

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 Y, CHEN Y F, QIAO Q, et al. Cryopreservation of *Malus Red Splendor Crabapple* Shoots [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (5): 566–573.

红丽海棠茎尖超低温保存技术研究

彭颖, 陈友锋, 乔谦, 刘燕*

(花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室/国家花卉工程技术研究中心/城乡生态环境北京实验室/林木花卉遗传育种教育部重点实验室/北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要:【目的】建立红丽海棠超低温保存技术体系, 实现其种质资源保存。【方法】以红丽海棠茎尖为试材, 研究蔗糖预处理浓度和时间、装载处理时间、PVS2 处理时间对其超低温保存后的存活率的影响, 并在此基础上, 在超低温保存程序中的不同环节添加 3 种抗氧化剂 [过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、抗坏血酸 (Ascorbic acid, AsA) 和谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)] 和 2 种细胞程序性死亡 (PCD) 抑制剂 [(乙烯利 Ethephon, Eth) 和 NO 供体 (Sodium Nitroprusside, SNP)], 探讨其对茎尖冻后存活率的影响。【结果】(1) 红丽海棠茎尖的玻璃化保存程序为: 首先将红丽组培苗切为 4~5 mm 带顶芽茎段, 接种在含 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的预培养基后放入 4°C 冰箱冷锻炼 2 d; 再将其切成约 1.5~2.0 mm 的茎尖, 置于 Loading 溶液中, 在室温下处理 20 min, 随后于 0°C 下 PVS2 溶液处理 90 min, 立即投入液氮冻存; 需用时将其从液氮罐取出后, 快速放入 38°C 水浴中化冻 1 min, 再用 Unloading 溶液在室温下震荡洗涤 2 次, 每次 10 min。采用此方法红丽海棠茎尖液氮冻后存活率为 66.58%, 恢复生长率为 16.67%。(2) 不同浓度的外源添加剂对红丽海棠冻后存活率影响不同。其中, CAT、AsA 和 GSH 最佳添加浓度分别为 $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 较对照冻后存活率分别提高了 20.28%、6.75% 和 27.61%, 添加 Eth 和 SNP 没有显示明显的正向作用。【结论】红丽海棠茎尖可以实现超低温保存, 外源添加适宜浓度 GSH、CAT、AsA 可以提高液氮冻存后率, 效果最好的 GSH 可将恢复生长率从 16.67% 提高到 41.39%。

关键词: 观赏海棠; 茎尖超低温保存; 抗氧化剂; 细胞程序性死亡

中图分类号: S 685.99

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 05-0566-08

Cryopreservation of *Malus Red Splendor Crabapple* Shoots

PENG Ying, CHEN Youfeng, QIAO Qian, LIU Yan*

(Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding / National Engineering Research Center for Floriculture / Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment / Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education / School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: 【Objective】Cryopreservation technology was applied for the conservation of the ornamental *Malus Red Splendor* crabapple germplasm. 【Methods】Sucrose concentration and time for pretreatment as well as conditions for the subsequent loading, PVS2, and unloading treatments on the shoot tips of *Malus* spp. were studied. Under the selected preservation conditions, additional improvement on the post-freezing survival of the shoots by application of antioxidants (i.e., CAT, AsA, and GSH) and PCD inhibitors (i.e., Eth and SNP) was explored. 【Results】(1) The procedures employed for vitrification to preserve the shoots included cutting the histoponic seedlings into 4-5 mm segments containing terminal buds, inoculating the cut stems segments in a pre-culture medium containing $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose at 4°C for 2 d, cutting the tips into approximately 1.5-2 mm in length and placing in a loading solution for 20 m at room temperature, treating with PVS2 solution for 90 m at 0°C followed by immediate submerging in liquid nitrogen, removing the cryogenically frozen tips to rapidly thaw them in a water bath at 38°C for 1 m, and rinsing twice with an unloading solution at room temperature with constant shaking for 10 m each time. The post-cryopreservation survival rate of the shoot tips was 66.58%, and 16.67% of them recovered to grow as normal. (2) The best improvement by the addition of various agents was found to be CAT at $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, AsA at $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and GSH at $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which improved the survival rate after freezing by 20.28%, 6.75% and 27.61% respectively, while the addition of Eth and SNP did not show obvious positive effect.

收稿日期: 2022-12-20 初稿; 2023-03-22 修改稿

作者简介: 彭颖 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 植物种质资源保存 (E-mail: pengying_hallo@163.com)

* 通信作者: 刘燕 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物种质资源保存 (E-mail: chblyan@163.com)

基金项目: 雄安新区科技创新专项 (2022XAGG0100); 国家自然科学基金项目 (31770741)

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and GSH at $0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, which increased the post-freezing survival rate by 20.28%, 6.75%, and 27.61%, respectively, over control. On the other hand, the addition of Eth or SNP posted no significant effect on the tip survival.

