



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: 桑树种质资源超低温保存效果与芽休眠状态关系探讨
作者: 王好, 王玲, 王应敏, 方林林, 晁楠, 张金梅
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20250109003
收稿日期: 2025-01-09
网络首发日期: 2025-02-25
引用格式: 王好, 王玲, 王应敏, 方林林, 晁楠, 张金梅. 桑树种质资源超低温保存效果与芽休眠状态关系探讨[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250109003>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

桑树种质资源超低温保存效果与芽休眠状态关系探讨

王好^{1,2}, 王玲¹, 王应敏², 方林林¹, 晁楠³, 张金梅²

(¹东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; ²中国农业科学院作物科学研究所/农业农村部粮食作物基因资源评价利用重点实验室, 北京 100081;

³江苏科技大学蚕业研究所/农业农村部蚕桑遗传改良重点实验室/中国农业科学院桑蚕科学研究中心, 镇江 212100)

摘要: 探究桑树种质资源休眠芽的不同休眠状态对其超低温保存存活率的影响, 为明确休眠芽超低温保存适宜休眠状态提供科学依据和数据支持。本研究以2023年冬季12月8日、18日、28日和2024年1月7日四个时间节点的‘湖桑32号’1年生枝条为试验材料, 分别测定其萌芽率、第一芽萌发时间、碳水化合物、渗透调节物质和内源激素等含量, 统计经超低温保存后组培恢复培养的存活率。结果表明: 结合萌芽率和第一芽萌发时间, 获得了内休眠-生态休眠转化和解除内休眠进入生态休眠的2个休眠阶段, 以及处于深休眠(进入休眠后6d)、中度休眠(进入休眠后16~26d)和浅休眠(进入休眠后36d)的3个休眠深度。桑树休眠芽经超低温保存-组培恢复培养后, 样品存活率最高达90%。随着取样材料内休眠的解除, 超低温保存后存活率降低, 于浅休眠状态(进入休眠后36d)取样时最低。休眠芽进入内休眠后, 可溶性糖含量呈先上升后下降趋势, 在中度休眠(进入休眠后26d)达最大值, 之后下降; 淀粉含量与可溶性糖含量呈相反趋势; 可溶性蛋白和脯氨酸含量总体呈上升趋势。脱落酸(ABA)等4种内源激素含量在深休眠状态下(进入休眠后6d)均显著高于其他状态。取样12月份处于深休眠和中度休眠状态的休眠芽, 即进入休眠后26d内取样, 作为桑树种质资源超低温保存的材料较为适宜。

关键词: 桑树; 种质资源; 超低温保存; 休眠芽; 休眠状态

Study on the Relationship Between Cryopreservation Survival Behaviors and Bud Dormancy States of Mulberry Germplasm Resources

WANG Hao^{1,2}, WANG Ling¹, WANG Yingmin², FANG Linlin¹, CHAO Nan³, ZHANG Jinmei²

(¹College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Gene Resources Evaluation and Utilization of Food Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081; ³Institute of Sericulture, Jiangsu University of Science and Technology/Key Laboratory of Sericulture Genetic Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Silkworm Scientific Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212100)

Abstract: It is aimed to explore the effects of bud dormancy states on the survival of mulberry germplasm resources during cryopreservation, and to provide scientific basis and technical support for clarifying the suitable dormancy states for cryopreservation of dormant buds. In this study, one-year-old branches of 'Hu mulberry' were sampled on December 8th, 18th, 28th, 2023, and January 7th, 2024, during the winter season. The budding rates, first bud germination times, carbohydrates, osmotic regulating substances and endogenous hormones of the dormant buds were measured. In addition, their survival rates of cryopreservation and recovery were analyzed. Results showed that two dormancy stages of endodormancy to ecodormancy transformation and release of endodormancy into ecodormancy, as well as three dormancy depths of deep dormancy (6 days after entering dormancy), moderate dormancy (16-26 days after entering dormancy) and shallow dormancy (36 days after entering dormancy) were obtained, based on the budding rates and

收稿日期: 2025-01-09

第一作者研究方向为园林植物种质资源, E-mail: wh18734690983@163.com; 王玲为共同第一作者

通信作者: 张金梅, 研究方向为作物种质资源保护, E-mail: zhangjinmei@caas.cn

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2024-ICS01)

Foundation project: Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2024-ICS01)

the germination times of the first bud. After cryopreservation of mulberry dormant buds and recovery by tissue culture, the survival rate was up to 90%. With the release of endodormancy for dormant buds sampled, the survival rates after cryopreservation decreased, and the lowest survival rates were obtained when the dormant buds were sampled in the shallow dormancy state (36 days after entering dormancy). During the process of endodormancy of 'Hu mulberry', the content of soluble sugar increased first and then decreased, and reached the maximum at moderate dormancy (26 days after entering dormancy), and then decreased. The starch and soluble sugar contents showed the opposite trends. Soluble protein and proline increased with the release of endodormancy. The contents of four endogenous hormones such as abscisic acid (ABA) during the deep dormancy state (6 days after entering dormancy) were significantly higher than other states. In conclusion, the dormant buds with deep dormancy and moderate dormancy in December (within 26 days after entering dormancy) were selected as the suitable materials for cryopreservation of mulberry germplasm resources.

Key words: mulberry; germplasm resources; cryopreservation; dormant buds; dormant states

桑树 (*Morus alba* L.) 是桑科桑属的多年生木本植物 (落叶乔木或灌木), 具有较好的药用、经济和园林观赏价值。原产于中国中部和北部, 也广泛栽培于朝鲜、日本、蒙古、中亚各国和俄罗斯等地^[1]。我国桑树种质资源丰富, 主要以植株形式保存于 1990 年建成的国家种质镇江桑树圃 (National Mulberry Genebank, Zhenjiang, NMGB)。截止 2022 年, 共收集保存了我国 29 个省份及 4 大洲 19 国的各类桑树种质资源 2519 份^[2]。随着农业生产的发展及我国城镇化速度的加快, 为最大限度保存我国桑树种质资源的遗传多样性, 对桑树种质资源收集保存尤为重要^[3]。超低温保存是实现植物种质资源离体长期保存的重要技术^[4]。植物材料经超低温保存后, 在适宜的条件下可复活再生, 并保持其遗传稳定性^[5]。植物超低温保存通常与组织培养技术相结合, 可实现离体分生组织、休眠芽、花粉、愈伤组织、体细胞胚、合子胚、种子等长期保存^[6]。在超低温保存过程中面临多种非生物胁迫, 外植体的外部形态、大小、内部生理状态及其对脱水和冷冻的敏感性等因素都会显著影响保存效果^[7]。因此, 选择状态适宜的休眠芽对于实现有效的超低温保存至关重要。

