

植物种质资源的超低温保存研究进展 (综述)

殷晓辉 舒理慧

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

ADVANCES IN CRYOPRESERVATION RESEARCH ON PLANT GERMPLASM

Ying Xiaohui Shu Lihui

(School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

液氮超低温(-196℃)保存是目前唯一可行的长期而稳定地保存植物种质资源的方法。在液氮低温下,所有的细胞分裂和代谢活动停止,因而植物材料在超低温保存过程中不会产生遗传性状的改变。

超低温保存的基本操作程序为:选择适宜年龄与生长状态的冷冻材料,对其进行预处理,然后将材料装入试管或安瓿瓶中,插入冰浴,在冰浴条件下加入0℃预冷的冰冻保护剂,0℃放置30-45min。采用不同的降温冰冻方式进行冷冻,材料在液氮中停留的时间在理论上是不受限制的。保存后的化冻一般采取在37-40℃温水浴中快速化冻。材料化冻后,可测定其生活力与存活率,并进行再培养观察恢复生长的速度及植物的再生能力,分析冻后材料或再生植株的遗传性状。

超低温保存成功的关键在于避免降温冰冻及化冻过程中的细胞内结冰,所以使细胞发生适当程度的脱水是采取各种措施的中心原则。根据不同的材料,通过改变冰冻保护剂、降温方式及化冻方式的组合就能得到最恰当的保存效果。

1973年, Nag 和 Street 将胡萝卜悬浮培养细胞保存在液氮中之后,观察到细胞的生长,这是超低温保存植物材料的首次报道^[1]。迄今为止,已对100多种植物材料进行过超低温保存的研究,并已取得了重要进展。最近,武汉大学的田永中在光敏感核不育水稻的超低温保存研究中,成功地获得了再生植株^[2],这具有重大意义。因为光敏感核不育水稻是我国发现并特有的稻属种质资源,在长期种植过程中,几经南繁北育出现各种混杂,花粉败育不彻底,因此保存好纯系材料,将为杂交水稻的利用开辟广阔应用前景。最近殷晓辉等人在疣粒野生稻幼穗离体培养产生的愈伤组织的超低温研究中,首次成功地获得了冻后再生植株^[3]。这为野生稻优异种质资源的保存提供了有效途径。

1 超低温保存材料的类型

1.1 种子

种子蕴藏着极为丰富的遗传信息,它的长期保存是解决当前及今后品种退化问题、增强抗性

国家自然科学基金资助课题

1995-08-14 收稿; 1995-11-20 修回

的基础,同时还可防止由于单一保存无性系可能造成的基因特异性丧失。

通过控制种子的含水量和冷冻速率,Stanwood成功地保存了芝麻种子^[4]。目前已有粮食、蔬菜、花卉等二十余种植物的种子进行了超低温保存。

1.2 芽及茎尖分生组织

芽的超低温保存是保存无性繁殖植物种质的方便途径。桑树芽经液氮保存后,能够再生正常植株^[5]。Kuoksa和Hohtola冷冻保存了苏格兰松树的芽,其冻后存活率高达90-100%^[6]。

分生组织作为种质超低温保存的材料,具有其独特的优越性:(1)某些情况下,愈伤组织很难再生完整植株,分生组织相对会容易得多;(2)分生组织遗传上更稳定;(3)更快的营养繁殖方式;(4)产生无病植株;(5)细胞培养物一般需要控制冷冻速率,而有些分生组织则可经受突然的冷冻。

Fukai等对石竹科的5个属38个种和栽培种进行了茎尖的液氮保存,冻后所有种的茎尖均存活并发育为正常植株^[7]。冰冻保存前,将海枣的分生组织在培养基上培养1-3d,使解剖所引起的伤害得以修复并重新恢复生长,可提高其冻后存活率^[8]。马铃薯冻后分生组织的发育有赖于冷冻方式,快速冷冻会使冻后分生组织愈伤组织化,而慢速冷冻能使其直接恢复生长^[9]。Dereuddre等从离体培养的石竹植株上切取分生组织进行超低温保存^[10],由于离体植株无病毒,生长容易控制,所以它们是种质保存的更佳来源。进行过茎尖分生组织超低温保存的植物至今已有17个属50余种^[11-13]。