【Conclusion】 The survival rate of the post-cryopreservation *Malus Red Splendor* shoot tips could be further improved by the addition of GSH, CAT or AsA in appropriate concentration. GSH could most significantly raise the rate of viable plants after the cryopreservation from 16.67% to 41.39%.

Key words: Ornamental crabapple; cryopreservation; antioxidants; programmed cell death

0 引言

【研究意义】植物种质资源的收集与保存是植物研究重要内容，其中超低温保存作为植物组织和细胞长期保存的理想方法，尤其适合营养繁殖作物的茎尖或分生组织的保存，具有直接再生完整小植株、减少遗传变异等优点^[1]。海棠是蔷薇科（*Rosaceae*）苹果属（*Malus*）中果径较小（ $\leq 5 \text{ cm}$ ）的落叶乔木或小乔木，其中观赏海棠（*Malus sp.*）观赏价值高，是重要的优质绿化树种，研究海棠茎尖超低温保存在生产上具有重要意义。【前人研究进展】超低温保存后较高的存活率和再生率是主要的技术目标，已有研究显示，玻璃化超低温保存中活性氧（Reactive oxygen species, ROS）诱导的氧化应激是引起植物材料冻存后存活率下降的原因之一，因此，可以采用外源抗氧化剂来保护机体在超低温保存中免受伤害，如过氧化氢酶（Catalase, CAT）^[2]、超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）^[3]等酶类抗氧化剂以及抗坏血酸（Ascorbic acid, AsA）^[4]和谷胱甘肽（Glutathione, GSH）^[5]等非酶类抗氧化剂，均可以有效降低 ROS 生成量，减少氧化应激的发生，显著改善超低温保存效果。此外，细胞程序性死亡（Programmed cell death, PCD）作为一种基因编码主动性的死亡方式，在植物超低温保存中也扮演了重要的角色，添加细胞凋亡抑制剂 D-CHO^[6]、NO 供体（Sodium Nitroprusside, SNP）^[7]和乙烯（乙烯利 Ethephon, Eth）^[8]等抑制 PCD 发生的物质可以提高存活率。【本研究切入点】目前除了对苹果属一些种类有少量超低温保存^[9-12]，特别是涉及观赏海棠的超低温保存研究极少，而极具观赏价值的北美海棠品种之一——红丽海棠（*Malus Red Splendor*）超低温保存鲜见报道。【拟解决的关键问题】本文以红丽海棠茎尖为试材，研究其超低温保存技术程序，探讨添加不同含量的抗氧化剂及 PCD 抑制剂对茎尖超低温保存冻后存活率的影响，建立红丽海棠玻璃化超低温保存技术程序，为观赏海棠种质资源保存提供一种技术思路，并为抗氧化剂和 PCD 抑制剂在超低温保存中的应用提供参考。

1 材料与方法

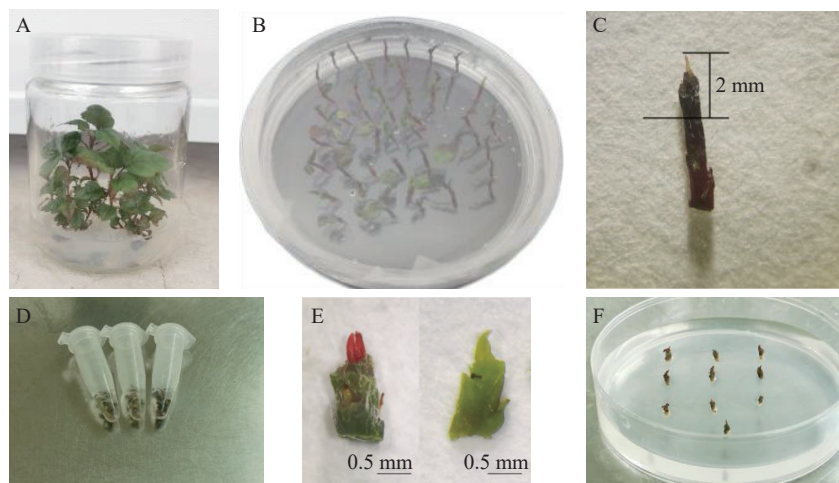
1.1 试验材料

供试材料为观赏海棠品种红丽，以健康且带有饱满腋芽的当年生枝条为外植体（采自国家植物园海棠栒子园），在 $1/2\text{MS}+1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6BA}+0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ IAA}$ 的培养基中诱导无菌苗，并于 $1/2\text{MS}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ IAA}$ 的培养基中进行继代培养，诱导和继代培养条件： $(23\pm 3)^\circ\text{C}$ ，光照强度 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，光照时间 $14 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ ，取生长旺盛的组培苗用于超低温保存试验。

