

引用格式: 赵月, 单璐, 陈之光, 等. 象鼻兰茎尖小液滴玻璃化超低温保存体系建立[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(5): 1102–1109. ZHAO Yue, SHAN Lu, CHEN Zhiguang, *et al.* Establishment of droplet vitrification cryopreservation system for *Phalaenopsis zhejiangensis* shoot tips[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(5): 1102–1109.

象鼻兰茎尖小液滴玻璃化超低温保存体系建立

赵月^{1,2}, 单璐³, 陈之光², 杨树华², 赵鑫², 寇亚平²,
葛红², 陈陆琴³, 任保青³, 郝瑞杰¹, 贾瑞冬²

(1. 山西农业大学园艺学院, 山西 太谷 030031; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所蔬菜生物育种全国重点实验室/农业农村部花卉生物学与种质创制重点实验室(北方), 北京 100081; 3. 太原植物园, 山西 太原 030025)

摘要: 【目的】探明象鼻兰 *Phalaenopsis zhejiangensis* 茎尖超低温保存的最适条件, 建立适用的小液滴玻璃化超低温保存体系, 以实现该物种种质资源的长期稳定保存。【方法】以象鼻兰组培苗为材料, 采用小液滴玻璃化法保存象鼻兰茎尖。通过单因素实验方法设置超低温保存程序中不同预培养基蔗糖浓度、不同装载处理时间和不同玻璃化溶液(PVS2)处理时间, 优化保存条件, 并通过石蜡切片观察超低温保存过程中茎尖组织结构的受损情况。【结果】将象鼻兰茎尖放在 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖预培养基中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下保存 2 d, 装载溶液处理 20 min, 玻璃化溶液处理 120 min 后, 再将茎尖放入锡纸条的小滴中, 经液氮冷冻处理 1 h, 卸载溶液处理 20 min, 最高存活率为 70.0%。经再生培养后, 再生率为 43.33%。同时对石蜡切片进行组织观察发现: 液氮冻存及卸载环节对细胞结构与功能的损伤程度较为显著。因此, 在冻存前对象鼻兰茎尖进行预培养及装载处理优化, 对于降低细胞损伤及维持细胞完整性具有重要的作用。【结论】成功建立了小液滴玻璃化法超低温保存体系, 为象鼻兰种质资源的长期保存提供了一种高效且操作简便的方法。图 4 参 34

关键词: 象鼻兰; 茎尖; 小液滴玻璃化; 超低温保存

中图分类号: S68 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)05-1102-08

Establishment of droplet vitrification cryopreservation system for *Phalaenopsis zhejiangensis* shoot tips

ZHAO Yue^{1,2}, SHAN Lu³, CHEN Zhiguang², YANG Shuhua², ZHAO Xin², KOU Yaping²,
GE Hong², CHEN Luqin³, REN Baoqing³, HAO Ruijie¹, JIA Ruidong²

(1. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030031, Shanxi, China; 2. National Key Laboratory of Vegetable Biobreeding/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Flower Crops (North China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Taiyuan Botanical Garden, Taiyuan 030025, Shanxi, China)

Abstract: [Objective] This study aims to explore the optimal conditions for cryopreservation of *Phalaenopsis zhejiangensis* shoot tips and establish an applicable droplet vitrification preservation system for long-term and stable conservation of its germplasm resources. [Method] *P. zhejiangensis* seedlings were used as experimental materials, and droplet vitrification cryopreservation method was used to preserve *P. zhejiangensis* shoot tips. By a single factor test method, pre-cultured sucrose concentrations, loading time, and different vitrification solution (PVS2) treatment time were set in the cryopreservation preservation program to optimize the preservation

收稿日期: 2025-03-04; 修回日期: 2025-07-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1600505, 2021YFD1200205)

作者简介: 赵月(ORCID: 0009-0001-7572-1641), 从事花卉种质资源与遗传育种研究。E-mail: zy18303582663@163.com。通信作者: 郝瑞杰(ORCID: 0000-0002-0849-0046), 教授, 博士, 从事植物芳香机制及代谢研究。E-mail: hrj000@126.com。贾瑞冬(ORCID: 0000-0002-2650-1650), 副研究员, 博士, 从事花卉种质资源与遗传育种研究, E-mail: jjaruidong@caas.cn

conditions. Paraffin sections were used to observe the damage to the shoot tip tissue structure during ultra-low temperature preservation. [Result] The highest survival rate of 70.0% was achieved when the shoot tips of *P. zhejiangensis* were stored in a $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose pre-culture medium at 4°C in the dark for 2 days, treated with loading solution for 20 minutes and vitrification solution for 120 minutes, then placed into small droplets of tin foil, frozen in liquid nitrogen for 1 hour, and treated with unloading solution for 20 minutes. After regeneration culture, the regeneration rate was 43.33%. Histological observation of paraffin sections revealed that the damage to cell structure and function caused by liquid nitrogen freezing and unloading was relatively significant. Therefore, optimizing the pre-culture and loading treatment of the shoot tips of *P. zhejiangensis* prior to cryopreservation was of great significance for reducing cellular damage and maintaining cell integrity. [Conclusion] The established droplet vitrification cryopreservation system offers an efficient and simple method for long-term conservation of *P. zhejiangensis* germplasm resources. [Ch, 4 fig. 34 ref.]

