

# 木薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存技术优化

苗秀清<sup>1,2</sup>, 王敏瑞<sup>2</sup>, 李志英<sup>2</sup>, 李季<sup>3</sup>, 王小冰<sup>2</sup>, 符运柳<sup>2</sup>, 徐立<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>海南大学热带农林学院, 海口 570228; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/国家热带作物中期库/海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 儋州 571737; <sup>3</sup>云南农业大学热带作物学院, 普洱 665099)

**摘要:** 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 作为重要的粮食与经济作物, 其种质资源保存意义重大。目前小滴玻璃化法是操作最为简便、应用最广的茎尖超低温保存手段, 但并未对木薯茎尖小滴玻璃化法进行系统优化。为此本研究首先对木薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存过程中的关键步骤进行优化, 结果发现, 在加载液处理前增加 4 h 蔗糖预培养搭配 PVS2 植物玻璃化溶液冰上冷冻保护 50~60 min, 能显著提升冷冻保存效果, 但 15 个木薯品种的适用性测试结果不理想。因此本研究随后对茎尖超低温保存后的再生培养基进行优化, 发现再生培养基中去除奈乙酸 (NAA) 和添加较低浓度的 6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 可避免冷冻后茎尖形成愈伤组织从而提高再生率, 最终得到优化再生培养基 RMB2: 0.09  $\mu\text{mol/L}$  6-苄氨基嘌呤+0.23  $\mu\text{mol/L}$  赤霉素+4.4 g/L MS 培养基+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。木薯 COL777、SC8002 经冷冻保存后在 RMB2 上培养再生率分别为 86% 和 69%。RMB2 的 7 个木薯品种的测试发现, 有 4 个木薯品种经冷冻保存后茎尖再生率达到 30% 以上。综合来说, 80% 的木薯品种经优化后超低温保存技术冷冻保存后获得 30% 以上的再生率, 这一结果也使小滴玻璃化法具有更加广泛的品种适用性。本研究构建的小滴玻璃化法超低温保存体系简便高效, 可有力推动木薯种质资源超低温保存工作的开展, 更好地保护木薯种质资源。

**关键词:** 木薯; 小滴玻璃化; 超低温保存; 冷冻保护剂; 预培养; 植物生长调节剂

## Optimization on Cryopreservation Technique of Cassava Shoot Tips Using Droplet-vitrification

MIAO Xiuqing<sup>1,2</sup>, WANG Minrui<sup>2</sup>, LI Zhiying<sup>2</sup>, LI Ji<sup>3</sup>, WANG Xiaobing<sup>2</sup>, FU Yunliu<sup>2</sup>, XU Li<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228; <sup>2</sup>Tropical Crop Germplasm Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/National Gene Bank of Tropical Crops/Hainan Province Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation, Danzhou 571737; <sup>3</sup>College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er 665099)

**Abstract:** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), as an important food and economic crop, has significant implications for the conservation of its germplasm resources. Currently, the droplet-vitrification method is the most straightforward and widely applied technique for cryopreservation of shoot tips, but systematic optimization of this method for cassava shoot tips has not been conducted. Therefore, this study first optimized the key steps in the droplet-vitrification cryopreservation process for cassava shoot tips. This study found that adding a 4-hour sucrose preculture before treatment with loading solution, combined with ice-cold protection using PVS2 plant vitrification solution for 50 to 60 minutes, significantly improved the cryopreservation effect. However, the applicability test results for fifteen cassava varieties were unsatisfactory. Consequently, this study proceeded to optimize the regeneration medium after cryopreservation of shoot tips and found that removing 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and adding a lower concentration of 6-benzylaminopurine (6-BA) in the

收稿日期: 2025-01-19 网络出版日期: 2025-02-24

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250119001>

第一作者研究方向为植物种质资源保存, E-mail: 1822371302@qq.com

通信作者: 徐立, 研究方向为种质资源学, E-mail: xllzy@263.net

基金项目: 中央级科研事业单位基本科研业务费项目 (1630032022010, 1630032023011)

**Foundation project:** Basic Scientific Research Business Expense Projects of Central-level Scientific Research Institutions (1630032022010, 1630032023011)

regeneration medium could prevent the formation of callus from the shoot tips after freezing, thereby improving the regeneration rate. Ultimately, an optimized regeneration medium, designated as RMB2, was developed: 0.09  $\mu\text{mol/L}$  6-BA + 0.23  $\mu\text{mol/L}$  GA<sub>3</sub> + 4.4 g/L MS + 30 g/L Sucrose + 7 g/L Agar. The regeneration rates of cassava varieties COL777 and SC8002 after cryopreservation and culture on RMB2 were 86% and 69%, respectively. Testing of seven varieties on RMB2 revealed that four varieties achieved shoot tip regeneration rates above 30% after cryopreservation. Overall, 80% of the cassava varieties tested achieved regeneration rates above 30% after cryopreservation using the optimized droplet-vitrification method, making this method more widely applicable across different genotypes. The cryopreservation system established in this study, based on the droplet-vitrification method, is simple and efficient, which can effectively promote the cryopreservation of cassava germplasm resources and better safeguard them.

**Key words:** cassava; droplet-vitrification; cryopreservation; cryoprotectants; preculture; plant growth regulators

植物种质资源是生物多样性的关键组分,对维持生态稳定及推动农业育种工作意义重大。安全高效地保存作物种质资源关乎当下农业生产的可持续发展,也为保障未来粮食安全及应对复杂多变的环境挑战做好战略储备<sup>[1]</sup>。全球气候变化、病虫害频发及农业用地紧张使种质资源保存面临严峻考验,超低温保存技术借助液氮超低温环境(-196℃~-150℃)可使经过冷冻保护的植物细胞组织处于新陈代谢停滞的状态,极大降低种质资源长期保存带来的遗传变异风险<sup>[2]</sup>。超低温保存技术建立和应用后只需定期补充液氮,降低了长期保存过程中的人力物力投入,目前已经成为发达国家和重要国际农业组织长期保存植物种质资源的重要技术<sup>[3]</sup>。

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)为大戟科木薯属无性繁殖的双子叶多年生灌木,作为重要粮食作物,凭借耐旱、耐贫瘠及低成本优势在热带和亚热带地区广泛种植,为数十亿人口提供食物保障<sup>[4-5]</sup>。木薯在非洲、亚洲及拉丁美洲部分国家的膳食结构中至关重要,对解决粮食短缺问题起着不可替代的作用<sup>[6-7]</sup>。此外,木薯丰富的淀粉是生物燃料、造纸及纺织等行业重要原料,能创造可观经济效益并推动工业绿色发展,因此保护木薯种质资源的完整性与丰富度对全球粮食安全及农业经济稳定意义重大<sup>[8-9]</sup>。

当前,鉴于保护与评估木薯遗传多样性及育种计划的需要,中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所(中国热科院品资所)建设有国家木薯种质资源圃,保存了国内外木薯种质资源3000多份,是我国最大的木薯种质资源保存机构。此外中国热科院品资所运营的国家热带作物种质资源中期保存库备份保存有1000多份木薯试管苗资源。然

而随着引进木薯资源数量持续增长,木薯保存工作面临的压力和挑战也显著增加。一方面,田间资源圃占地面积大、人工投入高且易受不利天气和病虫害影响<sup>[10]</sup>;另一方面,试管保存方式需要定期进行继代培养,长期保存过程中有污染和体细胞变异的风险<sup>[11]</sup>。为了有效克服两种传统木薯保存方法的弊端和局限性,中国热科院品资所启动了关于木薯茎尖超低温保存技术的研究与应用工作,期望借助超低温保存技术更加全面地保存木薯种质资源。

