

马铃薯茎尖超低温保存流程 TTC 活力响应

张海晶^{1,2}, 张金梅², 辛霞², 尹广鹏², 何娟娟², 卢新雄², 周元昌¹, 陈晓玲²

(¹福建农林大学, 福州 350002; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:以马铃薯栽培种呼自 83-213 无菌试管苗茎尖为材料, 通过开展 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC, 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride) 茎尖活力染色关键因素研究, 优化了马铃薯茎尖 TTC 活力染色条件, 确定了适合的染色温度为 40 °C, 染色时间为 2 h。利用优化的 TTC 活力染色条件, 对马铃薯茎尖小滴玻璃化超低温保存关键步骤处理茎尖进行 TTC 活力观察。研究发现: 经蔗糖预培养 (MS 培养液添加 0.3 mol/L 和 0.5 mol/L 蔗糖) 的茎尖与新鲜茎尖均保持高活力; 经 PVS2 处理后茎尖表现时空特异性活力丧失和存活, 分生组织和叶原基中间区域仍保持较高活力。通过对茎尖 TTC 活力染色面积测定, 发现当茎尖 TTC 活力染色面积比 ≥ 0.4 时, TTC 活力染色与恢复培养存活率呈极显著正相关。

关键词: 马铃薯; 试管苗茎尖; 小滴玻璃化超低温保存; TTC 活力染色

Study on Potato Shoot Tips Vitality Responses during Cryopreservation by TTC Staining Method

ZHANG Hai-jing^{1,2}, ZHANG Jin-mei², XIN Xia², YIN Guang-kun²,
HE Juan-juan², LU Xin-xiong², ZHOU Yuan-chang¹, CHEN Xiao-ling²

(¹ Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: TTC (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride) vitality staining conditions for potato shoot tips of Hu-zi83-213 cultivar were optimized in this study. The optimal staining temperature and duration were determined as 40 °C and 2 h, respectively. The viability of potato shoot tips was investigated during droplet – vitrification cryopreservation by TTC staining under the optimal conditions. The fresh shoot tips and precutured (Murashige and Skoog liquid medium with 0.3 mol/L and 0.5 mol/L sucrose) shoot tips showed high vitality. However, after cryoprotection with plant vitrification solution No. 2 (PVS2 solution), the shoot tips had the temporal and spatial specificity of vitality loss and survival, and the inner meristem and the middle part of the leaf primordium kept high vitalities. The results between TTC staining vitality and survival percentages after recovery showed extremely significant positive correlation when the area ratio of the red – stained shoot tips was higher than 0.4.

Key words: potato; shoot tips; droplet – vitrification cryopreservation; TTC staining

马铃薯种质资源安全保存是马铃薯种质有效利用、新基因挖掘、优异品种选育等产业发展的物质基础。目前, 马铃薯种质采取多种形式保存, 包括田间圃位保存、试管苗保存、超低温保存等。田间圃位保存是进行种质保存、遗传完整性检测以及提供服务

利用最为有效的方式^[1]。但田间种质圃占地面积大, 耗费大量人力、物力。繁殖数代后, 还可能导品种退化^[2]。试管苗保存是主要的马铃薯离体保存形式, 国际马铃薯中心 (CIP, international potato center) 试管苗库保存 10500 份马铃薯种质^[3]; 德国

收稿日期: 2015-02-05 修回日期: 2015-03-26 网络出版日期: 2015-04-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150422.0823.006.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201256); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助 (2014JB02-002); 农业部作物种质资源保护与利用专项项目资助 (2014NWB030-11); 中国农业科学院科技创新工程/作物种质资源保护与共享团队

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: yrjswp@163.com; 张金梅为共同第一作者

通信作者: 周元昌, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: zwy_2002@163.com

陈晓玲, 研究方向为作物种质资源保存。E-mail: chenxiaoling@caas.cn

莱布尼茨植物遗传和作物研究所(IPK, leibniz institute of plant genetics and crop plant research) 试管苗库保存 2745 份种质^[4]。我国国家马铃薯试管苗库(克山)保存 11 个种的 1800 余份种质^[5]。试管苗保存与田间圃位保存相比,具有需要空间小,可有效避免多种病原菌的侵染和自然灾害等优点。但由于频繁的继代培养,易受微生物污染和人为错误损失,且不够经济。超低温保存,即将植物细胞、组织或器官等材料保存在 $-135 \sim -196$ °C 液氮或其蒸汽相中,被认为是一种安全、经济、有效的适用于无性繁殖作物和顽拗性种子作物长期安全保存的方法^[6]。在超低温保存条件下,细胞的新陈代谢活动基本停止,处于相对稳定的生物学状态,但仍可保持活力、形态发生潜能和遗传稳定性^[7]。近 30 年来,随着超低温保存技术的不断发展,已有 200 余种植物用于超低温保存研究实践^[8-9]。

