



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: 木薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存技术优化
作者: 苗秀清, 王敏瑞, 李志英, 李季, 王小冰, 符运柳, 徐立
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20250119001
收稿日期: 2025-01-19
网络首发日期: 2025-02-24
引用格式: 苗秀清, 王敏瑞, 李志英, 李季, 王小冰, 符运柳, 徐立. 木薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存技术优化[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250119001>



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。

木薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存技术优化

苗秀清^{1,2}, 王敏瑞², 李志英², 李季³, 王小冰², 符运柳², 徐立²

(1 海南大学热带农林学院, 海口 570228; 2 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, 海南儋州 571737; 3 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, 其种质资源保存对育种工作持续开展和粮食安全保障意义重大。茎尖超低温保存节约空间和人力投入, 降低保存过程中的遗传变异风险, 是木薯等无性繁殖作物种质资源长期保存的重要手段。小滴玻璃化法是目前广泛应用的茎尖超低温保存技术, 但该方法并未针对木薯茎尖进行优化, 致使该方法在木薯种质资源长期保存的实际应用中受限。为此本研究以不添加任何激素的 MS 培养基为恢复培养基, 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。研究发现在加载液处理前增加 0.3 mol/L 蔗糖 MS 培养基进行 4 h 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, 使木薯‘COL777’茎尖经超低温保存后获得 85.6% 的成活率和 63.3% 的再生率。15 份木薯基因型适用性测试中有 8 种基因型经超低温保存后再生率能达到 33.3%-73.3%。然而, 仍有 7 种基因型的冷冻保存效果不理想。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生长素(萘乙酸 NAA, 1-Naphthaleneacetic acid)和添加较低浓度的 6-苄氨基嘌呤(6-BA, 6-benzylaminopurine)会避免冷冻后茎尖形成愈伤组织从而提高再生率, 最终优化得到再生培养基 B2(RMB2, regeneration media B2): 0.09 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 0.23 $\mu\text{mol/L}$ 赤霉素(GA3, Gibberellin A3) + 4.4 g/LMS + 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 种基因型测试发现有 4 种基因型经冷冻保存后茎尖再生率达到 30% 以上。综合来说, 80% 的木薯基因型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基因型适用性。因此本研究构建的小滴玻璃化法超低温保存体系简便高效, 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^{1,2}, WANG Minrui², LI Zhiying², LI Ji³, WANG Xiaobing², FU Yunliu², XU Li²

(¹College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228; ²Tropical 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, Hainan; ³College 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 sustainable development of breeding work and food security through the preservation of its germplasm resources. Cryopreservation of shoot tips, which saves space and labor, and reduces the risk of genetic variation during storage, is an important method for the long-term preservation of germplasm resources of vegetatively propagated crops like cassava. The droplet-vitrification method is currently a widely used technique for shoot tip cryopreservation, but it has

收稿日期: 2025-01-19

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)

not been optimized for cassava shoot tips, limiting its application for cassava long-term conservation. Therefore, this study used hormone-free MS medium as the recovery medium to optimize key steps in the droplet-vitrification cryopreservation process for cassava shoot tips. The study found that a 4-hour preculture in 0.3 mol/L sucrose MS medium before loading solution treatment, combined with 50-60 minutes of cryoprotection on ice using PVS2 plant vitrification solution, significantly enhanced the cryopreservation effect, resulting in an 85.6% survival rate and a 63.3% regeneration rate for cassava 'COL777' shoot tips after ultra-low temperature preservation. In a genotype applicability test involving 15 cassava genotypes, 8 of them achieved regeneration rates ranging from 33.3% to 73.3% after ultra-low temperature preservation. However, the cryopreservation effects were unsatisfactory for 7 genotypes. Consequently, the study subsequently optimized the regeneration medium following shoot tip cryopreservation. It was discovered that removing auxin (NAA, 1-Naphthaleneacetic acid) and adding a lower concentration of 6-benzylaminopurine (6-BA) to the regeneration medium prevented the formation of callus tissue from the cryopreserved shoot tips, thereby improving the regeneration rate. Ultimately, an optimized regeneration medium, RMB2, was developed: 0.09 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 0.23 $\mu\text{mol/L}$ gibberellic acid (GA3, Gibberellin A3) + 4.4 g/L MS + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar. When cassava 'COL777' and 'SC8002' were cultivated on regeneration media B2 after cryopreservation, their regeneration rates were 86% and 69%, respectively. In a test involving 7 genotypes using RMB2, 4 of them achieved shoot tip regeneration rates above 30% after cryopreservation. Overall, 80% of the cassava genotypes tested achieved regeneration rates above 30% after cryopreservation using the optimized ultra-low temperature preservation technique. This result also enhances the genotype applicability of the droplet-vitrification method. Therefore, the droplet-vitrification ultra-low temperature preservation system established in this study is simple and efficient, significantly promoting the development of cassava germplasm cryopreservation work and better protecting cassava germplasm resources.