1.3 花粉

超低温保存花粉可延长花粉寿命,解决花期不育和异地植物的杂交困难,减少病虫害传播,建立起花粉种质库,为国际间的种质交换提供便利。进行过花粉超低温保存的植物已达三十余种^[14]。

1.4 幼胚及胚状体

胚保存在种质库建立中起着十分重要的作用:(1)顽拗型种子由于对温度及湿度极其敏感,常导致胚的退化,因而无法长期保存。而通过分离出胚或其片段进行超低温保存,是解决这一难题的有效途径。(2)体细胞胚被看作是不产生种子植物的“种子”,它能迅速大量繁殖,是人工种子的核心,它的超低温保存为人工种子的长期保存奠定了基础。(3)不亲和种的杂种胚常在早期败育,因此可切下幼胚,进行超低温保存,在需要时解冻培养。(4)单倍体细胞极不稳定,短期内就可转变为二倍体,通过花粉胚的超低温保存可维持其稳定性。

胚作为超低温保存的材料,其特点是体积大。在不同的发育阶段,胚由不同分化程度的组织组成,因此应尽可能选取未成熟的幼胚作为保存材料,如球形胚的抗寒力就高于心形胚及子叶形胚。对合子胚,常切除子叶,仅保存其胚轴部分。

迄今已对20余种植物的体细胞胚、花粉胚和合子胚进行了超低温保存。

1.5 悬浮培养细胞及愈伤组织

对于悬浮培养细胞的超低温保存,适用于大多数植物种的常规技术已建立有十多年了。至于

成功保存所需的特殊条件,应注意以下几方面:冷冻材料应选取处于指数生长期的细胞;加入冰冻保护剂前,可先对材料进行预培养以提高其抗寒力;适当的保护剂及冷冻程序是成功的关键;冷冻后必须快速化冻,一般采用 30-40℃ 温水浴。水浴温度升至 60℃ 或 80℃ 可增强保存效果,用微波炉解冻则化冻更均匀,可达到最佳效果^[15]。解冻后,为防止渗透冲击对细胞造成的伤害,可用缓慢扩散的方法除去保护剂;在细胞转入正常培养条件下恢复生长之前,常需在半固体培养基上培养一或二周;恢复生长所用的培养基成分需做适当改变,如薰衣草细胞冻后恢复生长时,若培养基中加入活性炭则可大大提高存活率^[16]。

旺盛生长的愈伤组织是冷冻保存所必须的;在慢速冷冻前常用复合保护剂预处理;在预冻终点温度停留 2h,甘蔗愈伤组织在冻后才能获得存活^[17];快速化冻后需对愈伤组织进行洗涤,除去冰冻保护剂。值得注意的是保护剂的加入要在冰浴条件下进行。黑暗条件有助于材料的恢复生长。

目前,进行过悬浮培养细胞及愈伤组织超低温保存的植物种类已多达 50 余种。

1.6 原生质体

冷冻原生质体优于冷冻细胞,由于原生质体没有细胞壁,排除了冷冻期间细胞中产生的张力,所以受伤害较少,存活率提高,同时能筛选出抗逆性强、生长处于优势的细胞系。

原生质体的冷冻保存由于操作复杂、技术难度大,故成功的例子尚不多。目前,仅有数十种植物的原生质体进行了超低温保存^[18]。

2 影响超低温保存效果的主要因素

2.1 材料的特性

不同基因型的植物对超低温保存的反应各不相同。Ulrich 对 6 个栽培稻品种的愈伤组织进行了超低温保存,发现不同品种的保存效果是不相同的^[19]。由此可看出冷冻后存活率的巨大差别不仅存在于种间,而且存在于不同品种间。

植物组织、细胞培养物的生长年龄与生理状态是决定冷冻细胞生活力的最重要因素之一。高细胞质、无液泡、薄壁的小分生细胞的存活率高于含大量液泡的大细胞;取延滞生长后期或指数生长期的细胞培养物能得到最高的存活率,此外,冻后细胞的恢复生长依赖于保持分裂能力的细胞浓度,即高密度细胞是细胞存活力的重要指标。另外,细胞团体积大小本身对冰冻保存效果也有影响,体积过大或过小(如游离细胞)冰冻保存效果都不好。

