

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.09.010

# 紫参薯的包埋玻璃化超低温保存<sup>①</sup>

蔡月琴, 王艳平, 庄君娥, 林燕茹,  
柯美玉, 陆奎眉, 张泽宏

闽南师范大学 生物科学与技术学院, 福建 漳州 363000

**摘要:**以紫参薯带芽茎段为材料, 采用 2% 海藻酸钠和 0.1 mol/L 氯化钙凝胶系统制备包埋珠, 液氮保存, 以茎段细胞活力和包埋珠成活率为指标筛选获得有关参数适宜水平, 比较冻后再生苗与常温苗形态及生理指标. 结果表明: 紫参薯试管苗经 4 °C 锻炼 6 d 后, 无菌条件下制备其带芽茎段包埋珠, 接种到 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.5 mol/L 蔗糖液体培养基中预培养 1 d, 转入 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖溶液中室温下装载 40 min, 在玻璃化保护剂 PVS2 中脱水 40 min, 更新 PVS2 后迅即液氮保存, 24 h 后置于 37 °C 水浴中化冻 5 min, 用 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.8 mol/L 蔗糖溶液洗涤 3 次(每次 10 min), 然后转入 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+1 g/L 活性炭固体培养基中, 暗培养 7 d 后转至光照下培养 14d, 该包埋珠成活率可达 60%. 冻后再生苗诸多形态和生理指标与常温苗差异不具有统计学意义.

**关键词:**紫参薯; 带芽茎段; 包埋玻璃化; 超低温保存

**中图分类号:** S632.1; Q945.79

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2016)09-0058-07

紫参薯是薯蓣科薯蓣属山药(*Dioscorea alata* L.)中的精品, 为一年生或多年生缠绕性藤本植物, 又名紫山药、紫人参, 在我国南方的浙江、江西、福建、台湾、广东等省区有广泛栽培<sup>[1]</sup>, 其块茎椭圆形至扁圆形, 表皮为紫褐色, 肉质呈亮紫色, 含有丰富的花青素、蛋白质、维生素和薯蓣皂苷等营养物质, 具有滋肺益肾、健脾止泻、降血脂血糖、调节人体免疫力等功效, 药食兼用<sup>[2]</sup>. 目前国内有关紫参薯的研究主要集中在引种<sup>[3]</sup>、栽培管理<sup>[4]</sup>、组织培养<sup>[5]</sup>、营养成分<sup>[6]</sup>等方面. 紫参薯种质资源主要采用大田保存, 费时费力, 且易受到各种自然灾害和病虫害的影响而造成种质丢失, 且保存时间短、效果差. 采用组培方法可长期离体保存, 但需定期继代培养<sup>[7-9]</sup>, 可能会发生污染及引起遗传变异<sup>[10]</sup>. 因此, 探索适合紫参薯种质长期离体保存方法有重要现实意义.

包埋玻璃化超低温保存是在玻璃化和包埋脱水超低温保存基础上发展起来的一种新的超低温保存技术, 兼具后两者优点, 所需设备简单、易于操作、恢复生长快、成活率高<sup>[11]</sup>, 现已成功应用于苹果<sup>[12]</sup>、酸橙<sup>[13]</sup>、高山红景天<sup>[14]</sup>、甘薯<sup>[15]</sup>和怀山药<sup>[16]</sup>等多种植物的种质保存. 目前有关紫参薯的超低温保存国外已有研究<sup>[17]</sup>, 但未见采用包埋玻璃化法超低温保存的相关报道. 本研究采用包埋玻璃化法对紫参薯茎段超低温保存技术进行探讨, 旨在建立紫参薯茎段超低温保存体系, 为其种质资源的长期保存提供技术支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为继代培养 40 d 的紫参薯(产自福建漳州云霄马铺乡)试管苗(无菌), 由闽南师范大学园艺

① 收稿日期: 2015-08-16

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2013N0037); 漳州市科技计划项目(ZZ2013052); 国家大学生创新训练项目(201410402007).

作者简介: 蔡月琴(1980-), 女, 福建漳州人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事植物生物技术研究.

生物技术课题组提供.

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 试管苗的低温锻炼及带芽茎段的包埋

将试管苗于 0~8 °C 下暗处低温锻炼 0~12 d, 研究低温锻炼对其超低温保存效果的影响.