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^[1]。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°C~-150°C)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^[2]。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^[3]。

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^[4-5]。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作用不可替代^[6-7]。此外，其丰富的淀粉是生物燃料、造纸及纺织等行业重要原料，可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^[8-9]。

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。此外品资所运营的国家热带作物中期库备份保存有 1000 多份木薯试管苗资源。然而随着引进的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^[10]；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^[11]。为了有效克服两种传统木薯保存方法的弊端和局限性，中国热科院启动了木薯茎尖超低温保存研究与应用，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，先后试验了早期的慢速冷冻法^[10,12-14]、和快速冷冻法^[13-14]、包埋干燥法^[14-15]、玻璃化法^[17-18]、包埋玻璃化^[11]、小滴玻璃化法^[16,18-21]和铝盘玻璃化法^[21]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^[10,12-14]。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^[14-16]。PVS2 植物玻璃化溶液发明后，玻璃化相关方法(常规玻璃化法、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^[11,17-18]。其中，Charoensub 等^[11]在包埋玻璃化技术研究中发现 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^[22]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^[21]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。但相较于铝盘玻璃化法，小滴玻璃化法操作简单、成本较低可能更适合应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^[21]，包括温带和热带地区的木本和草本植物种质资源^[23]。

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))^[24]茎尖开展试验，并在此基础上获得了以下进展：外植体上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^[19]，3 个月龄植株茎尖质量更高^[20]；加载液处理时间 2 h 搭配 PVS2 处理时间 30 min 效果更佳^[20]；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^[20]。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，例如：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。全球目前木薯超低温保存仅 500 份左右，显著滞后于马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、甘薯 (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkil) 等其他根茎类作物的研究与应用进展^[25]。

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^[15,20-22]。例如，Dumet 等^[19]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(ascorbic acid)+ 植物凝胶 2.5 g/L)上黑暗保持 24 h，再将其转移至标准分生组织培养基(表 1 再生培养基 A(RMA, Regeneration media A))中继续培养；Escobar 等^[20]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，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。

植物生长调节剂如 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)被证明对超低温冷冻保存后的再生率影响较大^[26-28],需确定再生培养基中是否添加 NAA 及 6-BA 并筛选其添加浓度从而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进行优化,并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。本研究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amp;方法

1.1 试验材料

在前期研究中,我们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,木薯‘COL777’呈中等水平的反应,而‘SC8002’反应较差。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 种木薯基因型,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基因型适用性测试,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。所有木薯基因型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 + 30g/L 蔗糖 + 7g/L 卡拉胶, pH=5.8, 121℃ 下高压灭菌 20 min,培养条件为 24℃,光强为 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的冷白色荧光管下,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗。

1.2 试验方法

1.2.1 优化木薯‘COL777’茎尖小滴玻璃化法超低温保存再生培养前的关键步骤 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(LS, loading solution)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。

植物玻璃化溶液(PVS2, plant vitrification solution 2)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 中,该溶液由液体 WPM 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,0℃下处理 10~60 min。

液氮(LN, liquid nitrogen)冷冻:将茎尖转移到铝箔条(约 2.5cm × 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 LN 中预冷,随后将铝箔条放入 LN 预冷的冷冻管中,再把冷冻管放入 LN 预冷的冷冻盒,最后放入液氮生物储存罐中。