2.2 预处理

对材料进行抗寒锻炼或预培养能增强细胞的抗寒力。将玉米的胚留存于离体穗的种子中进行抗寒锻炼后,能得到高存活率^[20]。悬钩子分生组织低温驯化后,极大地提高了耐寒力^[21]。对于离体培养物,则常在冷冻前进行预培养。毛地黄细胞培养物在加有海藻糖的培养基中预培养后,不仅得到高存活率,而且细胞开始恢复生长所需的修复时间也极短^[22]。未成熟的春小麦合子胚在含 0.5mg L⁻¹ ABA 的半固体培养基上预培养 10d 后,不用加冰冻保护剂便能得到高存活率^[23]。

2.3 冰冻保护剂

冰冻保护剂的使用能减少超低温保存造成的伤害。除了目前经常采用的二甲基亚砷(DMSO)、甘油、糖和糖醇外, Crowe等还发现:海藻糖能与磷脂相互作用而稳定细胞膜,因而它也被用作保护剂。Bhandal等用海藻糖做唯一的冰冻保护剂,成功地保存了胡萝卜、烟草等细胞培养物^[24]。脯氨酸在冰冻—解冻过程中,能稳定蛋白质,在水稻中,它是有效的冰冻保护剂^[25]。

2.4 降温冰冻方法

普通采用快速、慢速或逐级冰冻法。对于原生质体、悬浮培养细胞、愈伤组织和某些植物的茎尖,宜采用慢速冰冻法,使细胞内的水有充足的时间不断流到细胞外结冰,达到良好的脱水效应,避免细胞内结冰。

在冰冻过程中,最至关重要的因素是降温速率、预冻温度及其停留时间。木薯茎尖保存时,若预冻温度从 -20°C 降到 -40°C ,则冻后存活率也将从91%降到3.3%^[26]。此外,在预冻温度停留一段时间也是十分必要的,它对存活率起着关键性的作用。

2.5 后处理

材料解冻后的后处理可保证其在最佳条件下得以迅速恢复,由于保护剂具有一定的毒性,对材料的冰后复苏不利,因此大多数情况下,将它们清除掉。但在白三叶草^[27]和甘蔗^[28]中,已观察到不清洗能提高存活率,增加正常苗形成的比例。

由于冷冻与解冻的伤害,冻后细胞在生理与结构上都不同于未冷冻的细胞,因此,适于两种细胞生长的培养基成分是不同的。Kuriyama等发现:铵离子对冷冻后的水稻细胞有害,它阻止细胞的修复过程;但它对未冷冻的水稻细胞生长有促进作用。冻后水稻细胞培养于不含 NH_4NO_3 的培养基上有助于提高存活率^[29]。因此,选择冻后合适的培养基成分关系到超低温保存的成败。

3 冻后细胞活力及遗传性

材料解冻后,常采用FDA法(二醋酸酯荧光素染色法)与TTC法(氯化三苯四氮唑还原法)迅速测知材料的存活率,但两种方法都要破坏材料,而且无法显示细胞是否具有分生能力,因此,正在寻找一种不破坏材料而能测知细胞存活率的方法,如对冰冻组织产生的挥发性碳氢化合物(乙烯、乙烷)进行色谱分析^[30]。

在水稻细胞的超低温保存中,冷冻伤害造成了呼吸损伤,减缓了葡萄糖的吸收,细胞内钾离子损失^[31],加速了脂质的过氧化反应^[32]。Gnanapragasam等观察了糜子(*Panicum maximum*)悬浮培养细胞在超低温保存时的超微变化,发现细胞器增大,内质网的潴泡膨胀形成泡囊^[33]。尽管冷冻造成了伤害,但并非致死性的,所以在细胞恢复再生长之前有一个停滞期用以修复这些损伤。细胞的再生长才是最终检验细胞活力的唯一可靠方法。

种质保存的目的是要保持遗传性状的稳定,超低温保存可以达到这一目的。原生质体^[34]、胚发生培养物^[35]、茎尖分生组织^[36]、珠心细胞^[37]等经超低温保存后均能再生表型正常的植株。对再生植株进行的RFLP分析表明其核糖体基因与对照相比没有变化^[38]。花粉经液氮保存后,不会丧失萌发率^[39]。细胞合成次生代谢产物的能力以及抗性经液氮保存后也都没有改变^[40]。

