

观赏植物种质资源的超低温保存

王越 刘燕*

北京林业大学园林学院国家花卉工程中心, 北京 100083

Cryopreservation of Ornamental Plant Germplasm

WANG Yue, LIU Yan*

National Flower Engineering Centre, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

提要 概述了观赏植物种质资源超低温保存的研究进展。

关键词 花卉; 种质资源; 超低温保存

近年来, 世界观赏植物产业迅速发展, 已成为最具活力的产业之一。其研究热点主要有以下几个方面: 种质资源、遗传育种、栽培技术、采后生理及其它生产相关技术等(潘会堂和张启翔 2000)。观赏植物种质资源是所有相关研究的基础, 没有资源就没有观赏植物产业的发展。

我国许多栽培和野生的观赏植物面临品种散失和濒于灭绝的严重威胁。国内普遍对保护观赏植物种质资源的重要性认识不足, 许多有重要科学研究价值、经济价值或观赏价值的植物遭到严重的破坏。种质资源是不可再生的自然资源, 一旦丢失, 任何方法都难以再造。观赏植物种质资源的保存工作极为重要和迫切。

传统的观赏植物种质保存方法主要有原地保存(*insitu conservation*)与异地保存(*exsitu conservation*)两种。但这些方法往往存在占地面积大, 成本高, 易受外界环境影响等弊端, 不能长期稳定保存种质资源。近年来发展起来的超低温保存技术能够有效克服这种不足。超低温条件能够最大限度的抑止材料的生理代谢强度, 降低劣变发生的频率, 从而达到长期保存种质的目的(王郁民和李嘉瑞 1996)。超低温保存的长期稳定性对一些稀有、珍贵和濒危观赏植物种质资源来说意义重大。众多试验结果证明, 超低温(一般指液氮, -196°C)保存是植物种质保存技术中较为理想的方法(Takagi 等 1997; 吴诗光等 1999)。

1 观赏植物种质资源超低温保存方法及其研究现状

1.1 原理与基本程序 生物体的新陈代谢速度常随着温度的下降而减缓, 温度下降至 -196°C 时, 生命活动几乎完全停止而处于相对静止的生物学状

态。这样的细胞其本身的遗传性状不会改变, 其形态发生潜能也不会丧失, 温度恢复时细胞能够重新持有正常状态下的生理功能(梁永恒等 1999)。超低温保存技术即是指将植物活体材料安全存放在超低温条件下(液氮, -196°C)长期保存, 待需要时通过一定方式将其恢复到常温状态, 并确保其能够正常生长的一套技术。

超低温条件能够将细胞活力和形态发生的潜能保存下来, 并可保持材料的遗传稳定性(Kartha 1994)。植物组织培养物于超低温下保存的技术建立种质库与品种库已日益受到人们的重视。

超低温保存基本程序是选择适宜年龄与生长状态的材料, 对其进行预处理后装入冻存管, 在冰浴条件下加入 0°C 预冷的冰冻保护剂, 放置一段时间, 采用不同的降温方式投入液氮冰冻, 材料在液氮中存留的时间在理论上是不受限制的。化冻(一般采用在 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水浴中快速化冻或室温化冻等方式)后, 测定材料的生活力与存活率, 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时及化冻过程中的细胞内结冰。所以对细胞进行适当程度的脱水, 降低材料含水量是各种冻存方式的中心原则, 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够得到最恰当的保存效果。目前超低温保存的主要方法有:

收稿 2005-09-26 修定 2006-03-06

资助 北京林业大学研究生自选课题基金(04jj017)。

*通讯作者(E-mail: chbly@sohu.com, Tel: 010-82376017)。

快速冰冻法、慢速冰冻法、两步冰冻法、逐级冰冻法、干燥冰冻法、玻璃化法、包埋干燥法、包埋玻璃化法等。

1.2 观赏植物的超低温保存现状 从20世纪50年代起, 世界各国就开始大规模地进行种质收集和保存工作。“国际植物遗传资源委员会”(International Board for Plant Genetic Resources, IBPGR; 现为国际植物遗传资源研究所, International Plant Genetic Resources Institution, IPGRI) 于1974年成立。但是大部分种质保存的对象都集中于农作物、经济作物、果树及药用植物等。虽然其中部分种类也具有观赏价值, 但真正意义上的种质保存工作还未充分开展。目前的研究所涉及的观赏植物种类太少, 缺乏从科属、区系角度考虑其整体保存价值和彼此之间的借鉴, 缺乏对某种保存材料系统深入的研究。

我国超低温保存植物种质资源技术最先应用于农作物。郑光植等(1983)最早将药用植物三分三(*Anisodus acutangulus*)愈伤组织及其悬浮培养细胞进行冰冻贮藏, 即超低温保存植物种质。我国花卉种质资源超低温保存研究近年来才有所开展。现按照保存材料的种类分述如下:

