

‘红香芋’茎尖玻璃化法保存条件的筛选

臧玉文, 蒋芳玲, 刘敏, 程雅琪, 孔祥宇, 吴震^①

(南京农业大学园艺学院 农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

Screening on vitrification conservation conditions for shoot tip of *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’ ZANG Yuwen, JIANG Fangling, LIU Min, CHENG Yaqi, KONG Xiangyu, WU Zhen^① (Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(1): 116-118

Abstract: In order to screen suitable vitrification conservation conditions for shoot tip of *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’, pre-culture, vitrification protection and thawing conditions were compared. The results show that with increasing of sucrose concentration in the medium and extending of pre-culture time, survival rate of shoot tip increases gradually. After different loaded and dehydrated measures, water content in shoot tip is lower than that of the control, while survival rate of shoot tip increases significantly than that of the control. Thawing for 1-2 min at 40 °C-60 °C generally has no significant effect on survival rate of shoot tip. Suitable cryopreservation steps of vitrification as follows: shoot tip pre-cultured for 3 d in medium with 0.6 mol · L⁻¹ sucrose firstly, then loaded for 30 min in 60% PVS2, dehydrated for 15 min in PVS2, put in PVS2 and conserved in liquid nitrogen, and shoot tip thawed for 1-2 min in 40 °C.

关键词: 红香芋; 茎尖; 玻璃化保存; 存活率

Key words: *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’; shoot tip; vitrification conservation; survival rate

中图分类号: Q943.1; S632.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2017)01-0116-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.01.18

芋[*Colocasia esculenta* (Linn.) Schott]通常用球茎繁殖,其种质保存方式主要为建立种质圃,但具有占用空间大、投入较高、易遭受胁迫等问题^[1]。超低温保存技术具有稳定、经济、有效等优点,适合无性繁殖和非正常性种子繁殖植物的种质保存^[2],而玻璃化法作为一种更优的保存技术已成功应用于多种植物的种质保存^[3-4]。目前,芋的玻璃化冷冻保存主要以愈伤组织或体胚为材料^[5],但再生培养时易发生变异,而利用茎尖或分生组织则能避免此类情况的发生^[6]。

作者以芋品种‘红香芋’(‘Hongxiangyu’)试管苗茎尖为材料,研究了预培养、玻璃化保护液装载与脱水、化冻等过程对其冻存效果的影响,以确定适宜的玻璃化法超低温保存技术,为建立更加简单可靠的芋种质资源保存体系提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试芋品种‘红香芋’为江苏省金坛市优良地方品种,现保存于南京农业大学园艺学院。选择顶芽饱满、未感病的球茎,割取顶芽、剥去外层鳞片,消毒后备用。

1.2 方法

1.2.1 茎尖继代培养 将供试顶芽置于 MS 培养基(含 1.0 mg · L⁻¹6-BA、0.1 mg · L⁻¹NAA、30 g · L⁻¹蔗糖和 6.5 g · L⁻¹琼脂)中继代培养。培养条件为光照度 3 000~4 000 lx、光照时间 12 h · d⁻¹、温度(25±1) °C。

1.2.2 蔗糖浓度和预培养时间筛选 剥取无菌苗 1 cm 茎尖,分别接种在含 0.2、0.4、0.6 和 0.8 mol · L⁻¹蔗糖的 MS 培养基上,按照上述培养条件分别预培养 0、1、2、3 和 4 d。预培养后的茎尖经过 60% PVS2(PVS2 由体积分数 30%甘油、体积分数 15%乙二醇、体积分数 15%DMSO 以及含 0.4 mol · L⁻¹蔗糖的 MS 培养液组成)装载 30 min, PVS2 脱水 15 min;将茎尖放入装有新鲜 PVS2 的冻存管中,于液氮中保存;24 h 后取出冻存管,40 °C 水浴解冻 1 min;用含 1.2 mol · L⁻¹蔗糖的 MS 培养液洗 2 次,各 10 min,然后用 TTC 法^[7]检测茎尖存活率。

1.2.3 装载与脱水条件筛选 将茎尖接种在含 0.6 mol · L⁻¹蔗糖的 MS 培养基中预培养 3 d,然后按照 CK(对照组)以及 T1、T2、T3 和 T4 处理组的设置分别装载与脱水。对照组直接置于液氮中保存 24 h;T1、T2 和 T3 处理组分别先用 60%PVS2 装载 10、20 和 30 min,再用 PVS2 脱水 15 min;T4 处理组依次