卸载液(ULS, unloading solution)处理:将带茎尖的铝箔条从 LN 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 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 培养后移至正常光培养，茎尖每隔一个月更换到新鲜培养基上。培养 3 个月记录成活率和再生率。

首先对比 6 个不同 PVS2 处理时间 (10, 20, 30, 40, 50, 60 min) 比较解冻后茎尖成活率和再生率。其次在 LS 加载处理之前添加预培养步骤，使用含 0.3 mol/L 的 MS 液体培养基对比 5 个处理时间 (0, 4, 16, 24, 48 h)，用优化后的 PVS2 冰上处理时间进行冷冻保存。随后采用最佳蔗糖预培养时间、PVS2 冰上处理时间，对比卸载液中不同蔗糖浓度 (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。

1.2.2 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 先对比研究再生培养基 A (RMA, Regeneration media A)^[29]、再生培养基 B (RMB, Regeneration media B)^[24]、再生培养基 C (RMC, Regeneration media C)^[20] 与分别去除 NAA 的再生培养基 A1 (RMA1, Regeneration media A1)、再生培养基 B1 (RMB1, Regeneration media B1)、再生培养基 C1 (RMC1, Regeneration media C1) 对木薯 ‘COL777’ 冷冻后茎尖恢复生长的影响，并设置对照组 MS30 培养基 (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 $\mu\text{mol/L}$)。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。

表 1 四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 (Regeneration media A)	再生培养基 B RMB (Regeneration media B)	再生培养基 C RMC (Regeneration media C)	再生培养基 MS30 Regeneration medium MS30
MS	4.4 g/L	4.4 g/L	4.4 g/L	4.4 g/L
SUC	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
NAA	1.07 $\mu\text{mol/L}$	1.07 $\mu\text{mol/L}$	0.05 $\mu\text{mol/L}$	
6-BA	0.66 $\mu\text{mol/L}$	0.66 $\mu\text{mol/L}$	0.09 $\mu\text{mol/L}$	
GA ₃	0.23 $\mu\text{mol/L}$	0.23 $\mu\text{mol/L}$	0.29 $\mu\text{mol/L}$	
肌醇 (Inositol)	0.56 mol/L		0.56 mol/L	
腺苷硫酸盐 (Adenine sulfate)	0.22 mol/L			
盐酸硫胺素 (Thiamine HCL)			2.96 $\mu\text{mol/L}$	
琼脂 (Agar)	7 g/L	7 g/L	7 g/L	7 g/L

1.2.3 数据收集与分析 本研究各试验为单因素试验，每个处理设三个重复，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。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。成活和再生率定义为成活和再生数/处理茎尖总数之比，分别在培养后 3 个月记录。对优化后的小滴玻璃化法超低温保存方案及再生培养基进行木薯基因型适用性测试，每种基因型测试 60-100 个茎尖，同样利用 3 个月后的成活率及再生率进行评价分析。所有试验数据以平均值±标准误差 (SE) 表示。运用 SPSS 26.0 软件对数据进行正态性检验

