

红掌小滴玻璃化法超低温保存研究

高洁¹, 李志英², 张玄兵¹, 谢龙海², 陈莹³, 朱振芬³, 符运柳⁴, 徐立^{5*}

1. 海南大学, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 3. 华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 北京 100000; 4. 海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南儋州 571737; 5. 国家热带作物中期库, 海南儋州 571737

摘要: 以红掌腋芽为试材, 探讨小滴玻璃化法对红掌超低温保存的影响因素, 并对再生植株进行遗传稳定性检测。结果表明, 红掌腋芽置于含 0.4 mmol/L 蔗糖和 2 mmol/L 甘油的 MS 固体培养基中预培养 4 d 后, 在 0 °C 下 80% PVS₂ 处理 50 min, 转到铝箔条上 PVS₂ 液滴中, 将铝箔条迅速浸入液氮中, 2 s 后直接转入装满液氮的冻存管中, 投入液氮至少保持 30 min; 室温下用含有 1.2 mmol/L 蔗糖的 MS 液体培养基复温并卸载 20 min 后置于恢复培养基上, 腋芽存活率高达 63.70%。通过 ISSR 和 SSR 分子标记检测, 再生植株的遗传稳定性未发生改变。该研究结果为红掌种质资源的长期保存提供有效途径。

关键词: 红掌; 小滴玻璃化法; 超低温保存; 腋芽; 遗传稳定性

中图分类号: S682.14 文献标识码: A

Cryopreservation of *Anthurium andraeanum* by Droplet Vitrification

GAO Jie¹, LI Zhiying², ZHANG Xuanbing¹, XIE Longhai², CHEN Ying³, ZHU Zhenfen³, FU Yunliu⁴, XU Li^{5*}

1. Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Crop Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Beijing 100000, China; 4. Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation of Hainan Province, Danzhou, Hainan 571737, China; 5. National Gene Bank of Tropical Crops, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Using the *in vitro* axillary bud of *Anthurium* (*Anthurium andraeanum* Lind.) as the materials, this article reports the influence of the droplet vitrification on *Anthurium* after cryopreservation, and plants regenerated tissues genetic stability were assessment. The results showed the highest survival rate of *Anthurium* (63.70%) was achieved after preculture for 4 days on MS solid medium containing 0.4 mmol/L sucrose and 2 mmol/L glycerol, dehydration with 80% PVS₂ at 0 °C for 50 min, cooling in droplets of PVS₂ placed on aluminum foil strips, after immersing in liquid nitrogen for 2 s, directly transferred it to a cryotube filled with liquid nitrogen, and kept it in liquid nitrogen for at least 30 min after rewarming them with MS liquid medium containing 1.2 mmol/L sucrose at room temperature for 20 minutes, transferred to recovery medium. Through ISSR and SSR molecular marker detection, the genetic stability of regenerated plants did not changed. The results would provide an effective way for long-term preservation of *Anthurium andraeanum* germplasm resources.

Keywords: *Anthurium andraeanum* Lind; droplet vitrification; cryopreservation; axillary buds; genetic stability

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.019

红掌 (*Anthurium andraeanum* Lind.) 为天南星科 (Araceae) 多年生常绿草本植物, 其花色多

样, 佛焰苞独特, 插花效果大胆新颖, 切花保存时间长质量优, 是第二大热带花卉, 也是世界销

收稿日期 2022-04-09; 修回日期 2022-06-21

基金项目 中央级科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630032019039, No. 1630032020026)。

作者简介 高洁 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 种质资源保存。*通信作者 (Corresponding author): 徐立 (XU Li), E-mail: xlzy@263.net。

量最大的“贵族”花卉之一。作为国际上重要的切花和盆栽观赏植物，红掌在花卉产业中占有重要地位，在全球花卉贸易中，为世界五大设施花卉之一。在我国，2019年红掌的销量为3500万盆^[1]。目前，红掌在各个国家及地区都有商业栽培，品种日益增加，通过种间杂交已培育出大量栽培品种，2000年已培育出红掌优良栽培品种600余个^[2-3]。获得基因库中可用的遗传资源是红掌育种遗传改良成功的关键因素，但在新品种的推广过程中，大多数传统品种逐渐丢失。因此，种质资源的保存对于红掌生产及新品种的选育显得极为重要。红掌种质资源保存方法以建立田间资源圃和试管苗保存种质等传统保存方法为主。种质圃保存耗时费力，占用大量土地资源，且在保存过程中易受病害侵扰。而试管苗保存对温度、光照和低温等环境条件要求严格，导致保存能耗较高，需定期继代，且易发生变异，影响种质资源的保存效果。

