

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

白建明^{1,2,3}, 陈晓玲^{1,*}, 卢新雄¹, 郭华春^{2,*}, 辛霞¹, 张志娥¹, 辛萍萍¹

(¹ 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ² 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; ³ 云南省农业科学院经济作物研究所, 昆明 650205)

摘要: 以马铃薯试管苗为试材, 对其茎尖小滴玻璃化法超低温保存的影响因素进行了研究, 并对再生植株进行了遗传稳定性检测。结果表明, 马铃薯茎尖依次在含有 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的液体 MS 培养基中预培养各 1 d 后, 在 0°C 下 PVS₂ 处理 30 min, 转到铝箔条上 PVS₂ 小滴上 (约 $15 \mu\text{L}$), 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, 投入液氮至少保持 1 h。室温下用含有 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 液体培养基解冻并洗涤 30 min 后, 接种到 MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zeatin + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 恢复培养基上, 存活率和再生率最高达 79.91% 和 62.52%。通过 SSR 分子标记检测, 再生植株的遗传稳定性没有发生改变。

关键词: 马铃薯; 离体茎尖; 小滴玻璃化法; 超低温保存; 遗传稳定性

中图分类号: S 532; S 632

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 09-1431-08

Cryopreservation of *In Vitro* Shoot Tips of Potato by Droplet Vitrification and Genetic Stability of Regenerated Plantlets

BAI Jian-ming^{1,2,3}, CHEN Xiao-ling^{1,*}, LU Xin-xiong¹, GUO Hua-chun^{2,*}, XIN Xia¹, ZHANG Zhi-e¹, and XIN Ping-ping¹

(¹ Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² College of Agricultural Sciences and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; ³ Institute of Economic Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205)

Abstract: Shoot tips from axillary buds of *in vitro* potato (*Solanum tuberosum* L.) were successfully cryopreserved by droplet vitrification. The optimum cryopreservation procedures were as follows. Shoot tips excised from 2–3 month-old plantlets were precultured on liquid MS medium supplemented with $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose for 1 day each and then dehydrated with PVS₂ for 30 min at 0°C . Five shoot tips were transferred to approximately $15 \mu\text{L}$ droplets of PVS₂ solution on thin strips of sterile aluminum foil. The aluminum foil strips were folded to enclose the shoot tips. The foil envelope was then carefully immersed into liquid nitrogen (LN) using fine forceps. After immersion the strips were quickly transferred to 2 mL cryotubes and immediately plunged into LN and maintained for 1 h at least. The shoot

收稿日期: 2010-05-20; 修回日期: 2010-06-17

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD13B10); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (092060302-07); 农业部农作物种质资源保护利用专项

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xlchen@caas.net.cn; ynghe@126.com)

tips in the foil strips were then rapidly heated by immersion twice at 15 min intervals into 10 mL $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose MS medium at room temperature. The shoot tips were then unloaded from the foil, rinsing the PVS₂ from the shoot tips. The shoot tips were transferred to solid culture medium (MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zeatin + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃) for recovery and regeneration. The average survival rate and regeneration rate were 79.91% and 62.52%, respectively. There was no genetic variation in the regenerated plants based on assessment of SSR markers.

Key words potato *In vitro* shoot tips droplet vitrification method cryopreservation genetic stability

无性繁殖的马铃薯栽培种资源通常是在缓慢生长的条件下进行离体保存。对于短期和中期保存来说,试管苗保存是一种非常好的方法,保存材料易于利用。然而,对于不需要马上使用的材料来说,在液氮中进行超低温长期保存可能是一种更好的选择。因为冷冻后只需要定期往容器里添加液氮即可,像组培继发性感染或污染等其它风险将会避免 (Schäfer-Menuhr et al., 1996)。

已报道的马铃薯茎尖超低温保存方法中的包埋脱水法、包埋玻璃化法和玻璃化法保存后的存活率均比较低 (Bajaj, 1977; Grout & Henshaw, 1978; Bouafia et al., 1996; Hirai & Sakai, 1999; 王永林, 2006; 宋继玲 等, 2009)。在玻璃化法基础上发展起来的小滴玻璃化法,其冷冻和解冻速率更快,存活率更高。利用小滴玻璃化法已成功保存了芦笋 (Mix-Wagner et al., 2000)、薯蓣 (Leunufna & Keller, 2003)、芋头 (Sant et al., 2008)、大蒜 (Kim et al., 2007)、番木瓜 (Ashmore et al., 2001) 等多种植物茎尖。Schäfer-Menuhr 等 (1996) 用小滴法超低温保存马铃薯时,平均存活率虽为 80%,但平均再生率较低,只有 40%。目前,在国内还未见马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存的报道。