Key words: *Phalaenopsis zhejiangensis*; shoot tips; droplet vitrification; cryopreservation

象鼻兰 *Phalaenopsis zhejiangensis* 是兰科 Orchidaceae 蝴蝶兰属 *Phalaenopsis* 植物^[1], 是中国特有兰科植物, 主要分布在浙江省杭州市临安、淳安等地, 在陕西、安徽、甘肃等地有少量分布。象鼻兰首次发表时为新属, 即象鼻兰属 *Nothodoritis*^[2], 后重新分类, 归蝴蝶兰属^[3]。象鼻兰喜通风、潮湿的环境, 原生境多近溪流小河, 附生在树龄较大且青苔较多的山核桃 *Carya cathayensis*、银杏 *Ginkgo biloba*、枫杨 *Pterocarya stenoptera* 等的树枝和树干上。象鼻兰是单轴类兰花, 茎极短小, 具 2~5 片叶, 在冬季掉落。花期 6—7 月, 总状花序, 1~2 个花序, 花较多, 花朵为白或浅绿色底并带有深紫色条纹, 蕊喙狭长, 似象鼻。果实为蒴果^[1], 授粉后 60 d 左右种子成熟。象鼻兰被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II、《全国极小种群野生植物拯救保护工程规划》、《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》(UNCN)。2021 年 9 月公布的《国家重点保护野生植物名录》将象鼻兰列为一级保护植物。目前, 已对象鼻兰野外资源进行了调查, 并对象鼻兰种子萌发率进行了相关研究^[4]。

植物种质资源保存有原生境保存、迁地保存和离体保存 3 种方式^[5]。原生境保存能使植物在原生态环境中生长繁衍, 维持自然演化和遗传多样性, 但气候变化与病虫害威胁导致种质资源损失的可能性较大, 因此需利用其他保存形式补充^[6]。迁地保护是对栖息地破坏严重, 种群生存受到严重威胁的珍稀植物进行抢救性保护的有效途径, 需要良好的生境和人工养护, 但有些野生兰花对生长环境依赖性强, 不适于资源长期保存^[7]。离体保存是目前兰科植物最有效的资源保存方法, 主要包括离体限制生长保存和超低温保存^[8]。组培苗的离体限制生长保存仍需多次继代, 耗费大量的人力、物力, 且植物材料存在一定遗传变异的风险^[5]。

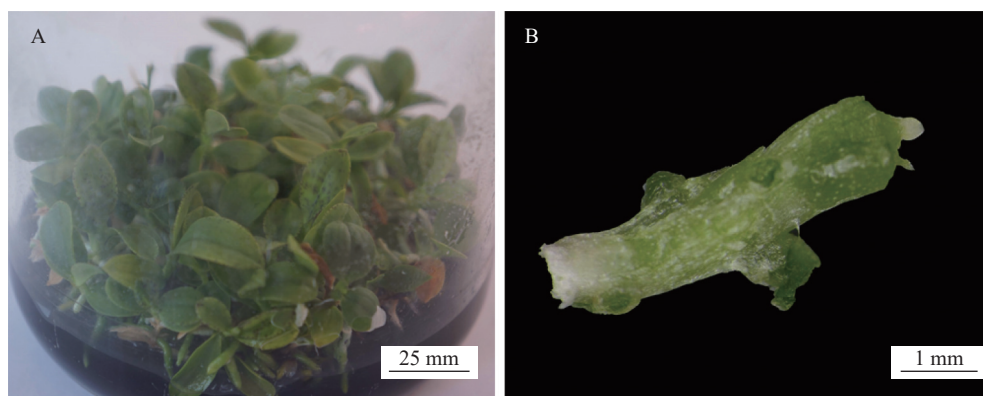
超低温保存技术是基于组织培养技术, 将植物外植体、愈伤组织、细胞等经冷冻保护剂处理后, 在超低温条件 (一般指 -196°C 的液氮低温) 下冻存的一种方法。该方法使植物体内生理生化活动几乎停止, 可降低在植物储藏过程中遗传变异的风险^[9], 是植物种质资源长期保存的有效方法之一。王军晖等^[10]指出: 玻璃化超低温保存法适用于园艺作物茎尖和分生组织的冻存, 效果优于其他方法。在兰科植物中, 该技术已经成功用于多个种质资源不同部位材料的保存, 包括种子、原球茎^[11]、类原球茎^[12]、花粉^[13]等。在超低温条件下, 植物细胞快速降温后, 细胞质溶液玻璃化, 使细胞不受直接伤害^[14]。小液滴玻璃化法 (droplet-vitrification) 是将植物材料经玻璃化处理后, 在铝箔上滴成小液滴, 直接投入液氮中迅速冷冻, 可实现材料的快速降温, 以提高保存后的活力^[15]。对 *Brassidium* (长萼兰属 *Brassia* × 文心兰属 *Oncidium*) 的流星兰 ‘Shooting Star’ 进行小液滴玻璃化处理, 得到高再生率^[16]。ZARGAR AZAD 等^[17]对 *Cephalanthera rubra* 茎尖进行液氮超低温保存, 得到 83.66% 的再生率。由于茎尖遗传稳定性较高, 可分化出与原生苗基因型几乎一致的再生植株, 适宜于长期保存。目前对蝴蝶兰属植物茎尖采用小液滴玻璃化法超低温保存的研究仍较少, 本研究以象鼻兰茎尖为试验材料, 优化预培养基蔗糖浓度、装载时间和玻璃化时间, 建立小液滴玻璃化超低温保存体系。通过组织学观察, 了解材料在超低温保存中组织结构的变化, 达到象鼻兰种质资源的长期保存目的, 为其他兰科珍稀濒危种质资源的超低温保存研究提

