

技术与方法 Techniques and Methods

超低温保存植物种质资源的新途径——小滴玻璃化法

吴昫¹, 张琳¹, 林田², 夏宜平^{1,*}¹浙江大学农业与生物技术学院园林研究所, 杭州310058; ²上海市农业科学院农业生物基因中心, 上海201106

摘要: 超低温保存是一种安全、有效的种质资源保存途径, 可长期保存种质资源。小滴玻璃化法是在滴冻法和玻璃化法上基础上发展起来的用于植物种质资源保存的新技术。本文综述了该方法的技术概念、主要优点、基本程序、应用前景及国内外研究现状。

关键词: 小滴玻璃化法; 超低温保存; 种质资源

A Novel Approach for Cryopreservation of Plant Germplasm Resources— Droplet-Vitrification

WU Yun¹, ZHANG Lin¹, LIN Tian², XIA Yi-Ping^{1,*}¹Institute of Landscape Architecture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;²Shanghai Agriculture and Biology Gene Center, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China

Abstract: Cryopreservation is a safe and efficient method for germplasm conservation, which could be long-term preservation. Droplet-vitrification technique is the newest method based on droplet-freezing method and vitrification method for plant germplasm resources cryopreservation. The present paper primarily reviewed the concept, the major advantages, the basic procedure, the present research status at home and abroad, and application prospect.

Key words: droplet-vitrification; cryopreservation; plant germplasm resources

1 超低温法保存植物种质资源

植物种质资源是植物遗传育种的原始材料, 但由于人口激增, 工业发展, 导致大量具备优良特性的野生资源逐渐濒临灭绝, 从而失去了很多育种中改良品种的宝贵材料。传统植物种质资源保存的方法通常有以下几种: 一、原地保存及种质圃保存, 二、建立种子库, 三、组培离体保存(梁永恒等1999), 这些方法虽在资源保存方面发挥了重要的作用, 但由于其占地面积大、成本高、易受外界环境影响、不利于材料的国际交流等弊端, 不能长期稳定保存种质资源(王越和刘燕2006)。而上世纪70年代初发展起来的超低温保存却弥补了这方面的不足(Nag和Street 1973), 以最少的空间和维护成本成为种质资源长期保存的一项重要途径(Sakai和Engelmann 2007)。

超低温保存(cryopreservation)是离体保存与低温生物学相结合的产物, 是指-80 °C以下的极低温保存种质资源的一整套生物学技术(裴冬丽等

2005)。在超低温条件下(一般是液氮, -196 °C), 几乎所有的细胞代谢活动和生长过程都停止, 最大程度地抑制了生理活动, 减少了遗传变异的发生, 从而保持了生物材料的稳定性。但此时的细胞仍然具备活力和形态发生的潜能(Kartha和Engelmann 1994)。因而, 超低温保存是一种安全、有效的种质资源保存途径, 尤其对于无性繁殖及顽拗性种子植物的保存, 是唯一长期保存的途径。目前, 已有超过200种植物成功确立了超低温保存程序(Engelmann 2004)。保存材料主要有三种: 顽拗性及营养繁殖作物、珍稀及濒危植物和具优良遗传资源的栽培品种(Engelmann 2011)。自70年代初发展起来的玻璃化法(Nag和Street 1973), 与传统超低温保存法(慢冻法、二步法等)(Withers 1985, 1987)相

