

技术与方法 Techniques and Methods**植物组织培养物的超低温保存**

苗琦 谷运红 王卫东* 秦广雍

郑州大学物理工程学院, 离子束生物工程省重点实验室, 郑州 450052

The Cryopreservation of Plant Tissue Culture Materials

MIAO Qi, GU Yun-Hong, WANG Wei-Dong*, QIN Guang-Yong

Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, School of Physical Science and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

提要 对超低温保存技术的研究历史、基本原理、方法、影响因素和国内外植物组织培养物超低温保存的研究进展作了介绍, 并对这一问题的前景作了展望。

关键词 植物组织培养物; 超低温保存

组织培养技术是种质保存的有效途径之一, 利用这种技术可迅速建立植物无性繁殖系, 其缺点在于长期继代培养过程中要发生细胞学变化, 导致染色体变异和基因突变, 增加遗传的不稳定性。在超低温条件(一般指液氮低温, -196°C)下, 几乎所有的细胞代谢活动和生长过程都停止进行, 但细胞活力和形态发生的潜能却可保存, 因而细胞培养物的遗传稳定性得以保存。将超低温冷冻保存技术和组织培养技术结合起来, 可望成为保存植物种质的最佳办法。

冰冻生物材料的研究是从低温保护附加剂的有效利用开始的。1959年, 应用二甲基亚砜(DMSO)作为冷冻保护剂初次成功, 但直到1968年Quatrano才用它作为冷冻植物组织培养细胞的低温保护剂。1973年, Nag和Street^[1]将胡萝卜悬浮培养细胞保存在液氮中一段时间后再培养时, 观察到细胞仍可生长, 这是超低温保存植物材料的首次报道。自此以后, 许多国家的有关实验室相继开展了植物组织和细胞保存以及种质库建立的研究, 并取得了一定进展, 超低温保存技术也日趋完善。1979年, Sala等^[2]报道了水稻悬浮细胞的超低温保存, 他们观察到冷冻保存化冻后细胞可恢复生长。殷晓辉等^[3]在1994年由疣粒野生稻幼穗离体培养所产生的愈伤组织超低温研究中, 成功地获得了冻后再生植株, 这为野生稻优质资源的保存提供了有效途径。迄今为止, 关于植物

组织培养物超低温保存的报道已不少。本文就植物组织培养物超低温保存方法的研究概况作一概述。

1 植物组织培养物的超低温保存

超低温保存是指在 -80°C 以下的超低温环境中保存种质资源, 是70年代发展起来的一套现代生物学保存技术。常以液氮为冷源, 因此超低温保存又称液氮保存。

植物材料的特性和材料的预培养对超低温保存植物组织培养物的成活关系很大。另外, 低温冰冻会使细胞内水结冰, 造成细胞结构不可逆的破坏, 导致死亡。组织培养物含大量的水分, 因此, 冰冻防护剂的使用、降温及解冻方法是植物组织培养物保存的几个关键因素。目前, 此问题的研究主要在以下几方面进行。

1.1 材料特性 由于植物基因型、抗冻性及器官、组织和细胞年龄、生理状态等^[4]的不同, 不同材料冷冻后细胞存活率差别很大。冷冻后存活率的巨大差别不仅表现在种间, 而且同种的不同品种间也不同。Ulrich^[5]对6个栽培稻品种的愈伤组织进行超低温保存的结果表明, 不同品种的保存效果是不相同的。

