

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201410003

尹明华,洪森荣,夏瑾华,等. 黄独微型块茎低温保存及其萌发苗遗传稳定性研究[J]. 广西植物, 2015, 35(5):733—740

Yin MH, Hong SR, Xia JH, et al. Low temperature conservation of *Dioscorea bulbifera* microtuber and genetic stability of its germination seedling[J]. Guihaia, 2015, 35(5):733—740

黄独微型块茎低温保存及其萌发苗遗传稳定性研究

尹明华, 洪森荣*, 夏瑾华, 林国卫, 王爱斌, 柯维忠

(上饶师范学院 生命科学学院, 江西 上饶 334001)

摘 要: 以黄独微型块茎为材料, 对其低温保存期间的解剖结构、生理生化指标进行观察, 并对其低温保存后的萌发苗进行遗传稳定性检测。结果表明: 低温保存时间越长, 微型块茎外围细胞内的淀粉粒消失越多, 至 90 d 时, 淀粉粒消失的细胞扩延到微型块茎中部; 低温保存期间, 微型块茎的抗氧化酶和淀粉酶活性及其脯氨酸和可溶性糖含量均呈显著增加趋势。在低温保存的 0~90 d 内, SOD 活性在 18~54 d 内持续增加, 而在 54~90 d 内基本维持不变; POD 活性在 18~36 d 内显著增加, 在 36~54 d 内维持稳定, 而在 54~72 d 内又开始显著增加, 72~90 d 趋于稳定; CAT 活性变化趋势与 SOD 活性一致, 即在 18~54 d 内持续增加, 而在 54~90 d 内基本维持不变; α -淀粉酶和总淀粉酶活性在 18~36 d 内快速增加, 在 36~54 d 内无显著变化, 在 54~90 d 内持续显著增加; β -淀粉酶活性在 18~54 d 内显著增加, 在 54~72 d 内维持稳定, 在 72~90 d 内又开始显著增加; 可溶性糖含量在 18~36 d 内显著增加, 36~54 d 内无显著性变化, 54~90 d 又开始显著增加; 脯氨酸含量在 18~36 d 内无变化, 在 36~72 d 内显著提高, 在 72~90 d 内维持不变。微型块茎低温保存 90 d 后, 其萌发苗的形态(株高、叶片数、根数和茎节长)、DNA 含量、生理指标(总叶绿素含量、SOD 活性、CAT 活性、POD 活性、可溶性糖含量和可溶性蛋白含量)及其叶片的光合特性参数(净光合速率、气孔导度、细胞间 CO_2 浓度、蒸腾速率、气孔限制值、水分利用效率和瞬时羧化速率)和叶绿素荧光参数(初始荧光、最大荧光、PSII 最大光化学效率、PSII 潜在光化学效率、PSII 实际光化学效率、开放的 PSII 反应中心捕获激发能效率、光化学荧光猝灭系数和非光化学猝灭系数), 与常温保存的比较均无显著性差异, 这表明黄独微型块茎的低温保存不会造成植株的遗传变异。

关键词: 低温保存; 黄独; 微型块茎; 解剖结构; 生理生化指标; 遗传稳定性

中图分类号: Q942.5, Q944.55, Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0733-08

Low temperature conservation of *Dioscorea bulbifera* microtuber and genetic stability of its germination seedling

YIN Ming-Hua, HONG Sen-Rong*, XIA Jin-Hua,

LIN Guo-Wei, WANG Ai-Bin, KE Wei-Zhong

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

Abstract: Using *Dioscorea bulbifera* microtubers as material, the anatomical structure and the physiological and biochemical indexes of microtubers during low-temperature conservation were observed and measured, the genetic stability of germination seedlings after low-temperature conservation was also tested in this article. The results were as follows: HE staining method was complicated, whose effect was difficult to observe. Compared with HE staining meth-

收稿日期: 2014-10-19 修回日期: 2015-01-30

基金项目: 国家自然科学基金(31360072); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ14713)。