木薯种质资源超低温保存的研究以茎尖为主,先后研究了早期的慢速冷冻法<sup>[10,12-14]</sup>、快速冷冻法<sup>[13-14]</sup>、包埋干燥法<sup>[14-15]</sup>、玻璃化法<sup>[17-18]</sup>、包埋玻璃化<sup>[11]</sup>、小滴玻璃化法<sup>[16,18-21]</sup>和铝盘玻璃化法<sup>[21]</sup>超低温保存方法。早期的快速冷冻法和慢速冷冻法虽为后续研究奠定了基础,却存在操作复杂和保存效果不稳定等弊端<sup>[10,12-14]</sup>。随后包埋干燥法通过优化处理条件,在一定程度上提高了冷冻保存效果,但基因型适用性测试结果仍不理想<sup>[14-16]</sup>。植物玻璃化溶液(PVS2, plant vitrification solution 2)发明后,玻璃化相关方法(玻璃化法、包埋玻璃化法等)优化了预培养和冷冻保护处理等关键步骤,显著提高了超低温保存后茎尖的存活率和再生率<sup>[11,17-18]</sup>。其中,Charoensub等<sup>[11]</sup>在包埋玻璃化技术研究发现2 mol/L甘油+0.6 mol/L蔗糖组合的渗透保护剂使存活率高达74.5%,且0℃相较于25℃下进行PVS2处理能获得更高的存活率。陈志林等<sup>[22]</sup>也采用包埋玻璃化法系统探究了木薯茎尖在不同预处理时长、温度及冷冻保护剂处理条件下的成活与再生状况,成功构建出一套木薯包埋玻璃化超低温保存方案。

随着技术的发展,小滴玻璃化法和铝盘玻璃化法等新方法极大提高了茎尖超低温保存的操作效

率和基因型适用性。两种方法均能实现茎尖快速冷却及复温,有效减少自由水结晶带来的细胞损伤,在一定程度上提高了存活率和再生率。Gueye等<sup>[21]</sup>在木薯的铝盘玻璃化法超低温冷冻保存中测试了36个品种,仅3个品种再生率小于30%,说明该法在木薯上有较高的基因型适用性。相较于铝盘玻璃化法,小滴玻璃化法操作简单、成本较低,可能更适用于大规模的冷冻保存工作中。目前小滴玻璃化法保存技术已在100多种植物物种上成功应用<sup>[21]</sup>,包括温带和热带地区的木本和草本植物种质资源<sup>[23]</sup>。

木薯小滴玻璃化法超低温保存体系均参照香蕉(*Musa acuminata* Colla, AAA Group)<sup>[24]</sup>茎尖开展试验,并在此基础上获得了以下进展:外植体选用组培苗获取茎尖冷冻后的再生率远高于田间植株获取茎尖<sup>[19]</sup>,3个月龄植株茎尖质量更高<sup>[20]</sup>;加载液处理时间2 h搭配PVS2处理时间30 min效果更佳<sup>[20]</sup>;在解冻后的恢复阶段逐步调整光照强度和培养基成分也可以提高保存效果<sup>[20]</sup>。然而该法在木薯上的现有研究并未对几个关键因素进行优化,如PVS2的处理方式、蔗糖预培养的处理、卸载复温的处理以及再生培养基。目前全球木薯超低温保存仅500份左右,显著滞后于马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、甘薯[*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkil]等其他根茎类作物<sup>[25]</sup>。

此外,现有木薯小滴玻璃化法超低温保存后的再生培养操作繁琐,通常会使用2~3种培养基,且这些培养基的成分较为复杂<sup>[16, 19-21]</sup>。例如,Dumet等<sup>[19]</sup>将木薯试管苗茎尖经小滴玻璃化法冷冻卸载处理后,先置于恢复培养基(102.6 g/L蔗糖+5.6 μmol/L抗坏血酸+2.5 g/L植物凝胶)上黑暗保持24 h,再将其转移至标准分生组织培养基(1.07 μmol/L萘乙酸+0.66 μmol/L 6-苄氨基嘌呤+0.23 μmol/L赤霉素+100 mg/L肌醇+80 mg/L腺苷硫酸盐+4.4 g/L MS培养基+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂)中继续培养;Escobar等<sup>[20]</sup>同样进行2~3步茎尖恢复培养,在43种基因型中约一半达到30%的再生率。复杂的再生培养基成分和繁琐操作降低了超低温保存的效率,因此有必要进一步开展优化,以建立简单高效的木薯茎尖冷冻后恢复再生培养体系。

超低温冷冻保存后的再生培养基中添加植物生长调节剂如6-苄氨基嘌呤(6-BA, 6-benzylaminopurine)、萘乙酸(NAA, 1-naphthaleneacetic acid)被证明对超低温冷冻保存后的再生率影响较大<sup>[26-28]</sup>,因此需对

现有的木薯茎尖超低温保存后再生培养基进行对比和优化,从而确定再生培养基中是否添加NAA及6-BA并筛选其添加浓度,以得到不产生愈伤组织且能获得高再生率的再生培养基。

因此,本研究以木薯茎尖为试验材料,对小滴玻璃化法超低温保存中的关键步骤及再生培养基进行优化,旨在建立一套简便有效的超低温保存技术应用体系,进而推动木薯种质资源长期安全保存工作,为木薯育种和科学研究提供可靠的种质资源保存手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

在前期研究中,全面考察了多种材料对本研究使用的现有小滴玻璃化法保存体系的反应,经综合评估,来自哥伦比亚的木薯COL777呈中等水平的反应(存活率及再生率达到30%以上),而来自中国海南的SC8002反应较差(存活率及再生率未能达到30%)。因此先以木薯品种COL777为材料,在小滴玻璃化法超低温保存过程中优化了PVS2处理时间、蔗糖预培养处理时间、卸载液中蔗糖浓度及处理时间;并在冷冻保存后优化对比了再生培养基不同组分。其次以COL777和SC8002为材料优化了6-BA在再生培养基中的添加浓度。另外随机选取来自不同地区的15个木薯品种,包括ZMH42、COL523-7(19S)、SM610-1、GR891、GR911、ZMG35、SC11、ZM9710、SC8002、ZMH588、SC205多倍体、ZM'50、桂热3号、CMR26-07-15、COL1061,利用优化后的小滴玻璃化保存流程进行适用性测试,进而更好的开展后续大规模的木薯种质资源超低温保存工作。所有木薯品种均由国家热带作物种质资源中期保存库提供。冷冻所用茎尖均为3个月龄生长健壮的木薯组培苗顶芽。无菌苗培养在无菌透明且带透气孔的组培袋中,每3个月进行一次传代培养,传代培养基为MS+30 g/L蔗糖+7 g/L卡拉胶,pH=5.8,121℃下高压灭菌20 min,培养条件为24℃,光照强度为40 μmol/(m<sup>2</sup>·s)的冷白色荧光管下,光周期为12 h光照/12 h黑暗。

### 1.2 茎尖超低温保存过程中的关键步骤优化

切取茎尖:从3个月龄组培苗上切取含3~4个叶原基的茎尖,茎尖大小为1.5~2.0 mm。

加载液处理:将茎尖放入加载液(2 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖),用镊子调整木薯茎尖使其浸入到加载液中,室温放置2 h。

