

扁桃小滴玻璃化超低温保存研究

姜喜^{1,2,3}, 赵书珍¹, 党艳青¹, 张琦^{1,3}, 焦培培², 庞新安², 陈家力^{1*}

(¹塔里木大学植物科学学院, 新疆阿拉尔 843300; ²新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; ³南疆特色果树高效优质栽培与深加工技术国家地方联合工程实验室, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:【目的】以扁桃休眠茎尖为试材, 探讨小滴玻璃化法对扁桃离体超低温保存的影响, 为扁桃种质资源的长期保存提供有效途径。【方法】采用小滴玻璃化法, 通过正交设计试验和单因素试验对预培养蔗糖浓度、预培养时间、装载时间和PVS₂[30%(ω, 后同)甘油+15%二甲亚砷+15%乙二醇+0.4 mol·L⁻¹蔗糖]脱水处理时间这4个因素影响扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率的情况进行分析。【结果】预培养时间对扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率的影响极显著($P < 0.01$), 而预培养蔗糖浓度、装载时间和PVS₂处理时间的影响不显著。建立了以‘莎车14号’为代表的扁桃茎尖小滴玻璃化法超低温保存体系, 最佳处理方案是: 用0.5 mol·L⁻¹预培养蔗糖液处理2 d, 装载液处理20 min, PVS₂脱水处理120 min, 放入含新鲜PVS₂小滴的铝箔纸上投入液氮24 h后, 浸入用40℃温水预热过的洗涤液(1.2 mol·L⁻¹蔗糖的MS)中30 s, 然后再将休眠茎尖转入新鲜的洗涤液中洗涤30 min。恢复后接种在MS+0.3 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹IAA+0.3 mg·L⁻¹GA₃培养基上, 扁桃成活率达80.44%。运用优化的方案对‘莎车1号’‘莎车11号’和‘莎车18号’3个扁桃品种进行超低温保存, 平均成活率分别为87.41%、85.44%和83.02%。【结论】利用小滴玻璃化法可提高扁桃超低温保存成活率, 建立了适合扁桃休眠芽超低温保存技术方法, 为扁桃种质资源的长期保存提供理论和实践借鉴。

关键词: 扁桃; 超低温保存; 小滴玻璃化; 休眠茎尖

中图分类号: S662.9

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)03-0367-09

A study on the cryopreservation of almond buds by droplet-vitrification

JIANG Xi^{1,2,3}, ZHAO Shuzhen¹, DANG Yanqing¹, ZHANG Qi^{1,3}, JIAO Peipei², PANG Xin'an², CHEN Jiali^{1*}

(¹College of Plant Science, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China; ²Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar 843300, Xinjiang, China; ³The National and Local Joint Engineering Laboratory of High Efficiency and Superior-Quality Cultivation and Fruit Deep Processing Technology of Characteristic Fruit Trees in South Xinjiang, Alar 843300, Xinjiang, China)

Abstract: 【Objective】Almond (*Amygdalus communis* L.) is an important fruit tree in the world, and preservation of almond germplasm provides the basic materials for breeding of new varieties. This paper studied the cryopreservation of almond germplasm resources in order to provide a practical reference for preservation of almond germplasm resources in China. 【Methods】Dormant buds of almond sterilized with 70% alcohol for 10 s and then with 0.1% HgCl₂ for 7-8 minutes were used as the experimental materials, and an orthogonal design and single factor tests were used to evaluate the cryopreservation of dormant apical buds of almond by droplet vitrification. Factors including pre-culture sucrose concentration, pre-culture time, loading time and duration of exposure to PVS₂ were tested. The dormant buds were suspended in 10 mL of liquid MS medium supplemented with 0, 0.1, 0.3, 0.5 or 0.7 mol·L⁻¹ sucrose and pre-cultured in the dark at room temperature for 2 day. The dormant buds were excised and loaded for 0, 10, 20, 30 or 40 min at (24±2) °C in filtration-sterilized loading solution (LS) (2 mol·L⁻¹ glycerol and 0.4 mol·L⁻¹ sucrose dissolved in MS liquid medium). After loading, the buds

收稿日期: 2017-09-21 接受日期: 2017-12-11

基金项目: 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放项目(BRYB1504)

作者简介: 姜喜, 女, 高级实验师, 硕士, 研究方向为果树种质资源保存及果树栽培生理。Tel: 0997-4680312, E-mail: jiangxi4684225@126.com

