

脱水时间对超低温保存橡胶树花药愈伤组织生理指标的影响

周权男¹, 吉辛⁴, 吴胤乐⁴, 李季¹, 杨先锋^{1,2,3}, 吴日智¹, 黄天带^{1,2,3*}

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/海口市热带植物种苗创新重点实验室/农业农村部橡胶生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025; 3. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572025; 4. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099

摘要: 超低温保存可降低橡胶树花药愈伤组织长期继代发生的遗传变异风险, 是长期保存愈伤组织的有效方法。为评价脱水时间对超低温保存过程中橡胶树花药愈伤组织与抗性相关生理指标的影响, 本研究将花药愈伤组织于植物玻璃化溶液 (plant vitrification solution, PVS) PVS2 中分别脱水 0、10、20、40 min 后进行超低温保存 24 h, 分析脱水时间对超低温保存前后愈伤组织中可溶性蛋白、丙二醛 (MDA) 含量、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性等生理指标的影响。结果显示: 脱水时间对超低温保存后花药愈伤组织中可溶性蛋白、MDA 含量、SOD 和 POD 活性具有显著影响 ($P < 0.05$), 而对 CAT 活性无显著影响。除 MDA 外, 超低温保存后每个脱水时间的各生理指标值均高于保存前。脱水 40 min 的花药愈伤组织超低温保存后, 其可溶性蛋白含量、CAT、SOD 和 POD 活性均达最大值, 分别为 129.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、627.30 U/g、290.38 U/g、25 643.33 U/g, MDA 含量最低, 为 41.31 nmol/g, 表明脱水 40 min 可明显增强超低温保存后愈伤组织细胞的持水能力和抗氧化水平。进一步对脱水 40 min 后超低温保存的花药愈伤组织进行复苏, 平均存活率在 70% 以上, 且能诱导易碎胚性愈伤系的形成, 平均诱导率为 13.33%, 为橡胶树花药愈伤组织超低温保存再生奠定生理基础。

关键词: 橡胶树; 花药愈伤组织; 超低温保存; 脱水时间; 生理指标; 存活率

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Effects of Dehydration Duration on Physiological Parameters of Rubber Tree Anther Callus Tissue During Cryopreservation

ZHOU Quannan¹, JI Xin⁴, WU Yinle⁴, LI Ji¹, YANG Xianfeng^{1,2,3}, WU Rizhi¹, HUANG Tiandai^{1,2,3*}

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Haikou Key Laboratory of Tropical Plant Seedling Innovation / Key Laboratory of Rubber Tree Biology and Genetic Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Crop Cultivation Physiology / Cultivation Base of State Key Laboratory Jointly Built by the Province and Ministry, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China; 3. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572025, China; 4. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China.

Abstract: Cryopreservation can reduce the risk of genetic variation in the long-term subculture of rubber tree anther callus tissue, and is an effective method for long-term preservation of callus tissues. To evaluate the effects of dehydration duration on physiological parameters during cryopreservation, rubber tree anther calli were treated with plant vitrification solution PVS2 for 0, 10, 20 and 40 min and then cryopreserved for 24 h in this study. Physiological parameters related to stress resistance were analyzed, including soluble protein content, malondialdehyde (MDA) content, and activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) during cryopreservation. Dehydration

收稿日期 2025-04-08; 接受日期 2025-06-03

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32271915); 海南省自然科学基金面上项目 (No. 321MS0805); 热带作物生物育种国家重点实验室科研项目 (No. NKLTCBCXTD22)。

作者简介 周权男 (1981—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 橡胶树组培与转基因。*通信作者 (Corresponding author): 黄天带 (HUANG Tiandai), E-mail: zhuanjiyinyuzhong@163.com。

duration had a significant effect on soluble protein content, MDA content, SOD and POD activities in callus tissues after cryopreservation, while showing no significant impact on CAT activity. All physiological parameters (except MDA) exhibited higher values after cryopreservation compared to pre-preservation levels across all dehydration durations. After 40 min of dehydration and cryopreservation, the soluble protein content, CAT, SOD and POD activities of anther callus reached the maximum value, which was 129.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 627.30 U/g, 290.38 U/g and 25 643.33 U/g, with the lowest MDA content of 41.31 nmol/g. The findings indicate that dehydration for 40 min significantly enhances water retention capacity and antioxidant level in cryopreserved callus cells. Post-thawing viability tests revealed that 40 min dehydrated callus maintained over 70% survival rate and could induce fragile embryogenic callus formation with an average induction rate of 13.33%. This study establishes a physiological foundation for the regeneration of cryopreserved rubber tree anther callus.