供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验在中国农业科学院蔬菜花卉研究所开展。象鼻兰种子于 2021 年 8 月采自浙江省杭州市临安区, 无菌播种萌发后生长 10 个月的实生苗用于茎尖的分离(图 1A)。将实生苗用镊子剥去外层叶片仅剩茎尖(图 1B), 作为超低温保存的材料。



A. 实生苗; B. 茎尖。

图 1 象鼻兰实生苗及茎尖

Figure 1 Seedlings and shoot tips of *P. zhejiangensis*

1.2 方法

1.2.1 小液滴超低温保存的基本程序 参照文献 [18] 的方法并适当改进。①预培养: 将分离的 5 mm 象鼻兰茎尖接种到浓度为 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的预培养基 ($1/2 \text{ MS} + 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $100.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 椰汁 + $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂) 上, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下黑暗培养 2 d。②装载处理: 将预培养后的象鼻兰茎尖放入含有装载溶液 ($1/2 \text{ MS} + 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $146.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙三醇) 的小烧杯中, 在室温下处理 20 min。③玻璃化溶液 (PVS2) 处理: 将装载溶液吸出, 加入 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 PVS2 溶液 ($1/2 \text{ MS} + 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $300.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙三醇 + $150.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二醇 + $150.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲基亚砜), 冰上处理 90 min。④小液滴处理: 将预先制备的长宽为 $3 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的锡纸条上均匀滴加新鲜的 PVS2 溶液 $5 \text{ } \mu\text{L}$, 将玻璃化后的茎尖放于该小滴溶液中。⑤液氮冷冻处理: 将放有象鼻兰茎尖的锡纸条迅速转移至预装液氮的冻存管中, 随后将该冻存管浸入液氮中冷冻保存 1 h。⑥卸载处理: 将含有茎尖组织的锡纸从液氮中取出后, 置于装满卸载溶液 ($1/2 \text{ MS} + 1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖) 的小烧杯中, 卸载处理 20 min。⑦再生培养: 将茎尖从卸载溶液中取出, 用滤纸吸干后置于恢复培养基 ($1/2 \text{ MS} + 20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $100.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 椰汁 + $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂 + $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭), 暗培养 7 d 后置于正常光照下继续培养。

1.2.2 超低温保存程序的优化 采用单因素实验方法对上述已设置的小液滴玻璃化超低温保存程序进行优化。①预培养基蔗糖浓度筛选: 设置 0、0.1、0.3、0.5、0.7 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 5 个处理, 其余步骤同 1.2.1。②装载溶液处理时间筛选: 设置 0、10、20、30、40、50 min 共 6 个处理, 预培养蔗糖浓度为步骤①筛选出的最佳结果, 其余步骤同 1.2.1。③PVS2 溶液处理时间筛选: 设置 0、30、60、90、120、150 min 共 6 个处理。预培养蔗糖浓度、装载处理时间为步骤①和步骤②筛选出的最佳结果, 其余步骤同 1.2.1。每个处理取 10 个茎尖, 重复 3 次, 以上实验均在超净台中完成。

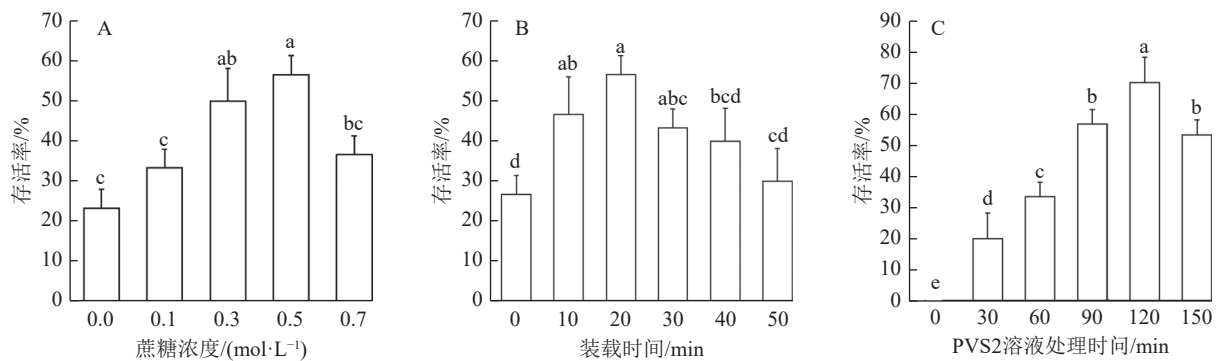
1.2.3 存活率及再生率测定 本研究采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色法^[19] 评估象鼻兰茎尖细胞的活力。具体操作为: 将经卸载溶液处理的茎尖转移到含有 1 mL TTC 染色液的离心管中, 确保样本完全浸没于染色液, 置于室温避光条件下染色 24 h。将去除卸载溶液的象鼻兰茎尖接种至恢复培养基, 暗培养 1 周后, 转移到正常光照条件下继续培养以促进进一步的恢复生长。观察到茎尖颜色由白色逐渐转变为绿色, 并在 7 d 后对茎尖的再生率进行统计分析。存活率 = (被染成红色的茎尖数 / 在 TTC 溶液中处理的总茎尖数) $\times 100\%$ 。再生率 = (再生茎尖数 / 去装载后接种茎尖总数) $\times 100\%$ 。