1.2.1 种子、胚、胚轴与体细胞胚 目前实现超低温保存的观赏植物种子、胚、胚轴与体细胞胚涉及约26个科51个属。

1.2.1.1 种子 种子蕴藏着极为丰富的遗传信息, 能够避免单一保存无性系可能造成的基因特异性丧失。并且保存起来也经济、方便。Roberts于1973年提出“正常性种子”和“顽拗性种子”的概念。全世界的花卉种子中有20%属于顽拗性种子(Beardmore和Whittle 2005)。正常性种子可以较好的进行超干燥长期保存, 顽拗性种子保存的最佳手段是超低温保存(李庆荣和郑郁善2003)。

种子的超低温保存方法操作简便, 一般经过常规干燥或直接投入液氮中即可达到保存目的。种子保存时, 含水量是关键因素。对大多数花卉种子来说, 自然含水量即在液氮中保存的安全含水量范围内, 液氮保存后种子仍有正常发芽率(刘燕等2001), 其生长势在短期内虽稍有减缓, 但稍后即恢复(Popova等2003; Nikishina等2001; 王君晖等1999)。不同植物种类进行超低温保存时

的最佳含水量不同, 适度脱水可以使种子达到最佳的保存成活率。苦槠[*Castanopsis sclerophylla* (Lindl.) Schott]种子及其离体胚通过适度脱水, 可大幅降低超低温保存过程中的质膜伤害, 试验得到的种子, 其保存的最佳含水量范围在12%~19%, 离体胚的最佳含水量为15% (郑郁善等2001), 此含水量范围也适用于闽粤栲[*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils.]和铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)种子及其原球茎的超低温保存(陈礼光和郑郁善2000; 王君晖等1999)。西班牙栗(*Castanea sativa* Mill.)种子是顽拗性种子, 适宜含水量为20%~24%, 超低温保存后的存活率达到63% (Corredoira等2004)。玻璃化法保存的白芨[*Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.]未成熟种子, 经预培养脱水后其萌发率可达80%以上(Hirano等2005)。Gonzalez-Benito等(1998)超低温保存西班牙特有矢车菊(*Centaurea hysopifolia* L.)和补血草(*Limonium dichotomum* Mill.)种子时, 在试验的21周内, 每周都从液氮中将种子取出10 min左右, 模拟种子库中的实际运行操作状况, 结果种子萌发并未受到影响。这为超低温种质库的建立提供了理论与实践支持。刘燕等(2001)曾对18个科47个种花卉种子(包括顽拗性种子和正常性种子)进行了超低温保存。这是近年来涉及花卉种类最多, 研究较系统的报道。

1.2.1.2 胚、胚轴与体细胞胚 许多木本植物的种子较大, 进行超低温保存不宜存活, 人们往往切取胚(Pritchard等1995)特别是胚轴(Gonzalez-Benito和Perez 1994; Pence 1992; Chaudhury和Chandel 1995)经无菌风干燥脱水后直接投入液氮中保存。印度紫檀(*Pterocarpus indaus*)胚(Krishnapillay等1994)、山茶花(*Camellia japonica* L.)体细胞胚和胚轴(Janeivo等1996)等超低温保存时采用此方案都取得较好的效果。闽粤栲离体胚作为超低温保存材料比种子的效果好, 保存后脱氢酶活性基本上能够维持超低温保存前的水平(陈礼光和郑郁善2000)。保存过程中若能辅以防冻剂[脱落酸(ABA)、蔗糖、二甲基亚砷(DMSO)]预处理, 则超低温保存的效果更佳(Beardmore和Whittle 2005; 陈礼光和郑郁善2000; 王君晖等1999; Hirano等2005)。欧洲栓皮栎(*Quercus robur* L.)的

胚培养物在半固体培养基上预培养后再用液氮保存, 其再生率超过88% (Valladares等2004; Martinez 2003)。银杏(*Ginkgo biloba* L.)胚较耐脱水, 含水量低于10%时, 整个胚仍能存活并正常生长, 只是生长势稍弱(徐刚标等2000)。超低温保存栎树(*Quercus faginea*)胚轴含水量降至21%时, 其存活率可达60% (Gonzalez-Benito和Perez-Ruiz 1992)。也有采用胚轴超低温保存成功的报道(徐刚标等2000; Bernard等2002)。

单倍体细胞在遗传上是不稳定的, 超低温保存可能是保持单倍体稳定性的有效途径。据Bajaj (1987)报道, 柑桔的珠心胚经过液氮保存后存活率为24%~28%。还有用脐橙(*Citrus sinensis* Osb.)珠心细胞作为超低温保存材料的报道(Kobayashi等1990)。目前的报道多为果树, 未见有观赏植物的相关报道。

