

植物种质的包埋脱水超低温保存

谷月, 张恩栋, 王起华*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029

Cryopreservation of Plant Germplasm by Encapsulation-dehydration

GU Yue, ZHANG En-Dong, WANG Qi-Hua*

College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

摘要: 文章介绍近10年来有关植物种质包埋脱水超低温保存的研究进展, 并对这一方法的应用前景作了展望。

关键词: 包埋脱水法; 超低温保存; 植物种质

超低温保存为液氮低温(-196 ℃)下的保存, 在此温度下, 细胞的物质代谢和生命活动几乎完全停止。超低温保存技术具有长期保持种质活力, 稳定遗传组成和避免基因多样性丧失等优点, 因此认为是植物种质资源保存的理想途径(Reed等2004; Flachsland等2006)。迄今, 所采用的超低温保存方法主要有两步冷冻法、玻璃化法和包埋脱水法(Shibli等2001)。其中, 包埋脱水法不需要昂贵的降温设备, 不用有毒害的抗冻保护剂, 操作方便, 可以同时处理大量样品(Shibli等2001; Clavero-Ramirez等2005), 而且材料化冻后不形成愈伤组织, 可直接发育生长(Gonzalez-Arno和Engelmann 2006)。这无疑是对超低温保存技术的一个重大改进。近年来, 包埋脱水法在植物种植保存中应用广泛, 且发展迅速, 不仅有更多的植物种类和种质类型采用此法保存获得成功, 而且在保存技术上也有了新的突破(Sakai等2000; Gupta和Reed 2006)。本文介绍了近10年来采用包埋脱水法保存植物种质的研究进展。

1 植物材料的包埋脱水保存

包埋脱水法最早出现在法国Fabre和Dereuddre(1990)保存马铃薯茎尖的研究中, 此法是将植物材料用褐藻酸钙包埋后, 先在含高浓度蔗糖的培养基中预培养, 再用无菌空气流脱水, 然后投入液氮中保存。此后, 包埋脱水法的研究报道逐年增加。迄今, 已经有50余属100种以上的植物种质采用此法保存获得成功(王君晖等1999; 王起华等2002; Flachsland等2006; Gonzalez-Arno和Engelmann 2006)。保存的材料

类型不仅包括高等植物的茎尖、腋芽、分生组织、悬浮细胞、花粉细胞和体细胞胚等, 也包括多种藻类材料(王君晖等1999; 王起华等2002; Flachsland等2006; Gonzalez-Arno和Engelmann 2006)。这说明在植物种质资源的保存中, 包埋脱水法对物种的依赖性较低, 适用范围很广, 因此, 得到人们的青睐。表1是国内外近10年来采用包埋脱水法保存植物材料的主要结果。1997年以前的结果可参见王君晖等(1999)的文章, 本文不再赘述。

2 影响包埋脱水法保存效果的因素

在超低温保存操作过程中, 在结冰温度范围内, 即0 ℃以下至低共熔点(液相和两种固相的三相共存点约为-135~-139 ℃, 在低于共晶点以下的温度, 水分子不再发生结冰作用), 细胞始终处于危险状态中, 操作中的每一步失误都可能对细胞造成致死性的伤害。因此, 优化冰冻保存程序是提高保存效果的一个重要途径。此外, 实验材料本身的特性对存活率也有影响。以下就影响植物种质包埋脱水法保存效果的主要因素作简要说明。

2.1 冰冻保存程序

2.1.1 预处理(pretreatment) 预处理包括实验材料在包埋前的冷驯化和其他有助于提高抗冻性的处理过程(Gonzalez-Arno和Engelmann 2006)。很多研

收稿 2007-08-31 修订 2007-11-20
资助 国家自然科学基金(30170099和30470184)。
* 通讯作者(E-mail: qihua_mail@163.com; Tel: 0411-84258039)。