作者简介: 尹明华(1973-), 女, 江西永新人, 硕士, 副教授, 主要研究方向为生物技术, (E-mail) yinminghua04@163.com。

*通讯作者: 洪森荣, 硕士, 副教授, 主要研究方向为植物生物技术, (E-mail) hongsenrong@163.com。

od, safranin fast green staining was much simpler, whose effect was better. Therefore, Safranin-fast green method was more suitable for staining of *D. bulbifera* microtubers; Without low temperature conservation, the starch grains in the cells around *D. bulbifera* microtuber has not begun to be exploited and be still conserved. When *D. bulbifera* microtuber treated with low temperature, the starch grains in the cells surrounding microtuber began to disappear. The longer the conservation time is, the more the cell number with no starch grains also increased. The starch grains in cells had started to translate into other substances for cell life activities during low temperature storage. When conserving for 90 d, the cell whose starch grains disappeared extended to the middle of the microtuber; During the low temperature conservation period, the antioxidase, the amylase activity, the proline content and the soluble sugar content of *D. bulbifera* microtubers all showed an increasing trend; During the low temperature conservation of *D. bulbifera* microtubers for 0–90 d, SOD activity during 18–54 d continued to increase, and SOD activity during 54–90 d still remained unchanged; POD activity increased significantly within 18–36 d, maintained stability within 3–54 d, increased significantly during 54–72 d, kept stable again in 72–90 d; CAT activity trends is consistent with the SOD activity, which continued to increase in 18–54 d, and remain unchanged in 54–90 d; α -amylase and total amylase activity increased rapidly in 18–36 d, had no significant change in 36–54 d and continuously increased significantl in 54–90 d; β -amylase activity increased significantly in 18–54 d, maintained stability within the 54–72 d, and began to increase significantly within the 72–90 d; Soluble sugar content increased significantly within 18–36 d, had no significant change within 36–54 d, and began to increase significantly during 54–90 d; Proline content had no change in 18–36 d, increased significantly in 36–72 d, and remained unchanged in 72–90 d. There was no significant difference between the seedling germinated from *D. bulbifera* microtubers stored at low temperature for 90 d and the seedling germinated from *D. bulbifera* microtubers without low temperature conservation in morphology (average plantlet length, average leaf number, average interstem length and average root number), DNA content, physiological index (total chlorophyll content, superoxidase dismutase activity, catalase activity, peroxidase activity, soluble sugar content and soluble protein content) and its leaf photosynthetic characteristics parameters (net photosynthetic rate, stomatal conductance, intercellular CO_2 concentration, transpiration rate, stomatal limitation value, water use efficiency and instantaneous carboxylation rate) and chlorophyll fluorescence parameters (initial fluorescence, maximal fluorescence, the most photochemical efficiency of PS II, the potential photochemical efficiency of PS II, the actual photochemical efficiency of PS II, captured excitation energy efficiency of open PSII reaction center, photochemical fluorescence quenching coefficient and non-photochemical fluorescence quenching coefficient), which indicated that low temperature conservation of *D. bulbifera* microtuber could not cause genetic variation of the seedling.

Key words: low temperature conservation; *Dioscorea bulbifera* L.; microtuber; anatomical structure; physiological and biochemical index; genetic stability

黄独(*Dioscorea bulbifera*)为薯蓣科薯蓣属植物,其地下块茎药性苦寒,具有散结消癭、清热解毒、凉血止血的作用,主治癭疾癌肿(牛成伟等,2014)。现临床上主要用于治疗各种原因引起的甲状腺疾病以及癌症、血液系统疾病、妇科病和皮肤病等(李玉娟等,2013)。薯蓣属植物容易形成微型块茎(俗称零余子,形态学称之为珠芽),它是薯蓣属植物试管苗在腋芽处形成的变态块茎,具有较强的光温抗性,且易移栽成活,能降低生产成本,可取代试管苗种植(苗利娟等,2014)。目前关于微型块茎的研究主要集中于诱导形成(李明军等,2008)、化合物提取(屈亚娟等,2014)、休眠破除(苗利娟等,2014)、愈伤组

织诱导(郭君丽等,2013)、产量和品质分析(吴小玲等,2013)等方面。而关于微型块茎的低温保存却少见报道。韦本辉等(2004)研究了低温干燥、干沙埋藏及室温自然放置三种贮藏方式对淮山微型块茎出苗及苗期生长的影响,结果表明低温干燥处理的微型块茎出苗率高达100%,而且低温干燥贮藏的微型块茎很饱满,表面光滑,无明显的失水皱缩现象,而室温自然放置贮藏(20~28℃)的微型块茎由于失水而严重皱缩。因此,研究薯蓣属微型块茎的低温保存很有意义。在国外,对黄独微型块茎的体外驱虫性(Adeniran *et al.*, 2013)、产量影响因子(Osuagwu *et al.*, 2013)、提取物药理学作用(Mbiantcha

et al., 2011)、萌发极性(Passam *et al.*, 2013)等方面研究较多。本课题组从 2014 年开始对黄独微型块茎的诱导形成(洪森荣等, 2014)进行了研究。然而, 正如 Balogun(2009)指出薯蓣属植物基因资源通过大田种植、试管苗、花粉和种子进行保存的手段分别会受到土地空间、继代费用以及不规律开花的影响, 而对试管苗诱导的微型块茎进行低温保存是薯蓣属种质资源保存的一种较佳途径。目前, 关于黄独微型块茎的低温保存国内外少见报道。本研究以低温保存的黄独微型块茎为对象, 观察其解剖结构, 测定其生理生化指标, 并对低温保存后的萌发苗进行遗传稳定性检测, 旨在为黄独微型块茎低温保存的可行性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄独脱毒苗离体诱导的成熟微型块茎(由上饶师范学院植物组织培养室提供)。

1.2 方法

1.2.1 低温保存 将黄独脱毒苗离体诱导的成熟微型块茎用滤纸吸干表面水分, 直接放入 250 mL 的三角瓶内, 用封口膜封口, 橡皮筋扎紧后放入冰箱的冷藏室内, 调节温度为 4 ℃, 保存时间 90 d。每隔 18 d 取出部分微型块茎进行解剖结构观察和生理生化指标测定。90 d 后再取出剩下的微型块茎, 均匀埋于细沙中, 用自来水浇湿, 放入 (25±1)℃ 培养箱中进行萌发成苗实验(苗利娟等, 2014), 并对其萌发苗进行遗传稳定性检测。

1.2.2 低温保存后微型块茎的解剖结构观察 从低温保存不同时间(18、36、54、72、90 d)的微型块茎中分别取样, 制作大小为 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 样片, 采用常规石蜡切片法制片: FAA 固定液固定, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋, KD-1508-3B 型冷冻石蜡两用切片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)切片(厚度 8~10 μm), HE 染色或番红—固绿染色, Olympus 光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3 低温保存后微型块茎的生理生化指标测定 过氧化氢酶(CAT)活性测定参照 Knörzer *et al.* (1996)的方法, 稍作修改。过氧化物酶(POD)活性测定参照 Maehly *et al.* (1954)的方法, 稍作修改。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法, 可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定, 可

溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法, 脯氨酸含量采用茆三酮显色法测定, 总叶绿素含量测定采用丙酮比色法(李合生, 2000)。淀粉酶活性测定参照植物 β-淀粉酶(β-amylase, β-AL)试剂盒(上海哈灵生物科技有限公司)的方法, 稍作修改。

1.2.4 低温保存后微型块茎萌发苗的遗传稳定性检测 对照组: 将成熟微型块茎用滤纸吸干表面水分后埋入细沙内室温保存 180 d, 放入培养箱内培养, 60 d 后取其完整的萌发苗。

低温保存组: 在对照组成熟微型块茎埋入细沙内室温保存 90 d 后, 取出也埋入细沙内, 放入培养箱内培养, 60 d 后取其完整的萌发苗。

取对照组与低温保存组的萌发苗进行遗传稳定性检测。检测内容涉及形态学(包括株高、叶数、茎节长、根数等)、生理学、细胞流式检测以及光合特性参数和叶绿素荧光参数的测定。其中: 细胞流式检测参考 Otto(1990)的方法, 将采集的黄独苗嫩叶在 BD FACSCalibur 流式细胞仪上进行 DNA 含量检测。光合特性参数测定参考洪森荣等(2013)的方法, 用 LI-6400 便携式光合仪于上午 9:00—11:00 测定第 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, 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)。叶绿素荧光参数测定参考洪森荣等(2013)的方法, 包括初始荧光(F_0)、最大荧光(F_m)以及 F_m' 、 F_s 及 F_0' 。并计算 PSII 最大光化学效率(F_v/F_m)、PSII 潜在光化学效率(F_v/F_0)、PSII 实际光化学效率(Φ_{PSII})、开放的 PSII 反应中心捕获激发能效率(F_v'/F_m')、光化学荧光猝灭系数(qP)、非光化学猝灭系数(NPQ)。

1.2.5 统计分析 实验均重复 3 次, 所有数据表示为 Mean±SD, 数据用 SPSS19.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析, 再进行 LSD 法检验, $P<0.05$ 为有统计学差异显著性。

2 结果与分析

2.1 低温保存后微型块茎的解剖结构

2.1.1 HE 染色或番红—固绿染色方法的比较 图 1 表明, HE 染色(左)程序复杂, 且效果难以做出来, 而番红—固绿染色相对来说, 比较简单且效果较好。因此, 在后续实验中, 我们均采用番红—固绿染色法。

2.1.2 低温保存后微型块茎的解剖结构比较 图 2

表明,未进行低温保存的微型块茎周围细胞内的淀粉粒保留较多,说明细胞内的淀粉还未开始被利用。而当微型块茎进行低温保存时,其周围细胞内的淀粉粒开始消失,保存时间越长,淀粉粒消失的细胞数量增多。说明在低温保存期间,细胞内的淀粉粒已开始转化为其它物质用于细胞的生命活动。

2.2 低温保存对微型块茎生理生化指标的影响

由图 3 可知,微型块茎在低温保存 0~90 d 内, SOD 活性在 18~54 d 内持续增加,而在 54~90 d 内基本维持不变;POD 活性在 18~36 d 内显著增加,在 36~54 d 内维持稳定,而在 54~72 d 内又显著增加,72~90 d 趋于稳定;CAT 活性变化趋势与 SOD 活性一致,即在 18~54 d 内持续增加,在 54~90 d 内基本维持不变; α -淀粉酶和总淀粉酶活性在 18~36 d 内快速增加,在 36~54 d 内无显著变化,在 54~90 d 内持续显著增加; β -淀粉酶活性在 18~54 d 内显著增加,在 54~72 d 内维持稳定,而在 72~90 d 内又显著增加;可溶性糖含量在 18~36 d 内显著增加,36~54 d 内无显著性变化,在 54~90 d 又显著增加;脯氨酸含量在 18~36 d 内无变化,在 36~72 d 内显著提高,而在 72~90 d 内维持不变。

2.3 低温保存对微型块茎萌发苗遗传稳定性的影响

黄独微型块茎经低温保存后,可直接萌成苗(图 4)。我们对低温保存后及未低温保存的黄独微型块茎萌发苗的形态指标、生理指标、DNA 含量以及光合特性参数和叶绿素荧光参数进行比较。结果表明,两者的株高、叶片数、根数和茎节长无显著性差异(图 5)。两者的总叶绿素含量、SOD 活性、CAT 活性、POD 活性、可溶性糖含量以及可溶性蛋白含量均无显著性差异(图 6)。两者的净光合速率、气孔导度、细胞间 CO_2 浓度、蒸腾速率、气孔限制值、水分利用效率和瞬时羧化速率基本相同,差异不显著(图 7)。两者的初始荧光、最大荧光、PS II 最大光化学效率、PS II 潜在光化学效率、PS II 实际光化学效率、开放的 PSII 反应中心捕获激发能效率、光化学荧光猝灭系数和非光化学猝灭系数虽有变化,但变化均不显著(图 8)。两者植株叶片经细胞流式仪检测,其细胞峰值相同,表明其 DNA 含量一致(图 9)。从这些指标来看,低温保存没有造成黄独微型块茎萌发苗的遗传变异。

3 讨论

薯蓣属在我国约有 49 个种,其中多数种具有医

疗、保健和食用功能。该属多个种可在叶腋处形成微型块茎。微型块茎除可食用外,还具医疗价值。此外,零余子易成活,易进行种质交换,繁殖系数高,是薯蓣属重要的繁殖器官(龙雯虹等,2006)。Dikshit(1998)研究参薯微型块茎发育过程中多糖、蛋白质和淀粉等代谢物的分布,发现多糖主要以淀粉粒形式积累在基本组织细胞中。本研究通过对黄独微型块茎解剖结构的观察也验证了这一观点。