com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: 99234902@qq.com

were treated for 0, 30, 60, 90, 120 or 150 min with filtration-sterilized PVS₂. At the end of the dehydration period, explants were transferred into 5 μ L droplets of vitrification solution attached to aluminum foil strips and rapidly immersed in LN for at least 24 h. For rewarming, the dormant buds were transferred to pre-heated (40 °C) unloading solution (filtration-sterilized liquid MS medium with 1.2 mol·L⁻¹ sucrose) for 30 s. After an equal volume of unloading solution (at room temperature) was added, the samples were incubated for a further 30 min. The buds were inoculated in MS liquid medium at different auxin concentrations, and the survival rate of almond was determined. 【Results】 Orthogonal test results showed that the effect of pre-culture time on the survival rate of dormant buds after cryopreservation was significant ($P < 0.01$), while the effects of pre-culture sucrose concentration, loading time and PVS₂ treatment time were not significant. The effects of the 4 factors on the survival rate of dormant buds after cryopreservation were pre-culture time > loading time > PVS₂ treatment time > pre-culture sucrose concentration. The method of cryopreservation of vitreous method was established. The optimal treatment regimen was: pre-culture in MS liquid medium containing 0.5 mol·L⁻¹ sucrose for 2 days, treatment for 20 min with the loading solution (MS +2 mol·L⁻¹ glycerol+0.4 mol·L⁻¹ sucrose), which was sucked out with a sterile plastic dropper. After loading, the dormant buds were treated with filtration-sterilized PVS₂ (30% glycerol, 15% dimethyl sulfoxide, 15% ethylene glycol and 0.4 mol·L⁻¹ sucrose in MS liquid medium) for 120 min under ice-water mixture at 0 °C. Then 10 droplets of PVS₂ each about 5 μ L were placed on a sterile aluminum foil strip of 1 cm × 2.5 cm. A dormant bud was placed into each of the droplet. The droplets with a dormant bud were quickly dipped in liquid nitrogen, and placed into a freezing tube filled with liquid nitrogen, and sealed with a cover. These freezing tubes were placed in a nylon yarn bag and placed in a liquid nitrogen tank. After storage in liquid nitrogen for 24 h, thawing was carried out at room temperature in a filtration-sterilized unloading solution (US) (1.2 mol·L⁻¹ sucrose dissolved in MS liquid medium) for 30 min. The solution remaining on the surface of the dormant bud was removed with sterilized absorbent paper. After thawing and unloading of the samples processed by droplet vitrification, the buds were inoculated in MS liquid medium with 0.3 mol·L⁻¹ sucrose and 7 g·L⁻¹ agar and at a pH of 5.8, and incubated in darkness for 72 h. The explants were then transferred to MS liquid medium with 0.3 mol·L⁻¹ sucrose, 0.3 mg·L⁻¹ BAP, 0.5 mg·L⁻¹ IAA, 0.3 mg·L⁻¹ GA₃ and 7 g·L⁻¹ agar at a pH of 5.8 and cultured at a 16-h photoperiod and 28 °C. After 30 days of culture, the survival rate of buds was 80.44%. The optimized program of cryopreservation used for the ‘Shache 1’ ‘Shache 11’ and ‘Shashe 18’ generated a survival rate of 87.41%, 85.44% and 83.02%, respectively. 【Conclusion】 The droplet vitrification method increased the survival rate of almond dormant buds after cryopreservation and proved to be viable for the long-term preservation of almond germplasm.

Key words: Almond; Dormant buds; Cryopreservation; Droplet vitrification

扁桃(*Amygdalus communi* L.)又名巴旦杏,商品名为“美国大杏仁”,是蔷薇科李亚科桃属扁桃亚属植物,是世界上著名的干果和木本油料树种^[1]。扁桃的果仁营养和药用价值很高,是不可多得的滋补佳品及明目、治疗肺炎、防治高血压等心血管疾病的重要药材^[2],在国内外市场上具有广阔的前景。我国扁桃的种植已有1 300 a(年)的历史,主要分布于

新疆喀什地区,其他地区尚未形成规模生产^[3]。据报道,全世界有扁桃品种4 000余个,我国自行培育和引进的品种有200多个,其中新疆约有90个^[4]。目前中国生产上主要品种有‘纸皮’‘双软’‘多果’‘鹰咀’‘晚丰’‘麻壳’‘克西’等^[5]。新疆喀什地区的莎车县和英吉沙县建立了扁桃品种资源圃,保存了34个扁桃品种类型^[6]。这些种和品种是进行扁桃遗传改良

的材料,随着扁桃生产日益市场化、专业化、规模化,其品种布局结构和生产方向越来越依赖于市场需求的变化,经过长期自然选择和人工选择的宝贵基因资源如不加以保存,就可能从自然界中消失。另外,扁桃优良品种全世界范围的融合与交流,能使扁桃产量得到较大幅度的提高,但是也会造成基因资源的流失。因此,扁桃种质资源的收集、保存、研究、评价工作任重而道远。

超低温保存是离体保存与低温生物学相结合的产物,是指 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的极低温度保存种质资源的一整套生物学技术^[7]。生物材料在超低温条件下,其活细胞内的新陈代谢和生长活动几乎完全停止,处于“生机停顿”的状态,因此能够有效保持生物材料的遗传稳定性,是一种不需要继代便可安全、长期保存植物种质的有效方法^[8-10]。关于扁桃的超低温保存技术已有报道^[11-13],采用了包埋玻璃化法超低温技术来保存扁桃茎尖,但成活率不到60%。为了提高扁桃超低温保存后的成活率,寻找一种可靠的超低温保存方法势在必行。自1982年Kartha等^[14]将木薯的茎尖置于玻璃化液滴中,再于程序化降温仪中逐步降温。小滴玻璃化是在此基础上并结合传统玻璃化法的主要程序,即用装载液及玻璃化液对材料进行处理,而后将材料放在含有玻璃化液滴的铝箔纸上并投入液氮冻存的一种高效超低温保存法,具有广适性、存活率和再生率高、处理量大、操作简单等优点^[15]。利用小滴玻璃化法已成功保存了红芽芋^[16]、牛大力^[17]、马铃薯^[18]、杧果^[19]、欧洲李^[20]等植物,但关于扁桃小滴玻璃化法超低温保存还未见报道。休眠芽是植物为适应不良环境而形成的一种保护器官,芽内积累着丰富的营养物质,在适宜的条件下很快就可萌芽分化,健壮生长^[21]。莎车扁桃属于优良遗传资源的栽培种,因此,采用小滴玻璃化法对莎车扁桃休眠茎尖进行超低温保存研究,通过正交设计试验和单因素试验对扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率的主要因素进行分析,旨在完善国内扁桃种质保存技术体系,为种类繁多的扁桃种质资源保存开辟一条新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为‘莎车14号’‘莎车1号’‘莎车11号’和‘莎车18号’扁桃休眠茎尖,均采自塔里木大