1.2.4 组织学观察 为了解在超低温保存过程中茎尖组织结构的受损情况, 对 8 种不同阶段的茎尖进行了石蜡切片观察, 即预培养 2 d、装载后、PVS2 后、经历冻存及解冻过程、卸载后、恢复再生、未经任何处理直接液氮冷冻的茎尖及正常生长未经任何处理的对照组茎尖。茎尖经甲醛-乙酸-乙醇 (FAA) 固定 24 h, 梯度乙醇脱水 1 h, 用环保浸蜡脱蜡透明液处理, 最后 45 ℃ 浸蜡; 65 ℃ 处理 24 h 完成包埋。包埋后的茎尖经过切片、烘干、脱蜡处理, 用质量分数为 0.1% 的甲苯胺蓝染色, 使用显微镜对染色后的组织进行观察并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 预培养基蔗糖浓度对象鼻兰茎尖超低温保存后存活率的影响

在其他条件 (装载时间 20 min、PVS2 处理 90 min、卸载 20 min) 不变时, 茎尖用不同蔗糖浓度预培养基驯化 2 d, 存活率如图 2。由图 2A 可知: 蔗糖浓度为 0.1~0.5 mol·L⁻¹ 时, 存活率呈逐渐上升趋势。蔗糖浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 时, 茎尖存活率最高, 达 56.7%。当蔗糖浓度上升到 0.7 mol·L⁻¹ 时, 存活率下降, 与蔗糖浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 的存活率存在显著差异 ($P<0.05$)。因此, 选用 0.5 mol·L⁻¹ 蔗糖浓度的预培养基进行后续实验。



不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。

图 2 超低温保存各环节不同处理对象鼻兰茎尖存活率的影响

Figure 2 Influence of different treatments in each step of cryopreservation on the survival rate of shoot tips of *P. zhejiangensis*

2.2 装载时间对象鼻兰茎尖超低温保存后存活率的影响

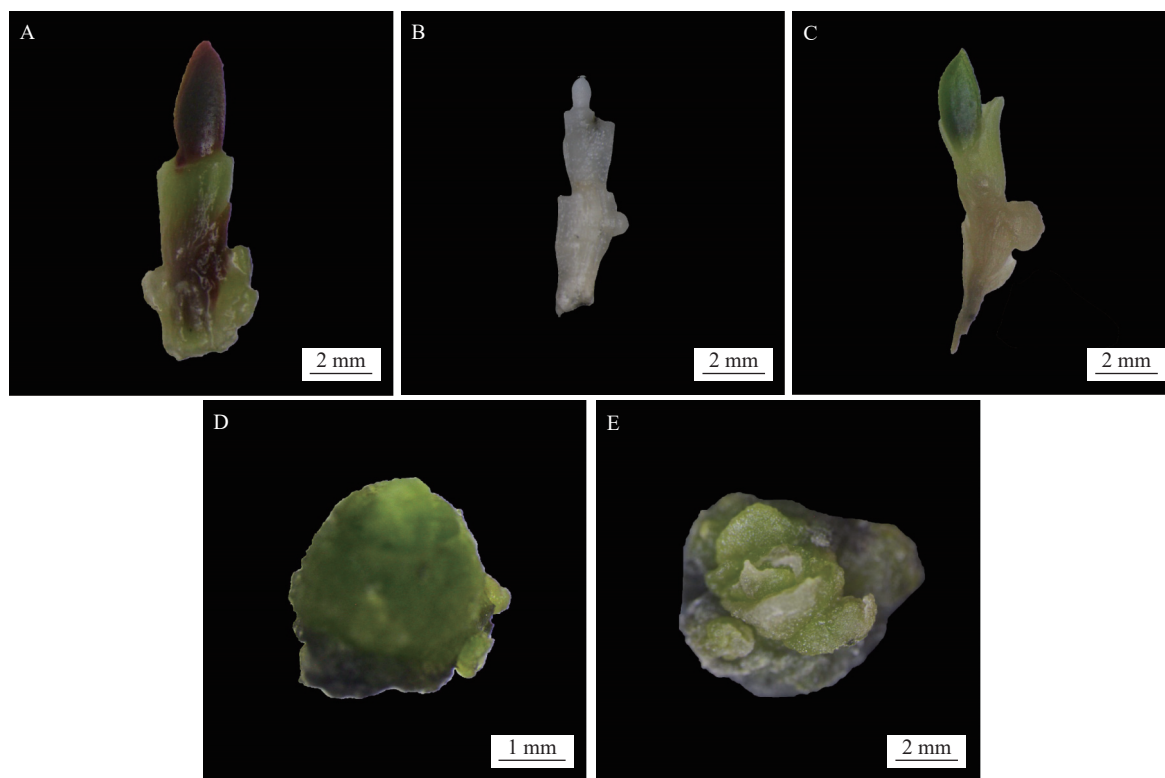
如图 2B 所示: 其他条件 (0.5 mol·L⁻¹ 预培养基驯化 2 d、PVS2 处理 90 min、卸载 20 min) 不变时, 存活率随装载时间增加呈先上升后下降的趋势, 装载时间为 20 min 时, 存活率达到最大值 56.7%, 与装载时间为 40 和 50 min 的存活率存在显著差异 ($P<0.05$)。随着处理时间的延长, 象鼻兰茎尖存活率逐渐下降。因此, 后续实验选用 20 min 为装载时间的处理。