微型块茎成熟后一般有较长的休眠期,在农业生产上常常需要打破微型块茎的休眠。1~10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP_{333} 水培(龙雯虹等,2011)和 2%~5% 的双氧水(苗利娟等,2014)能显著打破零余子的休眠。但在本研究中,发现黄独的微型块茎经过 90 d 低温保存后能 100% 直接萌发成苗,这与韦本辉等(2004)在淮山微型块茎上的研究结果一致。龙雯虹等(2012)也发现 3~10 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理 60~80 d 能使山药微型块茎在采收后较短时间内发芽。因此,低温保存既可保存微型块茎的种质,也能破除其休眠,起到一举两得的作用。

本研究通过对黄独微型块茎低温保存不同时间的解剖结构进行比较,发现没有进行低温保存的对照组微型块茎由于处于休眠期,其外围细胞的淀粉粒保持完整。当进行低温保存后,黄独微型块茎外围细胞内的淀粉粒开始逐渐消失,低温保存 90 d 时,中部细胞内的淀粉粒也开始消失。这个解剖结构上的变化似乎在暗示,低温保存后黄独微型块茎的休眠可能与其细胞内的淀粉粒开始利用有关。本研究进一步对低温保存的黄独微型块茎进行生理生化指标检测,发现经过低温保存后,黄独微型块茎的淀粉酶(包括 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和总淀粉酶)活性在 0~90 d 内均呈显著增加趋势,淀粉酶的活性增加直接导致了黄独微型块茎在低温保存期内可溶性糖含量的显著增加,同时由于低温保存是一种逆境,黄独微型块茎为了避免冷藏伤害,细胞内的抗氧化酶开始显著增加,一些保护性的渗透性物质如脯氨酸的含量也显著提高(于飞等,2014;王晓晓等,2014)。这些因素综合作用,可能是黄独微型块茎低温保存破除休眠的直接原因。本研究结果与陈艳乐等(2005)对浙江瑞安大白薯的低温保存结果相似。在其他植物变态茎的低温保存中也发现了类似结果。Langens-Gerrits *et al.* (2003)发现,低温保存也可打破百合组培小鳞茎的休眠,促进其发芽。在百合鳞茎(涂淑萍等,2005)和马铃薯块茎(王合理,

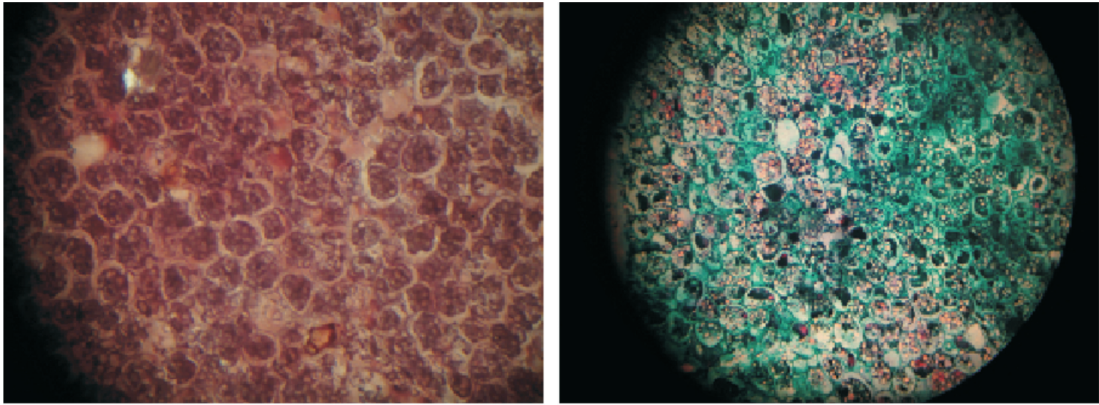


图 1 黄独微型块茎(未进行低温保存) HE 染色(左)和番红—固绿染色(右)(10×)
Fig. 1 *D. bulbifera* microtubers (without low temperature conservation) HE staining (left) and safranin fast green staining (right) (10×)

