



卵叶泥炭藓茎尖包埋玻璃化法超低温保存研究

许丹尔¹, 高雪笛¹, 李秋萍², 戚钰³, 韦玉梅⁴, 卢春红¹, 王健^{1*}, 朱瑞良¹

(1 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241; 2 中国科学院 上海生命科学学院植物生理生态研究所, 上海 200032; 3 四川大学 生命科学学院, 成都 610000; 4 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所 广西喀斯特山区植物保护及生态恢复重点实验室, 广西桂林 541006)

摘要: 该研究通过对脱水时间和化冻温度的探索, 检验了包埋玻璃化法在超低温保存湿润生境中苔藓的可能性。结果表明: 卵叶泥炭藓无菌苗在 4 ℃ 条件下预培养 3 d 后, 在 0 ℃ 用 60% PVS₂ 装载 30 min, PVS₂ 脱水 60 min 后迅速投入液氮保存, 24 h 后用 40 ℃ 水浴快速化冻 2 min 再培养, 成活率可达 42.41%, 且再生植株与常温状态下的植株形态指标没有显著性差异。研究认为, 包埋玻璃化法超低温保存湿润环境中生长的苔藓植物是可行的。

关键词: 苔藓植物; 卵叶泥炭藓; 包埋玻璃化法; 超低温保存

中图分类号: Q94-331

文献标志码: A

Cryopreservation of Shoot Tips of *Sphagnum ovatum* Hamp. by Encapsulation-vitrification

XU Daner¹, GAO Xuedi¹, LI Qiuping², QI Yu³, WEI Yumei⁴,
LU Chunhong¹, WANG Jian^{1*}, ZHU Ruiliang¹

(1 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2 Institute of Plant Physiology & Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3 School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610000, China; 4 Guangxi Key Laboratory of Plant Conservation and Restoration Ecology in Karst Terrain, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Science, Guilin, Guangxi 541006, China)

Abstract: Dehydration time and thawing temperature were explored to test the possibility of encapsulation-vitrification in the cryopreservation of bryophytes collected from moist habitats. The results showed that the regeneration rate of *S. ovatum* can reach 42.41% when the materials were pre-cultured at 4 ℃ for 3 days, loaded with 60% PVS₂ for 30 minutes and dehydrated with PVS₂ for 60 minutes at 0 ℃, then stored in liquid nitrogen for 24 hours and thawed at 40 ℃ for 2 minutes. There are no significant differences of morphological indicators between the plants before and after cryopreserved. The results demonstrated the feasibility of cryopreservation of bryophytes in humid environment by encapsulation-vitrification.

Key words: bryophyte; *Sphagnum ovatum*; encapsulation-vitrification; cryopreservation

随着全球气候的变化及人类不合理的开发利用, 生物多样性正以前所未有的速度丧失; 而全球性

收稿日期: 2017-11-07; 修改稿收到日期: 2018-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(31770371); 华东师范大学本科生创业训练培育项目(2017PY-409); 上海市大学生创新活动项目(201510269105)

作者简介: 许丹尔(1995—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事苔藓植物种质资源保存研究。E-mail: 51171300010@stu.ecnu.edu.cn

* 通信作者: 王健, 副研究员, 主要从事苔藓植物分类及种质资源保存研究。E-mail: jwang@bio.ecnu.edu.cn

生物多样性破坏和生态环境恶化正逐渐瓦解地球上的生命支持系统,威胁到生态系统的稳定及人类的生存和发展^[1]。因而,生物多样性和生物种质资源保护迫在眉睫。

生物多样性保护措施主要包括就地保护和迁地保护两种。当生物生存的野外环境遭受严重破坏,很难通过建立自然保护区和国家公园等就地保护措施实现保护的情况下,迁地保护将是一种更好的选择。在迁地保护中,种质资源库因其性价比高,早就被西方国家所重视,例如美国早在 1946 年就建立了国家植物种质系统,英国的“千年种子库”自 1997 年启动以来,已实现了保存全部的英国植物物种和全球 10% 的植物物种的目标。近年来,超低温保存技术在植物种质资源保存研究方面应用广泛。超低温一般是指液氮温度(−196 ℃),活细胞内的物质代谢和生长活动在这种温度下几乎完全停止,不会引起遗传性状的改变,也不会改变形态发生的潜能^[2]。