收稿日期: 2016-05-23

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 臧玉文(1989—),女,河北保定人,硕士研究生,主要从事蔬菜生理生态方面的研究。

^①通信作者 E-mail: zpx@njau.edu.cn

用 PVS2 处理 20 和 15 min。从对照组和各处理组分别取出一批茎尖, 用滤纸吸去表面水分, 称量鲜质量; 然后于 80 °C 烘干至恒质量, 称量干质量, 计算茎尖含水量。其余茎尖进行冻存和化冻后测定茎尖存活率。

1.2.4 化冻条件筛选 将茎尖接种在含 0.6 mol · L⁻¹ 蔗糖的 MS 培养基中预培养 3 d, 经过 60% PVS2 装载 30 min, PVS2 脱水 15 min, 放入冻存管, 液氮保存 24 h; 然后, 分别置于 30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 的水浴中化冻, 化冻时间分别为 1 和 2 min, 按照上述方法分别测定茎尖存活率。

1.2.5 茎尖再生培养 以上述筛选的最优条件冻存的茎尖为实验材料进行再生培养。培养基为含 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA、0.1 mg · L⁻¹ NAA、0.09 mol · L⁻¹ 蔗糖和 6.5 g · L⁻¹ 琼脂的 MS 培养基, 暗培养 2 周后转入光下培养 35 d^[8], 培养条件同上。观察植株生长状况并统计成苗数, 计算再生率。

上述各处理使用的培养基或培养液 pH 值均为 6.8, 以 21 个茎尖为 1 个重复, 各处理均设 3 个重复, 结果取平均值。

1.3 数据计算和统计分析

按照公式“含水量=[(茎尖鲜质量-茎尖干质量)/茎尖鲜质

量]×100%”、“存活率=(完全显深红色的茎尖数/经 TTC 处理的茎尖总数)×100%”和“再生率=(再生成苗的茎尖数/冻存茎尖总数)×100%”分别计算茎尖的含水量、存活率和再生率。

采用 EXCEL 2003 和 SPSS 16.0 统计分析软件对相关实验数据进行处理和统计分析。

2 结果和分析

2.1 蔗糖浓度和预培养时间对茎尖存活率的影响

不同蔗糖浓度和预培养时间对冻存后‘红香芋’茎尖存活率的影响见表 1。结果显示: 蔗糖浓度和预培养时间均对茎尖存活率有明显促进作用。在蔗糖浓度 0.2 和 0.4 mol · L⁻¹ 的条件下茎尖存活率随预培养时间延长而逐渐增大; 而在蔗糖浓度 0.6 和 0.8 mol · L⁻¹ 的条件下茎尖存活率先升高后下降, 分别在第 3 天和第 2 天达最高。预培养第 0 天和第 4 天, 各处理组的茎尖存活率均无显著差异; 预培养第 1 天至第 3 天, 蔗糖浓度 0.6 和 0.8 mol · L⁻¹ 处理组的茎尖存活率总体上显著高于其他 2 个处理组; 总体上看, 茎尖存活率随培养基

表 1 蔗糖浓度和预培养时间对冻存后‘红香芋’茎尖存活率的影响¹⁾

Table 1 Effects of sucrose concentration and pre-culture time on survival rate of shoot tip of *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’ after cryopreservation¹⁾

| 蔗糖浓度/mol · L ⁻¹ Conc. of sucrose | 预培养不同时间后茎尖的存活率/% Survival rate of shoot tip after pre-cultured for different times | | | | |
|--|---|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | 0 d | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d |
| 0.2 | 6.35±2.75a | 12.70±2.75b | 17.46±2.75b | 26.98±5.50c | 39.69±4.76a |
| 0.4 | 6.35±2.75a | 15.88±2.75b | 25.40±2.75b | 36.51±2.75bc | 42.86±4.76a |
| 0.6 | 6.35±2.75a | 20.64±2.75b | 41.27±9.91a | 55.56±7.27a | 46.03±5.50a |
| 0.8 | 6.35±2.75a | 34.92±2.75a | 46.03±7.27a | 44.44±7.27ab | 41.27±2.75a |