马铃薯种质超低温保存,一般以试管苗茎尖为外植体材料,采用玻璃化法^[10-11]、包埋玻璃化法^[11-12]、包埋干燥法^[13-14]、DMSO 滴冻法^[15-16]和小滴玻璃化法^[17-21]等进行超低温保存。据报道,德国 IPK 采用 DMSO 滴冻法超低温保存马铃薯茎尖 1119 份^[15,22],国际马铃薯中心采用玻璃化法和小滴玻璃化法超低温保存马铃薯茎尖 446 份^[23-25],韩国国家农业生物多样性中心(NAC, national agrobiodiversity center)利用小滴玻璃化法超低温保存马铃薯茎尖 90 份等^[26]。我国学者主要开展了玻璃化^[2,5,10,27]和小滴玻璃化^[20,28]超低温保存技术体系研究,并利用酯酶同工酶^[5]、相关序列扩增多态性(SRAP)^[2]、简单重复序列(SSR)^[10,29]、简单重复序列区间(ISSR)^[28]、扩增片段长度多态性(AFLP)^[30]、甲基化敏感扩增多态性(MSAP)^[30]等标记进行遗传稳定性检测,同时还建立优化了茎尖超低温脱毒技术体系^[28-29]。超低温保存机理研究方面,A. Kaczmarczyk^[16]和 B. Wang 等^[31]从生理生化、组织学、超微结构等方面开展研究。A. Kaczmarczyk^[16]发现经变温预培养处理后超低温保存的马铃薯茎尖中可溶性糖的含量上升,部分品种茎尖中天冬氨酸含量明显增加;不同品种中表现出上调和下调的蛋白点不同;显微结构观察发现 DMSO 滴冻法超低温保存的马铃薯茎尖顶端分生组织和叶原基处的细胞受损严重,只有少数细胞存活。B. Wang 等^[31]学者采用石蜡切片技术开展了基于玻璃化的 3 种超低温保存方法的比较研究,还通过转基因方法验证了 *AiGRI* 基因和 *AiDHAR1* 基因的过表达对提高超低温保存再生率的影响^[32]。

超低温保存后存活再生检测,主要采用恢复培养和活力染色。恢复培养所需时间一般较长,在适宜培养基、光照和温度条件下,约需 14 ~ 28 d 或更长时间。活力染色,如氯化三甲基四氮唑(TTC)活力染色方法,已被用于种子和根系活性的快速检测^[33-37]及茎尖、花粉、愈伤组织和悬浮细胞等离体组织器官超低温保存后活性检测^[38-41]。一般仅需 1 ~ 5 h 或 10 ~ 30 h。因此,在进行活力测定时,TTC 染色与恢复培养相比较具有快速的优点,但应用时存在一些问题,一是影响 TTC 活力染色的因素很多,如 TTC 浓度、pH 值、温度、时间、实验材料、处理方式等。不同植物茎尖 TTC 活力染色条件有较大差异,如超低温保存后月季茎尖采用 0.4% TTC 染液 37 °C 染色 1 h^[42]、大花蕙兰茎尖采用 0.1% TTC 染液 25 °C 染色 24 h^[43]、百合茎尖采用 0.5% TTC 染液 37 °C 染色 2 h^[44]、泡桐茎尖采用 0.6% 的 TTC 染液 30 °C 染色 15 h^[45]等。二是超低温保存处理后茎尖由于受到一定程度的胁迫伤害,茎尖出现时空特异性存活,在进行 TTC 活力染色时,可能会由于人为判断的误差,导致 TTC 活力染色结果仅能粗略指征超低温保存规律,精准确度较低。