收稿 2012-01-17 修定 2012-04-13

资助 国家“863”计划子项目(2011AA100208)。

* 通讯作者(E-mail: ypxia@zju.edu.cn; Tel: 0571-88982391)。

比, 具有设备简单、程序简化和冻存效果好等优点, 在保存器官和组织水平的结构完整性方面有独到之处(王君晖和黄纯农1994), 最早由Rall和Fahy (1985)成功冻存小鼠的胚胎, 这是玻璃化法在动物材料上的首例报道。Uragami等(1989)用玻璃化法保存了石刁柏体细胞胚; 同年, Langis等(1989)冻存了蔓菁悬浮培养物, 开始了玻璃化法在植物材料上的应用。目前, 玻璃化法已广泛应用于大量植物种质资源的保存(Sakai等1990; Niino等2007; Oh等2009; Hong等2009; Shatnawi等2011)。超低温保存的关键因素是材料脱水, 玻璃化法通过将材料进行高浓度玻璃化保护剂的处理, 最后一并投入液氮中, 从而使材料进入玻璃化状态(王君晖和黄纯农1994)。但高浓度的玻璃化保护剂如PVS₂等因具化学毒性或高渗透压而对植物造成一定程度的伤害(Maruyama等1998; Sakai和Engelmann 2007); 相同程序在不同的植物, 甚至同属不同品种或者基因型上常有较大的差异。如何通过技术的改良及优化, 寻找一种常规的超低温保存程序, 尽可能减少材料保存中的化学及物理伤害, 同时, 又具备广适性, 是低温生物学中的研究热点。小滴玻璃化法(droplet-vitrification)兼容了传统滴冻法(drop-let-freezing)和玻璃化法(vitrification)的优点, 在解决以上问题上显示出优越性。

2 小滴玻璃化法

2.1 小滴玻璃化法的概念

根据是否形成冰晶, 超低温保存分为两大类, 一类是常规超低温保存法, 另一类则是基于玻璃化法的超低温保存法, 但两者均有一定的局限性(Gonzalez-Arno等2009)。最早的滴冻法是由Kantha等(1982)首次提出, 并应用于木薯(*Manihot esculenta*)的茎尖超低温保存, 其将茎尖置于玻璃化液滴中, 再于程序化降温仪中逐步降温。小滴玻璃化是在此基础上并结合传统玻璃化法的主要程序, 即用装载液及玻璃化液对材料进行处理, 而后再将材料放在含有玻璃化液滴的铝箔纸上并投入液氮冻存的一种高效超低温保存法。Leunufna和Keller (2003)首次在植物材料山药属上采用小滴玻璃化法。Halmagyi等(2010a, b)以苹果栽培品种茎尖为试材, 采用小滴玻璃化法, 获得了60%~70%的再生率。Kim等(2006)成功冻存了马铃薯的野生及园艺品种, 再生率最高达到94.4%。目前小滴玻璃

化法已成功应用于17个科26个属约30个种的不同植物上, 特别是在马铃薯、苹果、甘蔗、薯蓣及菊属等植物上已广泛研究(表1)。

2.2 基本程序

小滴玻璃化法主要基于传统玻璃化法, 但因其高效的冻存效果, 实际操作中常省略部分程序, 而使整个方法得到简化(Senula等2007; 白建明等2010)。本文中以Sant等(2008)在芋头上使用小滴玻璃化法超低温保存为例, 介绍其常用的标准程序(图1)。

2.2.1 材料的获得 选继代2~3个月的外植体, 在无菌条件下, 用双目解剖镜剥取0.8~1.0 mm茎尖, 包含1~2个幼嫩叶原基的顶端分生组织及基部约1 mm³的原组织(图1, 步骤I)。

2.2.2 预培养 将剥离的茎尖放入含有0.3 mol·L⁻¹蔗糖的固体培养基中, 正常培养条件下进行1 d以上的培养(图1, 步骤II)。

2.2.3 loading装载 预培养后的茎尖转移到McCartney瓶(也可用1.8或2 mL冷冻管)中, 瓶内装有5 mL已过滤灭菌的装载液(2 mol·L⁻¹甘油+0.4 mol·L⁻¹蔗糖+MS, pH 5.8, Sakai等1990), 在25 °C室温下处理20 min后, 将茎尖转移至无菌滤纸上停留30 s, 吸除多余的装载液(图1, 步骤III)。也有研究认为装载这一步骤可去除, 不影响冻存效果(Kim等2006; Halmagyi等2010a, b)。

2.2.4 脱水处理 将材料在0 °C条件下放入装有玻璃化液PVS₂ (30%甘油+15%乙二醇+15% DMSO+0.4 mol·L⁻¹蔗糖+MS, pH 5.8, Sakai等1990)的McCartney瓶进行20~40 min脱水处理, 磁力搅拌器以60 rpm进行混匀(图1, 步骤IV)。利用无菌的一次性针管吸取5~8滴玻璃化液(每滴4~15 μL)滴到已消毒的铝箔条上(5 mm×20 mm), 将脱水后的茎尖转至铝箔条上的玻璃化液滴里, 每滴约含5个茎尖。铝箔条在使用前5 min左右置于冰盒中降温至0 °C左右(图1, 步骤V)。