Keywords: rubber tree; anther callus tissue; cryopreservation; dehydration duration; physiological parameters; viability

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.010

超低温保存是指将生物材料, 如植物组织、细胞等在液氮中 ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) 长期保存, 此温度下细胞分裂和新陈代谢活动停滞, 降低了离体组织培养长期继代所带来的遗传变异风险, 是目前热带作物种质资源离体保存的主要方式之一^[1-3], 已广泛应用于木薯^[4]、橡胶^[5]、菠萝^[6-7]、咖啡^[8-9]、椰子^[10-11]等。植物材料在超低温保存过程中会发生生理代谢紊乱、细胞膜受损、活性氧胁迫等, 材料经冻存后存活的组织可能具有一定的抗胁迫和较强的生活力^[12-13]。研究显示, 超低温保存过程中芍药花粉的过氧化氢含量随保存时间的增加而显著提高, 与花粉生活力显著相关^[14]。脱水处理和不同冷冻方法对龙眼种子过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性以及丙二醛 (MDA)、可溶性糖和蛋白质含量具有显著影响^[15]。含水量为 30% 的苹果休眠芽在超低温保存过程中脂质组分发生重构, 抗氧化酶活性升高, 超低温保存后休眠芽再生率可达 90% 以上^[16]。水稻萌发胚芽在超低温保存预培养、植物玻璃化溶液 (plant vitrification solution, PVS) PVS2 处理过程中发生氧化胁迫, 活性氧大量累积, 抗氧化系统发生响应, 抗氧化剂谷胱甘肽 (GSH)、抗坏血酸 (ASA) 等的含量及抗氧化相关酶 SOD、CAT 等的活性显著改变^[17]。

天然橡胶是重要的工业原料和战略物资, 橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) 是天然橡胶的主要来源。橡胶树花药愈伤组织是良好的遗传转化受体, 但是花药的获取受季节限制, 且长期继代可能导致胚性愈伤组织发生体细胞变异^[18], 而超低温保存不仅能将花药愈伤组织长期保存, 还能有效遏制愈伤组织体细胞发生变异。前期,

团队已初步建立了橡胶树花药愈伤组织的超低温保存体系^[5], 发现花药愈伤组织预培养 3 d, 采用 60% 的 PVS2 预处理 20 min 后, 于 PVS2 溶液中干燥脱水 40 min, 可使超低温保存后花药愈伤组织存活率达到 70% 以上^[5]。目前, 还未见有关脱水时间对超低温保存后花药愈伤组织生理指标影响方面的报道。为进一步评价不同脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织相关生理指标的影响, 本研究将花药愈伤组织于 PVS2 溶液中分别干燥脱水 0、10、20、40 min 后进行超低温保存, 分析脱水时间对超低温保存愈伤组织中与抗性相关的可溶性蛋白含量、CAT、SOD、POD 活性和 MDA 含量等生理指标的影响, 并进一步对脱水 40 min 后超低温保存的花药愈伤组织进行复苏和诱导易碎胚性愈伤系的形成。本研究为橡胶树花药愈伤组织超低温保存再生奠定生理基础, 为其他作物超低温保存体系的建立提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以定植于中国热带农业科学院橡胶研究所儋州试验基地的橡胶树无性系热研 73397 为试验材料, 采集春季幼嫩雄花花药作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的超低温保存处理 将接种培养 40 d 的橡胶树热研 73397 花药愈伤组织于改良 MS 培养基 (附加 5% 蔗糖和 5% 二甲基亚砷) 中室温 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 避光预培养 3 d 后转移至冻存管中。采用玻璃化超低温处理方法, 先在装有花药愈伤组织的冻存管中加入 5 mL 60% PVS2 溶液 (30% 甘油 + 15% 二甲基亚砷 + 15% 乙二醇 + 0.4 mol/L 蔗糖),