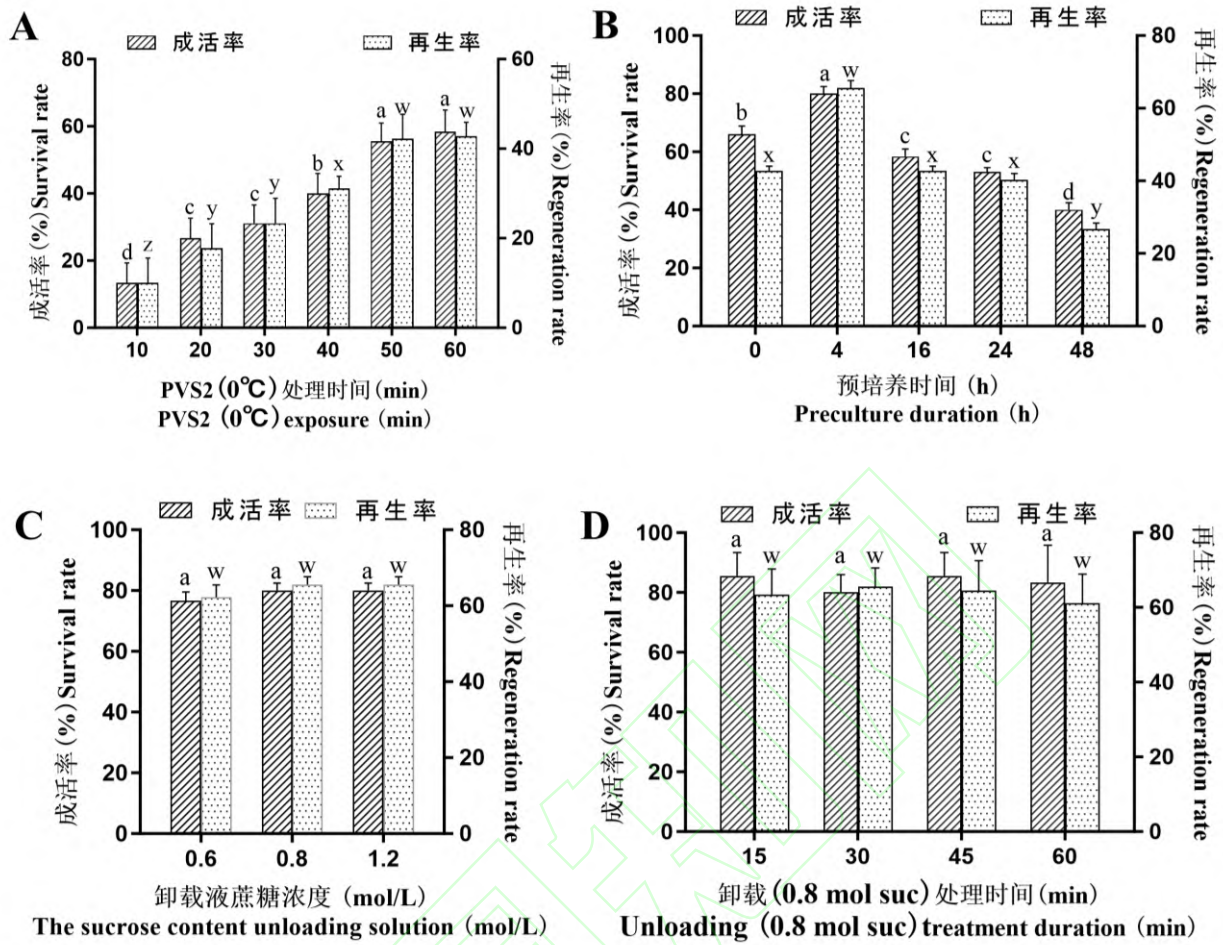
(Shapiro-Wilk 检验)及方差齐性检验(Levene's Test), $P \geq 0.05$, 说明数据服从正态分布及方差齐性, 随后进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 基于分析结果, 针对图 1 和图 3 的数据, 以邓肯多重范围检验(Duncan's Multiple-Range Test)进行差异显著性分析($P < 0.05$), 并用不同字母表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 优化木薯‘COL777’茎尖小滴玻璃化法超低温保存再生培养前的关键步骤

首先本研究对超低温冷冻保存过程中的关键步骤进行优化, 在添加有 30 g/L 蔗糖, 但不添加任何激素的 MS 恢复培养基(MS30)上对超低温保存后的木薯茎尖进行再生培养。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°C 下 PVS2 处理时间的优化。结果表明当 PVS2 处理时间 10 min 时成活率和再生率最低, 分别为 13.3%和 10.0%(图 1A); 从 10 min 延长至 50 min 时, 茎尖成活率和再生率显著升高, 50-60 min 时趋于稳定, 60 min 时成活率和再生率最高, 达到 58.3%和 42.8% (图 1A)。随后本研究对茎尖 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 与 48 h 相比, 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); 处理 16 h 与 24 h 时的成活率和再生率均无显著性差异。

随后本研究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 蔗糖浓度与 0.8 mol/L 和 0.6 mol/L 处理结果无显著性差异, 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)。