目前，超低温保存被认为是长期有效保存多种形式的植物种质的首选方法，是不同于传统的种质资源田间与试管苗保存的一种替代方法，可在几十年内以较小的空间和较低的日常维护，在一个相对安全的条件下最大化地长期保护植物的遗传资源^[4-5]。随着对超低温保存研究的不断深入，发展出了许多冷冻方法，如两步冷冻法、干燥冰冻法、玻璃化法、包埋-脱水法、包埋-玻璃化法、小滴玻璃化法等。小滴玻璃化法在吸取玻璃化法的主要优点后，对冷冻及化冻程序进行了改良，在冷冻过程中将植物材料直接与玻璃化液、装载液及液氮接触，因此能实现较快的冷却或复温速率，减少在冷却和复温过程中细胞内冰晶的形成，同时铝箔是一种良好的热传导材料，热量传导快速且均匀^[6]，提高了冷冻和化冻的速率，从而极大提高了超低温保存植物种质资源后的再生率^[7]。小滴玻璃化法是目前应用最广泛的基因库超低温保存植物种质的冷冻方法^[8]，采用小滴玻璃化法已成功保存了菠萝^[9]、香蕉^[7]、甘蔗^[10]等热带草本植物。

尽管超低温保存已是许多重要的经济植物的常规保存方法，但不同种类植物、同种植物的不同资源对超低温处理的反应均不同，需要针对每份资源开展研究。鉴于红掌超低温保存研究还较少，本研究通过小滴玻璃化法超低温保存技术，在常规保存方法的基础上对红掌的小滴玻璃化超

低温保存条件进行比较研究，筛选出适宜的保存条件，以期建立一种操作简便并能长期稳定保存红掌种质资源的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

以中国热带作物中期库提供的红掌 Pink Champion (PC) 无菌苗约 200 瓶为材料，组培苗在继代培养基 1/2MS+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 卡拉胶 (pH 5.8, 高温灭菌) 上生长 2~3 个月。

1.2 方法

1.2.1 超低温保存 (1) 预处理。切取 1~2 mm 带腋芽的茎段置于带滤纸的预培养基 (MS+0.4 mol/L 蔗糖+2 mol/L Gly+6.5 g/L 卡拉胶, pH 5.8, 高温灭菌) 上培养 1~5 d。

(2) PVS₂ 脱水。预培养后，将材料转入 0 °C 的 30%、60%、80% 的 PVS₂ 溶液中，分别处理 10、40、50、60、100 min，30%、60%、80% 的 PVS₂ 溶液分别由 0.4 mol/L 蔗糖 MS 溶液与 3.26 mol/L 甘油 (7:3, V/V) 溶液、2.42 mol/L 乙二醇 (4:6, V/V) 溶液和 1.9 mol/L 二甲基亚砷 (2:8, V/V) 溶液配置而成。

(3) 液氮冷冻。在 PVS₂ 处理结束前 2 min 用无菌滴管将 20 个材料转到铝箔条上，并加 15 μL PVS₂ 液滴，整个过程保持在 0 °C 环境下完成；用无菌镊子将铝箔条迅速浸入液氮 (-196 °C) 中 2 s 后快速转入装满液氮的 2 mL 冻存管中，关盖后液氮中至少保持 30 min；每个处理 15 个材料转移至液氮中，另外 5 个直接转移到 RS (卸载处理溶液) 中 (对照)，每个处理重复 3 次。

(4) 复温卸载。复温时将铝箔迅速从液氮中取出，放入室温下的 RS (卸载液: MS+1.2 mol/L 蔗糖, pH 5.8, 过滤灭菌) 中浸泡几秒后，液滴脱离，取出铝箔片材料游离到卸载液中继续保持 15~20 min。

(5) 用镊子将上述复温卸载后的材料置于无菌滤纸上，除去卸载液后，置于放置 2 层无菌滤纸的半固体培养基 (MS+0.3 mol/L 蔗糖) 上，在 25 °C 黑暗培养箱中培养 2 d。

(6) 再生 2 d 后，将组织转到无滤纸的再生培养基 (1/2MS+0.8 mg/L BA+0.2 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 卡拉胶, pH 5.8, 高温灭菌) 上，促进材料分化愈伤组织，黑暗培养 1 周后转