20 min 后将溶液吸出。然后加入 PVS2 溶液 5 mL，于冰水混合物中分别干燥脱水 0、10、20、40 min 后将溶液吸出，再加入 PVS2 溶液 5 mL，将冻存管于液氮中保存 24 h 后于 40 °C 水浴解冻。测定比较超低温保存前后不同脱水时间花药愈伤组织与抗性相关生理指标。

1.2.2 生理指标测定 可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[15]，CAT 活性测定采用分光光度法^[19]，SOD 活性测定采用氮蓝四唑光化还原法^[20]，POD 活性测定采用愈创木酚法^[21]，MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法^[17]。

1.2.3 花药愈伤组织的复苏及易碎胚性愈伤系的诱导 将脱水处理 40 min 的花药愈伤组织经超低温保存 24 h 后于 40 °C 水浴解冻，然后将解冻后的花药愈伤组织倒入空培养皿中，吸净 PVS2 溶液后加入洗涤液 (M1 培养基附加 1.2 mol/L 蔗糖) 浸泡清洗 10 min，重复清洗 3 次后吸净洗涤液，将洗涤后的花药愈伤组织接种至 M1 培养基 (改良 MS+1.5 mg/L KT+1.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L NAA+0.1 g/L 肌醇+0.3 g/L 天冬酰胺+50 mL/L 椰子水+2.2 g/L 植物凝胶，pH 5.8)。跟踪观察花药愈伤组织发生及恢复情况，40 d 后统计愈伤组织存活率。观察恢复后新生长的愈伤组织结构，在新愈伤组织达到 5 mm 左右，显微镜下观察记录表型，挑出转至新鲜 M1 培养基中进行增殖继代培养，每 2~3 周继代 1 次，直至形成稳定的易碎胚性愈伤系。愈伤组织存活率=(愈伤存活数/超低温处理的愈伤数)×100%，易碎胚性愈伤系诱导率=(易碎胚性愈伤系数/超低温处理的愈伤数)×100%。

1.3 数据处理

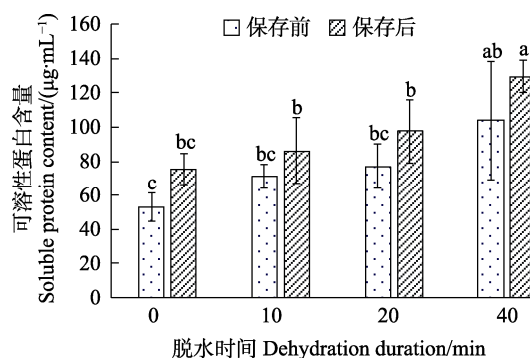
所有试验均重复 3 次。使用 IBM SPSS Statistics 22 软件对数据进行统计分析，采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)、Duncan's 多重比较方法 ($\alpha=0.05$) 对生理数据进行处理。使用 Microsoft Excel 2016 软件作图。

2 结果与分析

2.1 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

由图 1 可知，超低温保存前后，花药愈伤组织可溶性蛋白含量均随着脱水时间的延长而增加，且均在脱水 40 min 时达到最大值，分别为

103.93、129.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，显著高于对照组 (0 min)。超低温保存前后，脱水 0、10、20 min 的花药愈伤组织的可溶性蛋白含量均差异不显著。超低温保存后各脱水时间点的可溶性蛋白含量均较保存前升高，但差异不显著。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

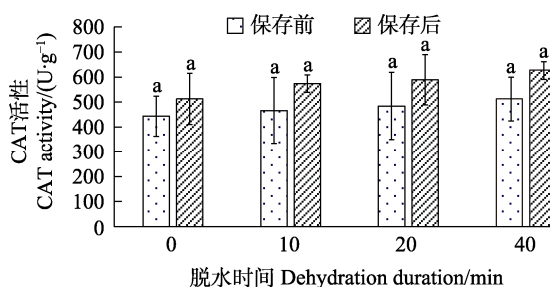
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 1 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

Fig. 1 Effects of dehydration duration on the soluble protein content of rubber tree anther calli before and after cryopreservation

2.2 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 CAT 活性的影响

由图 2 可知，脱水时间对花药愈伤组织 CAT 活性影响差异不显著，且超低温保存前后，花药愈伤组织 CAT 活性均随着脱水时间的延长而增强，均在脱水 40 min 时达到最大值，分别为 512.55、627.30 U/g，分别较对照组增加 68.85、114.75 U/g。超低温保存后各脱水时间点的 CAT 活性均高于保存前。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