**PVS2处理:**用移液管移去加载液,在培养皿中加入提前预冷到0℃的PVS2溶液,该溶液由MS液体培养基补充30%甘油(w/v)、15%乙二醇(w/v)、15%DMSO(w/v)和0.4 mol/L蔗糖组成。随后用镊子调整木薯茎尖使其浸入到PVS2溶液中,首先对比6个不同PVS2冰上处理时间(10、20、30、40、50、60 min)。

**液氮冷冻:**将茎尖转移到铝箔条(约2.5 cm×0.9 cm)上的PVS2小滴中,用镊子调整茎尖使其完全包裹在小滴中,将带有茎尖小滴的铝箔条直接浸入液氮中预冷2 min,随后将铝箔条放入液氮预冷的冷冻管中,再把冷冻管放入液氮预冷的冷冻盒,最后放入液氮生物储存罐中进行冷冻保存1周。

**卸载液处理:**将带茎尖的铝箔条从液氮中取出,立即放入卸载液(含1.2 mol/L蔗糖的MS液体培养基)中,并用镊子调整茎尖使其浸入卸载液中迅速解冻卸载,室温避光处理30 min。

**冷冻后培养:**茎尖卸载后于无菌滤纸上除去多余卸载液,接种于MS30培养基上进行3 d暗培养及4 d弱光(10 μmol/(m<sup>2</sup>·s))培养后移至正常光(40 μmol/(m<sup>2</sup>·s))培养,茎尖每隔一个月更换到新鲜MS30培养基上。培养3个月记录成活率和再生率。成活茎尖以保持绿色,有明显生长为标志;再生茎尖以茎部伸长1 cm以上且产生明显根系为标志。成活率和再生率定义为成活数和再生数与处理茎尖总数之比。

表1 4种不同再生培养基的成分及浓度

Table 1 Composition and concentrations of four different regeneration media

成分 Composition	再生培养基A RMA	再生培养基B RMB	再生培养基C RMC	MS30培养基 MS30 medium
Murashige 和 Skoog 培养基(g/L) MS	4.4	4.4	4.4	4.4
蔗糖(g/L) Suc	30	30	30	30
萘乙酸(μmol/L) NAA	1.07	1.07	0.05	
6-苄氨基嘌呤(μmol/L) 6-BA	0.66	0.66	0.09	
赤霉素(μmol/L) GA <sub>3</sub>	0.23	0.23	0.29	
肌醇(mg/L) Inositol	100		100	
腺苷硫酸盐(mg/L) Adenine sulfate	80			
盐酸硫胺素(μmol/L) Thiamine HCl			2.96	
琼脂(g/L) Agar	7	7	7	7

MS: Murashige and Skoog medium; Suc: Surose; RMA: Regeneration media A; RMB: Regeneration media B; RMC: Regeneration media C; 6-BA: 6-benzylaminopurine; NAA: 1-naphthaleneacetic acid; GA<sub>3</sub>: Gibberellin A<sub>3</sub>; The same as below

#### 1.4 木薯优化后超低温保存体系的适用性测试

随机挑选15个来自不同地区的木薯品种,利用优化关键步骤后的小滴玻璃化法进行体系的适用性测试,每个冷冻管保存10~15个茎尖,每个品种保存60~100个茎尖。分别在冷冻当天、冷冻后一周及

在加载液处理之前添加蔗糖预培养步骤,使用含0.3 mol/L蔗糖的MS液体培养基对比5个处理时间(0、4、16、24、48 h),在优化得到的PVS2冰上处理时间60 min的基础上进行超低温保存。随后采用最佳蔗糖预培养时间4 h、PVS2冰上处理时间60 min,对比卸载液处理中不同蔗糖浓度(0.6、0.8、1.2 mol/L),并在此优化的基础上进行卸载处理时间的对比(15、30、45、60 min)。最终将卸载后的茎尖在MS30固体培养基上培养,并记录茎尖的成活率和再生率。

#### 1.3 超低温保存后再生培养基对冷冻茎尖成活和再生的影响测定

首先对比再生培养基A(以下简称RMA)<sup>[29]</sup>、再生培养基B(以下简称RMB)<sup>[24]</sup>、再生培养基C(以下简称RMC)<sup>[20]</sup>与分别去除NAA的再生培养基A1(以下简称RMA1)、再生培养基B1(以下简称RMB1)、再生培养基C1(以下简称RMC1)对木薯COL777冷冻后茎尖恢复生长的影响,并设置MS30培养基为对照组(表1)。随后基于RMB1和RMC1优化6-BA添加浓度,设置7个处理(0.09、0.18、0.27、0.36、0.45、0.54、0.66 μmol/L),该研究在两种再生率不同的木薯品种COL777、SC8002中开展。所有再生培养基中pH调整至5.8,培养3个月记录成活率和再生率并观察有无愈伤组织形成。

冷冻1个月后(当天解冻的茎尖未经液氮罐保存,冷冻一周及一个月后解冻的两组茎尖在液氮罐中保存)解冻,并在MS30培养基上进行再生培养,先进行3 d暗培养后再转至弱光(10 μmol/(m<sup>2</sup>·s))培养4 d,随后转至正常光(40 μmol/(m<sup>2</sup>·s))进行培养,

茎尖每隔一个月更换到新鲜MS30培养基上,培养3个月记录成活率和再生率并进行评价分析。在此基础上,利用优化后得到的再生培养基对15个品种中未能成功保存即冷冻后再生率小于30%的品种进行适用性测试,以此考察优化后的超低温保存方案的适用范围是否扩大。

