

# 玻璃化法超低温保存技术及其研究进展

石 茹<sup>1,2</sup>, 王 芳<sup>1</sup>, 王 舰<sup>1</sup>

(1. 青海省农林科学院 生物技术研究所, 教育部青藏高原生物技术重点实验室, 青海 西宁 810016; 2. 青海大学, 青海 西宁 810016)

**摘 要:**玻璃化法超低温保存技术是一门新兴的生物技术,是目前植物种质资源长期稳定保存的理想方法。现对玻璃化法超低温保存的原理、优点,对玻璃化法保存的程序、影响因素、关键技术的最新成果和研究进展进行综述,并对其今后的发展进行了展望。

**关键词:**超低温保存;玻璃化法;植物种质资源;研究进展

**中图分类号:**Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0231-05

植物种质资源作为一种可再生资源,是人类赖以生存的最重要自然资源之一,是人类食物、药物及工业原料的重要来源,也是农业可持续发展的基础。长期以来,种质资源的多样性受到人为破坏<sup>[1]</sup>,特别是近些年,随着自然资源、生态环境的破坏以及新品种、杂交种的推广,种质资源流失越来越严重<sup>[2]</sup>。目前世界上约有 25 万种植物,其中就有 2~2.5 万种植物日益锐减并面临灭绝的严重威胁;在我国分布的高等植物有 3 万多种,其中 4 000~5 000 种受到灭绝的威胁,占总数的 12%~15%<sup>[3]</sup>。如今,随着植物育种技术的不断进步,植物种质资源向简单化、单一化发展,人们对商业利益的追求使得植物遗传基础越来越狭窄。因此,

保存植物种质资源已经刻不容缓。

1985 年玻璃化法超低温保存技术第一次成功的应用到小鼠胚胎的保存中,证明这项技术具有可操作性<sup>[4]</sup>。1989 年 Uragami 等和 Langis 等首次报道玻璃化保存法在植物中的应用,证实了应用玻璃化法冻存植物种质材料同样是可行的<sup>[5]</sup>。玻璃化法超低温保存将为植物种质资源有用基因的长期利用和保护提供一条有效途径,是目前植物种质资源保存技术中一种比较理想的方法。

## 1 玻璃化法超低温保存

玻璃化法超低温保存是在冰冻前,用由一定比例的渗透性和非渗透性保护剂组成的玻璃化溶液处理材料,使之与玻璃化溶液在足够快的降温速率下过冷到玻璃化转变温度,最终固化成无定形的玻璃化状态的过程,并以这种状态在低温下保存。

### 1.1 玻璃化法超低温保存的原理

在超低温条件下(-196℃),所有细胞生长过程和代谢活动几乎都会停止进行,植物材料的生物学状态相对稳定<sup>[6]</sup>,并且材料经过高浓度玻璃化保护剂处理后,快速投入液氮时,细胞内水分子和保护剂来不及形

第一作者简介:石茹(1988-),女,在读硕士,现主要从事马铃薯遗传育种研究工作。

责任作者:王舰(1964-),男,硕士,研究员,现主要从事马铃薯遗传育种研究工作。

基金项目:青海省科学技术厅资助项目(2008-N-164);马铃薯产业技术体系资助项目(GWZJ-2)。

收稿日期:2011-10-08

## Research on the Relationship Between Plant Growth Regulating Substances and Kiwifruit Fruit Post Harvest Senescence Process

ZHANG Ji-yu<sup>1</sup>, ZHOU Zhen-xing<sup>2</sup>, XUAN Ji-ping<sup>1</sup>, JIA Xiao-dong<sup>1</sup>, GUO Zhong-ren<sup>1</sup>

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014; 2. Jiangsu Agriculture Commission, Nanjing, Jiangsu 210036)

**Abstract:** Kiwifruit, known as the 'king of fruits', is rich in nutritional value and unique healthy features. Kiwifruit which belong to climacteric type was easy to soften and senescence in the process of post-harvest storage. Plant growth regulators play an important role in fruit ripening and senescence. The relationship of plant growth regulators and kiwifruit ripening and senescence were reviewed, in order to provide a reference for studying the mechanism of kiwifruit post-harvest storage and preservation technology in future.