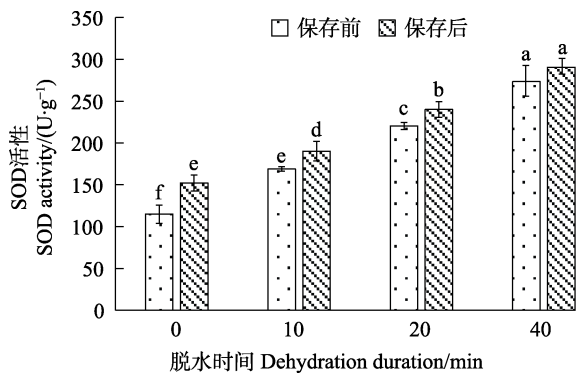
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 2 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of dehydration duration on CAT activity of rubber tree anther calli before and after cryopreservation

2.3 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 SOD 活性的影响

由图 3 可知,脱水时间对花药愈伤组织 SOD 活性的影响差异显著。超低温保存前后,花药愈伤组织 SOD 活性均随着脱水时间的延长而显著增强,且均在脱水 40 min 时达到最大值,分别为 273.24、290.38 U/g。脱水 40 min 时,超低温保存后花药愈伤组织 SOD 活性高于保存前 17.14 U/g,但二者差异不显著。超低温保存后各脱水时间的 SOD 活性均高于保存前。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 3 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of dehydration duration on SOD activity of rubber tree anther calli before and after cryopreservation

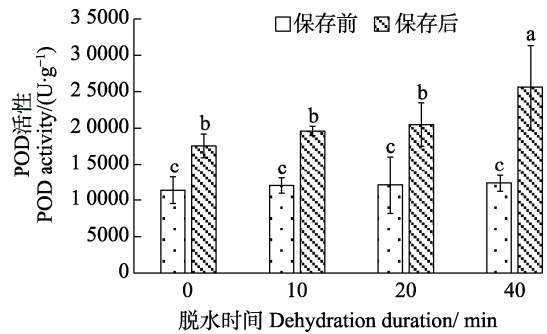
2.4 脱水时间对超低温保存处前后橡胶树花药愈伤组织 POD 活性的影响

由图 4 可知,超低温保存前,脱水时间对花药愈伤组织 POD 活性差异不显著。超低温保存后,花药愈伤组织 POD 活性随脱水时间的延长而增强,且在脱水 40 min 时达到最大值 25 643.33 U/g,显著高于脱水 0、10、20 min 时的 POD 活性。脱水 40 min 时,超低温保存后花药愈伤组织 POD 活性比保存前高 13 311.67 U/g。超低温保存后各脱水时间的 POD 活性均显著高于保存前。

2.5 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 MDA 含量的影响

由图 5 可知,超低温保存前,花药愈伤组织 MDA 含量随脱水时间的延长呈显著增加,在 40 min 时达到最大值 (43.26 nmol/g);超低温保存后,MDA 含量随脱水时间的延长呈显著下降,在脱水 40 min 时降到最低值 (41.31 nmol/g)。除脱水

40 min 外,超低温保存后花药愈伤组织的 MDA 含量均较保存前高。

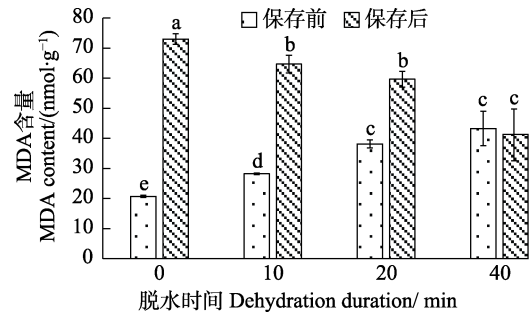


不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 4 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 POD 活性的影响

Fig. 4 Effects of dehydration duration on POD activity of rubber tree anther calli before and after cryopreservation



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 5 脱水时间对超低温保存前后橡胶树花药愈伤组织 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effects of dehydration duration on MDA content of rubber tree anther calli before and after cryopreservation