表1 近10年来采用包埋脱水法冷冻保存植物种质的主要结果

植物名称	材料类型	存活率/%	文献	
猕猴桃	<i>Actinidia chinensis</i>	茎尖	22~56	Wu 等 2001
甜菜(4)	<i>Beta vulgaris</i>	茎尖	60~70	Vandenbussche 等 1999
牟氏角刺藻	<i>Chaetoceros muelleri</i>	细胞	30	李莹等 2003
菊	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	茎尖	85	Sakai 等 2000
柑橘属	<i>Citrus spp.</i>	茎尖	95	Wang 等 2002
柑橘属(18)	<i>Citrus spp.</i>	珠心, 体细胞胚	75~100	Gonzalez-Arno 等 2003
波斯菊	<i>Cosmos atrosanguineus</i>	茎尖	92	Wilkinson 等 1998
菊	<i>Dendranthema grandiflora</i>	茎尖	64	Martin 和 Gonzalez-Benito 2005
参薯	<i>Dioscorea alata</i>	茎尖	67	Malaurie 等 1998
黄独	<i>Dioscorea bulbifera</i>	茎尖	65	Malaurie 等 1998
巨桉	<i>Eucalyptus grandis</i>	腋芽	49	Blakesley 和 Kiernan 2001
纤细裸藻(细致虫藻)	<i>Euglena gracilis</i>	细胞	40	Day 等 2000
草莓属(7)	<i>Fragaria spp.</i>	茎尖	23~63	Clavero-Ramirez 等 2005
啤酒花	<i>Humulus lupulus</i>	茎尖	100	Martinez 等 1999
番薯(4)	<i>Ipomoea batatas</i>	茎尖	62~83	Pennycooke and Towill 2001
鸢尾	<i>Iris nigricans</i>	体细胞胚	60	Shibli 2000
球等鞭金藻	<i>Isochrysis galbana</i> 3011	细胞	17	王起华等 2005a
湛江等鞭金藻	<i>Isochrysis zhanjiangensis</i>	细胞	15	王起华等 2005a
补血草	<i>Limonium mill</i>	顶端分生组织	73.3	Matsumoto 等 1998
苹果属(3)	<i>Malus spp.</i>	茎尖	81.6~87.3	Hao 等 2001
苹果属(7)	<i>Malus spp.</i>	茎尖	70~90	Zhao 等 1999
紫苜蓿(2)	<i>Medicago sativa</i>	悬浮细胞	14~29	Shibli 等 2001
楝	<i>Melia azedarach</i>	茎尖	83	Scocchi 等 2004
留兰香	<i>Mentha spicata</i>	顶端分生组织	61	Sakai 等 2000
二叶瘤瓣兰	<i>Oncidium bifolium</i>	种子和原球茎	67 和 81.7	Flachsland 等 2006
红门兰属(2)	<i>Orchid</i>	种子	100	Wood 等 2000
绿色巴夫藻	<i>Pavlova viridis</i>	细胞	74	王起华等 2005a
枳	<i>Poncirus trifoliata</i>	茎尖	50	Gonzalez-Arno 等 1998
坛紫菜	<i>Porphyra haitanensis</i>	丝状体	65	王起华等 2000
甜杏	<i>Prunus dulcis</i>	茎尖	62	Shatnawi 等 1999
茶藨子属(2)	<i>Ribes spp.</i>	茎尖分生组织	62~67	Sherlock 等 2005
黑穗醋栗	<i>Ribes aureum</i>	顶端分生组织	10	Reed 等 2001
黑茶藨子	<i>Ribes nigrum</i>	顶端分生组织	50	Reed 等 2001
复盆子(7)	<i>Rubus idaeus</i>	茎尖	46~90	Wang 等 2005
悬钩子属(25)	<i>Rubus L.</i>	茎尖	60~100	Gupta 和 Reed 2006
马铃薯	<i>Solanum tuberosum</i>	茎尖	78.8	Grospietsch 等 1999
裙带菜	<i>Undaria pinnatifida</i>	配子体	66	王起华等 2005b
小蔓长春花	<i>Vinca minor</i>	毛状根	70	Hirata 等 2002
葡萄属(2)	<i>Vitis spp.</i>	茎尖	40~60	Wang 等 2000
块茎山萮菜	<i>Wasabia japonica</i>	苗	90.6	Sakai 等 2000