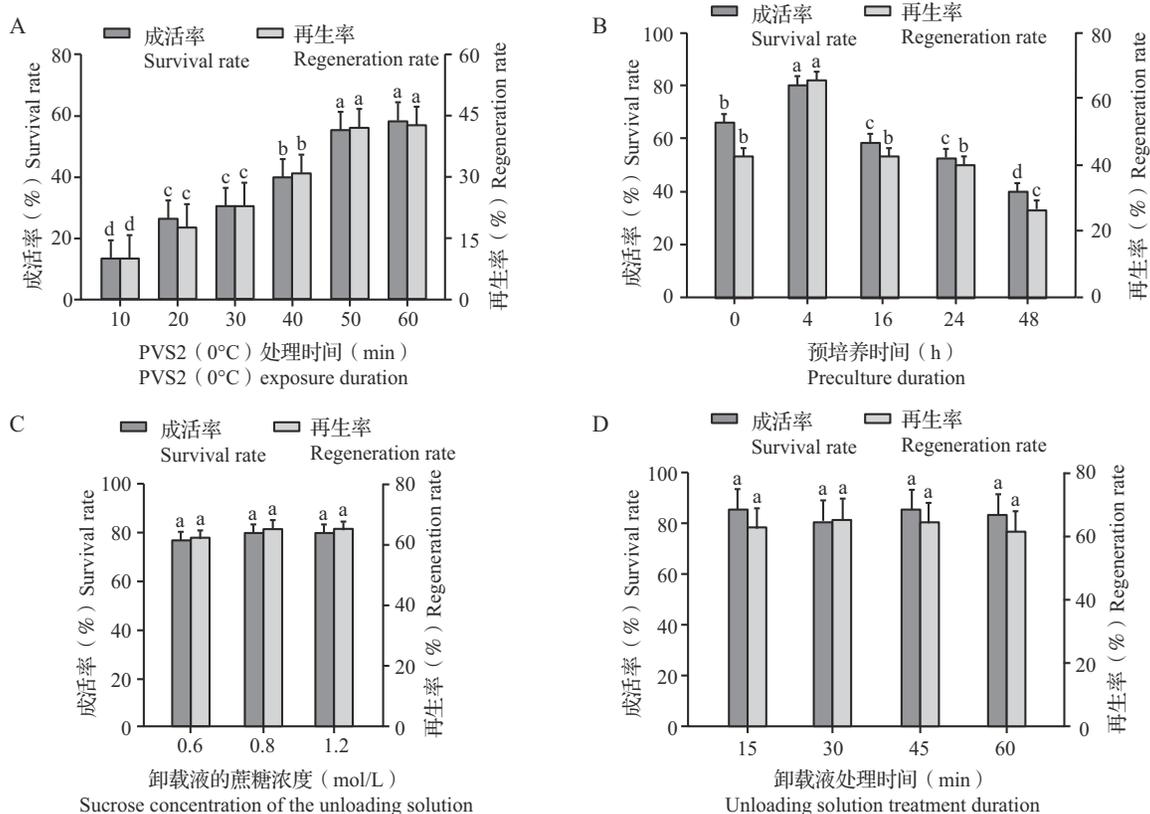
### 1.5 数据分析

本研究各试验为单因素试验,每个处理设3个重复,每个重复采用10~15个茎尖以获得相应处理后的成活率与再生率,且每个试验均重复两次,试验数据以平均值±标准误差表示。运用SPSS 26.0软件对数据进行正态性检验及方差齐性检验, $P \geq 0.05$ 说明数据服从正态分布及方差齐性,随后进行单因素方差分析,基于分析结果,针对关键因素对比试验所得到的数据,以邓肯多重范围检验差异显著性分析( $P < 0.05$ ),并用不同字母表示显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎尖超低温保存过程中的关键步骤优化

由于脱水干燥是影响超低温保存后茎尖再生的最重要步骤,本研究先进行 $0^{\circ}\text{C}$ 下PVS2处理时间的优化。结果表明当PVS2处理10 min时茎尖成活率和再生率均最低,分别为13.3%和10.0%(图1A);从10 min延长至50 min时,成活率和再生率显著提高,50~60 min时趋于稳定,60 min时成活率和再生率均最高,分别达到58.3%和42.8%(图1A)。随后在PVS2冰上处理60 min的基础上对茎尖0.3 mol/L蔗糖预培养时间进行优化,结果表明当不进行蔗糖预培养时,成活率和再生率分别为66.1%和42.8%;短暂蔗糖预培养4 h较0 h能够显著提高茎尖超低温保存后的成活率与再生率,该处理下得到最高的成活率和再生率,分别为80%和65.6%(图1B);相较于0 h,处理16 h与24 h时的再生率均无显著性差异。



A: PVS2( $0^{\circ}\text{C}$ )处理时间对木薯茎尖冷冻保存后成活和再生的影响; B: 蔗糖预培养对木薯茎尖冷冻保存后成活和再生的影响; C: 卸载溶液中蔗糖含量对茎尖成活和再生的影响; D: 卸载液处理时间对茎尖成活和再生的影响,其中卸载液的蔗糖浓度为0.8 mol/L;不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异;下同

A: Effect of PVS2 ( $0^{\circ}\text{C}$ ) exposure duration on the survival and regeneration of cassava shoot tips after cryopreservation; B: Effect of sucrose preculture on the survival and regeneration of cassava shoot tips after cryopreservation; C: Effect of sucrose content in the unloading solution on the survival and regeneration of shoot tips; D: Effect of unloading solution treatment duration on the survival and regeneration of shoot tips, the sucrose concentration of the unloading solution is 0.8 mol/L; Different lowercase letters indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level; The same as below

图1 优化木薯茎尖超低温保存过程中的关键步骤

Fig. 1 Optimize the key steps in the cryopreservation process of cassava shoot tips

在蔗糖预培养4 h及PVS2冰上处理60 min的基础上,对解冻卸载时所用卸载液中蔗糖浓度进行优化,木薯小滴玻璃化法中卸载液常用的1.2 mol/L蔗糖浓度下的成活率与再生率均与0.8 mol/L和0.6 mol/L处理下的结果无显著性差异,成活率平均为78.9%,再生率平均为64.4%(图1C)。本研究首次对卸载时长进行优化,结果表明在15~60 min之间获得的成活率与再生率无显著差异(图1D)。

## 2.2 优化后的小滴玻璃化法的适用性测试

优化关键步骤后的小滴玻璃化法对15个木薯品种进行适用性测试,计算木薯茎尖超低温保存后的成活率和再生率(表2)。结果显示只有7个木薯品种的再生率达到长期安全保存的标准(再生率 $\geq$ 30%),表明该体系还需继续优化。

表2 木薯茎尖小滴玻璃化体系的15个品种的适用性测试  
Table 2 Applicability testing of the vitrification system for cassava shoot tip droplets across 15 varieties

品种名 Variety name	成活率 (%) Survival rate	再生率 (%) Regeneration rate
ZMH42	82.2 ± 2.8	73.3 ± 2.4
COL5237(19S)	88.9 ± 2.2	64.4 ± 2.2
SM6101	82.2 ± 2.2	51.1 ± 2.2
GR891	80.0 ± 2.4	51.1 ± 2.2
GR911	73.3 ± 1.7	48.9 ± 2.8
ZMG35	77.8 ± 1.3	37.8 ± 2.2
SC11	62.2 ± 2.2	33.3 ± 1.7
ZM9710	60.0 ± 1.7	24.4 ± 2.2
SC8002	42.2 ± 2.8	22.2 ± 2.8
ZMH588	62.2 ± 2.2	15.6 ± 2.8
SC205 多倍体 SC205 polyploid	55.6 ± 2.8	13.3 ± 2.4
ZM'50	35.6 ± 2.8	15.6 ± 2.8
桂热3号 Guire No.3	57.8 ± 2.3	2.2 ± 1.4
CMR26-07-15	33.3 ± 1.7	0.0 ± 0.0
COL1061	11.1 ± 2.2	0.0 ± 0.0
平均值 Average	60.3 ± 2.3	30.2 ± 2.5

## 2.3 小滴玻璃化法超低温保存后再生培养基对成活和再生的影响

为进一步提高木薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存后的再生率,本研究应用前人报道的3种培养基(RMA、RMB与RMC)与本研究所用的对照组MS30培养基进行对比。结果表明,添加NAA的3种培养基虽然能够获得较高的成活率(高于60%),