学园艺试验站。将采集好的休眠枝条带回实验室,清水冲洗0.5 h后,用蒸馏水冲洗3~4次,70%(φ)酒精消毒10 s,0.1%(ω) HgCl_2 消毒7~8 min,用无菌水冲洗3~4次,无菌条件下剥去外部鳞片至休眠茎尖为2 mm进行后续试验。

1.2 试验设计

1.2.1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计 以材料的预培养时间(A)、预培养蔗糖浓度(B)、装载时间(C)、 PVS_2 [30%(ω ,后同)甘油+15%二甲亚砷+15%乙二醇+0.4 mol·L⁻¹蔗糖]处理时间(D)作为4个试验因素,每个因素取3个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,具体设计见表1,每个处理3次重复,每个重复至少10个茎尖。

表1 $L_9(3^4)$ 因子水平
Table 1 $L_9(3^4)$ factor level table

水平 Level	预培养 时间(A) Pre-culture time (A)/d	预培养蔗糖 浓度(B) Pre-culture of sucrose concen- tration (B)/(mol·L ⁻¹)	装载 时间(C) Loading time (C)/ min	PVS_2 处理 时间(D) processing time (D)/min
1	1	0.3	20	70
2	2	0.4	30	90
3	3	0.5	40	120

1.2.2 休眠茎尖小滴玻璃化超低温保存单因素试验研究 在进行本步骤试验时,只变化单因子,其他处理按正交试验筛选出的最佳处理组合进行。

(1)预培养。将休眠茎尖放入含有0、0.1、0.3、0.5、0.7 mol·L⁻¹蔗糖的MS培养基上,分别预培养2 d,筛选适宜的蔗糖浓度。

(2)装载。预培养结束后将休眠茎尖放入1.8 mL的冷冻管中(10个·管⁻¹),3次重复,用装载液(MS+2 mol·L⁻¹甘油+0.4 mol·L⁻¹蔗糖)于(24±2)°C处理0、10、20、30、40 min,选出最佳装载处理时间。

(3) PVS_2 玻璃化溶液脱水处理。用无菌胶头滴管吸出装载处理液,加入玻璃化溶液 PVS_2 并在0 °C冰水混合物条件下处理0、30、60、90、120、150 min,选出最佳脱水处理时间。其中玻璃化液 PVS_2 是由30%甘油、15%二甲亚砷、15%乙二醇和0.4 mol·L⁻¹蔗糖组成。

(4)小滴玻璃化处理。将 PVS_2 脱水处理过的休眠茎尖放到无菌铝箔条(长×宽为2.5 cm×1 cm)内含 PVS_2 液滴(约5 μL)上,每个铝箔条上有10个液滴,每个液滴含1个茎尖,迅速在液氮中过一下,投入装满液氮的冻存管中,盖好冻存管盖,将冷冻管放入尼龙纱袋中绑好浸入液氮中,保存时间不少于24 h。

(5)化冻、洗涤处理。休眠茎尖超低温保存 15 d 后取出,用镊子将冻存管中含冷冻芽的铝箔条取出,浸入用 40 °C 温水预热过的洗涤液(1.2 mol · L⁻¹蔗糖的 MS)中 30 s,使休眠茎尖从铝箔条上脱落下来,然后再将休眠茎尖转入新鲜的洗涤液中洗涤 3 次,每次 10 min。

(6)TTC 染色法检测休眠茎尖活力与恢复培养。化冻的材料除去保护液,用无菌纸吸干残留于休眠茎尖表面的溶液,用 TTC 染色法检测其成活率。在恢复培养中将化冻好的休眠茎尖接种于含不同浓度的 IAA、GA₃ 和 6-BA 的 MS 培养基上,于 24 °C 黑暗条件下培养 5 d,弱光培养 5 d,转到正常光照条件培养 28 d 左右,统计其成活率。

(7)测定指标。成活率/%=超低温保存后成活的茎尖数/保存的总体休眠茎尖数×100。

1.3 数据处理

试验结果用 Excel 进行输入,并计算平均值,用 DPS 7.5 计算正交试验及方差分析。

2 结果与分析

2.1 扁桃休眠茎尖超低温保存正交试验

2.1.1 扁桃休眠茎尖超低温保存正交设计结果与极差分析 由表 2 的超低温保存正交试验结果可以看出,在影响‘莎车 14 号’扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率的因素中,极差大小顺序为:预培养时间>装载时间>PVS₂处理时间>预培养蔗糖浓度,R 值分别为 31.58、12.50、6.70、5.09,暗示预培养时间对‘莎车 14 号’扁桃休眠茎尖超低温保存后的成活率影响最大,相较于其他 3 个因素,预培养蔗糖浓度影响较小。预培养时间中以处理 2 d 休眠茎尖成活率最高,装载时间以 20 min 效果最好,PVS₂处理时间以 120 min 脱水时间成活率最高,预培养蔗糖浓度以含 MS 的 0.5 mol · L⁻¹蔗糖预培养液保存效果最好。在本试验的 9 个处理方案中,处理 6 (A₂B₃C₁D₂)即预培养时间为 2 d、预培养蔗糖浓度为 0.5 mol · L⁻¹、装载时间为 20 min、PVS₂处理为 90 min

