

植物种质资源超低温保存现状及其研究进展

陈晓玲, 张金梅, 辛霞, 黄斌, 卢新雄

(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/
农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要:根据联合国粮农组织 2010 年发布的世界各国的《第二份世界粮食和农业植物遗传资源现状报告》以及有关国际会议和相关文献资料,从超低温保存材料类型、基本程序、方法技术、理论基础、影响因素、保存费用、保存策略和保存现状、实际应用等方面综述了全球植物种质资源超低温保存现状及其研究进展,展望了植物种质资源超低温保存技术的应用前景,旨在加强非正常型种子植物种质资源的安全长期保存。文章最后分析了我国存在的差距,提出了今后努力方向和建议。

关键词:植物;种质资源;超低温保存;研究进展

Progress on Cryopreservation State and Research of Plant Germplasm Resources

CHEN Xiao-ling, ZHANG Jin-mei, XIN Xia, HUANG Bin, LU Xin-xiong

(Key Laboratory of Crop Germplasm Resources and Utilization, Ministry of Agriculture / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The current article was a synthesis of progress on cryopreservation state and research of plant germplasm resources in the world, based on the Second Report of the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, international conferences, and other literatures. The contents covered material types, basic procedures, methods and techniques, theoretical basis, influence factors, costs, strategy, and practical application in the cryopreservation of plant germplasm resources. It also identified the gaps and put forward striving direction and suggestions for strengthening the safety and long-term cryopreservation of non-orthodox seed plant germplasm resources in China.

Key words: plant; germplasm resources; cryopreservation; research progress

植物种质资源可以分为 4 类,即正常性种子植物、中间性种子植物、顽拗性种子植物和无性繁殖植物。能产生正常性种子的植物种质资源通常是在低温库以种子形式进行保存。不能产生正常性种子的植物种质资源通常在田间种质圃、植物园、原生境保护区(点)进行野外保存和在试管苗库、超低温库进行离体保存。

随着环境的恶化,极端天气频发,强度不断增大,野外保存资源的安全性受到的威胁日增。试管苗保存种质需要按期继代,有可能发生污染导致材

料丧失。另外,随着培养时间的延长,试管苗在贮藏时有可能发生一些变异,且变异的可能性将随着保存时间的增加而增大。超低温保存以其安全、稳定、长期、经济的显著优点,正逐步发展成为与野外保存并行且互补的长期安全有效保存方式。

植物种质资源超低温保存一般是在液氮(-196℃)及液氮蒸汽相(-150~-180℃)的超低温条件下保存植物细胞、组织或器官。植物材料在如此低的温度下,调节和控制细胞生长代谢的各类酶的作用受到极大抑制,新陈代谢活动基本停止,处于

收稿日期:2012-08-15 修回日期:2012-10-11 网络出版日期:2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1733.004.html>

基金项目:中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(1610032012006);农业部农作物种质资源保护利用专项资助项目(NB08-2130135)

作者简介:陈晓玲,副研究员,研究方向为作物种质资源保存。E-mail:xlchen@caas.net.cn

通信作者:卢新雄,研究员,研究方向为作物种质资源保存。E-mail:xxlu@caas.net.cn

“生机停顿”或“假死”状态。经过超低温保存后,处于“假死”状态的植物材料能保持正常细胞的活性、形态发生潜能和遗传稳定性,从而达到长期保存植物材料的目的,理论上可以无限期保存种质资源^[1-2]。超低温保存将尽可能避免组织、细胞继代培养及自然界中积累性突变等的发生,是非正常性种子植物和无性繁殖植物种质资源长期安全保存方法,也是生物技术材料有效、安全、稳定、经济、长期保存的唯一方法。

表 1 超低温保存材料类型的优缺点及适用物种

Table 1 Types, advantages, disadvantages, and suitable species of cryopreserved explants

外植体材料类型 Types of explants	优缺点 Advantages and disadvantages	适用物种 Suitable species
种子	超低温保存操作简单,可大大延长种子寿命	珍稀、濒危、野生正常性种子、中间性种子(番木瓜、茶、杏、杨桃、柑橘、油棕)、短寿命种子、顽拗性种子(橡胶)
茎尖分生组织	超低温保存的一种理想材料,可维持遗传稳定性;所需保存空间较小	适用植物范围广,包括温带和热带植物
休眠芽(枝条)	超低温保存操作简单,可以避免超低温保存后进行组织培养的污染问题;但需专用仪器设备如程序降温仪等来精确控制降温速度,取材时间受季节限制,所需保存空间较大,化冻复苏后需要熟练的嫁接技术	耐寒木本植物,如温带、亚温带植物(苹果、桑、李、柿、核桃、柳树、榆木),热带植物还未见报道
花粉	超低温保存操作简单,可保持特定的基因型,解决杂交育种时的花期不遇或地理隔离等问题,也可免去每年种植同一父本材料;取材时间受季节限制	短寿命的三核型花粉(禾本科、十字花科、菊科等)、顽拗性种子植物(没有其他长期保存方案)
合子胚(胚轴)	超低温保存操作简单;体积小、具有形态发生潜力的芽尖和根尖,解冻复苏后能生长成正常植株	正常性种子(花生)、非正常性种子(椰子、佛手瓜、榛子、咖啡、橄榄、杏、茶、柑橘、木菠萝、棕榈)
愈伤组织和体细胞胚	相对容易,方法简单,需要预先建立完善的胚性愈伤诱导组培体系,对超低温保存前需要确定愈伤组织维持高度扩繁和再生能力的状态。有的物种需要使用程序降温仪进行降温速度精确控制,但超低温保存后是否能维持较高的遗传稳定性,尚存在争议	很多物种,如冷杉属、云杉属、松属、栎属、油棕、柑橘属、苹果、草莓、洋橄榄、甜樱桃、芦笋、甘薯、水稻等

1.2 超低温保存基本程序

超低温保存基本程序为:材料选择与准备→预处理→降温冷冻→化冻→存活鉴定→遗传稳定性分析。

1.2.1 材料选择与准备 由于材料的特性(植物的基因型、抗冻性及细胞、组织和器官的年龄、生理状态等)、材料大小、取材部位均影响超低温保存效果^[3-13],因此,应根据植物种类,选择适宜进行超低温保存的不同材料类型,并适时取材,一般选择指数增长长期的细胞。

1.2.2 预处理 预处理目的主要是提高分裂相细胞的比例和减少细胞内自由水含量,使材料达到最

1 超低温保存研究进展

1.1 超低温保存外植体材料类型

由于植物的繁殖特性、种属、基因型、抗冻性不同,适宜进行超低温保存的种质外植体材料类型也有所不同。目前成功进行超低温保存的材料类型有种子、休眠芽、茎尖分生组织、花粉、合子胚(胚轴)、体细胞胚、悬浮细胞、愈伤组织、原生质体等。各类型材料的优缺点及适用物种见表 1。

适于超低温保存的生理状态。预处理的方法有低温锻炼和预培养。茎尖分生组织、胚(轴)和顽拗性种子预处理的一般方法是在 0~4℃ 进行人工低温锻炼 1~6 周或用不同浓度蔗糖或甘露糖的培养基进行 1~7 d 的预培养。在预培养时有的需要逐步提高蔗糖浓度,有的需要添加 ABA 等激素,有的则需缩短光照时间。休眠芽或枝条预处理的方法是在 0℃ 进行低温锻炼不同时间。有的则需逐步在 0℃ 以下温度处理不同时间,如 -3℃, 14 d → -5℃, 3 d → -10℃, 1 d。花粉一般不需要进行预处理,有的则在投液氮前需在 -20℃ 进行预处理。

1.2.3 降温冰冻 降温冰冻方式主要有 4 种:1)快

速降温;2)慢速降温;3)两步降温;4)逐级降温。

1.2.4 化冻 不同类型的保存材料以及用不同的冷冻前处理和降温冰冻方式处理所得材料,其化冻方法也相应不同,主要有常温化冻、快速化冻和慢速化冻3种方法。化冻方法的选择关键是防止化冻过程中细胞内次生结冰和化冻吸水过程中水的渗透冲击对细胞膜体系的破坏。细胞再次结冰的危险温度区域大约是 $-50 \sim -10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[14]。用玻璃化液处理后的材料和采用快速降温法处理后的材料一般在 $37 \sim 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温水浴中进行快速化冻1~3min,具体时间长短

短依材料而定,如滴冻法处理的材料化冻时只需几秒。花粉通常在室温下进行常温化冻或置于 $37 \sim 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温水浴中进行快速化冻。休眠芽需在 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 缓慢化冻或 $37 \sim 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温水浴化冻。