A: PVS2 处理时间(0°C)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: 卸载处理时间对茎尖成活和再生的影响。a-d 不同字母表示成活率在 $P<0.05$ 水平上有显著性差异, 相同字母表示无显著性差异; w-z 不同字母表示再生率在 $P<0.05$ 水平上有显著性差异, 相同字母表示无显著性差异

A: Effect of PVS2 exposure time (0 °C) 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; C: Effect of sucrose content in the unloading solution on the survival and regeneration of shoot tips; D: The effect of unloading treatment time on the survival and regeneration of shoot tips; Different letters a-d indicate significant differences in survival rates at the $P<0.05$ level, while the same letters indicate no significant differences; different letters w-z indicate significant differences in regeneration rates at the $P<0.05$ level, while the same letters indicate no significant differences; the same as below

图 1 优化木薯‘COL777’茎尖小滴玻璃化法超低温保存前再生培养的关键步骤

Fig.1 Optimization of key steps prior to regeneration culture for Dr-vi cryopreservation of cassava 'COL777' shoot tips

2.2 优化后的小滴玻璃化法基因型适用性测试

本研究随机挑选 15 种木薯基因型, 利用优化后的小滴玻璃化法进行实际保存, 每个冷冻管保存 10-15 个茎尖, 每种基因型保存 60~100 个茎尖。分别在冷冻当天、冷冻后一周及冷冻 1 个月解冻进行再生培养(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经历保存), 得到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 种基因型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 15 种木薯基因型的小滴玻璃化超低温保存

Table 2 Cryopreservation of 15 cassava genotypes using droplet-vitrification

基因型 Genotypes	再生培养基 MS30 Regeneration medium MS30	
	成活率(%) ± 标准差 Survival (%) ± SE	再生率(%) ± 标准差 Regeneration (%) ± SE
	ZMH42	82.2 ± 2.8
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
CMR260715	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

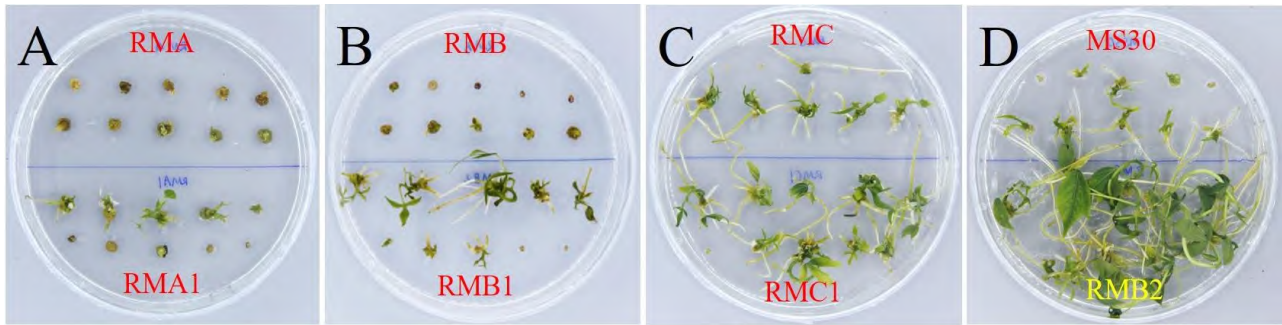
2.3 小滴玻璃化法超低温保存后再生培养基对成活和再生的影响

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三种培养基 (RMA、RMB 与 RMC，见表 1) 与本研究所用的 MS30 培养基进行对比。结果表明：添加 NAA 的三种培养基虽然能够获得较高的成活率 (高于 60%)，但茎尖的生长形态与再生率差异显著。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 (图 2A, B)，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%。

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，并用 RMA1、RMB1、RMC1 分别代指无 NAA 添加的三种培养基。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)；RMC1 上的茎尖成活率提高到 91%，再生率达到 86%，高于对照组 MS30 固体培养基上的再生率 (图 3A)。

随后本研究基于 RMB1 和 RMC1 优化 6-BA 的添加浓度。该研究在两种再生率不同的木薯基因型 ‘COL777’、‘SC8002’ 中开展。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)。本研究将基于 RMB1 添加 0.09 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 6-BA 的培养基命名为 RMB2, 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)。