入光照条件,并转入继代培养基中,4周后统计存活率。

1.2.2 DNA提取和检测 根据改良的CTAB法,提取红掌小滴玻璃化法超低温保存后的再生植株和未经处理植株的DNA,通过SimpliNano微量分光光度计检测纯度及浓度,达到SSR和ISSR要求后,-20℃保存备用。

1.2.3 ISSR分析 利用8条UBC通用引物进行PCR扩增。反应体系:12.5 μL Taq Master Mix,1.0 μL模板,1.0 μL引物,10.5 μL无菌水。PCR程序设置为:95℃预变性3 min,95℃变性15 s,退火(温度根据引物说明设置)15 s,72℃延伸2 min(循环35次),72℃延伸10 min。

1.2.4 SSR分析 利用6对已发表的红掌SSR引物进行PCR扩增(表1)。SSR引物由广州天一辉远生物科技有限公司合成。反应体系:12.5 μL Taq Master Mix,1.0 μL DNA,1.0 μL正向引物,1.0 μL反向引物,9.5 μL无菌水。PCR程序设置为:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,退火(温度根据引物说明设置)15 s,72℃延伸1 min(循环33次),72℃延伸10 min。

表1 SSR分子标记引物
Tab.1 Primers SSR molecular makers

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃
SSR1-F	TGCTCCATCGATCTCTCCTT	55
SSR1-R	GTGCATCATCTCGCAGATT	
SSR2-F	GACACAGTTGCCTCCGATTT	54
SSR2-R	AGCTGTTGTTTATAGAGGCAGAA	
SSR3-F	GAAAAGGTAGGGTGTCTCTCG	55
SSR3-R	CGGAACAAGTACCTCGGTTG	
SSR4-F	GCGTAGGGTAGACACAGTTGC	56
SSR4-R	CAGCTGTTGTTTATAGAGGCAGA	
SSR5-F	ACTGGGCCACCAAATAAACA	53
SSR5-R	ACGACCTGGACTTCATGACC	
SSR6-F	GCCGATGTGTCCTCAGTGTA	55
SSR6-R	AGCAAGGGCACAGAGAAGAA	

2 结果与分析

2.1 红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存正交试验

2.1.1 正交试验结果 由正交试验结果可以看出(表2),在影响红掌PC腋芽超低温保存存活率的因素中,PVS₂浓度极显著影响红掌PC腋芽超

低温保存的存活率,预培养时间显著影响红掌PC腋芽超低温保存的存活率,PVS₂处理时间也影响其存活率。在9个处理方案中,处理6(A₂B₃C₁:预培养时间4 d、PVS₂浓度80%和PVS₂处理时间40 min)的超低温保存存活率最高,达61.48%。对比红掌Amigo胚性悬浮细胞超低温保存32.1%的存活率^[11],有明显提升。由表2可知,红掌PC腋芽超低温保存过程中,预培养时间、PVS₂浓度和PVS₂处理时间3个因素的最佳水平分别是4 d、80%和50 min(A₂B₃C₂),但此最佳水平组合并未在本试验中体现,对此结果仍需进一步验证。

2.1.2 单因素试验结果 正交试验得出最佳处理组合后,还需开展不同单因素对红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存存活率的影响。只变化单因素,其他处理按最佳水平即预处理4 d、PVS₂浓度为80%和装载50 min进行。如图1A所示,预培养与未经预培养的存活率有明显差异。随着预培养时间的延长,红掌PC腋芽存活率呈先上升后下降的趋势。预培养4 d的存活率最高,达60%,高于其他处理。预培养时间延长,红掌细胞含水量逐渐减少,当预培养5 d以后细胞产生了渗透胁迫,使部分细胞失去活性,降低存活率。

红掌PC腋芽小滴玻璃化法超低温保存后的存活率对PVS₂装载液浓度的变化比较敏感(图1B)。随着PVS₂装载液浓度的增加,红掌PC超低温保存的存活率先逐渐增加后下降。当PVS₂装载液浓度为80%时,存活率最高,达61.48%。PVS₂装载液浓度对红掌PC超低温保存的存活率的影响比较明显,而PVS₂装载液浓度过高后存活率反而下降。未经PVS₂装载的红掌材料没有存活,可能是红掌材料易受装载液的毒害影响,但若不经过程过装载液保护红掌材料则不能承受低温冻害。

本研究发现,随着PVS₂装载液处理时间的延长,红掌PC腋芽超低温保存的存活率增加,但超过50 min后,红掌腋芽由于受PVS₂的毒害,存活率反而下降。PVS₂装载液处理50 min时,红掌腋芽存活率最高,达63.70%(图1C)。