通过离体培养技术, 许多观赏植物能大量同步地诱导形成胚状体, 用于植株再生研究和人工种子制备。应用超低温技术保存体细胞胚可能是观赏植物种质资源保存的理想方式(Tessereau等1994)。云杉属(*Picea*)植物体细胞胚冻成活率达到66% (Bomal和Tremblay 2000)。也有白云杉 [*Picea glauca* (Motnch) Voss.] (Park等1994)、石刁柏(*Asparagus officinalis* L.) (Uragami 1989)和山茶花(Janeivo等1996)体细胞胚冻存的报道。

人们在超低温保存研究中观察到, 许多植物种子超低温保存后发芽率有所提高(Touchell和Dixon 1993; 石思信等1989), 此现象也出现在花粉超低温保存研究中(石思信和田玥1989a)。其机制还有待进一步探讨。

种子保存还可用于野生种、野生近缘种及有些栽培种或品种的保存, 在长期保存花卉遗传变异中是较为理想的途径。有些花卉种或品种为保持其优良性状必须采用营养繁殖, 采用种子进行种质资源保存不太适宜, 可选用其它保存方式。

1.2.2 花粉 目前实现超低温保存的观赏植物花粉涉及约9个科13个属。花粉在观赏植物育种中可用来解决杂交时花期不遇和异地杂交困难等问题。花粉具有体积小、携带方便的特点, 用花粉超低温保存技术可以在不破坏种质资源的前提下, 最大限度的保存观赏植物种质资源。花粉经超低温

保存后其萌发率和生活力与新鲜花粉相比均没有明显改变。2002年, Sparks和Yates在液氮中保存美洲山核桃(*Carya illinoensis* K. Koch)花粉超过10年还有较高的萌发率。超低温保存几年后, 唐菖蒲(*Gladiolus hortulanus* Bailey.)花粉及月季(*Rosa chinensis* Jacq.)两个栽培变种的花粉生活力基本上不下降(Rajasekharan 1994; Marchant等1993)。尹曾芳等(1997)发现, 在几种不同的鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg]花粉保存方法中, 液氮超低温保存的花粉萌发率最高。超低温保存适度干燥的花粉可望成为一种永久性保存花粉的手段。

超低温保存花粉时含水量是一个关键的制约因素, 含水量应保持在一定水平, 细胞内可结冰水含量应是最少, 再加上一定的结合态水, 细胞结构不受损伤, 这样才能获得最好的超低温保存效果(石思信和田玥1989b)。不同种植物的花粉超低温保存的适宜含水量是有差异的。例如, 茄科的几个属(*Atropa*, *Nicotiana*和*Petunia*)的花粉含水量降低到35%~40%时, 液氮冻存后可存活(Bajaj等1987)。牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)花粉超低温保存的最适含水量范围为7%~11% (尚晓倩等2004), 而芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)、梅花(*Prunus mume* Sieb. & Zucc.)许多品种的花粉进行超低温保存时则不需任何特殊脱水处理, 直接投入液氮中保存效果的最好(尚晓倩2005; 刘燕和张亚利2004), 鹅掌楸、诸葛菜 [*Orychophragmus violaceus* (Linn.) O.E. Schulz]花粉超低温保存也是如此(尹增芳等1997; 赵云等1995)。银杏花粉的含水量低于12.7%时冻存于液氮中仍能存活, 花粉含水量高于20%时, 萌发率与生活力均明显下降(徐刚标等2000)。

通过花粉进行种质资源保存也有不尽如人意的一面: 花粉缺乏细胞质基因, 不能完整保持花卉遗传性, 并且有些品种没有花粉等。花粉超低温保存可作为花卉种质资源保存的必要补充, 与其它保存手段结合进行, 取得相得益彰的保存效果。

1.2.3 茎尖分生组织与芽 茎尖分生组织细胞分化程度小, 倍性一致, 作为超低温保存花卉种质的材料, 具有其独特的优越性——可直接形成完整的小植株, 并快速地进行无性繁殖, 减少材料的

遗传变异, 尤其对那些营养繁殖或易产生体细胞变异的观赏植物来说, 茎尖分生组织更是理想的保存材料(肖洁凝和黄学林 1999)。目前实现超低温保存的观赏植物茎尖分生组织与芽涉及约14个科20个属。

已经有多种观赏植物茎尖超低温保存取得了成功, 保存效果较为理想。Fukai等(1991)对石竹科(Caryophyllaceae)的5个属38个种和栽培种的茎尖进行液氮保存, 冻后均存活并发育成正常植株等。白三叶(*Trifolium repens* L.)茎尖组织经预培养, 浸入液氮中保存后其再生率达到80% (Yamada等1991)。矮生万代兰(*Vanda pumila* Hook. f.)茎尖原基预培养后, 脱水至相对含水量24%时浸入液氮保存, 再生率可达65.0%±7.5%, 再生植株在染色体数目和细胞结构方面均未表现出异常(Hai-yan和Kondo 1996)。楝树(*Melia azedarach* L.)茎尖超低温贮存后存活率达到67%~83%, 增殖率为43%~60% (Scocchi等2004)。超低温保存茎尖分生组织一般经预培养处理后成活率都有明显提高, 主要是在培养基中添加提高植物抗胁迫能力或降低含水量的物质(脯氨酸、蔗糖、二甲基亚砷等), 以及遮光或低温培养一段时间等方式(Ryynänen 1998)。经扩增片段长度多态性(AFLP)分析, 袋鼠爪(*Anigozanthos viridis*)茎尖材料在液氮中贮存不同时间后并未检测出与不经液氮储存的材料在多态性上有何差异, 贮存后茎尖恢复生长的比率可达85%, 与未经液氮贮存的材料之间没有显著差异(Turner等2001)。