1.2 试验方法

1.2.1 茎尖玻璃化法超低温保存 根据初步预试验设置玻璃化超低温保存的基本程序，再采用“逐步单因子法”对关键环节进行优化。（1）预培养：将红丽组培苗切成 5 mm 左右的带顶芽茎段，分别接种在不同蔗糖浓度（ 0.1 、 0.3 、 0.5 、 0.7 、 $0.9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的 MS 培养基中 4°C 下培养 2 d ，然后继续下述程序：（2）装载（Loading）：在双目解剖镜下，用镊子和手术刀切下带 $3\sim 4$ 片叶原基、大小为 $1.5\sim 2.0 \text{ mm}$ 的茎尖；将切下的茎尖放入 1.5 mL 装有 1 mL MS 溶液的离心管中，吸出离心管中的 MS 溶液，加入 1 mL Loading 溶液（ $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙三醇+ $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖，蒸馏水配置， $\text{pH } 5.8$ ），在室温下静置处理 30 min ；（3）PVS2 处理：吸出离心管中的 Loading 溶液，加入 1 mL PVS2 溶液 [$30\% (m/V)$ 丙三醇+ $15\% (m/V)$ 乙二醇+ $15\% (m/V)$ 二甲基亚砜+ $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖， $1/2\text{MS}$ 盐溶液配置， $\text{pH } 5.8$]，在 0°C 于冰浴中处理 90 min ；（4）液氮冻存：更换新的 1 mL PVS2 溶液后，封紧离心管口，立即投入液氮，冻存 1 h ；（5）化冻：将装有 PVS2 和茎尖的离心管从液氮中取出，迅速放入 38°C 水浴中化冻 1 min ；（6）去装载（Unloading）：将离心管中的 PVS2 溶液吸出，加入 Unloading 溶液（用 $1/2\text{MS}$ 盐溶液配置的 $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖， $\text{pH } 5.8$ ）后在室温下震荡洗涤 2 次，每次 10 min 。然后用于存活率或恢复生长率测定。相关步骤示意图见 [图 1](#)。

关键环节的优化：在获得适宜预培养蔗糖浓度基础上，分别设置不同预处理时间（ 1 、 2 、 3 d ），不同 Loading 溶液处理时间（ 0 、 10 、 20 、 30 、 40 min ）和



A.红丽海棠组培苗; B.预培养; C.切取 1.5~2.5 mm 茎尖; D.茎尖在离心管中; E.经 TTC 染色变红(左)与未染色(右)的茎尖; F.冻后茎尖接种到恢复培养基中。

A: Crabapple tissue culture; B: pre-culture; C: 1.5-2.5 mm cut of shoot tip; D: shoot tip segment in centrifugal tube; E: TTC stained red (left) and original (right) shoot tips; F: post-frozen shoot tips inoculated on recovery medium.

图 1 茎尖玻璃化超低温保存及存活率检测

Fig. 1 Survival rate of post-cryopreservation shoot tips

不同 PVS2 溶液处理时间 (0、30、60、90、120 min), 每个优化环节之前的步骤采用上一步已优化的处理方法, 之后的步骤采用上述基本程序, 直至完成所有关键环节的优化。每处理 10~15 个茎尖, 重复 3 次。

1.2.2 存活率测定 采用氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法检测冻存后茎尖的存活率。将经过 Unloading 溶液处理的茎尖置于含 0.4% (m/V) 的 TTC 溶液的离心管中, 再放入 37 °C 的水浴中黑暗处理 30 min, 将茎尖取出后, 置于体视显微镜下, 观察其染色情况。顶端分生组织被染红的茎尖记为存活的茎尖, 而未被染红的茎尖记为死亡的茎尖。存活率/%=(被染红的茎尖/所有经过 TTC 处理的茎尖)×100%。每处理 10~15 个茎尖, 重复 3 次。

1.2.3 恢复生长率测定 将经过液氮保存后的茎尖接种于 MS 培养基中暗培养 2 周后, 然后转入正常光照条件 (与组织培养的条件相同) 下培养, 茎尖长叶记为恢复生长。每处理 10~15 个茎尖, 重复 3 次。

1.2.4 外源抗氧化剂和 PCD 抑制剂的添加 在建立的玻璃化超低温保存程序的基础上, 根据课题组前人研究结果^[4, 7-8, 13], 分别在预培养基中添加 Eth (100、200、400、800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 在 Loading 溶液中添加 CAT, 使其终浓度分别为 50、100、200、400 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和硝普钠 (SNP), 使其终浓度分别为 50、100、200、1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 PVS2 溶液中添加 GSH, 使其终浓度分别为 0.04、0.08、0.16、0.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 Unloading 溶液中添加 AsA, 使其终浓度分别为 100、200、400、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 各处理均以原溶液为对照。