1.2.5 存活鉴定 超低温保存后存活鉴定及评价指标与所用的超低温保存技术、材料类型及其再生方式有关,主要有存活率(细胞活力快速染色法、再培养法等)、再生率、萌发率、嫁接成活率、坐果率和结实率等,各种方法的原理、适用材料类型及优缺点详见表2。

表2 超低温保存后材料存活检测方法

Table 2 Methods for testing the survival of cryopreserved materials

存活评价指标 Survival evaluation indices	适用材料类型 Fitted types of material	优缺点 Advantages and disadvantages
存活率(细胞活力快速染色法,如 TTC、FDA 染色法等)	所有外植体类型	快速鉴定,测定值可能高于实际存活率或再生率;进行快速染色鉴定后的样品已无存活能力,不能继续进行长期保存以及活体细胞再生行为的后续观察
存活率(再培养法)	茎尖分生组织、合子胚(胚轴)、愈伤组织和体细胞胚	体现实际存活状况,但在组织培养过程中面临污染的危险,部分存活组织有可能不能再生
再生率	茎尖分生组织、合子胚(胚轴)、愈伤组织和体细胞胚	体现实际再生状况,但周期长,在组织培养过程中面临污染的危险
萌发率	花粉、种子	花粉萌发率可能高于实际坐果率或结实率
坐果率、结实率	花粉	周期长,受气候、环境因素影响
嫁接成活率	休眠枝条或冬芽	需要熟练的嫁接技术,受气候、环境因素影响

1.2.6 遗传稳定性分析 保存后材料不发生遗传变异是种质资源保存的一个关键点。超低温保存中材料经受了一系列逆境胁迫,易诱导超低温保存材料及其再生植株产生变异。因此,必须在利用超低温进行常规大量长期保存植物种质资源前证实超低温保存后材料遗传稳定。目前采用多种方法从各个水平对超低温保存后的遗传稳定性进行了评价。细胞、花粉、茎尖、种子等材料超低温保存后在表现型、生化方面(可溶性蛋白和同工酶)、染色体结构和倍性、分子水平(ISSR、RAPD 和 AFLP 等)以及细胞合成次生代谢产物的能力均没有发生变化^[15-21]。虽然超低温保存在保持材料遗传稳定性方面比其他离体方法有较好的保证^[15],但用 RAPD、AFLP 分子标记技术检测超低温保存的草莓、苹果、菊花和欧李茎尖均观察到特异条带的产生^[22-25]。另外,在欧李、啤酒花和马铃薯超低温保存材料中检测到 DNA 甲基化状态的改变^[26-28]。一方面组培本身会促进材

料的甲基化^[29];另一方面由于以上遗传稳定性的改变都是在玻璃化超低温保存材料上发现,其中一步要用玻璃化液冰冻保护剂进行脱水处理,冰冻保护剂中的二甲基亚砷(DMSO)对植物材料有毒害作用,会引起材料遗传稳定性的改变^[30]。因此,目前大部分观点仍认为变异是发生在组培继代阶段和保护剂进行保护脱水过程中,而非超低温保存。

1.3 超低温保存方法及其理论基础

1.3.1 超低温保存方法技术的发展 1922年 H. E. Knowlton^[31]将金鱼草花粉冷冻到 $-180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 后,仍获得一定程度的萌发率。这是超低温冷冻保存植物种质的最早报告。1956年日本科学家 A. Sakai^[32]首次报道耐寒桑树枝经冷冻脱水后超低温保存能存活。1968年 R. S. Quatrano^[33]报道亚麻培养细胞经(DMSO)预处理后能够抗 $-50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温。1971年 R. Latta^[34]报道胡萝卜悬浮细胞在液氮($-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中保存成功,且再生出胚状体。1973年 A. Sakai 等^[35]

报道白杨愈伤组织超低温保存成功。1976 年 M. Seibert^[36]首次报道麝香石竹茎尖超低温保存成功,指出具有 2~3 对叶原基的效果最好,之后超低温保存技术在植物种质资源保存方面的研究逐渐深入,应用不断扩大。已有近千种植物成功进行了超低温保存,并且一些植物种质资源实现了规模化超低温保存,如苹果、桑树休眠芽和马铃薯茎尖。

1.3.2 超低温保存方法的基本原理 依据不同原理可将超低温保存方法分为两类:一类是依据冷冻脱水的原理,结合程序降温的传统保存技术;另一类是依据植物细胞玻璃化原理,采取快速降温方式的新技术^[37-38]。

1) 传统技术:传统技术需要程序降温仪或连续降温冰冻装置等昂贵的仪器设备来控制降温速度,成本较高。存活关键在于降温冷冻环节,而非脱水环节。主要应用于保存形态、大小较一致的培养物,如悬浮细胞、愈伤组织和耐寒植物顶端分生组织^[39]。传统技术主要为两步降温法,另外还有慢速降温法和逐级降温法等^[14]。

两步降温法:第 1 步以一定的降温速度先从 0℃ 降到一定的预冻温度(-30~-50℃)后,停留一段时间(1~3 h),使细胞达到适当的保护性脱水。第 2 步迅速投入液氮。该方法中降温速度、预冻温度以及达到预冻温度时停留的时间都因保存材料的不同而有所不同。

2) 新技术:新技术主要有包埋-干燥法、玻璃化法和滴冻法这 3 种。另外,在这 3 种方法基础上改良的方法有干燥法、预培养法、预培养-干燥法、包埋-玻璃化法这 4 种。新技术可以用于保存结构复杂、含有各种形态、大小不一的细胞和体积比较大的组织和器官,如茎尖、合子胚和体胚。而且实验条件要求也比较简单,不需要昂贵的程序降温仪。存活关键在于脱水环节,而非降温冷冻环节。另外,新技术比经典技术有更大的应用潜力,其应用范围更广,有些技术只需稍做修改就可应用于各种形态的细胞^[40]。

包埋-干燥法:基于人工种子包被原理。将外植体用藻酸钙包埋成球后在含高浓度蔗糖(0.3~1.5 mol/L)的液体培养基中进行预培养后置于流动的无菌空气流或硅胶中进行干燥脱水,使含水量降至 20% 左右(以鲜重为基础),然后快速投入液氮中进行冷冻保存。通常采用逐级提高蔗糖浓度的方法,以避免直接用高浓度蔗糖培养基培养的敏感性。

用这种方法保存的材料存活率高,可快速直接成苗,不易形成愈伤组织。这种方法已成功应用于多种植物的茎尖、细胞悬浮液和体细胞胚的超低温保存中^[38,40-44]。

玻璃化法:将材料用冰冻保护剂进行渗透平衡,然后用玻璃化溶液进行脱水处理,最后直接投入液氮,使材料连同玻璃化溶液发生玻璃化转变,进入玻璃态。保存终止后,复温时要快速化冻,防止去玻璃化的发生。快速化冻后用 MS + 1.2 mol/L 蔗糖溶液或 MS + 1.17 mol/L 山梨糖醇进行洗涤,以去除玻璃化液,然后进行恢复培养。成功应用此法的报道比较多,可用于细胞悬浮系、顶端分生组织、胚状体、原生质体等多种外植体的超低温保存^[45-50]。

滴冻法:将材料茎尖用加有冰冻保护剂的液体培养基进行预处理,然后将茎尖连同冰冻保护剂一起滴在铝箔上使之成为小滴,最后将粘有小滴的铝箔直接投入液氮中进行冷冻保存^[51]。这种技术发展得最晚,但成功应用此法的物种数量稳步增加,如已成功应用于马铃薯茎尖、芦笋和苹果茎尖的冷冻保存中^[12,51-53]。

1.4 超低温保存影响因素

材料对超低温保存效果影响很大。由于受植物的种属、基因型、抗冻性以及不同器官、组织和细胞的生理状态等因素影响,因此,种质材料的选择非常重要。材料的特性是影响超低温保存存活率和再生率的基本因素。材料的特性一般包括材料的遗传特性和生理状态等。植物材料对低温的耐受能力与植物的种属、基因型以及器官、组织和细胞的生理状态有密切关系。不同基因型的植物材料用同一种超低温方法保存后结果也不一样^[10-12]。苹果茎尖超低温保存时,6 周龄的茎尖存活率只有 27%,29 周龄的存活率达到 86%^[53-54]。指数生长早期和滞后期的细胞其细胞质稠密、没有形成大的液泡、细胞壁薄、体积小,因此有较强的耐冻能力,液氮保存后存活率高^[55]。对于不同种类和不同生理状态下的植物材料往往选用不同的保存方法。