收稿 2004-07-08 修定 2004-12-10

资助 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B-03)。

*通讯作者(E-mail: wwd413@zzu.edu.cn, Tel: 0371-7767728)。

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重要因素, 细胞质浓、无液泡、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, 因此, 取生长延滞后期或指数生长期的细胞进行冷冻能得到较高的存活率; 冻后细胞的恢复生长依赖于保持分裂能力的细胞密度, 高密度细胞是细胞存活力的重要指标; 此外, 细胞团体积大小本身对冷冻保存效果也有影响, 体积过大或过小(如游离细胞)对冷冻保存效果均不好。刘贤旺等^[6]在超低温保存杜仲愈伤组织时发现, 一周龄的杜仲愈伤组织抗冻能力较低, 培养至第2周时, 抗冻能力最强, 延长培养时间, 抗冻能力呈下降趋势; 他们还在超低温保存半枫荷(*Altingia chingii* Mete)愈伤组织时发现三周龄的半枫荷愈伤组织为超低温保存的最佳材料^[7]。水稻培养细胞的超低温保存以幼龄的培养细胞存活率为高, 液体悬浮培养细胞以培养1周为宜, 固体培养基培养的愈伤组织以2周为宜, 胚状体的保存也是如此^[8]。Cornejo等^[9]发现水稻愈伤组织培养时间长短对保存效果影响很大, 8个月的愈伤组织保存效果和复温后培养物再生能力明显不如4个月的愈伤组织。杨文等^[10]发现年龄在15~20 d的香雪兰愈伤组织的抗冻能力最强, 他们认为选择这个时期的香雪兰愈伤组织作为超低温保存材料较为适宜。

1.2 预培养 预培养是改善材料生理状态的有效方法, 离体培养物在冷冻前进行预培养能增强细胞的抗寒力。预培养的目的是提高分裂细胞的比例, 减少细胞内自由水含量, 增强细胞的抗冻力。方法包括: 增加预培养基中的糖浓度, 提高渗透压, 以减少细胞内自由水含量; 或在预培养基中加入诱导抗寒力的物质或冰冻保护剂, 如山梨醇、蔗糖、丙二醇、DMSO、脱落酸(ABA)等, 此法已在许多植物离体培养物保存中获得成功, 是目前应用最广泛的一种预处理方法。毛地黄细胞培养物在加有海藻糖的培养基中预培养后, 不仅存活率高, 而且细胞开始恢复生长所需的修复时间也极短^[11]; 未成熟的春小麦合子胚在含0.5 mg·L⁻¹ ABA的半固体培养基上预培养10 d后, 不用加冰冻保护剂便能得到高存活率^[12]。陈勇等^[13]把瓯柑愈伤组织在含5% DMSO的MS培养基上预

培养5 d后获得83.10%的冻后愈伤组织存活率。

将被保存的材料暴露于一定的低温环境中, 使其接受低温锻炼, 也是一种常用的预处理方法, 称为低温预处理。对某些植物材料, 尤其是对低温敏感的植物来说, 超低温保存显得尤为重要。预培养与超低温保存结合使用能进一步提高冻后的细胞存活率。Niino等^[14]将离体的樱桃茎尖接种在MS+0.7 mol·L⁻¹蔗糖培养基上于5℃低温条件下预培养1 d, 冻存后存活率高达80%以上; Leena^[15]以超低温保存银杏离体茎尖时发现, 用附加10⁻¹⁴ mol·L⁻¹ ABA的WPM培养基上于5℃低温条件下低温锻炼28 d, 可显著提高冻后细胞存活率。

1.3 冰冻保护剂 冰冻保护剂能减少超低温保存造成的伤害。除一些对脱水极不敏感的材料以外, 几乎所有的植物材料都需经过冰冻保护剂的处理。保护剂的作用机制是增大膜对水分的通透性, 促进细胞外冰冻造成的脱水效果, 降低细胞内水分冰点温度, 保护蛋白质和酶类。选好冰冻保护剂是保证细胞进行超低温处理成功的关键。理想的冰冻保护剂应是在超低温保存过程中能保护组织免受冰冻伤害, 而且, 应极易溶于水, 对细胞的毒性低, 化冻后容易从组织中洗掉。常用的冰冻保护剂大体分两类: 一类是能穿透细胞的低分子量化合物(DMSO)以及各种糖类等; 另一类是不能穿透细胞的高分子量化合物(如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯二醇等)。在各种保护剂中, DMSO是广泛采用的一种。Sakai^[16]较详细地研究了DMSO的使用浓度, 认为其较适宜的浓度为5%~10%。除了目前经常使用的保护剂外, Crowe等^[17]发现: 海藻糖能与磷脂相互作用而稳定细胞膜, 因而也用作保护剂; Bhandal^[18]用冰冻保护剂海藻糖成功地保存了胡萝卜、烟草等细胞培养物; 脯氨酸在冰冻-解冻过程中能稳定蛋白质, 在水稻超低温保存中也是一种有效的冰冻保护剂^[19]。复合保护剂比单一保护剂的效果好, 这是因为复合保护剂可以减轻或消除单一保护剂成分对细胞产生的毒害作用, 而且各种保护剂的作用可以相互协调, 共同作用。如Bajaj^[20]用10% DMSO+20%葡萄糖保存水稻细胞悬浮培养物获得成功; 徐刚标等^[21]用10% DMSO+8%水解乳蛋白及10% DMSO+0.5 mol·L⁻¹山梨醇也成功地保存了银杏愈伤