本文中分析了马铃薯离体茎尖小滴玻璃化法超低温保存的影响因素,并对再生植株的遗传稳定性进行了检测,构建存活率和再生率都较高的马铃薯离体超低温保存技术,以期建立起适合马铃薯种质资源长期安全保存的技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 4 个马铃薯品种,分别是‘坝 10’、‘克新 4 号’、‘东农 303’和‘克新 17 号’,均由国家种质克山马铃薯试管苗库提供。试管苗生长在添加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的固体 MS 培养基上。培养温度维持在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每天 16 h 光照。光源采用冷白色荧光灯管,光照强度为 $50 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 。每 3 个月转接 1 次。

选取继代 2~3 个月马铃薯试管苗,在无菌条件下,利用双目解剖镜拨取大小约为 1 mm 的茎尖用于试验。

1.2 预培养试验

将拨取的茎尖依次转到含 0.3、0.5、0.7、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的液体 MS 培养基中,每个蔗糖浓度的 MS 培养基中均预培养 1 d (表 1)。培养条件与试管苗相同。对照的茎尖不经过含高浓度蔗糖的液体 MS 培养基预培养。

将预培养后的茎尖和对照茎尖在 0 用 PVS₂ 玻璃化液处理 30 min。

用吸管分别吸取 5 滴玻璃化液 (每滴 $15 \mu\text{L}$) 滴到 0.03 mm 厚, $0.8 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ 大小的铝箔条上,

将脱水后的茎尖转到铝箔条上的玻璃化液滴里，每滴 5 个茎尖。将粘有茎尖的铝箔条在液氮里蘸一下，然后装入盛满液氮的 2 mL 冷冻管中，投入液氮，并至少保持 1 h。

从液氮中取出冷冻管中的铝箔条，室温下迅速浸入含 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的液体 MS 溶液，使茎尖从铝箔条上脱落下来，然后再将茎尖转入新的含 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的液体 MS 溶液洗涤 30 min。

将洗涤后的茎尖转到 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Zeatin} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3$ 固体培养基中进行恢复培养。先黑暗培养 7 d，然后微光培养 7 d，最后转到正常光照下培养。1 个月后，观察并统计结果。存活率 (%) = (恢复绿色的芽数/总茎尖数) $\times 100$ ；再生率 (%) = (不经过愈伤直接长成植株的芽数/总茎尖数) $\times 100$ 。

1.3 脱水试验

选择预培养试验中最好的处理 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 1 d + $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 1 d) 的茎尖转入不同玻璃化液 (表 2) 中，并在 0 条件下分别处理 0、15、30、60、90 min。之后的步骤同上。

1.4 恢复培养试验

选择上述试验中效果最好的预培养 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 1 d + $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 1 d) 和脱水处理 (PVS₂ 处理 30 min) 的茎尖，经液氮保存并解冻洗涤后，转入到不同的固体恢复培养基 (表 3) 培养。光照等条件同上。

1.5 遗传稳定性检测

参照 Ghislain 等 (2004) 的方法对超低温保存后的再生植株用 SSR 法进行遗传稳定性检测。分别取 4 个品种的试管苗 2 株和超低温保存后的再生苗 10 株提取 DNA (Hillis et al., 1990; Colosi & Schaal, 1993)。DNA 用 $1 \times \text{TE}$ 缓冲液稀释至 $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