括号内数字为所用实验材料的不同品种或基因型数目。

究表明,材料经过冷驯化预处理后,冰冻保存存活率可显著提高(Vandenbussche 等 1999; Gupta 和 Reed 2006)。其原因可能是经过冷驯化的细胞中可溶性糖含量增加和脂肪酸组成发生变化,从而提高材料的抗脱水性之果。这在包埋脱水法保存技术中很重要(Vandenbussche 等 1999)。冷驯化的

时间一般是 1~4 周(Zhao 等 1999; Sakai 等 2000; Clavero-Ramirez 等 2005);冷驯化过程中的温度和光照设置多采用 4~5 黑暗(Zhao 等 1999; Paul 等 2000; Sakai 等 2000; Clavero-Ramirez 等 2005),或 4~5 光(8 h)/暗(16 h)周期(Wu 等 2001)。但也有采用光(8 h, 21)/暗(16 h, 5

)周期进行冷驯化的报道(Vandenbussche 等 1999)。除了冷驯化外,在包埋前进行蔗糖预培养也是一个常用的步骤(Sakai 等 2000; Pennycooke 和 Towill 2001)。

2.1.2 包埋(encapsulation) 包埋是用包埋脱水法保存植物材料时最具特色的一个步骤,包埋后的材料可以较大限度地使材料的结构不致因实验处理或操作时温度的急剧变化而遭致破坏。包埋的基本过程是先将经过预处理的实验材料悬浮在含有褐藻酸钠(常用浓度为3%)的无钙培养基中,然后将此悬浮液滴入含有CaCl₂(常用浓度为100 mmol·L⁻¹)的培养基中,并保持约20~30 min (Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006),所形成的褐藻酸钙胶球的直径通常为3~5 mm (Fabre 和 Dereuddre 1990; Sakai 等 2000; Flachsland 等 2006)。Sakai 等(2000)还提出一种新的包埋脱水保存程序,即在包埋液中加入玻璃化装载液(2 mol·L⁻¹甘油+0.4 mol·L⁻¹蔗糖),这不仅可以省去传统包埋脱水法中所必需的蔗糖预培养步骤,使操作程序大大简化,还使所保存的植物材料存活率都有提高。这一方法也为其他一些研究工作所采用(Wang 等 2002; Clavero-Ramirez 等 2005),并得到了较好的保存效果。

2.1.3 预培养(preculture) 预培养一般指蔗糖预培养,是将包埋实验材料的胶球置于含有高浓度蔗糖的培养基中振荡培养,以选择最佳蔗糖浓度和最适培养时间。其基本原则是:既要使样品获得高的抗冻力和抗脱水力,又不至于引起样品受太多的高渗损伤。常用蔗糖浓度为0.5~1.25 mol·L⁻¹,其中0.75 mol·L⁻¹是最常用的浓度(Shatnawi 等 1999; Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006)。蔗糖预培养的时间因实验材料而异,从16~18 h到7~10 d (Martinez 等 1999; Paul 等 2000; Sherlock 等 2005; Gupta 和 Reed 2006)。对高浓度蔗糖敏感的材料宜采用蔗糖梯度预培养,如常采用0.25~0.3 mol·L⁻¹、0.5 mol·L⁻¹、0.75 mol·L⁻¹和1.0 mol·L⁻¹ 4个(或其中3个)蔗糖浓度依次处理胶球;每个浓度的处理时间大约为12 h到3 d (Martinez 等 1999; Wang 等 2000, 2002; Scocchi 等 2004)。对某些植物材料来说,在预培养基中须同时加入蔗糖和甘油以提高材料的抗脱水性和抗冻性,进而提高了存活率和再生率(Matsumoto 等 1998; Gonzalez-Arno