超低温保存茎尖分生组织常用的方法有: (1)包裹脱水法(encapsulation-dehydration)。包裹脱水法最早出现于法国学者Dereuddre等(1990)对梨树茎尖超低温保存的研究中。一般用藻酸盐包埋样品, 在含一定浓度蔗糖(一般为 $0.3\sim 0.75\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基中预培养, 然后在通风橱中处理2~6 h或用硅胶处理, 通过空气蒸发脱水(吴雪梅和汤浩茹 2005)。优点在于脱水过程容易掌握, 程度缓和, 可简化脱水程序, 且能一次处理较多的材料, 不需对细胞有毒的冰冻保护剂。桑(*Morus alba* L.)茎尖用此方法冻存后成活率可达80% (Niino和Sakai 1992); 杜鹃花品种(*Rhododendron simsii* 'Nordlicht' Planch.)茎尖冻存后存活率达到40% (Hans等

2005)。(2)缓慢降温法(step-freezing)。以 $0.5\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度, 从 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降至一定的预冷温度, 再立即投入液氮, 在逐步降温的过程中, 细胞内水分可以有充分的时间流出细胞外结冰, 致使胞内水分降到最低限度, 可达到良好的脱水效果, 并能避免细胞内结冰。菊花(*Dendronthema* ssp.)茎尖以 $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的降温速度从 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降至 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 然后浸入液氮中, 贮存后茎尖组织存活率高于87%, 其中47%经组培后实现了再生(Fukai 1990); 龙胆(*Gentian axillary*)腋芽保存后存活率达到78%~90%, 绝大多数腋芽发育出正常的根与茎(Suzuki等1998)。(3)玻璃化法(vitrification)。玻璃化法在材料冰冻前需用高浓度的冰冻保护剂(plant vitrification solution, PVS)处理, 再投入液氮, 脱水样品玻璃化, 不产生冰晶, 此法有设备简单, 材料处理简便, 效果和重演性好等优点(蔡小宁等2004; Niino和Sakai 1992; Langis等1990; Lu和Steponkus 1994; Takagi等1997)。天仙子(*Hyoscyamus niger* L.)根尖以玻璃化法超低温处理后, 再生率为93.3%, 并发育成植株, 经检测, 生物碱的含量和成分与正常植株相比没有改变(Jung等2001); 采用改良的超低温玻璃化冻存法成功保存6种澳大利亚特有植物种(血皮草科Haemodoraceae 袋鼠爪属的*Anigozanthos humilis* ssp. *chrysanthus* Hopper; *Anigozanthos kalbarriensis* Hopper; *Anigozanthos viridis* ssp. *terraspectans* Hopper和*Conostylis*属的*Conostylis dielsia* ssp. *teres* Hopper; *Conostylis micrantha* Hopper; *Conostylis wonganensis* Hopper) (Turner等2001); 补血草(*Limonium* cv. Blue Symphonet)采用包裹玻璃化法、玻璃化法和包裹脱水法3种方式超低温贮存后的存活率基本一致, 茎尖再生率达到70%~75% (Matsumoto等1998)。

玻璃化法采用的冰冻保护剂(plant vitrification solution, PVS)浓度很高, 对植物材料的毒性很大(Matsumoto等1994, 1995), 需严格控制脱水过程及保护剂的渗透性, 且玻璃化法较难在同一时间内处理大量材料。包埋脱水法与玻璃化法相比, 冻存后恢复生长较慢, 脱水所需时间较长, 有些植物不适宜使用, 得到的存活率和再生率都较低。缓慢降温法操作起来需要较为昂贵的程控

降温仪, 程序较为复杂。总之, 每种超低温保存方法均有其优点和可取之处, 应根据所选材料的特点和试验的实际情况来选择最佳的保存方案。

超低温保存芽也是保存无性繁殖花卉种质的方便途径。据报道, 桑树芽经液氮保存后, 能够再生正常植株(王利民和张晓义 1988; Niino 等 1993; Yakuwa 和 Oka 1988)。Kuoksa 和 Hohtola (1991)以冷冻方法保存欧洲赤松(*Pinus sylvestris*L.)的芽, 冻后存活率高达 90%~100%。Jokipii 等(2004)的试验证明, 最合适的超低温保存欧洲山杨×颤杨(*Populus tremula*L. × *P. tremuloides*Michx.)的方法是慢冻法贮存其休眠芽, 化冻后芽的再生率可达 72%~96%。RAPD 分析表明, 超低温储存的材料其遗传稳定性可得到保存。