**Key words:** Kiwifruit; ripening; senescence; plant growth regulators

成冰晶或难以形成,就会进入一种人工的完全玻璃化状态,从而达到长期保存的目的,且保持了种质的遗传稳定性。此外,在这种状态下,水分子不会发生重组、产生结构和体积变化,保证了细胞复苏后的活力,也使植物材料的存活率大大提高。

玻璃化超低温保存方法成功的关键在于冷冻材料进入液氮的瞬间即固化形成玻璃态,以及化冻时没有再结晶现象发生,即由玻璃态固体直接变成液体,而液氮中贮存时间的长短对冻后植株再生和细胞遗传的特性几乎没有影响<sup>[7]</sup>。

## 1.2 玻璃化法超低温保存的优点

传统的植物种质资源保存方法中的原境保存(植物保护区、农田种植保存)和异境保存中的种植保存、储藏保存的缺陷日益明显。这些方法需要大量的人力、物力、财力,并且在保存过程中易受空间、气候影响发生变异或种质退化,从而改变了种质的遗传稳定性。超低温保存方法可以克服传统保存方法的不足,能够长期稳定的保存种质资源,但是它也存在不能同时处理大量材料或者冻存后材料不易成活等问题。玻璃化法超低温保存技术的出现,不但可以避免和克服上述不足,而且因其设备简单、无需昂贵仪器、材料处理步骤方便、效果和重复性好等优点备受人们的推崇,其正在成为长期稳定保存植物种质资源及珍贵试验材料的一条重要途径。

自从玻璃化法问世以来,该法在植物种质资源的保存中取得了很大进展,尤其是近几年更是从其保存机理上作了深层次的研究,使该方法不断趋于成熟与完善。

## 2 玻璃化法超低温保存的程序及其研究进展

### 2.1 材料的选择

玻璃化法超低温保存适用于多种植物材料。在进行超低温保存前,材料的选择十分重要。植物的基因型、抗冻性、细胞和组织生长年龄及状态是决定冻存后存活率的重要因素<sup>[8]</sup>。处于快速生长期的材料,其细胞体积小且分裂旺盛、液泡小而少、细胞质浓度高,有利于超低温保存。同时有研究表明,相同浓度的冰冻保护剂随材料种类不同其保护效果也不同<sup>[9]</sup>。

从1989年开始,玻璃化法冻存的植物材料已涉及胚、花粉、花药、种子、愈伤组织、悬浮细胞和原生质体,随后又发展到冻存植物的茎尖、根尖、腋芽分生组织。近几年,玻璃化法超低温保存发展迅速,技术不断完善,成功保存的植物种质资源材料和相关报道也越来越多(表1)。

### 2.2 冷冻前的预处理

2.2.1 低温锻炼 低温锻炼是一种常用的预处理方法。一般来说,经过低温锻炼,细胞会发生保护性脱水,可以避免细胞内大量结冰引起的细胞死亡,这对低温敏感材料的超低温保存更是尤为重要。研究表明,低温锻炼可以提高抗寒力,通过提高ATPase活性或

表1 不同植物材料的玻璃化法超低温保存

物种	材料	参考文献
天仙子	根尖	Jung D W等,2001 <sup>[9]</sup>
柑桔	茎尖	王子成等,2001 <sup>[10]</sup>
黑云杉	胚胎	Touehell D H等,2002 <sup>[11]</sup>
柿	休眠芽茎尖	艾鹏飞等,2003 <sup>[12]</sup>
瓯柑	愈伤组织	陈勇等,2004 <sup>[13]</sup>
拟南芥	幼苗	何艳霞,2004 <sup>[14]</sup>
栗	茎尖	Nieves V等,2005 <sup>[15]</sup>
悬钩子	茎尖	Wang Q C等,2005 <sup>[16]</sup>
长鞭红景天	悬浮培养细胞	郭艳霞,2006 <sup>[17]</sup>
高山红景天	愈伤组织	刘剑锋等,2007 <sup>[18]</sup>
梅花	花粉	张亚利,2007 <sup>[29]</sup>
罗汉果	茎尖	覃灵华等,2008 <sup>[20]</sup>
荔枝	胚性悬浮细胞	谢玉明等,2008 <sup>[21]</sup>
铁皮石斛	原球茎	Yin M H等,2009 <sup>[22]</sup>
银条	茎尖	宋尚伟等,2009 <sup>[23]</sup>
香果树	茎尖	Hong S R等,2009 <sup>[24]</sup>
番木瓜	茎尖	Tsai S F等,2009 <sup>[25]</sup>
月季	茎尖	王秋竹等,2009 <sup>[26]</sup>
微绿苣荬	茎尖和腋芽	许英等,2011 <sup>[27]</sup>

