

大苞鞘石斛原球茎玻璃化超低温保存技术的研究

吴元玲 申晓辉*

(上海交通大学农业与生物学院, 农业部都市农业(南方)重点开放实验室, 上海 200240)

摘要 本文研究建立了大苞鞘石斛(*Dendrobium wardianum* Warner)原球茎玻璃化法超低温保存的技术体系。结果发现, 预处理和玻璃化溶液(plant vitrification solution 2, PVS2)装载脱水是影响大苞鞘石斛原球茎相对存活率的两个关键步骤, 高参与低温-高渗两种预处理方法测定的相对存活率具有显著性差异; 玻璃化溶液的种类以及脱水时间对冻后存活率具有重要的影响。基于此, 建立了大苞鞘石斛原球茎的超低温保存体系, 即: 以继代培养 60 d 的大苞鞘石斛原球茎为材料, 1/2 MS+0.8 mol/L 蔗糖的培养基上 4℃ 低温预处理 6 d 后, 转至 1/2 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖的装载液中室温下装载 40 min, 在 0℃ 下装载 PVS2 脱水 40 min, 然后转入装有新鲜 PVS2 冷冻管中并迅速投入液氮。在液氮保存 1 h 后放在 40℃ 水浴中快速解冻 1 min, 利用含 1.2 mol/L 蔗糖的 1/2 MS 培养液洗涤 3 次, 每次间隔 10 min; 待恢复培养 30 d 后统计存活率, 可使大苞鞘石斛原球茎超低温保存后存活率达到 20.0%。

关键词 大苞鞘石斛; 原球茎; 玻璃化; 超低温保存

大苞鞘石斛, 又名腾冲石斛, 为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生兰, 花大、色艳, 花期长, 是石斛属中观赏价值很高的种类^[1]; 另外, 新鲜或干燥茎可入药, 有益胃生津、滋阴清热的功效^[2]。作为我国兰科第二大属的野生种类, 大苞鞘石斛对生态环境要求严格, 现仅分布于我国云南东南部至西部海拔 1 350~1 900 米热带雨林中, 缅甸、泰国和印度东北部也有分布。由于石斛属植物生长缓慢, 种子极其微小, 且胚具有生理后熟现象, 自然条件下繁殖率极低(种子萌发率低于 5%)^[3]; 加之长期非法采挖, 致使多种石斛原生种已濒临灭绝。自 1987 年开始, 石斛先后被列为《中华人民共和国珍稀濒危植物名录》、《濒危野生动植物种国际贸易公约 CITES》中 II 级保护植物, 2001 年石斛属全部被列入《国家重点保护野生植物名录(第 2 批)》^[4]。但到目前为止, 大苞鞘石斛种质资源保存仍采用传统的原地保存和异地保存^[5,6], 这两种保存方法因受保存地自然环境的影响, 无法确保长期稳定地保存种质资源^[7]。

玻璃化法超低温保存(vitrification-cryopreservation)是上世纪 70 年代发展起来的唯一不需要连续继代的中长期保存方式, 即将受高浓度保护剂作用后的细胞或组织, 连同保护剂一起在快速降温过程中形成非结晶的玻璃化状态; 是超低温保存的常用方法, 具

有简便、成本低、保存材料遗传性稳定等优点^[8], 现已应用于兰科植物鹤顶兰(*Phaius tankervilleae*)种子^[9]、大花蕙兰“幻影”(Cymbidium hybridum Walu “Idol”)茎尖、原球茎^[10]、白芨(*Bletilla striata*)合子胚^[11]、香荚兰(*Vanilla planifolia* “Andrews”)茎尖^[12]、血红石斛(*Dendrobium cruentum* Rchb.f.)原球茎^[13]、以及铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)种子^[14]、原球茎^[15,16]和原生质体^[17], 但大苞鞘石斛超低温保存技术尚未见报道。

本文以大苞鞘石斛原球茎为试验材料, 研究探讨了玻璃化法超低温保存技术体系中预处理和脱水 2 个关键步骤细胞相对成活率变化规律, 以期为实现长期稳定保存石斛属珍贵野生植物种质资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大苞鞘石斛果实由中国林业科学研究院李振坚博士提供。参照王伟^[18]等方法, 用 75% 酒精擦拭果实表面, 洗洁精清洗 30 min 后自来水冲洗 1 h, 移置

收稿日期: 2010-10-22 接受日期: 2010-11-30

花卉种质创新和产业发展关键技术的研究-上海农委重点攻关(No. 2006-4-9)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-34205736, E-mail: shenxh62@sjtu.edu.cn

于超净工作台上,用75%酒精消毒1 min,0.1% HgCl₂溶液消毒15 min,并经常摇动,无菌水清洗5次,无菌滤纸吸干表面水分,在靠近果实基部切开一小口,把粉末状的种胚均匀铺撒于1/2 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+2%蔗糖的固体培养基上,培养室温度25±1℃,光照强度为2 336 lux,光照时间16 h/d。30 d后将种子萌发产生的原球茎转移至1/2 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+2%蔗糖的原球茎增殖培养基上,每隔30 d继代1次,连续继代2次(60 d)后,取直径大小约2~3 mm原球茎为试验材料,进行超低温保存试验研究。