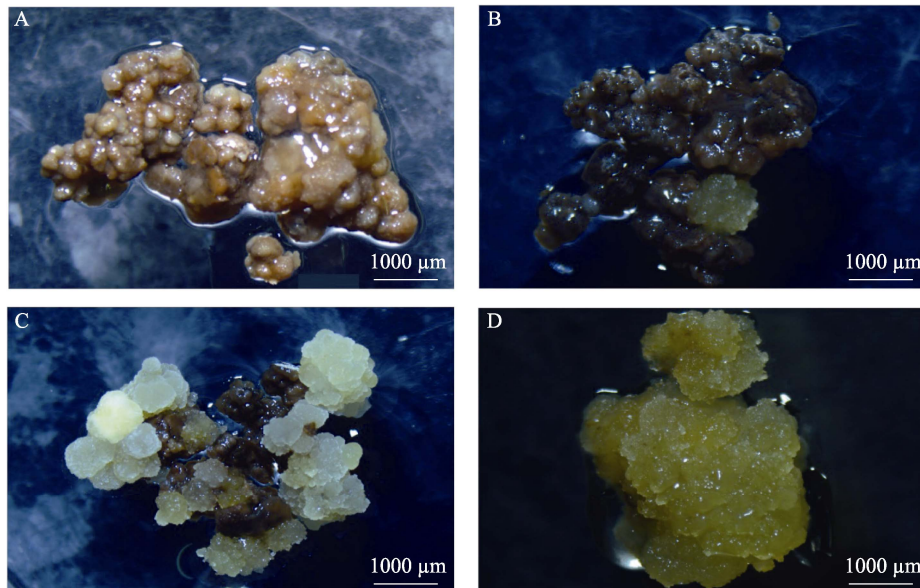
2.6 超低温保存后橡胶树花药愈伤组织复苏及诱导易碎胚性愈伤系

花药愈伤组织经 40 min 脱水后进行超低温保存和复苏处理。结果显示,3 个处理组 (处理 1、2、3) 的愈伤 (每组 30 个愈伤) 在超低温保存后,分别有 23、22、21 个愈伤复苏存活,存活率分别为 76.67%、73.33%、70.00%。90 个愈伤中共有 66 个存活,平均存活率为 73.33% (表 1)。3 个处理组形成的易碎胚性愈伤系分别为 5、3、4 个,易碎胚性愈伤系诱导率分别为 16.67%、10.00%、13.33%。90 个愈伤中共形成 12 个易碎胚性愈伤系,平均易碎胚性愈伤系诱导率为 13.33% (表 1)。愈伤组织的复苏、增殖及易碎胚性愈伤系的形成如图 6 所示。

表 1 超低温保存后橡胶树花药愈伤组织存活率及易碎胚性愈伤系诱导率

Tab. 1 Viability rate of rubber tree anther calli and induction rate of fragile embryonic callus lines after cryopreservation

处理组 Groups	愈伤数 Number of calli	愈伤存活数 Number of callus viability	愈伤存活率 Rate of callus viability/%	易碎胚性愈伤系个数 Number of fragile embryonic callus lines	易碎胚性愈伤系诱导率 Induction rate of fragile embryonic callus lines/%
1	30	23	76.67	5	16.67
2	30	22	73.33	3	10.00
3	30	21	70.00	4	13.33
总计/平均	90	66	73.33	12	13.33



A: 复苏 3 d 后的花药愈伤组织; B: 愈伤组织复苏; C: 愈伤组织复苏增殖; D: 易碎胚性愈伤系形成。
A: Anther calli after 3 d of resuscitation; B: Resuscitation of calli; C: Resuscitation and proliferation of calli;
D: Formation of fragile embryonic callus lines.

图 6 超低温保存后橡胶树花药愈伤组织复苏及易碎胚性愈伤系形成

Fig. 6 Resuscitation of rubber tree anther calli and formation of fragile embryonic callus lines after cryopreservation

3 讨论

超低温保存可降低橡胶树花药愈伤组织长期继代发生的遗传变异风险，是长期保存花药愈伤组织的有效方法。超低温保存主要包括预处理、脱水处理和液氮保存等步骤，其中脱水处理能避免植物材料在液氮冷冻过程中形成的大量冰晶对细胞造成的破坏，提高超低温保存后植物材料的再生率，是超低温保存中至关重要的步骤。橡胶树花药愈伤组织于 PVS2 溶液中不同脱水时间对超低温保存后的存活率具有显著影响，其中脱水 40 min 的愈伤组织超低温保存后存活率最高^[5]。为进一步了解脱水时间对超低温保存花药愈伤组织与抗性相关生理指标的影响，本研究分析橡胶树花药愈伤组织于 PVS2 溶液中脱水 0、10、20、40 min 进行超低温保存前后其可溶性蛋白、MDA 含量以及 CAT、SOD、POD 等抗氧化酶活性的