多年生木本植物的休眠芽是其在自然条件下过冬的关键生理结构^[8]。芽休眠大致分为 3 种类型, 即类休眠 (Paradormancy)、内休眠 (Endodormancy) 和生态休眠 (Ecodormancy)。内休眠是由植物休眠结构内部的生理因素所控制的休眠, 包括碳水化合物水平、渗透调节物质以及内源激素等因素, 其休眠机制较为复杂^[9]。碳水化合物在休眠建立过程中发挥重要作用, 其代谢可能与休眠诱导相关^[10]。淀粉作为长期储存非结构性碳水化合物的主要形式之一, 在芽休眠期间也发挥重要作用。淀粉会转换成蔗糖、果糖等可溶性糖来维持植物的基本生理活动^[11]。有研究表明, 芽进入内休眠之前, 会响应低温信号, 引起芽的可溶性蛋白和游离脯氨酸等渗透调节物质的大量积累, 调节细胞质渗透势, 有效地阻止水分外渗, 提高其抗寒性^[12]。同时, 环境因素也可通过影响激素的合成与运输来调控休眠过程^[13]。

湖桑是分布于杭嘉湖地区的优良栽培桑树品种群体, 具有比较古老独特的起源, 对于南宋以来该地区蚕桑业的繁荣和区域经济社会发展具有重要价值^[14]。‘湖桑 32 号’桑叶肥厚、产量高, 具有重要的历史地位和经济价值, 是苏南的“明星”桑树品种。‘湖桑 32 号’参考基因组于 2020 年首次被报道^[15], 其遗传背景较为

清晰，常被用于开展桑树种质资源保存、育种改良及功能基因挖掘等科学研究。课题组前期研究发现，于12月采集的桑树休眠芽经超低温保存后，恢复培养的存活率显著高于次年1月和2月^[5]。本研究以2023年冬季12月初~次年1月初的‘湖桑32号’休眠芽为材料，对其相关生理指标进行测定分析，旨在了解桑树种质资源休眠芽的不同休眠状态对其超低温保存存活率的影响，对明确适宜超低温保存的休眠芽状态，具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由江苏科技大学蚕业研究所国家种质镇江桑树圃提供，分别于2023年12月8日、12月18日、12月28日和2024年1月7日采集树龄为20年的‘湖桑32号’春伐后的一年生枝条（粗细均匀）。水培萌发及后续试验均在中国农业科学院作物科学研究所国家作物种质库进行。采集的休眠芽剥去7~9层外鳞皮（取芽分生组织），用锡箔纸包裹置于大型气相液氮罐（CryoExtra 80）中保存，用于后续相关生理指标的测定。

1.2 试验方法

1.2.1 萌芽率的测定 参照刘国琴^[6]的方法，采集12个一年生枝条，随机分成3组，每组4个枝条（重复3次），剪去两端，留约30 cm；基部留约5 cm无芽部分插入清水中（水深约3 cm）；移入人工光照培养箱（OP-R500LED，温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}/18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光/暗12 h/12 h，光照强度3000 lx，空气相对湿度为75%），期间每2 d换水1次，换水时剪去基部（约2 mm），露出新的切面；连续培养21 d后统计萌芽率，并统计第1颗芽萌发时间，以芽顶端开裂露绿为萌芽标准，以萌芽率 $\geq 50\%$ 时为解除内休眠的日期。

1.2.2 休眠状态的确定 参照Lang等^[7]的方法，以萌芽率为0%时，芽完全处于内休眠阶段；萌芽率0~50%时，芽处于内-生态休眠转换阶段；萌芽率 $\geq 50\%$ 时，即认定芽解除内休眠进入生态休眠阶段。参照Yamane等^[8]的方法，以第一芽萌发时间超过10 d为枝条进入内休眠时期的标志，萌芽率在10%~20%为轻度休眠，萌芽率 $< 10\%$ 为深休眠；经休眠后萌芽率再次 $> 10\%$ 为开始解除内休眠的标志，萌芽率 $> 50\%$ 则为完全解除内休眠。参照刘国琴^[6]的方法，休眠深度以第一芽萌发时间为判定标准，若在10 d内萌芽则称为浅休眠，在10~21 d内称为中度休眠，超过21 d称为深休眠。

1.2.3 超低温保存流程 参照陈晓玲等^[5]的方法，获取休眠枝条后，将其中部条段剪成4~7 cm长的节段，每段带1~2个芽；将休眠芽段置于室温 20°C ，空气相对湿度10%进行缓慢干燥，使休眠芽段含水量降低到质量百分含量20%，将干燥后的休眠芽段用热缩管密封；密封好的休眠芽段顺序以以下温度和时长降温： 5°C 、 0°C 、 -5°C 、 -10°C 、 -15°C 、 -20°C 各1 d， -30°C 2 d；梯度降温后的休眠芽段投入大型气相液氮罐中保存。

1.2.4 存活率的统计 参照Ravish等^[9]的方法，将超低温保存后的休眠芽在 38°C 水浴中化冻3~5 min；于室温下在无菌湿苔草中回湿2 h；将取出的休眠芽去除7~9个外层鳞片，用Tween20洗涤15 min后，用无菌水冲洗10 min，然后用7%次氯酸钠溶液消毒10 min，再用无菌水反复冲洗3次/5 min；最后将灭菌后的芽转接到 $\text{MS}+1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.1\text{ mg/L TDZ}$ 的培养基上，待萌芽后转接至 $\text{MS}+1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.1\text{ mg/L GA}_3$ 的培养基上继代培养；培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照条件为先暗培养7 d，之后转于弱光下培养3 d，再转于正常光照4000 lx下培养（16 h/8 h）。取30个芽进行恢复培养，每10个芽为1个重复，共3个重复，以休眠芽呈现明显绿色为标准，3周后统计其存活率。

1.2.5 生理指标的测定 每个指标取45个芽分生组织，每15个芽为1个重复，共3个重复，所有指标含量的测定均为干重，采用真空冷冻干燥机（LGJ-12A）充分冻干后测定。可溶性糖和淀粉含量的测定采用蒽酮比色法（BC0035，China和BC0705，China）；可溶性蛋白含量的测定选用双缩脲法（BC3185，China）；