促进其合成,从而释放出更多的能量来抵御低温的侵袭<sup>[28]</sup>;同时,Steponkus等<sup>[29]</sup>认为低温锻炼是提高植物抗冷性的一个很有效的途径,低温锻炼后植物细胞内的溶液浓度、细胞忍受渗透和脱水的能力提高,有利于细胞质玻璃化的形成;Vandenbussche等<sup>[30]</sup>认为冷冻锻炼对细胞脱水和冰冻忍受的影响是由于糖的积累和脂肪酸组成发生了变化。一些植物在预培养前需要对其进行低温锻炼,如Shibli等<sup>[31]</sup>的研究表明,苜蓿悬浮细胞经过2℃低温锻炼10 d,存活率得到极大提高;宋萍萍<sup>[33]</sup>将怀菊花茎段在4℃下低温锻炼7 d再做相关处理后成活率可达80%。

2.2.2 预培养 预培养的目的在于诱导植物组织细胞进行保护性脱水,减少细胞内自由水含量,防止细胞在低温冰冻过程中结冰,避免细胞结构的损伤及死亡。预培养对超低温保存后的存活率有很大影响,一般采用高渗处理对材料进行预培养,即材料在添加0.3~1.0 mol/L蔗糖、甘露醇、山梨醇等渗透调节剂或在5%~10% DMSO等冷冻保护剂的培养基上培养,可降低冰点,增加可溶性糖等保护性物质含量,提高胞液渗透势<sup>[33-35]</sup>。如先用0.3 mol/L蔗糖暗培养芋头茎尖16 h,再用0.18 mol/L甘油预培养2 d<sup>[36]</sup>成活率相对较高;6 mm长的甘薯无菌苗茎尖,接种在MS+0.5 mol/L蔗糖+5% DMSO的培养基上预培养2 d茎尖长势良好,3 d时部分茎尖发生褐化、死亡,4 d则86%以上茎尖死亡<sup>[37]</sup>。然而一些材料如扶芳藤茎尖<sup>[38]</sup>、柿休眠茎尖<sup>[12]</sup>、拟南芥幼苗<sup>[39]</sup>的玻璃化超低温保存则不需要预培养也可保存成功。

### 2.3 装载

在玻璃化之前,通常会选择用一定浓度的冷冻保护剂处理材料,称为装载过程。该过程可增加细胞内

保护剂的含量,减少对细胞的伤害<sup>[40]</sup>。装载溶液一般采用甘油和蔗糖混合液,或者为 60% PVS<sub>2</sub>,少数采用高于或低于 60% PVS<sub>2</sub><sup>[29]</sup>。装载时间随选择材料的不同而不同,一般在 20~60 min,茶悬浮培养细胞<sup>[42]</sup>用 60% PVS<sub>2</sub> 装载 20 min,佛手茎尖<sup>[42]</sup>则装载 30 min,甜土豆茎尖<sup>[43]</sup>用 2 mol/L 甘油和 1.6 mol/L 蔗糖的装载液处理 3 h。与预培养相似,有些材料如杨树的茎尖<sup>[44]</sup>、黑杉胚状体<sup>[11]</sup>和马铃薯茎尖<sup>[46]</sup>等不进行装载,冻存后也能成活。

#### 2.4 脱水或玻璃化

将处理后的材料投入高浓度玻璃化液中,之后在 25℃ 或 0℃ 下处理一段时间,随即投入液氮进行保存,此时保存材料和冰冻保护剂溶液都会进入玻璃化状态。冷冻保护剂有渗透型保护剂和非渗透型保护剂,高浓度的保护剂可以降低冰点和水的过饱和点,阻止冰晶生长,起到保护作用。但高浓度的玻璃化溶液在保护细胞的同时也有毒害作用,所以综合 2 种类型的复合保护剂比单一的效果好,它们可以相互协调、相互作用以达到更好的保护效果。同时在整个脱水过程中,玻璃化保护剂的处理时间也是一个关键的因素。