综上,正交试验所得的最佳处理组合能使红掌PC腋芽小滴玻璃化法超低温保存的存活率达到最优。

2.2 红掌PC小滴玻璃化法超低温保存的遗传稳定性检测

2.2.1 DNA的提取 提取红掌PC对照植株和再生植株的DNA,用1%琼脂糖凝胶电泳的检测结

表 2 正交设计 $L_9(3^4)$ 试验结果及方差分析
Tab. 2 Orthogonal test design $L_9(3^4)$ results and variance analysis

编号 No.	因素 Factor			误差 Error	存活率 Survival rate/%
	预培养时间 A Pre-culture time/d	PVS ₂ 浓度 B PVS ₂ concentration/%	PVS ₂ 处理时间 C PVS ₂ processing time/min		
1	1(3)	1(30)	1(40)	1	31.85±2.77
2	1(3)	2(60)	2(50)	2	54.81±9.13
3	1(3)	3(80)	3(60)	3	52.59±4.57
4	2(4)	1(30)	2(50)	3	45.92±2.77
5	2(4)	2(60)	3(60)	1	57.04±5.83
6	2(4)	3(80)	1(40)	2	61.48±2.10
7	3(5)	1(30)	3(60)	2	21.48±2.77
8	3(5)	2(60)	1(40)	3	45.19±1.05
9	3(5)	3(80)	2(50)	1	51.89±5.54
K_1	139.25	99.25	138.52	140.78	
K_2	164.44	157.04	152.62	137.77	
K_3	118.56	165.96	131.11	143.70	
k_1	46.42	33.08	46.17	46.93	
k_2	54.81	52.35	50.87	45.92	
k_3	39.52	55.32	43.70	47.90	
R	15.29	22.24	7.17	1.98	
S_j	351.95	874.39	79.60	5.86	
f_j	2	2	2	2	
S_j/f_j	175.98	437.19	39.80	2.93	
F	60.05	149.18	13.58		
$F_{0.05}$	19	19	19		
$F_{0.01}$	99	99	99		

注: K_i 为每列因素 i 水平所对应的试验指标和; k_i 为每列因素 i 水平所对应的试验指标的平均值; R 为每列因素的极差; S_j 为离差平方和; f_j 是自由度; S_j/f_j 是均方; F 是 F 值; $F_{0.05}$ 和 $F_{0.01}$ 为临界值。

Note: K_i is the sum of test indicators corresponding to each factor i level; k_i is the average of the test indicators corresponding to each factor i level; R is the range of each factor; S_j is the sum of squares of deviation; f_j is freedom; S_j/f_j is a mean square; F is F value; $F_{0.05}$ and $F_{0.01}$ are critical values.

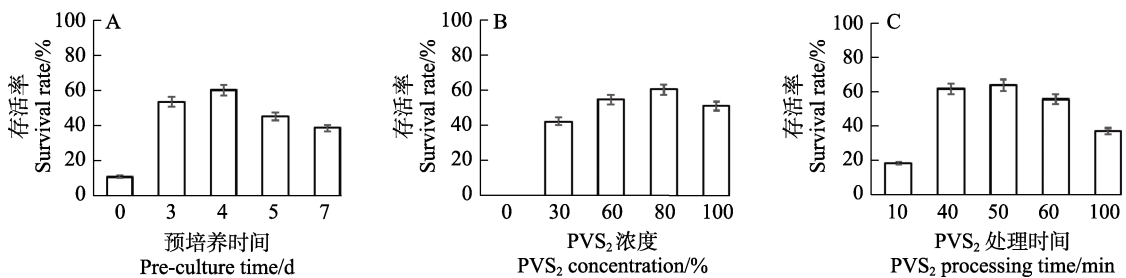


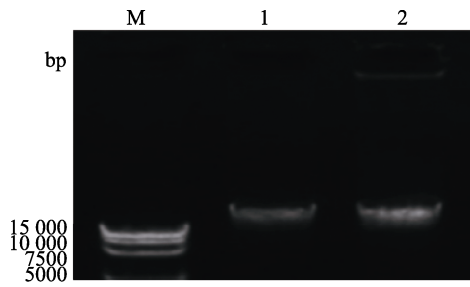
图 1 不同处理对存活率的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on survival rate

果如图 2 所示, 为单一条带, 无降解现象, 纯度较高, 满足 2 种标记试验需求。

2.2.2 ISSR 电泳检测结果 8 条 ISSR 引物扩增后, 最多的能扩增出 11 条清晰的条带(UBC 807), 最少的能扩增出 3 条条带(UBC840), 8 条引物

共扩增出 56 条条带(表 3)。图 3 所示为其中的 6 条引物扩增电泳图, 红掌 PC 对照和小滴玻璃化法超低温保存再生植株条带均一旦无杂带, 初步证明红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存不会影响材料的遗传稳定性。



M: Marker; 1: CK; 2: 超低温保存后再生植株。
M: Marker; 1: CK; 2: Plants regenerated after cryopreservation.

