

木本植物种质资源超低温保存研究进展

熊兴耀^{1,2}, 李炎林²

(1.中国农业科学研究院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:超低温保存是目前木本植物长期保存的理想方法。综述国内外超低温保存技术在木本植物种质资源保存方面的应用现状和超低温条件下的低温伤害及细胞超微结构改变, 阐述超低温保存技术的发展及各类超低温保存技术的优缺点和影响因素, 指出广谱适用性问题、保存方法的可重复性问题和可操作性问题、投入产出问题是影响超低温保存技术推广应用的主要问题, 认为扩大超低温保存木本植物资源的种类、根据植物种类和外植体类型发展相应的超低温保存技术、根据保存目的合理选取保存材料及其保存方法、优先发展经济优势物种的保存技术、增加财政投入以研发新型超低温保存技术是解决上述问题的重要途径。

关键词:木本植物; 种质资源; 超低温保存; 低温伤害

中图分类号: S718.52⁺1.2; S325 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)04-0347-07

Progress in cryopreservation of woody plant germplasm

XIONG Xing-yao^{1,2}, LI Yan-lin²

(1.The Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China; 2.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Cryopreservation is considered to be a valuable solution for long-term storage of plant germplasm especially for woody plant species. In this article, we summarized the application of cryopreservation in woody plant species, the damage and ultrastructural changes of freezing cell and the development of various cryopreservation techniques and their advantages and disadvantages. We pointed out that the spectrum, repeatability and maneuverability of cryopreservation plus high investment and low output of this technique were main problems existed at present. To solve these problems, various suggestions were put forward, such as expanding the woody plant resources for cryopreservation, developing cryopreservation techniques according to plant species, choosing the right conservation materials and methods based on the purpose of preservation, giving priority to development of preservation techniques for economic species and raising investment for developing new cryopreservation methods.

Key words: woody plant species; germplasm resources; cryopreservation; low-temperature damage

种质资源保存技术是食品安全与农业生物资源多样性的重要保证。高产、优质和高抗新品种的筛选与选育离不开丰富的种质资源^[1]。品种的单一区域化栽培替代了高度多样化的地方品种和传统的农业-生态品种。森林砍伐、城市化进程加快、环境污染、生境破坏、种质退化、外来物种入侵、

气候改变、市场经济的发展以及土地使用方式的改变等, 均直接或间接导致了植物种质资源遗传多样性的缺失^[1-3]。随着生物技术的发展, 植物离体组织培养技术和分子生物学技术已成为种质资源保存和管理的重要工具和手段^[1,4]。其中超低温(-196℃)保存是目前种质资源长期保存的理想方法^[3]。多年

收稿日期: 2012-05-10

基金项目: 国家教育部项目(IRT0963)

作者简介: 熊兴耀(1961—), 男, 湖南桑植人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事现代生物技术研究, xiongy@hunau.net

生木本植物是人类重要的林木用材,是食品、医药等人类生存物质的重要来源。有许多宝贵的木本植物资源,如水杉、珙桐、红豆杉等因自然环境恶化或者过度开采而濒临灭绝。因此,开展多年生木本植物超低温保存研究具有重大意义。笔者综述近年来超低温保存技术在木本植物种质资源保存方面取得的部分成果,以期对多年生木本植物资源进行超低温保存提供参考。

1 超低温保存技术在木本植物种质资源保存中的应用

超低温保存技术至今已有近40年的发展历史,是目前无性繁殖种质资源唯一可靠的中长期保存方法,可作为大量收集和保存种质资源的有效手段,已建立了多种保存方法,如二步降温法、预培养法、干燥法、预培养干燥法、包埋干燥法、玻璃化法、包埋玻璃化法和小滴冰冻法等^[3,5]。超低温保存技术具有操作简单和适合保存多种种质资源的优势^[5]。可用超低温保存技术保存的材料种类众多,如种子、茎段、茎尖、胚、胚状体、花粉、愈伤组织、悬浮细胞等^[3,5-6]。在液态氮的极端低温(-196℃)或者在其气化温度(-150℃)条件下,超低温保存种质资源的细胞分化、新陈代谢以及生理、生化反应都将停止,因此,这些被保存的材料都具有高度的遗传稳定性。