表 2 正交试验设计结果与极差分析

Table 2 Orthogonal test design results and range analysis

处理号 Processing number	预培养时间 (A) Pre- culture time (A)/d	预培养蔗糖浓度 (B) Pre- culture of sucrose concentration (B)/(mol · L ⁻¹)	装载时间 (C) Loading time (C)/min	PVS ₂ 处理时间 (D) PVS ₂ processing time (D)/min	成活率 Survival rate/%
1	1	0.3	20	70	65.71±22.83 abcAB
2	1	0.4	30	90	67.50±9.57 abAB
3	1	0.5	40	120	65.00±12.91 abcAB
4	2	0.3	30	120	77.50±17.08 aA
5	2	0.4	40	70	64.17±5.00 abcAB
6	2	0.5	20	90	82.50±15.00 aA
7	3	0.3	40	90	33.33±4.71 dC
8	3	0.4	20	120	51.79±3.57 bcdABC
9	3	0.5	30	70	44.32±18.14 cdBC
K ₁	792.86	706.19	800.00	696.80	
K ₂	896.67	733.81	757.27	733.33	
K ₃	517.75	767.27	650.00	777.14	
k ₁	66.07	58.85	66.67	58.07	
k ₂	74.72	61.15	63.11	61.11	
k ₃	43.15	63.94	54.17	64.76	
极差 R Extreme R	31.58	5.09	12.50	6.70	

注:数值为平均值±SD。大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。下同。

Note: Values are means ± SD. The capital and small letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 level. The same below.

的超低温保存后成活率最高,达 82.50%。从正交试验结果可以看出,对‘莎车 14 号’扁桃小滴玻璃化超低温保存最佳的组合方案为:A₂B₃C₁D₃,但此最佳试验方案并没在本试验处理中体现,对此试验结果仍需进一步验证。

2.1.2 扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率方差分

析 由表 3 可以看出,在本试验中不同预培养时间对‘莎车 14 号’扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率的影响差异极显著($P < 0.01$),而其他 3 个因素(预培养蔗糖浓度、装载时间和 PVS₂处理时间)的不同处理水平对休眠茎尖超低温保存后成活率的影响差异不显著,其中 F 值由大到小的顺序分别为:预培养

表3 扁桃超低温保存后成活率方差分析

Table 3 Variance analysis of survival rate of almond buds after cryopreservation

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F值 F value	p-值 p-value
预培养时间 Pre-culture time	6 390.43	2	3 195.21	17.06**	0.000 10
预培养蔗糖浓度 Sucrose concentration during pre-culture	155.92	2	77.96	0.42	0.66
装载时间 Loading time	995.35	2	497.68	2.66	0.09
PVS ₂ 处理时间 PVS ₂ processing time	269.67	2	134.84	0.72	0.50
误差 Error	5 055.54	27	187.24		

注:**表示在 0.01 水平差异极显著。

Note: ** indicates significant difference at 0.01 level.

时间 > 装载时间 > PVS₂处理时间 > 预培养蔗糖浓度,与极差分析结果一致。

2.2 超低温保存单因素试验

单因素试验均在正交试验筛选出的最优方案下进行,只变化单因子,其他处理按 0.5 mol·L⁻¹蔗糖预培养液处理 2 d、装载 20 min、PVS₂处理 120 min 的最佳处理组合进行。

2.2.1 预培养蔗糖浓度对扁桃超低温保存后的影响 为使‘莎车 14 号’扁桃休眠茎尖逐步脱水,将已剥好的扁桃茎尖直接放置在含 MS 的不同浓度蔗糖预培养液上培养 2 d,结果见图 1。试验结果表明,不

响 为了进一步降低扁桃组织的含水量,避免由于渗透压变化剧烈对材料所造成的伤害,用一种高浓度的冷冻保护混合液(即装载液)进行在不同时间内处理,试验结果见图 2。用装载液处理不同时间扁桃芽的成活率均比对照(装载 0 min)高,其中装载 20 min 扁桃成活率最高,达 80.56%,显著高于其他装载时间,比对照高 72.98%。装载 0、10、40min 扁桃成活率差异不显著($P < 0.05$)。试验中‘莎车 14 号’扁桃处理时间过短装载液不能起到缓冲作用,成活率低,但装载时间超过 30 min,扁桃组织易受装载液的毒害而使成活率下降。

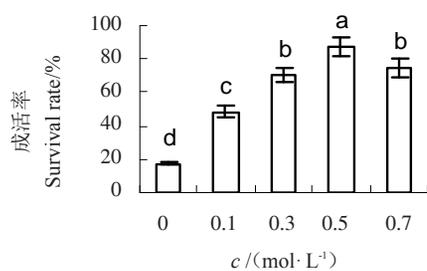


图1 预培养蔗糖浓度对保存后成活率的影响

Fig. 1 Effect of sucrose concentration during pre-cultured on survival rate

同预培养蔗糖浓度对扁桃茎尖的成活率影响较大,随着预培养蔗糖浓度的增加,扁桃超低温保存后成活率逐渐增加而后下降。预培养蔗糖浓度为 0.5 mol·L⁻¹时成活率最高,达 87.74%,显著高于其他各处理,比对照 0 mol·L⁻¹的预培养蔗糖浓度成活率高 70.31%,蔗糖浓度为 0.7 mol·L⁻¹时成活率降低,原因可能是随着蔗糖浓度增加,扁桃植株细胞渗透能力逐渐增加,使细胞组织水分含量降低,当蔗糖浓度为 0.7 mol·L⁻¹时,细胞产生了渗透胁迫,使部分细胞失去活力,成活率降低。