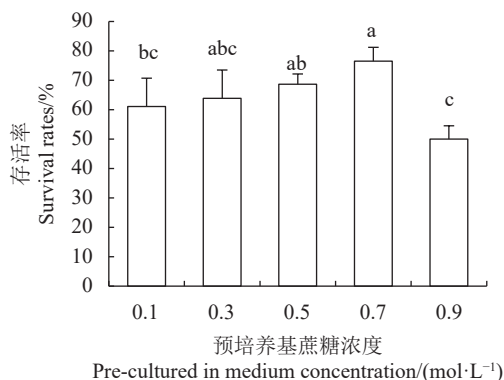
1.2.5 数据处理及分析 采用 SPSS 26.0 和 Excel 软

件分别对试验数据进行单因素方差分析和数据整理、图表绘制。

2 结果与分析

2.1 红丽海棠茎尖玻璃化超低温保存程序的建立

2.1.1 预培养基蔗糖浓度对液氮冻存后茎尖存活率的影响 将红丽海棠带顶芽茎段分别在含 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的预培养基上进行 2 d 的培养, 之后采用后续的基本程序, 测定液氮冻存后茎尖存活率。如图 2 所示, 茎尖冻后存活率随蔗糖浓度的升高先上升再下降, 0.3、0.5、0.7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖浓度培养的茎尖存活率没有显著差异, 但 0.7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖浓度的预培养基上茎尖冻后存活率最高, 为



不同小写字母表示不同差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Different lowercase letters indicate different significant differences ($P<0.05$), same as below.

图 2 预培养基蔗糖浓度对液氮冻存后茎尖存活率的影响
Fig. 2 Effect of sucrose concentration in pretreatment medium on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

76.54%，显著高于 0.1、0.9 mol·L⁻¹ 蔗糖浓度。因此红丽海棠超低温保存程序中预培养基的最适蔗糖浓度为 0.7 mol·L⁻¹，浓度过低过高则会降低茎尖的存活率。

2.1.2 预处理时间对液氮冻存后茎尖存活率的影响

将带顶芽的红丽海棠茎段接种于含 0.7 mol·L⁻¹ 蔗糖的预培养基上，在 4 ℃ 条件下分别培养 1、2 和 3 d，继续超低温保存基本程序的后续环节，液氮冻存后红丽茎尖存活率见图 3。随预处理时间的增加，茎尖存活率逐渐升高，在 2 d 时存活率最高达到 79.24%，后又下降。表明液氮冻后茎尖存活率受预培养环节冷锻炼时间的影响，适宜时长可以提高茎尖的抗冻能力。

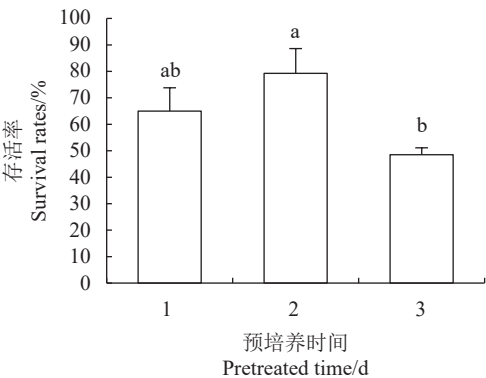


图 3 预处理时间对液氮冻存后茎尖存活率的影响
Fig.3 Effect of pretreatment time on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

2.1.3 Loading 溶液处理时间对液氮冻存后茎尖存活率的影响 红丽海棠茎段在含 0.7 mol·L⁻¹ 蔗糖浓度的预培养 2 d 后，将茎尖分别在 Loading 溶液中处理不同时间，继续超低温保存基本程序的后续环节，从液氮取出化冻后茎尖存活率的结果如图 4 所示。Loading 处理 20 min 时茎尖存活率最高，为 60.61%，而随着处理时间的继续延长逐渐下降，处理 40 min 时的茎尖存活率为 0。因此，Loading 溶液处理时间

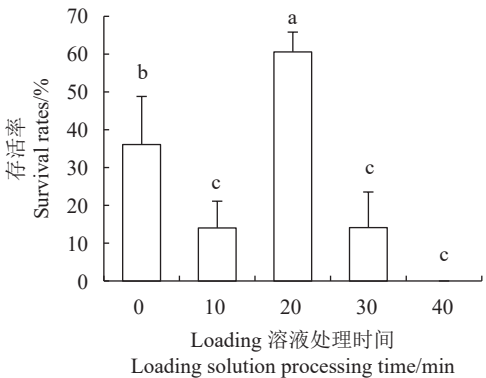


图 4 Loading 溶液处理时间对液氮冻存后茎尖存活率的影响
Fig.4 Effect of loading solution treatment time on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

不宜过长，否则可能会造成茎尖过度脱水而降低存活率。红丽海棠茎尖超低温保存的适宜 Loading 处理时间为 20 min。

2.1.4 PVS2 溶液处理时间对液氮冻存后茎尖存活率的影响

红丽海棠茎段在 4 ℃ 下，含 0.7 mol·L⁻¹ 蔗糖浓度的预培养基上培养 2 d 后，Loading 溶液处理 20 min，分别采用 PVS2 溶液处理不同时间，继续超低温保存基本程序的后续环节，结果如图 5。未经 PVS2 溶液处理的茎尖全部死亡，说明 PVS2 处理对玻璃化超低温保存过程起着至关重要的作用，随处理时间的增加，茎尖冻后存活率逐渐升高，处理 90 min 时茎尖存活率最高，为 62.88%，后随时间的延长而显著下降。红丽海棠茎尖超低温保存 PVS2 处理适宜时间为 90 min。