在无菌条件(室温)下, 切取经低温锻炼的试管苗的带芽茎段(长为 2~5 mm), 转入 MS+2% 海藻酸钠+0.4 mol/L 蔗糖的包埋基质中, 然后将裹有包埋基质的茎段逐个移入 MS+0.1 mol/L 氯化钙+0.4 mol/L 蔗糖的液体培养基中, 反应(固化)30 min(使茎段表面的海藻酸钠溶胶形成具有一定厚度和机械强度的海藻酸钙凝胶), 取出茎段包埋珠.

### 1.2.2 包埋珠的预培养及装载

在无菌条件下, 将包埋珠用 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 液体培养基洗涤和无菌滤纸吸干后, 分别接入含 0~1 mol/L 蔗糖的 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 液体培养基中, 在 36  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (14 h/d)光照、(25 $\pm$ 2) °C 温度条件下预培养 1 d, 研究预培养中蔗糖浓度对紫参薯超低温保存效果的影响.

在室温下, 将经预培养的包埋珠转入 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖的装载液中处理 0~60 min, 研究装载时间对紫参薯超低温保存的效果.

### 1.2.3 包埋珠的玻璃化保护剂脱水

将装载 40 min 的包埋珠分别转入以 MS 液体培养基为基质的 4 种玻璃化保护剂中(pH=5.8). PVS<sub>1</sub>: 25%甘油+10%乙二醇+10%二甲基亚砷+15%聚乙二醇; PVS<sub>2</sub><sup>[11]</sup>: 30%甘油+15%乙二醇+15%二甲基亚砷+0.4 mol/L 蔗糖; PVS<sub>3</sub>: 40%甘油+10%乙二醇+5%二甲基亚砷+0.4 mol/L 蔗糖; PVS<sub>4</sub>: 25%甘油+20%乙二醇+15%二甲基亚砷+0.4 mol/L 蔗糖. 然后分别在 0 °C 下脱水处理 40 min, 并对保护剂 PVS<sub>2</sub> 中的包埋珠脱水处理 0~80 min, 研究不同玻璃化保护剂和在不同脱水时间对紫参薯茎段超低温保存的效果.

### 1.2.4 包埋珠的冰冻保存、化冻及洗涤

将经脱水处理的材料换上新的 PVS<sub>2</sub> 溶液后置于 4 mL 冻存管中, 迅速投入液氮(-196 °C)中保存, 24 h 后在 37 °C 水浴锅中分别化冻 3~9 min, 研究化冻时间对紫参薯茎段超低温保存的效果.

在室温下, 将化冻后的包埋珠, 在含 0~1.6 mol/L 蔗糖的 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 液体培养基中洗涤 2 次, 每次 10 min, 研究洗涤液中不同蔗糖浓度对紫参薯茎段超低温保存效果的影响.

### 1.2.5 包埋珠的细胞活力及成活率测定

对经超低温保存、化冻和洗涤后的包埋珠进行茎段细胞活力和包埋珠成活率测定. 茎段细胞活力采用 TTC 法<sup>[18]</sup>测定, 以相对活力表示. 茎段细胞活力=超低温保存后包埋珠茎段 TTC 值/未经超低温保存茎段 TTC 值 $\times$ 100%. 将茎段包埋珠接入 MS+2 mg/LKT+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+1 g/L 活性炭的固体培养基中, 暗培养 7 d 后转光照培养(温光条件同预培养), 3 周后统计成活率. 包埋珠成活率=腋芽萌发包埋珠数/接种包埋珠总数 $\times$ 100%. 培养 50 d 后测定再生苗有关形态及生理指标, 并与常温苗比较.

### 1.2.6 数据处理

各试验不同因子每个水平处理 20 个茎段或包埋珠, 重复 3 次. 采用 Excel 2003 及 SPSS 17.0 软件处理数据, Duncan 法分析显著性差异.

## 2 结果与分析

### 2.1 低温锻炼对紫参薯包埋碧波玻璃化超低温保存的影响

低温锻炼对紫参薯茎段包埋珠超低温保存的效果有显著影响(表 1). 0~8 °C 下锻炼 3 d 的结果表明, 4 °C 时, 冻后茎段细胞活力和包埋珠成活率最高, 细胞活力显著高于 0 °C 和 2 °C, 成活率显著高于 0 °C、2 °C 和 8 °C. 4 °C 锻炼 0~12 d 的结果表明, 低温锻炼后茎段细胞活力和包埋珠成活率显著提高, 其中 3~6 d 效果最好. 由此可见, 紫参薯用于包埋玻璃化超低温保存的带芽茎段, 其试管苗低温锻炼的适宜温度为 4 °C, 适宜时间为 3~6 d.