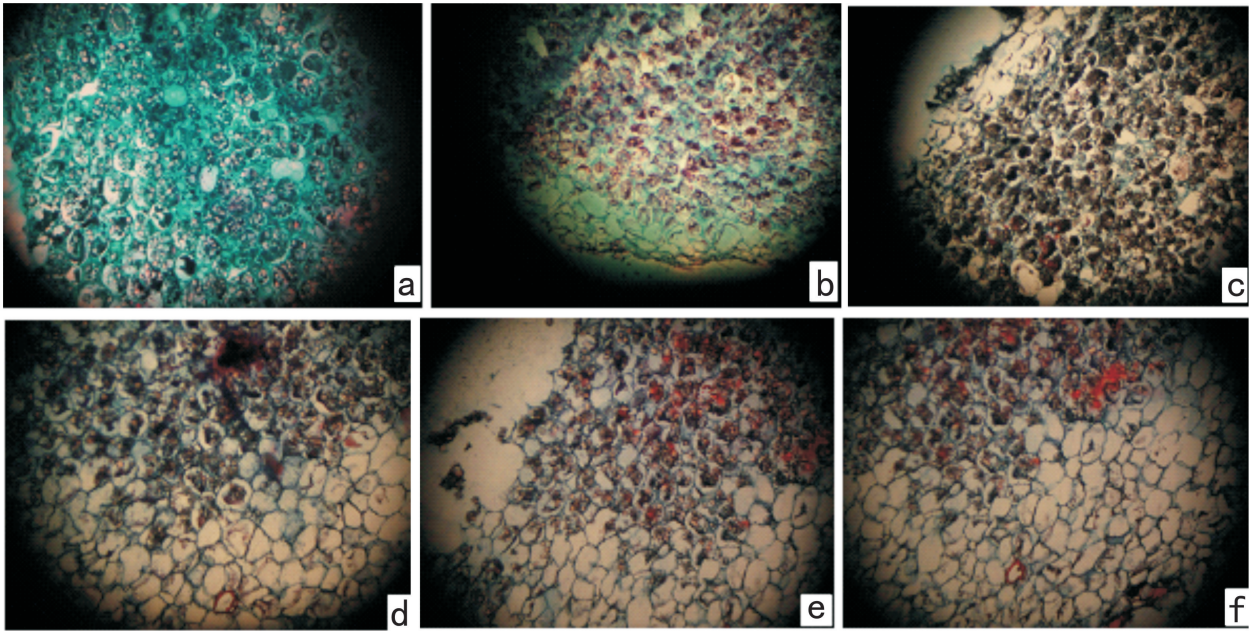


图 2 黄独微型块茎低温保存后的解剖结构比较 (40×) a-f. 0、18、36、54、72 d 和 90 d 的低温保存时间。
Fig. 2 Anatomical structure comparison of *D. bulbifera* microtubers after low temperature conservation (40×)
a-f. Low temperature conservation time for 0, 18, 36, 54, 72 d and 90 d respectively.

1999)低温保存期间,鳞茎内的淀粉酶(α -淀粉酶和 β -淀粉酶)活性增加,淀粉酶的活性与糖分的积累呈正相关。

低温保存实际上是一种温度胁迫,这种低温胁迫有可能作为一种选择压对不同基因型的植物材料产生选择效应,并产生一些生理及遗传的影响。因此,有必要对低温保存后的材料作遗传稳定性检测。本研究对低温保存后和未低温保存的黄独微型块茎萌发苗进行了形态学、生理学和 DNA 含量等方面的比较,结果表明两者虽有差异,但无显著性变化。因此,黄独微型块茎的低温保存是可行的。当然,黄

独微型块茎萌发苗的遗传稳定性还需进一步从分子方面进行检测(如 RAPD 和 AFLP 分析等),这也是本文将继续努力的方向。

参考文献:

Adeniran AA, Sonibare MA. 2013. *In vitro* potential anthelmintic activity of bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. on earthworms and liverflukes[J]. *J Pharm & Phytoth*, **5**(12): 196—203

Balogun MO. 2009. Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints [J]. *Biotechnol & Mol Biol Rev*, **4**(1): 1—10

Chen YL(陈艳乐), Jia SJ(贾守菊), Lin MY(林梦野). 2005. Effects of low-temperature on biophysiological and biochemical

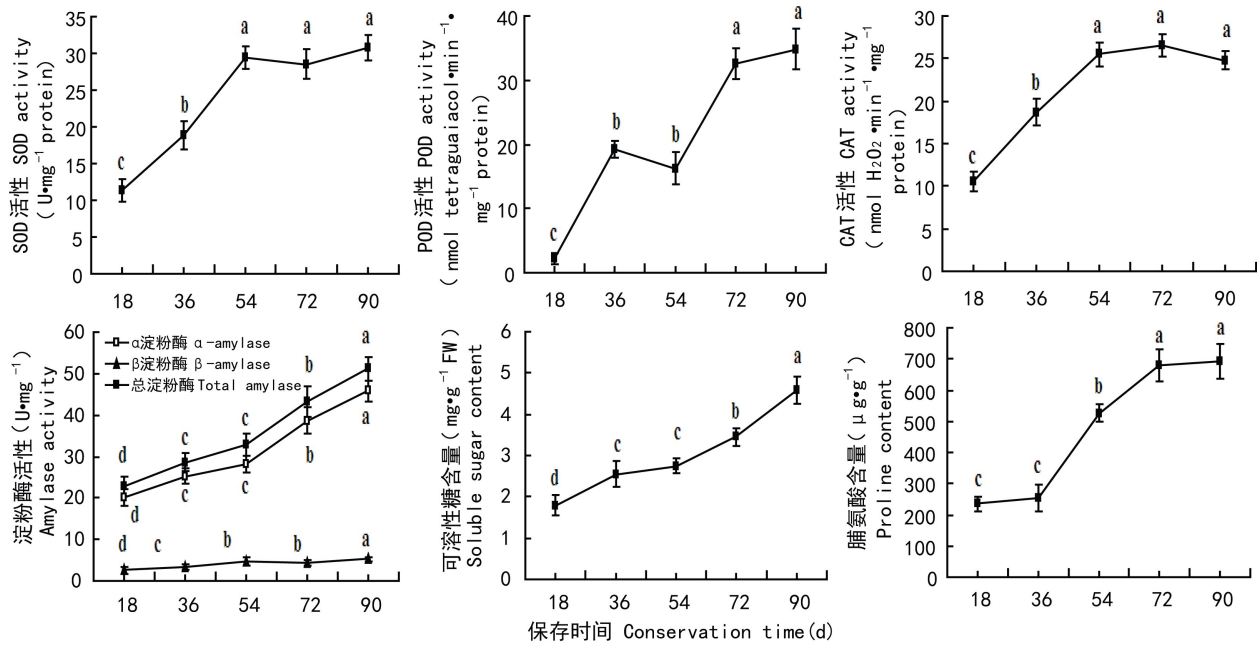


图 3 黄独微型块茎低温保存后的生理生化变化

Fig. 3 Physiological and biochemical changes of *D. bulbifera* microtubers after low temperature conservation