脯氨酸 (Pro) 含量采用磺基水杨酸法测定 (BC0295, China)。采用超高效液相色谱 (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) (Agilent 1290) 和串联质谱 (Tandem mass spectrometry, MS/MS) (Agilent 6495) 进行内源激素脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA₃)、生长素 (IAA)、茉莉酸 (JA) 含量的测定。检测试剂盒由北京索莱宝科技有限公司提供, 以上所有测定结果均为 3 次生物学重复测定之平均值。

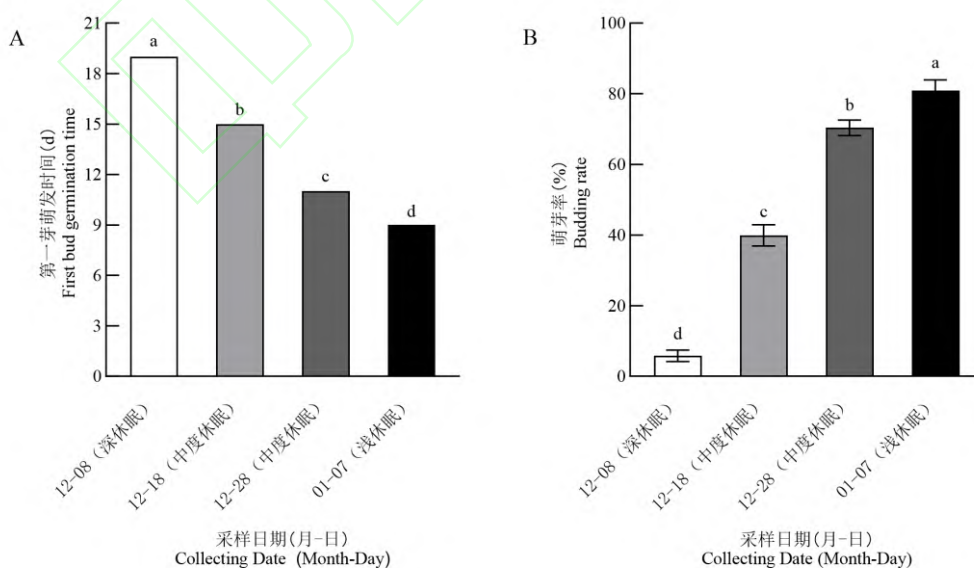
1.3 数据统计与处理

利用 Excel 2022 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) 进行数据统计, 采用 SPSS Statistics 27 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA) 软件进行单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 运用 GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 超低温保存取样休眠芽初始水培萌芽率统计

本试验 4 个不同采样日期获得的桑树休眠芽样品, 在水培条件下第一芽萌发时间和萌芽率, 如图 1 所示。2023 年 12 月 8 日采集样品培养至第 19 d 时开始萌芽 (图 1A), 连续培养 21 d 时平均萌芽率为 5.82% (图 1B)。之后采样时间的样品分别在第 15 d、11 d 和 9 d 有萌发现象, 第一芽萌发所需时间逐渐缩短, 总体呈下降趋势; 培养至 21 d 时平均萌芽率分别为 39.90%、70.38% 和 80.85%, 萌芽率总体呈上升趋势。研究表明, 依据不同采样时期桑树休眠芽第一芽的萌发时间和 21 d 水培萌芽率的变化, 推测江苏镇江栽植的‘湖桑 32 号’芽休眠状态为: 进入内休眠后, 于 2023 年 12 月 8 日处于内休眠-生态休眠转化阶段 (深休眠); 12 月 18 日处于内休眠-生态休眠转化阶段 (中度休眠); 12 月 28 日处于解除内休眠、进入生态休眠阶段 (中度休眠); 次年 1 月 7 日处于解除内休眠、进入生态休眠阶段 (浅休眠)。



使用不同小写英文字母标记的数据间有显著差异 ($P < 0.05$), 下同

Significant differences between data marked with the different lowercase letters ($P < 0.05$). The same below

A: 不同采样日期所处休眠状态的第一芽萌发时间; B: 不同采样日期所处休眠状态的 21 d 时萌芽率

A: The germination times of the first bud in the dormant states at different collecting dates; B: the budding rates at 21 days of the dormant states at different collecting dates

图 1 不同采样日期样品第一芽萌发时间和萌芽率

Fig.1 The budding rates and the first bud germination times of the samples with different collecting dates

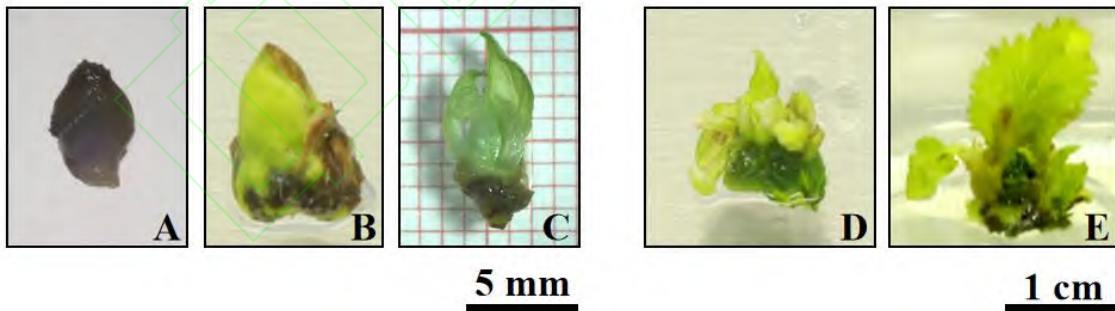
2.2 超低温保存后存活率统计

本试验 4 个不同采样日期样品经超低温保存-组培恢复培养后存活率统计结果, 如表 1 所示。休眠芽超低温保存-组培恢复培养的萌发及生长状况, 如图 2 所示。12 月 8 日-1 月 7 日, 组培恢复培养总体的污染率相对较低, 存活率呈下降趋势。12 月份在内休眠期间取样的材料超低温保存后存活率相对较高 (80% 以上), 进入 1 月份内休眠解除到一定程度, 进入生态休眠, 其超低温保存后存活率显著下降至 66.67% ($P<0.05$)。