变化，并进一步对脱水 40 min 后超低温保存的花药愈伤组织进行复苏和诱导易碎胚性愈伤系的形成。

可溶性蛋白可增强植物细胞的持水能力，提高细胞的抗冷性，降低因结冰产生的细胞损伤。本研究结果显示，随着脱水时间的延长，超低温保存前后花药愈伤组织中可溶性蛋白含量均明显提高，在 40 min 时达到最大值，且超低温保存后的可溶性蛋白含量均高于保存前，表明延长脱水时间可增强愈伤组织的抗低温能力，有利于超低温保存后愈伤组织的存活。一些研究如任悦等^[22]将水曲柳合子胚经脱水后进行超低温保存，其可溶性蛋白含量提高，增加了存活率；山茶花粉经超低温保存后可溶性蛋白含量明显增加^[23]；含水量为 36.78% 的龙眼种子经玻璃化冷冻后可溶性蛋白含量也显著提高^[15]，这些结果与本研究的结

果类似。

植物组织在超低温保存过程中会产生大量活性氧,导致氧化胁迫,引起抗氧化酶活性改变^[24-25]。植物酶促清除系统主要包括 SOD、CAT、POD、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 等^[26]。本研究结果表明,脱水时间对超低温保存后花药愈伤组织 SOD 和 POD 活性具有显著影响,而对 CAT 活性无显著影响,SOD 和 POD 活性随脱水时间延长而明显增强,这说明 SOD 和 POD 可能在活性氧清除及花药愈伤组织抗低温胁迫、抗氧化损伤中发挥重要作用。脱水 40 min 时花药愈伤组织超低温保存后 CAT、SOD 和 POD 活性均高于其他脱水时间,说明脱水 40 min 可明显提升超低温保存后愈伤组织的抗氧化能力,有利于超低温保存后愈伤组织存活。有研究表明,超低温保存后的油棕合子胚和胚性愈伤组织中过氧化氢含量显著增加,SOD、POD、CAT、APX 等酶的活性发生显著变化^[25];含水量为 20%和 30%的苹果休眠芽在超低温保存后,其抗氧化酶 SOD、CAT 和 POD 的活性显著高于含水量为 40%的苹果休眠芽,可能有助于清除过多的活性氧,促进休眠芽存活^[16];李珊珊等^[15]研究表明,脱水处理显著提高了玻璃化超低温保存后龙眼种子 SOD 活性,CAT、POD 活性也有一定提高,认为将龙眼种子脱水后再进行超低温保存可减轻活性氧积累导致的细胞膜伤害。以上研究结果进一步说明,适宜的脱水处理能提高超低温保存后植物组织中的抗氧化酶活性,进而提升超低温保存后植物的再生率。

MDA 是衡量细胞膜氧化损伤程度的重要指标。本研究中,超低温保存前,MDA 含量随脱水时间延长而呈显著增加趋势,而超低温保存后则呈显著下降趋势。说明超低温保存前延长脱水时间导致细胞膜氧化损伤加剧,而超低温保存后延长脱水时间逐渐减轻了氧化损伤。脱水 40 min 时 MDA 含量最低,说明脱水 40 min 可有效降低由超低温保存引发的氧化损伤。这与任悦等^[22]经玻璃化超低温保存后的水曲柳合子胚中 MDA 含量随脱水时间的延长而逐渐降低的研究结果类似。而大苞鞘石斛原球茎在超低温保存过程中 MDA 含量显著升高,解冻后 MDA 含量达到最大值^[27],说明超低温保存过程中其细胞膜脂过氧化程度加剧。此外,益智种子在液氮冷冻过程中 MDA 含