表 1 低温锻炼紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

3 d 低温锻炼温度/℃	茎段细胞活力/ %	包埋珠成活率/ %	4 ℃ 锻炼天/d	茎段细胞活力/ %	包埋珠成活率/ %
0	67.788±1.968 cC	30.035±1.935 bcC	0	20.903±1.285 bB	11.295±0.040 cC
2	75.476±2.304 bB	35.917±1.778 bB	3	88.493±1.253 aA	50.275±1.014 aA
4	87.903±1.585 aA	51.331±4.060 aA	6	91.177±0.837 aA	53.272±4.812 aA
8	84.741±0.584 aA	40.722±4.200 bB	12	87.512±1.380 aA	47.907±3.072 bB

注: 大写字母表示在 1% 水平差异具有统计学意义, 小写字母表示在 5% 水平差异具有统计学意义。

## 2.2 预培养基中蔗糖浓度对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

在预培养基中加入 0.25~1.00 mol/L 蔗糖时, 冻后茎段细胞活力和包埋珠成活率显著提高, 且随蔗糖浓度的增加先升高后下降(表 2)。其中, 当蔗糖浓度为 0.5 mol/L 时, 细胞活力和成活率最高, 且与其他蔗糖浓度存在显著差异。因此, 紫参薯茎段包埋珠预培养基的适宜蔗糖浓度为 0.5 mol/L(预培养 1 d)。

表 2 预培养基的蔗糖浓度对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

蔗糖浓度/(mol·L <sup>-1</sup> )	茎段细胞活力/%	包埋珠成活率/%
0	46.721±0.425 cdD	10.810±1.461 eE
0.25	52.795±0.739 cC	32.097±0.762 cC
0.50	91.557±2.102 aA	53.001±1.362 aA
0.75	67.045±0.034 bB	39.808±0.720 bB
1.00	65.029±1.227 bB	28.721±1.167 dD

注: 大写字母表示在 1% 水平差异具有统计学意义, 小写字母表示在 5% 水平差异具有统计学意义。

## 2.3 装载时间对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

装载 20~60 min 后, 冻后茎段细胞活力和包埋珠成活率显著提高(表 3), 其中装载 40 min 和 60 min 的效果最好, 且二者细胞活力和成活率无显著差异。因此, 紫参薯茎段包埋玻璃化超低温保存适宜的装载时间为 40~60 min。

表 3 装载时间对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

装载时间/min	茎段细胞活力/%	包埋珠成活率/%
0	19.761±0.811 cC	5.880±1.083 cC
20	63.381±0.412 bB	20.102±0.482 bB
40	89.252±1.353 aA	52.931±2.439 aA
60	85.246±0.562 aA	49.182±0.392 aA

注: 大写字母表示在 1% 水平差异具有统计学意义, 小写字母表示在 5% 水平差异具有统计学意义。

## 2.4 不同保护剂和脱水时间对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

在组分不同的 4 种玻璃化保护剂中 0 ℃ 脱水 40 min, 冻后茎段细胞活力和包埋珠成活率差异具有统计学意义(图 1)。其中保护剂 PVS2 效果最好, 其细胞活力和成活率最高, 且与其他 3 种保护剂差异具有统计学意义。

不经保护剂脱水处理时, 包埋珠冻后全部死亡(图 2); 经 20~80 min 脱水时, 随着时间的延长, 茎段细胞活力和包埋珠成活率先升高后降低。其中, 脱水 40 min 的细胞活力和成活率最高, 且与其他脱水时间差异具有统计学意义。由此可见, 紫参薯茎段包埋珠超低温保存前适宜的脱水条件为: 在保护剂 PVS2 中于 0 ℃ 下处理 40 min。

## 2.5 化冻时间对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

37 ℃ 水浴化冻 3~9 min 时, 茎段细胞活力和包埋珠成活率先升后降(图 3), 化冻 5 min 时最高, 且与其他化冻时间差异具有统计学意义。因此, 紫参薯茎段包埋珠超低温保存后适宜的化冻时间为 5 min(37 ℃)。