1.2.4 悬浮细胞和愈伤组织 悬浮细胞和愈伤组织是体细胞胚和植株再生的来源, 也是植物生物技术的实验材料。1973年, Nag 和 Street 首次成功实现了胡萝卜的悬浮细胞的超低温保存。采用包裹脱水法可以实现葡萄(*Vitis vinifera*L.)悬浮细胞超低温保存, 包裹后的含水量降至 20.6%时, 冻存后的悬浮细胞活性最强。Wang 等(2002)发现, 生长前期细胞鲜重增加较缓慢, 超低温保存对胚发生及其后的萌芽生长有促进作用, 冻后细胞再生和叶片形态与正常植株没有差别。有试验发现, 冻存细胞恢复生长前有一段 5 d 左右的停滞期, 有人在欧亚唐松草(*Thalictrum minus*L.)悬浮细胞冻存中也发现此现象, 停滞期为 3~7 d (Baskakova等2003)。石刁柏(*Asparagus officinalis*L.)悬浮细胞经玻璃化法冻存后的存活率达到80%~90%, 其再生率与未冻存细胞没有差异(Nishizawa 等 1993)。

悬浮细胞的培养时间与培养时的最初密度都是影响冻存后细胞存活率的关键因素。试验证实, 欧洲云杉[*Picea abies*(L.) Karst.]、北美云杉(*Picea pungens* Engelm.)悬浮细胞培养时间、最初密度与冻存后存活率及胚的再生率相关(Find等 1998)。解冻后, 悬浮细胞恢复生长所用的培养基成分需做适当改变, 如薰衣草(*Lavandula vera* DC.)细胞冻后恢复生长时, 培养基中加入活性炭后细胞存活率大大提高(Kuriyama 1990)。

在愈伤组织冻存中, 缓慢降温法冻存对中华

猕猴桃(*Actinidia chinensis*Planch.)的愈伤组织伤害最小, 产生伤害的温度为-40~-20℃, 愈伤组织细胞投入液氮的安全温度范围为-75~-60℃, 如在此温度范围之外投入液氮中则细胞活力显著下降(李嘉瑞等 1996)。郭延平和李嘉瑞(1995)研究猕猴桃(*Actinidia deliciosa*C. F. Liang)愈伤组织的超低温保存中也证明了这一点, 经预培养后以 1℃·min⁻¹的降温速度降至-75~-60℃后投入液氮中保存, 存活率最高可达 86.7%。银杏愈伤组织用缓慢降温法冻存后的存活率可达 60%以上(徐刚标等 2001)。目前已初步确定, 香雪兰(洋玉簪 *Freesia refracta*Klatt.)的愈伤组织适用快速冷冻法的超低温保存(杨文等1999)。黄花蒿(*Artemisia annua*L.)采用优化后的超低温保存程序为预培养→25℃预处理→投入液氮中保存, 冻存愈伤组织后的最高存活率可达 87% (An 等 2003)。

1.2.5 其它 除以上所述的各种器官和组织可以用于观赏植物种质资源的超低温保存外, 还有原生质体、类原球茎(兰科植物)等材料可用超低温保存。

原生质体具有多种用途, 特别是在花卉育种中有广阔的应用前景, 它是细胞杂交和基因工程的基础材料。对原生质体的超低温保存有很大的优越性, 它缺少细胞壁, 冰冻危害程度可降低, 能得到更高的存活率。但原生质体的超低温保存要求较高, 花卉原生质体的超低温保存报道较少。马峰旺和李嘉瑞(1998)的研究报道, 一些杏(*Prunus armeniaca*L.)品种的悬浮培养物分离的原生质体经超低温保存后成活率可达 40%。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*Wall. ex Lindl.)原生质体经玻璃化保护剂(plant vitrification solution 2, PVS2)预处理并冻存后的存活率达到 48% (陈勇 2000)。

此外, 采用空气干燥法可成功地超低温保存白花石斛(*Dendrobium nobile*Lindl. cv. 'albiflorum')的类原球茎, 冻存前的最佳含水量范围为 11%~33% (Bian 等 2002)。还有以花粉胚作为超低温保存材料的报道(Bajaj 1987)。

2 结语

自从认识到观赏植物种质资源保存的重要性与必要性后, 迄今人们曾从不同方面、不同层次对此进行了研究。建立在离体培养技术基础上的

超低温保存技术, 在种质资源保存中独具潜力与优势。经过20多年的发展已取得了一些令人鼓舞的进展, 尤其是上世纪80年代后期, 植物种质玻璃化保存的成功, 为解决复杂的组织和器官的超低温保存展示了广阔的前景。我国是从上世纪80年代中期开始这方面工作的。

