

低温保存技术在顽拗性种子种质保存中的利用

唐安军^{1,2}, 龙春林^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 由于顽拗性种子不耐脱水且对低温敏感, 常规保存方法难以达到长期保存的目的。因此, (超)低温保存顽拗性种子种质是最理想的方法。顽拗性种子的低温保存, 应用较多的是玻璃化法和两步法。诸多因素影响低温保存的成败, 如种子或胚的含水量水平、溶液低温保护剂效应、降温冰冻与解冻方式、水合过程以及后培养等, 这些需深入探索与解决。除顽拗性种子脱水耐性和低温敏感性机理外, 植物细胞的冻害和抗冻机理也亟需探明, 以便找到最佳冷冻方法, 制定长期保存种质基因的最佳方案。

关键词: 顽拗性种子; (超)低温保存; 玻璃化法; 两步法; 种子含水量; 脱水方式

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)05-0759-06

Cryopreservation of recalcitrant seed germplasm

TANG An-Jun^{1,2}, LONG Chun-Lin^{1*}

(1. *Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;*

2. Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Being sensitive to desiccation and low temperature, the recalcitrant seeds can not be stored with conventional methods. However, cryopreservation has been considered as the most effective means. As far as cryostorage of recalcitrant seeds is concerned, vitrification and two-step freezing have been applied in many studies. Unfortunately, there are some factors, including water content of seeds or embryonic axes, effects of cryoprotectants in solutions, cooling rate and thawing, rehydration and after-thawing culture that influence succeeding in cryopreservation. To produce normal plants after cryopreservation of recalcitrant seeds or embryonic axes, a carefully defined sequence of manipulations is needed to be solved. Besides the mechanisms of desiccation tolerance and sensitivity to low temperatures, the freezing and antifreezing mechanisms of plant cells are also ascertained imminently in order to dig out the most effective long-term storage method through seed-gene bank.

Key words: recalcitrant seed; cryopreservation; vitrification; two-step freezing; seed water content; drying method

基于种子贮藏行为的多样性, 种子生物学家将种子划分为正常性种子(orthodox seed)、顽拗性种子(recalcitrant seed)和中间性种子(intermediate seed)(Roberts, 1973; Ellis 等, 1990)。与正常性种子不同的是, 顽拗性种子不经历成熟脱水, 在整个发育过程和收获后均对脱水敏感; 种子脱离母体时含水量相对较高, 一般在 25% 以上。在能保存正常性种子的常规低温和低湿条件下, 顽拗性种子不能被

有效贮藏(Berjak, 2005)。即使在潮湿环境中, 其贮藏寿命仍很短(Roberts, 1973; King 等, 1979; Berjak 等, 1990; 傅家瑞, 1991; Berjak 等, 2001)。产生顽拗性种子的植物许多是热带和亚热带林木, 部分是温带植物, 其中一些有很高的经济价值, 如橡胶(*Hevea brasiliensis*)、芒果(*Mangifera indica*)、可可(*Theobroma cacao*)、木菠萝(*Artocarpus heterophyllus*)、荔枝(*Litchi chinensis*)、龙眼(*Euphoria*

收稿日期: 2006-07-10 修回日期: 2006-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(30170102); 国家科技部平台建设重点项目(2004DKA30430, 2005DKA21006)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170102); the Ministry of Science and Technology of China(2004DKA30430, 2005DKA21006)]

作者简介: 唐安军(1976-), 男, 湖南永州人, 博士研究生, 主要从事种子生理生态研究, E-mail: tanganjun@mail.kib.ac.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: long@mail.kib.ac.cn)

longan)和枇杷(*Eriobotrya japonica*)等种子(傅家瑞等,2004)。更甚的是,有些产生顽拗性种子的植物因过度收获而濒临灭绝,如 *Warburgia salutaris* (Berjak,2005)。因此,研究顽拗性种子贮藏机理和保存方法极为重要。

综观种子种质的保存实践,发现低温(尤其是超低温)保存以其极佳的保存效果在顽拗性种子的保存中倍受关注(唐安军等,2004;郑郁善等,2001;Normah等,1986;Chin,1988;Sam等,1999;Thammasiri,1999;Popov等,2006)。同时,这些成果也证明了低温生物学在生物多样性保护中的重要意义。在对国内外相关文献进行分析归纳的基础上,本文扼要地论述(超)低温保存的原理、两大主要方法及其在顽拗性种子保存中的应用和需要进一步解决的问题。

