

# 菊花茎尖玻璃化法超低温保存技术研究

张艳秋, 屈连伟, 苏君伟, 邢桂梅, 鲁娇娇, 张晓菲

(辽宁省农业科学院 花卉研究所, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:**以菊花品种“神马”为试材,采用单因素逐级优化试验设计方法,研究了蔗糖浓度、预培养时间、装载时间、玻璃化处理时间、茎尖大小以及冻存时间对茎尖存活率的影响。结果表明:菊花茎尖玻璃化超低温长期保存最佳处理组合为预培养蔗糖浓度 0.25 mol/L,预培养时间 3 d,装载处理温度 25℃、40 min,玻璃化处理温度 0℃、60 min,菊花茎尖大小 1.5~2.0 mm。采用此体系保存菊花茎尖 180 d 后,经卸载及恢复培养,存活率可达 71.33%。

**关键词:**菊花;组织培养;茎尖;超低温保存

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0128-05

菊花为世界四大切花之一,在我国有 3 000 多个品种,种质资源丰富。目前,菊花种质资源保存方法主要有 2 种:一是建设种质资源圃,进行露地保存;二是采用组织培养技术进行离体保存。前者占地面积大,耗时耗力,易受环境条件影响;后者每 20~30 d 需继代 1 次,保存成本较高,并且随着植物材料继代次数的增加,体细胞容易发生变异。因此,科研人员正在研发一种新的更高效的超低温保存技术,并逐渐应用于珍贵植物种质资源的保存。超低温保存技术是在组织培养技术的基础上,将植物细胞或组织经防冻处理后,在超低温条件(一般指液氮低温, -196℃)下进行保存的一种方法。由于在超低温条件下,植物的生理生化活动几乎停止,贮藏过程中的生理和遗传变化能够控制在最低限度内,因此超低温保存是植物资源长期保存的有效方法。目前已经在草莓<sup>[1]</sup>、香蕉<sup>[2]</sup>、葡萄<sup>[3]</sup>、苹果<sup>[4]</sup>、百合<sup>[5]</sup>、月季<sup>[6]</sup>等植物离体茎尖的保存上取得了成功,但在菊花上的研究较少。因此,该试验以菊花茎尖为试材,进行玻璃化超低温保存技术研究,以期建立菊花茎尖的超低温保存体系,为菊花种质资源的超低温长期保存提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试菊花品种“神马”,由辽宁省农业科学院花卉研究所提供。

**第一作者简介:**张艳秋(1981-),女,辽宁阜新人,硕士,助理研究员,日本岐阜大学访问学者,现主要从事花卉育种与栽培等研究工作。E-mail:zyq810711@163.com。

**责任作者:**屈连伟(1977-),男,辽宁辽阳人,博士,副研究员,荷兰瓦赫宁根大学访问学者,现主要从事观赏园艺植物新品种选育及高效栽培技术示范与推广等工作。E-mail:568219189@qq.com。

**收稿日期:**2015-09-24

**PVS-2 溶液:**MS+30%(W/V)甘油+15%(W/V)聚乙二醇+15%(W/V)DMSO+0.4 mol/L 蔗糖。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌苗获得** 从温室选取生长旺盛、无病虫害、腋芽饱满且未萌发的菊花嫩茎,将其剪成 1.5~2.0 cm 的小段,每个小段带有 1 个腋芽。用洗衣粉水刷洗茎段,再用流水冲洗 30 min。在超净工作台上,用 70%酒精消毒 30 s,0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 5 min,然后用无菌水冲洗 3~5 遍,将其接种至诱导培养基(MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+琼脂 5.5 g/L+3%蔗糖)上(图 5-A),1 周后将萌发的腋芽切下进行继代培养(图 5-B),培养温度为 25℃,每天照光 12 h,光照强度 2 000~3 000 lx。

**1.2.2 预培养蔗糖浓度对茎尖存活率的影响** 将经过 4℃处理的菊花组培苗进行茎尖剥离,茎尖大小为 1.5~2.0 mm,然后将其接入含有不同蔗糖浓度的培养基中,预培养 3 d(图 5-C),用装载溶液处理 40 min,再用玻璃化 PVS-2 溶液处理 60 min,液氮冻存 1 h,最后进行解冻、洗涤及恢复培养。每个处理 20 个茎尖,3 次重复。