组织; Ulrich等^[22]用10% DMSO+8% 葡萄糖+10% 聚乙二醇(PEG6000^[23]、PEG8000^[24]较常用)的复合保护剂得到的枣椰树愈伤组织存活率接近100%; 陈书安等^[25]用15% DMSO+15% 乙二醇+30% 甘油的0.4 mol·L⁻¹蔗糖液的复合保护剂, 在15℃下处理10 min得到的水母雪莲愈伤组织, 经玻璃化法冻存后的存活率为54.2%; 马锋旺和李嘉瑞^[26]认为, 单用DMSO不适合做杏愈伤组织超低温保存的冰冻保护剂, 而以DMSO与山梨醇或葡萄糖混合处理对杏愈伤组织超低温保存较适宜。

1.4 降温冰冻方法 组织培养物的超低温保存中, 常用的降温方法主要有以下几种:

1.4.1 快冻法 快冻法是将材料从0℃或其它预处理温度中直接投入液氮内。据报道, 此种方法降温速度达到300~1 000℃·min⁻¹^[27], 也有报道称降温速度达到1 000℃·min⁻¹以上^[28], 这样可使细胞内的水还未来得及形成冰晶中心就降到-196℃的安全温度, 从而可避免细胞内结冰的危险, 使细胞内呈“玻璃化”状态。此法简单, 不需要复杂、昂贵的设备, 但对含水量较高的培养物效果并不好, 采用此法成活率较高的报道很少。据报道, 用此法超低温保存光棘豆(*Oxytropis leptophylla* DC)愈伤组织^[29]和红豆杉愈伤组织^[30]时, 均发现冻后再培养的存活率接近于零。

1.4.2 慢冻法 慢冻是指以0.1~10℃·min⁻¹的降温速度从0℃降到-100℃左右再立即浸入液氮。降温过程中, 细胞内水分可以有充分的时间不断流到细胞外结冰, 使细胞内水分含量减少到最低限度, 达到良好的脱水效果, 从而避免细胞内结冰。一般来说, 植物组织培养物以采用慢冻法为宜, 采用的降温速度多为0.5~2℃·min⁻¹。

1.4.3 逐级冰冻法 培养物预冷却到-20、-50、-70、-100℃停留一段时间后浸入液氮中。据报道, 生物细胞在有防冻剂存在的降温过程中, 随着温度的降低, 至-10℃时细胞外介质结冰已基本完成, 而细胞内尚未结冰, 形成细胞内外的蒸气压差, 只要降温速率不超过连续脱水的速度, 这样细胞内水不断向细胞外扩散, 细胞原生质浓缩, 从而降低细胞内含物的冰点, 这种逐渐除去细胞内水分的过程称为“保护性脱水”。冷却过程中停留一段时间可以诱导细胞内水溶液向外扩散

结冰, 使细胞对外产生蒸气压差, 进行保护性脱水; 否则细胞外可能产生非均一的冰晶, 从而对细胞产生严重伤害。这种冰冻方法在多数培养物超低温保存中已获得成功。多数报道认为, 慢冻材料降温至某一温度并停留一段时间是必要的。徐刚标等^[21]发现, -10和-35℃处停留一段时间能明显提高冻存后的银杏愈伤组织的相对存活率; 但也有研究认为, 在-10℃中停留15 min保存光棘豆愈伤组织比用慢冻法的效果差^[29], 这可能是因为在-10℃中停留会造成过度脱水。这说明, 采用何种冰冻保存方法应因材料而异。