1.2 方法

1.2.1 预处理 高渗处理:(1)选择蔗糖、山梨醇、甘露醇和葡萄糖4种渗透压调节剂,浓度分别为0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.6 mol/L、0.8 mol/L,预处理8 d后,超低温保存后直接用TTC法测定原球茎的相对存活率,筛选出相对存活率较高的渗透压调节剂供下一步试验。(2)以蔗糖为渗透压调节剂,进行浓度(0.4 mol/L蔗糖+10 mg/L ABA和0.4 mol/L、0.6 mol/L、0.8 mol/L蔗糖)和培养时间(4 d、6 d、8 d、10 d)的筛选。

低温-高渗处理:以0.8 mol/L蔗糖为渗透压调节剂,在4℃低温下培养4 d、6 d、8 d。

1.2.2 装载与脱水 预处理后的原球茎装入冷冻管中,在室温条件下用1/2 MS+2 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖装载液处理40 min,然后在0℃条件下4种玻璃化溶液PVS1、PVS2、PVS4、PVSW处理40 min,筛选出最佳的玻璃化溶液,其中PVSW是一种改良的、将含氮化合物(脯氨酸)与含羟基化合物(蔗糖)相结合的混合冷冻保护剂(表1)。

随后用最佳的玻璃化溶液处理20~90 min,进一步研究玻璃化溶液脱水时间对原球茎冷冻处理后相对存活率的影响。

1.2.3 冻存与解冻 脱水结束后换入新鲜的0℃玻璃化溶液,迅速投入液氮,液氮中保存1 h后取出冷冻管,40℃水浴解冻1 min,立即用1/2 MS+1.2 mol/L蔗糖的培养液洗涤3次,每次间隔10 min。

1.2.4 恢复培养 洗涤后的原球茎用无菌滤纸快速吸干表面残留的溶液,转入1/2 MS+0.2 mol/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+2%蔗糖恢复培养基中,黑暗中培养14 d,然后转入弱光下(光照强度为1 308 lux)下培养7 d,再置于正常光下(光照强度为2 336 lux)培养,光照时间均为16 h/d,7 d后统计成活率(以原球茎变绿为准)。

1.2.5 相对存活率测定 TTC法:按Towill和Mazur方法^[19],取15个洗涤后的原球茎,加入0.4% TTC试剂和0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)各2.5 ml,在黑暗条件下于27℃恒温箱中放置24 h后倒掉TTC液,蒸馏水洗涤3次。再加入95%乙醇5 ml,于60℃水浴30 min,用紫外分光光度计在485 nm处测定浸出液吸收峰值。细胞相对存活率(%)=处理后原球茎的吸光值/未处理原球茎的吸光值×100%。

FDA法:常用丙酮配制成2 mg/ml溶液,4℃保存。超低温保存后的原球茎放于0.6 ml离心管中,加入稀释后的100 μg/ml FDA溶液,静置20 min后,取出原球茎压片,用荧光显微镜DFM-50D观察并拍照。在紫外光照射下,发黄绿色荧光的细胞具有活力,发红色荧光的细胞则是无活力的^[20]。

TTC法是测定细胞活力最常用的方法,但是该法测定的相对存活率与实际再生率具有一定差异^[21],而FDA被认为是一种鉴定细胞活性的特异性很强的指示剂,因此,本试验中用FDA法来补充验证TTC法测定细胞活力的准确性。

1.2.6 数据分析 采用SAS9.1数据分析软件对数据进行LSD多重比较($P<0.05$)。大写字母表示图例所示因素之间具有显著性差异,小写字母表示横坐标所示因素之间存在显著性差异。

表1 4种玻璃化溶液的成分组成

Table 1 The composition of four types of plant vitrification solutions

名称	组成(w/v)
Name	Composition(w/v)
PVS1	1/2 MS+22% glycerol+15% PEG+15% glycol+7% DMSO+0.5 mol/L sorbierite
PVS2	1/2 MS+30% glycerol +15% glycol +15% DMSO+0.4 mol/L sucrose
PVS4	1/2 MS+35% glycerol +20% glycol +0.6 mol/L sucrose
PVSW	1/2 MS+10% proline+0.6 mol/L sucrose

2 结果

2.1 不同渗透压调节剂预处理对原球茎相对存活率的影响

高渗预处理即通过向培养基中添加渗透压调节剂, 增加细胞外渗透势, 加速植物材料细胞内的水流到细胞外以减少其含水量, 进而避免快速冷冻时细胞内结冰而对细胞造成的损伤。糖和多元醇中的羟基可以通过氢键与膜磷脂相连, 使得膜在脱水过程中更

加稳定。由图 1 可以看出, 经山梨醇、甘露醇、葡萄糖和蔗糖 4 个不同浓度高渗预处理后, 蔗糖处理的原球茎相对存活率最高, 与另外 3 种渗透压调节剂间存在显著性差异; 4 种物质随着浓度的增加, 相对存活率均出现先升高后降低的变化趋势。