1 (超)低温保存的理论基础

低温保存(cryopreservation or cryostorage)是离体保存与低温生物学相结合的产物,一般是指在-80℃以下的温度中保存种质资源的一套生物学技术。超低温一般是指液氮(liquid nitrogen, LN₂)低温,即-196℃。在这种温度下,活细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止,最大限度地抑制了生理代谢强度。如果能有效地把植物细胞内液态水转变为固态或气态,那么细胞内的生命过程将发生变化但可逆,那么植物材料在此状态下处于“假死”状态。当恢复到正常状态时,细胞能保持正常的活性与特性。因此,从理论上讲,细胞、组织和器官在超低温保存过程中不会发生遗传性状的改变,也不会改变形态发生的潜能。

1.1 细胞结冰伤害理论

在降温过程中,如果生物机体细胞内的水发生结冰,就会造成细胞结构的损伤,导致死亡。因此,种质超低温保存成功的关键,是在降温过程中避免细胞内结冰。一般地,随着温度的降低,细胞外介质先于细胞内含物结冰,造成细胞内外的蒸汽压差,只要降温速率不超过脱水的连续性,细胞内的水就不断向外扩散,细胞原生质逐渐浓缩,从而降低细胞内含物的冰点。这种细胞内的自由水逐渐外逸的过程称为保护性脱水,能有效地遏制细胞内溶液结冰。但是,细胞的过度失水可能造成胞内有害物质的积累(如自由基),使得蛋白质和酶的结构发生破坏性改变,从而破坏膜的完整性(简令成,1988;Fujikawa

等,1986)。从细胞冰冻理论可知,在降温冰冻过程中,避免细胞内结冰是超低温保存技术中各种措施的核心问题。因此,对植物材料而言,在降温冰冻过程中需创造一个适宜的条件以避免冰冻伤害。研究表明,降温冰冻速度和冰冻保护剂对防止细胞内结冰尤为重要(Meryman,1971;Litvan,1972;Mycock等,1994;Fujikawa等,1986)。

1.2 溶液玻璃化理论

玻璃化就是将细胞或组织置于含有一定比例的渗透性和/或非渗透性保护物质的溶液中,使其在一定的降温过程中转变成玻璃态,并以此在低温下保存(Langis等,1989;Uragami等,1989)。溶液固化需晶核的存在。在降温过程中,如果溶液内没有形成均一化的晶核或晶核无足够的时间得以生长,首先便形成过冷溶液(低于冰点而不结冰的溶液)。如果继续降温,则形成均一化的晶核;若降温速度不够快,则形成不规则的冰晶;若降温速度足够快,则晶核难以形成,即使有少量的晶核形成,这些微小晶核也无足够的时间得以扩展,溶液就进入无定性的玻璃化态,即“玻璃化”(Thammasiri,2000;裴冬丽等,2005)。在玻璃化过程中,既不产生溶液效应(包括渗透效应和离子效应)而损伤细胞,也无冰晶对细胞的机械损伤。

当然,在快速解冻时,同样会出现“玻璃化”现象,而且使用高浓度大分子的冰冻保护剂及增强压力,可增加“玻璃化”的概率,防止细胞内次生结冰而造成低温伤害(Wesley-Smith等,2001),从而确保复苏细胞的活力。

2 (超)低温保存的主要方法

在植物种质保存的实践中,根据预处理和降、升温方式(冰冻过程)的不同,超低温保存常用的方法包括预冻法、干冻法、两步法、(包埋)玻璃化法和(包埋)脱水(干燥)法等方法。虽然有研究认为在低温保存苹果离体茎尖时,包埋干燥法优于玻璃化法和两步降温法(赵艳华等,2003),但在(顽拗性)种子保存的实践中,被推崇的方法是(包埋)玻璃化法和两步法。

2.1 玻璃化法(vitrification)