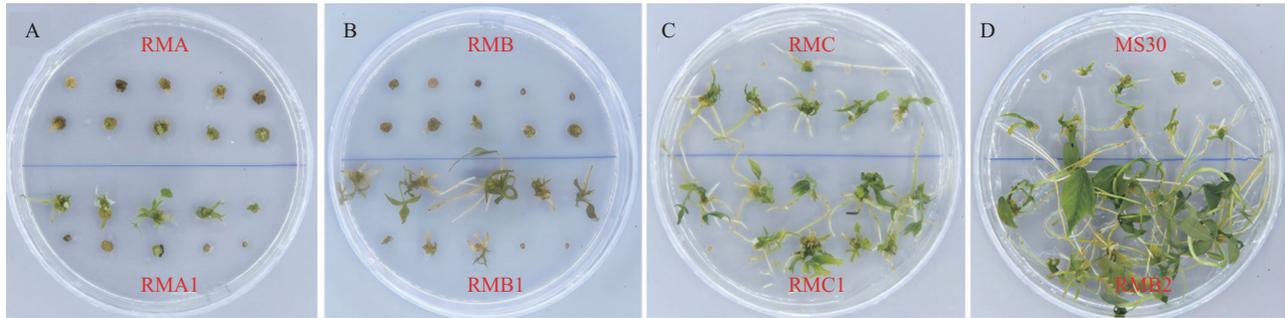
但三者再生率之间存在显著性差异,茎尖的生长形态也具有明显差异(图2,图3A)。其中RMA和RMB上恢复培养的茎尖生长形态一致,即基部均产生明显质密的愈伤组织且无法生根,再生率均为0(图3A);而RMC和MS30培养基上恢复培养的茎尖形态相似,即无明显愈伤组织产生,部分茎尖可直接再生发育成完整植株(图2C,D),再生率分别为44%和66%(图3A)。

为了降低茎尖恢复培养过程中的愈伤组织发生率,本研究去除了上述三种培养基中的NAA。结果表明去除培养基中的NAA显著减少了RMA1和RMB1上茎尖愈伤发生率,部分成活茎尖可产生根系并形成完整植株(图2A、B),成活率分别提高至62%和86%,再生率分别提高至21%和62%(图3A)。与添加NAA的三种培养基相比,冷冻茎尖在去除NAA的三种培养基上的再生率显著提高;RMC1上的茎尖成活率提高到91%,再生率达到86%,显著高于对照组MS30培养基及添加有NAA的RMC上的再生率(图3A)。

进一步基于RMB1和RMC1优化6-BA的添加浓度。研究表明随着6-BA浓度的增加,木薯COL777、SC8002的茎尖再生率在0.09~0.27  $\mu\text{mol/L}$ 范围内相对稳定,当浓度超过0.36  $\mu\text{mol/L}$ 时,茎尖在恢复过程中会产生愈伤组织,再生率随即降低。基于RMB1添加0.09  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的6-BA时,COL777、SC8002再生率最高,分别达86%、69%(图3B、C)。将基于RMB1添加0.09  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的6-BA的培养基命名为RMB2,与添加有1.07  $\mu\text{mol/L}$  NAA和0.66  $\mu\text{mol/L}$  6-BA的RMB及添加有0.66  $\mu\text{mol/L}$  6-BA的RMB1相比,木薯超低温保存后的茎尖在RMB2上培养3个月的再生植株根系发达,植株健壮(图2D)。

## 2.4 RMB2再生培养基的适用性测试

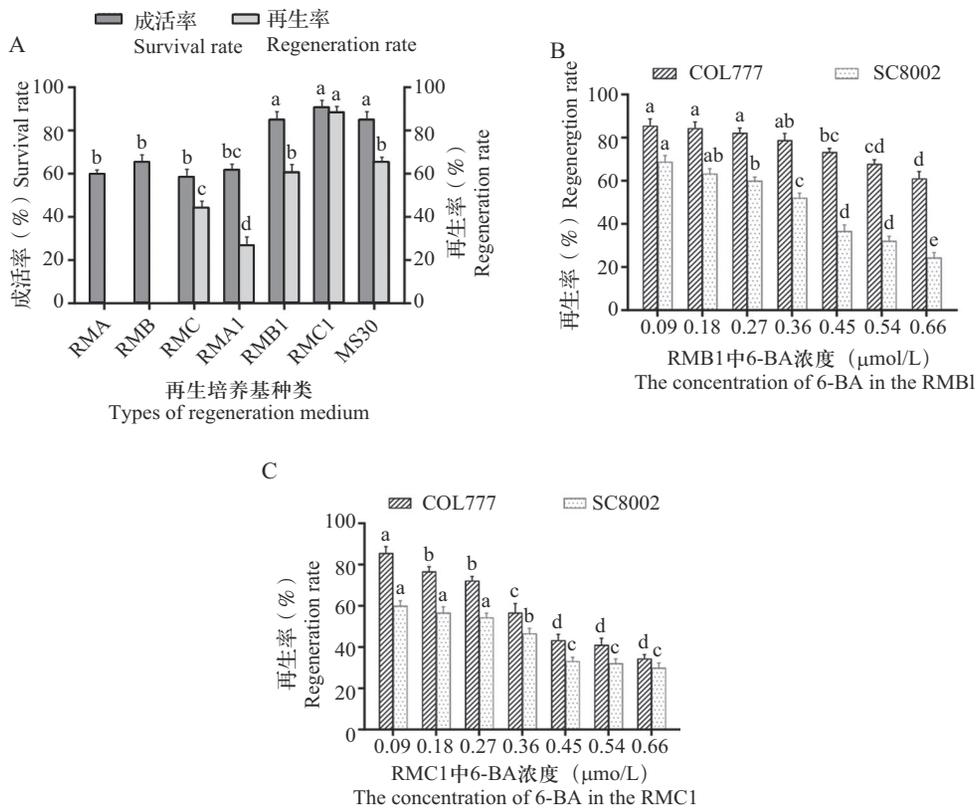
在以MS30培养基培养的15个木薯品种中,有8个品种的再生率未达到30%(表2)。本研究应用优化后的RMB2对这8个品种的木薯茎尖进行第二轮超低温保存的适用性测试,同样解冻3组。结果显示,其茎尖的成活率和再生率相较于MS30培养基均明显提升(表3)。其中5个品种的超低温保存再生率达到31.1%~68.9%之间,符合超低温长期保存的再生率标准;而CMR26-07-15、COL1061和ZM'50三个品种的再生率低于30%,这表明该超低温保存体系仍存在一定的品种适用性差异,需优化其他影响因素,进一步提高木薯超低温保存体系的适用范围。



RMA1: Regeneration media A1; RMB1: Regeneration media B1; RMC1: Regeneration media C1; RMB2: Regeneration media B2; MS30: Regeneration media MS30; The same as below

图2 木薯 COL777 冷冻茎尖在不同再生培养基上的反应情况

Fig. 2 Response of cassava COL777 shoot tips after cryopreservation on different regeneration media



A: 不同再生培养基种类对木薯 COL777 茎尖成活和再生的影响; B: RMB1 中不同 6-BA 浓度对木薯茎尖再生的影响; C: RMC1 中不同 6-BA 浓度对木薯茎尖再生的影响

A: Effects of different regeneration medium types on the survival and regeneration of cassava COL777 shoot tips; B: Effects of different 6-benzylaminopurine (6-BA) concentrations in RMB1 medium on the regeneration of cassava shoot tips; C: Effects of different 6-benzylaminopurine (6-BA) concentrations in RMC1 medium on the regeneration of cassava shoot tips

图3 不同培养基对木薯茎尖超低温保存后成活和再生的影响

Fig. 3 Effects of different media on the survival and regeneration of cassava shoot tips after cryopreservation

表3 优化得到的RMB2对8个木薯品种进行测试

Table 3 The optimized RMB2 was tested on eight cassava varieties

品种名 Variety name	成活率 (%) Survival rate	再生率 (%) Regeneration rate
SC8002	82.2 ± 2.2	68.9 ± 2.8
ZM9710	82.2 ± 2.8	60.0 ± 1.7
SC205 多倍体 SC205 polyploid	75.6 ± 2.8	53.3 ± 3.4