本研究以马铃薯试管苗茎尖为材料,参照以往文献中 TTC 活力染色关键影响因素^[43-44,46-47],优化马铃薯茎尖 TTC 活力染色条件,并对马铃薯茎尖小滴玻璃化超低温保存^[26]过程中的茎尖进行 TTC 活力检测,观察其染色区域及范围,为马铃薯茎尖超低温保存技术的快速优化和超低温保存机理研究提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究以保存于中国农业科学院国家种质库试管苗库的马铃薯呼自 83-213 品种无菌试管苗为材料。试管苗在添加 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂的 MS 培养基(美国 Phyto Technology Laboratories, LLCTM, M519)中培养,每 30 d 继代 1 次。培养基 pH 5.8, 121 °C 高压灭菌 20 min。培养温度 18 ± 1 °C,光照 16 h/d,光照强度为 50 $\mu\text{E}/\text{sm}$ 。光源采用冷白色荧光灯管。

1.2 方 法

1.2.1 马铃薯茎尖超低温保存方法 采用改良的白建明等^[20]研究的马铃薯茎尖小滴玻璃化超低温保存方法,具体技术流程如下。(1)获取茎尖:选取继代 30 d 左右的马铃薯试管苗,在无菌条件下,利用双目解剖镜(中国,重庆, SZ660T2L)剥取大小约为 1 ~ 2 mm 的茎尖,先后在含有 0.3 mol/L 和

0.5 mol/L 蔗糖的 MS 液体培养基中室温避光预培养各 1 d。(2) 渗透保护:在 0 °C 下,用玻璃化溶液 PVS2^[48] [30% (w/v) 甘油 + 15% (w/v) 乙二醇 + 15% (w/v) 二甲基亚砷 + 0.4 mol/L 蔗糖] 分别处理 30 min 和 60 min。(3) 液氮保存:用移液器分别吸取 4 滴新鲜 PVS2 玻璃化液(每滴 20 μL)滴到 0.8 cm × 3.5 cm 大小的铝箔条上,将渗透保护脱水后的茎尖转移至铝箔条上的小滴中。将粘有茎尖的铝箔条在液氮里蘸一下,然后直接装入盛满液氮的冷冻管中,投入液氮保存。(4) 化冻:在室温下从冷冻管中取出铝箔条,并迅速浸入含 1.2 mol/L 蔗糖的液体 MS 溶液中卸载洗涤 20 min。

为了与超低温保存过程中 TTC 活力染色实验进行比较分析,本研究将以下样品分别进行恢复培养,包括:(1) 新鲜茎尖;(2) 经蔗糖预培养茎尖;(3) 经蔗糖预培养和 PVS2 处理 30 min 茎尖;(4) 经蔗糖预培养和 PVS2 处理 60 min 茎尖;(5) 经蔗糖预培养和 PVS2 处理 30 min,投液氮后化冻茎尖;(6) 经蔗糖预培养和 PVS2 处理 60 min 投液氮后化冻茎尖。将以上样品茎尖分别转移至 MS + 50 μg/L Zeatin + 300 μg/L IAA + 50 μg/L GA₃ 固体培养基中进行恢复培养。先于室温黑暗培养 7 d,后于微光培养 7 d,最后正常光照培养。

1.2.2 马铃薯茎尖 TTC 活力染色条件优化 在对马铃薯茎尖 TTC 活力染色温度和染色时间等条件进行优化时,以不经处理的新鲜马铃薯试管苗茎尖为材料,采用 3 因素 4 水平试验,研究获得最佳活力染色条件。选取苗龄为 30 d 左右的健康马铃薯试管苗,剥取 1 ~ 2 mm 的新鲜茎尖,置于 0.5% TTC-0.1 M 磷酸缓冲液(pH 7.0),在 30 °C、40 °C 和 50 °C 水浴中分别染色 1 h、2 h、3 h 和 5 h。染色后用蒸馏水洗涤 3 ~ 5 次,体视显微镜成像系统(日本,OLYMPUS, SZ × 16)照相观察。

1.2.3 马铃薯茎尖超低温保存过程中 TTC 活力染色 为了观察小滴玻璃化法超低温保存过程马铃薯茎尖 TTC 活力染色情况,利用优化的 TTC 染色条件对以下茎尖(材料同 1.2.1 中的恢复培养的 6 种茎尖)进行活力染色,染色后用蒸馏水洗涤 3 ~ 5 次,体视显微镜成像系统(日本,OLYMPUS, SZ × 16)拍照观察。

马铃薯茎尖 TTC 活力染色结果统计方法如下。在体视显微镜下,利用 Cell Sens Standard(日本, Olympus) 等软件,手动选定染红面积和茎尖总面积,通过染红面积/茎尖总面积进行活力染色面积比计算,并将活力染色面积比进行等级划分,分为 0 ~ 0.2(含 0 和 0.2)、