在选取的 75 对 SSR 引物中，53 对参考 Feingold 等 (2005)，22 对参考 Ghislain 等 (2004)。引物结合位点分别分布在 12 条染色体上，每条染色体上有 2 ~ 11 对引物结合位点。所有引物均由北京三博远志生物技术有限公司合成。PCR 反应体积为 $20 \mu\text{L}$ ： $10 \times \text{PCR Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$ ，dNTPs ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$ ，SSR 引物 ($1 + 1$) = $2 \mu\text{L}$ ，*Taq* 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$ ，模板 DNA $4.0 \mu\text{L}$ ，ddH₂O $10.0 \mu\text{L}$ 。PCR 反应中所用 *Taq* 酶、dNTP、PCR buffer 和 ddH₂O 购自天根公司。用梯度 PCR 扩增的结果确定不同引物的最佳退火温度，筛选出 75 对引物进行 PCR 扩增；SSR 扩增程序为：94 预变性 5 min；94 变性 1 min，56 (不同引物有差别) 退火 1 min，72 延伸 1 min (循环 35 次)；72 延伸 8 min。PCR 扩增产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，恒定功率 65 W，电泳 55 min。银染法检测并统计电泳结果。

方差分析采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 预培养对存活率和再生率的影响

马铃薯‘坝 10’茎尖经含不同浓度蔗糖的液体 MS 培养基预培养，用 PVS₂ 处理 30 min 后投入液氮。不同的预培养存活率和再生率差异显著。以 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1 d + $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1 d 的预培养处理后的存活率 (85.87%) 和再生率 (74.58%) 最高 (表 1)。

从表 1 中结果可以看出，随着预培养天数和液体 MS 培养基的蔗糖浓度的增加，超低温保存后的存活率和再生率呈现出先升高后又降低的趋势，而没有经过高浓度蔗糖的液体 MS 培养基培养 (对

照)的茎尖存活率为0。原因可能是较低蔗糖浓度的MS液体培养基预培养后,茎尖中含水量仍较高,存活率较低;而随着预培养时间的延长和蔗糖浓度的增加,会引起组织细胞的过度脱水,对细胞正常的生理代谢产生了不利的影响,造成存活率和再生率的下降。

表 1 预培养对存活率及再生率的影响

Table 1 The effect of pre-culture of shoot tips on survive rate and regeneration rate

处理 Treatments	存活率/% Survive rate	再生率/% Regeneration rate
0.3 mol · L ⁻¹ , 1 d	67.32 ± 13.08 b	54.86 ± 0.11 b
0.3 mol · L ⁻¹ , 1 d + 0.5 mol · L ⁻¹ , 1 d	85.87 ± 4.61 a	74.58 ± 13.38 a
0.3 mol · L ⁻¹ , 1 d + 0.7 mol · L ⁻¹ , 1 d	68.81 ± 5.81 b	45.87 ± 7.45 c
0.3 mol · L ⁻¹ , 1 d + 0.5 mol · L ⁻¹ , 1 d + 0.7 mol · L ⁻¹ , 1 d	69.99 ± 2.80 b	54.15 ± 4.80 b
0.3 mol · L ⁻¹ , 1 d + 0.5 mol · L ⁻¹ , 1 d + 0.7 mol · L ⁻¹ , 1 d + 1.0 mol · L ⁻¹ , 1 d	34.44 ± 2.14 c	7.78 ± 2.14 d
对照 Control	0 d	0 d

注:同一列中相同字母表示差异不显著。下同。
Note: The same letters in the same column indicated no significant difference. The same below.

2.2 玻璃化液对存活率和再生率的影响

马铃薯‘坝10’依次在含0.3 mol · L⁻¹和0.5 mol · L⁻¹蔗糖的MS液体培养基各预培养1 d后,分别使用不同的玻璃化液处理30 min,然后投入液氮。

从表2的结果可以看出,在使用了含有DMSO的玻璃化液PVS₁和PVS₂后,马铃薯茎尖的存活率和再生率要高于其它两种不含有DMSO的玻璃化液,PVS₂的存活率(85.13%)和再生率(70.13%)与其它玻璃化液都达到了显著差异水平。说明PVS₂可以使茎尖内组织适量脱水,便于DMSO进入茎尖组织,将其快速冷冻,茎尖组织细胞便形成玻璃化状态,减轻对组织的伤害,从而提高茎尖组织超低温保存后的存活率和再生率。

表 2 玻璃化液对茎尖存活率和再生率的影响

Table 2 The effects of different PVS solutions for survive rate and regeneration rate of shoot tips