2.3 PVS2 对象鼻兰茎尖超低温保存后存活率的影响

由图 2C 可知: 其他条件 (0.5 mol·L⁻¹ 预培养基驯化 2 d、装载时间 20 min、卸载 20 min) 不变时, 在未经 PVS2 溶液处理时, 其茎尖存活率降至 0, 表明玻璃化溶液处理在超低温保存中对茎尖存活至关重要, 且随处理时间延长, 茎尖的存活率逐渐提升; 处理 120 min 时, 茎尖存活率达到峰值, 为 70.0%, 与其他处理时间的存活率存在显著差异 ($P<0.05$), 之后呈现下降的趋势。结果表明: 象鼻兰茎尖的超低温保存时, PVS2 处理的最佳时间为 120 min。

2.4 象鼻兰茎尖超低温保存后的再生培养

经超低温处理的茎尖卸载, 以及 TTC 染色后存活茎尖如图 3A 所示。将其接种至恢复培养基中, 暗培养 7 d 后, 茎尖转移到新培养基中, 正常光照条件促进茎尖生长。培养 7 d 后, 象鼻兰茎尖的再生率为 43.33%。通过形态观察, 死亡的茎尖组织逐渐变为白色 (图 3B), 未能恢复绿色。存活的茎尖组织 (图 3C) 则表现出持续的体积膨胀现象, 并最终脱分化为愈伤组织 (图 3D)。再生培养 2 个月的茎尖形成类原球茎, 再生培养 3 个月后分化出芽原基 (图 3E)。可见愈伤组织的生成与茎尖组织的存活能力密切相关。



A.超低温处理后TTC染色存活的茎尖; B. 再生培养7 d后死亡的茎尖; C. 再生培养7 d后成活的茎尖; D. 再生培养2个月的茎尖; E. 再生培养3个月的茎尖。

图3 象鼻兰茎尖超低温保存后再生情况

Figure 3 Regeneration status following shoot tips cryopreservation in *P. zhejiangensis*

2.5 象鼻兰茎尖细胞组织观察

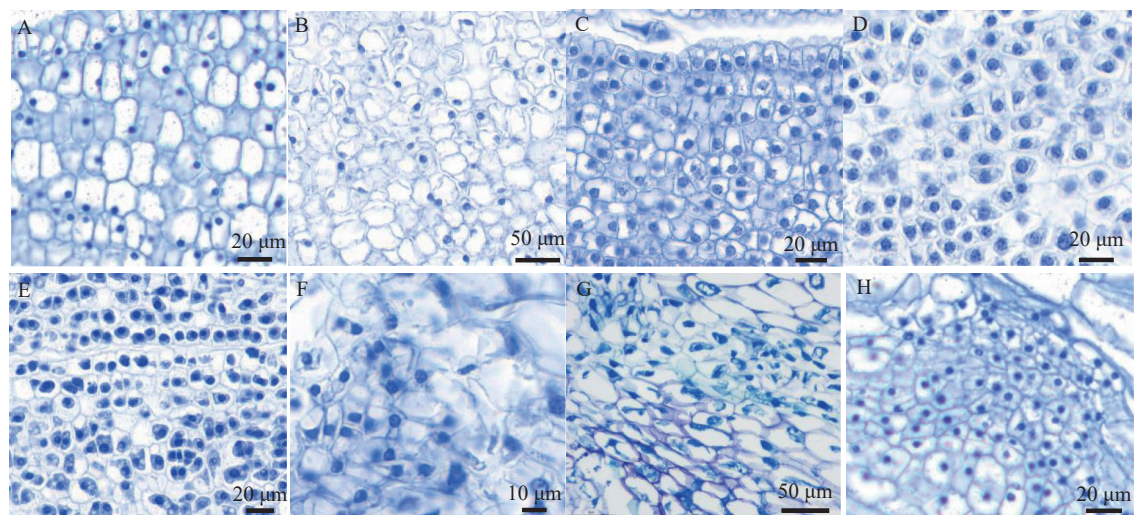
由石蜡切片可见：未经任何处理正常生长的象鼻兰茎尖，细胞排列疏松，体积较大，呈现椭圆形或长椭圆形，细胞核清晰可见，并进行旺盛的分裂活动(图4A)。未经任何处理直接投入液氮冻存的茎尖，发生细胞破裂，细胞壁被破坏，胞质外流，细胞形态不规则，散乱排列，细胞核消失，并且出现较为严重的质壁分离现象(图4B)。预培养后茎尖细胞小而排列紧密，细胞质及细胞核等染色加深，但与正常生长的茎尖无明显差别(图4C)。装载之后的细胞排列紧密，开始出现轻微的质壁分离现象(图4D)。在玻璃化溶液处理后茎尖细胞质壁分离现象加重，细胞核变得不清晰(图4E)。经冷冻卸载之后的细胞排列散乱，细胞壁破裂，结构不完整，细胞质等内容物散出，出现严重的质壁分离现象，细胞核染色加深(图4F, G)。恢复再生的茎尖细胞分裂旺盛(图4H)。