苔藓植物是一类以孢子作为有性生殖产物和长距离传播方式的原始高等植物,全世界估计有 21 000 余种,是高等植物中仅次于种类最多的被子植物的类群之一,是生物多样性的的重要组成部分。作为自然界的拓荒者,苔藓植物具备强大的吸水能力,在防止水土流失及维持生态系统平衡方面发挥着非常重要的作用。最新的研究还表明,苔藓植物是地球上首个稳定的氧气来源,使得智能生物及人类得以蓬勃发展,可以说没有苔藓植物就不会有我们人类^[3]。由于生态环境恶化已成为当今世界各国共同面临的一个严峻问题,苔藓植物保护因其在生态系统及人类生存和发展中的重要作用日渐受到各国重视,英国及北欧国家率先开展对苔藓植物多样性的保护研究。

泥炭藓属植物(*Sphagnum*)因其高效的孢子传播方式,在全世界各地均有分布,约覆盖地球陆地表面的 1%;全世界共 380 余种,中国目前有 47 种,主要生长在高山沼泽、湿润的林下或水沟边^[4-5]。泥炭藓是世界上吸水能力最强的植物之一,其吸水量可达干重的 10~25 倍。因为其惊人的吸水能力及天生具备的抗菌能力,泥炭藓已成为最具经济开发价值的苔藓植物,在药用、园艺、燃料等方面已经得到广泛应用,导致商业采收泥炭藓日趋严重。由于泥炭藓生长缓慢,一旦破坏就很难再恢复。因此,为了保护泥炭藓,在开展对其人工种植的基础上还应开展对其迁地保护,尤其是超低温保存方面的研究。

包埋脱水法和玻璃化法是植物种质资源保存中

常用的两种方法。在苔藓植物超低温保存研究方面,国际上主要采用包埋脱水法对其配子体及原丝体进行保存^[6-8]。干燥和低温预处理是苔藓植物配子体超低温保存成功的关键,因而超低温保存效果与其植物体在自然环境中对干燥和低温的忍受能力紧密相关。干燥生境中的苔藓植物不用干燥处理就可以成功实现超低温保存,但生长在湿润环境中的苔藓植物极易受干燥处理的影响,超低温保存后的成活率非常低^[9-10]。因此,如何保存这些生长于湿润环境中的苔藓是超低温保存中的一个难题。近年来报道的包埋玻璃化法弥补了包埋脱水法和玻璃化法的不足之处,既缩短了脱水时间又减轻了保护剂对细胞的毒害作用,且保存后的材料成活率高^[11],已经在一系列植物的超低温保存方面有了成功的先例^[12-13]。能否利用这种方法保存湿润生境中的苔藓植物? 本研究通过对脱水时间和化冻温度等条件的摸索,采用包埋玻璃化法对卵叶泥炭藓(*S. ovatum* Hamp.)进行超低温保存研究,以检验这一方法对于湿润生境下生长的苔藓植物的保存效果,为特殊生境下苔藓植物的超低温保存提供理论依据和实践基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

卵叶泥炭藓的配子体于 2012 年采自四川省阿坝藏族羌族自治州黑水县白塔至娜姆湖途中栈道旁,土生,32°15.069'N,102°46.123'E,海拔 3 579 m。凭证标本存于华东师范大学生物博物馆(HSNU)。

1.2 实验方法

1.2.1 组织培养获得无菌试管苗 新鲜的材料连同基质置于培养皿中带回,外包保鲜袋后置于人工智能气候箱(温度 15 ℃,光照周期 12 h 明暗交替)保存,直到孢子体完全成熟后,选取饱满有光泽的孢蒴用于实验。参照李秋萍等的孢蒴消毒方法^[14],将消毒后的孢子进行组织培养获得卵叶泥炭藓的无菌配子体。