玻璃化液 PVS solutions	玻璃化液配方 The component of PVS solutions						存活率/% Survive rate	再生率/% Regeneration rate
	MS	甘油/% Gly	乙二醇/% EG	二甲基亚砜/% DMSO	蔗糖/(mol · L ⁻¹) Sucrose	聚乙二醇/% PEG		
PVS ₁	MS	22	13	6	—	13	52.93 ± 3.80 b	27.23 ± 10.21 b
PVS ₂	MS	30	15	15	0.40	—	85.13 ± 7.53 a	70.13 ± 0.88 a
PVS ₃	MS	50	—	—	1.46	—	31.64 ± 1.60 c	15.03 ± 1.36 c
PVS ₄	MS	35	20	—	0.60	—	45.38 ± 14.68 bc	23.25 ± 8.96 b

2.3 PVS₂处理时间对存活率和再生率的影响

选择继代2~3个月的‘坝10’试管苗,拔取的茎尖经过含0.3 mol · L⁻¹和0.5 mol · L⁻¹蔗糖的液体MS培养基预培养各1 d后,用PVS₂分别处理0、15、30、60、90 min。

如图1所示,没有用PVS₂处理而直接进行超低温保存,茎尖存活率和再生率都为0。随着PVS₂处理时间的延长,存活率和再生率迅速增高,当处理时间为30 min时存活率和再生率为最高,分别

为 95.09%和 93.98%，达到显著或极显著差异；然后随着 PVS₂ 处理时间继续延长，存活率和再生率开始下降。这种结果可能是因为随着 PVS₂ 处理时间的延长，渗透到细胞内过多的 DMSO 对细胞过度毒害损伤所致。

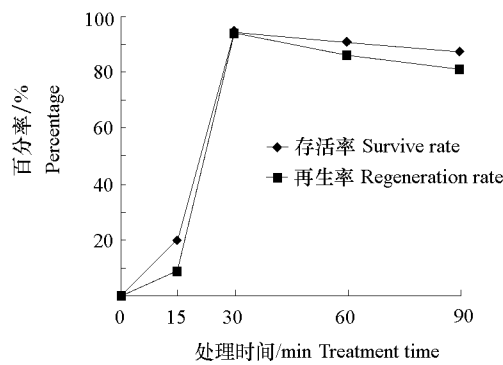


图 1 PVS₂处理时间对存活率和再生率的影响

Fig. 1 The effects of PVS₂ treatment time on survival rate and regeneration rate

2.4 恢复培养基对存活率和再生率的影响

马铃薯‘坝 10’茎尖经过 1 d 0.3 mol · L⁻¹和 1 d 0.5 mol · L⁻¹蔗糖液体 MS 培养基预培养后，用 PVS₂ 处理 30 min 后投入液氮，解冻后的尖转到不同恢复培养基上，结果表明恢复培养基 A 和 B 的存活率为 70.63%和 65.07%，高于其它恢复培养基。A 的再生率最高，为 54.91%。

恢复培养基 A 和 B 的成分只是 NAA 和 IAA 的差别，因此在恢复培养基中使用 NAA 有利于马铃薯茎尖超低温保存后的存活和再生。恢复培养基 C 可能是因为激素的浓度较低，所以存活率和再生率都较低。

表 3 恢复培养基对存活率和再生率的影响

Table 3 The effect of different recovery medium for survive rate and regeneration rate

恢复培养基 Recovery medium	组成成分/(mg · L ⁻¹) Component	存活率/% Survive rate	再生率/% Regeneration rate
A	MS + 0.5 Zeatin + 0.1 NAA + 1.0 GA ₃	70.65 ± 0.89 a	54.91 ± 15.39 a
B	MS + 0.5 Zeatin + 0.1 IAA + 1.0 GA ₃	65.07 ± 14.44 a	47.59 ± 7.39 b
C	MS + 0.4 Zeatin + 0.08 NAA + 0.2 GA ₃	37.36 ± 3.65 b	12.92 ± 3.67 c
D	MS	38.74 ± 9.69 b	11.89 ± 6.55 c

2.5 不同基因型马铃薯存活率和再生率的差异

对 4 个马铃薯品种（表 4）采用以上单因子试验选出的马铃薯茎尖，用含 0.3 mol · L⁻¹和 0.5 mol · L⁻¹蔗糖的液体 MS 培养基依次预培养各 1 d，0℃下 PVS₂ 处理 30 min，化冻后转入 MS + 0.5 mg · L⁻¹ Zeatin + 0.1 mg · L⁻¹ NAA + 1.0 mg · L⁻¹ GA₃ 的恢复培养基培养。可以看出，坝 10 和克新 4 号存活率和再生率最高（表 4）。