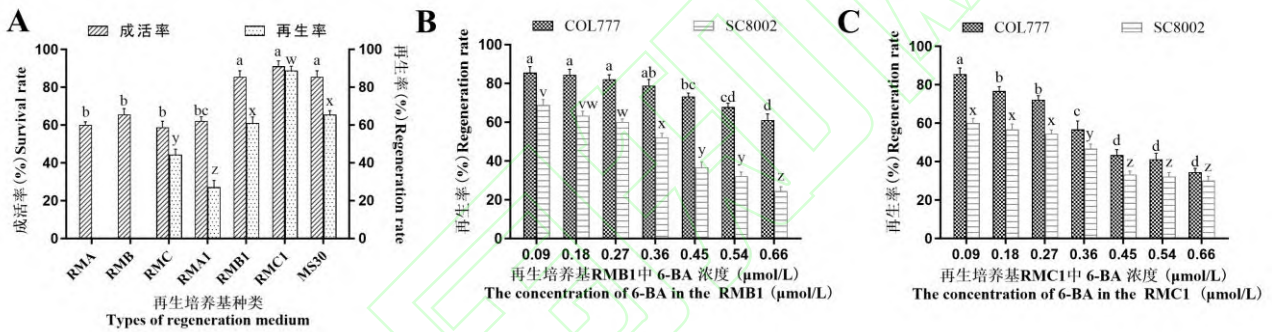


A: 在 RMA 和 RMA1 培养得到的茎尖状态; B: 在 RMB 和 RMB1 培养得到的茎尖状态; C: 在 RMC 和 RMC1 培养得到的茎尖状态; D: 茎尖在 MS30 培养基与优化后筛选得到的 RMB2 上的反应

A: shoot tip status obtained from cultures in RMA and RMA1; B: shoot tip status obtained from cultures in RMB and RMB1; C: shoot tip status obtained from cultures in RMC and RMC1; D: Responses of shoot tips on MS30 medium and the optimized and selected RMB2 medium

图 2 木薯 'COL777' 茎尖小滴玻璃化法超低温保存后在不同再生培养基上培养 3 个月的反应情况

Fig. 2 Response of cassava 'COL777' shoot tips after droplet-vitrification cryopreservation on different regeneration media



A: 培养基种类及是否添加 NAA 对木薯 'COL777' 茎尖成活和再生的影响; B: 利用 RMB1 对比添加 6-BA 浓度对木薯茎尖成活和再生的影响; C: 利用 RMC1 对比添加 6-BA 浓度对木薯茎尖成活和再生的影响; 图 A 中 a-b 不同字母表示成活率在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异; w-z 不同字母表示再生率在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异; 图 B 和图 C 中 a-b 不同字母表示 'COL777' 再生率在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异; v-z 不同字母表示 'SC8002' 再生率在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异

A: Effects of different media types and the addition of NAA on the survival and regeneration of cassava 'COL777' shoot tips; B: Comparison of the effects of different 6-BA concentrations on the survival and regeneration of cassava shoot tips using RMB1; C: Comparison of the effects of different 6-BA concentrations on the survival and regeneration of cassava shoot tips using RMC1, in Fig. A, different letters a-b indicate significant differences in survival rates at the $P < 0.05$ level; different letters w-z indicate significant differences in regeneration rates at the $P < 0.05$ level; in Figs B and C, different letters a-b indicate significant differences in the regeneration rate of 'COL777' at the $P < 0.05$ level; different letters v-z indicate significant differences in the regeneration rate of 'SC8002' at the $P < 0.05$ level.

图 3 不同培养基对木薯茎尖小滴玻璃化法保存后的成活和再生的影响

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

2.4 RMB2 再生培养基的基因型适用性测试

在以 MS30 培养基培养的 15 种木薯基因型种质中, 有 8 种基因型的再生率未达 30% (表 2)。本研究应用优化后的 RMB2 对这 8 种基因型的木薯茎尖进行第二轮超低温保存的广谱性测试, 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 培养基均显著提升 (表 3)。其中 5 种基因型的超低温保存再生率达到 30%-68% 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' 三种基因型的再生率低于 30%, 其超低温保存体系仍需进一步优化。