2.2 不同浓度蔗糖与预处理时间对原球茎相对存活率的影响

由图 2 可以看出, 经过不同浓度蔗糖预处理的原

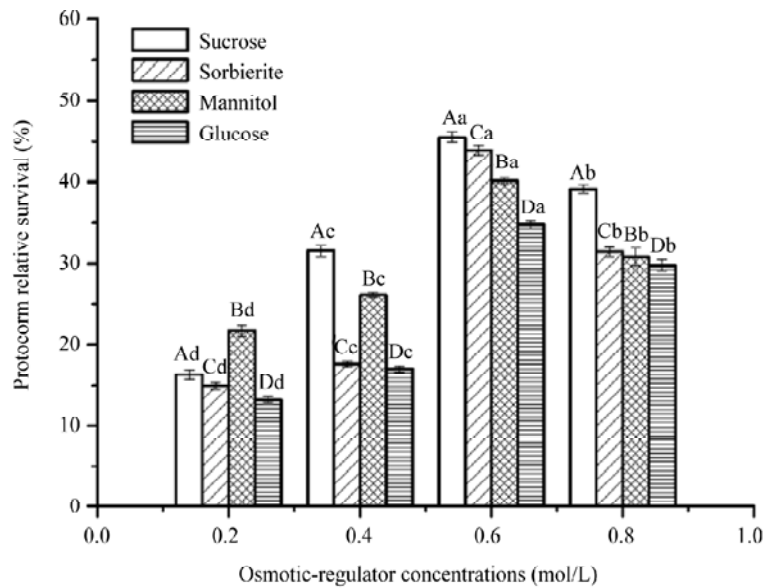


图 1 不同浓度渗透压调节剂预处理对原球茎超低温保存后相对成活率的影响

Fig.1 Effect of osmotic-regulators with different concentrations in pre-culture on relative survival of cryopreserved protocorms

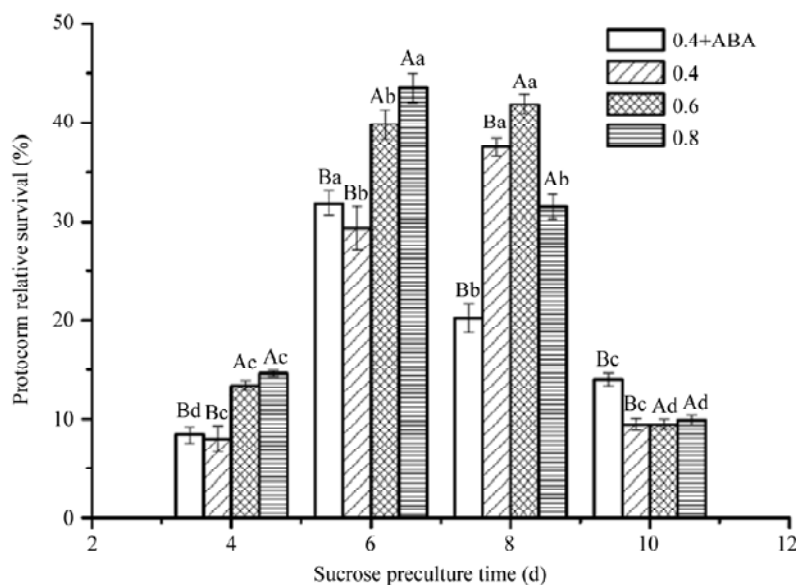


图 2 蔗糖浓度和预处理时间对原球茎超低温保存后相对存活率的影响

Fig.2 Effect of sucrose pre-culture concentration and time on relative survivals of cryopreserved protocorms

球茎相对存活率较高者多集中在预处理 6 d 和 8 d, 其中以 0.8 mol/L 蔗糖预处理 6 d 为最高, 但仅为 43.5%, 其次是含 0.6 mol/L 蔗糖培养 8 d(41.9%); 方差分析结果表明, 二者之间没有显著性差异; 除预处理 8 d 外, 在 0.4 mol/L 蔗糖的培养基中添加 ABA 比不添加 ABA 处理原球茎的相对存活率均略高。

2.3 玻璃化溶液组分对原球茎相对存活率的影响

PVS1、PVS2 和 PVS4 是 3 种常用的玻璃化溶

液, 其组分都是由含羟基化合物按照不同比例的渗透性物质和非渗透性物质组成, 通过适度降低细胞含水量以更好地避免细胞内冰晶的生成。由图 3 可以看出, 4 种玻璃化溶液中以 PVS2 效果最好, 与其它 3 种之间存在显著性差异; 但 PVS2 略优于 PVS1 和 PVS4。PVS2 在含有相同的蔗糖浓度下, 添加 10% 脯氨酸的玻璃化溶液的效果要比含有 35% 甘油和 20% 乙二醇的效果好, 二者之间存在显著性差异。