表 4 品种对存活率和再生率的影响

Table 4 The effect of cultivars on survive rate and regeneration rate

品种 Cultivar	存活率/% Survive rate	再生率/% Regeneration rate
坝 10 Ba 10	85.93 ± 9.56 a	76.03 ± 7.50 a
东农 303 Dongnong 303	77.03 ± 4.95 b	47.05 ± 5.28 b
克新 4 号 Kexin 4	91.06 ± 2.63 a	73.09 ± 14.61 a
克新 17 号 Kexin 17	73.79 ± 17.14 b	51.75 ± 11.19 b

2.6 再生植株的遗传稳定性分析

75 对引物总共扩增出 476 个 DNA 片段，不同引物的扩增条带数从 2~16 条不等，平均每对引物扩增 6.03 条。保存前的试管苗和超低温保存后的再生植株的扩增条带完全相同（图 2），说明两者之间没有发生变异。其中坝 10 有 334 条带，东农 303 有 342 条带，克新 4 号有 321 条带，克新 17 号有 342 条带。

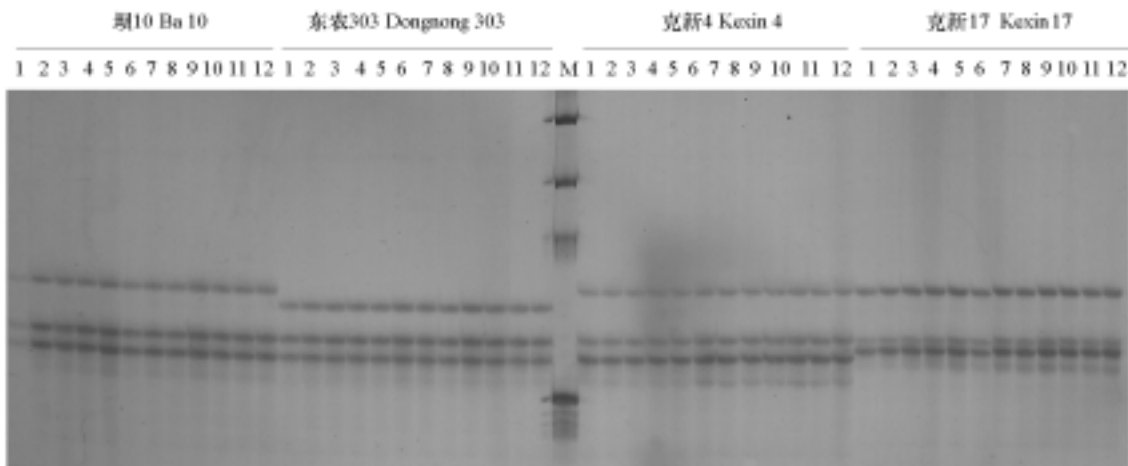


图 2 SSR引物STI021对各品种试管苗和超低温保存后再生苗的扩增情况

1、2为试管苗，3~12为超低温保存后的再生苗。M为标准分子量。

Fig. 2 DNA fingerprinting of varieties detected by SSR primer STI021

1, 2 are *in vitro* plantlet, 3–12 are regenerated plantlets. M is DNA ladder.

3 讨论

在超低温条件（一般指液氮低温，-196℃）下几乎所有的细胞代谢活动和生长都停止，而细胞活力和形态发生的潜能可保存，这样可保持细胞培养物的遗传稳定性（张江丽等，2008）。

超低温保存过程中，材料的预培养是保存后能够成活的重要步骤（梁宏和王起华，2005）。预培养增强细胞分裂与分化的同步化，减少细胞内自由水的含量，降低冰点从而阻止冻存过程中冰晶生长对细胞膜的伤害（卢利平和艾鹏飞，2007）。Kaczmarczyk等（2008）认为较高可溶性糖浓度可能是超低温保存后再生率提高的原因。可溶性糖在超低温保存冷冻过程中有使膜稳定（Anchordoguy et al., 1987；Hinchey, 1990）和减少细胞渗透水含量（Hitmi et al., 1999）以防止细