0.2 ~ 0.4(含 0.4)、0.4 ~ 0.6(含 0.6)、0.6 ~ 0.8(含 0.8)、0.8 ~ 1.0(含 1.0),共 5 个等级。茎尖 TTC 活力染色与茎尖恢复培养结果相关性分析利用 SPSSW Statistics 18 软件(<http://www.spss.com/>)进行。

1.2.4 数据分析 所有试验每个处理 3 次重复,每次重复 10 ~ 20 个茎尖。利用 SPSSW Statistics 18 软件(<http://www.spss.com/>)进行数据差异显著性分析,利用 GraphPad Prism 5 软件(<http://www.graphpad.com/>)作图。

2 结果与分析

2.1 马铃薯茎尖 TTC 活力染色条件优化

本研究结果发现,不同的染色温度和染色时间对马铃薯新鲜茎尖的染色具有显著影响,且染色时间和染色温度之间存在交互作用(表 1)。

表 1 不同染色温度和时间对 TTC 活力染色方差分析

Table 1 Variance analysis of the staining temperature and time on the TTC vitality staining

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	F 值 F	显著性 Significance
染色时间	1.664	3	134.274	*
染色温度	2.051	2	248.220	*
染色时间 & 染色温度	0.849	6	34.264	*
误差	0.099	24		

* 表示在 0.05 水平上差异显著

* indicates significant difference at 0.05 level

由图 1 可知,在 50 °C 染色条件下,不论染色时间长短(1 ~ 5 h),茎尖整体被染为红色的全染率较低(<40%),且着色较浅。30 °C 染色条件下,随着染色时间延长,茎尖整体被染为红色的全染率从染色 1 h 的 0,增加至染色 5 h 时的 90%。40 °C 染色条件下,染色 1 h 茎尖全染率为 40% 左右,而 2 ~ 5 h 时全染率显著增加,均在 90% 以上,且相比于 30 °C 染色时着色较深。因此,优化获得马铃薯茎尖 TTC 染色适宜条件为 40 °C 染色 2 h。

2.2 马铃薯茎尖超低温保存过程 TTC 活力染色

利用优化获得的马铃薯茎尖 TTC 染色条件对超低温保存关键步骤的茎尖进行 TTC 活力染色。从图 2 可以看出,新鲜茎尖和经蔗糖预培养茎尖 TTC 活力染色全部为深红色;经 PVS2 处理后(30 min/60 min),大部分茎尖全部染为深红色,少数染成部分红色,且与新鲜和经蔗糖预培养茎尖相比,着色较浅;而经液氮超低温保存并化冻后茎尖,出现全红、部分红和未被染红 3 种状态。

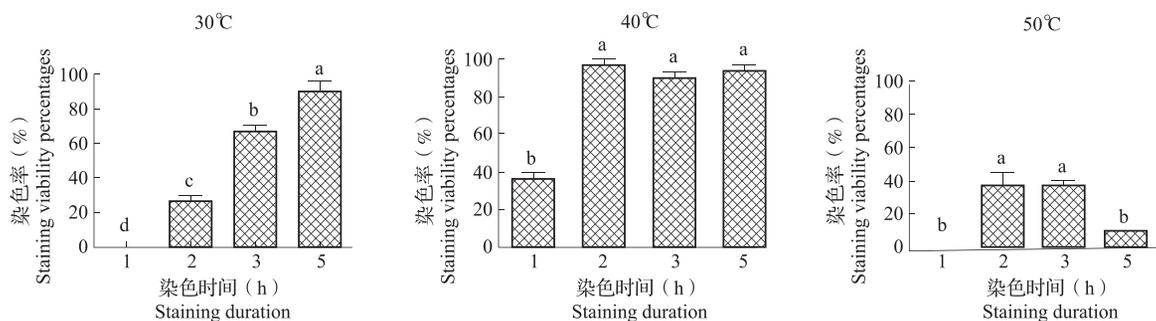


图 1 染色温度和时间对马铃薯新鲜茎尖 TTC 活力染色率的影响

Fig. 1 The effects of staining temperature and duration on TTC viality staining percentage of fresh potato shoot tips