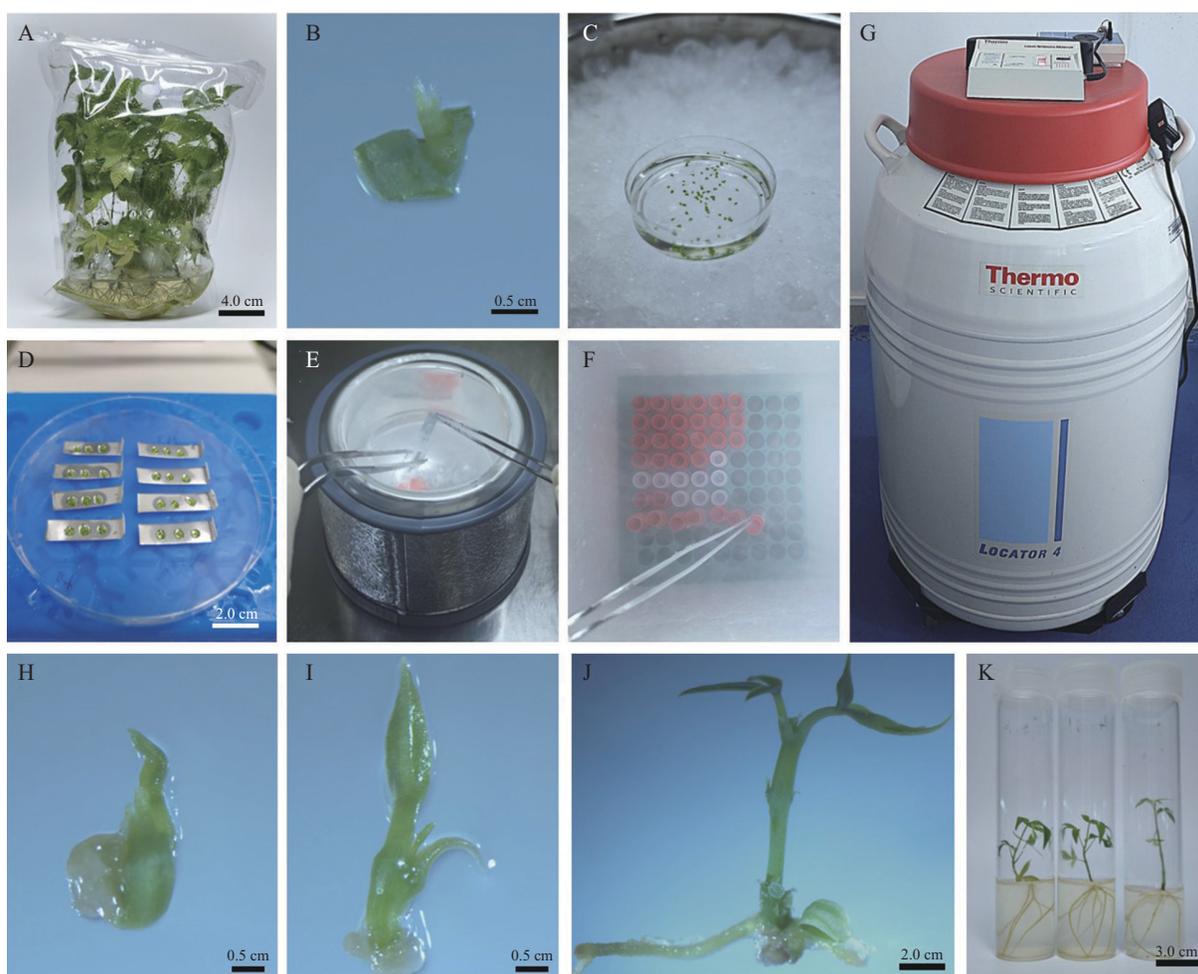
表3 (续)

品种名 Variety name	成活率(%) Survival rate	再生率(%) Regeneration rate
桂热3号 Guire No.3	68.9 ± 2.2	40.0 ± 1.7
ZMH588	68.9 ± 1.4	31.1 ± 2.2
ZM'50	55.6 ± 2.8	24.4 ± 2.2
CMR26-07-15	42.2 ± 3.3	17.8 ± 2.2
COL1061	28.9 ± 1.4	4.4 ± 1.4
平均值 Average	63.1 ± 2.8	37.5 ± 3.1

## 2.5 优化的木薯茎尖小滴玻璃化法冷冻保存体系

本研究优化后构建的木薯茎尖超低温保存体系如下:从培养3个月的组培苗(图4A)上切取

1.5~2 mm的顶芽茎尖(图4B)置于含0.3 mol/L蔗糖的MS液体培养基中预培养处理4 h;接着用加载液对茎尖短暂处理30 min(加载)后,将茎尖转移到



A: 待切取茎尖的木薯组培苗; B: 用于冷冻的茎尖; C: 将木薯茎尖在冰上进行PVS2冷冻保护; D: 将PVS2脱水处理后的茎尖转移到铝箔条的PVS2小滴中; E: 冷冻管; F: 冷冻盒; G: 液氮生物储存罐; H: 解冻后茎尖成活生长; I: 解冻后茎尖茎的伸长; J: 解冻后茎尖根的再生; K: 超低温保存后恢复的木薯再生试管苗

A: The cassava tissue culture plantlets from which the shoot tips will be excised; B: Shoot tips for cryopreservation; C: Treating cassava shoot tips with PVS2 cryoprotectant on ice; D: Transferring PVS2-dehydrated shoot tips to small droplets of PVS2 on aluminum foil strips; E: Cryovial; F: Cryobox; G: Liquid nitrogen biological storage tank; H: Survival and growth of the shoot tips after thawing; I: Elongation of the shoot tips' stems after thawing; J: Regeneration of roots from the shoot tips after thawing; K: Regenerated cassava plantlets in test tubes recovered after ultralow temperature preservation

图4 优化的木薯小滴玻璃化法超低温保存

Fig. 4 Optimized vitrification method for cryopreservation of cassava in droplet-vitrification

PVS2中于冰上(0℃)进行50~60 min的冷冻保护(图4C);然后把茎尖转入铝箔条上的PVS2小滴中(图4D),快速浸入液氮预冷,并将铝箔条移至预冷的冷冻管中(图4E),然后放入冷冻盒内(图4F),再浸入液氮罐中长期储存(图4G);当需要进行茎尖恢复再生时,迅速将冷冻管中粘附有茎尖的铝箔条浸入含0.8 mol/L蔗糖的卸载液中解冻并处理15~30 min,最后将茎尖接种于RMB2培养基(MS+30 g/L Suc+0.09 μmol/L 6-BA+0.23 μmol/L GA<sub>3</sub>+7 g/L Agar)中进行再生培养。木薯茎尖冷冻后在RMB2上培养经历3个关键阶段:茎尖成活(图4H),茎的伸长(图4I)以及根发生(图4J)。再生植株可转入试管中继续培养得到试管苗(图4K),并用于资源共享与后续评价。

### 3 讨论

利用植物玻璃化溶液进行茎尖超低温保存时,蔗糖预培养、玻璃化溶液冷冻保护、解冻卸载以及再生培养是影响茎尖超低温保存后再生的关键步骤,本研究通过优化这些关键步骤,最终获得了简单有效的木薯茎尖超低温保存体系。