超低温保存各步的处理是影响超低温保存存活率和再生率的重要因素,每一步处理都会直接影响超低温保存效果,即预处理中的低温锻炼、预培养、脱水方式及程度、降温冰冻方式及速率、化冻方法和恢复培养条件等。如低温锻炼温度及时间、预培养中蔗糖或渗透性化合物浓度及处理时间、装载液装载时间、冷冻保护剂类型(PVS1、PVS2、PVS3、PVS4 和 PVS5)及处理时间、再生培养基不同激素种类和

比例以及光照处理等^[10-12,36,56-58]。因此,应根据植物种类,选择合适的材料类型,使其达到最佳的生理状态,并采取合适的超低温方法及最佳的处理组合,才能使超低温保存效果最好。

1.5 超低温保存机理研究

超低温保存过程涉及脱水、冷冻、化冻和再生培养过程,很多研究通过完善和改进预培养和玻璃化处理等关键步骤处理条件,提高成活率和再生率,效果明显,但需经过多次尝试^[59-62]。为了解决这些问题,超低温保存领域开展了较多的超低温保存机理研究,主要集中在低温物理学和冷冻生物学2个领域。

1.5.1 低温物理学研究 低温物理学研究主要集中在水的相变及低温下的分子运动模型^[63-64]。水分含量及水的相变关系到植物能否经受住低温的考验,一般认为,植物细胞达到玻璃化状态时即可避免形成损伤细胞膜的细胞内冰晶。温带植物在冬季来临前都会出现含水量降低、胞质浓度升高的现象,是一种自然形成玻璃化状态的现象。1985年A. G. Hirsh等^[65]首次使用示差扫描量热法(DSC, differential scanning calorimetry)和冷冻电子显微镜对自然冷冻锻炼的木本植物杨树进行研究,发现其可以成功抵御液氮可能是因为存在3个明显的玻璃态转换温度值,且在高温、低温以及玻璃态过程中均保持稳定。在以茎尖、胚、种子等为外植体材料进行超低温保存过程中,水相的热力学变化研究也日益成为超低温保存机理的研究重点,成为开发超低温保存体系以及优化体系的重要内容,如2009年H. H. Kim等^[66]以大蒜和菊花茎尖为材料应用DSC技术模拟超低温保存过程的放热峰和冷却峰,观察超低温保存关键步骤的热力学事件,确定最适合的装载液组成成分和最佳处理时间。

1.5.2 冷冻生物学研究 超低温保存对细胞结构的影响。在生物学研究方面主要通过研究超低温对细胞超微结构以及细胞内含物质的影响,探讨超低温保存中的伤害机理和对策^[67]。超低温保存主要涉及细胞对超低温的耐受行为。研究细胞的应激反应可以通过观察细胞显微和超显微结构来进行。通过观察细胞是否具备完整的细胞膜和细胞结构,判断分生组织细胞的存活状态^[68]。通过透射电镜对超低温保存中细胞结构完整性的观察结果表明,此方法还可以确定超低温保存技术环节中的关键步骤。如2010年B. Wen等^[69]通过对玉米胚超低温保存过程中细胞学和生理学变化研究表明,脱水和

冷冻导致了细胞学伤害,发生了质壁分离、线粒体膨胀、异染色质增加、细胞核收缩等现象。多个研究表明,细胞超微结构的破坏主要发生在脱水、冷冻和解冻过程,若材料在冷冻前经适宜的保护性处理,则冷冻和化冻过程基本不对细胞产生新的损伤^[68,70-74]。

超低温保存对抗氧化体系的影响 在正常情况下,细胞内自由基的产生和清除处于一种动态平衡的状态^[75]。S. Flower等^[76]和D. Y. Sung等^[77]研究发现由活性氧(ROS, reactive oxygen species)导致的抗氧化代谢和氧化胁迫是植物应答低温胁迫的重要组成部分。2004年R. Mittler等^[78]研究表明,保持稳定ROS水平对应答胁迫十分重要,拟南芥维持ROS水平至少涉及152个基因。细胞在冷冻过程中受到不同程度的氧化损伤是影响超低温保存存活率的重要原因^[78-80]。超低温保存过程中水分和低温对细胞产生了胁迫,一方面会诱导细胞的自由基防御体系发生改变,另一方面会促进自由基的产生,加速细胞内有害代谢产物的积累,造成次生伤害,受胁迫的细胞还可以通过多种途径产生 O_2^- 、 H_2O_2 等自由基,引发膜脂过氧化作用,同时细胞也存在着清除这些自由基的多种途径,包括超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase),过氧化氢酶(CAT, catalase),谷胱甘肽转移酶(GST, glutathione transferase)等在内的保护酶系统及内源抗氧化剂,防止或终止脂质过氧化^[81]。研究表明,ROS和自由基调节过程可能在超低温保存过程中发挥着调节耐受性的作用^[82]。2010年B. Wen等^[69]对玉米胚超低温保存过程中的细胞学和生理学变化研究表明,脱水过程增强了抗坏血酸过氧化物酶(APX, ascorbate peroxidase)和谷胱甘肽还原酶(GR, glutathione reductase)活性,降低了SOD和脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR, dehydroascorbate reductase)活性,冷冻过程进一步降低了GR和SOD的活性,导致了极低的DHAR活性。抗氧化酶活性快速响应以及产生OH在植物超低温保存机理研究中已被发现^[83-85]。

超低温保存对膜脂的影响 膜体系是生命活动的基础,超低温保存中细胞膜结构的损坏是影响超低温保存效果的主要因素之一^[86]。膜脂是细胞膜的基本骨架,脂质结构的稳定对于稳定细胞骨架、提高超低温保存存活率有积极作用^[87-88]。此外,膜脂中的类脂和脂肪酸成分会影响膜脂的物理特性,尤其是相变温度和水合特性等,从而影响超低温保存存活率。玻璃化超低温保存中溶液处理及超低温保存均会引起膜脂组分的变化^[89-90]。

超低温保存对细胞含糖量的影响 许多试验表明糖在超低温保存中具有重要的保护作用。可溶性糖参与调控抗冻力的形成,抗冻锻炼中有可溶性糖的积累并对冻害具有保护作用^[91-94]。2000 年刘燕^[89]和 2005 年尚晓倩^[95]分别报道,植物的含糖量与耐液氮冻融性呈正相关。温带植物为了适应低温还普遍表现出细胞内可溶性糖浓度上升的现象。而且可溶性糖浓度的变化与植物的低温耐性呈显著的正相关。

超低温保存对蛋白表达的影响 1) 在超低温保存前的预培养和低温锻炼期间有新的蛋白质合成,其与能量代谢、脱落酸合成和盐逆境反应相关,对抗冻性增强起到了积极的作用。这些新蛋白多数为糖蛋白,可以进入膜内或是附着于膜表面,对膜起稳定作用^[94,96-97]。2006 年 S. C. Carpentier 等^[98]观察香蕉分生组织超低温保存前经蔗糖预培养后分生组织蛋白点变化的结果表明,蔗糖预培养影响了不同蛋白的表达量,观察到与能量代谢、脱落酸合成反应相关蛋白的特异表达。冷冻适应锻炼能增加非饱和脂肪酸水平,改变脂类和蛋白组成及比例,增加磷脂比例稳定细胞膜。有研究发现在冷冻锻炼过程中,脂蛋白和 ERD14 蛋白(脱水早期响应蛋白)表达增加。DREB1 蛋白是 CBF 冷冻应激反应通路中 300 多个基因的转录催化剂。转录因子 CBF1、CBF2、CBF3 在 4 °C 条件下 1 h 内可被诱导产生,这些转录因子通过与顺式作用原件 DRE/CRT 相作用,完成冷冻胁迫响应^[99]。2) 超低温保存引起材料可溶性蛋白表达变化,一些特异表达的蛋白质可能与细胞耐受液氮冻融有关,如牡丹、山茶花粉可溶性蛋白含量升高^[100-101];马铃薯茎尖、拟南芥幼苗以及梅花花粉等超低温保存后均有差异蛋白出现^[89,102-105]。