**1.2.3 预培养时间对茎尖存活率的影响** 将经过 4℃处理的菊花组培苗进行茎尖剥离,茎尖大小为 1.5~2.0 mm,然后将其接入蔗糖浓度为 0.25 mol/L 的培养基中,预培养 0~5 d,用装载溶液处理 40 min,再用玻璃化 PVS-2 溶液处理 60 min,液氮冻存 1 h,最后进行解冻、洗涤及恢复培养。每个处理 20 个茎尖,3 次重复。

**1.2.4 装载时间对茎尖存活率的影响** 将经过 4℃处理的菊花组培苗进行茎尖剥离,茎尖大小为 1.5~2.0 mm,然后将其接入蔗糖浓度为 0.25 mol/L 的培养基中,预培养 3 d,用装载溶液处理 0、20、40、60、80 min,再用玻璃化 PVS-2 溶液处理 60 min,液氮冻存 1 h,最后进行解冻、洗涤及恢复培养。每个处理 20 个茎尖,3 次重复。

**1.2.5 玻璃化处理时间对存活率的影响** 将经过 4℃

处理的菊花组培苗进行茎尖剥离,茎尖大小为 1.5~2.0 mm,然后将其接入蔗糖浓度为 0.25 mol/L 的培养基中,预培养 3 d,用装载溶液处理 40 min,再用玻璃化 PVS-2 溶液处理 0、30、60、90、120 min,液氮冻存 1 h,最后进行解冻、洗涤及恢复培养。每个处理 20 个茎尖,3 次重复。

**1.2.6 茎尖大小对存活率的影响** 将经过 4℃ 处理的菊花组培苗进行茎尖剥离,茎尖大小为 0.5~1.0、1.5~2.0、2.5~3.0 mm,然后将其接入蔗糖浓度为 0.25 mol/L 的培养基中,预培养 3 d,用装载溶液处理 40 min,再用玻璃化 PVS-2 溶液处理 60 min,液氮冻存 1 h,最后进行解冻、洗涤及恢复培养。每个处理 20 个茎尖,3 次重复。

**1.2.7 冻存时间对存活率的影响** 将经过 4℃ 处理的菊花组培苗进行茎尖剥离,茎尖大小为 1.5~2.0 mm,然后将其接入蔗糖浓度为 0.25 mol/L 的培养基中,预培养 3 d,用装载溶液处理 40 min,再经玻璃化 PVS-2 溶液处理 60 min 后,将茎尖转入 5~10 mL 冻存管中,于液氮中分别处理 1 h、1 d、7 d、30 d、60 d、90 d、180 d 后取出,置于 40℃ 的水浴锅中,水浴 2 min,最后进行解冻、洗涤及恢复培养。每个处理 20 个茎尖,3 次重复。

**1.2.8 卸载及恢复培养** 将水浴后的茎尖用洗液(MS+1.2 mol/L 蔗糖的液体培养基)洗涤 3 次,每次 10 min,直至茎尖漂浮在液体表面。然后用滤纸吸干多余液体,接种到恢复培养基 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+琼脂 5.5 g/L+3%蔗糖中,暗培养 3 d(图 5-D)后光照培养,10 d 后统计存活率。

**1.2.9 继代、生根及驯化移栽** 将小苗转入到继代培养基中进行增殖培养,然后选取 1.0~2.0 cm 的健壮继代苗,接种至生根培养基 1/2MS+IBA 0.2 mg/L 上进行生根培养,15 d 后待小苗长出 0.5~1.0 cm 长的根时,将其移至温室中进行驯化移栽。移栽基质为珍珠岩:草炭土=1:1,1 个月后统计存活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 预培养蔗糖浓度对茎尖存活率的影响