将慢冻法与逐级冰冻法结合使用能得到较好的冰冻保存效果。马锋旺和李嘉瑞^[26]在保存杏愈伤组织时, 开始以1℃·min⁻¹速度降温至-40℃, 停留2 h后投入液氮中保存, 可获得80.5%的存活率。钱士忠和赵树仁^[29]保存光棘豆愈伤组织时, 以0.5℃·min⁻¹的速度降至-40℃, 停留2 h后投入液氮中, 冻后存活率可高达93.7%。

1.4.4 干冻法 采用无菌空气流、干燥硅胶或饱和溶液表面的气相等对材料进行脱水处理后快速将材料投入液氮贮存, 或用冰冻保护剂处理后析出材料表面水分, 再以金箔密封进行慢冻后置于液氮中保存。如果脱水足够, 细胞内溶液浓度就会变得很高而易进入玻璃化状态。这种方法对某些愈伤组织是适合的, 但对大多数对脱水敏感的组织培养物则是很困难的。

1.4.5 玻璃化法 玻璃化法是由Sakai等^[31]建立的一种简单高效的冰冻保存方法。此法是将生物材料用一定配方的复合保护剂处理后快速投入液氮中保存。通过保护剂处理可避免胞内外冰晶形成, 使组织各部分都进入一个相同的玻璃化状态, 这是目前在一些较复杂组织中常用的一种有效超低温保存方法, 也是近年来发展较快的一种冻存方法。玻璃化法冻存采用的复合保护剂被称为玻璃化溶液(vitrification solution, VS)。目前用得最多的植物材料玻璃化溶液(plant vitrification solution, PVS)是PVS₂: 30% (W/V)甘油+15% (W/V)乙二醇+15% (W/V)DMSO+0.4 mol·L⁻¹蔗糖, 保存的材料在0~25℃中处理一段时间后直接投入液氮中保存; 现已有人用PVS₄: 35% (W/V)甘油+20% (W/V)乙二醇+0.6 mol·L⁻¹蔗糖替代PVS₂, 这可避免直接接

触DMSO,从而减少毒害作用^[32]。玻璃化冻存的关键在于严格控制植物材料在玻璃化保护剂中的脱水时间,材料的最佳脱水时间具有种的特异性^[33]。总之,此法简单易行、省时省力,且冻存效果好。黄纯农等^[34]用玻璃化法冻存大麦悬浮细胞时发现,冷冻后细胞的TTC(氯化三苯四氮唑)活性很高。但此法对材料毒害较大,易造成过分脱水。为解决这一问题,人们采用逐步冷冻法与玻璃化法相结合保存材料,已获得成功^[6,23,29,30]。为了进一步降低组织细胞含水量,在玻璃化溶液脱水处理前有人还往往采用一个过渡性的预处理阶段。预处理能增加保护性成分向细胞渗入,减轻细胞在脱水时的损伤,有利于存活率的提高^[35]。周小梅等^[36]在超低温保存玉米组培材料时发现,未经过渡液处理的玉米悬浮细胞的存活率只有17.2%,而经过渡液处理5 min后存活率可达85.2%;陈勇等^[13]在室温下用60% PVS₂对瓯柑愈伤组织进行过渡性预处理20 min后,再在0℃中用100% PVS₂处理40 min,可得到85.62%的冻后愈伤组织存活率。

1.4.6 包埋脱水法 包埋脱水法是将植物材料用海藻酸钙包埋后,先在含高浓度蔗糖的培养基中脱水,再用无菌空气流或干燥硅胶脱水,然后投入液氮中保存,若用玻璃化保护剂辅助脱水,也叫包埋玻璃化法。包埋可保护材料,使之能经受对裸露材料致死性的伤害。此法可省去传统的慢速降温方法对昂贵降温仪器的依赖,从而避免玻璃化法中高浓度保护剂对材料的毒害作用,且一次能处理较多的材料,这在对低温敏感的植物材料中有很大的应用潜力,但也存在脱水慢、成苗率低和组织恢复生长慢等缺点。现在一些植物的悬浮细胞、愈伤组织和胚性愈伤组织采用包埋脱水法保存材料获得成功的已有所报道^[37]。