植物种质资源保存是育种的重要环节。超低温保存的最大优势是在理论上可以随时以低成本、占用最小空间的方式来保存种质资源,不同类型的细胞、组织和器官均可以作为被保存的材料。超低温保存技术除了适合保存无性繁殖的植物外,还适合保存种子繁殖的部分多年生木本植物。部分多年生木本植物的种子属于顽拗性种子,常规保存或者脱水保存都会失去活力。利用超低温保存技术可以保存数量巨大的繁殖材料,以满足生产的需要^[3]。

超低温保存技术除了作为种质资源保存的手段外,还是获得无病毒苗木的重要途径。在茎尖培养过程中,利用超低温保存技术或超低温冰冻处理,或者在超低温保存或超低温冰冻后结合热治疗法,可以有效去除病毒浸染,获得无病毒苗木^[7]。

已有用超低温保存技术获得无病毒苗木的报道^[8-9](采用玻璃化超低温保存方法,用PPV浸染的李属种间杂种‘Fvereley-Jaspi’的茎尖,获得了45%~60%的无菌材料)。Wang等^[10]利用茎尖超低温保存技术成功去除了葡萄的葡萄A病毒,脱毒率达96%,且脱毒率比单独使用茎尖培养技术高出了84%。Wang等^[11]利用离体培养技术,将感染悬钩子丛矮病毒病(RBDV)的悬钩子通过昼温38℃、夜温26℃处理28~35d,然后切取约1mm的茎尖进行超低温保存处理,获得了33%~35%的RBDV脱毒苗。

2 超低温保存的低温伤害与超微结构改变

在超低温保存过程中,被保存的生物材料主要在物理和生物化学方面受到伤害,特别是超低温保存过程中细胞内冰晶形成造成的伤害是不可逆的^[3]。在快速降温过程中,细胞内冰晶的形成会引起机械损伤;胞间冰晶的形成使细胞动态脱水,导致细胞损伤。细胞内冰晶的形成起初主要导致细胞膜伤害^[12]。谢玉明^[13]通过对预培养荔枝花粉胚性愈伤组织的超微结构观察,发现预培养可以使细胞内的液泡化程度降低。细胞内的自由水含量降低是细胞抗冻能力和抗脱水能力提高的标志;细胞核膜皱缩导致核孔复合体破裂,细胞核变形,原生质收缩,各种细胞器及膜结构受到破坏,导致细胞出现致死伤害。曾继吾等^[14]报道番木瓜茎尖细胞在经过预培养、60% PVS2预处理和PVS2脱水处理后,细胞质壁分离程度加重,细胞的抗冻力增加;细胞的严重伤害主要发生在液氮保存的降温及解冻过程中;部分细胞的细胞壁、细胞膜及细胞核膜均发生了不可逆的损伤,可能是部分番木瓜茎尖细胞致死的原因之一。Xu Xiao-bao等^[15]认为,猕猴桃茎尖细胞在超低温冰冻和冻融保存时,细胞壁、细胞膜和细胞核膜均受到了伤害,但经过PVS2处理后,细胞发生的质壁分离使猕猴桃茎尖细胞的复活率提高。

综上所述,通过对超低温保存过程中超微结构的观察,可以合理解释超低温保存过程中预培养、预处理、脱水处理等对提高材料超低温保存成活率的机理,也可为合理选择超低温保存方案提供辅助手段。

3 超低温保存的常用方法

大多数植物活体细胞含有的自由水和结合水对 0 °C 以下的低温特别敏感。对这些活体细胞进行超低温保存前都要进行脱水处理,以避免冰晶伤害,但细胞过度脱水会造成细胞膜破坏、胞质内溶液高度浓缩或者蛋白质变性等^[4,16],所以,超低温保存应尽量减少以上两方面的伤害。