冷冻保护是玻璃化法超低温保存中最关键的步骤,不同植物对PVS2冷冻保护液的耐受度不同<sup>[29-30]</sup>,因此必须针对不同物种进行优化。本研究发现木薯茎尖在0℃下使用PVS2处理50~60 min时能获得较高的再生率。这一结果与同为薯类的热带高山水果菊薯[*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Rob.]在小滴玻璃化法中优化所得的0℃下PVS2时间相似<sup>[31]</sup>。PVS2处理时间不足导致组织细胞内过多的自由水在后续冷冻及复温过程中结晶,带来较大的冷冻伤害,而过长时间的PVS2处理给组织细胞带来较大的渗透胁迫,同样影响超低温保存后的茎尖再生<sup>[31]</sup>。不同的保存方法对于PVS2的处理时间也有很大差异。Charoensub等<sup>[11]</sup>在木薯茎尖包埋玻璃化法的优化研究中发现PVS2在0℃下处理4 h时存活率最高,这是由于包埋减缓了PVS2的渗透速率,导致更长的处理时间。木薯茎尖超低温保存中存在室温与冰上两种PVS2处理方式,研究表明PVS2在0℃下处理的冷冻保存效果优于25℃,因此现有木薯小滴玻璃化均在冰上进行冷冻保护<sup>[15,21]</sup>。这是因为PVS2中的二甲基亚砜具有一定的化学毒性,在冰上进行能够降低PVS2在细胞间的渗透速率,从而减少PVS2的毒性<sup>[30]</sup>。本研究优化后的PVS2冰上处理时间为50~60 min,长于前人所用30 min的处理时间<sup>[16,19-21]</sup>,这可能也与不同的茎

尖大小和切取方式有关,值得未来开展研究对比。PVS2处理时间的延长也便于同时操作更多样品。

在PVS2冷冻保护处理之前,提高茎尖对冷冻保护剂的耐受性是冷冻保存过程中必不可少的一步,在热带作物超低温保存体系建立中尤为重要<sup>[32]</sup>。蔗糖预培养有助于促使茎尖适应高渗透压环境,增强其对后续PVS2处理的耐受性,从而可以提高茎尖在超低温保存后的活力<sup>[33]</sup>。在蔗糖预培养中,茎尖的总可溶性蛋白质、总可溶性糖、脱落酸以及脯氨酸含量显著增加,有利于在冷冻环境中维持质膜的完整性和蛋白质的稳定性,进而提高冷冻保存茎尖的再生率<sup>[34]</sup>。此外预培养溶液的处理时间对于确保高成活和高再生率至关重要<sup>[35]</sup>。而现有的木薯超低温保存技术并未对该步骤进行优化。本研究优化对比后发现,短暂时间的蔗糖预培养(4 h)有助于提高木薯茎尖对后续PVS2脱水处理的耐受性,而较长时间(16 h以上)可能会给细胞带来损害。Rafique等<sup>[36]</sup>在甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)上发现蔗糖预培养时间从1 d延长至2 d时会导致再生率下降,而0.5 mol/L蔗糖比0.3 mol/L蔗糖预培养更有利于提高再生率。但本研究结果不支持使用更高浓度的蔗糖(0.3 mol/L以上)对木薯茎尖进行预培养。

解冻也是影响超低温保存后茎尖再生的关键环节,快速升温能实现茎尖从玻璃态到液态的快速转变,防止水分在植物细胞内重结晶<sup>[24]</sup>。在小滴玻璃化法中,冷冻后的茎尖于卸载液中直接进行解冻,而卸载液中的蔗糖浓度影响茎尖复水的速率<sup>[37]</sup>。马铃薯茎尖采用小滴玻璃化法冷冻保存时,含0.8 mol/L蔗糖的卸载液处理30 min的成活率高于含0.3 mol/L和1.2 mol/L蔗糖的卸载液<sup>[38]</sup>。这表明卸载液中不同的蔗糖浓度会对超低温保存后的茎尖再生带来影响。目前最常使用添加1.2 mol/L蔗糖的培养基作为卸载液,本研究对卸载液中的不同蔗糖浓度(0.6、0.8、1.2 mol/L)进行对比发现无显著性差异。因而本研究对含中等蔗糖浓度的卸载液(0.8 mol/L)进行卸载处理时间的对比优化,结果表明在15~60 min内无显著性差异。这些结果表明木薯卸载液中的蔗糖浓度和处理时间对冷冻效果未产生较大影响,这可能与木薯自身的生理特性及选用木薯品种有关。这一结果也使得操作人员能够更加灵活地进行解冻操作,提高木薯茎尖超低温保存的操作效率。

冷冻保存后的再生培养基成分对超低温保存的冷冻效果也存在较大影响,需依据植物物种特性

以及所采用的冷冻方法进行针对性优化。茎尖超低温保存后再生培养基的优化过程往往需要调整植物生长调节剂如6-BA、NAA和GA<sub>3</sub>等的含量,避免产生负面效应<sup>[26-28]</sup>。由于在植物组织培养中添加生长素往往促进愈伤组织的形成<sup>[26]</sup>,因此本研究去除了培养基中的NAA,结果表明无生长素的木薯茎尖再生培养基能够减少愈伤组织的形成,从而提高冷冻后的再生率。Ashmore等<sup>[35]</sup>在番木瓜(*Carica papaya* L.)上也得到了相似的结果,该研究的再生培养基只添加6-BA和GA<sub>3</sub>更有利于茎尖超低温保存后的恢复和生长。6-BA作为植物超低温保存的恢复培养中应用最多的细胞分裂素,添加浓度也因冷冻保存方法与物种的影响呈现出较大差异<sup>[28]</sup>,当6-BA添加浓度过高时也会导致冷冻后茎尖形成愈伤组织<sup>[27-28]</sup>。本研究在6-BA浓度优化对比试验中发现,木薯茎尖在冷冻恢复过程中受其影响显著,0.09 μmol/L为最适添加浓度,该浓度下的木薯COL777、SC8002在RMB2的再生率分别达到86%和69%;当浓度超过0.36 μmol/L时,部分冷冻后的茎尖同样会形成愈伤组织。这表明木薯冷冻后的茎尖产生愈伤组织不仅受NAA的影响,还受6-BA浓度的影响。这与在特洛亚枳橙[*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.]<sup>[28]</sup>、葡萄LN33杂交种(*Vitis* L.)<sup>[27-28]</sup>和Superior品种(*Vitis vinifera* L.)<sup>[27]</sup>中观察的结果相似。此外本研究得到的RMB2一步再生培养较MS30恢复培养基提高了木薯冷冻管保存后的再生率及适用范围,较前人研究中使用2~3步再生培养简化了成分及步骤,极大提升了超低温保存技术的简便性。然而本研究中目前还有少量的木薯品种经超低温保存后的再生率较低,围绕其再生培养基成分的继续优化仍然是进一步提高木薯品种适用性的重要途径。

综上所述,本研究通过体系优化明确了木薯茎尖超低温保存的适宜蔗糖预培养方式、冷冻保护处理时间及解冻方法,同时揭示了再生培养基中NAA及6-BA对超低温保存后植株再生的显著影响。本研究优化后的木薯再生培养基成分简单,能够避免愈伤组织的形成,获得较高的再生率,并显著提高了小滴玻璃化法在木薯品种中的适用性。这一研究成果在木薯茎尖超低温保存领域具有重要的应用潜力,在提高效率、节约成本的同时,可有效满足木薯核心种质资源、重要育种材料及优良品种安全保存的实际需求,也对其他热带作物超低温保存体系的构建具有借鉴作用。