关于玻璃化法在植物组织保存中的成功运用的报道,最先出现在1989年(Langis等,1989;Uragami等,1989)。这一技术依赖于用玻璃化溶液对外植体的处理,处理时间因材料而异(从15 min到2

h)。随后,将处理过的材料直接插入液氮,致使细胞内和细胞间的玻璃化。这就是所谓的玻璃化——一步冰冻法。玻璃化溶液是一种浓度较高的渗透性与非渗透性细胞保护性物质组成的混合物。应用得最多的玻璃化溶液就是“PVS2”。PVS2 包含甘油(glycerol)(30%, 体积比,下同)、乙烯乙二醇(ethylene glycol, EG)(15%)、二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(15%)和蔗糖(sucrose)(0.4 M)(Sakai 等,1990)。然而,由于溶液和机械效应,除花粉、正常种子及其胚外,大多数含水组织不能被脱水到玻璃化所需的含水量(20%~30%)。这样,超低温保存成功的关键就从材料的冰冻耐性转至脱水耐性。简而言之,植物材料玻璃化冻存方法包括以下几个环节:装载(预处理,以降低组织含水量)→玻璃化溶液脱水→降温(冰冻,通常采用一步法快速投入液氮)→复温(解冻,一般在 40 °C 左右的水浴中快速化冻)→洗涤(除去样品中的保护剂)→再培养(选择某一培养基,对冻存材料进行培养)→存活率与遗传稳定性的鉴定(曾继吾等,2004; Channuntapipat 等,2000; Touchell 等,2002)。

当前,因其易操作、高度重演及对植物材料的普遍实用等特点,玻璃化法是使用最广泛的超低温保存方案(Langis 等,1990; Takagi 等,1997; Hirano 等,2005)。不过,由于 PVS2 以及改进的 PVS 系列溶液保护剂浓度较高,对材料有一定毒性,且毒性与保护剂的浓度以及浸泡时间直接相关(Matsumoto 等,1994; Nascimento,2005),因而需严格控制脱水过程和冰冻保护剂的渗透性(Matsumoto 等,1994,1995; Ramon 等,2002)。低温保护剂可分为渗透性和非渗透性两大类,前者如 DMSO 和乙二醇;后者如糖和 PEG(polyethylene glycol)。研究发现,保护剂混合使用比单独使用效果更好,其原因可能是彼此的协同效应(马锋旺等,1999; 臧新等,2002)。

较之玻璃化法,包埋玻璃化法(encapsulation-vitrification)是外植体包埋和玻璃化溶液脱水的结合,兼容了玻璃化法和包埋脱水法的优点,显示了巨大的应用潜力(Sakai,2000)。一般地,包埋玻璃化法有以下几个步骤:预培养→包埋→玻璃化溶液脱水→液氮冻存→解冻→恢复培养(Ramon 等,2002; 吴雪梅等,2005)。当然,对于某些植物材料而言,包埋玻璃化法不一定是最好的,这可能与植物材料的固有特性(如基因型)有关(Matsumoto 等,1998; Al Ababneh 等,2002)。因此,在具体的实验中,研究

者应分析比较不同的保存方法,以找到最佳的种质保存方案。

2.2 两步法

经预处理(脱水处理和添加冰冻保护剂)的材料,用可控速率的降温设备(程序降温仪),以一定的速率将样品进行分步降温(Assy-Bah 等,1992)。

一般地,使用程序降温仪以 0.1~10 °C/min 的速度先将材料降温至较低温度(-40~-70 °C),然后将材料投入液氮贮存(Stanwood 等,1981)。此外,也有将材料先放置在 -20~-50 °C 的条件下预冷一段时间(常用低温冰箱而非程序降温仪);然后再将其转移到液氮罐中贮藏。具体的预冷速度和时间依材料而异。

3 顽拗性种子的(超)低温保存

Roberts 等(1984)认为长期贮藏脱水敏感性种子最有希望的方法是液氮法。适当低含水量的种子能在 -196 °C 下不受伤害(Stanwood 等,1978)。可是,顽拗性种子含水量较高,降低其含水量到一定水平时才有可能在低温下存活。在实际保存中,常常低温保存离体胚或胚轴,因为离体胚或胚轴体积较小,易于在短期内脱水,而且胚自身具有较强的抗逆能力。Stanwood(1983)提出能耐液氮超低温的最高含水量限度(HMCL)在 9.6%~28.5%之间。如果含水量低于 HMCL,就不会在超低温条件下形成冰晶。不过,银白槭(*Acer saccharinum*)、红毛丹(*Nephelium lappaceum*)、榴莲(*Durio zibethinus*)和木菠萝(*Artocarpus heterophyllus*)的最高冻结含水量为 30%~33%(Becwar 等,1983; Hor 等,1990)。由此可见,超低温保存顽拗性种子及其胚(轴)的首要问题就是选择何种方式将其脱水到最高冻结含水量(highest freezing moisture limit, HFML)。