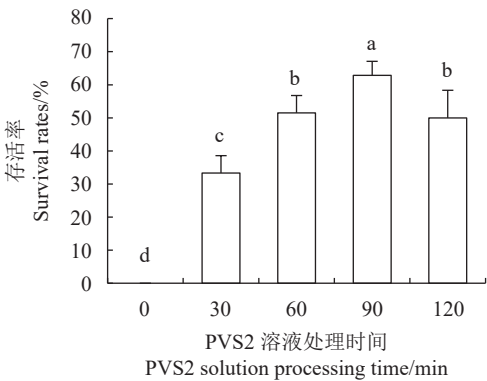


图 5 PVS2 溶液处理时间对液氮冻存后茎尖存活率的影响
Fig.5 Effect of PVS2 treatment time on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

2.2 外源添加剂对茎尖超低温保存效果的影响

2.2.1 预培养环节添加外源 Eth 对液氮冻存后茎尖存活率的影响 在红丽海棠茎尖超低温保存中预培养环节添加 4 个质量浓度的外源 Eth，继续超低温保存优化后的后续环节，茎尖冻后存活率见图 6。添加 100~400 mg·L⁻¹ 与对照没有显著差异，200 mg·L⁻¹

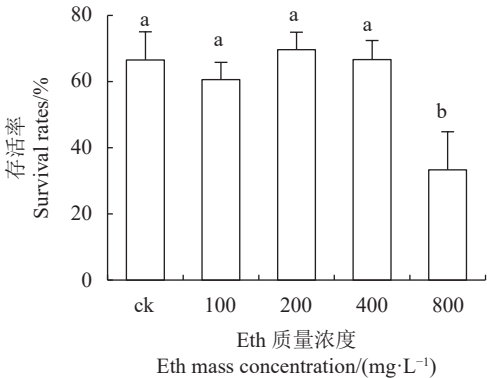


图 6 外源 Eth 对液氮冻存后茎尖存活率的影响
Fig.6 Effect of added Eth on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

时存活率稍高, 而 100、400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时存活率稍低, 而质量浓度过高时 (800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 存活率显著下降。说明在预培养环节导入 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Eth 时可能起到一定保护作用, 小幅度提高冻后存活率, 高浓度反而会导致其存活率降低。

2.2.2 Loading 环节添加外源 CAT 或 SNP 对液氮冻存后茎尖存活率的影响 采用预培养优化方案后, 在 Loading 环节添加不同浓度的外源 CAT, 之后继续超低温保存优化后的后续环节, 茎尖液氮冻存后存活率见图 7。添加 200 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 茎尖的存活率最高, 为 86.67%, 显著高于其他处理; 含量为 50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 稍有提高, 但差异不显著, 其余含量显著下降。由此可知, Loading 环节添加适宜浓度的外源 CAT 浓度可以发挥抗氧化保护作用, 显著提高茎尖冻后存活率。

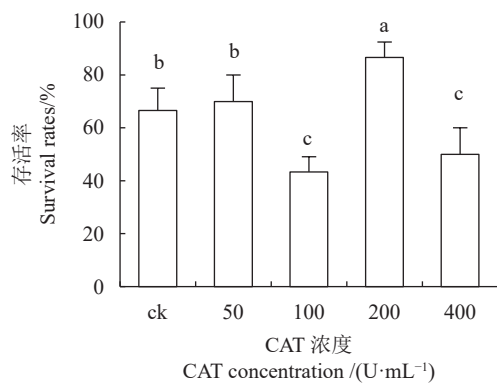


图 7 外源 CAT 对液氮冻存后茎尖存活率的影响

Fig. 7 Effect of added CAT on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

采用预培养优化方案后, 在 Loading 环节添加不同浓度的外源 SNP, 之后继续超低温保存优化后的后续环节, 茎尖超低温保存后存活率如图 8 所示。各浓度处理后冻后存活率均下降, 但添加 100 和 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 时与对照无明显差异, 而添加 50 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 时存活率显著下降, 相比对照分别降低

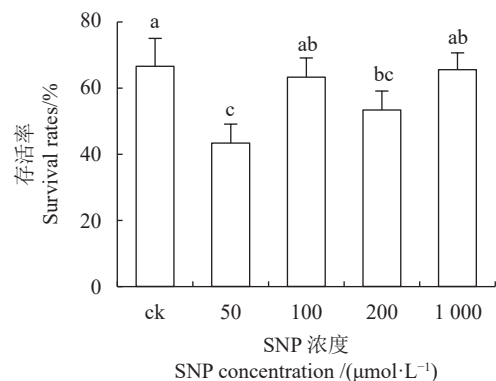


图 8 外源 SNP 对液氮冻存后茎尖存活率的影响

Fig. 8 Effect of added SNP on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