研究中多采用 100% PVS<sub>2</sub> (30% 甘油+15% 乙二醇+15% 二甲亚砜+0.4 mol/L 蔗糖+MS 培养基) 在 0℃ 条件下处理,可以减轻玻璃化溶液对材料的毒害<sup>[46]</sup>。罗汉果茎尖用 100% PVS<sub>2</sub> 在 0℃ 处理最佳脱水时间为 50 min<sup>[20]</sup>;甘薯茎尖是 0℃、30 min<sup>[37]</sup>;小麦卵细胞是 0℃、20 min<sup>[47]</sup>。为避免 DMSO 直接接触植物材料而造成的毒害作用,现在用 PVS<sub>4</sub> (PVS<sub>4</sub> 组成: 35% 甘油+20% 乙二醇+0.6 mol/L 蔗糖+MS 培养基) 来代替 PVS<sub>2</sub><sup>[48]</sup>。

#### 2.5 冻藏

快速冷冻可以使细胞内的水分子跨过冰晶形成区,迅速进入“玻璃化”状态,此状态下对细胞冷冻伤害最小。研究表明在贮存过程中,只要不断补充液氮,就可以长期保存植物种质资源,而对冻存后植株再生及其遗传特性没有影响。

#### 2.6 解冻及洗涤

植物的冻害常发生在冻存和化冻 2 个过程中,解冻速度也是冻存的关键技术。贮藏于液氮的材料,缓慢升温使溶液温度高于玻璃化温度,细胞内会再次结冰,即去玻璃化。如若解冻时细胞内发生次生结冰,则会因为渗透冲击而对细胞膜体系造成破坏导致细胞死亡<sup>[38]</sup>。现在采用 35~40℃ 水浴 1~3 min 的快速化冻法解冻,可以使材料迅速通过再次结冰的危险区域。研究发现在常温(25℃)或较高温度(35~40℃)下解冻,细胞都有较高存活率且差别不大<sup>[49]</sup>。但有一些情况是例外的,如魔芋茎尖在 40~77℃ 化冻能取得较好的结果<sup>[51]</sup>。

冻后洗涤是一个渗透压的过渡过程,用以快速除去高浓度的玻璃化保护剂,避免对细胞造成伤害。洗

涤液的渗透压过低,可能导致细胞发生质壁分离,影响其存活率。用含 1.2 mol/L 蔗糖培养液在 25℃ 下洗涤 10 min 左右是最常用的洗涤方法。实际应用时往往会因为彻底清除细胞内的保护剂而造成保存后的存活率下降,因为连续的清洗可能造成去质壁分离或打破溶质平衡,反而会进一步伤害到细胞,一般洗涤 2~3 次即可。

#### 2.7 活性检测与再培养

FAD 荧光双醋酸法、TTC(氯化三苯四氮唑)还原法、Evans 蓝法等是快速鉴定冻后材料生活力的方法。但是这些方法只能检测胞内某种酶活力,并不能反映细胞膜或其它结构是否有损伤,因此冻存后材料的活力不能仅以此衡量。最新的检测方法有电子顺磁共振波谱测定法和测定 Ca<sup>2+</sup> 的细胞化学法,这 2 种方法可以提高试验的预见性,但目前对其应用仍然比较少。

在大多数研究中,多采用冻后再生培养来检验材料的存活率。这种方法虽然费时较长,却是检测保存效果的最根本方法,将冻存的材料先在黑暗或弱光下培养 1~2 周,可以减少培养中的光抑制,利于材料恢复,然后转入正常光下培养,15 d 左右统计存活率,30 d 统计再生率。

#### 2.8 冻存后材料遗传稳定性的检测

植物种质资源保存的最根本目的在于保持植物遗传基因的稳定性,使其遗传性状不发生变化。因此,冻存后材料的遗传完整性的检测是十分必要的。主要是从形态、细胞、生化、分子 4 个水平上检测。随着研究的不断深入,细胞水平上既可进行细胞超微结构变化的检测,也可从蛋白质变异,POD、SOD 等同工酶变异生化水平上进行检测;分子水平上,已成功应用了 SSR、ISSR、RAPD、AFLP 等分子标记技术,近年来 AFLP 指纹图谱分析技术更是被广泛应用。

多项研究证明,玻璃化法超低温保存的材料在冷冻前后未发生遗传性状改变,如刘云国等<sup>[51]</sup>对苹果茎尖玻璃化法冻存后的成活苗进行了可溶性蛋白和 POD 同工酶等生化指标检测,并利用 RAPD 方法对 DNA 进行了检测,结果都未发现与未冻存的对照苗有差异。其它材料如拟南芥<sup>[14]</sup>、月季<sup>[52]</sup>、柿和君迁子<sup>[53]</sup>以及香蕉<sup>[54]</sup>再生植株的检测结果表明冻存前后未发生遗传变异,说明在超低温保存处理过程中没有造成保存材料基因组 DNA 序列的变化。