3) 2004 年林伟强等^[106]研究发现,铁皮石斛类原球茎受到严重脱水时,分子量分别为 28.7 kDa 和 34.3 kDa 的 2 个热稳定蛋白大量积累,经免疫检测 2 个蛋白均为脱水蛋白。并由此推测脱水蛋白对细胞耐受脱水胁迫可能起到保护作用,因样品含水量的控制是超低温保存成功的关键因素。4) 蛋白质组比较研究。鉴定超低温保存中蛋白质的变化涉及生命代谢活动相关的多个途径。2006 年和 2007 年 S. C. Carpentier 等^[107-108]利用脱水敏感和耐受基因型的香蕉茎尖分生组织为材料进行超低温保存,比较蛋白质组研究发现 41 个不同的上调蛋白和 19 个下调蛋白,下调蛋白与糖酵解、细胞修复防御、刺激代谢、信号转导有关,而上调基因表达则与储存能量

的糖酵解途径以及维持细胞壁完整性有关,同时还发现存在大量基因型特有蛋白和不同响应蛋白,影响了碳水化合物代谢,促进了保持能量的糖酵解途径,有助于维持细胞间蔗糖的渗透保护。2010 年 C. R. Forni 等^[109]以苹果变种 Annurca 为材料进行超低温保存研究结果表明,在超低温保存过程中伴随着蛋白质组学的变化,鉴定出 6 个与胁迫响应相关、涉及细胞循环的蛋白。

1.6 超低温的“永久”保存问题

长期以来,人们一直致力于寻找能够实现“永久”保存的技术而不断探索。理论上超低温保存具有“永久”保存的特点,因而倍受推崇。1903 年获得诺贝尔化学奖的瑞典物理化学家 Arrhenius 研究温度对化学反应速度的影响结果表明,低温能抑制生物体的生化活动,并得出了 Arrhenius 关系式: $K = A \cdot \exp(-E_a/RT)$, 式中 K 为反应速率, R 为气体常数, T 为绝对温度, E_a 为活化能, A 为 Arrhenius 因子。对于给定的反应, A 是常数。根据 Arrhenius 关系式可推算出生物材料在液氮(-196 °C)下可保存几个世纪^[63]。

S. Ozkavukcu 等^[110]报道超低温保存 50 年的牛精子复温后的生活力和功能没有发生变化。从超低温保存 11 年到 34 年的人红细胞结果可估算出超低温(-196 °C)可维持人血红细胞寿命至 276 年之久^[111]。在植物材料方面,超低温保存 28 年的豌豆和草莓茎尖生活力没有下降^[112]。超低温保存 20 年的苹果休眠芽嫁接后仍能成活^[113]。由于超低温保存技术发展时间较短,其保存的极限时间仍需要更长的时间来验证。

2 超低温保存费用

理论上讲,超低温长期保存种质资源具有省时、省地、省空间和无病虫害侵染等优点,比较安全、经济。用于超低温保存的设备简单,不需大量的基建投资,只是前期建库时的仪器设备投入花费要大一点,以后的维持费用较低,只需定期补充液氮而已,省却了监测和繁殖更新费用,节省空间和人力。实际研究结果表明,超低温保存的费用确实比较低。K. E. Hummer 等^[114]2000 年报道在美国国家无性繁殖种质资源圃(NCGR, national center for genome resources)田间保存 1 份温带果树每年需要 77 美元,离体试管苗库缓慢生长保存每年需 23 美元,超低温保存每年只需 1 美元,但需一次性投入 50 ~ 60 美元。M. E. Dulloo 等^[115]2009 年在拥有世界上最大

的咖啡田间种质圃的哥斯达黎加热带农业研究和高等教育中心组织(CATIE, clinical antipsychotic trials of intervention effectiveness)对咖啡种质超低温保存和田间种质圃植株保存的费用进行了比较研究。结果显示,每份资源超低温保存的费用比田间种质圃保存的费用要低;而且随着超低温保存份数的增加,费用越来越低。在哥伦比亚国际热带农业研究中心(CIAT, centre international pour agriculture tropique)超低温保存 5000 份木薯种质资源每年的费用约 5000 美元,而离体试管苗库缓慢生长保存每年需 3 万美元^[116]。

3 超低温保存的其他用途

超低温保存技术除了应用于植物种质资源的保存外,还应用于脱毒、抗性育种和遗传转化。

3.1 超低温脱毒

1997 年, M. Brison 等^[117]用超低温保存结合茎尖离体培养,成功地去除了李豆病毒,脱毒率达到 50%,比单纯的茎尖培养脱毒率(20%)高了很多,开创了超低温疗法。超低温疗法,即超低温脱毒,其原理是通过超低温保存进行选择性地破坏细胞。带病的顶端分化细胞含水量高,在冷冻过程中会形成冰晶而被杀死。相反,进行增殖而引起顶端生长的分生细胞的细胞质浓度大,因而冷冻后能存活^[118]。通过超低温保存可对感染病毒、植原体和细菌的植株进行脱毒,以代替或补充传统的脱毒技术,如茎尖分生组织培养、温热疗法以及温热疗法结合茎尖分生组织培养^[119]。目前,通过超低温疗法已脱除了香蕉、柑橘、葡萄、李、覆盆子、马铃薯和甘薯的严重病原体,即香蕉条斑病(BSV, boot sector virus)、黄瓜花叶病毒(CMV, cucumber mosaic virus)、葡萄病毒 A(GVA, grapevine virus A)、李豆病毒、马铃薯卷叶病毒(PLRV, potato leaf roll virus)、马铃薯 X 病毒(PVX, potato virus X)、马铃薯 Y 病毒(PVY, potato virus Y)、覆盆子丛矮病毒、甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV, sweet potato feathery mottle virus)、甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV, sweet potato chlorotic stunt virus)10 种病毒,甘薯小叶植原体和柑橘黄龙病细菌,脱毒率大大高于传统脱毒技术^[116,120-127]。目前,对于超低温保存脱除病毒的机理还没有完整清晰的认识^[119,128]。

3.2 抗性育种

在超低温保存过程中,材料会经历一系列胁迫,这些胁迫可能会作为一种选择压力,对不同基因型

的材料产生选择效应^[129]。L. A. Withers^[130]认为超低温保存对不同材料的选择作用和材料的遗传稳定性是相互关联的,异质群体中的不同基因型对超低温保存的反应不同,从而导致选择作用产生,使保存后成活的培养物不同于原始培养物。薰衣草悬浮细胞和挪威云杉胚性愈伤组织经多次超低温保存后存活率逐步提高^[131-132]。E. J. Kendall 等^[97]报道对小麦愈伤组织反复进行冷冻-化冻处理,恢复生长的小麦植株耐寒性提高。同时,这些耐寒植株也产生了不同的蛋白型。可见超低温保存过程可能对抗冻力较强的细胞进行了筛选。

3.3 遗传转化

超低温保存胚性组织可以提高水稻和葡萄的遗传转化效率和转化细胞的植株再生率^[133-134]。遗传转化材料离体试管苗保存不仅费工费时,而且有可能发生污染和产生变异,从而使基因丢失。超低温保存可在遗传转化的整个过程中具有潜在应用价值,包括目标基因的准备、长期保存、胚性组织再生能力的保持、遗传转化效率和转化细胞植株再生率的提高、安全有效保存转基因材料^[135]。

4 植物种质资源超低温保存策略

由于植物种质资源类型不同,其长期保存策略也不同。对于大多数正常性种子植物而言,可以通过低温库保存种子,以实现其资源的长期保存。其余植物种质资源,即珍稀、濒危、短寿命正常性种子植物以及中间性种子植物、顽拗性种子植物和无性繁殖植物种质资源的长期保存只能通过超低温保存。植物种质资源类型不同,其超低温保存材料、方法和技术要求也不同,见表 3。

5 植物种质资源超低温保存现状

5.1 各国超低温库保存植物种质资源情况

由于超低温保存具有安全、可靠、保存费用低等优点以及具有“永久保存”的潜力,随着新技术的发展,超低温保存技术也越来越多地应用到植物种质资源保存领域。目前已有包括美国、俄罗斯、法国、印度、尼日利亚、日本等多个国家建立了植物种质资源超低温库,对农作物、药用植物和林木等植物种质资源进行保存^[118,136-138]。各国超低温库保存植物种质资源情况见表 4。尽管应用超低温进行常规保存的实例有限,但是随着基于玻璃化理论的超低温保存新技术的发展,将会使超低温保存得到广泛应用^[118]。