了 23.25% 和 13.25%。表明对 PCD 有拮抗作用的 SNP 在这里没有显示其作用。

2.2.3 PVS2 环节添加外源 GSH 对液氮冻存后茎尖存活率的影响 采用优化的预培养和 Loading 方案后, 在 PVS2 环节添加不同浓度的外源 GSH, 之后继续超低温保存后优化的后续环节, 茎尖液氮冻存后存活率见图 9。添加各种浓度的 GSH, 较对照均显著提高了茎尖冻后的存活率, 其中导入浓度为 0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时存活率最高, 为 94.19%。由此表明, 在 PVS2 环节导入外源 GSH 可有效发挥抗氧化保护作用, 提高存活率。

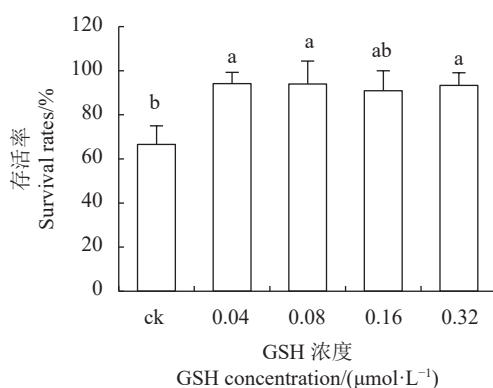


图 9 外源 GSH 对液氮冻存后茎尖存活率的影响

Fig. 9 Effect of added GSH on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

2.2.4 Unloading 环节添加外源 AsA 对液氮冻存后茎尖存活率的影响 采用优化的保存程序后, 在 Unloading 环节导入不同浓度的外源 AsA, 茎尖超低温保存后存活率如图 10 所示, 除 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 存活率下降外, 其余浓度均可提高冻后存活率, 效果最好的浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明外源 AsA 起到了一定的抗氧化保护作用, 小幅度提高了存活率。

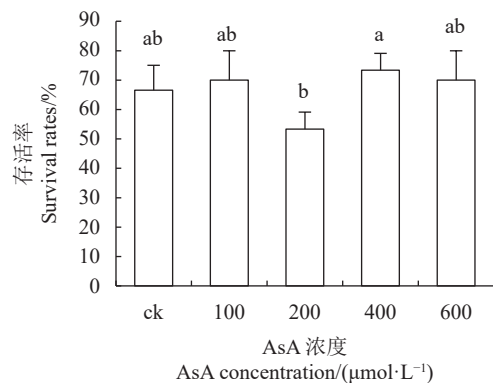


图 10 外源 AsA 对液氮冻存后茎尖存活率的影响

Fig. 10 Effect of added AsA on survival rate of post-cryopreservation shoot tips

2.3 红丽海棠茎尖超低温保存后恢复培养

采用优化后的超低温保存程序, 在 PVS2 环节添

加 $0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源 GSH，之后继续超低温保存后优化的后续环节，并进行恢复培养。没有添加 GSH 的对照组恢复生长率为 16.67%，添加 $0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源 GSH 的恢复生长率为 41.39%，提高了 24.73%。

3 讨论

冷锻炼能够提高植物茎尖的抗冻能力^[14]，通过在含有一定浓度的高糖、山梨醇或 DMSO 的培养基中培养植物茎尖，可以显著提高冻后茎尖的存活率^[15]。在大部分苹果属玻璃化超低温保存中，都至少需要 3~4 周的 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷锻炼^[16-19]。本试验通过 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预培养，起到冷锻炼作用，预培养 2 d，超低温保存后的茎尖存活率可到 79.24%。在苹果属其他茎尖超低温保存的研究中，有不使用 Loading 处理直接脱水处理^[20-22]，本试验不经 Loading 溶液处理也可达到 36.11% 的存活率，但经 Loading 溶液处理 20 min 的茎尖冻后存活率更高，因为装载阶段是实现玻璃化而脱水处理的过渡阶段，能够避免高浓度玻璃化溶液引起的剧烈渗透变化导致材料损伤。另外在本试验中 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 PVS2 处理 90 min 后茎尖冻后存活率最高，也有研究在室温下进行脱水处理，如将苹果品种嘎啦、望山红在室温下用 PVS2 处理 30 min^[10] 或 40 min^[11] 后再生率分别为 55.6% 和 17.9%，但 Uragami 等^[23] 认为低温能降低玻璃化溶液的高渗作用导致的植物损伤，因此在大多数植物的超低温研究中，玻璃化步骤均在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行^[24, 25]。

ROS 是需氧生物中细胞有氧代谢的副产物，在正常状态下，机体可以在 ROS 的产生和清除之间保持动态平衡，但当 ROS 在逆境胁迫下产生过量时，自身的抗氧化系统，包括 CAT、SOD 和 POD 等酶类，以及 AsA 和 GSH 等非酶类系统会协同作用清除抵抗 ROS 可能带来的伤害，但当抗氧化能力不足以清除过量的 ROS 时，机体就会出现氧化应激。这启发研究人员们通过导入外源抗氧化剂来抵御氧化损伤，研究证明外源 CAT^[4, 13, 26]、AsA^[4, 27] 和 GSH^[6] 均有抑制氧化应激的作用。本研究结果也显示，外源抗氧化剂 CAT、AsA 和 GSH 可以提高红丽海棠茎尖冻后存活率，说明外源抗氧化剂可能抑制了 ROS 造成的氧化损伤。3 种外源抗氧化剂在不同环节中使用，分别提高了红丽海棠茎尖冻后存活率 20.28%、6.75%、27.61%。