2.2.5 液氮冻存 脱水处理后, 用镊子将附有茎尖的铝箔条直接浸入液氮至液氮停止沸腾, 然后迅速将其转入2 mL装满液氮的冷冻管中, 至少保存1 h以上(图1, 步骤VI)。

2.2.5 快速化冻 用镊子从液氮中取出冷冻管中的铝箔条, 室温下迅速浸入已灭菌, 含1.2 mol·L⁻¹蔗糖的液体MS洗涤液(Sakai等1990)中, 在室温(25 °C)

表1 小滴玻璃化法成功保存植物种质资源列表
Table 1 Plant species and cultivars successfully cryopreserved by droplet-vitrification

植物种类	冻存材料	参考文献
櫻桃李(<i>Prunus cerasifera</i>)	茎尖	Vujovic等2011
黑莓(<i>Rubus fruticosus</i> ‘Cacanska Bestrna’)	茎尖	Vujovic等2011
补血草(<i>Limonium serotinum</i>)	茎尖	Barraco等2011b
甘蔗(<i>Saccharum</i> spp. ‘CP52-43’)	茎尖, 胚性愈伤	Barraco等2011a; Martinez-Montero等2008
苹果(<i>Malus domestica</i> ‘Pinova’, ‘Jonagold’, ‘Florina’, ‘Idared’, ‘Colmar’, ‘Rebra’, ‘Romus4’, ‘M106’)	茎尖, 腋芽	Condello等2009, 2011; Halmagyi等2010a, b
北美红杉(<i>Sequoia sempervirens</i>)	顶芽和基生芽	Ozudogru等2011
香石竹(<i>Dianthus caryophyllus</i>)	茎尖	Kentaro等2011; 张晓宁2011
切花百合(<i>Lilium hybrida</i> ‘Siberia’, ‘Snow Queen’)	顶端分生组织	Chen等2011
卷丹(<i>Lilium lancifolium</i>)	顶端分生组织	Chen等2011
红藤仔草(<i>Rubia akane</i>)	毛状根	Kim等2010
巨型兰花(<i>Grammatophyllum speciosum</i>)	原球茎	Sopalun等2010
百里香(<i>Thymus moroderi</i>)	茎尖	Marco-Medina等2010
红叶石楠(<i>Photinia fraser</i> ‘photinia×fraseri’)	茎尖, 分生组织	Tokatli和Akdemir 2010
香蕉(<i>Musa</i> spp., <i>paradisical</i>)	茎尖, 分生组织	李俊慧等2010; Panis等2005
甘薯(<i>Ipomoea batatas</i>)	茎尖	刘丽芳2009
香荚兰(<i>Vanilla planifolia</i>)	顶端分生组织	Gonzalez-Armao等2009
大蒜(<i>Allium sativum</i> ‘Danyang’, ‘Mokpo’)	顶芽, 茎尖及花梗, 芽原基	Kim等2006, 2007, 2009a, 2009b
小菊(<i>Dendranthema grandiflora</i> ‘Peak’)	茎尖	Kim等2009a, b
木樨榄(<i>Olea europaea</i>)	体细胞胚	Sanchez-Romero等2009
草莓(<i>Fragaria×ananassa</i> ‘Senga Sengana’, ‘Korona’, ‘Aroma’)	茎尖	Pinker等2009
银白杨(<i>Populus alba</i>)	茎尖	Tsvetkov等2009
白芨(<i>Bletilla striata</i>)	种子及原球茎	Jitsopakul等2008
天竺葵类(<i>Pelargonium×hortorum</i>)	顶芽	Gallard等2008
芋(<i>Colocasia esculenta</i> ‘Esculenta’)	茎尖	Sant等2008
薄荷属(<i>Mentha</i> spp.)	茎尖	Senula等2007
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i> ‘Dejima’, ‘STN13’, ‘Desiree’, ‘Ostar’, ‘Sante’)	茎尖	Leunufna和Keller 2005; Halmagyi等2005; Kim等2006; Yoon等2006, 2007; 王彪2011 白建明等2010
杂种月季(<i>Rosa hybrid</i>)	茎尖	Halmagyi和Pinker 2006
山药属(<i>Dioscorea</i> spp.)	芽及茎尖	Leunufna等2003, 2005
菊花(<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	茎尖	Halmagyi等2004