已有研究结果表明,利用超低温保存技术可以成功地保存某些顽拗性种子或其离体胚或胚轴。Chandel 等(1995)利用硅胶脱水和直接插入液氮中冻存(快速降温)的方法,研究了茶(*Camellia sinensis*)、可可和木菠萝 3 种植物的顽拗性种子的脱水和冰冻敏感性。结果表明,成熟的茶、可可和木菠萝的种子分别能于 24%、35%和 31%的含水量存活;但在这些水平条件下,3 物种的种子均不能忍受液氮低温作用。不过,含水量 14%的茶和木菠萝的离

体胚轴能经受液氮低温,可离体胚轴更是如此。Pritchard等(1995a)研究了南洋杉(*Araucaria hunsteinei*)的种子及其胚的含水量对低温反应的效应。在研究过程中,他们利用不同的脱水方式将种子脱水到目的含水量,而后分步降温(先于液氮上冷却到-40℃或更低,冷却速率为2~40℃/min,而后于液氮中保存)。在降温过程中,他们用热量差示仪(differential scanning calorimetry, DSC)测量了组织的含水量以检测不同含水量对液氮冻存的效应。结果表明,含水量对冻存效果的影响显著。Wesley-Smith等(2001)以顽拗性的七叶树(*Aesculus hippocastanum*)种子的胚为材料,将其快速脱水到不同的含水量,而后冷冻。在冷冻过程中,先预冷,而后转移到液氮中保存,直到活力检测。结果表明,快速冷冻能提高脱水敏感性胚轴的低温保存的可行性。此外,Sun(1999)比较了红栎(*Quercus rubra*)种子的胚和子叶组织在慢速和快速冷冻条件的状态变化。他发现在快速冷冻条件下(>100℃/min,液氮),当含水量(占干重)>0.5 g/g时,可以避免冰冻诱发的脱水伤害。

在顽拗性种子的保存中,玻璃化法的比较研究,也有成功的例子。Hirano等(2005)研究了白芨(*Bletilla striata*)不成熟种子的玻璃化保存。在研究中,他们运用了3种低温保存方案:①不经预处理的低温保存,即将种子置于冻存管中,而后把冻存管直接插入液氮中,30 min后取出于38℃条件下快速解冻、洗涤和再培养;②通过玻璃化低温冻存,即先用玻璃化液PVS2于25℃处理种子15 min,而后投入液氮中冻存。30 min后,取出种子进行解冻、洗涤和再培养。③预培养后,再玻璃化低温保存,即先将未成熟的种子在培养基上预培养3 d,而后重复②的操作。经检测存活率和萌发率后发现,低温保存的白芨种子的活力与对照的无明显差异。这表明三种保存方案是比较成功的。值得指出的是,在类似的实验中,不应忽视溶液的化学保护作用与保护剂的毒性,而且其他妨碍低温存活的因素(如冻存时间、解冻方式)也需深层次的探究。

4 影响顽拗性种子(超)低温保存的主要因素

影响顽拗性种子或胚(轴)(超)低温保存成功的因素有多种,主要有材料类型、发育时期、脱水方法、

含水量、冰冻保护剂种类、降温方式、解冻方式、水合过程和恢复培养基的种类及其成分比例。

首先,材料类型及其发育状态。不同的顽拗性种子或胚,因其不同的基因型、抗冻性以及生理状态,即使同基因型的种子因取材的时间差异而表现出不同的低温反应(Pence, 1991; Hirano等, 2005)。据现有的报道,除可可和白芨选用幼胚或未成熟的种子外,大多数顽拗性种子超低温均选用生理成熟的胚(或胚轴)(Farrant等, 1986; 傅家瑞等, 2004)。