表 1 2023—2024 不同采样日期样品经超低温保存-组培恢复培养后存活率

Table 1 The survival rates of 2023—2024 cryopreserved dormant buds with different collecting dates

采样日期 Collecting dates	休眠阶段 Dormancy stage	休眠深度 Dormancy depth	超低温后污染率 (%) Contamination rates after cryopreservation	超低温后存活率 (%) Survival rates after cryopreservation
12-08	内休眠-生态休眠	深休眠	6.67±5.77	90.00±10.00a
12-18	内休眠-生态休眠	中度休眠	0.00±0.00	80.00±10.00ab
12-28	解除内休眠 进入生态休眠	中度休眠	6.67±5.77	83.33±5.77a
01-07	解除内休眠 进入生态休眠	浅休眠	3.33±5.77	66.67±5.77b



A: 未存活, 休眠芽呈现黑色; B: 存活, 休眠芽呈现明显绿色且膨大; C: 休眠芽分生组织分化; D: 休眠芽萌发; E: 休眠芽增殖和伸长

A: It did not survive, and the dormant buds showed black; B: survival, dormant buds showed obvious green and swollen; C: dormant bud meristem differentiation;

D: dormancy bud germination; E: dormant bud proliferation and elongation

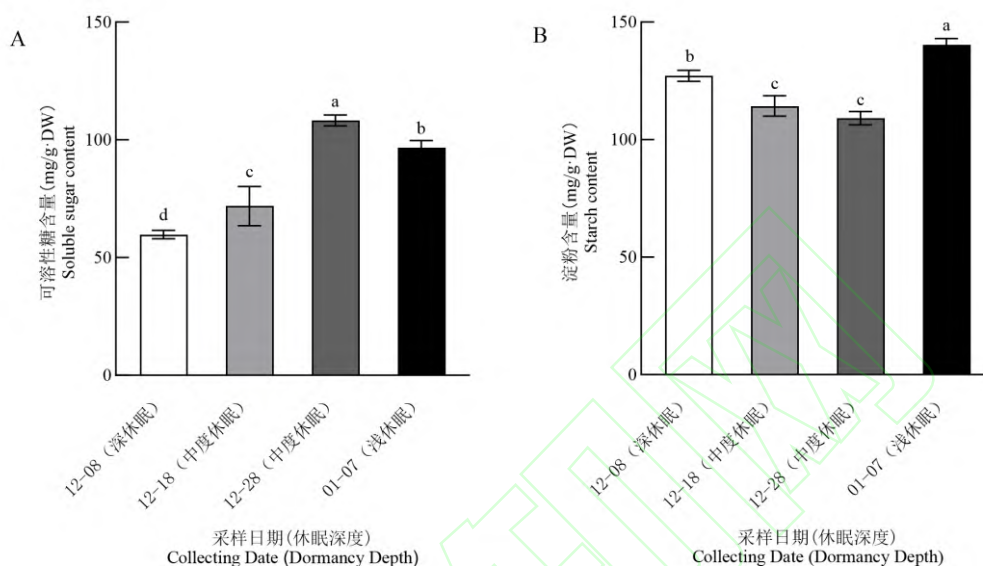
图 2 休眠芽超低温保存后组培恢复培养的萌发及生长状况

Fig.2 Germination and growth of dormant buds after cryopreservation and recovery

2.3 超低温保存取样不同休眠状态桑树休眠芽生理物质的变化

2.3.1 碳水化合物含量的变化 随着内休眠进程的推进, 桑树休眠芽的碳水化合物即可溶性糖和淀粉含量的变化呈相反趋势 (如图 3 所示)。可溶性糖含量呈倒 V 型动态变化, 在 2023 年 12 月 8 日至 12 月 28 日显

著上升 ($P<0.05$), 12月8日(深休眠)为 59.81 mg/g, 于12月28日(中度休眠)达最大值为 108.29 mg/g, 之后显著下降 ($P<0.05$) (图 3A)。淀粉含量呈正 V 型动态变化, 随着低温的积累, 在 2023 年 12 月 8 日至 12 月 28 日淀粉含量总体呈下降趋势, 12 月 8 日(深休眠)为 127.13 mg/g, 于 12 月 28 日(中度休眠)达到最小值 109.11 mg/g, 之后显著上升 ($P<0.05$), 于次年 1 月 7 日(浅休眠)达最大值 140.26 mg/g (图 3B)。



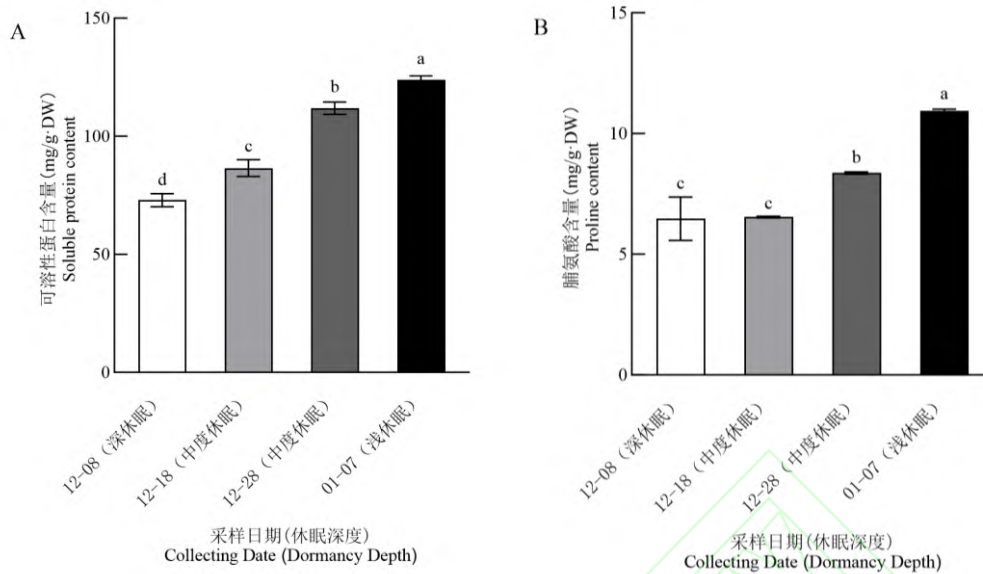
A: 不同采样日期所处休眠状态的可溶性糖含量; B: 不同采样日期所处休眠状态的淀粉含量