和 Engelmann 2006)。

2.1.4 脱水(desiccation) 经过预培养的胶球可采用无菌空气流风吹脱水或在含有干燥硅胶的密闭容器中脱水。相比之下,在实验室条件下用硅胶脱水更好一些(Sherlock 等 2005; Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006)。脱水过程就是将保存材料的含水量降低到一个最适范围。一般而言,胶球含水量为20% (此含水量相当于保存材料中的不可冻结水的含量)左右时的存活率最高(Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006), Sherlock 等(2005)就用差示扫描量热分析法(测量样品熔融过程中热差随温度及时间变化的关系)证实胶球含水量在20%左右时,胶球在冰冻和化冻过程中可以缩小形成冰晶的温度范围,快速度过形成冰晶的危险阶段,进而提高存活率。但在实际上,由于不同植物种类和组织类型的耐脱水性有差异,最适含水量的选择也不尽相同:如藻类一般为25%~40% (Day 等 2000; 李莹等 2003; 王起华等 2005b);高等植物的胚或小孢子胚一般为13%~25% (王君晖等 1999; Gonzalez-Arno 等 2003);腋芽一般为21%~25% (Blakesley 和 Kiernan 2001);茎尖和分生组织一般为14%~30% (Martinez 等 1999; Vandenbussche 等 1999; Sakai 等 2000; Reed 等 2001; Scocchi 等 2004; Gupta 和 Reed 2006)。此外,与脱水时间相关的脱水速率也是影响存活率的因素。最适脱水速率与植物种类有关,高等植物的最适平均脱水速率约为每小时含水量减少5%~15% (Shibli 2000; Hirata 等 2002; Scocchi 等 2004; Sherlock 等 2005; Flachsland 等 2006)。以藻类材料做实验的结果表明,微藻类宜采用每小时含水量减少0.9%的较低脱水速率(李莹等 2003; 王起华等 2005a);而大型海藻材料的适宜脱水速率相对较高,为每小时含水量减少5%~15% (王起华等 2000, 2005b)。

2.1.5 冰冻和保存(freezing and storage) 胶球经过脱水处理后,即可用于冰冻保存。在大多数情况下,都采用一步法快速降温完成冷冻过程,即将装有胶球的冻存管直接投入液氮中(Wang 等 2002; Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006)。但对有些植物材料来说,采用两步法降温方式,即先将材料按照一定的降温速率降到一个温度预冻一定

时间, 然后直接投入液氮, 可以显著提高存活率 (Gonzalez-Arno 等 1998; Scocchi 等 2004)。Zhao 等(1999)报道不同的降温方式对苹果茎尖的冰冻后存活率几乎没有影响。可见, 不同植物材料对降温方式的要求不同。冷冻保存管在液氮中保存通常最少在 1 h 以上 (Gonzalez-Arno 等 2003; Clavero-Ramirez 等 2005; Flachsland 等 2006)。

2.1.6 化冻和再培养(thawing and regrowth) 样品的化冻方式有两种。一种是将样品置于室温下在空气中慢速化冻 (Maurie 等 1998; Martinez 等 1999; Gonzalez-Arno 等 2003; Sherlock 等 2005)。其根据是样品在冰冻前已经过充分脱水, 不存在化冻时发生重结晶的风险 (Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006)。另一种是快速化冻, 多数研究者采用快速化冻方式, 即将样品置于 25~40 °C 的水浴中振荡 1~3 min (Wilkinson 等 1998; Shibli 等 2001; Scocchi 等 2004; Clavero-Ramirez 等 2005; Martin 和 Gonzalez-Benito 2005; Gupta 和 Reed 2006)。已有研究表明, 快速化冻后样品的存活率比慢速化冻有显著的提高 (Wang 等 2000; 苗琦等 2005)。再培养通常是将化冻后的胶球直接接种在标准的半固体培养基中来完成 (Gonzalez-Arno 等 2003; Clavero-Ramirez 等 2005; Gupta 和 Reed 2006)。但有时也需要通过调节培养基成分、控制培养条件等措施来提高存活率 (Pennycooke 和 Towill 2001; Wang 等 2002; Gonzalez-Arno 和 Engelmann 2006)。对于藻类材料, 通常是将化冻后的胶球转移到液体培养基中进行再培养 (王起华等 2000, 2005a, 2005b)。

2.2 材料的特性 上一节中各项措施即使是控制和做得很好, 但不同植物种类, 甚至同一种类不同品系间对包埋脱水法超低温保存的反应是各不相同的。这主要是由于植物的基因型、抗冻性、抗脱水性以及器官、组织和细胞的年龄、生理状态等因素对超低温保存效果也有较大影响。其中, 植物组织、细胞培养物的生长年龄与生理状态是决定冻存后细胞存活率的较为重要的因素, 细胞质浓度大、无液泡和薄壁的细胞比液泡和厚壁相对含量较大的单细胞培养物或愈伤组织更能抗冻和抗脱水, 因此, 用生长延滞后期或对数生长期的细胞进行冷冻所得到的存活率较高 (苗琦等 2005)。