3.1 传统的超低温保存方法

传统的超低温保存方法始于对动物细胞的成功保存。该类方法基于化学冷冻保护剂和慢速降温程序,主要通过预培养、冷冻保护剂处理、控制降温速率和转移温度等关键环节,创造合适的保护性脱水条件,实现超低温保存^[17]。根据降温方法,传统超低温保存方法可分为快速冷冻法和慢速冷冻法。基于慢速降温法的超低温保存方法又可分为两步冷冻法和逐级冷冻法等。

快速冷冻法是一种将材料在特定培养条件下或者处理后直接投入液氮中保存的方法。该方法操作简单,所需仪器设备少,较适合于保存一些高度脱水的植物材料,如种子、花粉和经过冬季低温锻炼后抗寒性较强的木本植物的枝条和芽^[17]等。

慢速冷冻法是在冷冻保护剂存在的条件下,以 0.1~10.0 °C/min 降温速率从 0 °C 降到 -70 °C 后,再直接浸入液氮中进行冷冻保存的方法。慢速冷冻法必须借助程序降温仪,技术系统昂贵。两步冷冻法是先慢速冷冻法降温(降温速率 0.1~4.0 °C/min),在降至转移温度(-70~-40 °C)后保持 0.5~2.0 h,然后再直接投入液氮中保存。逐级冷冻法是将经 0 °C 预培养的材料,依次经过不同温度(-10、-15、-23、-40、-70 °C 等)的冰浴,每个温度梯度保持约 5 min,然后再直接投入液氮中保存^[17]。慢速冷冻法结合了二甲基亚砜(DMSO)等化学渗透调节物质和冷驯化、高渗透物质处理,可以减少因细胞内结冰而引起的伤害,显著改善细胞忍耐脱水的能力^[18],适合于保存体积较大、液泡大、含水量较高的植物材料,现已在细胞愈伤组织和悬浮细胞系的保存方面取得了较大的成功^[19]。针对不同种类植物材料及

其生理状态等采用不同降温程序可以获得较好的再生率。ŠKRLEP 等^[20]利用二步降温法成功保存了红豆杉的悬浮系细胞,冻融后成活率达 90%^[20]。马峰旺等^[21]将杏的愈伤组织经过冷冻保护剂(10% DMSO+0.5 mol/L 山梨醇或葡萄糖)处理后,以 1 °C/min 的降温速率降至 -40 °C,停留 2 h 后投入液氮保存,在 40 °C 水浴中化冻,得到的恢复培养愈伤组织,该组织的生长与未经超低温保存愈伤组织生长的差异不显著^[21]。徐刚标等^[22]将银杏愈伤组织在含高浓度山梨醇或甘露醇的培养基上预培养 2 d 后,以 10% 二甲基亚砜+0.5 mol/L 山梨醇为冰冻保护剂,以 1 °C/min 速率分别降温至 -15、-35 °C,再分别停留 10、30 min 后投入液氮中保存 1 d,其细胞相对存活率可达 60% 以上^[22]。细胞预处理、选择合理的冷冻保护剂、优化降温程序、冻融方法等是传统超低温保存成功与否的关键,但对昂贵仪器设备的依赖限制了这类超低温保存方法的推广。

尽管传统超低温保存方法的应用已取得了较好的成效,但其存在的缺陷也相当明显,如快速冷冻法只适合于保存含水量较低的材料,慢速冷冻法(二步降温法和逐级降温法)需要昂贵的仪器设备等,因此,基于新技术、新理论的超低温保存方法得到了快速发展。

3.2 基于玻璃化的新型超低温保存方法

近二三十年来,一类基于玻璃化的超低温保存技术得到了较大的发展和应用。玻璃化是指利用高浓度的冷冻保护剂,在较低温度条件下使液体由液态转变为非晶态(玻璃态)的固化过程,从而使冻存材料在冷冻过程中经受得住冰晶形成的物理过程^[23]。基于玻璃化法的超低温保存法适合于保存多细胞的个体,如茎尖、胚状体等,所需仪器设备简单,保存程序只需进行较小的改变便可适应不同的细胞类型^[24],使用范围广泛,具有传统超低温保存法不可比拟的优势。