下洗涤15 min (图1, 步骤VII)。或可将铝箔条先浸入用40 °C温水预热过的洗涤液约30 s后, 转入新鲜的洗涤液中洗涤(Kim等2006a, b)。

2.2.6 恢复培养 将洗涤后的茎尖先转到含0.3 mol·L⁻¹蔗糖的固体MS培养基上, 培养基上方铺2层已消毒的滤纸, 进行恢复培养, 室温(25 °C)暗培养一夜。而后将茎尖转接到含0.1 mol·L⁻¹蔗糖的固体MS培养基上, 于黑暗条件下培养5 d后转到弱光条件(3.5 μmol·m⁻²·s⁻¹)培养10 d左右。

2.3 主要优点

2.3.1 高存活率、再生率 小滴玻璃化法在传统玻璃化法主要优点的基础上, 在冷冻及化冻程序上

进行了改良。一般将材料常规玻璃化后, 置于铝箔纸上的小液滴内, 后直接投入盛满液氮的冷冻管。一方面, 在冷冻过程中, 材料与玻璃化保护剂及液氮直接接触, 降温速度加快, 均一晶核很少或几乎未形成, 或者生长缺乏足够的时间, 溶液更易进入无定形的玻璃化状态, 减少了溶液效应对细胞的损伤, 亦无冰晶对细胞的损伤; 另一方面, 在复温过程中, 材料与洗涤液直接接触, 因其受热均匀, 同步融化, 从而避免了次生结冰对组织细胞的损伤(王君晖和黄纯农1994)。铝箔纸在程序中成为一种良好的热传导载体材料, 热量传导快速、分布均一(Leunufna和Keller 2003)。因而小滴玻璃

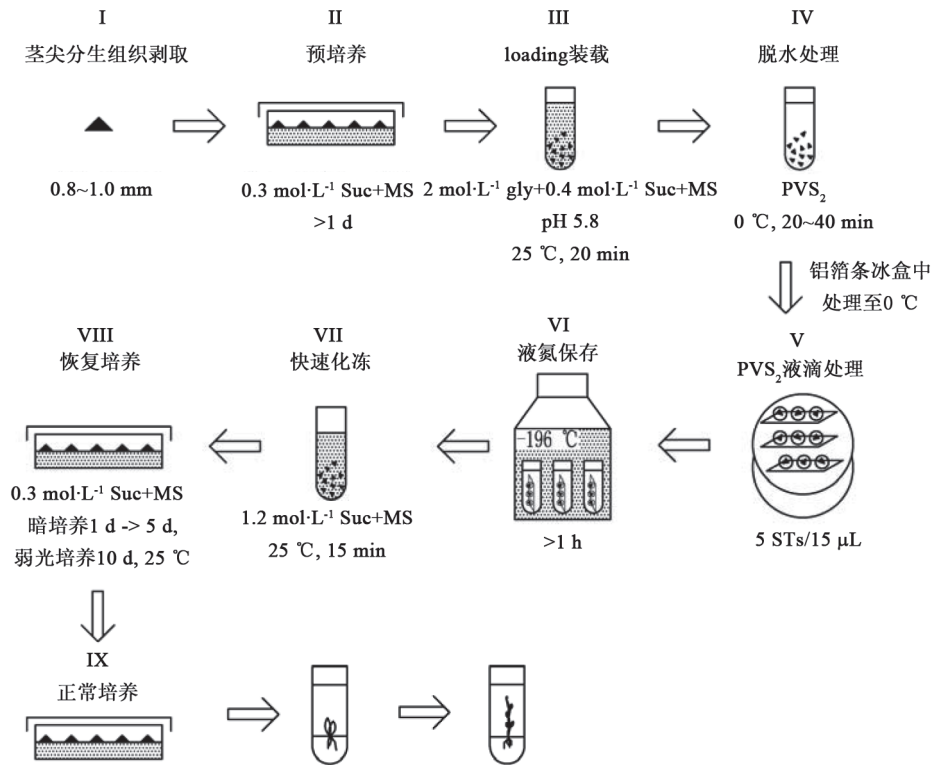


图1 茎尖小滴玻璃化法主要程序示意图(改自Tsvetkov等2009)