赵艳华等(1998)认为用包埋脱水法保存苹果离体茎尖时, 材料的生理状态对茎尖存活率的影响甚至比保存过程中处理因素的影响更大。因此, 在进行超低温保存前, 选择合适的材料十分重要。

3 包埋脱水法的应用前景

包埋脱水法在应用中已经显示出多方面的优点: 与传统的慢速降温方法(两步法)相比, 此法可省去对昂贵降温仪器的依赖, 降温过程比较随意; 与玻璃化方法(将细胞或组织置于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中, 使细胞及其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, 而被固化成玻璃态, 并以这种玻璃态在低温下保存)相比, 可以避免高浓度保护剂对材料的毒害作用, 且对处理时间的要求不需特别严格, 最适时间范围跨度较大; 与新发展起来的包埋玻璃化方法(将玻璃化法和包埋脱水法相结合的基础上发展起来的超低温保存植物种质的新技术)相比, 包埋脱水法中各环节的研究相对较为成熟, 而包埋玻璃化法才刚刚起步, 还有许多不稳定因素 (吴雪梅和汤浩茹 2005)。此外, 包埋脱水法还具有可同一时间内处理大量样品, 提高尺寸较大的外植体的存活率, 材料冰冻后可不经过愈伤组织阶段而能直接生长发育等优点 (Shibli 等 2001)。迄今已经有 50 余属 100 种以上的植物种质采用此法保存获得了成功。可以预计, 包埋脱水法技术在植物种质的超低温保存中的应用将越来越广泛。

包埋脱水法技术不仅在高等植物种质的冰冻保存中已广泛应用, 而且也能为藻类等低等植物的种质保存提供了一条值得考虑的新途径。近年来, 采用此项技术保存多种藻类也获得初步成功 (Day 等 2000; 王起华等 2000, 2002, 2005a, 2005b; 李莹等 2003)。这也进一步表明, 包埋脱水法在植物种质保存中有广泛的应用潜力。

但也应该看到, 由于不同种类材料如热带和寒温带种质、细胞、组织和器官等的耐脱水能力不同, 包埋脱水法对部分植物种类的保存效果仍不理想, 存在脱水慢、成苗率低和组织恢复生长慢等缺点。因此, 我们认为, 今后的工作重点应放在怎样从分子水平上分析冻存机制, 从而建立一套能普遍适用的包埋脱水超低温保存方法。