3 讨论

超低温保存技术应用日益广泛，小液滴玻璃化法具有适应性广、存活率和再生率高、样品处理量大、操作简易等优点，极大提高了植物种质资源的再生率^[20]。FOLGADO等^[21]采用小液滴玻璃化技术对白玉兰 *Magnolia heptapeta* 茎尖进行处理得到较高再生率。对菊花 *Chrysanthemum × morifolium* 小液滴玻璃化法超低温保存后的平均再生率为68.00%^[22]。杨晶文等^[23]对红豆越橘 *Vaccinium vitisidaea* 苗茎尖进行小液滴玻璃化处理，经再生培养，实现76.00%的高再生率。此外，小液滴玻璃化法在樱桃 *Prunus pseudocerasus*^[24]、苹果 *Malus pumila*^[25]、鳄梨 *Persea americana*^[26]、香葱 *Allium cepiforme*^[27] 等多种植物保存上也有成功报道。本研究采用小液滴玻璃化法进行象鼻兰茎尖超低温保存探索。

通过优化预处理条件，可以显著提高植物材料的抗冻性，提高存活率^[28]。LURSWIJIDJARUSA等^[29]发现：大苞鞘石斛 *Dendrobium wardianum* 茎尖在0.5 mol·L⁻¹蔗糖预培养后，超低温保存再生率较高。在象鼻兰茎尖预培养时，不同蔗糖浓度处理结果也存在显著差异，尤其是在0.5 mol·L⁻¹蔗糖预培养基中暗培养48 h后，茎尖存活率显著提升。

装载溶液通过渗透进入细胞内部，进而保护细胞膜及细胞内部结构的完整性，防止其在超低温保存



A. 正常生长的茎尖；B. 直接液氮冷冻后的茎尖；C. 预培养后的茎尖；D. 装载后的茎尖；E. PVS2处理后的茎尖；F. 液氮冷冻-解冻后的茎尖；G. 卸载后的茎尖；H. 再生培养2个月的茎尖。

图 4 象鼻兰茎尖在超低温保存过程中不同阶段的组织切片

Figure 4 Organ sections of *P. zhejiangensis* shoot tips after different cryopreservation treatments

过程中遭受损伤^[30]。在对珍贵种质蓝莓 *Vaccinium uliginosum* 进行小液滴玻璃化预培养处理后，用含有 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油的装载液处理茎尖 30 min，获得较高的存活率^[31]。在本研究中，茎尖预处理后，装载处理 20 min 得到较高存活率。玻璃化保护溶液可降低细胞内水分冰点，减少冰晶形成，降低细胞损伤风险。由于二甲基亚砜有较强毒性，因此，需控制 PVS2 处理时间。有研究对蔷薇 *Rosa* 茎尖进行冻存技术研究时，对比 3 种玻璃化溶液 (PVS2、PVS3 及 PVS4) 对存活率的影响，发现 PVS2 溶液处理的茎尖展现出最高的存活率^[32]。在本研究中所采用的玻璃化溶液为 PVS2。百合 *Lilium* 经液滴-玻璃化处理，于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下使用 PVS2 溶液浸泡 90~120 min，其存活率显著提高^[33]。铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 经 PVS2 溶液 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 150 min 后的存活率达 89.4%^[34]。在本研究中， $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 PVS2 溶液处理象鼻兰茎尖 120 min 的存活率最高，未经玻璃化处理的茎尖存活率极低。因此，玻璃化溶液的处理被认为是关键步骤。

在本研究中，将茎尖放入浓度为 $1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖卸载液中处理 20 min，可有效清除茎尖表面残留的 PVS2 溶液，避免 PVS2 溶液对茎尖的潜在二次毒性作用从而减少其对茎尖毒性影响，并显著提高存活率。