## 参考文献

- [1] 杨德卫, 张海峰, 余文权. 我国水稻种质资源创新研究与利用进展. 植物遗传资源学报, 2024, 25(4): 495-508  
Yang D W, Zhang H F, Yu W Q. Progress on innovative research and utilization of rice germplasm resources in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(4): 495-508
- [2] Reed B M. Plant cryopreservation: A continuing requirement for food and ecosystem security. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2017, 53: 285-288
- [3] Agrawal A, Singh S, Malhotra E V, Meena D, Tyagi R. In vitro conservation and cryopreservation of clonally propagated horticultural species. (2019-06-26) [2024-12-18]. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0_18)
- [4] Bayata A. Review on nutritional value of cassava for use as a staple food. Journal of Analytical Chemistry, 2019, 7(4): 83-91
- [5] Mathews H, Schopke C, Carcamo R, Chavariaga P, Fauquet C, Beachy R. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Reports, 1993, 12: 328-333
- [6] Bechoff A, Tomlins K, Fliedel G, Becerra Lopez-Lavalle L A, Westby A, Hershey C, Dufour D. Cassava traits and end-user preference: Relating traits to consumer liking, sensory perception, and genetics. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(4): 547-567
- [7] Burns A, Gleadow R, Cliff J, Zacarias A, Cavagnaro T. Cassava: The drought, war and famine crop in a changing world. Sustainability, 2010, 2(11): 3572-3607
- [8] de Vries S C, van de Ven G W, van Ittersum M K, Giller K E. Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. Biomass and Bioenergy, 2010, 34(5): 588-601
- [9] Tonukari N J, Tonukari N J, Ezedom T, Enuma C C, Sakpa S O, Avwioroko O J, Eraga L, Odiyoma E. White gold: Cassava as an industrial base. American Journal of Plant Sciences, 2015, 6(7): 972
- [10] Escobar R H, Mafla G, Roca W. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. Plant Cell Reports, 1997, 16: 474-478
- [11] Charoensub R, Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. CryoLetters, 2004, 25(1): 51-58
- [12] Kartha K, Leung N, Mroginski L. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982, 107(2): 133-140
- [13] Bajaj Y P S. Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years. Field Crops Research, 1983, 7: 161-167
- [14] Escobar R H, Debouck D, Roca W M. Development of cassava cryopreservation//Florent E, Hiroko T. Proceedings of the Japan international research center for agricultural sciences.

- Tsukuba, Japan: Japan International Research Center for Agricultural Science, 2000: 222-226
- [15] Engelmann F, Benson E E, Chabrilange N, Gonzalez Arnao M T, Mari S, Michauxferriere N, Paulet F, Glaszmann J C, Charrier A. Cryopreservation of several tropical plant species using encapsulation/dehydration of apices//Terzi M, Cella R, Falavigna A. Current issues in plant molecular and cellular biology. Dordrecht: Springer Science, 1995: 315-320
- [16] Dumet D, Korie S, Adeyemi A. Cryobanking cassava germplasm at IITA. Acta Horticulturae, 2011, 908: 439-446
- [17] Charoensub R, Phansiri S, Yongmanitchai W, Sakai A. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: Importance of a simple mononodal culture. Scientia Horticulturae, 2003, 98(4): 485-492
- [18] Diantina S, Efendi D, Mariska I. Response of two cassava accessions on vitrification and modification of vitrification techniques//Prendergast E. AIP conference proceedings. New York: AIP Publishing, 2016: 1-11
- [19] Dumet D, Diebiru E, Adeyemi A, Akinyemi O, Gueye B, Franco J. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources. CryoLetters, 2013, 34(2): 107-118
- [20] Escobar R H, MunOz L, Rios A, Núñez J, Tohme J. Using a droplet-vitrification method to partially overcome the recalcitrance of Cassava to cryostorage//Reed M M. II international symposium on plant cryopreservation. Leuven: International Society for Horticultural Science, 2014: 227-232
- [21] Gueye B, Obisesan O, Olagunju M. Optimisation and implementation of cryopreservation protocol for cassava and yam diversity long-term safeguarding. Acta Horticulturae, 2023(1384): 459-469
- [22] 陈志林, 陆柳英, 李开绵. 木薯茎尖包埋—玻璃化法超低温保存及植株再生. 广西热带农业, 2007(4): 19-22  
Chen Z L, Lu L Y, Li K M. Cryopreservation and plant regeneration of cassava shoot tips using encapsulation-vitrification method. Guangxi Tropical Agriculture, 2007(4): 19-22
- [23] 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. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2021, 144(1): 7-20
- [24] Panis B, Piette B, Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Science, 2005, 168(1): 45-55
- [25] Jenderek M M, Reed B M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2017, 53: 299-308
- [26] Chang Y J, Reed B M. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of rubus shoot tips following cryopreservation. CryoLetters, 1999, 20(6): 371-376
- [27] Wang Q C, Tanne E, Arav A, Gafny R. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2000, 63(1): 41-46
- [28] Wang Q C, Li P, Batuman O, Gafny R, Mawassi M. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured in vitro. CryoLetters, 2003, 24(5): 293-302
- [29] Wilms H, Fanega Sleziak N, Van der Auweraer M, Brands M, Verleije M, Hardeman D, Andre E, Panis B. Development of a fast and user-friendly cryopreservation protocol for sweet potato genetic resources. Scientific Reports, 2020, 10(1): 14674
- [30] Sakai A, Engelmann F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. CryoLetters, 2007, 28(3): 151-172
- [31] Hammond S D H, Viehmannova I, Zamecnik J, Panis B, Faltus M. Droplet-vitrification methods for apical bud cryopreservation of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Rob.]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2021, 147(2): 197-208
- [32] Souza F V D, Kaya E, de Jesus Vieira L, de Souza E H, de Oliveira Amorim V B, Skogerboe D, Matsumoto T, Alves A A C, da Silva Ledo C A, Jenderek M M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2016, 124: 351-360
- [33] Park S U, Kim H H. Cryopreservation of sweet potato shoot tips using a droplet-vitrification procedure. CryoLetters, 2015, 36(5): 344-352
- [34] Suzuki M, Ishikawa M, Okuda H, Noda K, Kishimoto T, Nakamura T, Ogiwara I, Shimura I, Akihama T. Physiological changes in gentian axillary buds during two-step preculturing with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. Annals of Botany, 2006, 97(6): 1073-1081
- [35] Ashmore S E, Drew R A, Azimi M. Vitrification-based shoot tip cryopreservation of *Carica papaya* and a wild relative *Vasconcellea pubescens*. Australian Journal of Botany, 2007, 55(5): 541-547
- [36] Rafique T, Yamamoto S I, Fukui K, Mahmood Z, Niino T. Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique. CryoLetters, 2015, 36(1): 51-59
- [37] Bettoni J C, Bonnart R, Volk G M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2021, 144(1): 21-34
- [38] Kim H H, Yoon J W, Park Y E, Cho E G, Sohn J K, Kim T S, Engelmann F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: Critical factors in droplet vitrification. CryoLetters, 2006, 27(4): 223-234