图 2 再生植株 DNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis map of regenerated plant DNA

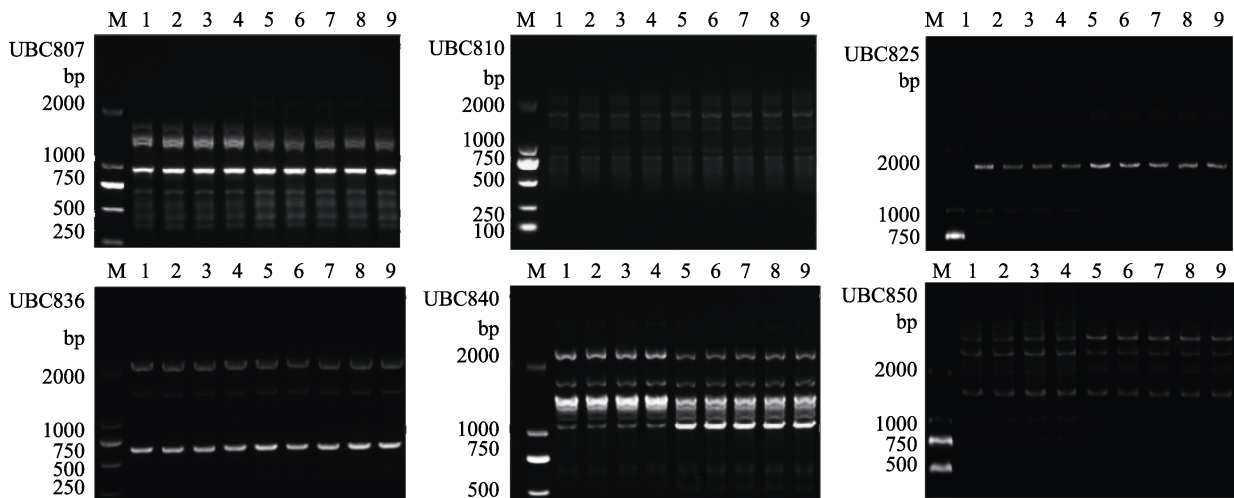
2.2.3 SSR 电泳检测结果 利用已发表的 6 对 SSR 引物进行后续 SSR 分析, 结果表明, 小滴玻璃化法超低温保存后的红掌样品与保存前的样品未出现差异性条带 (图 4), 再次证明了红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存的再生植株未发生遗传变异。因此, 结合 ISSR 电泳结果基本可以确定小滴玻璃化法超低温保存不会改变红掌 PC 材料的遗传稳定性。

表 3 8 条 ISSR 分子标记引物及扩增结果
Tab. 3 8 primers ISSR molecular makers and amplification results

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增条带 Total band	变异条带 Polymorphic band
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	11	0
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	9	0
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	10	0
UBC817	CACACACACACACACAA	5	0
UBC825	ACACACACACACACT	4	0
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	9	0
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGACT	3	0
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTCC	5	0
合计		56	

2.3 红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存后的增殖情况

红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存 4~6 周后, 材料会出现各种不同变化: 材料长出愈伤组



M: DL2000 Marker; 1~4: CK; 5~9: 超低温保存后再生植株。
M: DL2000 Marker; 1~4: CK; 5~9: Plants regenerated after cryopreservation.

图 3 红掌不同 ISSR 引物电泳图

Fig. 3 Electrophoretic maps of different ISSR primers in *A. andraeanum*



M: DL2000 Marker; 1~4: CK; 5~9: 超低温保存后再生植株。
M: DL2000 Marker; 1~4: CK; 5~9: Plants regenerated after cryopreservation.