量则呈先上升后下降趋势,直至趋于稳定^[28]。这些研究表明超低温保存对植物细胞 MDA 含量具有显著影响。

综合以上研究结果可知,脱水 40 min 的橡胶树花药愈伤组织超低温保存后,其可溶性蛋白含量、CAT、SOD 和 POD 活性最高,MDA 含量最低,表明脱水 40 min 可明显增强超低温保存后愈伤组织细胞的持水能力和抗氧化水平,有利于超低温保存后愈伤组织存活,从生理角度证明 40 min 是橡胶树花药愈伤组织超低温保存适宜的脱水时间^[5]。在此研究基础上,对超低温保存后橡胶树花药愈伤组织进行复苏,结果显示,脱水处理 40 min 的花药愈伤组织经超低温保存后的平均存活率在 70%以上,这与之前的研究结果一致^[5]。花药愈伤组织经进一步诱导形成易碎胚性愈伤系,平均诱导率可达 13.33%。本研究不仅为橡胶树花药愈伤组织超低温保存再生奠定生理基础,也为其他作物超低温保存体系的建立提供理论参考。

参考文献

- [1] NORMAH M N, SULONG N, REED B M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: advances and strategies[J]. *Cryobiology*, 2019, 87: 1-14.
- [2] PANIS B, NAGEL M, VAN DEN HOUWE I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen[J]. *Plants*, 2020, 9(12): 1634.
- [3] 王敏瑞, 荆永琳, 陈浪欣, 王小冰, 孟春阳, 黄碧兰, 徐立, 李志英. 超低温保存技术在热带作物种质资源保存中的应用与展望[J]. *热带作物学报*, 2025, 46(3): 611-628.
WANG M R, JING Y L, CHEN L X, WANG X B, MENG C Y, HUANG B L, XU L, LI Z Y. Applications and prospects of cryogenic technology in the conservation of tropical crop germplasm resources[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2025, 46(3): 611-628. (in Chinese)
- [4] DUMET D, DIEBIRU E, ADEYEMI A, AKINYEMI O, GUEYE B, FRANCO J. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources[J]. *Cryo-Letters*, 2013, 34(2): 107-118.
- [5] ZHOU Q N, SUN A H, LI Z, HUA Y W, JIANG Z H, HUANG T D, DAI X M, HUANG H S. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hevea* by vitrification[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11: 7212-7217.
- [6] SOUZA F V D, KAYA E, DE JESUS VIEIRA L, DE SOUZA E H, DE OLIVEIRA AMORIM B, SKOGERBOE