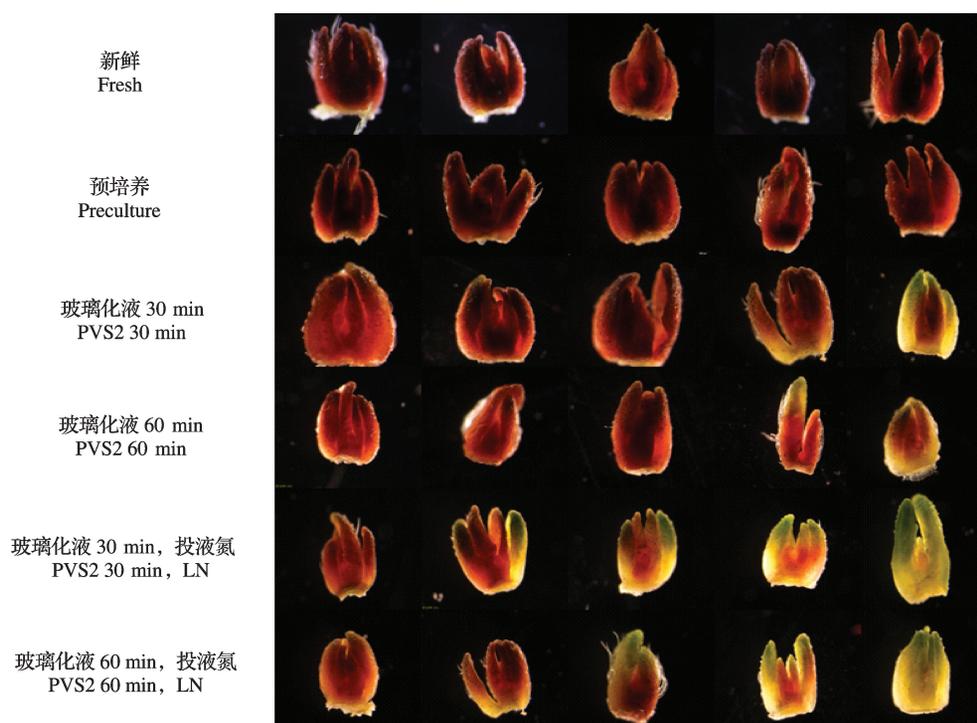


图 2 马铃薯茎尖小滴玻璃化超低温保存 TTC 活力染色

Fig. 2 Images of TTC stained potato shoot tips during droplet - vitrification cryopreservation

为了进一步对超低温保存过程中马铃薯茎尖 TTC 活力进行分析,本研究计算茎尖 TTC 活力染色面积比率,即茎尖染红面积/茎尖总面积,并进行分级。由图 3 可知,新鲜茎尖,TTC 活力染色全部为深红色,染色面积比为 0.8~1 的茎尖占总茎尖的 100%;经蔗糖预培养后的茎尖与新鲜茎尖活力染色相同;经 PVS2 处理 30 min 后,染色面积比为 0.8~1 的茎尖比例降低,为 64%,染色面积比为 0.4~0.8 的茎尖占 34%,染色面积比为 0~0.4 的茎尖占 2%;经 PVS2 处理 60 min 后,染色面积比为 0.8~1 的茎尖比率进一步降低,为 54%,染色面积比为 0.4~0.8 茎尖比率增加,为 42%,染色面积比为 0~0.4 的茎尖占 4%;经 PVS2 处理 30 min,投液氮保存并化冻后,染色面积比为 0.8~1 的茎尖仅占 25%,染色面积比为 0.4~0.8

的茎尖占 28%,染色面积比为 0~0.4 的茎尖占 47%;经 PVS2 处理 60 min,投液氮保存并化冻后,染色面积比为 0.8~1 的茎尖比率与经 PVS2 处理 30 min 投液氮保存并化冻后相同,为 25%,染色面积比为 0.4~0.8 的茎尖占总茎尖的 46%,染色面积比为 0~0.4 的茎尖占 29%。

马铃薯超低温保存关键步骤茎尖恢复培养结果表明,新鲜和蔗糖预处理茎尖恢复培养平均成活率均为 100%。经蔗糖预培养和 PVS2 处理 30 min 后,恢复培养平均成活率降为 91.67%。经蔗糖预培养和 PVS2 处理 60 min 后,恢复培养平均成活率降为 89.58%。PVS2 处理 30 min 或 60 min,投液氮化冻后,茎尖恢复培养平均成活率分别降至 43.75% 和 64.58% (图 4)。