图 4 红掌不同 SSR 引物电泳图

Fig. 4 Electrophoretic maps of different SSR primers in *A. andraeanum*

组织 (图 5A), 有些材料褐变死亡 (图 5B); 无愈伤组织再生直接长出腋芽 (图 5C); 材料逐渐

长出腋芽和愈伤组织 (图 5D); 超低温保存 5 个月后长出的再生植株 (图 5E)。

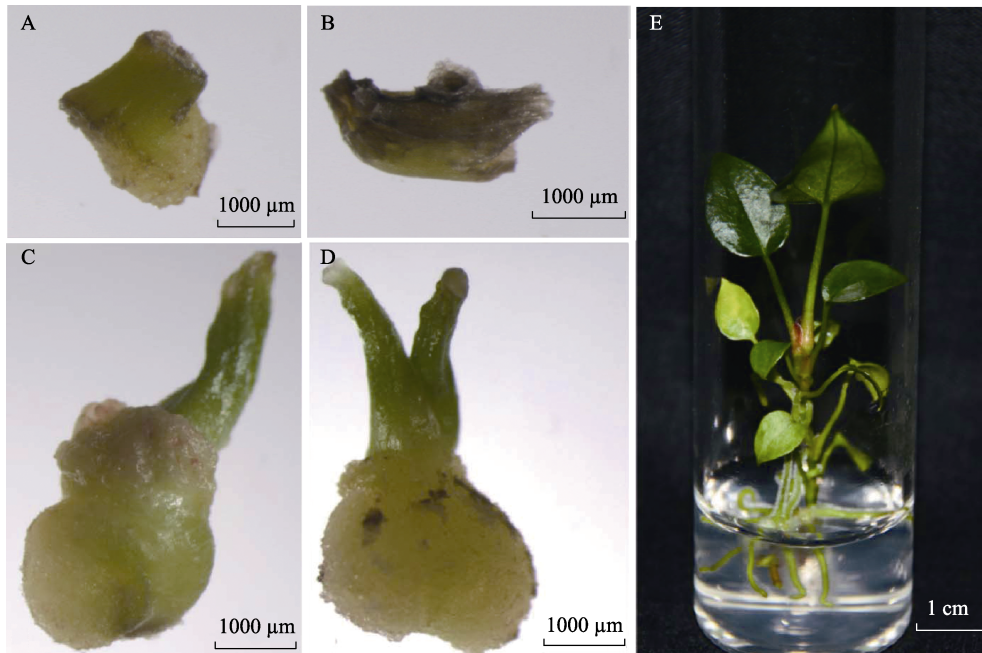


图 5 红掌腋芽超低温保存后的增殖情况

Fig. 5 Proliferation of *A. andraeanum* axillary buds after cryopreservation

3 讨论

植物遗传资源是农业生产最重要的自然资源^[12], 是物种进化、植物育种和遗传学研究的物质基础。随着植物遗传多样性和遗传资源潜在价值的急剧减少, 植物种质资源保存成为一个全球共同关注的课题^[13]。自 HENSHAW 和 MOREL 首次提出离体保存植物种质资源后^[14], 许多不能常规保存的植物得以保存。而在离体保存中超低温保存是目前唯一能长期保存物种的有效的理想手段^[13]。植物种质资源越来越多地使用超低温保存技术, 以确保无性繁殖植物资源的安全^[15]。

在自然界中, 许多植物在承受环境压力下能够形成保护机制, 在冷冻保存程序之前加入预处理这一步骤, 特别是一些对直接置于玻璃化液中十分敏感的热带植物, 更有利于超低温保存后植物材料的存活。预培养促使材料初步脱水减少细胞中的自由水含量, 提高细胞脱水耐受性和渗透压, 减少超低温保存过程中冰晶的产生和装载过程中 PVS₂ 溶液的毒害。细胞溶液在超低温保存过程中向玻璃化状态的转化是影响生物材料冷冻存活的重要因素^[16], 置于液氮中的时间则不影响材料的存活率。在高山红景天超低温保存过程中,

用 1 mmol/L 蔗糖 MS 预培养基效果最好^[17]。从马铃薯小滴玻璃化法超低温保存的研究中得出, 预培养中用 0.3、0.5 mmol/L 蔗糖的 MS 液体培养基对马铃薯茎尖进行梯度脱水 1 d 后, 茎尖的存活率和再生率最高^[18]。罗汉果茎尖小滴玻璃化法超低温保存使用含 0.7 mmol/L 蔗糖的 MS 培养基预处理 1 d 效果更佳^[19]。本研究结果表明, 红掌腋芽小滴玻璃化法超低温保存需要进行预培养, 使用含 0.4 mmol/L 蔗糖和 2 mmol/L 甘油的 MS 固体培养基培养 4 d, 红掌 PC 腋芽的存活率最高。培养时间延长后, 腋芽的存活率反而下降, 这可能与红掌对高浓度蔗糖和甘油的耐性有关。