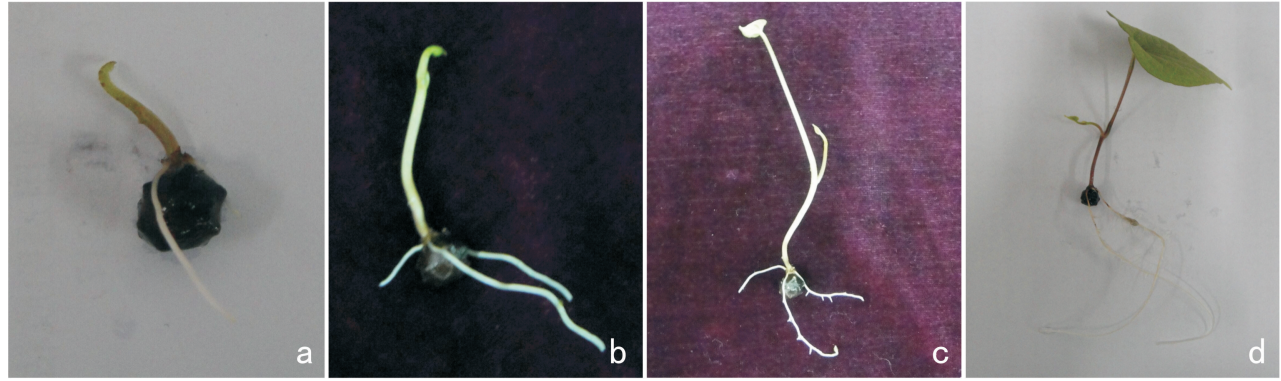


图 4 黄独微型块茎低温保存后的萌发

Fig. 4 Germination of *D. bulbifera* microtubers after low temperature conservation a. 12 d; b. 15 d; c. 20 d; d. 28 d.

indicators of yam (低温对薯蓣褐变相关生理生化的影响) [J]. *J Gansu Sci* (甘肃科学学报), **17**(2): 57–60

Dikshit N. 1998. Localisation and distribution of metaboites during development in *Dioscorea alata* L. [J]. *J Ind Bot Soc*, **77**(1–4): 171–174

Guo JL(郭君丽), Zhang XL(张晓丽), Li MJ(李明军), *et al.* 2013. Effects of light quality on callus induction in the bulbil of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. No. 47(不同光质对 47 号山药零余子愈伤组织诱导的影响) [J]. *J Henan Norm Univ: Nat Sci Ed* (河南师范大学学报·自然科学版), **41**(4): 145–148

Hong SR(洪森荣), Yin MH(尹明华). 2013. Photosynthetic and physiological responses of red bud taro transplantating seedlings under salt stress (红芽芋驯化苗对盐胁迫的光合及生理响应) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **33**(12): 2 499–2 506

Ju YJ(屈亚娟), Shi HY(史红艳), Chen XL(陈晓玲), *et al.* 2014. Process optimization of extracting flavonoids compounds from bulbel by response surface methodology (响应面法优化山药零余子黄酮类化合物的提取工艺研究) [J]. *Food Sci & Technol* (食品科技), **39**(8): 196–200

Knörzer OC, Burner J, Boger P. 1996. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress [J]. *Physiol Plant*, **97**(2): 388–396

Langens-Gerrits MM, Miller WBM, Croes AF, *et al.* 2003. Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regenerated *in vitro* [J]. *Plant Growth Regul*, **40**(3): 267–275

Li HS(李合生). 2000. The principle and technology of plant physiology and biochemistry experiment (植物生理生化实验原理与技术) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社)

Li MJ(李明军), Liu XY(刘欣英), Li P(李萍), *et al.* 2008. (山药

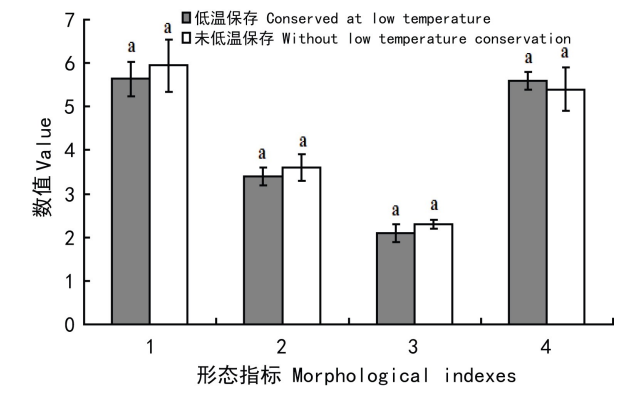


图 5 黄独微型块茎低温保存与未低温保存萌发苗的形态指标比较 1. 平均株高; 2. 平均叶片数; 3. 平均茎节长; 4. 平均根数。
Fig. 5 Comparison of morphological indexes between plantlets germinated from *D. bulbifera* microtubers with and without low temperature conservations 1. Average plantlet length (cm); 2. Average leaf number; 3. Average interstem length (cm); 4. Average root number.