参考文献

- 李莹, 王起华, 李贺, 李婷婷(2003). 用包埋脱水法冰冻保存牟氏角刺藻. 海洋科学, 27: 48~51
- 苗琦, 谷运红, 王卫东, 秦广雍(2005). 植物组织培养物的超低温保存. 植物生理学通讯, 41: 350~354
- 王君晖, 边红武, 黄纯农(1999). 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. 植物学通报, 16: 582~586
- 王起华, 李贺, 张恩栋, 高艳萍, 李大鹏(2005a). 用包埋脱水法冰冻保存海洋饵料金藻. 海洋与湖沼, 36: 172~178
- 王起华, 刘明, 程爱华(2000). 坛紫菜自由丝状体的胶囊化冰冻保存. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 23: 387~390
- 王起华, 刘艳萍, 张恩栋, 李大鹏, 张岚翠(2005b). 包埋脱水法冷冻保存裙带菜配子体克隆的研究. 海洋学报, 27: 154~159
- 王起华, 张恩栋, 周春影(2002). 藻类种质超低温保存研究概况. 植物学通报, 19: 21~29
- 吴雪梅, 汤浩茹(2005). 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展. 植物学通报, 22: 238~245
- 赵艳华, 吴永杰, 陈霜莹, 章德明, 周明德(1998). 包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖. 园艺学报, 25: 93~95
- Blakesley D, Kiernan RJ (2001). Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *CryoLetters*, 22: 13~18
- Clavero-Ramirez I, Galvez-Farfan J, Lopez-Aranda JM, Gonzalez-Benito ME (2005). Apex cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation-dehydration methods. *CryoLetters*, 26: 17~24
- Day JG, Fleck RA, Benson EE (2000). Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. *J appl Phycol*, 12: 369~377
- Fabre J, Dereuddre J (1990). Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters*, 11: 413~426
- Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engelmann F (2006). Cryopreservation of seeds and *in vitro*-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 27: 235~242
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F (2006). Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27: 155~168
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, Urrea C, Morenza M, Rios A (1998). Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*, 19: 177~182
- Gonzalez-Arno MT, Juarez J, Ortega C, Navarro L, Duran-Vila N (2003). Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*, 24: 85~94
- Grospietsch M, Stodulkova E, Zamecnik J (1999). Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters*, 20: 339~346
- Gupta S, Reed BM (2006). Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *CryoLetters*, 27: 29~42
- Hao YJ, Liu QL, Deng XX (2001). Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. *Cryobiology*, 43: 46~53
- Hirata K, Mukai M, Goda S, Ishio-Kinugasa M, Yoshida K, Sakai A, Miyamoto K (2002). Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration. *Biotechnol Lett*, 24: 371~376
- Malaurie B, Trouslot MF, Engelmann F, Chabrilange N (1998). Effect of pretreatment conditions on the cryopreservation of *in vitro*-cultured yam (*Dioscorea alata* 'Brazo Fuerte' and *D. Bulbifera* 'Noumea Imboro') shoot apices by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 19: 15~26
- Martin C, Gonzalez-Benito ME (2005). Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiology*, 51: 281~289
- Martinez D, Tames RS, Revilla MA (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep*, 19: 59~63
- Matsumoto T, Takahashi C, Sakai A, Nako Y (1998). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Sci Hortic*, 76: 105~114
- Paul H, Daigny G, Sangwan-Norreel BS (2000). Cryopreservation of apple (*Malus X domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Rep*, 19: 768~774
- Pennycooke JC, Towill LE (2001). Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* {L.} Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 22: 381~389
- Reed BM, Dumet D, Denoma JM, Benson EE (2001). Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodivers Conserv*, 10: 939~949
- Reed BM, Kovalchuk I, Kushnarenko S, Meier-Dinkel A, Schoenweiss K, Pluta S, Straczynska K, Benson EE (2004). Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. *CryoLetters*, 25: 341~352
- Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, Niino T (2000). Newly devel-

- oped encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters*, 21: 53~62
- Scocchi A, Faloci M, Medina R, Olmos S, Mroginski L (2004). Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica*, 135: 29~38
- Shatnawi MA, Engelmann F, Frattarelli A, Damiano C (1999). Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *CryoLetters*, 20: 13~20
- Sherlock G, Block W, Benson EE (2005). Thermal analysis of the plant encapsulation-dehydration cryopreservation protocol using silica gel as the desiccant. *CryoLetters*, 26: 45~54
- Shibli RA (2000). Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 21: 39~46
- Shibli RA, Haagenson DM, Cunningham SM, Berg WK, Volenec JJ (2001). Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep*, 20: 445~450
- Vandenbussche B, Leuridan S, Verdoodt V, Gysemberg M, de Proftu (1999). Changes in sugar content and fatty acid composition of *in vitro* sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. *Plant Growth Regul*, 28: 157~163
- Wang QC, Batuman O, Li P, Bar-Joseph M, Gafny R (2002). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.×*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep*, 20: 901~906
- Wang QC, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JPT (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep*, 24: 280~288
- Wang QC, Tanne E, Arav A, Gafny R (2000). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 63: 41~46
- Wilkinson T, Wetten A, Fay MF (1998). Cryopreservation of *Cosmos atrosanguineus* shoot tips by a modified encapsulation/dehydration method. *CryoLetters*, 19: 293~302
- Wood CB, Pritchard HW, Miller AP (2000). Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *CryoLetters*, 21: 125~136
- Wu Y, Zhao Y, Engelmann F, Zhou M (2001). Cryopreservation of Kiwi shoot tips. *CryoLetters*, 22: 277~284
- Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, Zhou M, Zhang D, Chen S (1999). Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. *CryoLetters*, 20: 103~108