预培养是改善植物生理状态的有效途径,也是影响玻璃化冻存效果的重要因素之一。由图 1 可知,随着预培养中蔗糖浓度的提高,茎尖的存活率先上升后下降。当蔗糖浓度为 0.25 mol/L 时,茎尖的存活率最高,为 55.33%;当蔗糖浓度提高至 1.00 mol/L 时,茎尖存活率最低,仅为 13.67%。由此可知在超低温培养过程中,蔗糖浓度对茎尖存活起着重要作用,最佳的预培养蔗糖浓度为 0.25 mol/L。

### 2.2 预培养时间对茎尖存活率的影响

由图 2 可知,随着预培养天数的增加,茎尖存活率也随之提高,当预培养天数为 3 d 时,茎尖存活率达到最大,为 52.81%;预培养 2 d 和 4 d 对茎尖存活率差异不显著;预培养 1 d 茎尖存活率仅为 9.56%;不经过预培养则茎尖不能存活。所以最佳的预培养时间为 3 d。

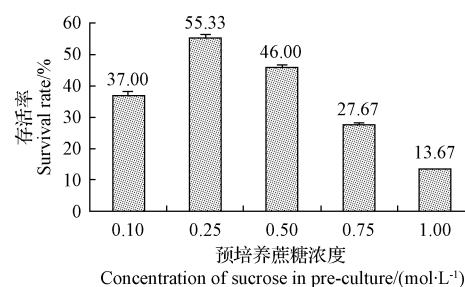


图 1 预培养蔗糖浓度对茎尖存活率的影响

Fig. 1 Effect of concentration of sucrose in pre-culture medium on survival rate of shoot tip after cryopreservation

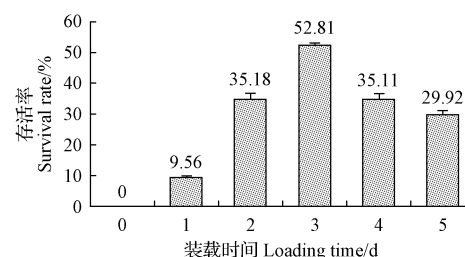


图 2 预培养时间对茎尖存活率的影响

Fig. 2 Effect of pre-culture time on survival rate of shoot tip after cryopreservation

### 2.3 装载时间对茎尖存活率的影响

由图 3 可知,茎尖存活率随着装载时间的延长先上升后下降,不经过装载和装载 80 min 的存活率较低,分别为 21.00%、29.33%;装载 20 min 的存活率为 47.33%,低于装载 60 min 的存活率(57.33%);最佳的装载时间为 40 min,茎尖存活率最高,为 64.67%。

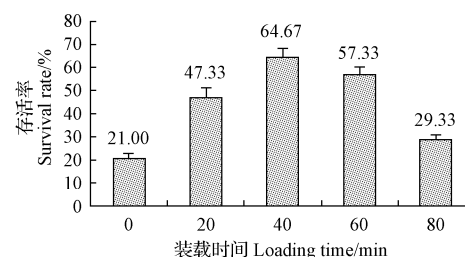


图 3 装载时间对茎尖存活率的影响

Fig. 3 Effect of different loading time on survival rate of shoot tip after cryopreservation

### 2.4 玻璃化处理时间对存活率的影响

由图 4 可知,茎尖存活率随着玻璃化时间的延长先上升后下降,不进行玻璃化处理的茎尖存活率最低,仅为 9.33%;最佳的玻璃化处理时间为 60 min,茎尖存活率最高,为 73.67%。超过 60 min,茎尖存活率降低,分别为 60.67%、36.37%,这可能是由于溶液中的 DMSO 的毒害和过度脱水对茎尖的伤害造成的。

### 2.5 茎尖大小对存活率的影响

由表 1 可知,茎尖大小对其存活率影响较大。当茎

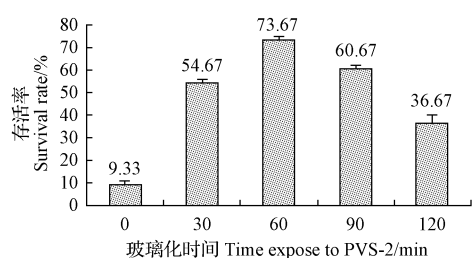


图4 玻璃化时间对茎尖存活率的影响

Fig. 4 Effect of different time expose to PVS-2 on survival rate of shoot tip after cryopreservation