#### 3 玻璃化法超低温保存技术的不断更新

目前,基于玻璃化法超低温保存技术的新方法—包埋玻璃化法和小滴玻璃化法被迅速建立和发展起来。包埋玻璃化法是在玻璃化法和包埋脱水法的基础上发展起来的超低温保存植物种质的新技术<sup>[55]</sup>。它具有能将大量材料同时处理,降低脱水率,减缓细胞内外渗透压,并且处理后恢复生长快、成芽率高等优点。它已被成功的应用于马铃薯分生组织<sup>[56]</sup>、铁皮石斛原球茎<sup>[22]</sup>、怀地黄<sup>[57]</sup>及怀山药<sup>[58]</sup>带芽茎段、葡萄胚胎细胞悬浮液<sup>[59]</sup>、高山红景天茎尖<sup>[60]</sup>等 20 余种植物,在植物

种质资源的保存上显示出其巨大的应用潜力。例如凤梨<sup>[61]</sup>、酸莓<sup>[62]</sup>、三俞菜<sup>[63]</sup>用几种不同超低温方法保存,其结果表明,包埋玻璃化法较其它保存方法可获得更高的成活率,采用包埋玻璃化法冻存凤梨茎尖后成活率为83%,比玻璃化法高出29%。

在玻璃化法基础上发展起来的小滴玻璃化法,其冷冻和解冻速率更快,存活率更高。利用小滴玻璃化法已成功保存了芦笋<sup>[64]</sup>、薯蓣<sup>[65]</sup>、大蒜<sup>[66]</sup>、芋头<sup>[67]</sup>等多种植物茎尖。用玻璃化法和小滴玻璃化法分别保存5个品种香蕉离体茎尖,用小滴玻璃化法保存后再生率都高于玻璃化法,平均高25.7%<sup>[68]</sup>。白建明等<sup>[69]</sup>利用小滴玻璃化法对马铃薯茎尖保存后,存活率和再生率最高达79.91%和62.52%,通过SSR分子标记检测,再生植株的遗传稳定性没有发生改变。

#### 4 展望

20世纪80年代以来,玻璃化法超低温保存方法在保存器官和组织水平的结构完整性方面取得了很大的进步,为医学的快速发展以及园艺作物品种改良、快速繁殖及脱毒等奠定了基础。该法以离体培养技术为基础,又综合了传统方法与超低温保存技术的优点,克服不足,使之在植物种质资源保存中独具潜力与优势。

随着超低温保存技术的发展,我国现已建立了梅花花粉的超低温种质资源库,填补了我国园林植物种质资源库的空白。因此,采用玻璃化法建立专有物种的超低温种质资源库已成为该领域今后发展的一个趋势。

经过多年的发展,玻璃化法超低温保存研究虽然取得了一些令人鼓舞的进展,但是针对这一新兴领域,还有许多问题需要做进一步的探讨与研究。一是采用玻璃化超低温保存方法研究时,对于不同的物种,并未建立起与之相适应的完善的保存体系。在整个方法体系中,针对不同材料的特性,选择与之相适应的冷冻保护剂及其浓度成为该技术的难点和重点;二是对于已保存的材料,在整个超低温保存过程中所发生的生理生化反应并不能完全描述和明白,如低温锻炼的机理现在仍不明确,所以应对玻璃化法保存植物的生化机理进行深入研究,如在活性检测时,可利用电子顺磁共振波谱测定法或测定 $\text{Ca}^{2+}$ 在细胞内外的动态变化等新的方法与思路;三是可从植物组织结构探究超低温保存程序中细胞的变化,并结合分子技术分析冻存的机制,加强超低温保存后遗传完整性的研究,从而建立一套简单、高效的冰冻保存体系;四是抗冻蛋白(AFP)作为一种新型冷冻保存剂,是目前的研究热点之一,但至今为止超低温保存中对抗冻蛋白利用的实例依然很少,同时应加强抗冻蛋白来源的开拓以及作用机理研究;五是对已经被成功保存的植物材料,应将其投入到大田应用中,通过对其相关指标的统计,探讨玻璃化法超低温保存的实际应用效果。