表 3 植物种质资源超低温保存策略

Table 3 Strategy for cryopreservation of plant germplasm resources

植物种类 Plant types	保存材料类型 Types of materials	保存方法 Storage methods	超低温保存技术 Cryopreservation techniques	代表作物 Representative crops	
正常性种子(大多数)	种子	低温库保存	空气干燥	水稻、小麦、玉米等	
	花粉	超低温保存		水稻、小麦	
正常性种子(珍稀、濒危、短寿命)	种子、花粉	超低温保存	空气干燥	地域特有种	
中间性种子	花粉	超低温保存	空气干燥	咖啡、柑橘、油棕榈等	
	胚、胚轴、体胚	超低温保存	空气干燥、包埋脱水、小滴玻璃化		
	离体茎尖	超低温保存	包埋脱水、小滴玻璃化、缓慢冷冻		
顽拗性种子	花粉	超低温保存	空气干燥	椰子、可可、许多热带或亚热带果树或树木	
	胚、胚轴、体胚	超低温保存	空气干燥、包埋脱水、小滴玻璃化		
	离体茎尖	超低温保存	包埋脱水、小滴玻璃化、缓慢冷冻		
无性繁殖植物	草本植物	体胚	超低温保存	块根、块茎类植物、草莓、葱属、甘蔗等	
		离体茎尖	超低温保存		
	木本植物	花粉	超低温保存	空气干燥	果树
		体胚	超低温保存	空气干燥、包埋脱水、小滴玻璃化	桑、茶、果树、树木
		离体茎尖	超低温保存	包埋脱水、小滴玻璃化、缓慢冷冻	
	休眠芽	超低温保存	缓慢冷冻		

表 4 世界各国主要超低温库保存植物种质资源情况

Table 4 Plant germplasm resources in cryobanks all over the world

材料类型 Types	国家或国际组织 Countries or international organizations	植物种类 Plants	保存数量(份) No. of cryopreserved accessions	
正常性种子(珍稀、濒危、短寿命)	美国	各种作物	43400	
		印度	禾谷类	240
	黍类及饲料		287	
	拟谷类作物		76	
	食用豆		636	
	油料		470	
	纤维		66	
	蔬菜		433	
	药用和香料作物		849	
	麻醉剂及染料		34	
	其他		16	
	澳大利亚		珍稀、濒危植物	110
	俄罗斯		濒危植物	250 种
	中国		园林植物	95
		农作物	17	
	合计	>46979		

表 4(续)

材料类型 Types	国家或国际组织 Countries or international organizations	植物种类 Plants	保存数量(份) No. of cryopreserved accessions		
非正常性种子(顽拗性及中间性)	印度	水果及坚果(扁桃、柑橘、荔枝、木菠萝)	2504		
		香料及调味品(胡椒等)	148		
		林木	1640		
		经济作物	1095		
		其他	22		
		哥斯达黎加	小果咖啡	180	
			法国	葡萄、咖啡	几百份
				合计	>5589
		休眠芽	美国	苹果	2503
				李	52
梨	187				
桑	262				
印度	桑		1283		
日本	桑		440		
法国	欧洲榆木		440		
中国	桑树		3		
		苹果	4		
		梨	5		
		合计	4739		

表 4(续)

材料类型 Types	国家或国际组织 Countries or international organizations	植物种类 Plants	保存数量(份) No. of cryopreserved accessions	
离体茎尖	英国	梨属、黑莓	223	
		甘薯	76	
		大蒜	103	
		草莓	145	
		啤酒花	73	
		野生紫苏	22	
		醋栗	78	
		悬钩子	136	
		柳树	25	
		马铃薯	141	
		蓝莓	10	
		香蕉、薄荷、黑麦草、狗牙根、温柏、欧洲榛等	403	
		日本	草莓	60
			辣根	40
	茜草		40	
	德国	马铃薯	1244	
		葱属	65	
		草莓	20	
		薄荷	56	
	国际马铃薯中心(CIP)		马铃薯	800
	国际热带农业研究中心(CIAT)		木薯	640
	比利时(ITC和IRD)		香蕉和大蕉	833
	捷克		马铃薯、苹果、梨、大蒜、啤酒花	50
	俄罗斯		马铃薯、玫瑰、草莓、覆盆子(树莓)	47
	苏格兰(UAD)		醋栗	31
	中国	马铃薯	23	
		香蕉	14	
李		6		
甘薯		5		
香石竹		4		
矮牵牛		4		
百合		3		
白术		1		
山葵		1		
其他园林植物		22种		
合计		5444		

表 4(续)

材料类型 Types	国家或国际组织 Countries or international organizations	植物种类 Plants	保存数量(份) No. of cryopreserved accessions	
花粉	美国	梨	37	
		印度	40种作物(15科)	912(有的超过20年)
	日本	桃	60	
		中国	山茶属植物	15
	中国	芍药属植物	190	
		梅花	60	
		桃	8	
	合计		1282	
	胚轴	美国	榛	5个种
		中国	园林植物	8个种
愈伤组织	英国	药用植物	1000	
	中国	园林植物	10个种	
培养物、胚性悬浮细胞系	加拿大	针叶树	几千份	
	法国	香蕉、咖啡、可可	所有收集资源	
其他	俄罗斯	油棕	80	
		稀有药用植物	51	
	中国	园林植物	6个种	
其他	韩国	葱属5个种	1650	
	中国	园林植物	2个种	

表中有关数据来源于以下报告和国际会议:(1)联合国粮农组织《第二份世界粮食和农业植物遗传资源现状报告》,2010。http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/seeds-pgr/sow/sow2/country-reports/en/;(2)比利时鲁汶:“第一届国际园艺植物超低温保存会议”,2009年;(3)印度新德里:“第五届国际植物遗传资源离体试管苗保存和超低温保存技术培训班”,2010年;(4)中国杨凌:“第一届国际园艺作物超低温保存会议”,2011年

All the data in the above table were sourced from the following report and international conferences. (1) FAO. The Second Report on the State of World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture: Country Reports [EB/OL], 2010 http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/seeds-pgr/sow/sow2/country-reports/en/. (2) First International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species. Belgium; Leuven, 2009. (3) Fifth International Training Course on *In Vitro* and Cryopreservation Techniques for Conservation of Plant Genetic Resources. India: New Delhi, 2010. (4) First International Symposium on Cryopreservation of Horticultural Crops in China. China: Yangling, 2011

5.2 中国植物种质资源超低温保存及研究现状

郑光植等^[139]1983年成功地对药用植物三分三的愈伤组织及其悬浮培养细胞进行了超低温保存,成为我国植物种质资源超低温保存研究的开创者。

我国植物种质超低温保存研究起步虽比较晚,但经近 30 年的努力,已报道约 200 余种植物超低温保存成功,然而进行实际保存的事例却极少。目前,我国在许多果树、花卉、蔬菜和园林植物种质资源超低温保存研究中均取得了成功,如苹果、梨、柑橘、柿、桃、甜樱桃、李、香蕉、葡萄、百合、香石竹、菊花、魔芋、马铃薯、芍药属植物等^[5,10-13,25-26,28,53-54,57,95,140-148]。研究的材料类型包括细胞、种子、花粉、茎尖、休眠芽、合子胚(胚轴)、体细胞胚、悬浮细胞、愈伤组织、原生质体等。但顽拗性种子作物,如芒果、荔枝等超低温保存仍很困难。超低温保存研究主要集中在超低温保存程序中各步骤条件的优化,如预处理、冷冻方法、化冻和恢复培养等方面。我国虽然在超低温保存研究中取得了很大进展,但尚未建立起作物种质资源超低温保存库。我国国家长期库已成功进行了人参种子、马铃薯、百合、香蕉、香石竹、李和山葵茎尖、苹果、梨和桃花粉以及桑树休眠芽的超低温保存研究,并正在进行实际保存应用。

6 小结

6.1 世界各国非常重视植物种质资源超低温保存

植物种质资源超低温保存方法研究始于 19 世纪 70 年代,20 世纪末得到广泛应用^[149-151]。目前,世界各国非常重视植物种质资源的超低温保存研究,并将一些研究结果应用于实际保存工作中,如印度、美国、日本、德国、韩国、加拿大、俄罗斯等国家纷纷建立了植物种质资源超低温保存库。印度国家植物遗传资源局(NBPGR, national bureau of plant genetic resources)已成为国际植物遗传资源试管苗保存和超低温保存培训中心,已成功举办 6 期培训班。《全球植物保护战略(2011-2020)》(GSPC, global strategy for plant conservation)强调加强对温带和热带物种的超低温保存研究。比利时、法国、英国等 21 个国家共同签署的 Food and Agriculture Cost Action 871 是专门关于欧洲作物超低温保存研究计划(cryopreservation of crop species in Europe)。

6.2 超低温保存中存在的问题及前景展望

目前,超低温保存技术已经成功地应用于上百种植物,保存的材料包括植物悬浮细胞、愈伤组织、原生质体、体细胞胚、花粉、茎尖和分生组织等。但是,这项技术发展得还不成熟。目前的研究多侧重于证实某种植物的超低温可贮性,以及保存技术的试验,对冻存机理的研究尚不深入。