1.2.2 低温锻炼 参照李明军等^[15],将继代培养 70 d 左右的无菌配子体于 4 ℃低温下炼苗 7 d。

1.2.3 预培养 参照李海兵等^[16],在无菌条件下,切取无菌配子体茎尖 1~1.5 cm,放入预培养基(Knop+0.1 mol/L 蔗糖+0.1 mol/L 甘油)中,低温下预培养 3 d。

1.2.4 包埋 参照李明军等^[12],在无菌条件下,用解剖刀切取 2 mm 大小的茎尖,室温下与含 3%

(w/v)海藻酸钠和 0.2 mol/L 蔗糖的无钙离子改良 Knop 培养基混合,将混合液滴入含有 0.1 mol/L CaCl_2 和 0.2 mol/L 蔗糖的 Knop 培养液中进行包埋,并不时轻轻摇动混合液。包埋过程结束后,固定 30 min,使包埋珠变硬,即获得球形包埋珠。每个包埋珠含 1 个材料。从 CaCl_2 中取出包埋珠,用无菌水清洗 2~3 次,再用无菌滤纸吸去多余的水分。

1.2.5 装载 参照洪森荣等^[17]的方法,将包埋珠分别放入 Knop+60% PVS_2 装载液中(60% PVS_2 配比为:180 g/L 甘油+90 g/L 乙二醇+90 g/L 二甲基亚砷+0.2 mol/L 蔗糖)于 0℃下装载 30 min。

1.2.6 脱水 参照李明军等^[12],用冰冻保护剂 PVS_2 (300 g/L 甘油+150 g/L 二甲基亚砷+150 g/L 乙二醇+0.4 mol/L 蔗糖)在 0℃下分别脱水 0、30、60 min。

通过以上的处理可使细胞内自由水含量减少,降低了细胞内结冰造成的机械损伤。

1.2.7 液氮保存 参照洪森荣和李明军^[18]的方法,将 10 个处理过的包埋珠放入一个冻存管中,滴加新的冰冻保护剂 PVS_2 ,用纱布包好冻存管后迅速置于液氮中保存 24 h。

1.2.8 化冻洗涤 参照李海兵等^[16]的方法,从液氮中取出冻存管,分别放入温度为 4℃(CK)、40℃、42℃中化冻,化冻时间为 2 min。解冻后用含 0.4 mol/L 蔗糖的洗涤液洗涤包埋珠 2 次,每次洗涤 10 min。然后再用无菌水清洗 2~3 次,用无菌滤纸吸干水分,再接种到培养基上。

1.2.9 恢复培养及成活率检测 将包埋珠转入再生固体培养基 Knop 中,先暗培养 7 d,再转到光下培养,培养温度为(25±2)℃,光照时间为 16 h/d;记录再生率及恢复生长的时间,并在 70 d 时比较超低温保存的再生苗与常温保存试管苗的形态指标。

再生率=包埋玻璃化超低温保存后突破包埋珠的茎段数/保存的总茎段数×100%

1.2.10 数据处理及分析 实验每次处理 20 个茎尖,重复 3 次,将未经液氮处理的材料设为对照。采用 SPSS19.0 程序对实验结果进行统计分析,均值的多重比较采用邓肯氏(Duncan)新复极差检验和 LSD 法检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 脱水时间和化冻温度对超低温保存的影响