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

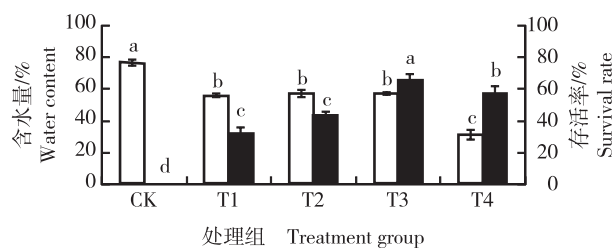
中蔗糖浓度提高而增大。

2.2 玻璃化装载与脱水对茎尖含水量和存活率的影响

玻璃化装载和脱水方式对‘红香芋’茎尖含水量和存活率的影响见图 1。结果显示: 各处理组的茎尖含水量均显著低于对照组, T4 处理组的茎尖含水量最低(为 31.57%), T1、T2 和 T3 处理组间无显著差异。对照组的茎尖存活率为 0%, 而 T3 处理组的茎尖存活率最高(达 65.08%), 显著高于 T1、T2 和 T4 处理组; 总体上看, 茎尖存活率随装载时间延长而增大。综合分析结果显示: 经 60% PVS2 装载 30 min, 再经 PVS2 脱水 15 min, 茎尖的含水量适宜、存活率最高。

2.3 化冻温度和时间对茎尖存活率的影响

化冻温度和时间对‘红香芋’茎尖存活率的影响见图 2。结果显示: 在化冻温度 30 °C ~ 60 °C 条件下, 茎尖均能快速解冻, 且相同化冻温度下化冻时间对茎尖存活率无明显影响; 而在化冻时间相同的情况下, 化冻温度为 40 °C ~ 60 °C, 茎尖存活率总体上无显著差异。故茎尖经液氮保存后, 在 1 ~ 2 min 内于 40 °C ~ 60 °C 快速化冻即可。

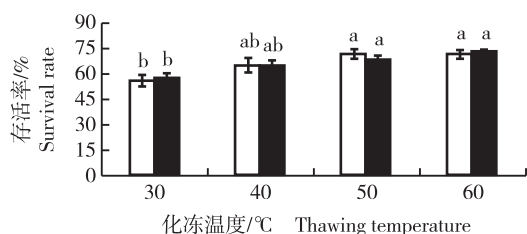


□: 含水量 Water content; ■: 存活率 Survival rate.

CK: 对照 The control; T1, T2, T3: 60% PVS2 分别装载 10、20 和 30 min, PVS2 脱水 15 min Loaded for 10, 20 and 30 min by 60% PVS2, respectively, then dehydrated for 15 min by PVS2; T4: 用 PVS2 依次处理 20 和 15 min Treated for 20 and 15 min orderly by PVS2. 同一指标的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases of the same index indicate the significant difference ($P < 0.05$).

图 1 玻璃化保护液装载和脱水方式对‘红香芋’茎尖含水量和存活率的影响

Fig. 1 Effects of vitrification protection liquid loaded and dehydrated measures on water content and survival rate of shoot tip of *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’



□: 化冻 1 min Thawing for 1 min; ■: 化冻 2 min Thawing for 2 min.

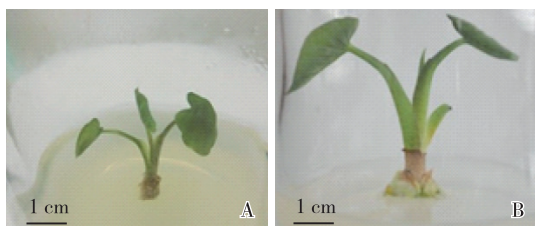
不同的小写字母表示同一化冻时间不同化冻温度间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant difference in the same thawing time among different thawing temperatures ($P < 0.05$).

