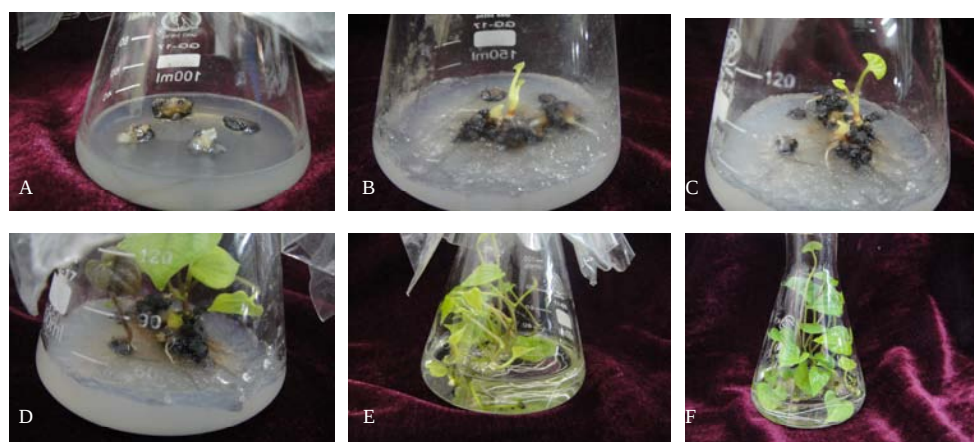
冻后培养条件	细胞存活率/%
直接光周期中培养 (12 h 光/暗)	82.7±5.4 bB
暗培养 2 d 后转入光周期中培养 (12 h 光/暗)	93.9±1.9 aA

2.7 冻后黄独微型块茎胚性愈伤组织再生苗的形态学、生理学和细胞学检测

通过对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存后的再生苗 (图 1) 与常温继代苗的形态指标 (株高、新生叶数、新生芽数、新生根长)、生理指标 (叶绿素量、可溶性蛋白量、可溶性总糖量以及 SOD 和 POD 活性) 以及光合特性参数和叶绿素荧光参数相比较, 表 7 表明, 这些指标和参数均无显著性差异 ($P>0.05$)。而且对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存后的再生苗与常温继代苗的流式细胞术检测也表明, 两者的 DNA 量也未发生显著变化 ($P>0.05$, 图 2)。因此, 黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存的实施可以从形态、生理、光合和 DNA 量上保证材料的遗传稳定性。

3 讨论

小滴玻璃化法超低温保存是目前应用较广泛的一种植物种质资源超低温保存方法^[5], 其操作步骤主要有预培养、装载、脱水、液氮冻存、化冻、洗涤、恢复培养等^[34]。



A-黄独微型块茎胚性愈伤组织诱导 B~D-超低温保存后黄独微型块茎胚性愈伤组织萌发出小芽 E~F-超低温保存后黄独微型块茎胚性愈伤组织再生苗
A-embryogenic calli induction of *D. bulbifera* microtuber B—D-shoots germinated from *D. bulbifera* embryogenic calli after cryopreservation
E—F- plantlets regenerated from *D. bulbifera* embryogenic calli after cryopreservation

图 1 黄独微型块茎胚性愈伤组织诱导及其超低温保存后的试管苗再生

Fig. 1 Embryogenic callus induction of *D. bulbifera* microtuber and its plantlets regeneration after cryopreservation

表 7 常温胚性愈伤组织再生苗与冻后胚性愈伤组织再生苗形态指标、生理指标以及光合特性和叶绿素荧光参数的比较
Table 7 Comparison on morphological indexes, physiological indexes, cytological indexes, photosynthetic characteristics, and chlorophyll fluorescence characteristics between regeneration plantlets in *D. bulbifera* microtuber embryogenic calli after cryopreservation and without cryopreservation