2.1.1 脱水时间对卵叶泥炭藓茎尖包埋玻璃化超低温保存的影响 在包埋玻璃化保存过程中,利用

玻璃化保护液即 PVS_2 对植物材料进行最佳的脱水处理是获得高存活率的关键。经 PVS_2 处理的组织会脱去水分,这样在冻存中可进入玻璃化状态,并使冷冻保护液渗入细胞而减轻在超低温保存过程中细胞所受的伤害,从而有效地保护细胞活性。经不同脱水时间后的材料投入液氮保存 1 d,40℃水浴快速化冻,然后再转至再生培养基上,70 d 后统计成活率,结果见表 1。由表 1 可知,在 0℃下, PVS_2 脱水时间不同,超低温保存的效果也不一样;脱水 60 min 的最高成活率高于脱水 30 min 的,且前者是后者的 2.12 倍,而不经脱水处理的包埋珠其成活率为 0。说明脱水时间对超低温保存效果具有显著的影响。

2.1.2 化冻温度对卵叶泥炭藓茎尖包埋玻璃化超低温保存的影响 由表 2 可以看出,化冻温度对包埋玻璃化超低温保存的效果也有影响。在以 PVS_2 为玻璃化保护剂的条件下,经脱水 60 min,化冻温度为 40℃时,卵叶泥炭藓茎尖的成活率达到最大值;当化冻温度继续升高到 42℃时,茎尖的成活率开始下降。本研究还发现,虽然 40℃水浴快速化冻比 42℃水浴快速化冻成活率要高,但是植物长势及大小却不如 42℃水浴快速化冻的。

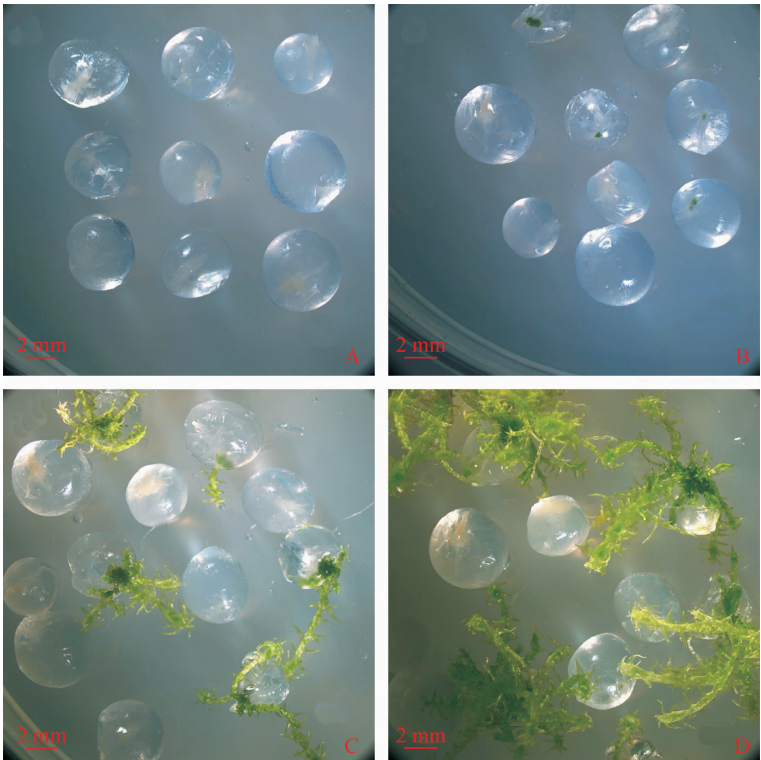
表 1 不同脱水时间处理条件下卵叶泥炭藓茎尖超低温保存后再生成活率比较

Table 1 The comparison of regeneration rate of shoot tips of <i>Sphagnum ovatum</i> after cryopreservation under different dehydration time points	
脱水时间 Dehydration time/min	成活率 Regeneration rate/%
0(CK)	0±0c
30	20.00±2.45b
60	42.41±6.97a

注:不同小写字母表示差异显著($\alpha=0.05$)。下同
Note: The different normal letters stand for significant difference at 0.05 level. The same as below

表 2 不同化冻温度处理条件下卵叶泥炭藓茎尖超低温保存后再生成活率比较

Table 2 The comparison of regeneration rate of shoot tips of <i>S. ovatum</i> after cryopreservation under different thawing temperatures	
化冻温度 Thawing temperature/℃	成活率 Regeneration rate/%
4(CK)	9.09±1.16c
40	42.41±6.97a
42	30.77±2.54b