#### 参考文献

- [1] Rao V, Hodgkin T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2002, 68: 1-19.
- [2] 巩振辉, 申书兴. 植物组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007, 178-189.
- [3] Rall W F, Rahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification[J]. Nature, 1985, 313: 573-575.
- [4] 周权男, 孙爱花, 季哲, 等. 木本植物超低温冷冻保存研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(6): 93-96.
- [5] 肖洁凝, 黄学林. 茎尖和芽的超低温保存[J]. 生物工程进展, 1999, 9(5): 46-48.
- [6] 王君辉, 黄纯农. 木本植物超低温保存的研究进展[J]. 世界林业研究, 1998(5): 6-11.
- [7] 间令成, 吴素萱. 植物抗寒性的细胞学研究—小麦越冬过程中的细胞结构形态的变化[J]. 植物学报, 1965(13): 1-15.
- [8] 简令成, 孙德兰, 孙龙华, 等. 甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究[J]. 植物学报, 1987, 29(2): 123-131.
- [9] Jung D W, Sung C K, Touno K, et al. Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification[J]. Plant Physiology, 2001, 158(6): 801-805.
- [10] 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.
- [11] Touhehl D H, Ching V L, Tsai C J. Cryopreservation of embryo-genesis cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification[J]. Plant Cell Reports, 2002(21): 118-124.
- [12] 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.
- [13] 陈勇, 陈炯婷, 王君晖, 等. 瓯柑愈伤组织的玻璃化法超低温保存研究[J]. 浙江大学学报, 2004, 31(4): 197-201.
- [14] 何艳霞. 拟南芥幼苗的超低温保存及其遗传变异的研究[D]. 开封: 河南大学, 2004.
- [15] Nieves V, Conchi S, Lorena J, et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips [J]. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2005, 41(1): 63-68.
- [16] Wang Q C, Laamanen J, Uosukainen M, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 280-288.
- [17] 郭艳霞. 长鞭红景天悬浮培养细胞玻璃化法超低温保存技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [18] 刘剑锋, 阎秀峰, 程云清, 等. 高山红景天愈伤组织的玻璃化法保存及植株再生[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(2): 147-151.
- [19] 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.
- [20] 覃灵华, 刘华英. 罗汉果茎尖玻璃化法超低温保存初探[J]. 河南农业科学, 2008(10): 102-104.
- [21] 谢玉明, 曾继吾, 张秋明, 等. 玻璃化法超低温保存荔枝胚性悬浮细胞[J]. 热带作物学报, 2008, 29(5): 622-625.
- [22] Yin M H, Hong S R. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009, 98: 179-185.
- [23] 宋尚伟, 苗红霞, 胡青霞, 等. 银条茎尖玻璃化法超低温保存及其植株再生[J]. 园艺学报, 2009, 36(12): 1810-1815.
- [24] Hong S R, Yin M H. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopteris henryi* Oliv [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009, 99: 217-226.