指标和参数	常温胚性愈伤组织再生苗	冻后胚性愈伤组织再生苗
平均株高/cm	8.2±0.4 aA	7.9±0.6 aA
平均新生芽数/个	5.4±1.2 aA	5.1±0.9 aA
平均新生根数/条	5.9±1.3 aA	6.2±1.1 aA
平均新生叶数/片	6.2±2.1 aA	6.8±1.9 aA
总叶绿素量/(μg·g ⁻¹)	1.963±0.284 aA	1.872±0.329 aA
可溶性蛋白量/(mg·g ⁻¹)	0.753±0.241 aA	0.821±0.216 aA
可溶性总糖量/(mg·g ⁻¹)	0.946±0.231 aA	0.885±0.194 aA
POD 活性/(U·g ⁻¹)	0.694±0.214 aA	0.728±0.165 aA
SOD 活性/(U·g ⁻¹)	186.4±52.8 aA	191.6±42.7 aA
P_n /(μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	6.59±0.43 aA	6.18±0.28 aA
G_s /(μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	0.39±0.04 aA	0.35±0.04 aA
C_i /(μmol·mol ⁻¹)	214.82±21.34 aA	221.7±32.86 aA
T_r /(mmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	2.55±0.62 aA	2.41±0.49 aA
Ls	0.463±0.042 aA	0.446±0.058 aA
WUE/(μmol·mmol ⁻¹)	2.584±0.216 aA	2.564±0.154 aA
CUE/(mmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	30.68±0.42 aA	27.88±0.16 aA
F_o	69.42±4.29 aA	65.22±9.60 aA
F_m	412.62±35.21 aA	406.88±25.64 aA
F_v/F_m	0.832±0.014 aA	0.840±0.029 aA
F_v/F_o	4.944±0.068 aA	5.239±0.024 aA
Φ_{PSII}	0.528±0.062 aA	0.534±0.019 aA
F_v'/F_m'	0.498±0.065 aA	0.514±0.048 aA
qP	0.896±0.052 aA	0.851±0.022 aA
NPQ	0.784±0.056 aA	0.802±0.034 aA

同一行中大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上的差异性

Capital and small letters in same line stand for signification on 0.01 and 0.05 levels, same as below

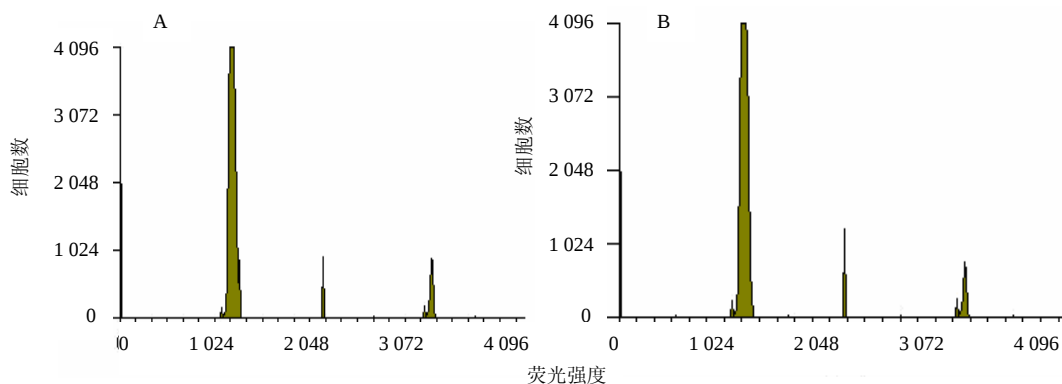


图 2 常温胚性愈伤组织再生苗 (A) 与冻后胚性愈伤组织再生苗 (B) 的流式细胞术检测

Fig. 2 Cell flow cytometry detection between regeneration plantlets of *D. bulbifera* microtuber embryogenic calli after cryopreservation and without cryopreservation

预培养主要是通过高浓度的蔗糖来降低细胞内自由水的量,以便有效降低冰点^[35]。其预培养方式一般有两步和一步之分。樱桃砧木茎尖采用两步预培养(即0.3 mol/L 蔗糖预培养15 h和0.7 mol/L 蔗糖预培养5 h)效果较好^[10],但大多数超低温保存采用的是一步法预培养。百合茎尖^[17]、菊花茎尖^[22]、香草茎尖^[8]、弥勒苣苔茎尖^[24]、*Byrsonima intermedia* A. Juss. 茎尖^[16]、油棕多胚体^[18]预培养时,蔗糖浓度一般为0.3~0.6 mol/L,预培养时间一般为12~24 h。这与本实验结果一致。

装载对于以玻璃化为基础的超低温保存也十分重要,而且找出适宜的装载时间对于超低温保存来说一般具有实际意义^[3]。目前装载液的成分一般为0.4 mol/L 蔗糖+2 mol/L 甘油。但其装载时间因植物种类而异。在百合茎尖^[17]、犬蔷薇和锈红蔷薇茎尖^[23]、香草茎尖^[8]、巢蕨原叶体和绿色球状体^[15]、月季芽^[19]装载时,装载时间一般为20~40 min。在某些植物种类中,装载液的成分需要发生一些改变,如油棕多胚体^[18]和樱桃砧木茎尖^[10]适宜的装载液分别为10% DMSO+0.7 mol/L 蔗糖以及0.5 mol/L 蔗糖+1.9 mol/L 甘油,但其装载时间一般维持在30 min。现在也有些学者认为装载这一步骤可免去,不会影响冻存效果^[5-6]。