玻璃化超低温保存法分为装载、脱水和液氮冷藏^[17]等 3 个基本步骤。玻璃化超低温保存的材料只有在玻璃化液中充分脱水而不产生伤害的条件下,才能保证在液氮中快速冷冻时完成非晶态的转化^[25]。

玻璃化冷冻保存成功与否的关键是样品在玻璃化液中精确地脱水。国内外已成功研究出了很多种适合植物材料超低温保存的玻璃化液,其中应用最广的是基于甘油的玻璃化液 PVS2 和 PVS3。PVS2 玻璃化液主要由 30%的甘油、15%的乙二醇、15%的二甲基亚砷(DMSO) 和 40%的蔗糖(pH 5.8) 组成; PVS3 由 40%的甘油、40%的蔗糖和基本培养基组成^[26-28]。在玻璃化超低温保存中,可以通过对保存材料进行合适的预培养、装载等处理来提高其对玻璃化液毒害作用的忍耐力。已有大量研究^[15,29-46]证实了玻璃化法是成功的超低温种质资源保存方法(表 1)。

表 1 玻璃化超低温保存法成功保存的植物种质资源

Table 1 List of plant germplasm resources cryopreserved using the vitrification technique

植物名称	保存类型	引用文献
中华猕猴桃(<i>Actinidia chinensis</i>)	茎尖	[15]
欧洲七叶树(<i>Aesculus hippocastanum</i> L.)	愈伤组织	[29]
扁桃(<i>Amygdalus communis</i> L.)	茎尖	[30]
番木瓜(<i>Carica papaya</i> L.)	茎尖	[31]
欧洲白蜡树(<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	茎尖	[32]
芒果(<i>Mangifera indica</i> L.)	胚状体	[33]
油橄榄(<i>Olea europaea</i> L.)	胚状体	[34]
欧洲板栗(<i>Castanea sativa</i> Mill.)	胚、胚状体	[35]
枳壳(<i>Citrus aurantium</i> L.)	茎尖	[36]
圆金柑(<i>Citrus madurensis</i>)	胚状体	[37]
沙梨木(<i>Crateva nurvala</i> Buch. Ham)	茎尖	[38]
柿(<i>Diospyros kaki</i>)	茎尖	[39]
云杉(<i>Picea mariana</i>)	胚状体	[40]
银白杨(<i>Populus alba</i> L.)	茎尖	[41]
河北杨(<i>Populus hopeiensis</i> Hu et Chow)	茎尖	[34]
欧美杂种杨树(<i>Populus tremula</i> L. × <i>Populus tremuloides</i> Michx)	离体芽	[42]
巴旦杏(<i>Prunus persica</i>)	茎尖	[43]
欧洲栎(<i>Quercus robur</i>)	茎尖	[44]
刺槐(<i>Robinia pseudoacacia</i>)	茎尖	[45]
玫瑰(<i>Rosa rugosa</i>)	茎尖	[46]

包埋玻璃化法结合了包埋脱水法和玻璃化法的优点,先将样品包埋在海藻酸钙的固化颗粒中,然后再通过玻璃化冷冻保存。包埋玻璃化法主要用于对植物茎尖进行超低温保存^[30,47-52](表 2)。

表 2 用包埋玻璃化超低温保存法成功保存的植物种质资源

Table 2 List of plant germplasm resources cryopreserved using the encapsulation-vitrification technique

植物名称	保存类型	引用文献
扁桃(<i>Amygdalus communis</i> L.)	茎尖	[30]
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	胚性悬浮系愈伤组织	[47]
希腊银冷杉(<i>Abies cephalonica</i>)	胚性愈伤组织	[48]
树莓(<i>Rubus idaeus</i>)	茎尖	[49]
苹果(<i>Malus domestica</i> Borkh)	茎尖	[50]
枳橙(<i>Poncirus trifoliata</i> (L.)Raf.× <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.)	茎尖	[51]
香果树(<i>Emmenopterys henryi</i> Oliv.)	茎尖	[52]