Watanabe等在水稻愈伤组织的超低温保存中发现:重复冰冻—解冻过程能增加由愈伤组织

细胞形成的克隆数^[41]; Kendall 等在小麦中发现重复冰冻保存能选出耐寒的愈伤组织, 由这些愈伤组织再生的冻后植株增强了抗寒性^[42]。如果通过超低温保存能选出抗寒性的植物, 将是十分有意义的工作。

4 超低温保存方法

4.1 玻璃化法

植物材料经高浓度玻璃化保护剂处理后, 快速投入液氮保存, 使保护剂和细胞内水分来不及形成冰, 或冰晶没有充分的时间生长, 从而进入一种人工的完全玻璃化状态。在“玻璃态”时, 水分子没有发生重排, 不产生结构和体积的变化, 因而不会由于机械损伤或溶液效应, 造成组织和细胞伤害, 保证化冻后细胞仍有活力。

1989年, Uragami 等及 Langis 等首次用玻璃化法成功地冻存了石刁柏体细胞胚和薄荷悬浮培养物^[43,44]。玻璃化法具有设备简单、程序简化和冻存效果好等优点, 并在保存器官和组织水平的结构完整性方面有独到之处。有些植物材料对常规冷冻方法极其敏感, 则可用玻璃化冻存来弥补这一不足。如石刁柏离体多生芽簇和甜薯茎尖只有用玻璃化法冻存才能存活^[45,46]。

4.2 干冻法

通过控制脱水速度与脱水程度, 对植物进行干燥预处理能增强其抗冻性。如橡胶树的新鲜切除胚轴含水量为 55%, 不经处理存活率为 100%, 但不能耐受液氮冷冻。经过 3h 干燥处理后, 含水量降至 16%, 存活率降至 87%, 但其冻后存活率达到了 67%^[47]。干燥处理还能增强油棕体细胞胚的抗冻性^[48]。石刁柏的腋芽经硅胶干燥后, 投入液氮, 冻后存活率为 71%, 并能再生植株^[49]。甜瓜的体细胞胚脱水后直接投入液氮, 得到了 65% 的存活率^[50]。干冻法不需要昂贵的仪器设备, 操作简便, 因此不失为一种可行的超低温保存方法。

4.3 包埋/脱水法

植物材料由褐藻酸盐包埋成珠状物, 在含高浓度蔗糖的液体培养基中预培养几小时或几天, 再经无菌空气或硅胶部分脱水后, 进行慢速或快速冷冻。解冻采用慢速化冻方式。包埋使材料得到了保护, 使之能经受对裸露材料致死性的伤害, 如脱水、冷冻等。

采用这种方法, Dereuddre 等保存了胡萝卜的体细胞胚^[51]; Fabre 和 Dereuddre 保存了马铃薯的顶端分生组织, 冻后有 26% 的分生组织发育为植株^[52]; Paulet 等保存了 5 种甘蔗离体植株的顶端分生组织, 它们冻后存活率的范围在 38—91%, 其中一种冻后再生植株的氨基亮氨酸胺酶及淀粉酶的电泳图谱都没有发生改变^[53]。

4.4 利用驯化冰箱法

Tessereau 等在保存咖啡的胚性悬浮细胞和体细胞胚时首先采用了这种简化方法^[54]。材料经高浓度蔗糖预处理后, 置于 -20℃ 冰箱中 24h, 然后直接投入液氮。冻后存活率为 50%。经过 42d 培养后, 冻后细胞系在细胞密度、胚的产率及鱼雷期胚所占百分率方面都与未冷冻的对照相似。Sakai 等在保存脐橙的珠心细胞时, 将材料预处理后置于 -30℃ 冰箱中 20—30min, 然后直接投入液氮, 冻后细胞存活率高达 90%, 并通过胚胎发生再生了植株^[55]。