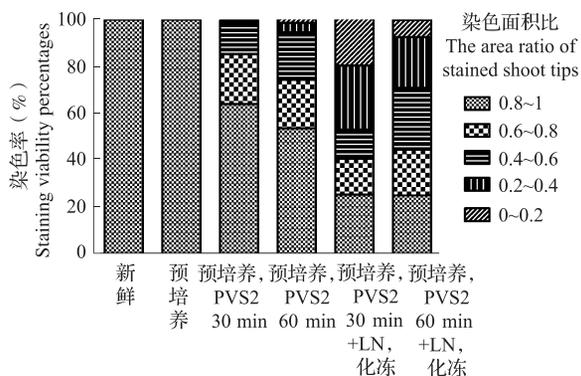


图3 马铃薯茎尖小滴玻璃化超低温保存关键步骤 TTC 活力染色率

Fig.3 TTC vitality staining percentage of potato shoot tips during droplet - vitrification cryopreservation

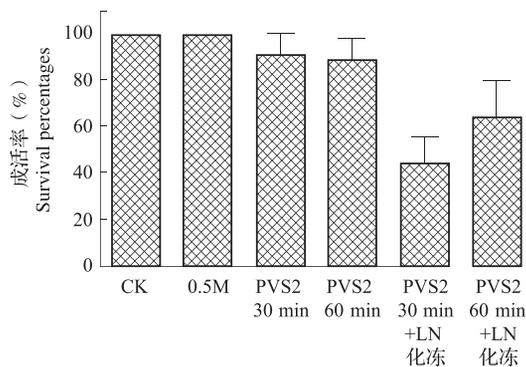


图4 小滴玻璃化超低温保存关键步骤马铃薯茎尖恢复培养成活率

Fig.4 Survival percentages of potato shoot tips after recovery during droplet - vitrificatin cryopreservation

相关性比较分析结果表明,当染色面积比 ≥ 0.4 时,茎尖 TTC 活力染色率与恢复培养成活率呈极显著正相关($P < 0.01$),且染色面积比 ≥ 0.45 的茎尖与液氮保存后存活率最为接近,TTC 活力染色面积集中在顶端分生组织和 1~2 叶原基的中间区域,且颜色较深。

3 讨论

TTC 染色法多用于种子和根系活力检测^[33-37]。R. J. Stein 等^[49]第 1 次描述其在植物组织培养上的应用,之后广泛应用于超低温保存后组织活力检测。TTC 是一种氧化还原色素,淡黄色的 TTC 粉末溶于水后为无色溶液,还原后即生成红色不溶于水的三苯基甲臜(TF, tetrazole red formazan)。TF 比较稳定,不会被空气中的氧自动氧化,所以 TTC 被广泛用作酶试验的氢受体。植物体内脱氢酶可以引起 TTC 还原,所以 TTC 还原量可表示脱氢酶活性^[50],进而表明检测样品的呼吸水平^[51]。但不同染色条件对染色结果存在显著性影响,本研究通过不同染色温度和时间对马铃薯新鲜茎尖 TTC 活力染色的影响试验,优化获得马铃薯茎尖超低温保存 TTC 染

色条件为 0.5% TTC - 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 40 °C 染色 2 h。温度过高、时间过长均有可能导致细胞死亡,影响 TTC 活力染色效果,该结果与闫芳等^[36]研究结果相一致。

利用优化的马铃薯茎尖 TTC 活力染色条件对小滴玻璃化超低温保存关键步骤茎尖进行染色,发现新鲜和蔗糖预培养处理的茎尖,TTC 活力染色面积比在 0.8~1 之间的茎尖占 100%。表明预培养对茎尖没有损伤或损伤较小。PVS2 处理 30~60 min 后,TTC 活力染色面积比为 0.8~1 的茎尖仅占 54%~64%。说明在投液氮前,PVS2 处理对茎尖活力有部分损伤。PVS2 等冷冻保护剂可将材料细胞中过多的自由水脱去,渗透性保护物质进入细胞,在超低温保存过程中达到玻璃化状态,避免形成大量细胞内冰晶而使分生组织细胞受到致命伤害是超低温保存成功的关键^[52-53]。B. Wang 等^[31]发现,预培养对马铃薯茎尖没有损伤,而经 PVS2 处理后,茎尖基部和较老叶原基的细胞死亡,顶端分生组织和幼嫩叶原基的细胞存活,PVS2 脱水是引起细胞损伤的关键步骤。本研究还发现,染色面积比 ≥ 0.4 的茎尖染色率与恢复培养后茎尖成活率呈极显著正相关($P < 0.01$),能够更加准确地判断茎尖的成活率。因此,当茎尖 TTC 活力染色面积比 ≥ 0.4 时,恢复培养后茎尖会存活。目前关于通过测定茎尖染色面积比的方式来提高 TTC 染色准确性的研究还未见报道。