尽管大规模超低温保存植物种质资源的应用例子不断增加,但由于超低温保存方法技术众多,各种植物适宜进行超低温保存的材料类型不同,甚至同一种植物不同品种用相同的方法和技术进行超低温保存后效果也不一样,致使超低温保存大规模实际应用存在一些问题,还没有形成普遍适用于各种植物的超低温保存技术体系,从而限制了大规模实际应用。中国国家作物种质库对马铃薯离体茎尖用小滴玻璃化法超低温保存后,斯诺顿存活率最高的可达 100%,克新 12 最低的只有 6.67%。日本国家种质库从 1997 年就开始进行桑树休眠芽的超低温保存。目前已保存了 1283 份桑树资源,但仍有 187 份(约为 13%)资源无法用此方法保存。

虽然进行规模化超低温保存的物种数量仍有限,但超低温保存植物种质资源具有广阔的发展前景,尤其在保护珍稀濒危植物方面将具有更大的应用价值。超低温保存已被认为是无性繁殖植物和顽拗性种子植物种质资源保存的理想方式,将在粮食和农业植物遗传资源安全保存方面发挥关键作用,为中国农业可持续发展提供坚实的物质基础。

6.3 中国作物种质超低温保存努力方向和建议

我国一直十分重视植物种质资源的收集与保存。目前,已收集保存近 5 万份无性繁殖作物种质资源,除了甘薯和马铃薯这 2 种作物建立了国家试管苗库外,其他绝大多数资源均以单一形式分别保存在 43 个国家作物种质资源圃或 125 个原生境保护点中。为了进一步完善我国作物种质资源保存体系,以妥善安全保存我国作物种质资源,满足种质资源收集、保存和利用的需要,2010 年 9 月,国家发展和改革委员会批复了中国农业科学院作物科学研究所申报的“国家作物种质库建设项目工程”(发改农经[2010]2014 号),其中试管苗库和超低温库是其重要的建设内容之一。该库的建成将为我国无性繁殖作物种质资源妥善安全保存提供重要的设施保障。

为了尽快缩短我国在植物种质超低温保存方面与其他国家的差距,须加强无性繁殖作物种质资源试管苗保存和超低温保存研究,同时也为新国家库的建设进行必要的技术储备。当前,应该加强以下 3 个方面的工作:

1)对成功进行了超低温保存研究报道的作物,首先要进行技术本土化的建立、优化及实际应用保存试验,然后对其操作流程进行标准化,尤其是一些

细节需要更加准确的描述,如外植体生长条件、所使用的培养基及其培养时间、外植体的部位以及实验室条件,如温度、湿度、超净工作台类型等,并制定出相应的操作处理程序手册,以使实验室之间的超低温保存技术及其流程能够顺利移植。因为目前实验室间技术的转移还存在许多问题^[152]。

2) 加强未成功进行超低温保存研究报道作物的超低温保存技术体系的开发研究,尤其是我国特有种。

3) 加强超低温保存有关机理研究,促进超低温保存技术的发展。

参考文献

- [1] Kartha K K, Engelmann F. Cryopreservation and germplasm storage[M]// Vasil I K, Thorpe T A. Plant cell and tissue culture. Dordrecht; Kluwer Academic Publishers, 1994: 195-230
- [2] Ozudogru E A, Previati A, Lambardi M. *In vitro* conservation and cryopreservation of ornamental plants[M]// Jain S M, Ochatt S J. Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. UK: Humana Press, 2010: 303-324
- [3] Takagi H, Thinh N T, Islam O M, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. I. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure[J]. Plant Cell Rep, 1997, 16(9): 594-599
- [4] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1998
- [5] 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): 301-306
- [6] Charoensub R, Phansiri S, Yongmanitchai W, et al. Routine cryopreservation of *in vitro*-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification; importance of a simple monod- al culture[J]. Sci Hortic, 2003, 98(4): 485-492
- [7] Vidal N, Sanchez C, Jorquera L, et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips[J]. In Vitro Cell Dev-Pl, 2005, 41(1): 63-68
- [8] Ishikawa M, Suzuki M, Nakamura T, et al. Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses[J]. Ann Bot, 2006, 97(3): 453-459
- [9] Niino T, Tanaka D, Tantely R R, et al. Cryopreservation of basal stem buds of *in vitro*-grown mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification[J]. Cryo Letters, 2007, 28(3): 197-206
- [10] 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
- [11] 李俊慧, 何平, 陈晓玲, 等. 香蕉离体茎尖超低温保存研究[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 34-39
- [12] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存及其再生植株的遗传稳定性[J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1431-1438
- [13] Chen X L, Li J H, Xin X, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification[J]. S Afr J Bot, 2011, 77(2): 397-403
- [14] 简令成. 超低温冷冻保存植物营养器官、组织及细胞[M]// 马缘生. 作物种质资源保存技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1989: 144-166
- [15] Harding K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review[J]. Cryo Letters, 2004, 25(1): 3-22
- [16] 石思信, 张志娥, 肖建平. 玉米花粉超低温长期保存对其后代农艺性状的影响[J]. 北京农业科学, 1994, 12(5): 14-15
- [17] Ahuja S, Mandal B B, Dixit S, et al. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips[J]. Plant Sci, 2002, 163(5): 971-977
- [18] Hirano T, Ishikawa K, Mii M, et al. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification[J]. Cryo Letters, 2005, 26(3): 139-146
- [19] Ahuja S, Mandal B B, Dixit S, et al. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification[J]. Plant Sci, 2002, 163(5): 971-977
- [20] Liu Y G, Liu L X, Wang L, et al. Determination of genetic stability in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification[J]. Cryo Letters, 2008, 29(1): 7-14
- [21] Benson E E. Cryopreservation[M]// Benson E E. Plant conservation biotechnology. London: Taylor & Francis, 1999: 83-95
- [22] Hao Y J, You C X, Deng X X. Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation[J]. Cryo Letters, 2002, 23(1): 37-46
- [23] 邵建柱. 苹果等果树种质资源的离体保存研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003
- [24] Martin C, Gonzalez-Benito M E. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration[J]. Cryobiology, 2005, 51(3): 281-289
- [25] 张成婉, 王子成, 何艳霞. 欧李茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(5): 516-521
- [26] 张成婉. 欧李茎尖超低温保存及遗传变异分析[D]. 开封: 河南大学, 2007
- [27] Peredo E L, Arroyo-Garcia R, Reed B M, et al. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. Cryobiology, 2008, 57(3): 234-241
- [28] 曲先, 王子成. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 茎尖的超低温保存及其遗传变异的初步观察[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(1): 11-16
- [29] Li X Q, Xu M L, Korban S S. DNA methylation profiles differ between field and *in vitro*-grown leaves of apple[J]. J Plant Physiol, 2002, 159(11): 1229-1234
- [30] Salaj T, Matušiková L, Píršelová B. Effect of cryoprotectant exposure on post-thaw recovery, growth and genetic stability of *Pinus nigra* Arn. embryogenic tissues [C]// The 1st international symposium on cryopreservation in horticultural species. Leuven; The conference scientific committee, 2009: 26
- [31] Knowlton H E. Studies in pollen with special reference to longevity[J]. Cornell Univ Agr Exp Sta Mem, 1922, 52: 751-793
- [32] Sakai A. Survival of plant tissue of super-low temperature[J]. Contrib Inst Low Temp Sci Hokkaido Univ Ser B, 1956, 42: 14-17
- [33] Quatrano R S. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide [J]. Plant Physiol, 1968, 43: 2057-2061
- [34] Latta R. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing[J]. Can J Bot, 1971, 49(7): 1253-1254
- [35] Sakai A, Sugawara Y. Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation [J]. Plant Cell Physiol, 1973, 14(6): 1201-1204
- [36] Seibert M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196 °C [J]. Sci USA, 1976, 191(4232): 1178-1179
- [37] Engelmann F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources[M]// Engelmann F, Takagi H. Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Rome: International plant genetic resources institute, 2000: 8-20
- [38] Engelmann F. *In vitro* conservation methods [M]// Ford-Lloyd B V, Newbury J H, Callow J A. Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Wellingford: CABI, 1997: 119-162
- [39] Reed B M, Uchendu E. Controlled rate cooling [M]// Reed B M.