- D, MATSUMOTO T, ALVES A A C, DA SILVA LEDO A, JENDEREK M M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2016, 124: 351-360.
- [7] SILVA R L D, SOUZA E H D, DE JESUS VIEIRA L, PELACANI C R, SOUZA F V D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 219: 326-334.
- [8] COELHO S V B, ROSA S D V F, FERNANDES J S. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method[J]. *Seed Science and Technology*, 2017, 45(3): 1-12.
- [9] VALDES Y C, SHUKLA M R, GONZALEZ VEGA M E, SAXENA P K. Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation[J]. *Agronomy*, 2021, 11(9): 1861.
- [10] SAJINI K K, KARUN A, AMARNATH C H, ENGELMANN F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification[J]. *Cryo-Letters*, 2011, 32(4): 317-328.
- [11] KARUN A, SAJINI K K, NIRAL V, AMARNATH C H, REMYA P, RAJESH M K, SAMSUDEEN K, JERARD B A, ENGELMANN F. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation[J]. *Cryo-Letters*, 2014, 35(5): 407-417.
- [12] WANG B, LI J W, ZHANG Z B, WANG R R, MA Y L, BLYSTAD D R, KELLER E R J, WANG Q C. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 184: 47-55.
- [13] WEN B, CAI C, WANG R, SONG S, SONG J. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation[J]. *Protoplasma*, 2012, 249: 323-335.
- [14] 任瑞芬, 李泽迪, 朱梦婷, 刘燕, 张孔英. ROS诱导的氧化应激和细胞程序性死亡对超低温保存后花粉生活力的影响[J]. *北京林业大学学报*, 2022, 44(2): 82-90.
- REN R F, LI Z D, ZHU M T, LIU Y, ZHANG K Y. Effects of ROS-induced oxidative stress and programmed cell death on pollen viability after cryopreservation[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2022, 44(2): 82-90. (in Chinese)
- [15] 李珊珊, 孙政, 曾琳. 超低温冷冻对龙眼种子生理生化特性的影响[J]. *热带作物学报*, 2024, 45(12): 2599-2606.
- LI S S, SUN Z, ZENG L. Effect of cryopreservation on the physiological and biochemical characteristics of longan seeds[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2024, 45(12): 2599-2606. (in Chinese)
- [16] 王应敏. 苹果休眠芽超低温保存生理及甘油磷脂代谢响应研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
- WANG Y M. The investigation of responses of the physiology and phospholipid remodeling on cryopreservation of apple dormant buds[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2024. (in Chinese)
- [17] 黄斌. 水稻胚对玻璃化超低温保存处理胁迫的响应机制[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
- HUANG B. The mechanism of stress response to vitrification-cryopreservation treatment in rice embryo[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018. (in Chinese)
- [18] BRETON D, HARVENGT L, TRONTIN J F O, FAVRE J M. High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2005, 41(4): 494-504.
- [19] 展海军, 王华芳, 谢鹏. 分光光度法测定小麦过氧化氢酶活动度[J]. *种子*, 2010, 29(1): 31-33, 36.
- ZHAN H J, WANG H F, XIE P. Determination of catalase activity in wheat by spectrophotometry[J]. *Seed*, 2010, 29(1): 31-33, 36. (in Chinese)
- [20] 沈文飏, 徐朗莱, 叶茂炳, 张荣铤. 氮蓝四唑光还原法测定超氧化物歧化酶活性的适宜条件[J]. *南京农业大学学报*, 1996, 19(2): 101-102.
- SHEN W B, XU L L, YE M B, ZHANG R X. Optimum conditions for determination of superoxide dismutase activity by nitrogen blue tetrazole photochemical reduction method[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1996, 19(2): 101-102. (in Chinese)
- [21] HAMMERSCHMIDT R, NUCKLES EM, KUĆ J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*[J]. *Physiological Plant Pathology*, 1982, 20(1): 73-82.
- [22] 任悦, 魏骋, 徐添添, 沈海龙, 杨玲. 超低温保存处理对水曲柳胚胎生理生化特征的影响[J]. *植物研究*, 2023, 43(3): 396-403.
- REN Y, WEI C, XU T T, SHEN H L, YANG L. Effects of cryopreservation on physiological and biochemical characteristics of *Fraxinus mandshurica* embryos[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2023, 43(3): 396-403. (in Chinese)
- [23] 李广清. 山茶花粉超低温保存研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- LI G Q. Studies on cryopreservation of *Camellia* pollen[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2005. (in Chinese)
- [24] HAN D G, HAN J X, XU T L, LI X G, YAO C Y, LI T M, SUN X H, WANG X H, YANG G H. Overexpression of *MbERF12*, an *ERF* gene from *Malus baccata* (L.) Borkh, increases cold and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* associated with ROS scavenging through ethylene signal transduction[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2021, 57(5): 760-770.
- [25] WEI Q, SHI P, KHAN F S, HTWE Y M, ZHANG D, LI Z, WEI X, YU Q, ZHOU K, WANG Y. Cryopreservation and cryotolerance mechanism in zygotic embryo and embryo-

- genic callus of oil palm[J]. *Forests*, 2023, 14: 966.
- [26] SAHOO M R, DEVI T R, DASGUPTA M, NONGDAM P, PRAKASH N. Reactive oxygen species scavenging mechanisms associated with polyethylene glycol mediated osmotic stress tolerance in Chinese potato[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 5404.
- [27] 刘晓东, 李晓丹, 吴元玲, 申晓辉. 大苞鞘石斛原球茎超低温保存中生理生化变化[J]. *东北林业大学学报*, 2013, 41(7): 79-84.
- LIU X D, LI X D, WU Y L, SHEN X H. Physiological and biochemical characteristics of *Dendrobium wardianum* protocorms during cryopreservation[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2013, 41(7): 79-84. (in Chinese)
- [28] 曾琳, 吴怡, 何明军, 顾雅坤, 王德立. 超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响[J]. *广西植物*, 2018, 38(4): 529-535.
- ZENG L, WU Y, HE M J, GU Y K, WANG D L. Physiological and biochemical characteristics of *Alpinia oxyphylla* seeds after cryopreservation[J]. *Guihaia*, 2018, 38(4): 529-535. (in Chinese)