A. 接种后 7 d 的茎尖;B. 接种后 14 d 的茎尖;C. 接种后 70 d 分化成的植株;D. 接种后 70 d 分化成的植株(对照,常温保存)

图 1 卵叶泥炭藓茎尖包埋玻璃化超低温保存后植株的再生

A. Shoot tips after culturing 7 d; B. Shoot tips after culturing 14 d; C. Shoot tips after culturing 70 d;
D. Shoot tips after culturing 70 d (CK, stored at room temperature)

Fig. 1 Regeneration of shoot tips of *S. ovatum* after cryopreservation

表 3 超低温保存与常温保存的再生植株的形态指标比较

Table 3 The comparison of morphological indicators of regeneration materials stored at room temperature and cryopreservation

形态指标 Morphological indicator	常温保存植株 Plant preserved at room temperature	超低温保存后再生植株 Regenerated plant after cryopreservation
平均株高 Average height/cm	1. 21±0. 78a	1. 15±0. 65a
平均叶片数 Average leaf number	194. 33±14. 01a	190. 67±12. 58a
平均芽数 Average bud number	9. 33±3. 06a	8. 67±2. 08a

2.2 超低温保存与常温保存的再生植株形态指标的比较

将超低温保存与常温保存(25 ℃)的卵叶泥炭藓茎尖包埋珠同时接种于 Knop 固体培养基(1%蔗糖+1%琼脂)上培养,超低温保存后的包埋茎尖先失绿再逐渐长出绿色(约 14 d 后逐渐出现绿色),20 d 开始突破包埋珠,25 d 长出新叶(图 1);而常温保存的茎尖大部分(约 92.7%)一直保持绿色,17 d 开始突破包埋珠,20 d 长出新叶。70 d 时测定再生植株的形态指标,结果见表 3。从表 3 可以看出,超低温再生植株与常温保存植株的形态指标基本一

致;经 Duncan 法检验,其株高、叶片数和芽数均未达显著水平。虽然液氮保存后的卵叶泥炭藓茎尖成活率(42.41%)低于对照(68.06%),但并未完全丧失,说明应用包埋玻璃化法保存该种藓类是可行的。

3 讨论

包埋玻璃化法超低温保存过程中脱水时间非常关键。脱水时间过短则不能有效地降低冰点,易产生冰晶对化冻后的细胞造成伤害,但处理时间过长,则又有可能由于 PVS₂ 本身具有较强的毒性而使植物组织受毒害而死亡^[19]。不同材料所用 PVS₂ 处

理时间长短也有所不同,木薯茎尖的最适脱水时间为 4 h^[20],青岛百合茎尖在脱水 60 min 获得最高的成活率^[13]。本研究中,脱水时间对保存效果的影响较明显,且随着脱水时间的延长,卵叶泥炭藓的再生率逐渐升高。在进行包埋玻璃化超低温保存时,除了要筛选出合适的脱水时间,还必须要筛选出符合实验材料特性的化冻方式。化冻方式是超低温保存技术的关键,从液氮中取出的样品,缓慢升温时细胞内会再次结冰,其温度危险区域大概在-50~10℃。因此,在化冻时须迅速通过此温度区域,避免细胞再次结冰而造成伤害。对于不同的材料,化冻方式也不同,一般以 35~40℃水浴快速化冻的效果较好^[21],如长春花胚性悬浮细胞超低温保存后在 37℃化冻 1.5 min 效果最好^[22],塞尔维亚云杉胚性组织在 42℃化冻 2 min 成活率达到最高^[23],瓠柑愈伤组织在 40℃水浴化冻的存活率最高^[24],怀山药在 40℃水浴快速化冻 1~3 min 成活率最高^[16]。但有些木本植物的冬芽超低温保存后必须在 0℃低温下化冻才能达到最好的效果^[25]。可见,不同的保