A: Soluble sugar contents in dormant states at different collecting dates; B: starch contents in dormant states at different collecting dates

图 3 不同采样日期样品碳水化合物含量的变化

Fig.3 Changes in carbohydrate contents of the samples with different collecting dates

2.3.2 渗透调节物质含量的变化 桑树休眠芽的渗透调节物质即可溶性蛋白和脯氨酸的含量在进入内休眠处于深休眠状态时保持较低水平, 后随着低温的积累而呈现不断上升的趋势 (如图 4 所示)。随着低温的逐渐积累, 可溶性蛋白的含量显著增加 ($P<0.05$), 于 2023 年 12 月 8 日(深休眠)时, 可溶性蛋白含量为 72.92 mg/g, 于次年 1 月 7 日(浅休眠)达到最大值为 123.97 mg/g (图 4A)。脯氨酸含量由中度休眠期后显著增加 ($P<0.05$), 于 2023 年 12 月 8 日(深休眠)时, 脯氨酸含量为 6.47 mg/g, 于次年 1 月 7 日(浅休眠)达到最大值为 10.94 mg/g (图 4B)。



A: 不同采样日期所处休眠状态的可溶性蛋白含量; B: 不同采样日期所处休眠状态的脯氨酸含量

A: Soluble protein contents in dormant states at different collecting dates; B: proline contents in dormant states at different collecting dates

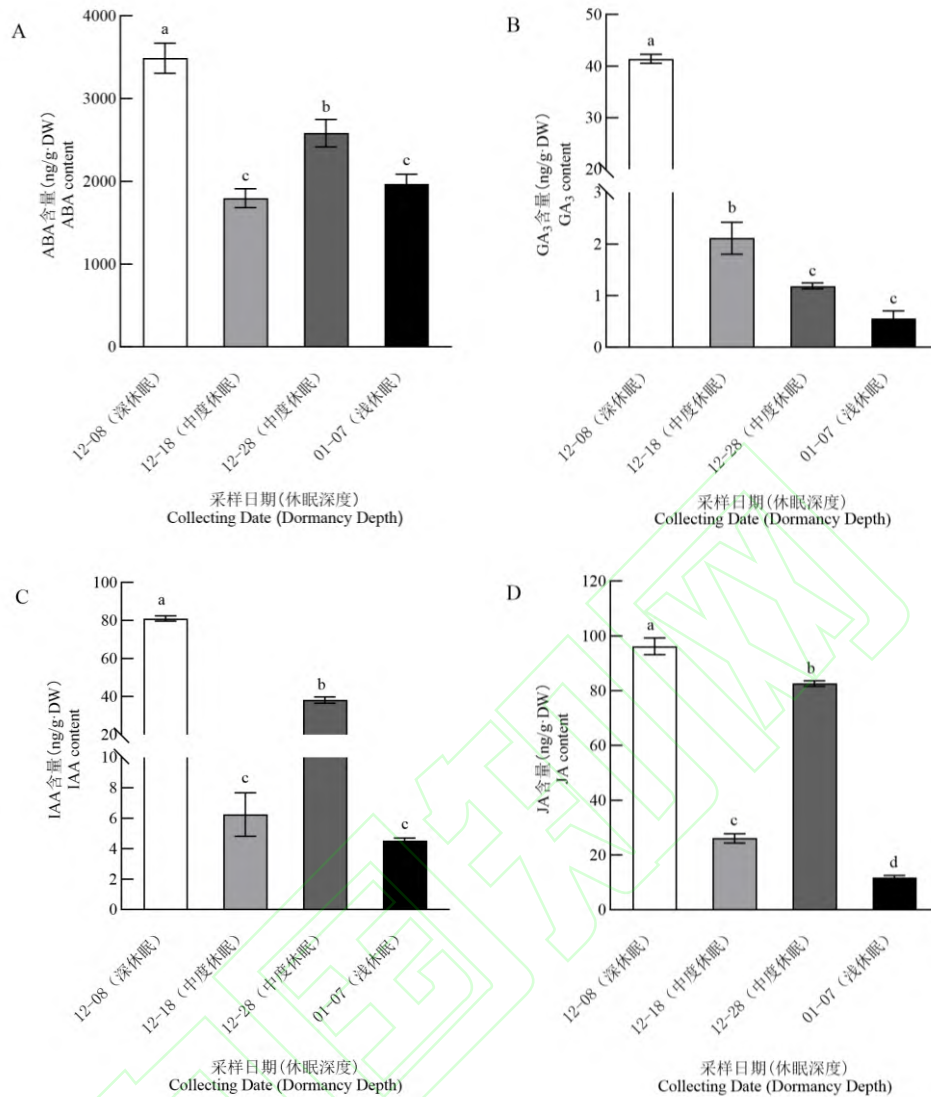
图 4 不同采样日期样品渗透调节物质含量的变化

Fig.4 Changes in osmotic regulating substances contents of the samples with different collecting dates

2.3.3 内源激素含量的变化 不同采样日期桑树休眠芽样品的内源激素含量变化, 如图 5 所示。休眠芽中的 ABA 含量在进入内休眠时期后, 总体维持在较高水平, 呈现下降-上升-下降的变化趋势 (图 5A)。随着内休眠进程的推进, ABA 含量在 12 月 8 日 (深休眠) 达到最大值为 3487.12 ng/g, 而在 12 月 18 日 (中度休眠) 时, 下降至最小值为 1797.07 ng/g。当内休眠结束并转入生态休眠阶段时, 在 12 月 28 日 (中度休眠) 时上升至 2580.87 ng/g, 后于次年 1 月 7 日 (浅休眠) 下降至 1967.79 ng/g。

桑树休眠芽 GA₃ 的含量在进入内休眠时期后, 总体维持在较低水平, 呈现下降的变化趋势 (图 5B)。不同时期之间的 GA₃ 含量呈现显著性的差异 ($P < 0.05$), 而 1 月 7 日 (浅休眠) 的 GA₃ 含量与 12 月 28 日 (中度休眠) 的 GA₃ 含量差异不显著 ($P > 0.05$)。GA₃ 含量在 12 月 8 日 (深休眠) 达到最大值为 41.41 ng/g, 于 1 月 7 日 (浅休眠) 下降至最小值为 0.56 ng/g。