PCD 作为一种自发性、有序的细胞死亡方式，受基因调控，是生物生活的基本过程。多项研究表明植物 PCD 存在于植物的各个生长发育过程及植物对非生物胁迫的响应中^[28]。有研究显示超低温保存

中预培养是 PCD 的一个信号起始环节，PCD 相关调控基因显著上调^[7]，由于细胞凋亡存在一定的延迟性，预培养后的 Loading 环节也成为超低温保存中 PCD 研究的另一重要环节。本试验在预培养和 Loading 环节添加了 PCD 抑制剂，结果显示预培养环节添加外源 Eth 只是小幅度提高了红丽海棠茎尖冻后存活率，而在 Loading 环节添加外源 SNP 冻后存活率反而下降了，SNP 通过抑制 PCD 信号分子 NO 而其作用，而 NO 调控 PCD 具有双重作用，可以促进 PCD 的发生^[29, 30]，也可以抑制 PCD 的发生^[31, 32]，而添加环节对 NO 在 PCD 发生的作用也十分关键，如在春石斛类原球茎中预培养环节导入 NO 供体 (SNP) 促进了 PCD 的发生，降低了存活率，而在 Loading 环节添加则抑制了 PCD 的发生^[7]，故推测外源 SNP 对不同的植物和不同添加环节可能有不同的影响效果。

4 结论

红丽海棠茎尖采用以下程序可以实现超低温保存：取组培苗 4~5 mm 带顶芽茎段，接种在含 $0.7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的预培养基， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱培养 2 d；切取 1.5~2.0 mm 的茎尖，Loading 溶液室温下处理 20 min；PVS2 溶液 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 90 min，可存入液氮保存；需用时将其取出放入 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴快速化冻 1 min；在室温下 Unloading 溶液震荡洗涤 2 次，每次 10 min；进行恢复培养，存活率为 66.58%，恢复生长率为 16.67%。在 Loading、PVS2 和 Unloading 环节导入适宜浓度的抗氧化物质 CAT、GSH、AsA 可明显提高冻后存活率，最佳添加量分别为 $200 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，较对照存活率分别提高了 20.28%、27.61% 和 6.75%，而添加 PCD 抑制剂没有显示明显作用

参考文献：

- [1] 王越, 刘燕. 观赏植物种质资源的超低温保存 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (3): 559-566.
WANG Y, LIU Y. Cryopreservation of ornamental plant germplasm [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42 (3): 559-566. (in Chinese)
- [2] JIA M X, JIANG X R, XU J, et al. CAT and MDH improve the germination and alleviate the oxidative stress of cryopreserved *Paeonia* and *Magnolia* pollen [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40 (2): 37.
- [3] DI W, JIA M X, XU J, et al. Exogenous catalase and pyruvate dehydrogenase improve survival and regeneration and affect oxidative stress in cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorm-like bodies [J]. *Cryo Letters*, 2017, 38 (3): 228-238.