2.2.2 装载液处理时间对扁桃超低温保存后的影

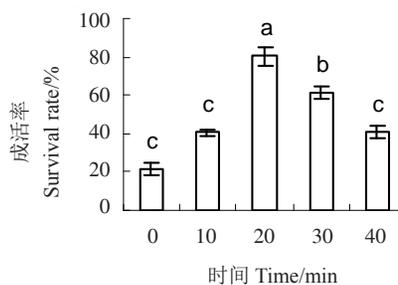


图2 装载液处理时间对保存后成活率的影响

Fig. 2 Effect of loading time on survival rate after cryopreservation

2.2.3 PVS₂脱水处理对扁桃超低温保存后的影响 玻璃化过程是超低温保存最重要的步骤。笔者用玻璃化保护液 PVS₂处理脱去‘莎车 14 号’扁桃组织中过多的水分,使扁桃组织能够达到完全玻璃化,并让冷冻保护液渗入细胞从而减轻在超低温保存过程中细胞所受的伤害,结果见图 3。试验发现,随着 PVS₂处理时间的增加,扁桃组织的成活率增加,但超过 120 min 后,扁桃材料由于受 PVS₂的毒害,成活率反而降低。玻璃化保护液 PVS₂处理 120 min 时,扁桃茎尖存活率最高,达 85.44%,显著高于其他处理,对照(0 min)与 30 min 处理下扁桃超低温保存的

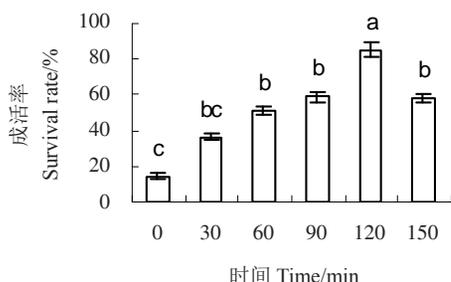
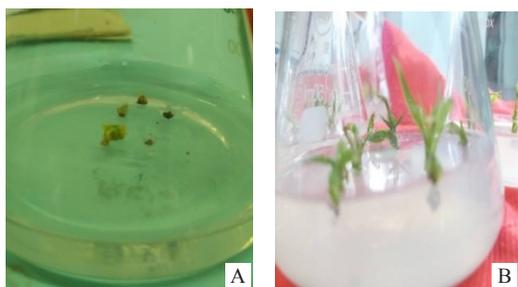


图 3 PVS₂处理时间对保存后成活率的影响

Fig. 3 The effect of PVS₂ treatment time on survival rate after cryopreservation

成活率无显著差异($P < 0.05$)。

2.2.4 冻存后扁桃茎尖恢复培养 扁桃茎尖经过小滴玻璃化超低温保存后,能够恢复生长(图4)。将‘莎车14号’扁桃茎尖超低温保存15 d后化冻,洗去保护液,无菌纸吸干残留于茎尖表面的溶液,接种于恢复培养基上,24 °C暗培养5 d,弱光培养5 d,转入正常光照条件下培养,14 d后休眠茎尖长出小幼芽,变绿(图4-A);继续培养40 d,茎尖长成幼小植株(图4-B),成活率为80.44%。图5是扁桃休眠茎尖未经超低温保存在24 °C正常光照培养下的苗,图4-



A. 恢复培养 14 d; B. 恢复培养 40 d.

A. Recovery culture of 14 days; B. Recovery culture of 40 days.

图 4 冻存后扁桃茎尖恢复培养

Fig. 4 Recovery culture of almond shoot tips after cryopreservation



图 5 未经超低温保存

Fig. 5 Shoot tips without cryopreservation

B为茎尖经小滴玻璃化超低温保存后恢复培养的苗,2者形态上无明显差异。

2.3 恢复培养基对扁桃休眠茎尖成活率的影响

‘莎车14号’扁桃休眠茎尖经过0.5 mol·L⁻¹蔗糖预培养液处理2 d、装载20 min、PVS₂处理120 min后,放入含新鲜PVS₂小滴的铝箔纸上超低温保存,经化冻后转入不同恢复培养基上,结果见表4。可以看出,不同恢复培养基对扁桃休眠茎尖超低温保存后存活率的影响差异显著,处理2中MS+0.3 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹IAA+0.3 mg·L⁻¹GA₃培养基扁桃成活率最高,达80.44%,苗绿且直接长成植株;而另外2个处理成活率不高,处理1中扁桃休眠茎尖恢复培养时易产生愈伤组织,而处理3培养基中恢复培养的休眠茎尖长出后叶片易卷曲发黄。

表 4 恢复培养基对扁桃超低温保存后成苗率的影响

Table 4 Effect of recovery medium on seedling rate of almond after cryopreservation

处理 Process	恢复培养基 Recovery medium	成活率 Survival rate/%
1	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ IAA	23.50 c
2	MS+0.3 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ IAA+0.3 mg·L ⁻¹ GA ₃	80.44 a
3	MS+0.3 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ IAA+1.0 mg·L ⁻¹ GA ₃	62.16 b

2.4 小滴玻璃化法对4个扁桃品种超低温保存后的影响

按照正交优化试验和单因素试验结果,运用优化的方案分别对‘莎车14号’‘莎车11号’‘莎车1号’和‘莎车18号’的休眠茎尖进行小滴玻璃化超低温保存试验,即将剥好的休眠茎尖用0.5 mol·L⁻¹蔗糖预培养液处理2 d,装载20 min, PVS₂处理120 min,放入含新鲜PVS₂小滴的铝箔纸上超低温保存,之后化冻恢复测其成活率。由图6可以看出,‘莎车