表1 茎尖大小对其存活率的影响

Table 1 Effect of size of shoot tips on survival rate after cryopreservation

茎尖大小 Size of shoot tips/mm	存活率 Survival rate/%
0.5~1.0	59.33±1.53
1.5~2.0	71.33±2.08
2.5~3.0	50.00±1.00

尖大小为0.5~1.0 mm时,茎尖存活率为59.33%;当茎尖大小为1.5~2.0 mm时,茎尖存活率为71.33%;当茎尖大小为2.5~3.0 mm时,茎尖存活率为50.00%;说明茎尖存活率随着其大小的增大而增加,但达到一定大小,由于细胞玻璃化效果降低,其存活率也降低。因此,最佳的茎尖大小为1.5~2.0 mm。

## 2.6 冻存时间对存活率的影响

由表2可知,茎尖经液氮冻存处理1 h、1 d、7 d、30 d、60 d、90 d和180 d后,存活率分别为74.48%、74.67%、

表2 冻存时间对茎尖存活率的影响

Table 2 Effect of different frozen time on survival rate of shoot tip after cryopreservation

冻存时间 Frozen time	存活率 Survival rate/%
1 h	74.48±0.39a
1 d	74.67±1.69a
7 d	75.66±1.15a
30 d	74.83±0.68a
60 d	75.13±1.42a
90 d	74.89±0.84a
180 d	76.53±1.21a

注:采用 Student-Newman-Keuls<sup>a</sup>统计方法,  $\alpha=0.05$ 。

Note: Statistical analysis of Student-Newman-Keuls<sup>a</sup> was performed,  $\alpha=0.05$ .

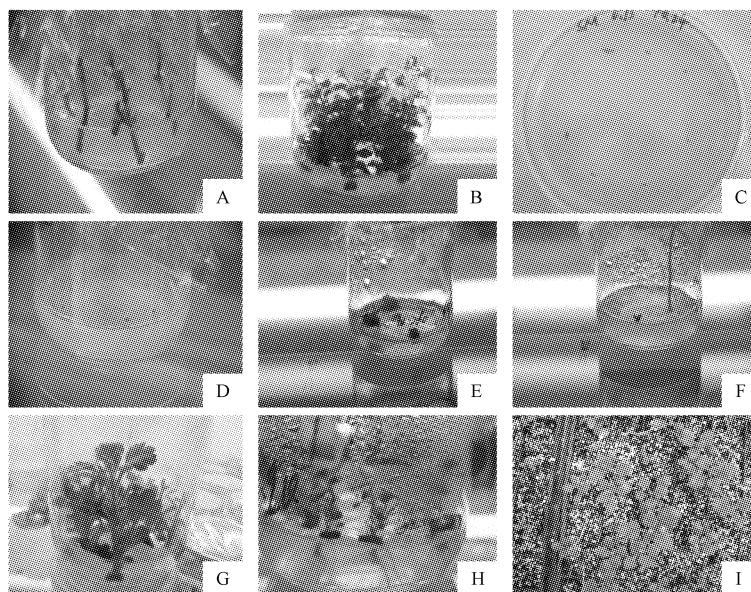
75.66%、74.83%、75.13%、74.89%和76.53%,各处理间不存在显著性差异,由此可知,液氮超低温保存是植物种质资源长期保存的理想方法。

## 2.7 茎尖恢复培养及植株再生

将超低温处理过的茎尖接种到恢复培养基上培养,1周后,死亡的茎尖逐渐褐变,而成活茎尖则可以通过2种途径形成小苗:一是由茎尖形成愈伤组织形成芽点,进而分化出不定芽(图5-E);二是茎尖直接形成小苗(图5-F)。

## 2.8 再生植株继代、生根及驯化移栽

将小苗转入到继代培养基 MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+琼脂 5.5 g/L+3%蔗糖中进行增殖培养(图5-G),1个月后植株生长健壮,增殖系数可达6,然后选取1.0~2.0 cm的继代苗,接种至培养基 1/2MS+IBA 0.2 mg/L上进行生根培养(图5-H),10 d后即可从基部生出白色根系,15 d后待根系长至0.5~1.0 cm时