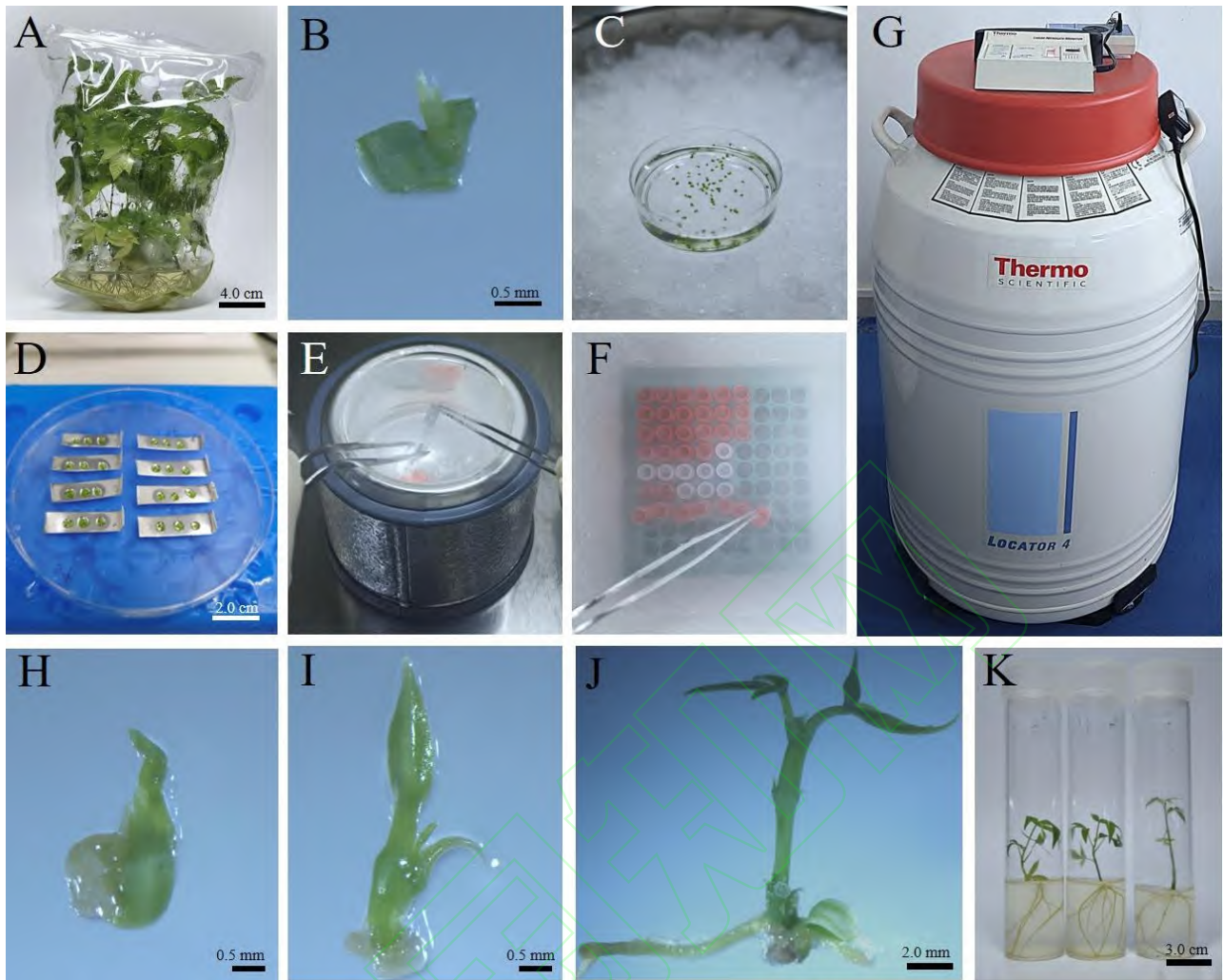
表 3 优化得到的 RMB2 对 8 种木薯基因型进行测试

Table 3 Testing of the optimized RMB2 on 8 cassava genotypes

基因型 Genotypes	RMB2 Regeneration medium B2	
	成活率(%) ± 标准差	再生率(%) ± 标准差
	Survival (%) ± SE	Regeneration (%) ± SE
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
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 优化得到的木薯茎尖小滴玻璃化法冷冻保存体系