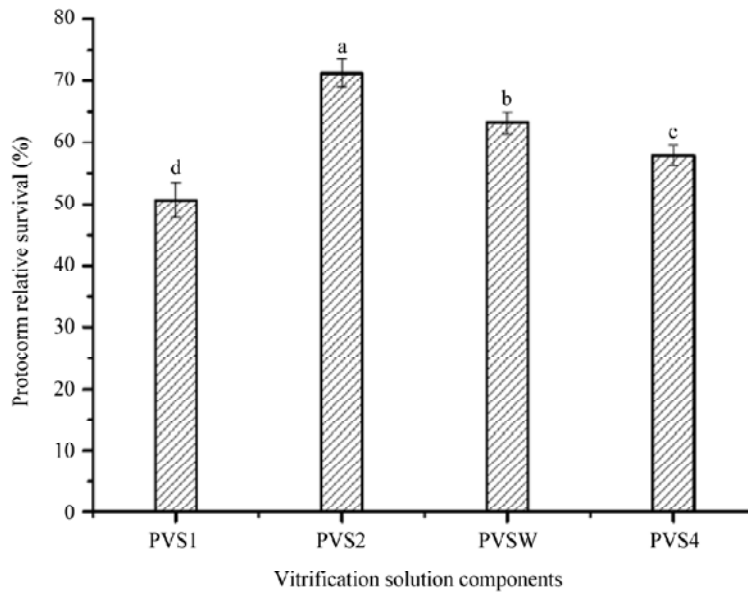


图 3 玻璃化溶液对原球茎超低温保存后相对存活率的影响

Fig.3 Effect of vitrification solution components on relative survivals of cryopreserved protocorms

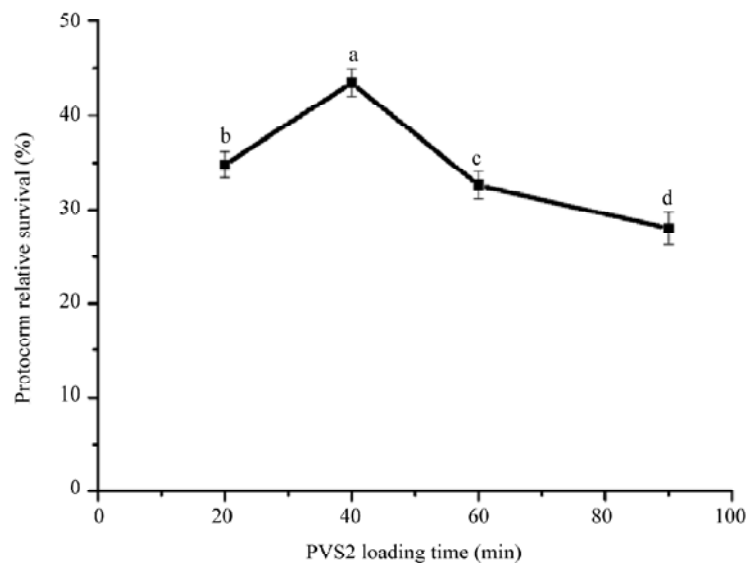


图 4 PVS2 脱水时间对原球茎超低温保存后相对成活率的影响

Fig.4 Effect of duration of exposure to PVS2 on relative survival of cryopreserved protocorms

2.4 PVS2 脱水时间对原球茎相对存活率的影响

由图 4 可以看出, PVS2 4 个处理时间的原球茎相对存活率差异显著。当 PVS2 处理 40 min 时, 液氮冻存后的原球茎相对存活率最高, 为 43.5%; 随着脱水时间的延长, 细胞脱水造成的结构损伤以及可能受到玻璃化溶液的离子毒害加重, 处理 90 min 时相对存活率下降为 28.0%, 而脱水 20 min 时, 由于脱水时间太短, 原球茎的含水量较高也导致冻存后相对存活率降低。因此可以确定 PVS2 最佳脱水时间为 40 min。

2.5 高渗与低温 - 高渗预处理对原球茎相对存活率的影响

大量研究结果表明, 细胞膜系统是植物受冷害的最初部位^[22,23], 而适宜的低温预处理能够提高植物细胞膜保护酶的含量, 减轻冷冻引起的膜伤害。由图 5 可以看出, 原球茎同时经蔗糖高渗和 4℃ 低温预处理后, 其相对存活率随着预处理时间的延长逐渐升高, 在预处理 6 d 时达到最高值, 为 46.6%; 此时只有高渗预处理的原球茎相对存活率为 43.5%, 两种处理方法之间差异性显著。而预处理 8 d 后原球茎的相对存活率迅速降低, 低温-高渗预处理的降低幅度要比高渗预处理的大, 可见低温预处理时间过长会导致细胞受到损害, 反而降低细胞活力。

2.6 FDA 法与 TTC 法在表征原球茎超低温保存

后细胞存活率的差异

已有研究表明, 大多数超低温保存后的植物材料恢复培养均是黑暗 14 d 后直接转至正常光下培养即可, 而大苞鞘石斛原球茎超低温保存后经黑暗恢复培养 14 d 后需先转至弱光下培养 7 d, 然后再转至正常光下培养 7 d, 原球茎部分细胞具有活力, 说明冻存后细胞恢复期较长。图 6B 是恢复培养未成活的原球茎在 FDA 指示剂下的状态, 茎尖分生组织细胞几乎全部死亡(绝大多数细胞为红色), 其 TTC 值一般都低于 30%; 而图 6D 中, FDA 法显示原球茎茎尖分生组织细胞具有活力(绿色部分), 虽然周围细胞死亡但是具有分生能力的细胞仍可以继续分裂增殖, 经 TTC 法测定其相对存活率大于 30%, 实际存活率最高为 20.0%, 恢复培养 30 d 后变绿呈现活力状态(图 7A), 90 d 后原球茎增殖状态(图 7B)。由此可以看出, TTC 法测定的相对存活率与实际存活率之间具有一定的相关性, 但相对误差较大, 不能准确地表征细胞存活状态。相比较而言, FDA 图像则能更准确、直观地显示细胞的活力水平, 只要茎尖分生组织具有活力的原球茎经恢复培养一般都可成活。