存材料要求的化冻温度也不同。本研究结果表明,40℃水浴快速化冻是卵叶泥炭藓的最佳化冻方式。

由于本研究的主要目的在于探索包埋玻璃化法是否适用于保存湿润生境中的苔藓植物,对脱水时间和化冻温度只进行了单因素分析,同时,对于脱水与保护剂二者对保存效果的相互影响未进行探究,进一步延长脱水时间是否会导致植物组织受到保护剂的毒害将在接下来的研究中继续开展。

包埋玻璃化法超低温保存技术克服了玻璃化法和包埋脱水法两种方法的缺点,研究证明是一种极有前途的种质保存技术^[11]。本研究仅通过对卵叶泥炭藓包埋玻璃化超低温保存过程中脱水时间和化冻温度进行单因素的初步分析,就获得了 42.41%再生率。尽管 Segreto 等的研究表明生长在寒冷地区的苔藓植物具有潜在的超低温保存能力,但其所保存的 2 种泥炭藓(*Sphagnum girgensohnii* 和 *S. russowii*)的再生率也仅有 20%^[10]。因此,本研究初步证明了包埋玻璃化法对于保存湿润生境中的苔藓植物效果明显。

参考文献:

[1] ISBELL F, CRAVEN D, CONNOLLY J, *et al.* Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes [J]. *Nature*, 2015, **526**(7 574): 575-577.

[2] 简令成. 低温生物学与植物种质的长期保存[J]. 植物学通报, 1998, **5**(2): 65-68.

JIAN L C. Germplasm long-term conservation associated with cryobiology in plant [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1988, **5**(2): 65-68.

[3] LENTON T M, DAHL T W, DAINES S J, *et al.* Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2016, **113**(35): 9 704-9 709.

[4] WHITAKER D L, EDWARDS J. *Sphagnum* moss disperses spores with vortex rings [J]. *Science*, 2010, **329**(5 990): 406.

[5] 贺 琼. 神奇的泥炭藓[J]. 大自然, 2017, (195): 12-15.

HE Q. The magic of peat moss [J]. *China Nature*, 2017, (195): 12-15.

[6] PENCE V C. Cryopreservation of bryophytes: the effects of Absciscic Acid and encapsulation dehydration [J]. *Bryologist*, 1998, **101**(2): 278-281.

[7] BURCH J, WILKINSON T. Cryopreservation of protonemata of *Ditrichum cornubicum* (Paton) comparing the effectiveness of four cryoprotectant pretreatments [J]. *CryoLetters*, 2002, **23**(3): 197-208.

[8] ROWNTREE J K, DUCKETT J G, MORTIMER C L, *et al.* Formation of specialized propagules resistant to desiccation and cryopreservation in the threatened moss *Ditrichum plumbicola* (Ditrichales, Bryopsida) [J]. *Annals of Botany*, 2007, **100**(3): 483-496.

[9] BURCH J. Some mosses survive cryopreservation without prior treatment [J]. *Bryologist*, 2003, **106**(2): 270-277.

[10] SEGRETO R, HASSEL K, BARDAL R, *et al.* Desiccation tolerance and natural cold acclimation allow cryopreservation of bryophytes without pretreatment or use of cryoprotectants [J]. *Bryologist*, 2010, **113**(4): 760-769.

[11] 吴雪梅, 汤浩茹. 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展 [J]. 植物学通报, 2005, **22**(2): 238-245.

WU X M, TANG H R. Research advances in cryopreservation of plant germplasm by encapsulation-vitrification method [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, **22**(2): 238-245.

[12] 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, 2008, **35**(4): 607-610.

LI M J, ZHOU N, LIU J, *et al.* Cryopreservation of *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch by vitrification and encapsulation-vitrification [J]. *Acta Horticulturae Sinica*,

2008,**35**(4): 607-610.

[13] 王金录, 铃泰琳, 赵爱美. 青岛百合包埋-玻璃化法超低温保存技术研究 [J]. 北方园艺, 2012, (18): 135-139.