注:A.腋芽诱导,B.继代培养,C.茎尖预培养,D.茎尖恢复培养,E.经愈伤组织诱导出芽,F.茎尖直接诱导出芽,G.超低温处理后的继代培养,H.生根培养,I.驯化移栽。

Note: A. Induction of axillary buds, B. Subculture, C. Pre-culture of shoot tips, D. Recovery culture, E. Buds induction by callus, F. Buds induction directly from shoot tips, G. Subculture after cryopreservation, H. Rooting culture, I. Domestication and transplanting.

图5 菊花茎尖超低温保存体系

Fig. 5 Cryopreservation system of shoot tips from *in vitro* plants of *Chrysanthemum*



进行移栽驯化(图 5-D),移栽存活率可达 93%。

### 3 讨论与结论

玻璃化超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存的最好方法,已保存成功的植物材料,包括茎尖、分生组织、体细胞胚、胚性愈伤组织、悬浮细胞、原生质体、拟南芥幼苗等,显示了适用植物材料的广泛性,为种质资源的长期稳定保存提供了行之有效的方法<sup>[7]</sup>。

#### 3.1 预培养对茎尖存活率的影响

预培养是改善材料生理状态的有效方法,对提高植物超低温处理后的存活率有很大的影响<sup>[8]</sup>。培养基中蔗糖浓度对于提高植物组织的抗寒性有着重要作用<sup>[9]</sup>。高蔗糖浓度可以有效降低植物细胞水分,提高细胞渗透势,有利于提高超低温保存后的存活率<sup>[7]</sup>。随着预培养时间的增加,茎尖中的含水量也趋于稳定,有利于茎尖的超低温保存。在该试验中,预培养 3 d,茎尖的存活率最高,之后随着预培养时间的延长,渗透胁迫作用导致植物细胞过度失水,进而导致茎尖的存活率降低。该试验在 0.25 mol/L 蔗糖浓度的培养基上暗培养 3 d,既可以防止茎尖褐化,又可以减缓茎尖的生长,有利于物质积累,从而提高超低温处理后的存活率。

#### 3.2 装载时间对茎尖存活率的影响

在用 PVS-2 进行快速脱水之前,用浓度较高的装载液进行处理,降低组织的含水量,从而可以避免由于渗透压变化太强而对材料造成的伤害,目前该方法已经得到了普遍应用<sup>[10]</sup>。周小梅等<sup>[14]</sup>在进行玉米组培材料超低温保存时发现,未经装载液处理的玉米悬浮细胞的存活率只有 17.2%,而经装载液处理 5 min 后存活率可达 85.2%。该研究表明 40 min 是菊花茎尖装载最佳处理时间,茎尖存活率最大,为 64.67%,显著高于不经装载和其它装载时间的茎尖存活率。

#### 3.3 玻璃化时间对存活率的影响

玻璃化处理也是影响存活率的关键因素。玻璃化处理过程中,PVS-2 的作用主要是使植物材料脱水,使其完全玻璃化,并使冷冻保护液渗入细胞,减轻在超低温保存中细胞所受到的伤害<sup>[11]</sup>。玻璃化处理时间较为关键,有研究表明<sup>[12]</sup>,不经过玻璃化处理的茎尖在超低温处理后其存活率为 0;玻璃化处理时间过长,细胞组织受到伤害后的恢复能力差,导致存活率降低。该研究结果表明 PVS-2 处理 60 min 茎尖存活率最大。

#### 3.4 茎尖大小对存活率的影响

在超低温保存过程中,茎尖大小对其存活率影响较大。一般来说,茎尖过大脱水不彻底,玻璃化程度不够,若延长时间,则又会对植物材料造成伤害,影响成活率;茎尖过小,易于脱水,受冰晶伤害小,但在剥离过程中容易造成机械损伤,其后的恢复培养也不易成活,而且直接裸露的生长点直接接触高浓度的保护剂,可能易造成伤害,同样降低成活率<sup>[13]</sup>。因此选取适当大小的茎尖,使之达到较高成活率,是试验过程中应注意的问题。该