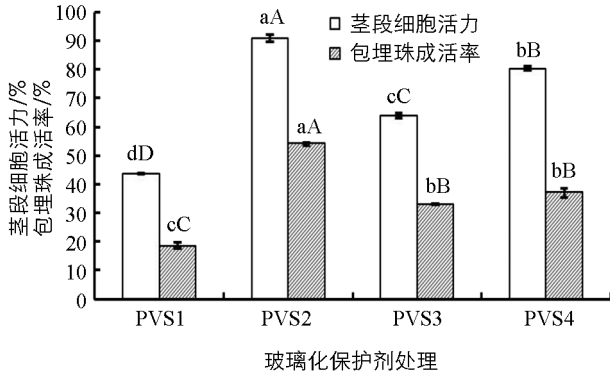


图 1 不同保护剂对茎段细胞活力和包埋珠成活率的影响

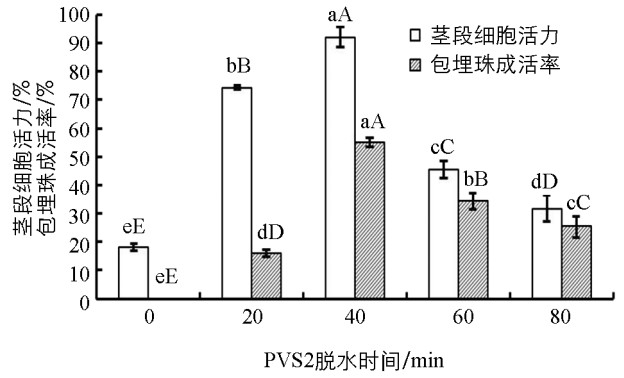


图 2 保护剂脱水时间对茎段细胞活力和包埋珠成活率的影响

## 2.6 冻后洗涤液蔗糖浓度对紫参薯包埋玻璃化超低温保存的影响

洗涤液蔗糖浓度对冻后茎段细胞活力和包埋珠成活率影响显著(图 4), 结果与包埋珠脱水时间(图 2)类似. 结果表明, 冻后洗涤液中适宜的蔗糖浓度为 0.8 mol/L.

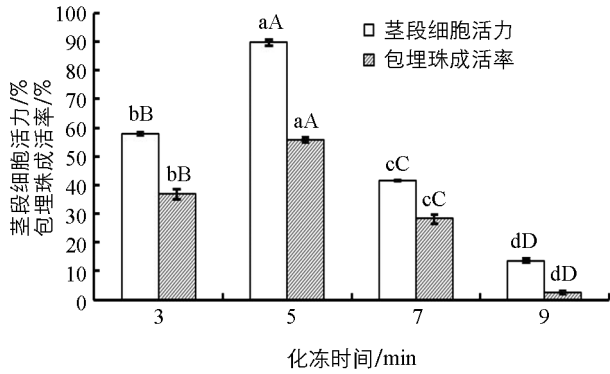


图 3 化冻时间对茎段细胞活力和包埋珠成活率的影响

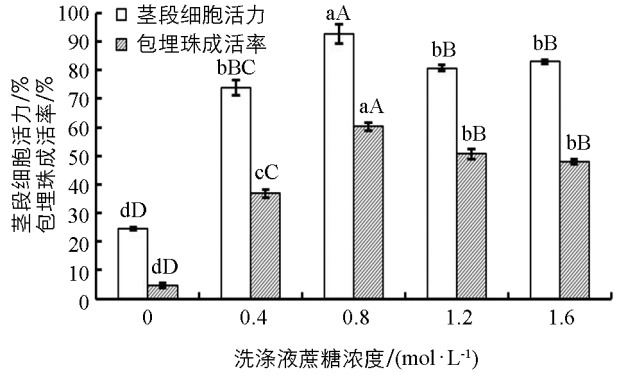


图 4 洗涤液蔗糖浓度对茎段细胞活力和包埋珠成活率的影响

## 2.7 冻后紫参薯再生植株的形成及其形态、生理指标测定

将化冻、洗涤后的包埋珠(图 5(a))接入含 2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+1 g/L 活性炭的 MS 固体培养基中, 暗培养 7 d 后转光照下, 1 周后逐渐恢复生长, 部分包埋珠膨大且叶腋处腋芽萌动(图 5(b)), 2~3 周后芽苗伸长生长, 高可达 1 cm(图 5(c)), 6 周后分化成正常植株(图 5(d)).