这些新技术均简便易行, 费用上更经济, 因而是常规超低温保存技术的有力补充。在液氮低温下, 细胞处于不分裂, 代谢失活状态。从理论上讲, 冷冻保存可以无限期地贮存材料。但是目前还没有能适合所有培养项目的有效的能重复的方法。因为适合一类组织或细胞的冷冻保存方法对另一类组织或细胞不一定适合, 致使冷冻后细胞存活率低或不能再生。在冷冻过程中, 低温对细胞造成的伤害是由多种依存因素引起的, 包括细胞过度脱水, 胞内冻结, 机械压力以及细胞膜的破损等。若能使以上伤害减少到最小, 细胞就能保持最大的存活率。

5 问题与展望

用液氮保存材料在生理代谢、生活力下降和基因特异性丧失的问题能得到最好的控制, 病原微生物的活动也受到抑制, 可以说这种保存方法是稳定可靠的长期保存植物种质资源的途径。但是, 植物超低温工作的开展毕竟时间还短, 有许多问题还须进一步探讨。贮存材料的存活率一般比较低, 对保存几十年后的材料, 遗传稳定性问题也有待时间的验证。保存因素间的相互影响, 基因型、保护剂与降温、化冻之间的关系, 建立各类植物的保存体系, 都是今后研究的重点, 特别是保存稀少野生种质和面临绝种危险的植物, 更具有重要价值。随着科学技术的发展, 将会建立种质收集保存与交换的种质库体系。

几十年来, 科学家们一直在利用植物的遗传多样性来培育优质高产、抗病虫害的品种, 而掌握丰富的野生资源为未来培育更优良的品种提供条件。目前迅速恶化的环境和不利的气候条件正在侵蚀着植物的遗传多样性, 这种侵蚀正在减少种内和种间的多样性, 使许多生物资源濒危和正在灭绝。因此, 保护植物的遗传多样性已经刻不容缓。科学家们已开始加紧搜集野生资源基因并进行保存, 采用超低温保存方法, 将为植物种群有用基因的长期利用提供一条有效途径。

参考文献

- 1 Nag K K, Street H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 1973, 245:270-272
- 2 田永中, 舒理慧, 郑从义. 光敏感核不育水稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植物的形成. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1994, (4):89-94
- 3 Ying X H et al. Plant regeneration from cryopreserved callus of wild rice (*Oryza meyeriana* Baill.). *Rice Genetics Newsletter*, 1994, 11:184-186
- 4 Stanwood P C. Survival of sesame seeds at the temperature (-196 °C) of liquid nitrogen. *Crop Science*, 1987, 27:327-331
- 5 Yakuwa H, Oka S. Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen. *Ann Bot*, 1988, 62:79-82
- 6 Kuoksa T, Hohtola A. Freeze-preservation of buds from Scots pine trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 27:89-93
- 7 Fukai S et al. Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. *Euphytica*, 1991, 56:149-153
- 8 Bagniol S et al. First successful cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) meristems. In: *Plant Tissue and Cell Culture (Abstr. Vth Intl. Cong.)*. Amsterdam, 1990, 374
- 9 Benson E E et al. Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post-freeze light regimes. *cryo-Lett*, 1989, 10:323-344
- 10 Dereuddre J et al. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. *eolo*) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Reports*, 1988, 7:170-173
- 11 Kartha K K. Meristem culture and germplasm preservation. In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*