试验研究结果表明 1.5~2.0 mm 的菊花茎尖更有利于存活。

#### 3.5 冻存时间对存活率的影响

液氮超低温保存是植物种质资源长期保存的理想方法<sup>[7]</sup>,但液氮保存时间的长短不是影响超低温保存效果的关键因素。薛建平<sup>[15]</sup>研究结果发现,在液氮条件下保存 6 个月,解冻后地黄茎尖存活率与保存 1 d 没有显著差异。该试验结果也表明,液氮冻存处理时间的长短对菊花茎尖超低温处理后的存活率无显著影响,可能是因为在液氮条件下,植物材料的生命活动几乎完全停止,处于相对稳定状态,所以植物材料才可以得以长期保存。

综合以上结果可以得出,适宜菊花茎尖的超低温保存条件为茎尖大小 1.5~2.0 mm,预培养蔗糖浓度为 0.25 mol/L,预培养 3 d,装载处理温度 25℃、40 min,玻璃化处理温度 0℃、60 min。

### 参考文献

- [1] 蔡斌华,张计育,渠慎春,等.通过玻璃化超低温处理脱除草莓轻型黄边病毒(SMYEV)研究[J].果树学报,2008,25(6):872-876.
- [2] 曾继吾,牛王翠,黄永红,等.利用超低温保存方法脱除香蕉顶病毒的研究[J].植物遗传资源学报,2009,10(3):457-460.
- [3] 王仁睿,李明福.葡萄、马铃薯种质超低温脱毒应用初步研究[C].中国植物病理学会 2010 年学术年会论文集,2010.
- [4] 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.
- [5] 陈辉,陈晓玲,陈龙清,等.切花百合离体茎尖玻璃化法超低温保存研究[J].植物遗传资源学报,2007,8(2):170-173.
- [6] 王秋竹,林丽华,董文轩.月季茎尖玻璃化法超低温保存技术研究[J].沈阳农业大学学报,2009,40(2):156-159.
- [7] 王君晖,黄纯农.玻璃化法-园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径-文献综述[J].园艺学报,1994,21(3):277-282.
- [8] TSKAGI H, TINH N, ISLAM O M. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of vitrification procedure[J]. Plant Cell Rep, 1997(16):594-599.
- [9] 刘祖祺,张石城.植物抗性生理学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [10] MATSUMOTO T, TAKAHASHI C, SAKAI A, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures[J]. Scientia Horticulture, 1998, 76:105-114.
- [11] 王子成,邓秀新.玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J].园艺学报,2001,28(4):301-309.
- [12] 王贞.扶芳藤茎尖玻璃化超低温保存及其效果评价[D].北京:北京林业大学,2007.
- [13] 刘艳霞.菊花茎尖超低温保存及遗传稳定性评价[D].武汉:华中农业大学,2008.
- [14] 周小梅,王国英,敖光明,等.玉米组培材料的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生[J].农业生物技术学报,2001,9(4):355-358.
- [15] 薛建平.地黄试管块根诱导及茎尖玻璃化法超低温保存[D].武汉:华中农业大学,2004.
- [16] 吕长平,鸾爱萍,陈海霞,等.玻璃化法超低温保存非洲菊茎尖及植株再生[J].中国观赏园艺研究进展,2012(4):307-310.
- [17] 王彪.马铃薯茎尖超低温保存及超低温疗法脱毒技术体系的建立[D].杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [18] 曹庆,易干军,陈金印,等.柑橘裂皮病类病毒超低温脱毒技术的初步研究[J].中国南方果树,2013,42(5):63-67.
- [19] 殷晓辉,舒理慧.植物种质资源的超低温保存研究进展[J].热带亚热带植物学报,1996,4(3):75-82.