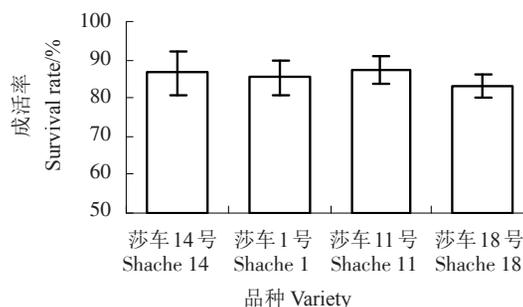


图 6 超低温保存后优化试验

Fig. 6 Optimization test after cryopreservation

14号‘莎车11号’‘莎车1号’和‘莎车18号’4个扁桃品种采用最佳处理方案进行超低温保存后成活率分别为86.67%、87.41%、85.44%和83.02%,品种间无显著差异。

3 讨论

正交试验法是研究多因素、多水平的一种试验设计方法,能够大幅度减少试验处理数,且不会降低试验可行度的方法,是一种高效、快速、经济的试验设计方法,可在研究中取得事半功倍的效果^[22]。笔者采用正交设计对扁桃休眠茎尖进行了超低温保存,通过极差和方差分析可知,预培养时间是扁桃休眠茎尖超低温保存后成活率高低的的主要因素,这与王跃华等^[23]对华重楼超低温保存的正交试验结果类似,其原因可能是预培养液渗入细胞内,经过一段适宜的预培养时间,使细胞进行保护性脱水,细胞达到超低温保存后最好的生理状态,有效避免由细胞内外冰晶形成所造成的破坏。

选择适当的材料对超低温保存后植株的成活率起决定因素。陈加利等^[11]发现用‘莎车18号’扁桃茎尖进行包埋玻璃化超低温保存后成活率仅为52.0%。Channutapipat等^[24]用一步超低温法保存了2种扁桃接穗及砧木的茎尖,成活率分别为87.5%、60.0%和72.5%。试验均将扁桃茎尖进行组培后形成的试管苗在4℃低温条件下驯化21~28d,使整个试验时间延长,部分苗叶片发黄,愈伤组织发褐,后期操作易受污染。休眠茎尖由于经受了冬季的深冷驯化和具有较低的含水量,因而成为超低温保存的良好试材^[25]。在杏^[26]、柿^[27]、麻花秦艽^[28]等植物直接选用休眠茎尖进行试验,减少了低温驯化这一步,简化了整个试验程序。笔者选用‘莎车14号’扁桃休眠芽,直接用0.5 mol·L⁻¹的蔗糖预培养液培养2d,获得较好的试验效果,污染率降低了,操作过程中的繁琐步骤减少了,超低温保存后的成活率提高了,为85.44%,从而为建立和优化扁桃超低温保存体系提供了理论基础。

小滴玻璃化法操作简单、存活率高,具有一定的广适性,此程序可广泛应用于同属的多个品种或者基因型^[15]。张守梅等^[18]采用小滴玻璃化法对15个香蕉品种的茎尖材料进行保存,存活率均在20%以上,认为小滴玻璃化法可以广泛地应用于香蕉的超低温保存中。笔者将‘莎车14号’小滴玻璃化超低温保

存的正交试验优化结果运用到‘莎车1号’‘莎车11号’和‘莎车18号’上,获得较好的试验效果,超低温保存后的成活率均超过80%,究其原因可能是小滴玻璃化法具有良好的冻存效果,整个程序简单,在冷冻和化冻时由于铝箔纸具有较好的热传导性,冷冻时,铝箔纸上PVS₂小滴内休眠茎尖与液氮接触,降温速度快,均一晶核少,减少了冰晶对细胞的损伤;化冻时从液氮中取出的扁桃休眠茎尖放入40℃洗涤液中,材料受热均匀,形成次生结冰的概率降低,从而提高了扁桃超低温保存后的成活率。白建明等^[29]以‘坝10’马铃薯为材料,建立了小滴玻璃化保存程序,存活率为79.91%,4个马铃薯品种成活率差异显著,而笔者利用小滴玻璃化超低温保存了4个扁桃品种,差异却不显著,这可能受扁桃自身因素的影响,超低温保存后成活率均超过80%。小滴玻璃化法是否能广泛应用在扁桃其他种质资源上还有待进一步试验验证。

4 结论

用小滴玻璃化超低温保存技术能成功保存扁桃休眠茎尖。将灭菌过的休眠茎尖,剥去外部鳞片后,用0.5 mol·L⁻¹预培养蔗糖液处理2d,装载液处理20 min,0℃下用PVS₂脱水处理120 min,放入含新鲜PVS₂小滴的铝箔纸上超低温保存24 h后,浸入用40℃温水预热过的洗涤液(1.2 mol·L⁻¹蔗糖的MS)中30 s,然后再将休眠茎尖转入新鲜的洗涤液中洗涤30 min,在MS+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ IAA+0.3 mg·L⁻¹ GA₃恢复培养基中暗培养7 d后转到正常光照下培养扁桃,成活率高达80.00%,建立了扁桃休眠茎尖小滴玻璃化法超低温保存体系。

参考文献 References:

- [1] 田建保. 中国扁桃[M]. 北京:中国农业出版社,2008: 1-2.
TIAN Jianbao. Chinese almond[M]. Beijing: China Agriculture Press,2008: 1-2.
- [2] 兰彦平,吐拉克孜,郭文英,顾万春. 巴旦杏的研究现状及开发利用前景[J]. 林业科学研究,2004,17(5): 674-679.
LAN Yanping, TURAKEZ, GUO Wenyong, GU Wanchun. Research progress and utilization on *Amygdalus communis*[J]. Forest Research,2004,17(5): 674-679.
- [3] 张倩茹,尹蓉,王红宁,王贤萍. 扁桃种质资源及其开发利用研究进展[J]. 农产品加工,2016(16): 49-51.
ZHANG Qianru, YIN Rong, WANG Hongning, WANG Xianping. Research progress of the germplasm resources and the ex-