- Plant cryopreservation; A practical guide. New York: Springer, 2008; 77-92
- [40] Engelmann F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species[J]. Plant Genet Res Newsletter, 1997, 112: 9-18
- [41] Fabre J, Dereuddre J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips [J]. Cryo Letters, 1990, 11: 413-426
- [42] Bachiri Y, Gazeau C, Hansz J, et al. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration[J]. Plant Cell Tiss Org, 1995, 43(3): 241-248
- [43] Engelmann F, Gonzalez-Arno M T, Wu W J, et al. Development of encapsulation dehydration[M]// Reed B M. Plant cryopreservation; A practical guide. New York: Springer, 2008; 59-76
- [44] Gonzalez-Arno M T, Engelmann F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane [J]. Cryo Letters, 2006, 27(3): 155-168
- [45] Uragami A, Sakai A, Nagai M, et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1989, 8(7): 418-421
- [46] Langis R, Schnabel B, Earle E D, et al. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification [J]. Cryo Letters, 1989, 10: 421-428
- [47] Langis R, Schnabel-Preikstas B, Earle B J, et al. Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification [J]. Cryobiology, 1990, 27: 658-659
- [48] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama A I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1990, 9(1): 30-33
- [49] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama A I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196 °C [J]. J Plant Physiol, 1991, 137(4): 465-470
- [50] Towill L E. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1990, 9(4): 178-180
- [51] Schäfer-Menuhr A. Refinement of cryopreservation techniques for potato [M]// Final report for the period 1 Sept. 1991-31 Aug. 1996. Rome: International plant genetic resources institute, 1996
- [52] Mix-Wagner G, Schumacher H M, Cross R J. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen [J]. Cryo Letters, 2003, 24(1): 33-41
- [53] Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, et al. Cryopreservation of apple *in vitro* shoot tips the droplet freezing method [J]. Cryo Letters, 1999, 20: 109-112
- [54] Wu Y, Engelman F, Zhao Y, et al. Cryopreservation of apple shoot tips: Importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants [J]. Cryo Letters, 1999, 20: 121-130
- [55] Sakai A, Sugarogen Y. Survival of plant germplasm in liquid nitrogen [M]// Li P H, Sakai A. Plant cold hardiness and freezing stress. New York: Academic Press, 1978; 345-359
- [56] 李全顺, 王洪庆. 唐菖蒲愈伤组织超低温保存 [J]. 植物生理学通讯, 1989(2): 48-50
- [57] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿休眠芽茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 553-556
- [58] 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
- [59] Volk G M, Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection [J]. Cryobiology, 2006, 52(1): 48-61
- [60] Kaczmarczyk A, Shvachko N, Lupysheva Y, et al. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27(9): 1551-1558
- [61] Quain M D, Berjak P, Acheampong E, et al. Sucrose treatment and explant water content: critical factors to consider in development of successful cryopreservation protocols for shoot tip explants of the tropical species *Dioscorea Rotundata* (Yam) [J]. Cryo Letters, 2009, 30(3): 212-223
- [62] Reed B M, Uchendu E E, Leonard S W, et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation [J]. Plant Cell Rep, 2010, 29(1): 25-35
- [63] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1994
- [64] Zhmakin A I. Fundamentals of cryobiology: physical phenomena and mathematical models [M]. Berlin: Springer, 2009
- [65] Hirsh A G, Robert J W, Meryman H T. A novel method of natural cryoprotection intracellular glass formation in deeply frozen Populus [J]. Plant Physiol, 1985, 79: 41-56
- [66] Kim H H, Lee Y G, Park S U, et al. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures [J]. Cryo Letters, 2009, 30(4): 291-299
- [67] Turner S, Senaratna T, Touchell D, et al. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation [J]. Plant Sci, 2001, 160(3): 489-497
- [68] 曾继吾, 易干军, 张秋明, 等. 番木瓜茎尖超低温保存过程中的细胞超微结构 [J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 15-19
- [69] Wen B, Wang R, Cheng H, et al. Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation [J]. Protoplasma, 2010, 239(1-4): 57-67
- [70] Mazur P. Principles of cryobiology [M]// Fuller B J, Lane N, Benson E E. Life in the frozen state. London: CRC Press, 2004: 3-65
- [71] 张守梅, 李建国, 陈厚彬, 等. 香蕉茎尖滴冻法保存中细胞的超微结构变化 [J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 709-713
- [72] Black S P, Constantinidis I, Cui H, et al. Immune responses to an encapsulated allogeneic islet beta-cell line in diabetic NOD mice [J]. Biochem Bioph Res Co, 2006, 340(1): 236-243
- [73] 刘峰, 王君晖, 黄纯农, 等. 水稻胚性悬浮细胞玻璃化冻存中的超微结构变化 [J]. 中国水稻科学, 1998, 12(1): 17-20
- [74] Xu C, Li Y, Panis B, et al. Ultrastructural changes in suspension culture cells of banana (*Musa* spp. AAA) during cryopreservation by vitrification [C]// The 1st International symposium on cryopreservation in horticultural species. Leuven: The conference scientific committee, 2009: 17
- [75] Agarwal A, Nandipati K C, Sharma R K, et al. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction [J]. J Androl, 2006, 27(3): 335-347
- [76] Flower S, Thomashow M F. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway [J]. Plant Cell, 2002, 14: 1675-1690
- [77] Sung D Y, Kaplan F, Lee K J, et al. Acquired tolerance to temperature extreme [J]. Trends Plant Sci, 2003, 8: 179-187
- [78] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 490-498
- [79] Nair S J, Brar A S, Ahuja C S, et al. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature [J]. Anim Reprod Sci, 2006, 96(1): 21-29
- [80] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻对斑尾刺虾鱼卵中酶活性的影响 [J]. 海洋渔业, 2010, 32(1): 49-53
- [81] 文彬. 植物种质资源超低温保存概述 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(3): 311-329
- [82] Benson E E. Cryopreservation of phyto diversity: A critical appraisal of theory practice [J]. Crit Rev Plant Sci, 2008, 27(3): 141-219