DOI:10.11937/bfyy.201605035

# 怀牛膝悬浮细胞培养的动力学研究

李金亭<sup>1</sup>, 郭晓双<sup>1</sup>, 王召阳<sup>2</sup>, 韩学娉<sup>1</sup>, 周志强<sup>1</sup>, 朱凯莉<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南省高校道地性中药保育及利用工程研究中心, 河南 新乡 453007;

2. 河南省南召县中药材开发办公室, 河南 南阳 474650)

**摘要:**以怀牛膝悬浮细胞系为试材,对牛膝细胞悬浮培养动力学进行了研究,采用 HPLC、原子吸收分光光度法和电导率测定等方法,分析了牛膝悬浮细胞生长、营养消耗和三萜皂苷积累的动力学关系。结果表明:牛膝细胞悬浮培养周期约为 24 d,经 24 d 的悬浮培养,最大生物量和齐墩果酸含量分别达到了 13.47 mg/L 和 1.418 mg/g;牛膝悬浮细胞生长与三萜皂苷积累的动力学关系属于生长偶联型。培养过程中培养液的 pH 值呈先下降后回升的趋势,而电导率逐渐减小,24 d 时降到最低点,而后略有上升。经 15 d 培养,培养基中的蔗糖即消耗殆尽;培养 21 d 后,培养基中大量的氮源、磷源、K<sup>+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 被消耗,而 Ca<sup>2+</sup> 比较充足,基本可以满足细胞生长的需要。由此可推断,培养液中营养成分的不足限制了细胞的快速增长和三萜皂苷含量的提高。

**关键词:**牛膝;悬浮细胞;细胞生长;齐墩果酸**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0132-05

牛膝(*A. bidentata* Bl.)属苋科多年生草本植物,以干燥根入药,主产于河南古怀庆府地区,是我国重要的大宗药材之一<sup>[1]</sup>。中国药典 2010 年版一部中记载牛膝味苦、酸、平,具有补肝肾、强筋骨,逐瘀通经,引血下行的功效<sup>[2]</sup>。据报道,从牛膝中分离鉴定的多种皂苷均为以齐墩果酸为苷元的三萜皂苷,经水解后生成齐墩果酸、

葡萄糖醛酸等,齐墩果酸具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降脂、利胆和保肝等作用<sup>[3]</sup>。随着天然植物资源的匮乏和栽培品种的日益退化,通过药用植物细胞悬浮培养生产药用次生代谢产物,是提高有效成分含量的有效途径之一,近年来受到广泛关注<sup>[4]</sup>。目前通过细胞悬浮培养获得天然活性产物的植物已达 1 000 多种,我国的西洋参、人参、紫草等药用植物细胞培养技术已实现了工业化生产,有效成分的含量远远超过原植株<sup>[5]</sup>。但通过牛膝细胞的悬浮培养生产次生代谢产物的报道极少<sup>[6-7]</sup>。因此,利用牛膝细胞悬浮培养技术对大规模生产牛膝活性成分具有重要的现实意义。该试验在已建立的牛膝

**第一作者简介:**李金亭(1962-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事药用植物学等研究工作。E-mail:Ljt66882004@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81274076);河南省基础与前沿资助项目(122300410430,132300410214)。

**收稿日期:**2015-10-08

## Study on Cryopreservation of Shoot Tips From *in vitro* Plants of *Chrysanthemum* by Vitrification Method

ZHANG Yanqiu, QU Lianwei, SU Junwei, XING Guimei, LU Jiaojiao, ZHANG Xiaofei

(Institute of Floriculture, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** *Chrysanthemum* 'Jinba' was used as test material, and the experiment design of single factor optimization was used to research the effect of sucrose concentration in pre-culture medium, time of pre-culture, loading, exposure of PVS-2, size of shoot tips and the time of frozen on cryopreservation. The results showed that the optimal treatment combination realizing long-period preservation of the shoot tip of *Chrysanthemum* by vitrification method including: 0.25 mol/L of sucrose in pre-culture medium, pre-culturing 3 days, loading treatment at 25°C for 40 minutes, vitrification process at 0°C for 60 minutes and 1.5-2.0 mm of shoot tips. The survival rate of shoot tips preserved for 180 days using this system could reach 71.33% after unloading and recovery training.

**Keywords:** *Chrysanthemum*; tissue culture; shoot tips; cryopreservation