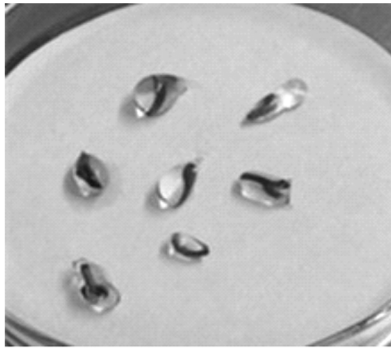
紫参薯茎段包埋珠超低温保存后再生苗的平均株高、茎节长和叶片数、叶绿素、类胡萝卜素和可溶性糖含量、POD 和 SOD 活性等形态及生理指标与常温苗无显著差异(表 4), 说明采用包埋玻璃化法超低温保存紫参薯茎段是可行的.

## 3 讨论

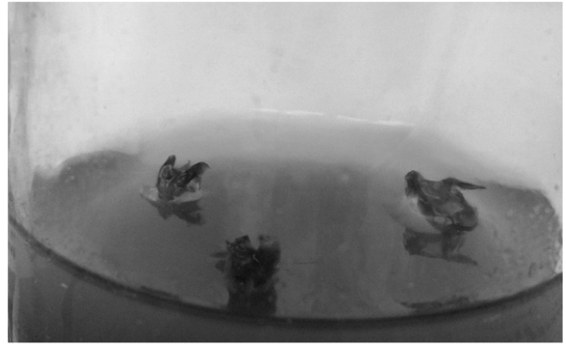
在植物种质包埋玻璃化超低温保存中, 预培养时将试管苗置于零上低温条件下锻炼一定时间, 可提高植物体内脯氨酸、多胺含量及降低胞液的渗透势, 从而增加植株耐冷冻能力. 洪森荣等人<sup>[16]</sup>在怀山药茎段超低温保存中发现低温锻炼可提高茎段冻后成活率, 4 °C 锻炼 7 d 成活率较高; 陈加利等人<sup>[19]</sup>在扁桃茎尖包埋玻璃化超低温保存研究中发现未经低温锻炼的茎尖冻后不能存活, 4 °C 锻炼 4 周后成活率提高. 在本试验中, 4 °C 锻炼 6 d 能显著提高紫参薯冻后茎段的细胞活力和成活率.

预培养除了低温锻炼外, 还有高渗培养. 一般是在预培养基中加入高浓度的蔗糖<sup>[11]</sup>, 以降低植物细胞内自由水含量, 提高胞质浓度, 降低原生质冰点, 从而增强植物的抗冻性. 李红民等人<sup>[18]</sup>在匍匐胚性

愈伤组织的预培养基中加入 0.3 mol/L 蔗糖, 陈志林等人<sup>[20]</sup>在木薯茎尖预培养基中加入 0.5 mol/L 蔗糖都取得了较好的效果. 本试验在预培养基中添加 0.5 mol/L 蔗糖时, 紫参薯茎段冻后的细胞活力和成活率最高.



(a) 茎段的包埋珠



(b) 冻后刚萌发的包埋珠



(c) 恢复培养25 d的再生苗



(d) 恢复培养50 d的再生植株

图5 紫参薯茎段包埋玻璃化超低温保存后植株的再生

表4 紫参薯包埋玻璃化超低温保存后再生苗与常温苗的形态、生理指标比较

形态指标及生理指标	常温苗	冻存后再生苗
平均株高/cm	7.877±0.116 Aa	7.833±0.040 Aa
平均叶片数/个	12.000±1.000 Aa	12.333±0.524 Aa
平均茎节长/cm	0.983±0.021 Aa	0.982±0.025 Aa
平均芽数/个	4.667±1.155 Aa	5.333±0.577 Aa
总叶绿素质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	1.304±0.042 Aa	1.298±0.027 Aa
叶绿素 a 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	0.943±0.034 Aa	0.941±0.040 Aa
叶绿素 b 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	0.361±0.01 Aa	0.357±0.006 Aa
类胡萝卜素质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	0.193±0.009 Aa	0.201±0.007 Aa
可溶性糖质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	4.793±0.359 Aa	4.787±0.241 Aa
POD 活性/[U·(g·min) <sup>-1</sup> ]	100±5.307 Aa	103.8±4.657 Aa
SOD 活性/(U·g <sup>-1</sup> )	1.743±0.190 Aa	1.733±0.096 Aa

注: 大写字母表示在 1% 水平差异具有统计学意义, 小写字母表示在 5% 水平差异具有统计学意义.