图2 化冻温度和时间对‘红香芋’茎尖存活率的影响

Fig. 2 Effects of thawing temperature and time on survival rate of shoot tip of *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’

2.4 茎尖再生植株的生长状况观察

‘红香芋’茎尖经玻璃化法超低温保存后接种于再生培养基上,其生长状况见图3。结果表明:化冻后的茎尖接种在再生培养基中均能够恢复生长,暗培养2周后转至光下培养10 d后茎尖萌动长出幼芽,光下培养约35 d后茎尖再生成幼小植株(图3-A),再生率为39.68%。与正常茎尖的试管苗(图3-B)相比,两者在形态上没有明显差异。



A: 培养约50 d玻璃化茎尖形成的试管苗 Plantlet from vitrified shoot tips after cultured for about 50 d; B: 正常茎尖形成的试管苗 Plantlet from normal shoot tip.

图3 ‘红香芋’玻璃化茎尖与正常茎尖的再生状况比较

Fig. 3 Comparison on regeneration status between vitrified shoot tip and normal shoot tip of *Colocasia esculenta* ‘Hongxiangyu’

3 讨论和结论

影响植物离体茎尖玻璃化法超低温保存效果的因素有很多,包括预培养方式、玻璃化保护液装载和脱水方式及化冻条件等。香石竹(*Dianthus caryophyllus* Linn.)在含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基中预培养1 d后冻存的茎尖存活率最高^[9],本研究结果与其有一定差异。说明利用此技术保存不同植物种质时,须筛选各自适宜的蔗糖浓度和预培养时间。

本研究中,脱水前先用60%PVS2处理30 min,茎尖存活

率大于直接利用PVS2脱水处理,可能由于低浓度保护液可缓解剧烈脱水对细胞的伤害,也说明直接用高浓度玻璃化溶液脱水,可使细胞渗透压剧烈变化,导致细胞损害^[10]。本研究中,用60%PVS2装载10~30 min,茎尖含水量无差异,但处理30 min茎尖存活率最高,是因为用玻璃化保护液处理茎尖,不仅要降低含水量,还须使保护剂充分浸入细胞以提高茎尖抗冻性,装载时间过短则无法有效抗冻。

化冻条件对存活率影响较大。‘红香芋’茎尖适宜的化冻条件为在40 °C水浴中快速处理1~2 min;当温度升至60 °C时,茎尖存活率无显著差异。由于用较高温度化冻不易掌握且重复性差,并易出现化学毒性伤害^[8],因此,40 °C是‘红香芋’茎尖最合适的化冻温度。

综上所述,适宜于‘红香芋’茎尖玻璃化超低温保存的步骤为:茎尖先用含 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的MS培养基预培养3 d,然后用60%PVS2装载30 min,再经PVS2脱水15 min,将茎尖置于液氮中冷冻保存。经过超低温保存的茎尖在40 °C水浴中化冻1~2 min,经过再生培养,即可获得正常试管苗。

参考文献:

- [1] SINGH S, SINGH D R, FASEELA F, et al. Diversity of 21 taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] accessions of Andaman Islands [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2012, 59: 821-829.
- [2] 吴 响, 张 琳, 林 田, 等. 超低温保存植物种质资源的新途径: 小滴玻璃化法[J]. 植物生理学报, 2012, 48(5): 511-517.
- [3] LI M J, ZHAO X T, HONG S R, et al. Cryopreservation of plantlet nodes of *Dioscorea opposita* Thunb. using a vitrification method [J]. CryoLetters, 2009, 30(1): 19-28.
- [4] IBRAHIM S, NORMAH M N. The survival of *in vitro* shoot tips of *Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by vitrification [J]. Plant Growth Regulation, 2013, 70(3): 237-246.
- [5] 洪森荣, 尹明华, 王艾平. 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存技术的研究[J]. 植物研究, 2014, 34(3): 333-338.
- [6] SANT R, TAYLOR M, TYAGI A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by vitrification [J]. CryoLetters, 2006, 27(3): 133-142.
- [7] 沈 琛, 徐 瑾, 李秉玲, 等. 卷丹不同继代试管苗茎尖超低温保存效果及组织细胞学研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(16): 139-142.
- [8] 张玉进, 张兴国, 庞 杰, 等. 魔芋茎尖玻璃化冻存研究[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 97-102.
- [9] 周旭红, 何 艳, 欧阳德爱, 等. 玻璃化法超低温保存香石竹种质资源的研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 248-252.
- [10] 王更亮, 许传营, 王广东. 花烛胚性悬浮细胞玻璃化超低温保存条件研究[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(1): 26-31.

(责任编辑: 郭严冬)