不同的低温保存方法在技术细节上有所不同。然而, 大多数都需要使用化学物质保护——低温保护剂。低温保护剂相互作用, 改变细胞内外的水分布, 使细胞脱水^[20]。这些物质增加了质膜的稳定性或完整性, 降低了冰点, 增加了细胞质的黏度, 同时在整个冷冻过程中保护细胞不受伤害, 是保证植物超低温保存材料存活的关键。一般将不穿透细胞的低温保护剂 (蔗糖和其他碳水化合物) 和穿透细胞的低温保护剂 (二甲基亚砜、乙二醇、甘油等) 以不同比例组成 PVS、PVS₂、

PVS₃ 等溶液^[21]。PVS₂ 中的二甲基亚砜是常用的渗透剂,但其毒性是完全发挥低温保护潜力的根本障碍^[22]。因此,在超低温保存过程中,确定所使用的低温保护剂的最佳浓度和暴露时间是至关重要的。本研究采用 80% PVS₂ 装载液在 0 °C 装载 50 min,效果最好。而月季茎尖的超低温保存以 60% PVS₂ 装载 30 min 存活率最高^[23],罗汉果小滴玻璃化法的最佳处理是 60% 装载液于 25 °C 处理 30 min^[19]。

尽管近年来植物种质资源超低温保存研究取得了显著进展,但对于不耐低温和脱水敏感的热带植物的超低温保存研究还较少,目前报道的超低温保存热带植物的种类少,存活率极低^[24-26],还有大量热带作物的超低温保存技术尚未开展研究。以无性繁殖植物为主的热带植物,对超低温保存技术的需求日益增加。国外关于红掌的组织培养始于 20 世纪 70 年代末,国内兴起较晚,始于 20 世纪 90 年代,近几年关于红掌组织培养的报道越来越多^[27]。本研究探索红掌超低温保存小滴玻璃化法的处理程序,结果表明,红掌 PC 腋芽放于含 0.4 mmol/L 蔗糖和 2 mmol/L 甘油的 MS 固体培养基中预培养 4 d 后,在 0 °C 下 80% PVS₂ 溶液中装载 50 min,然后转到铝箔条上 PVS₂ 液滴中,将铝箔条迅速浸入液氮中 2 s 后直接转入装满液氮的冻存管中,投入液氮至少保持 30 min;室温下用含有 1.2 mmol/L 蔗糖的 MS 液体培养基复温,并卸载 20 min 后置于恢复培养基上,腋芽存活率高且遗传稳定性好。本研究结果为建立红掌小滴玻璃化超低温保存体系奠定基础,为红掌种质资源研究提供参考,对红掌超低温种质资源基因库的建立和其他热带草本植物的超低温保存具有重要的理论和实践意义。

参考文献

- [1] 华新. 2019 年全国花卉产销形势分析报告[J]. 中国花卉园艺, 2019(12): 7.
HUA X. Analysis report on the national flower production and sales situation in 2019[J]. China Flowers & Horticulture, 2019(12): 7. (in Chinese)
- [2] 户帅雅, 李斌奇, 陈孝丑, 巫伟峰, 张毅智, 陈春, 陈发兴. 红掌遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 福建农业学报, 2020, 35(1): 20-27.
HU S Y, LI B Q, CHEN X C, WU W F, ZHANG Y Z, CHEN C, CHEN F X. ISSR analysis on genetic diversity and relationships among *Anthurium andraeanum*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2020, 35(1): 20-27. (in Chinese)
- [3] 辛伟杰, 徐彬, 王广东, 郭维明, 文方德, 金剑平. 花烛体细胞胚胎发生及植株再生研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1281-1286.
XIN W J, XU B, WANG G D, GUO W M, WEN F D, JIN J P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(6): 1281-1286. (in Chinese)
- [4] ENGELMANN F. Plant cryopreservation: progress and prospects[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2004, 40(5): 427-433.
- [5] PENCE V C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2011, 47(1): 176-187.
- [6] LEUNUFNA S, KELLER E R J. Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: effects of cold acclimation and sucrose[J]. Cryoletters, 2005(2): 387-392.
- [7] PANIS B, PIETTE B, SWENNEN R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*[J]. Plant Science, 2005, 168(1): 45-55.
- [8] WANG M R, LAMBARDI M, ENGELMANN F, PATHIRANA R, PANIS, B, VOLK G M, WANG Q C. Advances in cryopreservation of *in vitro*-derived propagules: technologies and explant sources[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020(1): 1-14.
- [9] SOUZA F V, KAYA E, VIEIRA L D, KAYA E, VIEIRA L D J, SOUZA E H D, AMORIM V B D O, SKOGERBOE D, MATSUMOTO T, ALVES A A C, LEDO C A D S, JENDEREK M M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2016, 124(2): 351-360.
- [10] BARRACO G, SYLVESTRE I, ENGELMANN F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(1): 320-324.
- [11] 王更亮. 花烛玻璃化超低温保存及相关生理生化和组织学特征[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
WANG G L. The cryopreservation of *Anthurium* by vitrification and their physiological and histological characteristic[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [12] NI J, COLOWIT P M, MACKILL D J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers[J]. Crop Science, 2002, 42(2): 601-607.
- [13] TAKAGI H, ENGELMANN F, TAKAGI H. Recent devel-