- (Kartha K K ed). Florida: CRC Press Boca Raton, 1985, 115-134
- 12 Bajaj Y P S. Cryopreservation of germplasm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz) viability of excised meristems cryopreserved up to four years. *Indian J Exp Biol*, 1985, 23:285-287
 - 13 Reed B. Survival of *in vitro*-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortScience*, 1990, 25: 111-113
 - 14 简令成. 细胞组织培养物的超低温保存种质库的建立. 植物生物技术和作物改良. 北京: 中国科学技术出版社, 1990, 254-280
 - 15 Reuff I et al. Cryopreservation of *Coleus blumei* suspension and callus cultures. *J Plant Physiol*, 1988, 133:414-418
 - 16 Kuriyama A et al. Effect of post-thaw treatment on the viability of cryopreserved *Lavandula vera* cells. *Cryo-Lett*, 1990, 11:171-178
 - 17 简令成, 孙德兰, 孙龙华. 甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究. 植物学报, 1987, 29:123-131
 - 18 Withers L A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs* (Kartha K K ed). Florida: CRC Press Boca Raton, 1985, 243-267
 - 19 Ulrich J M et al. Responses of six rice callus cultures to deep-frozen temperatures. *Crop Science*, 1984, 24:82-85
 - 20 Delvallee I et al. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*. *Plant Science*, 1989, 60:129-136
 - 21 Reed B M. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *Cryo-Lett*, 1988, 9:166-171
 - 22 Goldner E M et al. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Ehrh. cell cultures: preculture and freeze tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 24:19-24
 - 23 Kendall E J et al. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Reports*, 1993, 12:89-94
 - 24 Bhandal I S et al. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiol*, 1985, 78:430-432
 - 25 Meijer E G M et al. Retention of the capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, 1991, 10:171-174
 - 26 Kartha K K et al. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zpflanzenphysiol*, 1982, 107:133-140
 - 27 Yamada T et al. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science*, 1991, 73:111-116
 - 28 Gnanapragasam S et al. Cryopreservation of immature embryos, embryonic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science*, 1992, 83:205-215
 - 29 Kuriyama A et al. Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Science*, 1989, 64:231-235
 - 30 Benson E E, Withers L A. Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: a non-destructive method for assessing stability. *Cryo-Lett*, 1987, 8:35-46
 - 31 Cella R et al. Freeze-preservation of rice cells: A physiological study of freeze-thawed cells. *Physiol Plant*, 1982, 55:279-284
 - 32 Benson E E et al. The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival. *Plant Science*, 1992, 85:107-114
 - 33 Gnanapragasam S, Vasil I K. Ultrastructural changes in suspension culture cells of *Panicum maximum* during cryopreservation. *Plant Cell Reports*, 1992, 11:169-174
 - 34 唐定台, 杨志琦, 山田康之. 水稻原生质体产生细胞团的冰冻保存和冻后再生植株形成. 植物学报, 1988, 30:357-361
 - 35 Klimaszewska K et al. Cryopreservation and plant regeneration from embryonic cultures of larch (*Larix × eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *J Exp Bot*, 1992, 43(246):73-79
 - 36 Bajaj Y P S. Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years. *Field Crop Res*, 1983, 7:161-167
 - 37 Kobayashi S et al. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 23:15-20

- 38 Harding K. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica*, 1991, 55:141-146
- 39 石思信, 曹心如, 肖建平. 黑麦花粉超低温保存及过氧化物酶同工酶变化. *作物品种资源*, 1992, (3):33-35
- 40 Benson E E, Hamill J D. Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 24:163-172
- 41 watanabe K et al. Differences in viability after freeze-preservation in LN₂ among rice callus lines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54:1295-1296
- 42 Kendall E J et al. Regeneration of freezing-tolerant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from cryoselected callus. *Plant Physiol*, 1990, 94:1756-1762
- 43 Uragami A et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports*, 1989, 8:418-421
- 44 Langis R et al. Cryopreservation of *Brassica napus* suspensions by vitrification. *Cryo-Lett*, 1989, 10:421-428
- 45 Kohmura H et al. Cryopreservation of *in vitro*-cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparags officinalis* L.) cv Hiroshimagreen (2n=30) by the techniques of vitrification. *Plant Cell Reports*, 1992, 11:433-437
- 46 Towill L E et al. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea baiatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, 1992, 11:175-178
- 47 Normah M N et al. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis*. *Muell Arg Pertanika*, 1986, 9:299-303
- 48 Dumet D et al. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports*, 1993, 12:352-355
- 49 Uragami A et al. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 1990, 9:328-331
- 50 Shimonishi K et al. Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *Japanese J Breeding*, 1991, 41:347-351
- 51 Dereuddre J et al. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. effects of preculture. *Cryo-Lett*, 1991, 12:125-134
- 52 Fabre J et al. Encapsulation dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryo-Lett*, 1990, 11:413-426
- 53 Paulet F et al. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports*, 1993, 12:525-529
- 54 Tessereau H et al. Use of a simplified freezing process and dehydration for the storage of embryogenic cell lines and somatic embryos. In: *Seeds: Genesis of Natural and Artificial Forms* (Vegetal L B ed). Amiens, 1990, 123-133
- 55 Sakai A et al. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Science*, 1991, 74:243-248