3 讨论

Turner 等^[24]研究了澳大利亚濒危植物袋鼠花

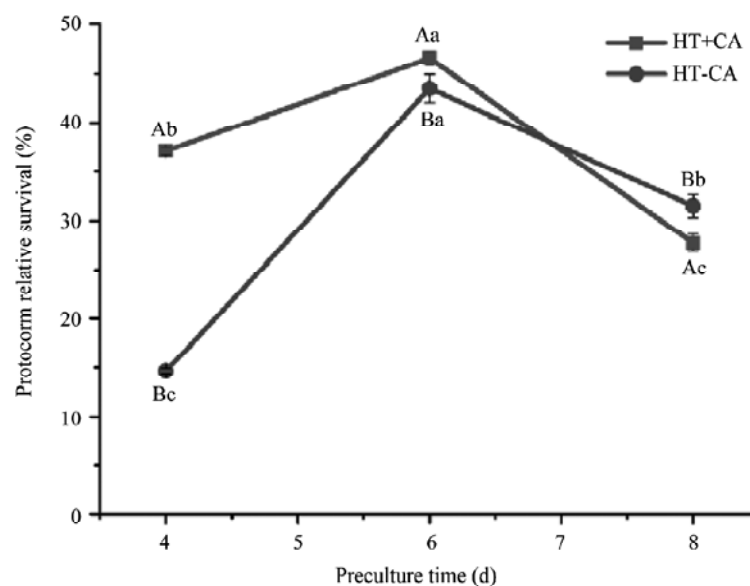


图 5 高渗和低温 - 低温预处理对超低温保存后原球茎相对成活率的影响

HT+CA: 高渗 - 低温预处理; HT-CA: 高渗预处理。

Fig.5 Effect of cold acclimation and hypertonic pretreatment on relative survival of cryopreserved protocorms

HT+CA: hypertonic pretreatment and cold acclimation; HT-CA: hypertonic pretreatment.

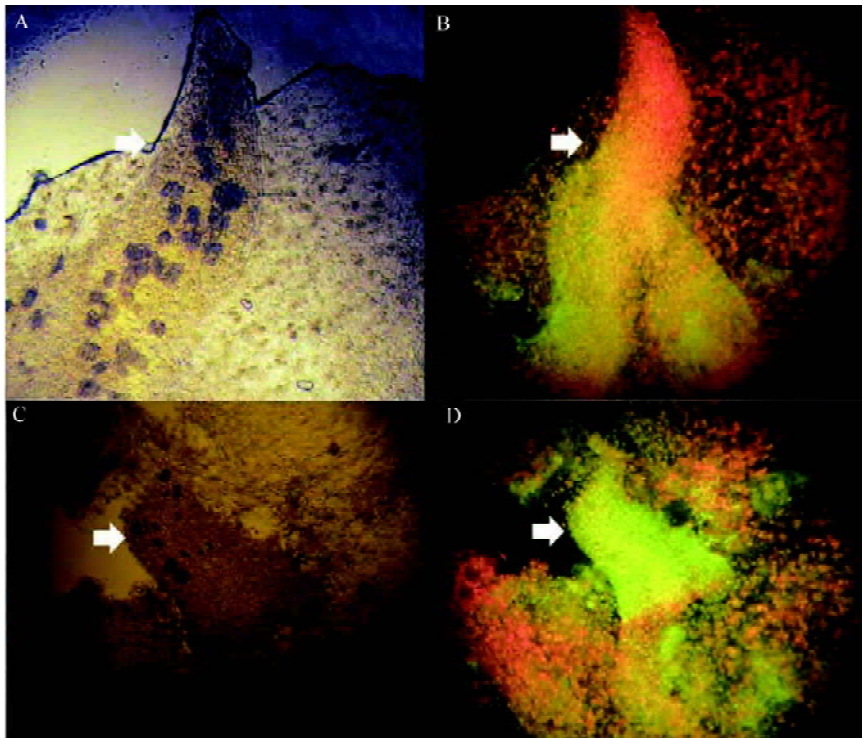


图6 FDA法显示超低温保存后原球茎正常光下恢复培养7 d后的细胞活力(100×)

A,C: 正常光下显示原球茎茎尖分生组织; B,D: 紫外光下显示原球茎茎尖分生组织。

Fig.6 The vitalities of cryopreserved protocorm after regrowth under light for 7 days by FDA staining procedure (100×)

A,C: apical meristem of protocorm exposed at normal light; B,D: apical meristem of protocorm exposed at ultraviolet light.