WANG J L, LING T L, ZHAO A M. Study on Cryopreservation of *Lilium tsingtauense* Gilg by encapsulation-vitrification method [J]. *Northern Horticulture*, 2012, (18): 135-139.

[14] 李秋萍, 姜丽佳, 鲁蓓蓓, 等. 细叶小羽藓孢子的超低温保存 [J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2014, (6): 121-125.

LI Q P, JIANG L J, LU B B, *et al.* Cryopreservation of spores of *Haplocladium microphyllum* (Hedw.) Broth [J]. *Journal of East China Normal University* (Natural Science), 2014, (6): 121-125.

[15] 李明军, 洪森荣, 徐 鑫, 等. 怀山药种质资源的玻璃化法超低温保存 [J]. 作物学报, 2006,**32**(2): 288-292.

LI M J, HONG S R, XU X, *et al.* Cryopreservation technique of *Dioscorea opposita* Thunb. germplasm resources by vitrification [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006,**32**(2): 288-292.

[16] 李海兵, 周 娜, 赵 姣, 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]. 植物学报, 2010,**45**(3): 379-383.

LI H B, ZHOU N, ZHAO J, *et al.* Cryopreservation and plantlet regeneration of germplasm resources of *Dioscorea opposita* by encapsulation-vitrification [J]. *Bulletin of Botany*, 2010,**45**(3): 379-383.

[17] 洪森荣, 尹明华, 邵兴华. 野葛试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生 [J]. 亚热带植物科学. 2007,**36**(4): 10-12.

HONG S R, YIN M H, SHAO X H. Cryopreservation of *Pueraria lobata* shoot-tip *in vitro* by vitrification and plant regeneration [J]. *Subtropical Plant Science*, 2007,**36**(4): 10-12.

[18] 洪森荣, 李明军. 玻璃化法超低温保存怀山药种质的技术研究 [J]. 中草药, 2006,**37**(11): 1 715-1 718.

HONG S R, LI M J. Cryopreservation technique of *Dioscorea opposita* germplasm by vitrification [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006,**37**(11): 1 715-1 718.

[19] 田 霄, 侯夫云, 王庆美, 等. 甘薯茎尖超低温保存技术研究 [J]. 山东农业科学, 2010, (5): 55-56.

TIAN X, HOU F Y, WANG Q M, *et al.* Research on cryopreservation technique for sweet potato shoot tips [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2010, (5): 55-56.

[20] 陈志林, 李开锦. 植物种质资源的超低温保存 [J]. 广西农业科学, 2007,**38**(3): 231-237.

CHEN Z L, LI K J. The ultra-cryopreservation of plant germplasm resources [J]. *Guangxi Agricultural Science*, 2007,**38**(3): 231-237.

[21] 殷晓辉, 舒理慧, 郑从义. 野生稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成 [J]. 武汉植物学研究, 1996,**14**(3): 247-252.

YIN X H, SHU L H, ZHENG C Y. Cryopreservation and formation of regenerative plantlets of callus from wild rice [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1996,**14**(3): 247-252.

[22] FATIMA S, MUJIB A, NASIM S A, *et al.* Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Catharanthus roseus* L. (G) Don [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009,**98**(1): 1-9.

[23] HAZUBSKA P T, CHMIELARZ P, MICHALAK M, *et al.* Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2010,**102**(1): 35-44.

[24] 陈 勇, 陈娴婷, 王君晖. 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(理学版), 2004, **31**(2): 197-201.

CHEN Y, CHEN X T, WANG J H. Studies of cryopreservation of callus of *Citrus suavisissima* Hort. et Tanaka by vitrification [J]. *Journal of Zhejiang University* (Science Edition), 2004,**31**(2): 197-201.

[25] SAKAI A, KOBAYASHI S, OIYAINA I. Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen [J]. *Hort Science*, 1978,**13**(3): 225-227.

(编辑: 潘新社)