桑树休眠芽 IAA 和 JA 含量在进入内休眠时期后, 其含量变化趋势与 ABA 一致, 均呈现下降-上升-下降的变化趋势 (图 5C 和 5D)。IAA 和 JA 含量均是在休眠芽进入内休眠后处于深休眠状态时达到最大值分别为 81.04 ng/g 和 96.19 ng/g, 而在解除内休眠时即 1 月 7 日 (浅休眠) 达到最小值为 4.53 ng/g 和 11.73 ng/g。IAA 和 JA 含量在桑树休眠芽内休眠进程的不同时期之间呈现显著性的差异 ($P < 0.05$), 而 1 月 7 日 (浅休眠) 的 IAA 含量与 12 月 18 日 (中度休眠) 的 IAA 含量差异不显著 ($P > 0.05$)。



A: 不同采样日期所处休眠状态的 ABA 含量; B: 不同采样日期所处休眠状态的 GA₃ 含量; C: 不同采样日期所处休眠状态的 IAA 含量; D: 不同采样日期所处休眠状态的 JA 含量

A: ABA contents in dormant states at different collecting dates; B: GA₃ contents in dormant states at different collecting dates; C: IAA contents in dormant states at different collecting dates; D: JA contents in dormant states at different collecting dates

图 5 不同采样日期样品内源激素含量的变化

Fig.5 Changes in endogenous hormone contents of the samples with different collecting dates

3 讨论

3.1 不同休眠状态芽对桑树种质资源超低温保存效果的影响

结合前人的研究方法, 确定了桑树休眠芽的休眠状态, 包括所处的休眠阶段以及休眠深度^[16-18]。根据‘湖桑 32 号’休眠芽超低温保存后组培恢复培养的存活率, 推测处于深休眠 (进入休眠后 6 d) 和适度休眠 (进入休眠后 16~26 d) 状态下的芽对桑树种质资源超低温保存效果显著高于浅休眠 (进入休眠后 36 d), 且处于深休眠状态下效果最好。

3.2 休眠芽初始生理特性对超低温保存休眠芽存活率的影响

落叶果树在休眠期通过储存体内的糖、淀粉等碳水化合物来抵御恶劣条件，并维持基本的代谢活动^[20]。在自然休眠过程中可溶性糖含量的变化趋势和淀粉含量的变化趋势相反^[21]。本研究研究表明，桑树可能通过积累可溶性糖和减少淀粉来应对低温条件；而在内休眠解除过程中，随着低温的有效积累达到一定程度，桑树可能开始增加淀粉的积累，以储备能量支持后续的生长发育。可溶性蛋白和脯氨酸是植物中研究较为普遍的渗透调节物质，与植物抗寒相关。王芳等^[22]研究发现，低温胁迫下，可溶性蛋白含量的上升可以增加植物体内束缚水的含量，维持细胞膨压，同时高细胞质浓度可以防止结冰，这表明可溶性蛋白在植物应对逆境时可能发挥重要作用。通常认为脯氨酸通过渗透调节提高植物抵抗逆境胁迫的能力，其含量的上升是对低温环境的适应^[23]。本研究结果表明，可溶性蛋白和脯氨酸在进入内休眠后，随着低温的积累，在内休眠解除过程中其含量逐渐上升，以适应自然低温环境，这与上述研究发现结果相一致。

植物激素已被证明是控制温带多年生木本植物芽休眠的最重要的内部调节剂^[24]。ABA 在多种落叶果树如桃 (*Prunus persica* L.)、树莓 (*Rubus idaeus* L.)、杏 (*Prunus armeniaca* L.) 等内休眠时期有相似的变化规律，先上升保持较高的含量，之后在内休眠转向生态休眠的过程中降低^[25-27]。在‘酥梨’ (*Pyrus* spp.) 休眠中，ABA 含量在内休眠开始阶段上升，内休眠时期一直处于较高水平，之后随着内休眠的解除含量逐渐降低^[28]。本研究结果与其一致，且含量变化可能会受到冬季气温的影响。有研究表明梨^[29]中响应 ABA 的 *ABF3* 也诱导 *GA2OX1* 的表达，可能导致 GA 含量降低，杨树 (*Populus* L.) 中也有相似的结果^[30]。本研究中，随着内休眠进程的推进，GA₃ 含量逐渐下降，总体处于较低水平，推测可能是由于低温的积累，虽处于内休眠解除阶段，但总体上仍处于休眠状态，尚未进入萌发期。茶树 (*Camellia sinensis* L.) 中 IAA 含量在类休眠阶段较高，类休眠进入内休眠过程中 IAA 含量不断降低，内休眠过渡到生态休眠阶段 IAA 含量逐步上升^[31]。在李 (*Prunus salicina* L.) 和葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 中发现芽休眠起始和低温处理会导致 IAA 含量降低，而生态休眠阶段 IAA 含量持续上升直至萌芽^[32-33]。也有研究表明 IAA 对休眠未起到直接解除的作用^[26]。JA 是调节胁迫反应的主要植物激素之一，近期有研究证明了 JA 对种子萌发具有抑制作用，与 ABA 和 GA₃ 相互作用^[34]。韩驰等^[35]研究发现果梅 (*Armeniaca mume* Sieb.) 在生态休眠时期的 JA 含量高于内休眠时期。本研究中 IAA 和 JA 含量在休眠进程中的变化规律与上述研究存在差异，对于内休眠解除的影响不显著，推测其含量变化可能会受到多种因素影响，较为复杂。

芽休眠是温带木本多年生植物在越冬期间对不利环境条件的一种基本适应。在休眠期，植物生长受阻，代谢活动减弱^[36]。在内休眠时期，短日照 (SDs) 或低温触发内部芽信号，使芽对远低于冰点的温度具有耐受性。相关研究表明，植物可以在内休眠期间进行抗寒锻炼以安全越冬^[37]。处于内休眠时期的芽对冷冻温度的抵抗能力最强^[38]。秋季叶片自然脱落是果树进入休眠的重要标志，本研究中经过 12 月份自然条件下的

低温积累，处于深休眠（进入休眠后 6 d）和中度休眠（进入休眠后 16~26 d）状态下的桑树休眠芽，通过积累可溶性糖和减少淀粉等碳水化合物，增加可溶性蛋白和脯氨酸等渗透调节物质来应对自然低温条件，同时更好应对超低温保存胁迫条件。在 1 月份其解除内休眠进入生态休眠，处于浅休眠状态下（进入休眠后 36 d）的桑芽，其芽内的细胞代谢活动增强，同时可能会导致芽对环境的敏感性增加，推测其会对超低温保存胁迫条件下的适应性降低。因此，12 月份处于深休眠和中度休眠状态下的芽（进入休眠后 26 d 内），其适宜的生理状态更有利于应对超低温保存过程中的多重胁迫以提高保存后的存活率。