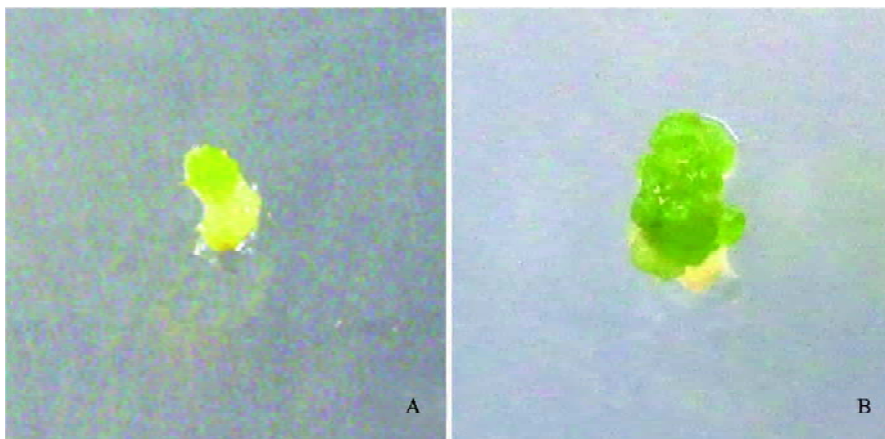


图7 超低温保存后的原球茎恢复培养30 d和90 d后的状态(10×)

A: 恢复培养30 d的原球茎; B: 恢复培养90 d的原球茎。

Fig.7 The surviving protocorm after regrowth for 30 days and 90 days(10×)

A: the surviving protocorm after regrowth for 30 days; B: the surviving protocorm after regrowth for 90 days.

(*Anigozanthos viridis* ssp. *terraspectans* Hopper) 茎尖在含有不同浓度糖和多元醇的培养基上预培养对超低温保存后茎尖存活率的影响, 指出预培养基中渗透压调节剂的羟基数是影响超低温保存后材料成活率

的主要因素。每单位蔗糖含有的羟基数最多, 所以效果最佳, 葡萄糖作为一种单糖羟基数最少, 而且在无法在脱水过程中保护离体细胞的细胞膜囊泡和脂质体^[25], 因此效果最差。而同分异构体甘露醇/山

梨醇在 0.6 mol/L 和 0.8 mol/L 时表现为山梨醇效果要好于甘露醇, Turner 在研究中也发现分子结构中同侧羟基数高的异构体对保存率的影响达到极显著水平。本实验中 4 种渗透压调节剂所含的羟基数不同, 蔗糖(8 个)和葡萄糖(5 个)属于糖类物质, 山梨醇(6 个/5 个同侧)和甘露醇(6 个/4 个同侧)属于同分异构体, 经 4 种渗透压调节剂不同浓度高渗处理后, 蔗糖处理的原球茎相对存活率最高, 与另外 3 种渗透压调节剂存在显著性差异。另外, 不同植物种类对渗透压调节剂预处理的浓度等要求不同, 铁皮石斛原球茎在含 0.75 mol/L 蔗糖的培养基中预处理 5 d(87.6%) 要比 4 d 和 6 d 处理的存活率高^[16], 而本试验中大苞鞘石斛原球茎 0.8 mol/L 蔗糖处理 8 d 后相对存活率最高(43.5%); 因此, 如何通过植物材料预处理和脱水条件的优化以提高其存活率至关重要。

低温预处理对不耐寒植物材料的超低温保存尤为重要。艾鹏飞等^[26]指出低温锻炼可以激活植物体内的抗寒机制, 如提高脯氨酸、多胺的含量及细胞液的渗透势, 从而提高抗寒力; “幻影”大花蕙兰 5℃ 低温预处理 20 d 时超低温保存后原球茎和茎尖成活率均达到最高^[10]。大苞鞘石斛原球茎低温预处理后相对存活率比单独高渗处理提高了 13.1%, 因此, 低温预处理可以使热带植物更好地适应冷冻保存。

已有研究^[15]报道在含有 0.5 mg/L ABA 的培养基上萌发产生的铁皮石斛原球茎, 经冻存后有较高的存活率, 达到 88%, 刘伟等^[27]也发现 ABA 预处理可以显著提高铁皮石斛类原球茎体的耐脱水性。本试验中在含 0.4 mol/L 蔗糖的培养基中添加 ABA, 在处理 4 d、6 d 和 10 d 时相对存活率高于对照(只含 0.4 mol/L 蔗糖的处理), 说明 ABA 的添加可以提高超低温保存的成活率。虽然 ABA 对原球茎相对存活率具有一定的影响, 但是效果以高浓度的蔗糖处理最好, Wang 等^[28]在紫花苞舌兰(*Spathoglottis plicata*)的研究中发现, ABA 处理的原球茎与对照相比在脱水性上没有很大的差别, 而蔗糖在诱导脱水上要比 ABA 的效果好, 本试验也证实了 0.8 mol/L 蔗糖不同预处理时间均比 0.4 mol/L 蔗糖 + 10 mg/L ABA 处理效果好。

在玻璃化溶液处理阶段, 玻璃化溶液种类和脱水时间是影响玻璃化法超低温保存存活率的 2 个重要因素。渗透性保护剂(甘油 + 乙二醇 + 二甲亚砜)在 PVS2 中占 60%, PVS1 中 44%, PVS4 中 55%, 试验结果表明, 在大苞鞘石斛原球茎玻璃化超低温保存中,