滴冻法被认为是对玻璃化法的一种改进,它最先在德国联邦农业研究中心获得成功。研究人员把马铃薯茎尖保存在 10%的 DMSO 溶液中,用锡箔纸条包好,并迅速浸入液氮中。用该方法保存的马铃薯茎尖恢复生长后较其他方式培养的复苏率高^[53]。该方法随后在多种苹果属植物^[54]和悬钩子、櫻杏^[55]等植物中得到了应用。

3.3 其他新型的超低温保存方法

除了传统的快速冷冻法、慢速冷冻法和玻璃化法外,其他的超低温保存方法还包括干燥法、预培养法、预培养/干燥法、包埋干燥法等。

干燥法也称空气干燥法,是将材料干燥后直接投入液氮中保存^[56],主要用于保存种皮较厚的种子、受精发育成的合子胚、胚状体等^[57]。

预培养法是将种质资源在添加冷冻保护剂(如蔗糖或者糖醇类物质)的培养基上预培养不同时间后,再直接投入液氮中保存的方法,较适合于保存某些植物的合子胚或胚状体,如梨属植物^[58]。

预培养/干燥法是指将种质资源在添加冷冻保护剂(如蔗糖或者糖醇类物质)的培养基上预培养不同时间后,再将其干燥后直接投入液氮中保存的一种方法^[56-58]。

包埋干燥法适用于对高质量人工种子的保存。尽管这种方法的最初目的是包埋单个胚状体来生产人工种子^[59],但后来也广泛应用于茎尖、球茎、茎段,甚至愈伤组织人工种子的生产。包埋的人工种子经过适当预培养后,再结合适当的脱水和降温处理,最后浸入液氮中保存。本方法已应用于对树莓^[50]等木本植物种质资源的保存中。

综上所述,超低温保存经历了 2 个发展阶段:传统超低温保存方法阶段和新型超低温保存方法阶段。传统超低温保存方法中的快速冷冻法适合于保存含水量较低的材料,且所需设备简单,成本较低;慢速冷冻法及基于慢速冷冻的两步冷冻法和逐级冷冻法必须借助高成本的程序降温仪,其前期成本高,且保存材料仅限于单细胞或多细胞团,很少有关于对茎尖、茎段、芽等具有不同组织分化细胞团材料保存的报道。新型超低温保存方法主要有 2 个发展方向:其一是基于高浓度冰冻保护剂使用的方法,如玻璃化法、包埋玻璃化法和滴冻法等;其二是先将培养物在含高浓度蔗糖或糖醇类物质的培养基上进行预培养,使培养物最大限度地失水,在超低温保存后再恢复生长的方法,如预培养法、干燥法、预培养/干燥法、包埋脱水法等。这类方法主要适合于保存不同组织分化的器官,如茎尖、合子胚、胚状体、多细胞团的愈伤组织等,而对但细胞或者细胞悬浮系种质资源的保存均存在复苏率较低、保存效率低下、复苏时间长(复苏唯一可靠的方法就是进行恢复培养)、不适合大规模保存等缺陷。为了提高保存后的成活率,需要对超低温保存程序进行大量的预试验,如寻找合适的预培养处理,使外植体具有较高的抗寒能力、耐受高浓度冷冻保护剂毒害作用的能力或者减少其失水的能力等,也需要筛选合适的冷冻保护剂种类、脱水时间、冻融程序等,保存程序较繁琐,需要投入的人力较多。