4 结论

在‘湖桑 32 号’内休眠进程中，经历和适应低温环境会引起一系列细胞内含物的变化，包括可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白、脯氨酸以及内源激素等。一方面，可能是其为了适应寒冷环境而采取的一种自我保护机制；另一方面，当其进入休眠，在满足一定的低温积累量后，这些生理指标的变化诱导内休眠的解除，它们与桑树休眠芽内休眠进程相联系。超低温保存过程中，材料会面临多重胁迫因素。本研究推测，进入内休眠后，在深休眠（进入休眠后 6 d）和中度休眠（进入休眠后 16~26 d）状态下，芽对冷冻温度的抵抗能力最强；而进入生态休眠阶段后，在浅休眠（进入休眠后 36 d）状态下，芽内的细胞代谢活动增强，对环境的敏感性增加，可能难以应对超低温保存的极端条件。因此，选择 12 月份处于深休眠和中度休眠状态下的芽（进入休眠后 26 d 内），作为桑种质资源超低温保存的材料较为适宜。本研究结果揭示了桑树休眠芽在不同休眠状态下的生理特性，并为明确超低温保存的最佳取材时期提供了理论依据。

参考文献

- [1] Ramona A M, Vasile A T, Nicolae A V, Florina G M, Cristiana A V, Ioana S V. Phytochemical composition of different botanical parts of *Morus* species, health benefits and application in food industry. *Plants*, 2022, 11(2): 152-152
- [2] 潘一乐, 刘利, 张林, 赵卫国, 方荣俊. 我国桑树种质资源及育种研究. *广东蚕业*, 2006,40 (1): 20-26
Pan Y L, Liu L, Zhang L, Zhao W G, Fang R J. Study on mulberry germplasm resources and breeding in China. *Guangdong Sericulture*, 2006, 40(1): 20-26
- [3] 刘利, 张林, 赵卫国, 潘一乐. 桑树种质资源的国内外现状比较. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(3): 285-289
Liu L, Zhang L, Zhao W G, Pan Y L. Comparison of the current situation of mulberry germplasm resources at home and abroad. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5(3): 285-289
- [4] Nagel M, Pence V, Ballesteros D, Lambardi M, Popova E, Panis B. Plant cryopreservation: Principles, applications, and challenges of banking plant diversity at ultralow temperatures. *Annual Review of Plant Biology*, 2024, 75(1): 797-824
- [5] 陈晓玲, 张金梅, 卢新雄, 辛霞, 尹广鹏, 何娟娟. CN201410366753.4 桑树休眠芽段的超低温保存及嫁接复活方法. 2016-06-29

- Chen X L, Zhang J M, Lu X X, Xin X, Yin G K, He J J. CN201410366753.4 Methods of cryopreservation and grafting resurrection of dormant bud segments of mulberry. 2016-06-29
- [6] 陈晓玲, 张金梅, 辛霞, 黄斌, 卢新雄. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 414-427
- Chen X L, Zhang J M, Xin X, Huang B, Lu X X. Present situation and research progress of cryopreservation of plant germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(3): 414-427
- [7] 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. 山东农业科学, 2013, 45(3): 122-125, 131
- Liu J W, Chen X, Xu L, Wei H R, Zhang L S, Cui H J, Zhang X Y, Liu Q Z. Research progress on cryopreservation of fruit tree germplasm resources. Shandong Agricultural Sciences, 2013, 45(3): 122-125, 131
- [8] Chen W, Tamada Y, Yamane H, Matsushita M, Osako Y, Gao T, Tao R. *H3K4me3* plays a key role in establishing permissive chromatin states during bud dormancy and bud break in apple. The Plant journal: for cell and molecular biology, 2022, 111(4): 1015-1031
- [9] 乌凤章, 王贺新, 徐国辉, 张自川. 木本植物低温胁迫生理及分子机制研究进展. 林业科学, 2015, 51(7):116-128
- Wu F Z, Wang H X, Xu G H, Zhang Z C. Research progress on physiological and molecular mechanism of low temperature stress in woody plants. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(7):116-128
- [10] 文滨滨, 张新昊, 陈修德, 高东升, 朱翠英, 肖伟. 三种不同需冷量桃品种休眠诱导期生理变化. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2019, 50(1): 1-5, 74
- Wen B B, Zhang X H, Chen X D, Gao D S, Zhu C Y, Xiao W. Physiological changes of peach cultivars with three different chilling requirement during dormancy induction. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition, 2019, 50(1): 1-5, 74
- [11] Guzicka M, Pawlowski T A, Staszak A, Rozkowski R, Chmura D J. Molecular and structural changes in vegetative buds of Norway spruce during dormancy in natural weather conditions. Tree Physiology, 2018, 38(5): 721-734
- [12] 张迎辉. 低温胁迫下福建山樱花的生理响应与抗寒基因的表达. 福州: 福建农林大学, 2014
- Zhang Y H. Physiological response and cold-related genes expression under low temperature in *Prunus campanulata* Maxim. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014
- [13] 陶昱含, 房丽莎, 岳继飞, 周亚飞, 谢焕冬, 张召增, 刘亚丽, 刘震. 外源 ABA 施用对泡桐顶芽休眠及其生理生化特征的影响. 林业科学, 1-15. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1908.s.20240828.0929.002.html>
- Tao Y H, Fang L S, Yue J F, Zhou Y F, Xie H D, Zhang Z Z, Liu Y L, Liu Z. Effects of exogenous ABA application on dormancy and physiological and biochemical characteristics of *Paulownia fortunei* terminal buds. Scientia Silvae Sinicae, 1-15.<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1908.s.20240828.0929.002.html>
- [14] 马焱, 何宁佳. 桑树基因组学研究进展. 蚕学通讯, 2024, 44(2): 2-9
- Ma X, He N J. Research progress of mulberry genomics. Sericulture Communication, 2024, 44(2): 2-9
- [15] Jiao F, Luo R S, Dai X L, Liu H, Yu G, Han S H, Lu X, Su C, Chen Q, Song Q X, Meng C T, Li F H, Sun H M, Zhang R, Hui T, Qian Y H, Zhao A C, Jiang Y. Chromosome-level reference genome and population genomic analysis provide insights into the evolution and improvement of domesticated mulberry (*Morus alba*). Molecular Plant, 2020, 13 (7): 1001-1012
- [16] 刘国琴. 梨休眠分子生理机制研究. 杭州: 浙江大学, 2013
- Liu G Q. Studies on molecular mechanism of pear dormancy. Hangzhou: Zhejiang University, 2013