胞内结冰的作用。但本研究的结果表明，用含有 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 液体培养基对马铃薯茎尖进行梯度脱水后，茎尖的存活率和再生率最高；当用含有更高浓度蔗糖 MS 液体培养基进行梯度脱水时，茎尖的存活率和再生率反而下降，这可能与马铃薯对高浓度蔗糖耐性差有关。

DMSO 属于渗透型的保护性物质，在 0℃ 时对细胞的毒害较轻（Matsumoto et al., 1995；Gupta & Reed, 2006），在一定时间内能使细胞内自由水减少，保护性物质增多，但时间过长 DMSO 会对细胞造成伤害甚至死亡。在本试验中使用含有 DMSO 的冷冻保护液对经过预培养的马铃薯茎尖进行处理，得到了比较高的存活率和再生率，尤其是使用 PVS₂ 在 0℃ 处理 30 min 时的效果最好；因此，冷冻保护液的处理时间和冷冻保护液的温度是影响超低温保存后茎尖存活率的重要因素（Niino et al., 1992；Takagi et al., 1997）。另外，经过超低温保存后的茎尖在恢复培养过程中，恢复培养基含有 NAA 要比含有 IAA 产生更高的存活率和再生率，激素的种类和浓度也是影响存活率和再生率的重要因素。

试验结果表明，小滴玻璃化法保存的 4 个马铃薯品种之间茎尖存活率和再生率差异显著，平均存活率和再生率为 79.91% 和 62.52%。其中克新 4 号的存活率最高，为 91.06%，坝 10 的再生率最高，为 76.03%。通过研究预培养、玻璃化液、PVS₂ 脱水时间和恢复培养基对坝 10 茎尖存活率和再生率的影响，初步构建了马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存体系，即将 1.0 mm 左右的茎尖顺序在含有 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的液体 MS 培养基中预培养各 1 d 后，用 PVS₂ 于 0℃ 下处理 30 min，然后液氮保存至少 1 h，在室温用含 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 培养液化冻并洗涤 30 min，最后转入 MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zeatin + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 恢复培养基上再培养。

由于茎尖分生组织细胞分化程度低，在植物离体保存后的再生过程中，比其他细胞培养物的遗传性稳定，所以茎尖分生组织是超低温保存的一种理想材料。在本研究中，超低温保存后的茎尖分生组织直接长成完整的小植株，这样既可快速地进行无性繁殖，又避免了形成愈伤组织所产生的遗传变异；尤其对那些易产生体细胞变异的营养繁殖作物来说，茎尖分生组织的超低温保存是保存种质资源较为理想的技术手段。本研究中采用 SSR 分子标记对经过超低温保存后的马铃薯再生植株进行了遗传稳定性的检测，结果发现超低温保存前的试管苗与再生植株的扩增结果完全一致，没有检测出遗传变异，从而为马铃薯种质资源的长期保存提供了理论依据和技术支撑。

References

- Anchordoguy T J, Rudolph A S, Carpenter J F, Crowe J H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24: 324–331.
- Ashmore S, Azimi M, Drew R A. 2001. Cryopreservation trials in *Carica papaya*. *Acta Hort*, 560: 117–120.
- Bajaj Y P S. 1977. Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at -196°C . *Crop Improvement*, 4: 48–53.
- Bouafia S, Jelti N, Lairy G, Blanc A, Bonnel E, Dereuddre J. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. *Potato Research*, 39: 69–78.
- Colosi J C, Schaal B A. 1993. Tissue grinding with ball bearings and vortex mixer for DNA extraction. *Nucleic Acids Res*, 21: 1051–1052.
- Feingold S, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M, Lorenzen J. 2005. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet*, 111: 456–466.
- Ghislain M, Spooner D M, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Vázquez C, Waugh R, Bonierbale M. 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet*, 108: 881–890.
- Grout B W W, Henshaw G G. 1978. Freeze preservation of potato shoot-tip cultures. *Annals of Botany*, 42: 1227–1229.
- Gupta S, Reed B M. 2006. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *Cryo-Letters*, 27 (1): 29–42.