4 展 望

经过多年的应用与发展,超低温保存方法已成为木本植物种质资源长期保存的有效手段,且保存种质资源的遗传稳定性好,具有广阔的发展前景。目前,超低温保存在木本植物中的应用还仅限于对少数种类的保存,但随着新的超低温保存方法的发展,如玻璃化法、包埋法、包埋脱水法等,将会有更多种类的木本植物得以保存。尽管如此,超低温保存技术至今仍没有完全取代常规的种质资源保存方式,这主要有四方面的原因:一是超低温保存技术的广谱适用性问题。植物物种种类繁多,每个物种的特性不同,适合对其进行保存的方法也不同,如快速冷冻法较适合于保存含水量较少的材料,基于玻璃化法和干燥脱水法的超低温方法较适

合保存已分化完全的多细胞组织。二是超低温保存方法的重复性问题。在实际应用中,同一物种的生理状态、发育程度等因素的差异使得多次试验的重复性较差,超低温保存技术的可靠性还有待证实。三是超低温保存技术的成本问题。超低温保存的投入与产出不成正比,如慢速降温法、两步冷冻法和逐级冷冻法,在前期均需要投入足够的资金来购买仪器设备;玻璃化法、滴冻法、包埋玻璃化法、包埋干燥法等均需要购买液氮贮藏灌等设备,并且还要定期添加液氮。四是超低温保存技术的可操作性问题。只有当这些技术在应用过程中便于操作时,才有可能将这些技术进行推广,要推广至广大不发达地区尤其需要如此。

为有效解决以上问题,可以采取以下措施:

1) 虽然中国植物资源丰富,但许多宝贵的植物资源已濒临灭绝。应针对这些濒临灭绝的植物资源开展超低温保存的基础性研究工作,政府相关部门应该加大支持力度,构建现代研究平台,培养高端技术人才。

2) 现代科学与技术的发展,为超低温保存技术提供了更先进、更可靠的研究条件,因此,应依托现代科学技术,研究和建立一整套完整的超低温保存技术体系。该体系应具有效果良好、操作简便、适应性强等特点。

3) 针对资源特性等构建相应的植物资源超低温保存技术体系。不同植物种类需要保存的外植体形式存在差异,同种植物在不同生长发育时期的生理状态不同,因此,有必要针对一些重要的植物种质资源分别建立相应的超低温保存技术体系。

参考文献:

- [1] Rao N K .Plant genetic resources :Advancing conservation and use through biotechnology[J] . African J Biotech , 2004 , 3 (2) : 136-145 .
- [2] Pitman N C A , Jorgensen P M . Estimating the size of the world's threatened flora[J] . Science , 2002 , 298 : 989 .
- [3] Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation[J] . Australian Journal of Crop Science , 2011 , 5(6) : 778-800 .
- [4] Ramanatha Rao V , Riley R . The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources[J] . Plant Genet Resour News , 1994 , 97 : 3-20 .
- [5] Engelmann F . Plant cryopreservation : Progress and prospects[J] . *In vitro* Cell Dev Bio Plant , 2004 , 40(5) :