本研究优化所构建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 mm-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 LS 对茎尖短暂处理 30 min (加载)后，将茎尖转移到 PVS2 中于冰上 (0°C)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 MS 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 GA₃ + 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：即茎尖成活(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。



A:为切取茎尖准备的木薯组培苗; 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-G:将液氮预冷过的茎尖转移至冷冻管(E), 然后放入冷冻盒(F), 最后放入液氮生物储存罐(G)中进行超低温保存; H-K: 一个茎尖在超低温保存后展现出芽的生长(H), 茎的伸长(I)和根的再生(J); K:超低温保存后恢复的木薯再生试管苗

A:Tissue-cultured cassava plantlets prepared for shoot tip excision; B:Shoot tips ready for freezing; C:Treatment of cassava shoot tips with PVS2 cryoprotectant on ice; D:Transfer of PVS2-dehydrated shoot tips to small droplets of PVS2 on aluminum foil strips; E-G:Transfer of liquid nitrogen-precooled shoot tips to cryotubes (E), then into a freezing box (F), and finally into a liquid nitrogen biological storage tank (G) for cryopreservation; H-K: A shoot tip exhibiting bud growth (H), stem elongation (I), and root regeneration (J) after cryopreservation; K:Regenerated cassava plantlets in test tubes recovered after cryopreservation

图 4 优化的木薯小滴玻璃化法超低温保存方案

Fig. 4 Optimized protocol for cryopreservation of cassava using the vitrification method in droplet vitrification

3 讨论

应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^[29-30]，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°C 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°C 下 PVS2 时间相似^[31]。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，带来过大的冷冻伤害，而过长时间的 PVS2 处理给组织细胞带来过大的渗透胁迫，同样影响超低温保存后的茎尖再生^[31]。不同的保存方法对于 PVS2 的处理时间也有很大差异。Charoensub 等^[11]在木薯茎尖包埋玻璃化法的研究中优化所得 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^[15,21]。这是因为 PVS2 中的二甲基亚砜(DMSO)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^[30]。本研究优化所得的 PVS20 冰上处理时间(50~60 min)，长于前人所用 30 min 的处理时间^[16,18-21]，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^[32]。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，从而提高茎尖在超低温保存后的活力^[33]。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^[34]。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^[35]。而现有木薯的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^[36]在甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)上发现蔗糖预培养时间从 1 天延长至 2 天会导致再生率下降，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^[24]。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^[37]。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 分钟的成活率高于含 0.3 mol/L 和 1.2 mol/L 蔗糖的卸载液^[38]。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。本研究对比木薯上常用四种再生培养基后发现：添加成分较多的 RMA 上茎尖成活率远低于添加成分较少的 RMB 再生培养基，这可能与 RMA 中添加了 0.22 mol/L 的腺苷硫酸盐有关。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细胞分裂素 6-BA、生长素 NAA 和赤霉素 GA₃ 等的含量，避免产生负面效应^[26-28]。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^[26]，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了愈伤组织的形成，从而提高冷冻后的再生率。Ashmore 等^[35]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 GA₃ 更有利于茎尖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^[28]，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^[27-28]。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.]^[28]、葡萄 LN33 杂交种 (*Vitis* L.)^[27-28]和 Superior 品种 (*Vitis vinifera* L.)^[27]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基因型适用性，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基因型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基因型适用性的重要途径。

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基因型中的适用性。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，也对其它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. Conservation and utilization of horticultural genetic resources, 2019: 529-578
- [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, Chavarriaga 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, Fliedler 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. Casava 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//F E, H 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, Chabrillange 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. Springer Netherlands, 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 monodonal 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. 2016, 1744(1): 020057-1–020057-11
- [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 A, Tohme J, BE Reed B M. Using a droplet-vitrification method to partially overcome the recalcitrance of Cassava to cryostorage. *Acta Horticulturae*, 2014, (1039): 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, MaurizioEngelmann, FlorentPathirana, RanjithPanis, BartVolk, Gayle 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 Slezziak 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