- ploitation and utilization of almond[J]. *Farm Products Processing*, 2016(16): 49-51.
- [4] 成建红, 侯平, 李疆, 李文胜, 马木提, 张华亭, 林星辉. 巴旦杏的生产发展及其研究进展[J]. *干旱区研究*, 2000, 17(1): 32-38. CHENG Jianhong, HOU Ping, LI Jiang, LI Wengsheng, MA Muti, ZHANG Huating, LIN Xinghui. The industrial development of almond and its research states[J]. *Arid Zone Research*, 2000, 17(1): 32-38.
- [5] 张宏平, 张晋元, 吴国良. 我国现有的扁桃品种种质资源[J]. *晋城职业技术学院学报*, 2010, 3(5): 69-72. ZHANG Hongping, ZHANG Jinyuan, WU Guoliang. Germplasm resource of main varieties of almond in china[J]. *Journal of Jincheng Institute of Technology*, 2010, 3(5): 69-72.
- [6] 梁艳霞, 王占和, 张志玲, 李小平, 马碧虎. 我国扁桃发展现状、问题及发展前景[J]. *现代园艺*, 2015(12): 9. LIANG Yanxia, WANG Zhanhe, ZHANG Zhiling, LI Xiaoping, MA Bihu. Current situation, problems and development prospects of almond in China [J]. *Modern Gardening*, 2015(12): 9.
- [7] 文彬. 植物种质资源超低温保存概述[J]. *植物分类与资源学报*, 2011, 33(3): 311-329. WEN Bin. An introduction to cryopreservation of plant germplasm[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2011, 33 (3): 311-329.
- [8] ENGELMANN F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2011, 47(1): 5-16.
- [9] 柳金伟, 陈新, 徐丽, 魏海蓉, 张力思, 崔海金, 张学寅, 刘庆忠. 果树种质资源超低温保存研究进展[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(3): 122-125. LIU Jinwei, CHEN Xin, XU Li, WEI Hairong, ZHANG Lisi, CUI Haijin, ZHANG Xueyan, LIU Qingzhong. Advances in research of cryopreservation of fruit germplasm resources[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(3): 122-125.
- [10] 曾继吾, 易干军, 张秋明, 霍合强. 果树种质资源离体保存研究进展[J]. *果树学报*, 2002, 19(5): 302-306. ZENG Jiwu, YI Ganjun, ZHANG Qiuming, HUO Heqiang. Advances in research of *in vitro* conservation of fruit germplasm [J]. *Journal of Fruit Science*, 2002, 19(5): 302-306.
- [11] 陈加利, 姜喜, 肖巍, 刘建亮, 王琳, 李志军. 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. CHEN Jiali, JIANG Xi, XIAO Wei, LIU Jianliang, WANG Lin, LI Zhijun. Studies on cryopreservation of almond shoot tips by encapsulation vitrification[J]. *Journal of Tarim University*, 2014, 26(2): 110-114.
- [12] 肖巍, 刘建亮, 姜喜, 马其, 王梦雪, 王秀. 扁桃休眠茎尖包埋玻璃化超低温保存的初探[J]. *新疆农业科学*, 2014, 51(9): 1624-1629. XIAO Wei, LIU Jianliang, JIANG Xi, MA Qi, WANG Mengxue, WANG Xiu. Preliminary exploration on dormant shoot-tips of almond cultivar 'Shache14' by encapsulation- vitrification method[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2014, 51 (9): 1624-1629.
- [13] WIRTHENSOHN M, COLLINS G, CHANNUNTAIPAT C, SEDGLEY M. Update on long-term cryopreservation of almond germplasm[J]. *Acta Horticulturae*, 2006, 726: 127-131.
- [14] KARTHA K K, LEUNG N L, MROGINSKI L A. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 1982, 107(2): 133-140.
- [15] 吴昉, 张琳, 林田, 夏宜平. 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. WU Yun, ZHANG Lin, LIN Tian, XIA Yiping. A novel approach for cryopreservation of plant germplasm resources droplet-vitrification [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(5): 511-517.
- [16] 洪森荣, 尹明华, 王艾平. 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织小滴玻璃化法超低温保存技术的研究[J]. *植物研究*, 2014, 34(3): 333-338. HONG Senrong, YIN Minghua, WANG Aiping. Cryopreservation technique of Jiangxi Yanshan Red Bud Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott var. *cornosus* cv. Hongyayu) embryogenic callus by droplet- vitrification. [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2014, 34(3): 333-338.
- [17] 李腾敏, 徐立, 李志英. 牛大力腋芽小滴玻璃化法超低温保存后遗传稳定性分析[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(15): 149-151. LI Tengmin, XU Li, LI Zhiying. Genetic stability analysis of cryopreservation of *Callerya speciosa* axillary buds by using droplet- vitrification [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(15): 149-151.
- [18] 张守梅, 李建国, 陈厚彬, 徐春香, 林顺权. 香蕉种质超低温保存技术研究进展[J]. *果树学报*, 2005, 22(5): 537-541. ZHANG Shoumei, LI Jianguo, CHEN Houbin, XU Chunxiang, LIN Shunquan. Advances in the techniques for cryopreservation of *Musa* germplasm[J]. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22 (5): 537-541.
- [19] SANTOS P A A, PAIVA R, SILVA L C, DE SOUZA A C; DE SANTANA M C; DA SILVA D P C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage[J]. *Acta Scientiarum Agronomy*, 2015, 37(3): 289-296.
- [20] VUJOVIĆ T I, RUŽIĆ Đ V, CERVIĆ R M. Cryopreservation of Serbian autochthonous *Prunus* spp. by droplet-vitrification[J]. *Biologia*, 2015, 70(10): 1359-1365.
- [21] 张若佐. 葡萄休眠芽的一般特性[J]. *国外农学(果树)*, 1983 (3): 45-50. ZHANG Ruozuo. The general characteristics of grape dormant buds[J]. *Foreign Agronomy (Fruit Trees)*, 1983(3): 45-50.
- [22] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 汤建. 正交试验设计和分析方法研究[J]. *实验技术与管理*, 2010, 27(9): 52-55. LIU Ruijiang, ZHANG Yewang, WEN Chongwei, TANG Jian. Study on the design and analysis methods of orthogonal experiment [J]. *Experimental Technology and Management*, 2010, 27 (9): 52-55.