- [17] Lang G A, Early J D, Martin G C, Darnell R L. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*, 1987, 22(3): 371-377
- [18] Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Hosaka Y, Sasaki R, Tao R. Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(10): 3481-3488
- [19] Ravish C, Kumar S M, Rekha C, Ananda A R. Optimized recovery of cryostored dormant buds of mulberry germplasm. *Plants*, 2023, 12(2): 225-225
- [20] 黄鑫, 戴思兰, 郑国生, 盖树鹏. 木本植物芽内休眠机制的研究进展. *林业科学*, 2008, 44(2): 129-133
Huang X, Dai S L, Zheng G S, Gai S P. Research progress on the mechanism of bud dormancy in woody plants. *Scientia Silvae Sinicae*, 2008, 44(2): 129-133
- [21] 张琛, 刘辉, 阮若昕, 骆慧枫, 廖益民, 汪末根. 不同海拔栽培区甜樱桃休眠阶段花芽内含物变化差异. *北方园艺*, 2024, (12): 1-10
Zhang C, Liu H, Ruan R X, Luo H F, Liao Y M, Wang M G. Difference of changes in flower bud inclusion of sweet cherry during dormancy at different altitudes. *Northern Horticulture*, 2024, (12): 1-10
- [22] 王芳, 王淇, 赵曦阳. 低温胁迫下植物的表型及生理响应机制研究进展. *分子植物育种*, 2019, 17(15): 5144-5153
Wang F, Wang Q, Zhao X Y. Research progress of phenotype and physiological response mechanism of plants under low temperature stress. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(15): 5144-5153
- [23] 赵崇宇, 苏凯, 刘春生, 肖坤, 李刚, 武军凯, 肖啸, 张立彬, 张晨光. 果树抗寒机理与影响因素研究. *中国果菜*, 2023, 43(12): 48-53
Zhao C Y, Su K, Liu C S, Xiao K, Li G, Wu J K, Xiao X, Zhang L B, Zhang C G. Research on the cold resistance mechanism and influence factor of fruit trees. *China Fruit & Vegetable*, 2023, 43(12): 48-53
- [24] Zhuang W, Gao Z, Wang L, Zhong W, Ni Z, Zhang Z. Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA₄ in Japanese Apricot flower bud dormancy release. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 4953-4966
- [25] Wang D, Gao Z, Du P, Xiao W, Tan Q, Chen X, Li L, Gao D. Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1248
- [26] 高庆玉, 闫超, 张丙秀, 魏媛媛, 王振武, 张宇. 树莓果实与休眠芽生长过程中内源激素含量变化研究. *东北农业大学学报*, 2015, 46(1): 19-25
Gao Q Y, Yan C, Zhang B X, Wei Y Y, Wang Z W, Zhang Y. Study on the variation of endogenous hormone content during the growth of raspberry fruit and dormant bud. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2015, 46(1): 19-25
- [27] 宋猜, 尹明宇, 姜仲茂, 李慧, 乌云塔娜, 宋继金. '优一'杏花芽分化特性及其与休眠期内源激素含量变化的关系. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2017, 45(6): 170-176
Song C, Yin M Y, Jiang Z M, Li H, Wu Y T N, Song J J. Relationship between flower bud differentiation and change of endogenous hormone of 'Youyi' during dormancy period. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2017, 45(6): 170-176
- [28] 李建召. 脱落酸及相关激素调控梨芽休眠的分子机制研究. 杭州: 浙江大学, 2019
Li J Z. Studies on the molecular mechanism of ABA and related phytohormones-regulated pear bud dormancy. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [29] Yang Q S, Gao Y H, Wu X Y, Moriguchi T, Bai S L, Teng Y W. Bud endodormancy in deciduous fruit trees: advances and prospects. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 139-139

- [30] Singh K R, Miskolczi P, Maurya P J, Bhalerao P R. A tree ortholog of SHORT VEGETATIVE PHASE floral repressor mediates photoperiodic control of bud dormancy. *Current Biology*, 2019, 29(1): 128-133.e2
- [31] Hao X Y, Tang H, Wang B, Wang L, Cao H L, Wang Y C, Zeng J M, Fang S, Chu J F, Yang Y J, Wang X C. Gene characterization and expression analysis reveal the importance of auxin signaling in bud dormancy regulation in tea plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2019, 38(1): 225-240
- [32] Zhang Z Y, Zhuo X K, Zhao K, Zheng T C, Han Y, Yuan C Q, Zhang Q X. Transcriptome profiles reveal the crucial roles of hormone and sugar in the bud dormancy of *Prunus mume*. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 5090
- [33] Aloni R. The role of cytokinin in organised differentiation of vascular tissues. *Functional Plant Biology*, 1993, 20(5): 601-608
- [34] Pan J J, Wang H P, You Q G, Cao R, Sun G L, Yu D Q. Jasmonate-regulated seed germination and crosstalk with other phytohormones. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(4): 1162-1175
- [35] 韩驰, 仲文君, 高志红, 霍希美, 李百健, 庄维兵, 倪照君. 基于液相色谱-串联质谱法分析茉莉酸与果梅休眠的关系. *江苏农业科学*, 2015, 43(5): 167-170
- Han C, Zhong W J, Gao Z H, Huo X M, Li B J, Zhuang W B, Ni Z J. Based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, the relationship between jasmonic acid and dormancy of *Prunus mume* was analyzed. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(5): 167-170
- [36] Arora R, Rowland L J, Tanino K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: A science comes of age. *HortScience*, 2003, 38(5): 911-921
- [37] Ruelland E, Vaultier M N, Zachowski A, Hurry V. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*, 2009, 49: 35-150
- [38] Farokhzad A, Nobakht S, Alahveran A, Sarkhosh A, Mohseniazar M. Biochemical changes in terminal buds of three different walnut (*Juglans regia* L.) genotypes during dormancy break. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2018, 76: 52-57