- Hillis D M , Larson A , Kavis S K , Zimmer E A. 1990. Nucleic acids. III. Sequencing Hillis D M , Moritz C. Molecular systematics. Sinauer Associates , Sunderland , Massachusetts : 318 – 370.
- Hincha D K. 1990. Differential effects of galactose containing saccharides on mechanical freeze-thaw damage to isolated thylakoid membranes. Cryoletters , 11 : 437 – 444.
- Hirai D , Sakai A. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. Potato Research , 42 : 153 – 160.
- Hitmi A , Barthomeuf C , Sallanon H. 1999. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. Cryoletters , 20 : 113 – 120.
- Kaczmarczyk A , Shvachko N , Lupysheva Y , Hajirezaei M R , Joachim Keller E R. 2008. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. Plant Cell Rep , 27 : 1551 – 1558.
- Kim H H , Lee J K , Hwang H S. 2007. Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique. Cryoletters , 6 : 471 – 482.
- Leunufna S , Keller E R J. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) . Plant Cell Rep , 21 : 1159 – 1166.
- Liang Hong , Wang Qi-hua. 2005. The cryopreservation of plant germplasm by vitrification. Chinese Journal of Cell Biology , (27) : 43 – 45. (in Chinese)
- 梁 宏 , 王起华 . 2005. 植物种质的玻璃化超低温保存 . 细胞生物学杂志 , (27) : 43 – 45.
- Lu Li-ping , Ai Peng-fei. 2007. Study on cryopreservation and plant regeneration of *in vitro* shoot-tips of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara. by vitrification. Journal of Anhui Agri Sci , 35 (35) : 11394 – 11395 , 11398. (in Chinese)
- 卢利平 , 艾鹏飞. 2007. 冬凌草试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生研究. 安徽农业科学 , 35 (35) : 11394 – 11395 , 11398
- Matsumoto T , Sakai A , Takahashi C. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by encapsulation-vitrification method. Cryo-Letters , 16 (4) : 189 – 196.
- Mix-Wagner G , Conner A J , Cross R J. 2000. Survival and recovery of *asparagus* shoot-tips after cryopreservation using the ' Droplet ' method. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science , 28 (4) : 283 – 287.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York : Columbia University Press : 190 – 191.
- Niino T , Sakai A , Yakuwa H , Nojiri K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown tips of apple and pear by vitrification. Plant Cell , Tissue and Organ Culture , 28 : 261 – 266 .
- Sant R , Panis B , Taylor M , Tyagi A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. Plant Cell Tiss Organ Cult , 92 : 107 – 111.
- Schäfer-Menuhr A , Müller E , Mix-Wagner G. 1996. Cryopreservation : An alternative for the long-term storage of old potato varieties. Potato Research , 39 : 507 – 513.
- Song Ji-ling , Liu Chang-chen , Sun Bang-sheng , Liu Xi-cai , Zhang Li-juan , Zhang Wen-ying , Li Jun. 2009. Cryopreservation of *in vitro* plants of potato germplasm by vitrification method. Chinese Potato Journal , 23 (5) : 268 – 270. (in Chinese)
- 宋继玲 , 刘长臣 , 孙邦升 , 刘喜才 , 张丽娟 , 张文英 , 李 军. 2009. 基因库中马铃薯种质资源超低温保存技术研究. 中国马铃薯 , 23 (5) : 268 – 270.
- Takagi H , Tien Thinh N , Islam O M , Senboku T , Sakai A. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schoff] by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. Plant Cell Reports , 16 (9) : 594 – 599.
- Wang Yong-lin. 2006. Study on cryopreservation of potato shoot tips. Gansu Agr Sci and Techn , (10) : 3 – 5. (in Chinese)
- 王永林. 2006. 马铃薯茎尖超低温保存研究. 甘肃农业科技 , (10) : 3 – 5.
- Zhang Jiang-li , Jia Yong-hong , Zhao Mei-ying , Feng Qing-min , Chen Cai-juan. 2008. Cryopreservation of sweet-potato shoot-tips by vitrification. Journal of Jiangsu Agri Sci , (1) : 243 – 245. (in Chinese)
- 张江丽 , 贾永红 , 赵美英 , 冯庆敏 , 陈彩娟. 2008. 玻璃化法超低温保存甘薯茎尖. 江苏农业科学 , (1) : 243 – 245.