本研究采用 TTC 染色,能简单快速地检测出超低温保存流程中茎尖的活力变化趋势,大大缩短了实验时间。同时可以直观地观察到茎尖在超低温保存过程中的存活和死亡区域,为马铃薯超低温保存机理研究奠定基础。对于超低温保存过程中马铃薯茎尖各部分细胞的内部形态和物质变化,如超低温保存过程中的水相状态变化,酶和蛋白的变化等机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] Schäfer - Menuhr A. Refinement of cryopreservation techniques for potato[M]. Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 1996: 1-41
- [2] 阮先乐. 马铃薯茎尖的超低温保存及再生植株的遗传稳定性分析[D]. 湖南: 湖南农业大学, 2008
- [3] Ellis D, Panta A, Vollmer R. The Evolving Cryobank[C]. Colorado: 2nd International symposium on plant cryopreservation, 2013: 46
- [4] Keller E R J, Senula A, Grube M, et al. Fifteen years of cryopreservation in the IPK genebank experience, conclusions and outlook[C]. Colorado: 2nd International Symposium on Plant Cryopreservation, 2014: 249-263
- [5] 宋继玲, 刘长臣, 孙邦升, 等. 基因库中马铃薯种质资源超低温保存技术研究[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(5): 268-270
- [6] 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
- [7] Kartha K K, Engelmann F. Cryopreservation and germplasm storage[M]//Vasil I K, Thorpe T A. Plant cell and tissue culture.

- Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994: 195-230
- [8] Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects [J]. *In Vitro Cellular Develop Biol Plant*, 2004, 40(5): 427-433
- [9] 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
- [10] 石茹, 王芳, 王舰. 马铃薯离体茎尖玻璃化法超低温保存 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(2): 272-277
- [11] Sallam A R, Abido A I, Gabr M F, et al. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *World Appl Sci J*, 2013, 26(9): 1185-1191
- [12] Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of in vitro - grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation - vitrification [J]. *Potato Res*, 1999 (42): 153-160
- [13] Bouafia S, Jelti N, Lairy G, et al. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation - dehydration [J]. *Potato Res*, 1996, 39: 69-78
- [14] Harding K, Benson E E. The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. in vitro plantlets derived from cryopreserved germplasm [J]. *CryoLetters*, 2001, 22: 199-208
- [15] Schäfer - Menuhr A, Schumacher H M, Mix - Wagner G. Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff [J]. *Landbauforschung Völkenrode*, 1994, 44: 301-313
- [16] Kaczmarczyk A. Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips [D]. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität, 2008
- [17] Kim H H, Yoon J W, Park Y E, et al. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification [J]. *CryoLetters*, 2006, 27: 223-234
- [18] Yoon J W, Kim H H, Ko H C, et al. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother - plants and of preculture of shoot tips [J]. *CryoLetters*, 2006, 27: 211-222
- [19] Panta A, Panis B, Sanchez D, et al. Improved potato cryopreservation based on the identification of biochemical cell compounds linked to response to abiotic stress [C]. Leuven: 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, 2009: 16
- [20] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 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
- [21] Wang B, Wang R R, Li J W, et al. Development of three vitrification - based cryopreservation procedures of shoot tips for China's potato [J]. *CryoLetters*, 2013, 34: 369-380
- [22] Kaczmarczyk A, Grübe M, Keller E R J. History and development of the potato cryopreservation method and the cryopreserved collection at the IPK Gatersleben [C]. Gatersleben: Meeting of the WG2, COST Action 871 'Cryopreservation of Crop Species in Europe', 2009: 37
- [23] Golmirzaie A M, Panta A, Delgado C. Structural observations on potato shoot - tips after thawing from liquid nitrogen [M]//Engelmann F, Takagi H. Cryopreservation of tropical plant germplasm Current research progress and application. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 2000: 388-389
- [24] Gonzalez - Arnao M T, Panta A, Roca W M, et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2008, 92: 1-13
- [25] Steponkus P L, Langis R, Fujikawa S. Cryopreservation of plant tissues by vitrification [J]. *Adv Low Temp Biol*, 1992, 1: 1-16
- [26] Kim H H, Yoon J W, Park Y E, et al. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification [J]. *Cryo Letters*, 2006, 27: 223-234
- [27] 马艳丽, 王彪, 冯豹, 等. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 茎尖超低温保存的研究 [J]. *现代园艺*, 2013(12): 6-7
- [28] 王彪. 马铃薯茎尖超低温保存及超低温疗法脱毒技术体系的建立 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2011
- [29] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 超低温保存法去除马铃薯 X 病毒和马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. *分子植物育种*, 2010, 8(3): 605-611
- [30] 曲先, 王子成. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 茎尖的超低温保存及其遗传变异的初步观察 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46(1): 11-16
- [31] Wang B, Li J W, Zhang Z B, et al. Three vitrification - based cryopreservation procedures cause different cryo - injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants [J]. *J Biotechnol*, 2014, 184: 47-55
- [32] Wang B, Li J W, Wang Q C, et al. *AtGRI* and *AtDHARI* over - expression in transgenic plants enhances recovery of cryopreserved shoot tips of potato (*Solanum tuberosum*) [C]. Colorado: 2nd International Symposium on Plant Cryopreservation, 2013, 1039: 91-95
- [33] 李淑梅, 孙君艳, 董丽平, 等. 45℃ 人工加速老化对不同品种小麦种子生理生化特性的影响 [J]. *吉林农业科学*, 2013, 38(1): 12-14
- [34] 吴君, 李因刚, 罗修宝, 等. 白花树种子生物学特性 [J]. *浙江农林大学学报*, 2014, 31(1): 9-13
- [35] 宋超, 王跃华, 孙燕霞, 等. 山葵种子的活力测定研究 [J]. *种子*, 2014, 33(1): 108-110
- [36] 闫芳, 毛著鸿, 王勤礼, 等. 黄瑞香种子生活力测定技术研究 [J]. *草地科学*, 2014, 22(1): 145-149
- [37] 张天铜, 陈垣, 郭凤霞, 等. 不同播种量对甘肃礼县掌叶大黄育苗质量的影响 [J]. *草业学报*, 2013, 22(4): 99-105
- [38] 陈志林. 木薯种质超低温保存及其再生植株遗传稳定性的研究 [D]. 海南: 华南热带农业大学, 2007
- [39] 王更亮. 花烛玻璃化法超低温保存及相关生理生化与组织学特征 [D]. 江苏: 南京农业大学, 2009
- [40] Khoddamzadeh A A, Sinniah U R, Lynch P, et al. Cryopreservation of protocorm - like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rehb. f.) Christenson by encapsulation - dehydration [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2011, 107(3): 471-481
- [41] 杨永智. 马铃薯花粉生活力测定及低温贮藏研究 [J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(3): 69-71
- [42] 刘芊. 中国古老月季离体保存技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2011
- [43] 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 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008
- [44] 王金录, 铃泰琳, 赵美爱. 青岛百合包埋 - 玻璃化法超低温保存技术研究 [J]. *北方园艺*, 2011, (18): 135-139
- [45] 翟晓巧, 程斐, 张晓申. 豫杂一号泡桐茎尖的玻璃化法超低温保存方法研究 [J]. *西部林业科学*, 2011, 40(3): 1-5
- [46] 冯军, 董琳, 付雪艳, 等. 宁夏产药材小茴香种子 TTC 活力测定 [J]. *科协论坛*, 2007, 22(8): 35-38
- [47] 王跃华, 刘益丽, 马良良, 等. TTC - 脱氢酶还原法测定滇重楼细胞活力优化条件筛选 [J]. *成都大学学报: 自然科学版*, 2011, 30(1): 1-3
- [48] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cell of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 9: 30-33
- [49] Stein R J, Gerarde H W. Triphenyl tetrazolium chloride in tissue culture [J]. *Science*, 1950, 111: 691
- [50] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化试验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 119
- [51] Whithers L A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts [M]//Vasil J K. Cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation. Florida: Academic Press Inc, 1985: 253-316
- [52] Sakai A, Engelmann F. Vitrification, encapsulation - vitrification and droplet - vitrification: a review [J]. *Cryo Letters*, 2007, 28: 151-172
- [53] Reed B M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide [M]. Berlin: Springer, 2008