渗透性保护剂比例越大冻存后相对存活率越高; 另外也有可能和渗透性保护剂中 DMSO 的用量有相关性, Finkle 等^[29]指出 DMSO 作为渗透性保护剂, 是复合型保护剂中最主要的保护剂。脯氨酸是一种细胞质渗透物质, PVSW 可能由于渗透性物质的种类单一, 所以在本试验中测定的相对存活率仅次于 PVS2。保护剂的毒性及渗透损伤的程度主要取决于保护剂的浓度和处理的时间、温度, 0℃ 可以减少 DMSO 的毒性, 提高冻后成活率。铁皮石斛原球茎包埋玻璃化法超低温保存中, PVS2 于 0℃ 处理 150 min 要比处理 120 min 和 180 min 冻后存活率分别提高了 13% 和 30%^[16]。在大苞鞘石斛原球茎玻璃化法超低温保存研究中, 0℃ 处理 40 min 原球茎相对存活率最高达到 43.5%。因此, 要根据保存材料的含水量以及玻璃化溶液对细胞的渗透性等因素确定合适的脱水时间。

TTC 值用于兰科植物种子保存后的活力评价已有报道^[30,31], 但用于检测原球茎的相对成活率与实际再生率差异较大。严庆丰等^[21]研究指出, 冻存的组织和细胞经 TTC 法测出的相对成活率很高, 但接种到恢复培养基上根本不能恢复生长, 说明细胞的内膜系统或其它结构已经遭受不可逆的致命损伤, 而 TTC 染色法无法检测细胞内部这些变化, 因此, 该法只能给试验者提供一个评价材料成活情况的估测值^[32], 而不能作为冷冻保存后细胞相对存活率的唯一衡量指标。

本试验研究采用 TTC 法测定细胞相对存活率作为各种处理方法的初选标准时也证实了这一点, 0.6 mol/L 蔗糖预培养 8 d 后超低温保存相对存活率为 41.9%, 但是恢复培养却没有成活, 这可能是因为 TTC 法检测的是细胞琥珀酸脱氢酶的活性, 而细胞的真正活性除了各种酶的综合作用外, 还与细胞结构的完整性以及超低温保存后恢复生长的条件有关。另外, 由于在装载液和 PVS2 玻璃化溶液以及洗涤液中含有蔗糖, 蔗糖的渗入有可能提高了 TTC 测定值, 具体机理还需进一步的研究。

FDA 本身没有极性, 无荧光, 但在活细胞中, FDA 经酯酶分解为具有荧光的极性物质荧光素后, 不能自由穿透细胞膜而在细胞中积累, 因此, FDA 是一种特异性很强的鉴定细胞活性的指示剂, 已被广泛应用于花粉、悬浮细胞和原生质体生活力的鉴定^[20]。本试验研究结果也证明, FDA 法能够较 TTC 法更准确、直观地评价大苞鞘石斛原球茎超低温保存后的细胞活性, 但限于本试验的材料为原球茎, FDA 法无

法计算活细胞占总细胞数量的百分比,仅用来定性验证TTC法测定结果的可参考性。如在今后试验中改用悬浮细胞或胚性细胞作为供试材料,则可以定量测定细胞冷冻后的活力水平。

参考文献(References)