1.5 解冻方法和解冻后处理 大量的实验表明,快速化冻法对大多数植物材料都适合,通常的做法是:将冻存后的材料放在25~40℃的水浴中解冻,一旦冰完全融化后,立即取出材料以防热伤害和高温下保护剂的毒害;此种经脱水处理后的材料宜在室温下缓慢解冻。

除了干冻处理的生物材料外,解冻后的材料一般都需洗涤,以除去细胞内高浓度的冰冻保护

剂,这对于玻璃化冻存的材料来说,解冻后的洗涤尤为重要。常用的洗涤方法是用含1~2 mol·L⁻¹蔗糖的培养基在25℃下洗涤10 min左右。

冰冻与解冻会造成细胞的冷冻损伤,导致冻后细胞的再生力与结构上都有不同于未经冷冻处理的细胞。Kuriyama等^[38]发现,铵离子对未冷冻的水稻细胞生长有促进作用,但对冷冻后的水稻细胞有害,因此,选择冻后合适的培养基成分十分重要,这关系到超低温保存的成败。

2 问题与展望

生物材料用液氮超低温保存后,其生理代谢、生活力下降和基因特异性丧失等问题可得到控制,病原微生物的活动也可得到抑制,可以说此方法是稳定、可靠的长期保存植物组织培养物的一种技术。迄今,人们已对15种植物愈伤组织、22种植物悬浮培养细胞的超低温保存进行了研究,但此项研究尚处于起步阶段,其深度与广度都不够,许多问题还需进一步探讨:经超低温保存后的材料存活率一般较低,特别是保存的时间还较短;长期保存的材料生活力和存活率如何,再生能力如何,以及低温保存机制等。据此,我们认为,今后应加强以下几方面的研究:(1)植物超低温保存影响因素很多,想用一种方法或体系保存不同的植物组织培养物不一定可行,尚须根据材料的特性,研究并建立与之相适应的保存体系的方法;(2)种质保存的目的在于保持遗传基因的稳定,所以,应跟踪研究成苗的植物生长状况和遗传稳定性,加强超低温保存后遗传性状的分析;(3)从分子水平上分析冻存的机制,建立一套操作简便、行之有效的冰冻保存方法,以供实际应用中参考。

参考文献

- 1 Nag KK, Street HE. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 1973, 245: 270~272
- 2 Sala F, Cella R, Rollo F. Freeze-preservation of rice cells grown in suspension culture. *Plant Physiol*, 1979, 45: 170~176
- 3 Ying XH. Plant regeneration from cryopreserved callus of wild rice (*Oryza meyeriana* Baill). *Rice Genet Newsletter*, 1994, 11: 184~186
- 4 Finkle BJ, Ulrich JM. Protocols of cryopreservation. In: Evans DA. *Handbook of Plant Cell Culture (Vol. 1), Techniques for Propagation and Breeding*. New York: Macmillan