在对文心兰类原球茎进行组织结构观察，发现在玻璃化、液氮冻存-解冻阶段对类原球茎造成的损害较大^[12]。本研究发现：预培养和装载处理对细胞结构的影响较小，经过 PVS2 处理、液氮冷冻及随后的卸载步骤后，观察到细胞破裂现象显著增强。这可能是导致材料活性下降的关键因素，表明在关键阶段，细胞完整性受到了较大的影响。未经任何处理直接投入液氮的茎尖遭受了较严重的损伤，这一发现强调了在进行液氮冷冻保存前，采用适当浓度的预培养及装载溶液处理的必要性。

4 结论

本研究采用小液滴玻璃化法成功实现了象鼻兰组培苗茎尖的超低温保存，为珍稀植物种质资源的长期保存提供了有效途径。通过优化预培养、PVS2 处理及卸载等关键步骤，茎尖存活率达到 70.0%，再生率为 43.33%，证实了该方法在兰科植物中的适用性。通过石蜡切片观察发现：液氮冻存前的预处理和装载步骤对茎尖细胞结构影响较小，但在液氮冻融过程中，部分细胞结构发生显著变化甚至损伤。本研究建立了适用于象鼻兰茎尖的小液滴玻璃化法超低温保存体系。未来可进一步探索不同植物材料的适应性，优化冷冻保护剂配方及再生培养条件，提高保存效率和再生率，推动该技术在植物种质资源保护中的广泛应用。

5 参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 6 卷第 1 分册 蕨类植物门[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 383.

- Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Science. *Flora of China: Volume 6 Issue 1 Pteridophyta* [M]. Beijing: Science Press, 1999: 383.
- [2] 阮积惠, 丁炳扬. 象鼻兰[J]. 植物杂志, 1999(2): 8.
RUAN Jihui, DING Bingyang. *Phalaenopsis zhejiangensis* [J]. *Plant Magazine*, 1999(2): 8.
- [3] JIANG Ming, ZHU Yan, WU Qian, *et al.* Complete chloroplast genome of a rare and endangered plant species *Phalaenopsis zhejiangensis*: genomic features and phylogenetic relationship within Orchidaceae [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2021, 6(10): 2872–2879.
- [4] 吴婷, 葛红, 杨树华, 等. 秋水仙素诱导象鼻兰种子产生多倍体[J]. 北方园艺, 2022(2): 71–78.
WU Ting, GE Hong, YANG Shuhua, *et al.* Colchicine induces polyploidy in the seeds of *Phalaenopsis zhejiangensis* [J]. *Northern Horticulture*, 2022(2): 71–78.
- [5] 欧阳英. 几种兰科花卉的离体保存技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
OUYANG Ying. *Study on in vitro Preservation Technology of Several Orchidaceae Flowers* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010.
- [6] 边佳琪. 草莓组培苗种质资源离体保存的研究[D]. 天津: 天津农学院, 2020.
BIAN Jiaqi. *Study on in vitro Conservation of Strawberry Tissue Culture Seedling Germplasm Resources* [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2020.
- [7] 王逸涵, 王烁凯, 董美响, 等. 果树种质资源保存研究进展[J]. 北方园艺, 2024(5): 127–131.
WANG Yihan, WANG Shuokai, DONG Meixiang, *et al.* Progress research on conservation of fruit germplasm resources [J]. *Northern Horticulture*, 2024(5): 127–131.
- [8] 穆玉珍, 朱美瑶. 兰花组织培养研究进展[J]. 现代园艺, 2021(1): 24–26.
MU Yuzhen, ZHU Meiyao. Research progress in tissue culture of orchids [J]. *Xiandai Horticulture*, 2021(1): 24–26.
- [9] LI Jingwei, ZHANG Xiaochen, WANG Minrui, *et al.* Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp. [J/OL]. *Plant Methods*, 2019, 15(1): 125 [2025-02-25]. DOI: [10.1186/s13007-019-0506-9](https://doi.org/10.1186/s13007-019-0506-9).
- [10] 王君晖, 黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径: 文献综述[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 277–282.
WANG Junhui, HUANG Chunong. Vitrification: a new approach for cryopreserving shoot-tips and meristems of horticultural crops [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1994, 21(3): 277–282.
- [11] 姚昕, 兰芹英, 李枝林. 兰科植物种子及圆球茎的超低温保存研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2013, 28(6): 891–895.
YAO Xin, LAN Qinying, LI Zhilin. Advances of cryopreservation of orchid seed and protocorm [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2013, 28(6): 891–895.
- [12] 王春浩. 文心兰类原球茎玻璃化超低温保存及相关生理生化与组织学研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
WANG Chunhao. *The Cryopresevation of Oncidium Protocorm Like Bodies by Vitrification and Their Physiological and Histological Characteristics Analysis* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [13] 欧阳英, 李秉玲, 刘燕. 密花石斛花粉的保存方法研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(6): 151–154.
OUYANG Ying, LI Bingling, LIU Yan. Preservation of *Dendrobium densiflorum* pollen [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, 32(6): 151–154.
- [14] 陈品良. 植物组织培养物的超低温保存[J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(4): 390–398.
CHEN Pinliang. Cryopreservation of plant tissue cultures [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1989, 7(4): 390–398.
- [15] BAE J, LEE S Y, SONG J Y, *et al.* Efficient cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) germplasm using droplet-vitrification [J]. *Korean Journal of Plant Resources*, 2021, 34(6): 600–607.
- [16] RAHMAH S, AHMAD MUBBARAKH S, SINNIHAH U R, *et al.* Effects of droplet-vitrification on *brassidium* shooting star's orchid protocorm-like bodies (PLBs) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 197: 254–260.
- [17] ZARGAR AZAD M, KAVIANI B, SEDAGHATHOOR S. Cold storage and cryopreservation by encapsulation-dehydration of *Cephalanthera rubra* (L.) Rich., a threatened orchid species[J/OL]. *Acta Agrobotanica*, 2024, 77: 189312 [2025-02-24]. DOI: [10.5586/aa/189312](https://doi.org/10.5586/aa/189312).
- [18] PING K S, POOBATHY R R, ZAKARIA R, *et al.* Development of a PVS2 droplet-vitrification cryopreservation technique