Fig.1 Schematic diagram of droplet-vitrification procedure for shoot tips

化法最大的特征就是提高了冷冻和化冻的速率,增加了形成均一玻璃化态的可能(Panis等2005)。

在已有的超低温方法中,小滴玻璃化法冻后存活率及再生率更高。白建明等(2010)以马铃薯(*Solanum tuberosum*)茎尖为试材,小滴玻璃化法保存后存活率和再生率最高达79.91%和62.52%。Martinez-Montero等(2008)将玻璃化法、包埋玻璃化法及小滴玻璃化法同时应用于甘蔗体细胞胚超低温保存,测定细胞电导率以反映其脱水伤害,试验进一步证实了电解液渗透量与体胚活性呈显著负相关。普通玻璃化处理甘蔗体胚成活率为0,包埋玻璃化法PVS₂处理10~15 min仅获20%成活率,而小滴玻璃化法将PVS₂处理时间延长至30~45 min时仍可获得高达30%的细胞存活率。Tsvetkov等(2009)将不同的玻璃化法程序应用于木本模式植物白杨属*Populus alba*及hybrid aspen (*P. tremula*×*P. tremuloides*),小滴玻璃化法存活率最高,分别达64%及78%。相同的研究结果在北美红杉(Ozudogru等2011)、苹果属(Halmagyi等2010a, b)、巨型兰花(Sopalun等2010)、木樨榄(Sanchez-Romer

等2009)、甘蔗(Martinez-Montero等2008)、薯蓣属(Leunufna和Keller 2003)、百里香属(Marco-Medina等2010)、甘薯(刘丽芳2009)等植物上均有体现,且冻存材料遗传稳定性好,不易形成愈伤组织。Barraco等(2011)指出包埋脱水法比小滴玻璃化法在保存甘蔗茎尖再生率时约高出26%,这是仅有的1篇本方法劣于其它方法的报道。笔者认为可能与材料本身的基因型有关。

2.3.2 广适性 Schafer-Menuhr等(1997)报道了采用快冻法建立马铃薯品种资源库,马铃薯经DMSO处理后,转至2.5 mL附于铝箔纸的液滴上进行冻存,此法可适用于150余种马铃薯品种,流式细胞术及DNA指纹分析技术分析显示161个被测样品无任何染色体或异常条带出现,这是最早关于超低温广适性程序的探索。王彪(2011)以中国主栽马铃薯品种‘紫花白’为试材,成功建立起小滴玻璃化法保存程序,获得高达70%的再生率,将此程序用于13个中国主栽的马铃薯品种,获得平均50%的再生率。而在国外,芋(Sant等2008)、银白杨(Tsvetkov等2009)、马铃薯(Sant等2008)等植物也报道了广

适性小滴玻璃化法程序,即同一程序可广泛应用于同属的多个品种或者基因型。

2.3.3 处理量大、操作简易 传统玻璃化法单管处理材料较少,常为10~15个外植体,而小滴玻璃化法增加了同一时间内处理材料的数量,一般1条铝箔纸可点5~8滴玻璃化液滴,每滴可容纳5个外植体,故大大节约了时间及人力,同时,相比包埋法等,方法简单,易于操作。

3 小滴玻璃化法的应用前景及存在问题

3.1 应用前景

3.1.1 广适性保存程序 Kim等(2006a, b)将同一小滴玻璃化法程序应用于12种马铃薯品系,其中包括较难保存的野生种窄刀薯(*Solanum stenotomum*)杂种系(STN13, 2X),保存存活率达64.4%~94.4%,该程序被韩国国家高原农业局(National Institute of Highland Agriculture)应用于韩国马铃薯资源搜集与离体保存工作。Kim等(2007a, b)还利用小滴玻璃化法对252个品系的葱属植物未成熟花进行保存,获得80.9%的平均存活率和77.0%的平均再生率,其中221个品系进行了液氮的长期保存。刘丽芳(2009)采用优化的小滴玻璃化法对国家种质徐州甘薯试管苗库内的7个品种进行保存,保存后存活率最高达64%,再生率最高46%。所以,超低温法相比种质圃及试管苗库产出高、投入低、安全有效。小滴玻璃化法的广适性特征适用于重要种质库的建立。