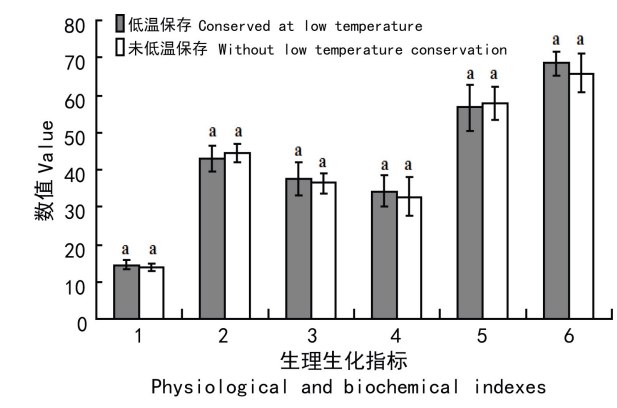


图 6 黄独微型块茎低温保存与未低温保存萌发苗的生理生化指标比较 1. 总叶绿素含量; 2. POD 活性; 3. SOD 活性; 4. CAT 活性; 5. 可溶性糖含量; 6. 可溶性蛋白含量。
Fig. 6 Comparison of physiological and biochemical indexes between plantlets germinated from *D. bulbifera* microtubers with and without low temperature conservations 1. Total chlorophyll content ($\mu\text{g} \cdot 10\text{g}^{-1}$); 2. POD activity ($\text{nmol tetraguaiacol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$); 3. SOD activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$); 4. CAT activity ($\text{nmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$); 5. Soluble sugar content ($\text{mg} \cdot 10\text{g}^{-1} \text{ FW}$); 6. Soluble protein content ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$).

微型块茎诱导形成的影响因子研究)[J]. *Chin Trad & Herb Drugs*(中草药),**39**(6): 905—910

Li YJ(李玉娟), Tain Y(田园), Ou WL(欧婉露), et al. 2013. Study on combination of *Rhizoma Dioscoreae bulbiferae* and *Radix Angelicae sinensis* with diosbulbin B and catechin as marker components (以黄独乙素和儿茶素为指标成分研究黄药子-当归配伍组合)[J]. *Trans Beijing Inst Technol* (北京理工大学学报),**33**(8): 866—870

Long WH(龙雯虹), Guo HC(郭华春). 2006. Advances in studies

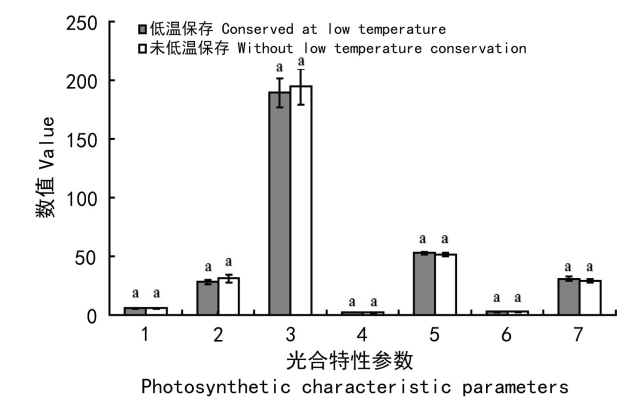


图 7 黄独微型块茎低温保存与未低温保存萌发苗的光合特性参数比较 1. 净光合速率; 2. 气孔导度; 3. 细胞间 CO₂ 浓度; 4. 蒸腾速率; 5. 气孔限制值; 6. 水分利用效率; 7. 瞬时羧化速率。
Fig. 7 Comparison of photosynthetic characteristic parameters between plantlets germinated from *D. bulbifera* microtubers with and without low temperature conservations 1. P_n ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); 2. G_s ($100 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); 3. C_i ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$); 4. T_r ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); 5. L_s (%); 6. WUE ($\mu\text{mol} \cdot \text{mmol}^{-1}$); 7. CUE ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

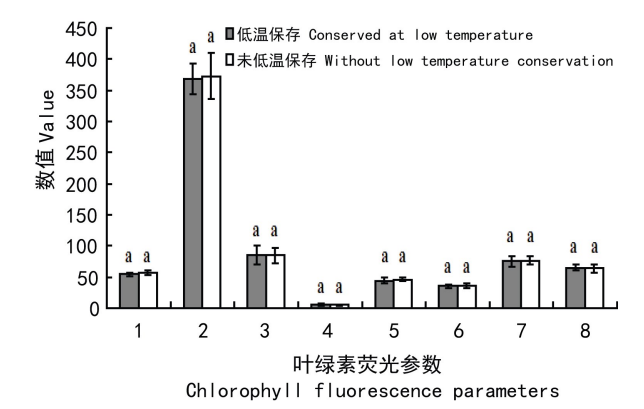


图 8 黄独微型块茎低温保存与未低温保存萌发苗的叶绿素荧光参数比较 1. 初始荧光; 2. 最大荧光; 3. 最大光化学效率; 4. 潜在光化学效率; 5. 实际光化学效率; 6. 捕获激发能效率; 7. 光化学淬灭系数; 8. 非光化学淬灭系数。在图中表示为百分比。
Fig. 8 Comparison of chlorophyll fluorescence parameters between plantletsgerminated from *D. bulbifera* microtubers with and without low temperature conservations 1. F_0 ; 2. F_m ; 3. F_v/F_m ; 4. F_v/F_0 ; 5. ΦPS II; 6. F_v'/F_m' ; 7. qP ; 8. NPQ. Expressed as percentages in the figure.

on bulbil of *Dioscore* L. (薯蓣零余子的研究进展)[J]. *J Yun-nan Agric Univ*(云南农业大学学报),**21**(4): 486—489

Long WH(龙雯虹), Xiao GL(肖关丽), Li DB(李德波), et al. 2012. Germination method for yam bulbil with different temperatures(山药零余子变温催芽的方法): China (中国), 201210045684. 8[P]. 2012-07-11