装载后还需要对超低温保存的材料进行脱水。脱水一般在0℃采用PVS2处理^[34]。但PVS2具体的脱水时间也与植物材料种类相关。月季芽^[19]、油棕多胚体^[18]、巢蕨原叶体和绿色球状体^[15]、菊花茎尖^[22]、犬蔷薇和锈红蔷薇茎尖^[23]、蔷薇茎尖^[6]、芋头茎尖^[7]的PVS2处理时间一般为10~40 min,这与本实验结果相类似。但有些植物PVS2处理需要更长的时间。如鳄梨胚性培养物^[12]、弥勒苣苔茎尖^[24]和百合茎尖^[17]的PVS2处理时间分别为600 min、90 min和4 h。而且在某些植物的小滴玻璃化法超低温保存实验中,也有用PVS3(50%甘油+50%蔗糖)进行脱水处理的。如香草茎尖^[8]和桃棕体细胞胚^[11]经过PVS3室温下30和120 min后,材料的细胞成活率得到了显著提高。

在小滴玻璃化法超低温保存中,液氮保存时间一般不会影响植物材料的保存效果,预试验结果也表明,在液氮中超低温保存24 h、48 h、15 d和30 d,其超低温保存效果无显著性差异。因此,本实验一般选择24 h的液氮保存时间。但超低温保存后的化冻方式对植物细胞的冻后存活率具有显著的影响。

芋头茎尖的化冻温度为25℃^[7]。但樱桃砧木茎尖的化冻温度为37℃^[10]。这与本实验结果一致。

化冻后对材料进行洗涤也是一个常规步骤。洗涤效果主要取决于洗涤液中的蔗糖浓度。在百合茎尖^[17]、油棕多胚体^[18]以及犬蔷薇和锈红蔷薇茎尖^[23]的洗涤液蔗糖浓度均为1.2 mol/L。这些研究与本实验结果一致。但有些植物材料超低温保存后需要较低浓度的蔗糖浓度洗涤,如樱桃砧木茎尖的洗涤液蔗糖浓度为0.8 mol/L^[10]。

目前也有很多报道表明,在小滴玻璃化法超低温保存后进行适宜时间的黑暗培养后再转入光周期中培养,细胞存活率和再生率一般会显著提高^[22]。本实验结果也表明,黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存较佳的冻后培养条件为暗培养2 d后转入光周期中培养(12 h 光/暗)。但油棕多胚体小滴玻璃化法超低温保存研究的结果表明,冻后材料直接转入16 h的光周期中,也可获得68%的再生率^[18]。

细胞的冻后存活表明了小滴玻璃化法超低温保存的可行。但种质资源超低温保存还需要对其再生苗的遗传稳定性进行检测。菊花茎尖小滴玻璃化法超低温保存后的再生苗经流式细胞术检测,发现其与正常继代苗无显著性差异^[22]。本实验也表明,黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存后的再生苗与常温继代苗在DNA量、形态指标、生理指标以及光合特性和叶绿素荧光参数等方面均无显著性差异。这些结果表明,小滴玻璃化法超低温保存可以用来长期保存黄独微型块茎的胚性愈伤组织。但仅有这些结果还不够,今后还将对黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存后的再生苗进行分子标记方面的检测,从分子方面来论证本实验建立的黄独微型块茎胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存程序的可行性。

参考文献

- [1] 彭 斌,周义峰,舒 璞,等.黄独(*Dioscorea bulbifera* L.)不同居群叶表皮微形态特征的比较观察[J].植物资源与环境学报,2011,20(2):19-27.
- [2] 金建涛,赖钟雄,刘生财,等.尤溪金柑离体再生体系优化及试管苗保存[J].福建农林大学学报:自然科学版,2014,43(3):256-262.
- [3] 陈加利,姜 喜,肖 巍,等.扁桃茎尖包埋玻璃化超低温保存条件研究[J].塔里木大学学报,2014,26(2):110-114.