预培养后, 为减轻玻璃化过程中高浓度冰冻保护剂的毒害作用, 常采用 MS 添加低浓度蔗糖和甘油等混合物作为转载液, 不同植物转载液组成和转载时间不同. 以 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖为转载液时, 适宜的转载时间树莓试管苗茎尖为 90 min<sup>[21]</sup>, 红芽芋胚性愈伤组织<sup>[22]</sup>和本试验紫参薯茎段均为 40 min.

玻璃化保护剂在植物种质的超低温保存中有重要作用. 经玻璃化保护剂处理后, 植物材料在液氮中被迅速固化成玻璃态, 可避免冰晶的形成和防止细胞因脱水瓦解和溶液电解质浓度过高带来的伤害<sup>[11]</sup>. 菊花茎尖在上述玻璃化保护剂 PVS2 中 0℃ 处理 15 min, 成活率达 85.7%<sup>[23]</sup>, 怀山药带芽茎段在 PVS1

中, 0 °C 处理 60 min, 成活率达 77.14%<sup>[24]</sup>. 脱水时间对超低温保存效果也有显著影响. 怀地黄带芽茎段在包埋玻璃化保存中脱水 30 min 的再生率是脱水 60 min 的 8 倍<sup>[25]</sup>. 在本试验中, 紫参薯带芽茎段最佳玻璃化保护剂为 PVS2, 0 °C 下适宜的脱水时间为 40 min.

化冻是超低温保存后的重要环节. 植物材料液氮保存后, 快速解冻可避免细胞再次结冰造成机械损伤和渗透伤害<sup>[10]</sup>. 木薯茎尖的化冻条件为 40 °C 化冻 1.5 min<sup>[20]</sup>, 红芽芋胚性愈伤组织为 37 °C 化冻 3 min<sup>[22]</sup>. 在本试验中, 紫参薯茎段适宜的化冻条件为 37 °C 化冻 5 min.

化冻后的植物材料用适宜浓度的蔗糖溶液洗涤, 既可除去细胞内玻璃化液中的有毒成分, 又能防止渗透损伤. 怀山药茎段化冻后用含 7% 蔗糖的 MS 溶液洗涤 4 次(每次 10 min), 成活率显著提高<sup>[24]</sup>. 在本试验中, 紫参薯带芽茎段化冻后用含 0.8 mol/L 蔗糖的 MS 溶液洗涤, 茎段细胞活力和成活率最高.

在本试验中, 紫参薯带芽茎段包埋玻璃化超低温保存后再生苗的诸多形态和生理指标与常温苗无显著差异, 说明包埋玻璃化超低温保存技术可用于紫参薯的种质保存, 所得各种参数可为其具体应用提供技术参考. 但有关参数水平还可优化, 包埋珠超低温保存后再生苗的遗传稳定性还需深入研究.

### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 第 16(1)卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 117.
- [2] 刘庞源, 宋曙辉, 张宝海, 等. 紫山药种质资源及其利用研究 [J]. 北方园艺, 2011(23): 55—56.
- [3] 赵冬兰, 唐 君, 刘 靖, 等. 紫山药的引种与标准化栽培技术初探 [J]. 江西农业学报, 2009, 21(2): 78—79.
- [4] 朱 祺, 郑 健, 王碧琴, 等. 紫山药栽培技术研究进展 [J]. 江西科学, 2014, 32(6): 833—836, 845.
- [5] 夏 赞. 紫参薯再生体系的建立和遗传转化的初步研究 [D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [6] 于 东, 林跃伟, 陈桂星, 等. 紫山药营养成分分析研究 [J]. 营养学报, 2010, 32(2): 190—192.
- [7] 张进仁, 陈善春, 权 银, 等. 柑桔种质离体保存研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1997, 22(4): 373—377.
- [8] 莫秀媚, 吴秀华, 李明惠, 等. 红花钓钟柳德组织培养及离体快速繁殖 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(6): 62—66.
- [9] 赵许朋, 周 月, 杨 立, 等. “红阳”猕猴桃茎段高效再生体系的建立 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(2): 6—10.
- [10] 陈晓玲, 张金梅, 辛 霞, 等. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 414—427.
- [11] 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(2): 238—245.
- [12] PAUL H, DAINGNY G, SANGWAN-NORREEL B S. Cryopreservation of Apple (*Malus × domestica* Borkh.) Shoot Tips Following Encapsulation-Dehydration or Encapsulation-Vitrification [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(8): 768—774.
- [13] Al-ABABNEH S S, KARAM N S, SHIBLI R A. Cryopreservation of Sour Orange (*Citrus aurantium*) Shoot Tips [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2002, 38(6): 602—607.
- [14] LIU Jian-feng, CHENG Yun-qing, QIN Xiao-wei. Cryopreservation of Shoot Tips of Rh. Sachalinensis by Encapsulation-Vitrification [J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2009(3): 61—65.
- [15] HIRAI D, SAKAI A. Simplified Cryopreservation of Sweet Potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by Optimizing Conditions for Osmoprotection [J]. Plant Cell Reports, 2000, 21(10): 961—966.
- [16] 洪森荣, 李明军. 玻璃化法超低温保存怀山药种质的技术研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1715—1718.
- [17] BARRACO G, SYLVESTRE I, COLLIN M, et al. Histochemical Analysis of Yam (*Dioscorea alata*) Shoot Tips Cryopreserved by Encapsulation-Dehydration [J]. Protoplasma, 2014, 251(1): 177—189.
- [18] 李红民, 马晖玲. 玻璃化法超低温保存匍匐剪股颖胚性愈伤组织及其植株再生 [J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(4): 62—66.
- [19] 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.