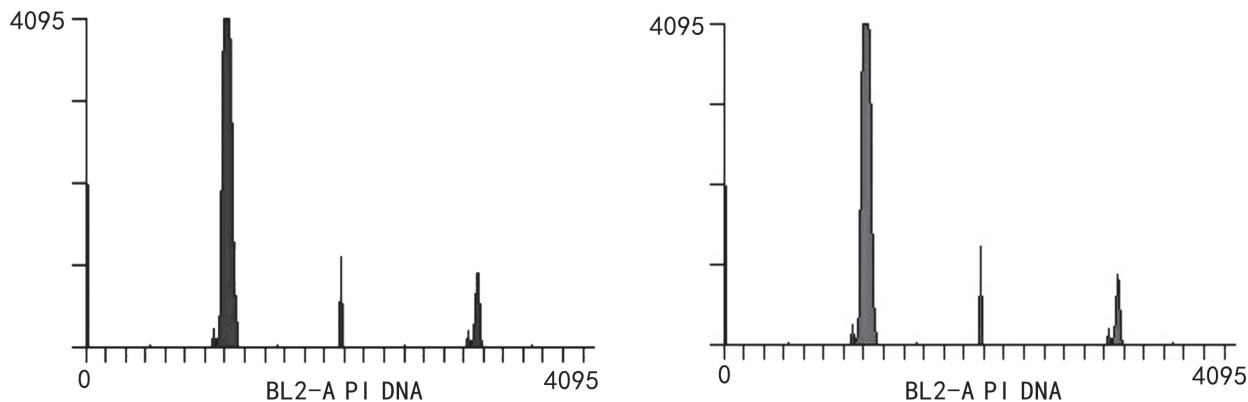


图9 黄独微型块茎低温保存与未低温保存萌发苗的细胞峰值直方图 低温保存后的萌发苗(左);未低温保存萌发苗(右)。
Fig. 9 Histogram of cell peak values between plantlets germinated from *D. bulbifera* microtubers with and without low temperature conservations The left is the plantlets germinated microtubers conserved at low temperature; the right is the plantlets germinated microtubers without low temperature conservation.

Long WH(龙雯虹), Xiao GL(肖美丽), Wang Q(王琼), *et al.*. 2011. Effect of paclobutrazol and chlormequat on dormancy-break of yam bulbils (多效唑和矮壮素破除山药零余子休眠的效应)[J]. *Chin Veget*(中国蔬菜), (12): 56—59

Maehly AC, Chance B. 1954. Catalases and peroxidases [J]. *Methods Biochem Analysis*, 1: 357—424

Mbiantcha M, Kamanyi A, Teponno RB, *et al.*. 2011. Analgesic and anti-inflammatory properties of extracts from the bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var. *sativa* (Dioscoreaceae) in mice and rats [J]. *Evidence-Based Compl & Altern Med*, (2011): 1—9

Miao LJ(苗利娟), Han SY(韩锁义), Zhang XY(张新友), *et al.*. 2014. Effect of hydrogen peroxide and gibberellin on break dormancy of Huai yam bulbil (双氧水和赤霉素打破怀山药零余子休眠的效应)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报), 27(1): 453—455

Niu CW(牛成伟), Lu B(陆宾), Ji LL(季莉莉), *et al.*. 2014. The acute liver injury and its mechanism of mice induced by diosbulbin B (黄独素 B 诱导小鼠急性肝损伤及其机制)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 39(7): 1 290—1 292

Osuagwu AN, Okigbo AU, Ekpo IA, *et al.*. 2013. Effect of crude oil pollution on growth parameters, chlorophyll content and bulbils yield in air potato (*Dioscorea bulbifera* L.) [J]. *Int J Appl*, 3(4): 37—42

Otto F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA [J]. *Methods Cell Biol*, 33(1): 105—110

Passam HC, Wickham LD, Wilson LA. 1982. Comparative observations on the polarity of sprouting of bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. and *Dioscorea alata* L. [J]. *Ann Bot*, 49(3): 359—366

Tu SP(涂淑萍), Mu D(穆鼎), Liu C(刘春). 2005. The physiological and biochemical change of lily bulbs during dormancy release with cold treatment (百合鳞茎低温解除休眠过程中的生理生化变化研究)[J]. *J Jiangxi Agric Univ*(江西农业大学学报), 27(3): 404—407

Wang HL(王合理). 1999. Effect of low temperature on respiration and sugar metabolism of potatoes (低温对马铃薯块茎呼吸及糖代谢的影响)[J]. *Chin Potato*(中国马铃薯), 13(3): 133—135

Wang XX(王晓晓), Wang ZH(汪志辉), Xiong B(熊博), *et al.*. 2014. Cold resistance mechanism study on effect of exogenous SOD under low temperature stress of young loquat fruits (低温胁迫下外源 SOD 对枇杷幼果抗寒性影响机理)[J]. *Guihaia*(广西植物), 34(5): 700—705

Wei BH(韦本辉), Tang RH(唐荣华), Wei WT(韦威泰), *et al.*. 2004. Effects of different store ways on budding rate and seedling growth in yam bulbil (淮山零余子不同贮藏方式对出苗及苗期生长影响的研究)[J]. *J Guangxi Agric & Biol Sci*(广西农业生物科学), 23(1): 28—30

Wu XL(吴小玲), Li CL(李春雷), Duan JC(段进潮), *et al.*. 2013. The yield and quality analysis of yams and bulbils propagated from different materials (山药不同繁殖材料所产山药及零余子产量和品质分析)[J]. *Ginseng Res*(人参研究), (2): 41—42

Yu F(于飞), Chen YP(陈银萍), Yang ZJ(杨宗娟), *et al.*. 2014. Effects of low temperature stress on antioxidant enzymes activities in the subcellular of two *Sabina* species (低温胁迫对两种圆柏属植物亚细胞抗氧化酶活性的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 34(5): 686—693