- [4] 杜来顺, 冯建军, 李晓华, 等. 生姜玻璃化法超低温保存技术 [J]. 北方园艺, 2014(13): 123-125.
- [5] 吴 昀, 张 琳, 林 田, 等. 超低温保存植物种质资源的新途径—一滴玻璃化法 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(5): 511-517.
- [6] Adela H, Pinker I. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2006, 84(2): 145-153.
- [7] Rajnesh S, Bart P, Mary T, *et al.* Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2008, 92(1): 107-111.
- [8] Maria T G A, Claudia E L V, Florent E, *et al.* Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews') [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2009, 45(5): 574-582.
- [9] Hülya A, Veysel S, Engin T, *et al.* *In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm [J]. *J Plant Biol Biot*, 2013, 22(1): 43-51.
- [10] Ružić D, Vujović T, Cerović R. Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) shoot tips by droplet-vitrification technique [J]. *J Horticult Res*, 2013, 21(2): 79-85.
- [11] Angelo S H, Douglas A S, Hugo P F F, *et al.* Global DNA methylation profiles of somatic embryos of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) are influenced by cryoprotectants and droplet-vitrification cryopreservation [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2013, 114(3): 365-372.
- [12] Guzmán-García E, Bradaï F, Sánchez-Romero C. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(1): 183-193.
- [13] Fki L, Bouaziz N, Chkir O, *et al.* Cold hardening and sucrose treatment improve cryopreservation of date palm meristems [J]. *Biol Plant*, 2013, 57(2): 375-379.
- [14] Zvezdana M, Philippe C, Isabelle S, *et al.* Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips [J]. *Cent Eur J Biol*, 2013, 8(10): 993-1000.
- [15] Li T, Xu L, Li Z, *et al.* Cryopreservation of *Neottopteris Nidus* prothallus and green globular bodies by droplet-vitrification [J]. *Cryoletters*, 2013, 34(5): 481-489.
- [16] Coutinho S L, Paiva R, Swennen R, *et al.* Shoot-tip cryopreservation by droplet vitrification of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: A woody tropical and medicinal plant species from Brazilian Cerrado [J]. *Cryoletters*, 2013, 34(4): 338-348.
- [17] Yin Z F, Bi W L, Chen L, *et al.* An efficient, widely applicable cryopreservation of *Lilium* shoot tips by droplet vitrification [J]. *Acta Physiol Plant*, 2014, 36(7): 1683-1692.
- [18] Saikat G, Uma R S, Periasamy S, *et al.* Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity [J]. *Protoplasma*, 2015, 252(1): 89-101.
- [19] Camille L B, Pierre-Henri L B, Latifa H, *et al.* Cryopreservation of ex-vitro-grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2014, 116(2): 235-242.
- [20] Mohammad S, Isabelle E S, Myriam C, *et al.* Effect of the successive steps of a cryopreservation protocol on the structural integrity of *Rubia akane* Nakai hairy roots [J]. *Protoplasma*, 2014, 251(3): 649-659.
- [21] Anuradha A, Rajkumari S, Rakesh S, *et al.* Phenotypic and molecular studies for genetic stability assessment of cryopreserved banana meristems derived from field and *in vitro* explant sources [J]. *In Vitro Cell Devel Biol-Plant*, 2014, 50(3): 345-356.
- [22] Wang R R, Gao X X, Chen L, *et al.* Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification [J]. *Sci Horticult*, 2014, 176: 330-339.
- [23] Božena P, Božena S T. Droplet vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from *in situ* plants [J]. *Sci Horticult*, 2014, 168: 151-156.
- [24] Lin L, Yuan B, Wang D, *et al.* Cryopreservation of adventitious shoot tips of *Paraisometrum Mileense* by droplet-vitrification [J]. *Cryoletters*, 2014, 36(1): 22-28.
- [25] Alka N, Sanjeev K, Srivastava P S. Genetic fidelity of *in vitro* regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(4): 623-629.
- [26] 郑玉红, 夏 冰, 杭悦宇, 等. 黄独遗传多样性研究 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2011-2017.
- [27] 龙雯虹, 王 琼, 肖关丽, 等. 黄独珠芽生长期內源激素及糖类物质含量的变化 [J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(2): 283-286.
- [28] 尹明华, 洪森荣, 林国卫, 等. 黄独微型块茎诱导形成中 SQS 基因表达的 qRT-PCR 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1520-1524.
- [29] Victor K, Rémy B T, Armelle T M, *et al.* Antibacterial

- activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, (12): 228-235.
- [30] 李石生, 邓京振, 赵守训. 黄独块茎的甾体类成分 [J]. 植物资源与环境, 1999, 8(2): 61-62.
- [31] Towill L E, Mazur P. Studies on the reduction of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures [J]. *Can J Bot*, 1975, 53(7): 1093-1102.
- [32] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [33] 陈艳丽, 范 飞, 王 旭, 等. DA-6 对高温胁迫下黄灯笼辣椒幼苗的影响 [J]. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1795-1801.
- [34] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存及其再生植株的遗传稳定性 [J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1431-1438.
- [35] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 9(1): 30-33.