超低温保存是低温生物学中比较新的领域, 有许多问题需要解决。首先, 超低温保存是一个非常复杂的过程, 不同植物和同一植物不同类型的材料, 它们的超低温保存的难易可能有不同, 所以一定要根据材料本身的特性, 对影响超低温保存的因素进行研究, 如预培养条件的研究可通过改变材料的生理状态, 增加细胞分裂与分化的同步化, 减少细胞内自由水含量, 增加保护性物质, 使其能够经受起超低温保存过程中的高度脱水 and 剧烈的温度变化等逆境, 从而获得较高的保存成活率。其次, 超低温保存过程涉及到一系列的胁迫, 它们有可能作为一种选择, 对不同基因型的材料产生选择效应, 因此关于超低温保存后材料的遗传稳定性还需进一步探讨。

今后, 超低温保存观赏植物种质资源应该对以下工作继续探讨: (1) 围绕降低保存材料含水量, 寻找不同观赏植物种及品种的最佳预冷温度及速率、最佳冷冻保护剂品种及浓度组合, 提高保存的成功率, 并探索其规律; (2) 加强超低温保存后遗传性状的分析, 例如: 后代的形状特征及生长发育状况, 后代染色体的分析, 同工酶谱的分析, 应用现代分子生物学技术检测超低温保存前后植物基因组DNA的差异; (3) 采用电子顺磁共振波谱测定法和测定Ca²⁺的细胞化学法等技术提高试验预见性。相信随着研究的不断深入和技术的进步, 不同的观赏植物种质都能找到适宜的超低温保存方法, 并最终建成观赏植物种质资源超低温保存库。

参考文献

- 蔡小宁, 陈舒泛, 陈俊, 刘少华(2004). 小球藻的玻璃化超低温保存法. 植物生理学通讯, 40 (5): 599~601
- 陈礼光, 郑郁善(2000). 闽粤栲种子和离体胚超低温保存效果研究. 江西农业大学学报, 22 (4): 571~575
- 陈勇(2000). 铁皮石斛原生质体的玻璃化法超低温保存. 温州师范学院学报, 21 (3): 40~41
- 郭延平, 李嘉瑞(1995). 中华猕猴桃愈伤组织细胞的超低温伤害研究. 西北农业大学学报, 23 (2): 10~14
- 李嘉瑞, 郭延平, 王民柱(1996). 猕猴桃愈伤组织的超低温保存. 果树科学, 13 (2): 88~91
- 李庆荣, 郑郁善(2003). 顽拗性种子种质超低温保存研究进展. 江西农业大学学报, 25 (4): 608~612
- 梁永恒, 黄上志, 傅家瑞(1999). 植物种质资源的保存. 植物生理学通讯, 35 (3): 244~250
- 刘燕, 张亚利(2004). 梅花花粉超低温保存研究. 北京林业大学学报, S1
- 刘燕, 周慧, 方标(2001). 园林花卉种子超低温保存研究. 北京林业大学学报, 23 (4): 39~44
- 马锋旺, 李嘉瑞(1998). 杏原生质体的超低温保存. 园艺学报, 25 (4): 329~332
- 潘会堂, 张启翔(2000). 花卉种质资源与遗传育种研究进展. 北京林业大学学报, 22 (1): 81~86
- 尚晓倩(2005). 芍药花粉超低温保存研究[硕士学位论文]. 北京: 北京林业大学园林学院
- 尚晓倩, 陶清波, 刘燕(2004). 牡丹花粉超低温保存技术研究. 见: 张启翔主编. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 193~196
- 石思信, 江朝余, 陶梅(1989). 利用液氮保存植物种子. 见: 中国农业科学院作物科学研究所编. 作物种质资源保存研究论文集. 北京: 学术书刊出版社, 129~134
- 石思信, 田玥(1989a). 黑麦(*Secale cereale*)花粉长期冷冻保存试验初报. 见: 中国农业科学院作物科学研究所编. 作物种质资源保存研究论文集. 北京: 学术书刊出版社, 92~95
- 石思信, 田玥(1989b). 超低温(-196℃)中保存一年的黑麦花粉生活力. 植物生理学报, 15 (4): 393~396
- 王君晖, 张毅翔, 刘峰, 黄纯农, 葛霁光(1999). 铁皮石斛种子、原球茎和类原球茎体的超低温保存研究. 园艺学报, 26 (1): 59~61
- 王利民, 张晓义(1988). 桑冬芽超低温保存. 华北农学院学报, 3 (1): 103~106
- 王郁民, 李嘉瑞(1996). 果树种质的超低温保存. 自然杂志, 14 (1): 19~23
- 吴诗光, 谭光轩, 王红星(1999). 水稻组织培养物超低温保存研究的现状. 信阳师范学院学报(自然科学版), 12: 238~241
- 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 (2): 238~245
- 肖洁凝, 黄学林(1999). 茎尖和芽的超低温保存. 生物工程进展, 19 (5): 46~51
- 徐刚标, 何方, 黄晓光(2000). 银杏种质离体保存的研究I. 银杏花粉贮存. 中南林院学报, 20 (1): 27~30
- 徐刚标, 易文, 李美娥, 郑从义(2001). 银杏愈伤组织超低温保存的研究. 林业科学, 37 (3): 30~34
- 徐刚标, 易文, 何方, 陈良昌, 李美娥, 郑从义(2000). 银杏种质离体保存的研究II. 银杏胚超低温保存. 中南林学院学报, 20 (2): 7~10
- 杨文, 刘春艳, 卜秀玲, 栾恒淳, 王丽(1999). 香雪兰愈伤组织超低温保存的研究. 东北师范大学学报, 4: 70~71
- 尹曾芳, 樊汝文, 尤录祥(1997). 鹅掌楸花粉保存条件的比较研究. 江苏林业科技, 24 (2): 5~8
- 赵云, 王茂林, 王天叫(1995). 诸葛菜花粉的低温保存研究. 西南农业学报, 8 (3): 65~69