- 1 吉占和。中国植物志。北京: 科学出版社, 1999, 145-6.
- 2 中华人民共和国卫生部药典委员会。中国药典。北京: 人民卫生出版社, 1990, 75.
- 3 王旭红, 余国奠。中国兰科药用植物。中国野生植物资源 1993; (4): 15-22.
- 4 王 雁, 李振坚, 彭红明。石斛兰资源生产应用。北京: 中国林业出版社, 2007, 11-2.
- 5 李振坚, 王 雁, 于 耀, 张 莹, 缪 崑。濒危石斛兰开花与授粉生物学特性研究。广东农业科学 2009; 6: 43-5.
- 6 李振坚, 缪 崑。濒危石斛兰野生原种的迁地保护与引种驯化。中国野生植物资源 2009; 28(6): 67-9.
- 7 王 越, 刘 燕。观赏植物种质资源的超低温保存。植物生理学通讯 2006; 42(3): 559-66.
- 8 Steponkus P. Advances in low temperature biology, Volume I. London: JAI Press, 1992, 185-256.
- 9 Tomonari H, Toshinari G, Kazumitsu M, Keiko I, Masaya I, Masahiro M. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. Plant Biotechnol Rep 2009; 3(1): 103-9.
- 10 刘佩佩。大花蕙兰“幻影”组培再生体系建立及离体保存技术研究。北京: 北京林业大学研究生论文 2008.
- 11 Ishikawa K, Harata K, Sakai A, Yoshimatsu K, Shimomura K. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Rep 1997; 16(11): 754-7.
- 12 Maria TG, Claudia EL, Florent E, Yolanda MM, Miriam CP, Carlos DR. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* “Andrews”). In Vitro Cell Dev Biol Plant 2009; 45: 574-82.
- 13 Keiko K. Cryopreservation of *Dendrobium cruentum* Rchb. f. Thailand: Mahidol university, 2006.
- 14 张治国, 刘 骅, 夏志俊, 王君晖。铁皮石斛种子的超低温保存研究。安徽中医学院学报 1997; 16(5): 40-2.
- 15 王君晖, 张毅翔, 刘 峰, 黄纯农, 葛霁光。铁皮石斛种子、原球茎和类原球茎体的超低温保存研究。园艺学报 1999; 26(1): 59-61.
- 16 Yin MH, Hong SR. Cryopreservation of *Dendrobium cadidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. Plant Cell Tiss Organ Cult 2009; 98:179-85.
- 17 陈 勇, 王君晖, 黄纯农。铁皮石斛种质资源的玻璃化法超低温保存。浙江大学学报(农业与生命科学版) 2001; 27(4): 436-8.
- 18 王 伟, 黄卫昌, 金荷仙, 陈香波。大苞鞘石斛的离体培养与快速繁殖。植物生理学通讯 2008; 44(5): 959-60.
- 19 Towill LE, Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can J Bot 1975; 53(7): 1097-102.
- 20 Rotman B, Papermaster B. Membrane properties of living mammalian cells a studied by enzymatic hygrolysis of fluorescein esters. Proc Nat Acad Sci USA 1966; 55: 134-44.
- 21 严庆丰, 黄纯农。植物组织和细胞的玻璃化冻存研究。细胞生物学杂志 1994; 16(3): 117-22.
- 22 Levitt J. Responses of plants to environmental stress, chilling freezing and high temperature stresses. Academic Press 1980; 497-512.
- 23 Steponkus PL. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Ann Rev Plant Physiol 1984; 35: 543-84.
- 24 Shane T, Tissa S, Darren T, Eric B, Kingsley D, Beng T. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation, Plant Sci 2001; 160: 489-97.
- 25 Crowe L, Womersley C, Crowe J, Reid D, Appel L, Rudolph A. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. Biochim Biophys Acta 1986; 861: 131-40.
- 26 艾鹏飞, 罗正荣。柿和君迁子试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及再生植株遗传稳定性研究。中国农业科学 2004; 37(12): 2023-7.
- 27 刘 伟, 潘瑞焱, 冷佳奕, 叶庆生。脱落酸处理对铁皮石斛类原球茎体耐脱水性的影响。植物生理与分子生物学学报 2006; 32(3): 369-74.
- 28 Wang X, Lou C, Sun W. Differential mechanisms to induce dehydration tolerance by abscisic acid and sucrose in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) protocorms. Plant, Cell & Environment 2003; 26(5): 737-44.
- 29 Finkle BJ, Ulrich JM. Effect of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. Plant Physiol 1979; 63(4): 598-604.
- 30 Van Waes JM, Debergh PC. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. Physiol Plant 1986; 66(3): 435-42.
- 31 Van Waes JM, Debergh PC. In vitro germination of some Western European orchids. Physiol Plant 1986; 67(2): 253-61.
- 32 Florin B, Brulard E, Tessereau H, Petiard V, Ducos JP. Development of simplified method for routine cryopreservation of coffee germplasm collection. JIRCAS International Agriculture Series 2000; 8: 348-51.

Cryopreservation of *Dendrobium wardianum* Warner. Protocorms by Vitrification

Yuan-Ling Wu, Xiao-Hui Shen*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Key Laboratory of Urban Agriculture (South) Ministry of Agriculture, Shanghai 200240, China)

Abstract Cryopreservation system of *Dendrobium wardianum* Warner. protocorms were successfully established by using vitrification cryopreservation method. The results indicated that pretreatment and plant vitrification solutions (PVS2) dehydration played crucial roles for relative survival rate in the whole process. In addition, room temperature and low temperature hypertonic treatments presented significant survival differences. Furthermore, the different plant vitrification solutions(PVS) and dehydration times even influence relative survival rate. Consideration of above impact factors, the optimal cryopreservation system of *Dendrobium wardianum* Warner. protocorms were as follows: samples were protocorms which continuous subculture 60 days on proliferation medium; pre-cultured on 1/2 MS solid medium containing 0.8 mol/L sucrose in darkness at 4°C for 6 days; Subsequently, transferred the samples to osmotic-protected solution, composed with 1/2MS, 2.0 mol/L glycerol and 0.4 mol/L sucrose, at room temperature for 40 min; Then, dehydrated with PVS2 at 0°C for 40 min; afterwards, put samples into cryo-tubes, adding fresh PVS2, plunged into liquid nitrogen (LN) for 1 h; Finally, samples thawed in a water bath at 40°C for 1 min, and washing with 1/2 MS liquid medium containing 1.2 mol/L sucrose for 10 min intervals three times. After 30 days re-growth cultured on recovery medium, the relative survival rate could reach 20.0%.

Key words *Dendrobium wardianum* Warner.; protocorms; vitrification; cryopreservation

Received: October 22, 2010 Accepted: November 30, 2010

This work was supported by Key Technology Research of Flower Germplasm Innovation and Industrial Development from Shanghai Council of Agriculture (SCA) Key Project (No.2006-4-9)

*Corresponding author. Tel: 86-21-34205736, E-mail: shenxh62@sjtu.edu.cn