- [23] 王跃华,刘银花,陈燕,彭世明,唐旭,何新友,任鹏飞,何诗红. 华重楼超低温保存条件的优化研究[J]. 种子, 2015, 34(4): 13-16.
WANG Yuehua, LIU Yinhua, CHEN Yan, PENG Shiming, TANG Xu, HE Xinyou, REN Pengfei, HE Shihong. Optimization of cryopreservation condition for paris *Polyphylla* var. *chinesis*[J]. Seed, 2015, 34(4): 13-16.
- [24] CHANNUTAPIPAT C, COLLINS G, BERTOZZI T, SEDGLEY M. Cryopreservation of *in vitro* almond shoot tips by vitrification [J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2000, 75(2): 228-232.
- [25] 张永卓,罗正荣. 甜柿休眠芽茎尖包埋-玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2019-2022.
ZHANG Yongzhuo, LUO Zhengrong. Cryopreservation of dormant shoot tips of non-astringent types of Chinese persimmon by encapsulation-vitrification and plantlets regeneration [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(12): 2019-2022.
- [26] 王彩虹,田义轲. 杏休眠芽的超低温保存研究[J]. 莱阳农学院学报, 1997, 14(4): 17-19.
WANG Caihong, TIAN Yike. Studies of super-low temperature storage in dormant buds of *Prunus armeniaca* [J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 1997, 14(4): 17-19.
- [27] 艾鹏飞,罗正荣. 柿休眠芽茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 553-556.
AI Pengfei, LUO Zhengrong. Cryopreservation of dormant shoot-tips of persimmon by vitrification and plant regeneration [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(5): 553-556.
- [28] 晋玲,刘进,张延红,朱田田,陈红刚. 麻花秦艽休眠芽的玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1374-1377.
JIN Ling, LIU Jin, ZHANG Yanhong, ZHU Tianian, CHEN Honggang. Cryopreservation and plantlet regeneration of dormant buds of gentiana straminea by vitrification[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(9): 1374-1377.
- [29] 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 Jianming, CHEN Xiaoling, LU Xinxiong, GUO Huachun, XIN Xia, ZHANG Zhie, XIN Pingping. 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.

《果树学报》参考文献著录格式

参考文献只选主要的列入(未公开发表的请勿列入,必要时可在文中加注或用脚注说明)。参考文献表按顺序编制,各篇文献按正文部分标注的序号用阿拉伯数字依次列出,并置于方括号内。文献的著录请按下列格式:

【期刊】 责任者. 文献篇名[文献类型标志]. 刊名, 年份, 卷(期): 起止页码。

【专著】 责任者. 书名[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项(初版不写). 译者(原著不写). 出版地: 出版者, 出版年: 引文页码。

【论文集析出文献】 析出文献的作者. 析出文献题名[文献类型标志]// 论文集主要责任者. 论文集题名. 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献的页码。

【学位论文】 责任者. 篇名[D]. 保存地点: 保存单位, 年份。

【专利文献】 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[P]. 公告日期或公开日期[引用日期]。

【电子文献】 作者. 题名: 其他题名信息[EB/OL]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问途径。

示例:

【期刊】 [1] 谢江辉, 刘成明, 马蔚红, 雷新涛. 杧果种质遗传多样性的RAPD分析[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 649-653.

XIE Jianghui, LIU Chengming, MA Weihong, LEI Xintao. Analysis of genetic relationships among mango germplasm by RAPD markers[J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(6): 649-653.

[2] YU Z, HABERER G, MATTHES M, RATTEI T, MAYER K F, GIERL A, TORRES-RUIZ R A. Impact of natural genetic variation on the transcriptome of autotetraploid *Arabidopsis thaliana*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(41): 17809-17814.

【专著】 张福锁. 环境胁迫与植物育种[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 330-348.

ZHANG Fusuo. Environment stress and plant breeding [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1999: 330-348.

【论文集析出文献】 FOURNEY M E. Advances in holographic photoelasticity[C]// American Society of Mechanical Engineers. Applied Mechanics Division, Symposium on Applications of Holography in Mechanics, August 23-25, 1971, University of Southern California, Los Angeles, California. New York: ASME, 1971: 17-38.

【学位论文】 CALMS R B. Infrared spectroscopic studies on solid oxygen[D]. Berkeley: University of California, 1965.

【专利文献】 KOSEKI A, MOMOSE H, KAWAHITO M. Compiler: US, 828402[P/OL]. 2002-05-25[2002-05-28]. <http://FF&p=1&u=netahtml/PTO/search-bool.html&r=5&f=G&l=50&col=AND&d=PG01&sl=IBM>. AS. &os=AN/IBM&RS=AN/IBM.

【电子文献】 Online Computer Library Center, Inc. History of OCLC[EB/OL]. [2001-01-08]. <http://www.oclc.org/about/history/default.htm>.