- 427-433 .
- [6] González-Benito M E , Clavero-Ramírez , López-Aranda J M . The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops[J] .Spanish Journal of Agricultural Research , 2004 , 2(3) : 341-351 .
- [7] Wang Q C , Panis B , Engelmann F , et al . Cryotherapy of shoot tips : A technique for pathogen eradication to produce healthy planting and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation[J] . Annals of Applied Biology , 2009 : 154 : 351-363 .
- [8] Damsteegt V D , Scrza R , Stone A L , et al . Prunus host range of plum pox virus (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation[J] . Plant Disease , 2007 , 91 : 18-23 .
- [9] Brison M , Boucaud M T , Pierronnet A , et al . Effect of cryopreservation, the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus[J] . Plant Science , 1997 , 123 : 189-196 .
- [10] Wang Q C , Mawassi M , LI P , et al . Elimination of grapevine virus A(GAV) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L.[J] . Plant Science , 2003 , 165 : 321-327 .
- [11] Wang Q C , Cuellar W J , Rajamaki M L , et al . Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication : Relation of virus distribution , subcellular changes , cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants[J] . Molecular Plant Pathology , 2008 , 9 : 237-250 .
- [12] Muldrew K , Acker J P , Elliot J A W , et al . The water to ice transition : Implications for living cells[C]// Fuller B J , Lane N , Benson E E . Life in the Frozen State . Florida : CRC Press LLC , 2004 : 67-108 .
- [13] 谢玉明 . 荔枝体细胞胚胎发生及种质超低温保存研究 [D] . 长沙 : 湖南农业大学园艺园林学院 , 2003 .
- [14] 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 .
- [15] Xu X B , Cai Z G , Gu Q Q , et al . Cell ultrastructure of kiwifruit(*Actinidia chinensis*) shoot tips during cryopreservation[J] . Agricultural Sciences in China , 2006 , 5(8) : 587-590 .
- [16] Mazur P . Freezing of living cells : Mechanisms and applications[J] . Am J Physiol , 1984 , 247 : 125-142 .
- [17] 杨淑慎 . 细胞工程[M] . 北京 : 科学出版社 , 2009 : 199 .
- [18] Sugawara Y , Steponkus P L . Effect of cold acclimation and modification of the plasma membrane lipid composition on lamellar-to-hexagonal . Phase transition in rye protoplasts[J] . Cryobiology , 1990 , 27 : 667 .
- [19] Lynch P . Applications of cryopreservation to the long-term storage of dedifferentiated plant cultures[C]// Razdan M K , Cocking E C . Conservation of Plant Genetic Resources *in vitro* . Enfield , NH : Science Publishers Inc , 2000 : 66-86 .
- [20] Škrlep K , Bergant M , Winter G , et al . Cryopreservation of cell suspension cultures of *Taxus* media and *Taxus floridana*[J] . Biologia Platarum , 2008 , 52(2) : 329-333 .
- [21] 马锋旺 , 李嘉瑞 . 杏愈伤组织的超低温保存[J] . 西北植物学报 , 1999 , 1(1) : 1-7 .
- [22] 徐刚标 , 易文 , 李美娥 , 等 . 银杏愈伤组织超低温保存的研究[J] . 林业科学 , 2001 , 37(1) : 30-36 .
- [23] Fahy G M , MacFarlane D R , Angell C A , et al . Vitrification as an approach to cryopreservation[J] . Cryobiology , 1984 , 21 : 407-426 .
- [24] Engelmann F . *In vitro* conservation methods[C]// Ford-Lloyd B V , Newbury J H , Callow J A . Biotechnology and Plant Genetic Resources : Conservation and Use . Wallingford : CABI , 1997 : 119-162 .
- [25] Akkira S , Florent E . Vitrification , encapsulation-vitrification and droplet-vitrification : A review[J] . Cryoletters , 2007 , 28(3) : 151-172 .
- [26] Nishizawa S , Sakai A , Amano Y , et al . Cryopreservation of asparagus(*Asparagus officinalis* L .) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification[J] . Plant Science , 1993 , 91 : 67-73 .
- [27] Sakai A , Kobayashi S , Oiyama I . Cryopreservation of nucellar cells of navel orange(*Citrus sinensis* Osb . var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J] . Plant Cell Report , 1990 , 9 : 30-33 .
- [28] Sakai A , Kobayashi S , Oiyama I . Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by a simple freezing method[J] . J Plant Physiol , 1991 , 137 : 465-470 .
- [29] Lambardi , Maurizio , De Carlo , et al . Cryopreservation of embryogenic callus of *Aesculus hippocastanum* L . by vitrification/one-step freezing[J] . Cryo Letters , 2005 , 26(3) : 185-192 .
- [30] Al-Ababneh S S , Shibli R A , Karam N S , et al . Cryopreservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.) shoot tips by encapsulation-dehydration and vitrification[J] . Advances in Horticultural Science , 2003 , 17 : 15-20 .
- [31] Sarah E , Ashmore , Roderick A , et al . Vitrification-based shoot tip cryopreservation of *Carica papaya* and a wild relative *Vasconcellea pubescens*[J] . Australian Journal of Botany , 2007 , 55 : 541-547 .
- [32] Schoenweiss K , Meier-Dinkel A , Grotha R . Comparison of cryopreservation techniques for long-term storage of ash (*Fraxinus excelsior* L .) [J] . Cryo Letters , 2005 , 26(3) : 201-212 .
- [33] Wu Y J , Huang X L , Xiao J N , et al . Cryopreservation of mango(*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures[J] . Cryo Letters , 2003 , 24(5) : 303-314 .
- [34] Lambardi M , De Carlo A , Benelli C , et al . Cryopreservation of woody species by vitrification of