- [20] 陈志林, 陆柳英, 李开绵. 木薯茎尖包埋—玻璃化法超低温保存及植株再生 [J]. 广西热带农业, 2007(4): 19—22.
- [21] 娄汉平, 郭修武, 代汉萍. 树莓试管苗茎尖包埋玻璃化法超低温保存 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 59—62.
- [22] 洪森荣, 尹明华, 王艾平. 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的包埋玻璃化超低温保存 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(1): 80—87.
- [23] 刘艳霞. 菊花茎尖超低温保存及遗传稳定性分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [24] 李明军, 洪森荣, 徐 鑫, 等. 怀山药种质资源的玻璃化法超低温保存 [J]. 作物学报, 2006, 32(2): 288—292.
- [25] 李明军, 周 娜, 刘 杰, 等. 怀地黄玻璃化和包埋玻璃化法超低温保存 [J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 607—610.

## Cryopreservation of Purple Yam (*Dioscorea alata*) by Encapsulation-vitrification

CAI Yue-qin, WANG Yan-ping, ZHUANG Jun-e, LIN Yan-ru,  
KE Mei-yu, LU Luan-mei, ZHANG Ze-hong

College of Biological Sciences and Technology, Min Nan Normal University, Zhangzhou Fujian 363000, China

**Abstract:** The cryopreservation of purple yam (*Dioscorea alata*) by Encapsulation vitrification was studied. Stems with axillary buds suspended in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2% sodium alginate and 0.4 mol/L sucrose were placed in liquid MS medium supplemented with 0.1 mol/L calcium chloride and 0.4 mol/L sucrose, and the beads were preserved with liquid nitrogen (LN). The optimum levels of related parameters were obtained with the stem cell vitality and embedding survival rate as indexes and the comparison of morphological and physiological indexes of regenerated plantlets and normal plantlets was made. The results showed that the plantlets of purple yam were cold-hardened for 6 d at 4 °C, then stems with axillary buds were excised and encapsulated into beads in sterile conditions and then pre-cultured in liquid MS medium supplemented with 2 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA and 0.5 mol/L sucrose for 1 d. The encapsulated beads were loaded with MS medium plus with 2 mol/L glycerol and 0.4 mol/L sucrose for 40 min at room temperature and then dehydrated with PVS2 for 40 min at 0 °C. The encapsulated beads were plunged directly into LN for 1 day after dehydration and then rapidly thawed in a water bath for 5 min at 37 °C. After warming, the encapsulated beads were rinsed three times with liquid MS medium containing 2 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA and 0.8 mol/L sucrose for 10 min at 25 °C, then transferred to regeneration medium supplemented with 2 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA and 30 g/L sucrose plus 0.1 g/L activated carbon in the dark for 7 d before exposure to the light. The survival rate of beads reached to 60% after two weeks of light culture. Plantlets regenerated from cryopreservation had no morphological and physiological variation with the normal plantlets.

**Key words:** purple yam (*Dioscorea alata*); stem with buds; encapsulation vitrification; cryopreservation