其次,脱水方式对种子或胚的活力影响较大。顽拗性种子或胚具有较高的含水量,在低温保存前,须将其干燥到冰冻安全含水量。因此,干燥方式的选择至关重要。干燥速率是决定种子脱水耐性的重要因子。例如,在研究茶种子脱水方式的影响时,Berjak等(1993)发现,迅速干燥时,胚轴生活力明显丧失之前的含水量(占干重)大约是0.4 g/g;缓慢干燥时,在含水量(占干重)为1.0 g/g时发生相同的生活力丧失;干燥速率越慢,随着进一步脱水伤害越严重。类似地,Pammenter等(1998)比较了快速(硅胶脱水,<24 h)和慢速(风干,>10 d)两种脱水方式对*Ekebergia capensis*种子活力的影响,发现慢速脱水的伤害程度大得多。此外,黄皮(*Clausema lansium*)胚轴(伍贤进等, 2001)和黑栎(*Quercus nigra*)种子(Bonner, 1996)的脱水反应同样说明了脱水速率对生活力有显著的影响。

第三,种子或胚的含水量水平。对植物材料而言,含水量是影响其超低温保存成败的关键因素之一。许多植物的种子或胚都有一个最高冻结含水量或冰点临界含水量和一个最低安全含水量(lowest safe moisture content, LSMC),如果种子的最低安全含水量低于最高冻结含水量,超低温保存比较容易成功(Stanwood, 1983, 1985; Pritchard, 1994, 1995b)。类似地,郑郁善等(2002)在超低温保存板栗种子时发现,超低温保存后种子发芽率受含水量的影响较大。因此,在进行顽拗性种子的(超)低温保存过程中,研究者应探求出保存的最佳含水量水平。

第四,冰冻保护剂种类。诸多研究表明,冰冻保护剂的使用能减少超低温保存造成的伤害(Meryman, 1971; Langis等, 1989; Sakai等, 1990)。好的防冻剂组合能够有效地降低材料的冰点,缓和超低温保存的冷冻伤害,使其最佳含水量范围得以扩大。

第五,降温与解冻方式。降温和解冻方式直接影响到材料低温保存的成败。对于顽拗性种子及其

胚而言,快速降温和快速解冻是比较理想的,因为这样可以因材料的玻璃化而减少冰晶造成的伤害(Fu 等,1993;Sun,1999;Walters 等,2004)。

第六,水合过程。解冻后的水合(化)严重影响幼苗的建成。这主要与水合介质有关,不同的水合介质将对幼苗根伸长造成极性差异,或垂直或水平,从而形成正常植株或畸形苗(Wesley-Smith 等,2000;Berjak 等,2004)。

最后,材料的再培养也是极其重要的。适宜的培养基能促进材料的生长,再现材料的活力和形态发生潜力(Pence,1992)。当然,也有用其他方法检测低温保存后的活力的(劣变程度),如 TTC、电导率测定、细胞超微结构检测、酶活性检测等方法(郑郁善等,2002;Fujikawa 等,1986;Gonzalez-Benito 等,1995)。

尽管个别低温保存的种子被研究得较详细,但总体上仍然很有限。因此,还需大力研究不同材料因低温保存造成的形态学的、细胞学的或遗传变化。

5 前景及今后工作

长期而有效的保存种子是解决植物遗传基础越发狭窄与品种退化的重要途径之一;同时,也是拯救珍稀和濒危植物物种的有效措施。不同种子的保存方法和技术是以其贮藏生理为基础的。因此,研究种子的贮藏机理和相应的保存技术,具有理论和实践意义。低温保存植物遗传资源具有广阔的前景,可长期保持种质遗传性的稳定及其形态发生能力、保存珍稀濒危物种的种质资源,设备简单、经济。随着低温保存程序(材料的玻璃化和液氮直接冻存)的简单化,低温保存植物材料便成了理想的选择。尽管玻璃化法比较成功,但许多工作仍处于科学研究的框架内而未能普遍应用,两个重要参数即脱水方式和玻璃化溶液处理外植体有待优化。因此,研究工作仍要尽可能地简化和标准化低温保存的玻璃化技术,以便该技术能被更广泛地运用。

此外,(超)低温保存过程中的降温冰冻与解冻、恢复培养是一个错综复杂的过程,其中任何一个环节的疏忽,都可能造成致死性伤害。所以,对于该过程中的每一阶段的细节及其最佳条件,都应深入的研究。在顽拗性种子的低温保存实践中,研究者要特别重视基础问题的研究,探明不同顽拗性种子的生理生化特性,阐明其细胞冻害和抗冻机理。

参考文献:

- 傅家瑞,宋松泉. 2004. 顽拗性种子生物学[M]. 北京: 中国科学文化出版社: 66—77
- Al Ababneh S, Karam NS, Shibi RA. 2002. Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium*) shoot tips[J]. *In vitro Cell Develop Bio-Plant*, **38**: 602—607
- Assy-Bah B, Engelmann F. 1992. Cryopreservation of mature embryos of cacao nut and subsequent regeneration of plantlets[J]. *Cryoletters*, **13**: 117—126
- Becwar MR, Stanwood PC, Leonhardt KW. 1983. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds[J]. *J Am Soc Hort Sci*, **108**: 613—618
- Berjak P. 2005. Protector of the seeds: seminal reflections from southern Africa[J]. *Science*, **307**: 47—49
- Brjak P, Mycock D. 2004. Calcium, with magnesium, is essential for normal seedling development from partially dehydrated recalcitrant axes; a study on *Trichilia dregeana* Sond[J]. *Seed Sci Res*, **14**: 217—231
- Berjak P, Vertucci CW, Pammenter NW. 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*[J]. *Seed Sci Res*, **3**: 155—166
- Bonner FT. 1996. Responses to drying of recalcitrant seeds of *Quercus nigra*[J]. *Ann Bot*, **78**: 181—187
- Chandel KPS, Chaudhury R, Radhamani J, et al. 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit[J]. *Ann Bot*, **76**: 443—450
- Channuntapipat C, Collins G, Bertozzi T, et al. 2000. Cryopreservation of *in vitro* almond shoot tips by vitrification[J]. *J Hort Sci Biotech*, **75** (2): 228—232
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. 1990. An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee[J]. *J Exp Bot*, **41**: 1167—1174
- Fu JR, Xia QH, Tang F. 1993. Effects of desiccation on excised embryonic axes of three recalcitrant seeds and studies on cryopreservation[J]. *Seed Sci Tech*, **21**: 85—95
- Fujikawa S, Miurab K. 1986. Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation of extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit-bodies of basidiomycetes (*Lycophyllum ulmarium* (Fr.) Kühner)[J]. *Cryobiology*, **23** (4): 371—382
- Gonzalez-Benito ME, Iriondo JM, Pita JM, et al. 1995. Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*[J]. *Ann Bot*, **75**: 1—4
- Hor YL, Stanwood PC, Chin HF. 1990. Effects of dehydration on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of three recalcitrant seeds[J]. *Pertanika*, **13**: 309—314
- Hirano T, Goto T, Mii M, et al. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, **23**: 534—539
- Jian LC(简令成). 1988. Cryobiology and long-term storage of plant germplasm(低温生物学与植物种质的长期保存)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **5** (2): 65—68
- Langis R, Schnabel Preikstas BJ, Earle ED. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification[J]. *Cryo-Letters*, **10**: 421—428
- Langis R, Schnabel Preikstas BJ, Earle FD, et al. 1990. Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification[J]. *Cryobiology*, **27**:

- 657—658
- Litvan GG. 1972. Mechanism of cryoinjury in biological systems[J]. *Cryobiology*, **9** (3):182—191
- Ma FW (马锋旺), Zhang JK (张军科), Li JR (李嘉瑞). 1999. Cryopreservation of apricot cellsuspension cultures (杏细胞悬浮培养物超低温保存有关因素的研究) [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), **7** (1):10—16
- Matsumoto T, Sakai A, Yamada K. 1994. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration[J]. *Plant Cell Reports*, **13**:442—446
- Matsumoto T, Sakai A, Yamada K. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of lily by vitrification[J]. *The Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **41**:237—241
- Matsumoto T, Takahashi C, Sakai A, et al. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid static by three different procedures [J]. *Sci Hort*, **76**:105—114
- Meryman HT. 1971. Cryoprotective agents[J]. *Cryobiology*, **8** (2):173—183
- Normah LN, Chin HF, Hor YL. 1986. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* [J]. *Muell-Arg Per-tanika*, **9**:299—303
- Pence VC. 1991. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species[J]. *Seed Sci Technol*, **19**:235—251
- Pence VC. 1992. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation[J]. *Cryobiology*, **29**:391—399
- Popov AS, Popova EV, Nikishina TV, et al. 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences[J]. *Inter J Refrigeration*, **29**:403—410
- Pritchard HW, Tompsett PB, Manger K, et al. 1995a. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos [J]. *Ann Bot*, **76**:79—88
- Pritchard HW. 1995b. Cryopreservation of seeds[M]// Day JG and McHellan eds. *Methods in Molecular Biology*, 38: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Humana Press Inc., Totowa NJ, 133—144
- Pei DL (裴冬丽), Hu JC (胡金朝), Wang ZC (王子成). 2005. Cryopreservation of plant genetic resources (植物遗传资源的超低温保存) [J]. *Chin Bull Bio* (生物学通报), **40** (3):19—20
- Ramon M, Genus J, Swennen R, et al. 2002. Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation[J]. *Cryoletters*, **23**:345—352
- Roberts HE. 1973. Predicting the storage life of seeds [J]. *Seed Sci Technol*, **1**:499—514
- Sakai A. 2000. Development of cryopreservation techniques[M]// Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm (Engelmann F and Takagi H, eds.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1—7
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, **9**:30—33
- Stanwood PC, Bass LN. 1978. Ultracold preservation of seed germplasm[M]// Li PH, Sakai A (eds). *Plant Hardiness and Freezing Stress. Mechanisms and Crop Implications*. New York: Academic Press, 361—372
- Stanwood PC, Bass LN. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen[J]. *Seed Sci. Technol.*, **9**:423—437
- Stanwood PC. 1983. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation[M]// Kartha KK (ed). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. Florida: CRC Press, 200—226
- Stanwood PC. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation[M]// Kartha KK (ed). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Boca Raton, FL, 199—226
- Sun WQ. 1999. State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: relevance to the dedication sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds[J]. *Cryobiology*, **38**:372—385
- Takagi H, Thinh NT, Islam OM, et al. 1997. 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 Reports*, **16**:594—599
- Tang AJ (唐安军), Long CL (龙春林), Dao ZL (刀志灵). 2004. Molecular mechanisms and storage technologies of recalcitrant seeds (种子顽拗性的形成机理及其保存技术) [J]. *Acta Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **24** (11):2170—2176
- Thammasiri K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification[J]. *Cryo-Letters*, **21**:237—244
- Touchell DH, Chiang VL, Tsai CJ. 2002. Cryopreservation of embryonic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, **21**:118—124
- Uragami A, Sakai A, Nagai M, et al. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. Cryopreservation by vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, **8**:418—421
- Walters C, Wheeler L, Stanwood PC. 2004. Longevity of cryogenically stored seeds[J]. *Cryobiology*, **48**:229—244
- Wesley-Smith J, Berjak P, Pammenter NW, et al. 1995. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryonic axes of *Pisum sativum* L. at various water contents [J]. *Ann Bot*, **76**:59—64
- Wu XJ (伍贤进), Song SQ (宋松泉), Qian XM (钱雪梅), et al. 2001. Effects of drying at different rates on desiccation sensitivity and membrane lipid peroxidation in Chinese wampee (*Clausena lansium*) axes (脱水速率对黄皮胚轴脱水敏感性及其膜脂过氧化的影响) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **10**:177—182
- Wu XM (吴雪梅), Tang HR (汤浩茹). 2005. Research advances in cryopreservation of plant germplasm by encapsulation-vitrification method (包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展) [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **22** (2):238—245
- Zang X (藏新), Mei XG (梅兴国), Gong W (龚伟), et al. 2002. Cryopreservation of *Taxus chinensis* cell suspension cultures (中国红豆杉悬浮培养细胞的超低温保存) [J]. *Biotechnology* (生物技术), **12** (2):13—14
- Zeng JW (曾继吾), Yi GJ (易干军), Zhang QM (张秋明). 2004. Cryopreservation of in vitro papaya shoot-tips by vitrification technique and its regeneration (番木瓜茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生) [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), **31** (1):29—33
- Zhao YH (赵艳华), Zhou XM (周锡明), Wu YJ (吴永杰). 2003. Comparison of four methods for apple shoot tips in vitro freezing (苹果离体茎尖超低温保存方法的比较) [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), **30** (6):719—721
- Zheng YS (郑郁善), Chen LG (陈礼光), Li QR (李庆荣), et al. 2002. Study of cryopreservation on *Castanea mollissima* seeds [J] (板栗种子超低温保存研究). *Sci Silv Sin* (林业科学), **38** (6):146—149