- [25] Tsai S F, Yeh S D, Chan C F, et al. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2009, 98(2): 157-164.
- [26] 王秋竹, 林丽华, 董文轩, 等. 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.
- [27] 许英, 陈建华, 栾明宝, 等. 微绿芒麻玻璃化超低温保存初步研究[J]. 中国麻业科学, 2011, 33(1): 31-35.
- [28] Engelmann F, Danbire D, Ollitrault P. Cryopreservation of embryogenesis cell suspensions and calluses of citrus using a simplified freezing process[J]. Cryo-Letters, 1994(15): 53-58.
- [29] Steponkus P L, Langis R, Fujikawa S. Cryopreservation of plant tissue by vitrification[J]. Advances in Low-temperature Biology, 1992(1): 1-6.
- [30] Vandenbussche B, Weyens G, De Proft M. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique[J]. Plant Cell Reports, 2000(19): 1064-1068.
- [31] Shibli R A, Haagensohn D M, Cunningham S M, et al. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration[J]. Plant Cell Rep, 2001(20): 445-450.
- [32] 宋萍萍. 怀菊花种植资源玻璃化超低温保存技术研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2010.
- [33] Lshikawa K, Harata K, Mii M. Cryopreservation of zygotic embryo of a Japanese terrestrial orchid by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1997, 16: 754.
- [34] Sehnhel-Preikstas B, Earle E D, Steponkus L. Cryopreservation of potato shoot tip by vitrification[J]. Cryobiology, 1992, 29(6): 747.
- [35] Towill E, Jartet R T. Cryopreservation of sweet Potato shoot tips by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1992(11): 15-18.
- [36] Sant R, Taylor M, Tyagi A. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *lesculenta*) by vitrification[J]. Cryo-Letters, 2006, 27: 133-142.
- [37] 张江丽, 贾永红, 赵美英, 等. 玻璃化法超低温保存甘薯茎尖[J]. 江苏农业科学, 2008(1): 243-245.
- [38] 王贞, 高健洲, 刘燕, 等. 扶芳藤茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 303-304.
- [39] 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.
- [40] Langis R, Steponkus P L. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification[J]. Plant Physiol., 1990, 92: 666-671.
- [41] 刘亚军, 高丽萍, 夏涛, 等. 茶悬浮培养细胞玻璃化超低温保存研究[J]. 茶叶科学, 2009, 29(2): 120-126.
- [42] 张桂芳, 徐鸿, 华贺红, 等. 佛手茎尖玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1806-1810.
- [43] Hirai D, Sakai A. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 961-966.
- [44] 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.
- [45] 万学玲. 马铃薯茎尖的超低温保存技术研究[J]. 中国科技论文, 2006(1): 6.
- [46] Vandenbussche B, Weyens M, De Proft M. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 1064-1068.
- [47] Attila Fa bian, Katalin Jager. Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification[J]. Acta Physiol Plant, 2008, 30: 737-744.
- [48] 赵艳华, 吴雅琴. 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.
- [49] 陈伟安, 王晓东, 李春敏, 等. 水母雪莲愈伤组织超低温保存条件的初探[J]. 过程工程学报, 2002, 2(6): 539-543.
- [50] 张玉进, 张兴国, 庞杰, 等. 魔芋茎尖玻璃化冻存研究[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 97-102.
- [51] 刘云国, 王晓云. 苹果种质资源玻璃化法超低温保存技术[J]. 山东农业大学学报, 2002, 33(1): 32-36.
- [52] Ahuja S, Mandal Binay B, Dixit S, et al. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in dioscorea foribunda plants derived from cryopreserved shoot tips[J]. Plant Science, 2002, 163: 971-977.
- [53] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿和君迁子试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及再生植株遗传稳定性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2023-2027.
- [54] 李艳娜, 尉义明, 胡桂兵, 等. 香蕉胚性细胞悬浮系玻璃化法超低温保存及再生植株遗传稳定性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 899-905.
- [55] Wang Q C, Per A vihai. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification[J]. Methods in Molecular Biology, 2006, 318: 77-86.
- [56] Dai Hirai, Akira Sakai. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification[J]. Potato Research, 1999, 42: 153-160.
- [57] 李明军, 周娜, 刘杰, 等. 怀地黄玻璃化和包埋玻璃化法超低温保存[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 607-610.
- [58] 李海兵, 周娜, 赵娇, 等. 怀山药种质资源的包埋玻璃化超低温保存与植株再生[J]. 园艺学报, 2010, 45(3): 379-383.
- [59] Wang Q C, Mawassi M. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 77: 267-275.
- [60] Liu J F, Cheng Y Q. Cryopreservation of Shoot Tips of Rh. Sachalinensis by Encapsulation-vitrification[J]. Journal of Jilin Normal University (Natural Science Edition), 2009(3): 61-65.
- [61] Gamez-Pastrana R, Martinez-Ocampo Y. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification[J]. CryoLetters, 2004, 25(6): 405-414.
- [62] Wang Q, Laamanen J. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration[J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(5): 280-288.
- [63] Carlo A D, Benelli C. Development of a shoot tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) [J]. CryoLetters, 2000, 21: 215-222.
- [64] Mix-Wagner G, Conner A J. Survival and recovery of asparagus shoot-tips after cryopreservation using the 'Droplet' method [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2000, 28(4): 283-287.
- [65] Leunufna S, Keller E R J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 1159-1166.
- [66] Kim H H, Lee J K, Hwang H S. Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique [J]. CryoLetters, 2007(6): 471-482.
- [67] Sant R, Panis B. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 92: 107-111.
- [68] 李俊慧, 何平, 陈晓玲, 等. 香蕉离体茎尖超低温保存[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 171-176.
- [69] 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.