- Publishing Co, 1983. 806~865
- 5 Ulrich JM. Responses of six rice callus cultures to deep-frozen temperatures. *Crop Sci*, 1984, 24: 82~85
 - 6 刘贤旺, 杜勤, 罗光明等. 杜仲愈伤组织超低温保存的研究. *生物学杂志*, 1996, 4: 21~24
 - 7 刘贤旺, 杜勤, 罗光明等. 半枫荷愈伤组织超低温保存研究初报. *中药材*, 1996, 19: 332~334
 - 8 Bajaj YP. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. In: Kartha KK (ed). Boca Raton, Florida, CRC Press Inc, 1985. 227~242
 - 9 Cornejo MJ, Wong VL, Blechl AE. Cryopreserved callus: A source of protoplasts for rice transformation. *Plant Cell Rep*, 1995, 14(2): 210~214
 - 10 杨文, 刘春艳, 卜秀玲等. 香雪兰愈伤组织超低温保存的研究. *东北师大学报(自然科学版)*, 1999(4): 71~73
 - 11 Goldner EM. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Ehrh. cell cultures: preculture and freeze tolerance. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1991, 24: 19~24
 - 12 Kendall EJ, Kartha KK, Qareshi JA et al. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid preculture. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 89~94
 - 13 陈勇, 陈娴婷, 王君晖. 瓠柑愈伤组织的玻璃化法超低温保存研究. *浙江大学学报(理学版)*, 2004, 31(2): 197~201
 - 14 Niino T, Tashiro K, Suzuki M et al. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Sci Hortic*, 1997, 70: 155~163
 - 15 Leena R. Effect of abscisic acid, cold hardening, and photoperiod on recovery of cryopreserved *in vitro* shoot tips of silver birch. *Cryobiology*, 1998, 36: 32~39
 - 16 Sakai A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj YPS. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Vol 1). New York: Springer-Verlag, 1986. 113~129
 - 17 Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science*, 1984, 223: 701~703
 - 18 Bhandal IS. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiol*, 1985, 78: 430~432
 - 19 Meijer EGM. Retention of capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 171~174
 - 20 Bajaj YPS. The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. *Theor Appl Genet*, 1984, 67: 525~528
 - 21 徐刚标, 易文, 李美娥等. 银杏愈伤组织超低温保存的研究. *林业科学*, 2001, 37(3): 30~34
 - 22 Ulrich JM, Finkle BJ, Moore PH et al. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology*, 1979, 16(6): 550~556
 - 23 郭延平, 李嘉瑞. 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*, 1995, 23(2): 10~13
 - 24 肖洁凝, 黄学林. 茎尖和芽的超低温保存. *生物工程进展*, 1999, 19(5): 46~51
 - 25 陈书安, 王晓东, 赵兵等. 水母雪莲愈伤组织超低温保存条件的初探. *过程工程学报*, 2002, 2(6): 539~543
 - 26 马锋旺, 李嘉瑞. 杏愈伤组织超低温保存的研究. *西北植物学报*, 1999, 19(1): 67~70
 - 27 曾继武, 易干军, 张秋明等. 果树种质资源离体保存研究进展. *果树学报*, 2002, 19(5): 302~306
 - 28 刘云国, 王晓云. 果树种质资源超低温保存研究进展. *生命科学研究*, 2001, 5(3): 227~232
 - 29 钱士忠, 赵树仁. 光棘豆愈伤组织超低温冰冻保存技术的研究. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 1995, 18(2): 156~160
 - 30 叶芳, 夏胜, 梅兴国. 红豆杉愈伤组织超低温保存有关因素的研究. *武汉植物学研究*, 2001, 19(4): 327~331
 - 31 Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep*, 1990, 9: 30~33
 - 32 Sakai A. Development of cryopreservation techniques. In: Florent E, Hiroko T (eds). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. Tsukuba, Japan: Japan International Research Center for Agriculture Sciences, 2000. 1~7
 - 33 王君晖, 严庆丰, 黄纯农. 大麦幼穗的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生. *植物学报*, 1996, 38(9): 730~734
 - 34 黄纯农, 王君晖, 颜秋生等. 大麦胚性悬浮细胞系的快速建立及其超低温保存. *中国农业科学*, 1995, 28(3): 21~27
 - 35 王君晖, 郑泳, 严庆丰等. 水稻胚性悬浮细胞的玻璃化法超低温保存和可育植株再生. *科学通报*, 1996, 41: 2081~2084
 - 36 周小梅, 王国英, 敖光明等. 玉米组培材料的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生. *农业生物技术学报*, 2001, 9(4): 355~358
 - 37 王君晖, 边红武, 黄纯农. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(5): 582~585
 - 38 Kuriyama A, Watanabe K, Ueno S et al. Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Sci*, 1989, 64: 231~235