- opments in cryopreservation of shoot apices of tropical species[C]//Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress & Application an International Workshop, 2000.
- [14] VILLALOBOS V M, ENGELMANN F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1995, 11(4): 375.
- [15] POPOVA E, SHUKLA M, KIM H H, SAXENA P. K. Plant cryopreservation for biotechnology and breeding[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2015: 540-742.
- [16] FUJIKAWA S, JITSUYAMA Y, ENGELMANN F, TAKAGI H. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification[J]. Letters in Biotechnology, 2000, 50(5): 363-367.
- [17] 刘剑锋, 程云清, 秦小伟. 高山红景天茎尖的包埋玻璃化超低温保存研究[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2009(3): 67-71.
LIU J F, CHENG Y Q, QIN X W. Cryopreservation of shoot tips of *Rh. sachalinensis* by encapsulation-vitrification[J]. Jilin Normal University Journal (Natural Science Edition), 2009(3): 67-71. (in Chinese)
- [18] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 郭华春, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍. 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.
BAI J M, CHEN X L, LU X X, GUO H C, XIN X, ZHANG Z E, XIN P P. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of potato by droplet vitrification and genetic stability of regenerated plantlets[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(9): 1431-1438. (in Chinese)
- [19] 李泳. 罗汉果茎尖小滴玻璃化法超低温保存及其遗传稳定性研究[D]. 广西: 广西师范大学, 2014.
LI Y. Studies on cryopreservation of *Siraitia grosvenorii* shoot-tips by droplet-vitrification and its genetic stability[D]. Guangxi: Guangxi Normal University, 2014. (in Chinese)
- [20] SHU Z, HUGHES S M, FANG C, HUANG J, FU B, ZHAO G, FIALKOW M, LENTZ G, HLADIK F, GAO D. A study of the osmotic characteristics, water permeability, and cryoprotectant permeability of human vaginal immune cells[J]. Cryobiology, 2016, 72(2): 93-99.
- [21] MARTÍNEZ-PÁRAMO S, HORVÁTH Á, LABBÉ C, ZHANG T T, ROBLES V, HERRÁEZ P, SUQUET M, ADAMS S, VIVEIROS A, TIERSCH K T R. Cryobanking of aquatic species[J]. Aquaculture, 2017, 472: 156-177.
- [22] FAHY G M, LILLEY T H, LINSDELL H, DOUGLAS M S J, MERYMAN H T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms[J]. Cryobiology, 1989, 26(6): 537.
- [23] 王秋竹, 林丽华, 董文轩. 月季茎尖玻璃化法超低温保存技术研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(2): 156-159.
WANG Q Z, LIN L H, DONG W X. Cryopreservation of rose *in vitro* shoot tips rose by vitrification[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2009, 40(2): 156-159. (in Chinese)
- [24] CHUA S P, NORMAH M N. Effect of preculture, PVS2 and vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan*-ake shoot tips after cryopreservation by vitrification[J]. Cryo Letters, 2011, 32(6): 506-515.
- [25] GONZALEZ-ARNAO M T, LAZARO-VALLEJO C E, ENGELMANN F, GAMEZ-PASTRANA R, MARTINEZ-OCAMPO Y M, PASTELIN-SOLANO M C, DIAZ-RAMOS C. Multiplication and cryopreservation of *Vanilla (Vanilla planifolia 'Andrews')*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2009, 45(5): 574-582.
- [26] 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.
- [27] 刘慧春. 红掌‘阿拉巴马’低温相关基因 *AOX*、*CAT* 和 *APX* 的表达分析、功能验证及遗传转化体系的构建[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
LIU H C. Expression analysis and functional identification of low-temperature-related genes *AOX*, *CAT* and *APX* in *Anthurium andraeanum* ‘alabama’ and construction of genetic transformation system[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012. (in Chinese)