- [83] Benson E E, Lynch P T, Jones J. The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery [J]. *Plant Sci*, 1995, 110: 249-258
- [84] Harding K, Johnston J W, Benson E E. Concepts in cryobiomics: A case study of *Ribes* genotype responses to cryopreservation in relation to thermal analysis oxidative stress nucleic acid methylation and transcriptional activity [M]// Laamanen J, Uosukainen M, Haggman H, et al. *Agrifood research working papers 153-cryopreservation of crop sciences in Europe*. Finland: MTT agrifood research, 2008: 10-11
- [85] Johnston J W, Harding K, Benson E E. Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation [J]. *Plant Sci*, 2007, 172(3): 524-534
- [86] Steponkus P L, Webb M S. Freeze induced dehydration and membrane destabilization in plants [M] // Somero G N, Osmond C B, Bolis C L. *Water and life*. Berlin: Springer-Verlag, 1992, 338-362
- [87] Liebermann J, Tucker M J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification [J]. *Reproduction*, 2002, 124: 483-489
- [88] Dobrinsky J R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos [J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 285-302
- [89] 刘燕. 拟南芥幼苗玻璃化超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2000
- [90] Chakrabarty J, Banerjee D, Pal D, et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2007, 54(1): 27-35
- [91] Koster K L, Lynch D V. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98: 108-113
- [92] Ruetten D, Santarius K A. Seasonal variation in frost tolerance and sugar content of two *Plagiomnium* species [J]. *Briologist*, 1993, 96(4): 564-568
- [93] Panis B, Totté N, Nimmen K V, et al. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose [J]. *Plant Sci*, 1996, 121(1): 95-106
- [94] Thierry C, Florin B, Petiard V. Changes in protein metabolism during the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37(2): 145-154
- [95] 尚晓倩. 芍药花粉超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2005
- [96] Carpentier S, Witters E, Laukens K, et al. Proteome research of banana meristems to study cryoprotection [J]. *Cryobiology*, 2006, 53(3): 422-422
- [97] Kendall E J, Qureshi J A, Kartha K K, et al. Regeneration of freezing-tolerant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from cryoselected callus [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 1756-1762
- [98] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, et al. Proteome research in banana meristems to study cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2006, 53: 422
- [99] Volk G M. Application of functional genomics and proteomics to plant cryopreservation [J]. *Curr Genomics*, 2010, 11(1): 24-29
- [100] 陶清波. 牡丹花粉超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2003
- [101] 李广清. 山茶花粉超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2005
- [102] Criel B, Panta A, Carpentier S, et al. Cryopreservation and abiotic stress tolerance in potato: A proteomic approach [J]. *Comm Agr App Biol Sci*, 2005, 70(2): 83-86
- [103] 徐艳. 观赏蕨类植物种质超低温保存研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2006
- [104] 张亚利. 梅花花粉超低温保存研究及其花粉库建立 [D]. 北京: 北京林业大学, 2007
- [105] Zhang Y L, Li B L, Wang H, et al. The changes of total soluble proteins and Ca^{2+} in cryopreservation pollen of *Prunus mume*. [C]// The 1st international symposium on cryopreservation horticultural species. Leuven: The conference scientific committee, 2009: 20
- [106] 林伟强, 边红武, 王君晖, 等. 铁皮石斛类原球茎空气干燥法超低温保存中的脱水蛋白分析 [J]. *园艺学报*, 2004, 31(1): 64-68
- [107] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, et al. Proteome research in banana meristems to study cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2006, 53: 422
- [108] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, et al. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress [J]. *Proteomics*, 2007, 7: 92-105
- [109] Forni C R, Braglia R, Beninati S, et al. Polyamine concentration, transglutaminase activity and changes in protein synthesis during cryopreservation of shoot tips of apple variety Annurca [J]. *Cryo Letters*, 2010, 31(5): 413-425
- [110] Ozkavukcu S, Eredemli E. Cryopreservation; Basic knowledge and biophysical effects [J]. *J Ankara Med School*, 2002, 24: 187-196
- [111] Sumida S. Recover rate, osmotic fragility, and oxygen dissociation curve of red blood cells cryopreserved for 30 years or longer [C]// Abstract book of the annual meeting of cryobiology (CRYO2006). Hamburg: The conference scientific committee, 2006: 134
- [112] Caswell K L, Kartha K K. Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years [J]. *Cryo Letters*, 2008, 30(1): 41-46
- [113] Walters C, Volk G M, Towill L E, et al. Survival of cryogenically-stored dormant apple buds: A 20 year assessment [C]// The 1st international symposium on cryopreservation in horticultural species. Leuven: The conference scientific committee, 2009: 25
- [114] Hummer K E, Reed B M. Establishment and operation of a temperate clonal field genebank [C]// Engelmann F. *Management of field and in vitro germplasm collections*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000: 29-31
- [115] Dulloo M E, Ebert A W, Dussert S, et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources [J]. *Crop Sci*, 2009, 49(6): 2123-2138
- [116] Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity [J]. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant*, 2011, 47(1): 5-16
- [117] Brison M, deBoucaud M T, Pierronnet A, et al. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox poty virus [J]. *Plant Sci*, 1997, 123(1-2): 189-196
- [118] Engelmann F. Plant cryopreservation: Progress and prospects [J]. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant*, 2004, 40(5): 427-433
- [119] Wang Q C, Valkonen J P T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(3): 119-122
- [120] Helliot B, Panis B, Poumay Y, et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 20(12): 1117-1122
- [121] Wang Q C, Mawassi M, Li P, et al. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L [J]. *Plant Sci*, 2003, 165(2): 321-327
- [122] Wang Q C, Liu Y, Xie Y H, et al. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) [J]. *Potato Res*, 2006, 49(2): 119-129
- [123] Wang Q C, Valkonen J P T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips [J]. *Plant Pathol*, 2008, 57(2): 338-347
- [124] Wang Q C, Cuellar W J, Rajamaki M L, et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral

- RNA degradation in shoot tips [J]. *Mol Plant Pathol*, 2008, 9 (2):237-250
- [125] Wang Q C, Valkonen J P T. Eradication of two synergistically interacting viruses from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy of shoot tips [J]. *J Virol Methods*, 2008, 154:135-145
- [126] Ding F, Jin S X, Hong N, et al. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27 (2):241-250
- [127] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 超低温保存法去除马铃薯 X 病毒和马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. *分子植物育种*, 2010, 68 (3):605-611
- [128] Wang Q C, Valkonen J P T. Elimination of viruses and phytoplasma by cryotherapy of *in vitro*-grown shoot tips: Analysis of all cases [J]. *Adv Hort Sci*, 2007, 21 (4):265-269
- [129] Dietrich B, Haack U, Lsuckner M. Cryopreservation of digitalis lanata cells grown *in vitro*: Precultivation and recultivation [J]. *J Plant Physiol*, 1986, 126 (1):63-73
- [130] Withers L A. Long-term preservation of plant cells, tissues and organs [J]. *Oxf Surv Plant Mol Cell Biol*, 1987, 4:221-273
- [131] Watanabe K, Yamada Y, Ueno S, et al. Change of freezing resistance and retention of metabolic and differentiation potentials in cultured green *Lavandula vera* cells which survived repeated freeze-thaw procedures [J]. *Agr Biol Chem*, 1985, 49 (6):1727-1731
- [132] Bercetche J, Galeme M, Dereuddre J. Efficient regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea-abies* L. karst after freezing in liquid nitrogen [J]. *CR Acad Sci III-Vie*, 1990, 310 (8):357-363
- [133] Moukadiri O, Lopes C R, Cornejo M J. Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion and storage in liquid nitrogen [J]. *Physiol Plantarum*, 1999, 105 (3):442-449
- [134] Wang Q C, Li P, Hanania U, et al. Improvement of agrobacterium-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions [J]. *Plant Sci*, 2005, 168 (2):565-571
- [135] Wang B, Zhang Z B, Yin Z F, et al. Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation [J]. *Bio-technol Adv*, 2012, 30 (3):604-612
- [136] Agrawal A, Uma S, Tyagi R K, et al. Cryobanking of banana (*Musa* spp.) germplasm in India; Evaluation of agronomic and molecular traits of cryopreserved plants [C]//The 1st international symposium on cryopreservation in horticultural species. Leuven: The conference scientific committee, 2009:23
- [137] Dumet D, Korie S, Adeyemi A. Cryobanking cassava germplasm at IITA [C]//The 1st international symposium on cryopreservation in horticultural species. Leuven: The conference scientific committee, 2009:37
- [138] Tay D, Panta A, Zea B, et al. The Potato cryo-bank at the international potato center [C]//The 1st international symposium on cryopreservation in horticultural species. Leuven: The conference scientific committee, 2009:38
- [139] 郑光植, 何静波, 王世林. 三分三愈伤组织及其悬浮细胞的冰冻贮藏 [J]. *植物学报*, 1983, 25 (6):513-517
- [140] 赵艳华, 吴雅琴, 李春敏. 梨离体茎尖超低温保存方法的比较研究 [J]. *河北农业科学*, 2004, 8 (4):93-95
- [141] 赵艳华, 吴雅琴. 桃离体茎尖的超低温保存及植株再生 [J]. *园艺学报*, 2006, 33 (5):1042-1044
- [142] 赵艳华, 吴永杰, 周明德. 马哈利樱桃离体茎尖超低温保存的研究 [J]. *园艺学报*, 1999, 26 (6):402-403
- [143] 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 等. 李离体茎尖超低温保存及茎尖存活快速检测 [J]. *园艺学报*, 2008, 35 (3):423-426
- [144] 赵艳华, 吴永杰. ‘品丽珠’葡萄离体茎尖超低温保存的研究 [J]. *园艺学报*, 2001, 28 (1):62-64
- [145] 刘艳霞, 刘灶长, 林田, 等. 菊花茎尖的玻璃化超低温保存研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10 (2):249-254
- [146] 张玉进, 张兴国, 刘佩瑛. 魔芋花粉的低温和超低温保存 [J]. *园艺学报*, 2000, 27 (2):139-140
- [147] 张玉进, 张兴国, 刘佩瑛. 魔芋不定芽的低温保存研究 [J]. *西南农业大学学报*, 1999, 21 (4):303-306
- [148] 王玉萍, 张峰, 王蒂. 马铃薯花粉的超低温保存研究 [J]. *园艺学报*, 2003, 30 (6):683-686
- [149] Reed B M, De Noma J, Chang Y. Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank [M]//Engelmann F, Takagi H. Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications. Tsukuba: JIRCAS, 2000:246-249
- [150] Ray A, Bhattacharya S. Cryopreservation of *in vitro* grown nodal segments of *Rawolfia serpentina* by PVS2 vitrification [J]. *Cryo Letters*, 2008, 29 (4):321-328
- [151] N'Nan O, Hocher V, Verdeil J L, et al. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.) [J]. *Cryo Letters*, 2008, 29 (4):339-350
- [152] Reed B M. Cryopreservation-practical considerations [M]//Reed B M. Plant cryopreservation: A practical guide. New York: Springer, 2008:3-13