- 郑光植, 何静波, 王世林 (1983). 三分三愈伤组织及其悬浮细胞的冰冻贮藏. 植物学报, 25 (6): 513~517
- 郑郁善, 陈礼光, 王舒凤, 董林水, 陈卓梅 (2001). LN₂保存处理后苦楮种子的膜透性. 福建农业大学学报, 30 (3): 315~319
- An C, Wang X, Yuan X, Zhao B, Wang Y (2003). Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua* L. callus. Biotechnol Lett, 25: 35~38
- Bajaj YPS (1987). Effect of super-low temperature on excised anthers and pollen-embryos of *Atropa*, *Nicotiana* and *Petunia*. Phytomorphology, 28: 171~176
- Baskakova OY, Voinkova NM, Nikishina TV, Osipova EA, Popov AS, Zhivukhina EA (2003). Freezing resistance and cryopreservation of cell strains of *Rhaponticum carthamoides* and *Thalictrum minus*. Russ J Plant Physiol, 50 (5): 666~671
- Beardmore T, Whittle C-A (2005). Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. Tree Physiol, 25 (8): 965~972
- Bernard F, Shaker-Bazarnov H, Kaviani B (2002). Effects of salicylic acid on cold preservation and cryopreservation of encapsulated embryonic axes of Persian lilac (*Melia azedarach* L.). Euphytica, 123: 85~88
- Bian HW, Wang JH, Lin WQ, Han N, Zhu MY (2002). Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. J Plant Physiol, 159 (10): 1139~1145
- Bomal C, Tremblay F-M (2000). Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea* species provide suitable material for direct plantlet regeneration and germplasm storage. Ann Bot, 86: 177~183
- Chaudhury R, Chandel K (1995). Cryopreservation of embryonic axes of almond (*Prunus amygdalus* Batsch) seeds. Cryo-Lett, 16 (1): 51~56
- Corredoir E, San-José MC, Ballester A, Vieitez AM (2004). Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. Cryoletters, 25 (1): 33~42
- Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M (1990). Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effect of previous cold hardening. C R Acad Sci Paris, 310: 317~323
- Find JI, Kristensen MMH, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998). Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway spruce and Sitka spruce. Plant Cell Tiss Org Cult, 53: 27~33
- Fukai S, Goi M, Tanaka M (1990). Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. Sci Hortic, 45 (1~2): 167~174
- Fukai S, Goi M, Tanaka M (1991). Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. Euphytica, 56: 149~153
- Gonzalez-Benito ME, Fernandez-Illoriente F, Perez-Garcia F (1998). Interaction between cryopreservation, rewarming rate and seed humidification on the germination of two Spanish endemic species. Ann Bot, 82: 683~686
- Gonzalez-Benito ME, Perez-Ruiz C (1992). Cryopreservation of *Quercus faginea* embryonic axes. Cryobiology, 29 (6): 685~690
- Gonzalez-Benito ME, Perez-Ruiz C (1994). Cryopreservation of embryonic axes of two cultivars of hazelnut (*Corylus avellana* L.). Cryo-Lett, 15: 41~46
- Hai-yan N, Kondo K (1996). Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. Plant Sci, 118 (2): 195~201
- Hirano T, Godo T, Mii M, Ishikawa K (2005). Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. Plant Cell Rep, 23 (8): 534~539
- Janeivo LV, vieitez A, Ballester A (1996). Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axe of *Camellia japonica* L. Plant Cell Rep, 15 (9): 699~703
- Jokipii S, Ryyänen L, Kallio P, Aronen T, Häggman H (2004). A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx. Plant Sci, 166 (3): 799~806
- Jung DW, Sung CK, Touno K, Yoshimatsu K, Shimomura K (2001). Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification. J Plant Physiol, 158 (6): 801~805
- Kartha KK (1994). Cryopreservation and germplasm storage. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds). Plant Cell and Tissue Culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 195~230
- Kobayashi S (1990). Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. Plant Cell Tiss Org Cult, 23: 15~20
- Krishnapillay B, Marzalina M, Alang ZC (1994). Cryopreservation of whole seeds and excised embryos of *Pterocarpus indicus*. J Tropical Forest Sci, 7 (2): 313~322
- Kuoksa T, Hohtola A (1991). Freezing-preservation of buds from Scots pine trees. Plant Cell Tiss Org Cult, 27: 89~93
- Kuriyama A (1990). Effect of post-thaw treatment on the viability of cryopreservation *Lavandula vera* cells. Cryo-Lett, 11: 171~178
- Langis R, Schnabel Preikstas BJ, Earle FD, Steponkus PL (1990). Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification. Cryobiology, 27: 657~658
- Lu M, Steponkus PL (1994). Cryopreservation of solanum shoot tip by vitrification. Cryobiology, 31: 569
- Marchant R, Powe JB, Davey MR, Chartier-Hollis JM, Lynch PT (1993). Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. Euphytica, 66: 235~241
- Martinez MT, Ballester A, Vieitez AM (2003). Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. Cryobiology, 46: 182~189
- Matsumoto T, Sakai A, Yamada K (1994). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Rep, 13: 442~446
- Matsumoto T, Sakai A, Yamada K (1995). Cryopreservation of *in*