3.1.2 低温疗法 植物在长期营养繁殖过程中常受到各种病毒病害的侵染,降低作物的产量和质量,影响观赏植物的观赏价值,从而造成极大的经济上的损失。常规的脱毒方法主要有热处理法、茎尖分生组织培养法、愈伤组织培养法、茎尖微体嫁接技术等(王永伟等2008)。而随着超低温保存技术研究的深入,人们逐步发现超低温保存具有脱除植物病毒的作用(Heliot等2003; Wang等2003; 陈芳和王子成2006),从而形成了低温疗法的概念。低温疗法是基于超低温保存对细胞的选择性破坏的原理,结合组织培养和病毒检测技术达到脱毒的目的。这主要是由于含有病毒的细胞和顶端分生组织细胞含水量的差异造成的,含水多的病毒细胞更易于形成冰晶,常受到冻害而死亡,因而处理过的植株再生后可能是无病毒的(Brison等2002)。传统的脱毒方法常有操作困难、费时、脱

毒率低等局限性,而低温疗法则操作简单、快速、脱毒率高,是植物病毒脱除的一种新技术(陈芳和王子成2006)。Kim等(2007a, b)发现,经过小滴玻璃化法保存后再生的瓶苗相比仅经过预处理或脱水处理再生的瓶苗,在RT-PCR检测后植株所含的病毒密度更低。王彪(2011)在其研究中以感染马铃薯Y病毒(PVY)的马铃薯‘紫花白’和感染了马铃薯卷叶病毒(PLRV)的Desiree试管苗为试材,开展超低温疗法脱除马铃薯病毒的研究,研究结果正在检测中。小滴玻璃化法保存的材料有望得到无病毒或者较少感染的材料。但这项技术的发展历史还较短,成功的案例尚少,更多的结合小滴玻璃化法进行植物材料脱毒的研究还需进一步展开。

3.1.3 珍稀及濒危植物的保存 除栽培种以外的野生植物统称为野生植物种质资源。在这些野生植物资源中,往往具有栽培品种所没有的优异的遗传多样性,如抗性种质、耐性种质、独特的品种种质、提高产量的种质和培育雄性不育所需要的种质等,因此,野生种质资源对育种工作具有特殊的意义(李仁全1994)。但随着环境的恶化、人为的破坏,这些资源正逐步减少种内和种间的多样性,保护植物的遗传多样性已刻不容缓(殷晓辉和舒理慧1996)。尤其是需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,用于种质收集保存与交换的种质库体系的建立将会大大改善野生资源保存的现状。超低温保存作为种质资源保存的安全、有效途径,可用于珍稀及野生资源的保存中。Mallon等(2008)采用玻璃化法保存濒危植物矢车菊(*Centaurea ulreiae*),成功实现了其茎尖的冻存程序。Dixit等(2005)以一种珍贵的药用山药植物三角叶薯(*Dioscorea deltoidea*)为试材,采用玻璃化法及包埋脱水法,用HPLC对保存后的茎尖进行检测,得出内含的薯蓣皂苷配基含量与对照的无差异。Thammasiri (2008)则在其综述中详细介绍了几种珍稀的泰国产兰花的超低温冻存,获得了较为理想的保存效果。通常野生种相对于栽培种常常显示较低的恢复生长水平,可能是因为野生种本身在离体和正常栽培条件下生活力均较低(Yoon等2007)。故选用更佳的超低温保存程序,尽可能多的保存野生珍稀和濒危植物材料,成为一个重要的发展方向。小滴玻璃化法由于其较好的

保存效果,正逐步应用到这些材料上。

3.2 存在问题

本校课题组将小滴玻璃化法应用于百合属植物资源保存,试验中遇到的主要问题为细菌侵染,材料直接接触液氮易造成外植体污染,如何保证优质干净的液氮作为保存载体,成为重点关注的对象。白建明等(2010)采用SSR标记,王彪(2011)采用ISSR标记等技术对小滴玻璃化法保存材料遗传稳定性进行检测,发现再生植株无遗传变异。但相关工作仍较少(Schafer-Menuhr等1997;李俊慧等2010),需在今后的工作中进一步展开,以便深入了解其内在机理。