- for Aranda Broga Blue orchid protocorm-like bodies (PLBs) [J]. *Cryo Letters*, 2017, **38**(4): 290–298.
- [19] 彭颖, 陈友锋, 乔谦, 等. 红丽海棠茎尖超低温保存技术研究[J]. 福建农业学报, 2023, **38**(5): 566–573.
PENG Ying, CHEN Youfeng, QIAO Qian, *et al.* Cryopreservation of *Malus* red splendor crabapple shoots [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, **38**(5): 566–573.
- [20] BI Wenlu, HAO Xinyi, CUI Zhenhua, *et al.* Droplet-vitrification cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2018, **54**(6): 590–599.
- [21] FOLGADO R, PANIS B. Cryopreservation of *Ashe magnolia* shoot-tips by droplet-vitrification [J]. *Acta Horticulturae*, 2019, **1234**: 233–240.
- [22] WANG Renrui, GAO Xiaoxia, CHEN Long, *et al.* Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification [J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, **176**: 330–339.
- [23] 杨晶文, 毛宇金, 李娟, 等. 红豆越橘组培苗茎尖小液滴玻璃化超低温保存[J]. 吉林农业大学学报, 2024, **46**(3): 439–445.
YANG Jingwen, MAO Yujin, LI Xian, *et al.* Cryopreservation of shoot tips of lingonberry *in vitro* culture by droplet-vitrification [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2024, **46**(3): 439–445.
- [24] ZHU D Z, CHEN X, WANG J W, *et al.* Orthogonal test design for optimization of the cryopreservation of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* L.) shoot tips by vitrification [J]. *Acta Horticulturae*, 2019, **1234**: 149–156.
- [25] FENG C H, LI B Q, HU L Y, *et al.* A comparison of two cryogenic protocols in cryopreservation of apple shoot tips [J]. *Acta Horticulturae*, 2014, **1039**: 161–166.
- [26] O'BRIEN C, HITI-BANDARALAGE J C A, FOLGADO R, *et al.* First report on cryopreservation of mature shoot tips of two avocado (*Persea americana* Mill.) rootstocks [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, **144**(1): 103–113.
- [27] WANG M R, ZHANG Z, HAUGSLIEN S, *et al.* Cryopreservation of shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*) shoot tips by droplet-vitrification [J]. *Acta Horticulturae*, 2019, **1234**: 241–248.
- [28] 俞嘉卿, 邱涵, 余文检, 等. 南方红豆杉悬浮细胞超低温保存体系的建立[J]. 江西农业大学学报, 2024, **46**(1): 118–127.
YU Jiaqing, QIU Han, YU Wenjian, *et al.* Establishment of cryopreservation system of *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension cells [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2024, **46**(1): 118–127.
- [29] LURSWIJIDJARUSA W, THAMMASIRI K. Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium walteri* oumae by encapsulation/dehydration [J]. *ScienceAsia*, 2004, **30**: 293–299.
- [30] LIN Liang, MA Junchao, AI Qin, *et al.* Lipid remodeling confers osmotic stress tolerance to embryogenic cells during cryopreservation[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(4): 2174[2025-02-24]. DOI: [10.3390/ijms22042174](https://doi.org/10.3390/ijms22042174).
- [31] WANG Liyu, LI Yadong, SUN Haiyue, *et al.* An efficient droplet-vitrification cryopreservation for valuable blueberry germplasm [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, **219**: 60–69.
- [32] HALMAGVI A, PINKER I. Cryopreservation of *Rosa* shoot tips: importance of preculture conditions [J]. *Acta Horticulturae*, 2006, **725**: 351–356.
- [33] CHEN X L, LI J H, XIN X, *et al.* Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification [J]. *South African Journal of Botany*, 2011, **77**(2): 397–403.
- [34] YIN Minghua, HONG Senrong. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2009, **98**(2): 179–185.