- shoot tips and embryogenic tissue[J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 560: 125–128.
- [35] Corredoira E, San-José M C, Ballester A, et al. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut[J]. *Cryo Letters*, 2004, 25(1): 33–42.
- [36] Samia S, Al-Ababneh, Nabila S, et al. Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips[J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2002, 38: 602–607.
- [37] Cho E G, Hor Y L, Kim H H, et al. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by vitrification: Importance of loading and treatment with vitrification solution[J]. *Cryo Letters*, 2002, 23(5): 317–324.
- [38] Sanayaima R K, Kaur A, Agrawal A, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Crateva nurvala* Buch. Ham, an important medicinal tree[J]. *Cryo Letters*, 2006, 27(6): 375–86.
- [39] Ai P F, Luo Z R. Cryopreservation of dormant shoot-tips of persimmon by vitrification and plant regeneration[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 553–556.
- [40] Touchell D H, Chiang V L, Tsai C J. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 21: 118–124.
- [41] Lambardi M, Fabbri A, Caccavale A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 213–218.
- [42] Jokipii S, Ryynanen L, Kallio P T, et al. A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx[J]. *Plant Science*, 2004, 166, 799–806.
- [43] Channuntapipat C, Colling G, Bertozzi T, et al. Cryopreservation of *in vitro* almond shoot tips by vitrification[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2000, 75 (2): 228–232.
- [44] Martínez M T, Ballester A, Vieitez A M. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures[J]. *Cryobiology*, 2003, 46(2): 182–189.
- [45] Verleysen H, Fernandes P, Pinto I S, et al. Cryopreservation of *Robinia pseudoacacia*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2005, 81: 193–202.
- [46] Adela H, Ina P. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2006, 84: 145–153.
- [47] Wang Q C, Mawassi M, Sahar N, et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2004, 77: 267–275.
- [48] Jana K, Suvi S, Tuiya A, et al. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: Recovery, maturation and genetic fidelity[J]. *Cryobiology*, 2011, 63(1): 17–25.
- [49] Wang Q C, Jaana L, Marjatta U, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24: 280–288.
- [50] Paul H, Daigny G, Sangwan-Norreeel B S. Cryopreservation of apple (*Malus domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification [J]. *Plant Cell Report*, 2000, 19: 768–774.
- [51] Wang Q C, Batuman Ö, Li P, et al. A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of ‘Troyer’ citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) by encapsulation-vitrification[J]. *Euphytica*, 2002, 10: 135–142.
- [52] Hong S R, Yin M H. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henryi* Oliv[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009, 99: 217–226.
- [53] Mix-Wanger G, Schumacher H M, Cross R J. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen[J]. *Cryoletters*, 2003, 24: 33–41.
- [54] Adela H, Constantin D, Valentina I. Cryopreservation of *Malus* cultivars: Comparison of two droplet protocols[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 124: 387–392.
- [55] Tatjana V, Isabelle S, Djurdjina R, et al. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130: 222–228.
- [56] Panis B, Swennen R, Engelman F. Cryopreservation of plant germplasm[J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 650: 79–86.
- [57] Engelmann F. Plant cryopreservation: Progress and prospects[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2004, 40: 427–433.
- [58] Scottez C, Chevreau E, Godard N, et al. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulation-dehydration[J]. *Cryobiology*, 1992, 29(6): 691–700.
- [59] Murashige T. Plant cell and organ cultures as horticultural practices[J]. *Acta Hort*, 1977, 78: 17–30.