- in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 41: 237~241
- Matsumoto T, Takahashi C, Sakai A, Nako Y (1998). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid static by three different procedures. *Sci Hortic*, 76: 105~114
- Nag KK, Street HE (1973). Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 245: 270~272
- Niino T, Sakai A (1992). Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci*, 87: 199~206
- Niino T, Shirata K, Oka S (1993). Viability of mulberry winter buds cryopreserved for 5 year at -135°C . *J Seric Sci Jpn*, 64 (4): 370~374
- Nikishina TV, Popov AS, Kolomeitseva GL, Golovkin BN (2001). Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russ J Plant Physiol*, 48 (6): 810~815
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci*, 91 (1): 67~73
- Park YS, Pond SE, Bonga JM (1994). Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*) genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, ermination, and cryopreservation. *Theor Appl Genet*, 89: 742~750
- Pence VC (1992). Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Cas-tanea* and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology*, 29: 391~399
- Popova EV, Nikishina TV, Kolomeitseva GL, Popov AS (2003). The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russ J Plant Physiol*, 50 (5): 672~677
- Pritchard HW, Tompsett PB, Manger K, Smidt WJ (1995). The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos. *Ann Bot*, 76: 79~88
- Rajasekharan PE (1994). Freeze preservation of gladiolus pollen. *Euphytica*, 80 (1~2): 105~109
- Roberts EH (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol*, 1: 499~514
- Ryynänen L (1998). Effect of abscisic acid, cold hardening, and photoperiod on recovery of cryopreserved *in vitro* shoot tips of silver birch. *Cryobiology*, 36: 32~39
- 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
- Sparks D, Yates IE (2002). Pecan pollen stored over a decade retains viability. *HortScience*, 37 (1): 176~177
- Suzuki M, Ishikawa M, Akihama T (1998). A novel preculture method for the induction of desiccation tolerance in gentian axillary buds for cryopreservation. *Plant Sci*, 135: 69~76
- Takagi H, Thinh NT, Islam OM, Senboku T, Sakai A (1997). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep*, 16: 594~599
- Tessereau H, Florin B, Meschine MC, Thierry C, Petiard V (1994). Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. *Ann Bot*, 74: 547~555
- Touchell DH, Dixon KW (1993). Cryopreservation of seed of Western Australian native species. *Biodivers Conserv*, 2: 594~602
- Turner S, Krauss S, Bunn E, Senaratna T, Dixon K, Tan B, Touchell D (2001). Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. *Plant Sci*, 161: 1099~1106
- Turner SR, Senaratna T, Bunn E, Tan B, Dixon KW, Touchell DH (2001). Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Ann Bot*, 87: 371~378
- Uragami A (1989). Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep*, 8: 418~421
- Valladares S, Toribio M, Celestino C, Vieitez AM (2004). Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *Cryo-Lett*, 25 (3): 177~186
- Verleysen H, van Bockstaele E, Debergh P (2005). An encapsulation-dehydration protocol for cryopreservation of the azalea cultivar 'Nordlicht' (*Rhododendron simsii* Planch.). *Sci Hortic*, 23: 307~311
- Wang Q, Gafny R, Sahar N, Sela I, Mawassi M, Tanne E, Perl A (2002). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Sci*, 162: 551~558
- Yakuwa H, Oka S (1988). Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen. *Ann Bot*, 62: 79~82
- Yamada T, Sakai A, Matusumura T (1991). Cryopreservation of apical meristems of white clover. *Plant Sci*, 78: 81~87