- [4] 狄玮, 贾梦雪, 刘燕. 外源抗氧化剂对春石斛类原球茎超低温保存的影响[J]. *植物生理学报*, 2015, 51 (11): 1880–1886.
- DI W, JIA M X, LIU Y. Effects of exogenous antioxidants on cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51 (11): 1880–1886. (in Chinese)
- [5] CHEN G Q, REN L, ZHANG D, et al. Glutathione improves survival of cryopreserved embryogenic calli of *Agapanthus praecox* subsp. *orientalis* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38 (10): 250.
- [6] 张洁. ROS诱导的氧化胁迫与细胞凋亡对百子莲愈伤组织超低温保存细胞活性的影响机制[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- ZHANG J. *Influence mechanism of ROS induced oxidative stress and apoptosis on cell viability of Agapanthus praecox callus during cryopreservation*[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015. (in Chinese)
- [7] 姜雪茹. 春石斛类原球茎玻璃化超低温保存中程序性细胞死亡研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- JIANG X R. *Study on the mechanism of programmed cell death during vitrification-cryopreservation in Dendrobium protocorm-like bodies*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019. (in Chinese)
- [8] 张玲玲. 乙烯在春石斛 PLBs 超低温保存 PCD 中的作用及其与 H₂O₂的关系研究[D]. 北京林业大学, 2021.
- ZHANG L L. The role of ethylene and its relationship with H₂O₂ in PCD during *Dendrobium* protocorm-like bodies cryopreservation[D]. Beijing Forestry University, 2021. (in Chinese)
- [9] 王敏瑞. 苹果带毒茎尖超低温保存与茎尖超低温技术对病毒脱除和保存效应的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- WANG M R. *Cryopreservation of apple with virus infection, and assessments of shoot tip cryotechniques for virus eradication and preservation in apple*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019. (in Chinese)
- [10] 冯超红. 苹果茎尖超低温保存技术及脱毒效率的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- FENG C H. *Cryogenic techniques for germplasm conservation and virus eradication in apple (malus)*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014. (in Chinese)
- [11] 胡凌云. 苹果茎尖超低温保存与脱毒研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- HU L Y. *Cryopreservation and virus eradication in shoot tips of apple*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015. (in Chinese)
- [12] 李百荃. 苹果属(*Malus*)试管苗植株再生、茎尖超低温保存和脱毒技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- LI B Q. *Plant regeneration, cryopreservation and virus eradication of apple (Malus)*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016. (in Chinese)
- [13] 徐瑾. 玉兰花粉超低温保存机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- XU J. *A study on the mechanism of Magnolia denudata pollen cryopreservation*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014. (in Chinese)
- [14] VANDENBUSSCHE B, DE PROFT M P. Cryopreservation of *in vitro* sugar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: Influence of abscisic acid and cold acclimation [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17 (10): 791–793.
- [15] NIINO T, TASHIRO K, SUZUKI M, et al. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification [J]. *Scientia Horticulturae*, 1997, 70 (2/3): 155–163.
- [16] LIU Y G, WANG X Y, LIU L X. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification [J]. *Plant Science*, 2004, 166 (3): 677–685.
- [17] KUSHNARENKO SVETLANA V, ROMADANOVA NATALIA V, REED BARBARA M. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips [J]. *Cryo Letters*, 2009, 30 (1): 47–54.
- [18] NIINO T, SAKAI A, YAKUWA H, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28 (3): 261–266.
- [19] LIU Y G, LIU L X, WANG L, et al. Determination of genetic stability in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification [J]. *Cryoletters*, 2008, 29 (1): 7–14.
- [20] HALMAGYI A, DELIU C, ISAC V. Cryopreservation of *Malus* cultivars: Comparison of two droplet protocols [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 124 (3): 387–392.
- [21] HALMAGYI A, VĂLIMĂREANU S, COSTE A, et al. Cryopreservation of *Malus* shoot tips and subsequent plant regeneration [J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2010, 15: 79–85.
- [22] 刘云国. 苹果种质资源玻璃化法超低温保存技术及其遗传变异分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2002.
- LIU Y G. *Cryopreservation technique of apple germplasm by vitrification and analysis of genetic variation*[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2002. (in Chinese)
- [23] URAGAMI A, SAKAI A, NAGAI M, et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8 (7): 418–421.
- [24] 张晓丽, 吕萌, 马明倩, 等. ‘怀黄’菊微滴玻璃化超低温保存体系优化及保存后再生植株的抗冷性分析 [J]. *植物生理学报*, 2021, 57 (7): 1427–1436.
- ZHANG X L, LÜ M, MA M Q, et al. Optimization of droplet-vitrification cryopreservation system and analysis of cold resistance of regenerated plants in *Chrysanthemum* × *morifolium* ‘Huaihuang’ [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57 (7): 1427–1436. (in Chinese)
- [25] 刘婧. 蓝莓、苹果不定芽超低温保存新技术的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- LIU J. *Developments of novel cryopreservation techniques for blueberry and apple adventitious buds*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018. (in Chinese)
- [26] 贾梦雪. 春石斛优良品种早期筛选、快繁及超低温保存研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2017.
- JIA M X. *The early screening, micrapropagation and cryopreservation of elite cultivar from nobile-type Dendrobium*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2017. (in Chinese)

- [27] ALMEIDA R D, ZERVOUDAKIS L K H, DUARTE M F Jr, et al. 225 oxidative stress and membrane integrity of cryopreserved spermatozoa with vitamin c [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2014, 26 (1) : 226.
- [28] 孙鑫博, 代小梅, 王怡杰, 等. 植物细胞程序性死亡研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010 (11): 1–6.
- SUN X B, DAI X M, WANG Y J, et al. Advances in programmed cell death in plants [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010 (11) : 1–6. (in Chinese)
- [29] JIAO J, ZHOU B G, ZHU X P, et al. Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells [J]. *Planta*, 2013, 238 (4) : 727–737.
- [30] MA W W, XU W Z, XU H, et al. Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells [J]. *Planta*, 2010, 232 (2) : 325–335.
- [31] PAN C L, YAO S C, XIONG W J, et al. Nitric oxide inhibits Al-induced programmed cell death in root tips of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by affecting physiological properties of antioxidants systems and cell wall [J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 1037.
- [32] HE H Y, HUANG W J, OO T L, et al. Nitric oxide suppresses aluminum-induced programmed cell death in peanut (*Arachis hypoganea* L.) root tips by improving mitochondrial physiological properties [J]. *Nitric Oxide*, 2018, 74: 47–55.

(责任编辑：黄爱萍)