参考文献

- 白建明,陈晓玲,卢新雄,郭华春,辛霞,张志娥,辛萍萍(2010). 马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存及其再生植株的遗传稳定性. 园艺学报, 37 (9): 1431~1438
- 陈芳,王子成(2006). 植物脱毒新技术——低温疗法. 河南农业科学, 12: 11~13
- 李俊慧,何平,陈晓玲,卢新雄,辛霞,张志娥,辛萍萍(2010). 香蕉离体茎尖超低温保存研究. 植物遗传资源学报, 11 (1): 34~39
- 李仁全(1994). 植物种质及其保存. 川北教育学院学报(自然科学版), 4 (13): 16~18
- 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
- 刘丽芳(2003). 甘薯种质遗传稳定性及超低温保存研究[学位论文]. 重庆: 西南大学
- 裴冬丽,胡金朝,王子成(2005). 植物遗传资源的超低温保存. 生物学通报, 40 (3): 19~20
- 王彪(2011). 马铃薯茎尖超低温保存及超低温疗法脱毒技术体系的建立[学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学
- 王君晖,黄纯农(1994). 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径. 园艺学报, 21 (3): 277~272
- 王永伟,王慧霞,贺丹,何松林等(2008). 观赏植物病毒病害及病毒脱除研究现状与发展趋势. 中国农学通报, 24 (5): 313~317
- 王越,刘燕(2006). 观赏植物种质资源的超低温保存. 植物生理学通讯, 42 (3): 559~566
- 殷晓辉,舒理慧(1996). 植物种质资源的超低温保存研究进展. 热带亚热带植物学报, 4 (3): 75~82
- 张晓宁(2011). 香石竹种质资源小滴玻璃化法超低温保存技术研究[学位论文]. 武汉: 华中农业大学
- Barraco G, Sylvestre I, Engelmann F (2011a). Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. *Sci Hortic*, 130 (1): 320~324
- Barraco G, Sylvestre I, Iapichino G, Engelmann F (2011b). Cryopreservation of *Limonium serotinum* apical meristems from *in vitro* plantlets using droplet-vitrification. *Sci Hortic*, 130 (1): 309~313
- Brison M, de Boucauda MT, Pierronnet A, Dosbac F (2002). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Sci*, 123 (1-2): 189~196
- Chen XL, Li JH, Xin X, Zhang ZE, Xin PP, Lu XX (2011). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *S Afr J Bot*, 77: 397~403
- Condello E, Andre E, Piette B, Caboni E, Druart P, Panis B (2009). Improvement of the cryopreservation of apple through the droplet vitrification method. *CryoLetters*, 30 (5): 395~396
- Condello E, Caboni E, Andre E, Piette B, Druart P, Swennen R, Panis B (2011). Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet vitrification. *CryoLetters*, 32 (2): 175~185
- Dixit SS, Ahuja GS, Mandal BB (2005). Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* — an endangered medicinal plant. *Sci Hortic*, 105 (4): 513~517
- Engelmann F (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 40: 427~433
- Engelmann F (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 47 (1): 5~16
- Gallard A, Panis B, Dorion N, Swennen R, Grapin A (2008). Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29 (3): 243~251
- Gonzalez-Arnao MT, Lazaro-Vallejo CE, Engelmann F, Gamez-Pastrana R, Martinez-Ocampo YM, Pastelin-Solano MC, Diaz-Ramos C (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 45 (5): 574~582
- Halmagyi A, Deliu C, Coste A (2005). Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters*, 26 (5): 313~322
- Halmagyi A, Delie C, Isac V (2010a). Cryopreservation of *Malus* cultivars: comparison of two droplet protocols. *Sci Hortic*, 124 (3): 387~392
- Halmagyi A, Fischer-Kluver G, Mix-Wagner G, Schumacher HM (2004). Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Rep*, 22 (6): 371~375
- Halmagyi A, Pinker I (2006). Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 84 (2): 145~153
- Halmagyi A, Valimareanu S, Coste A, Deliu C, Isac V (2010b). Cryopreservation of *Malus* shoot tips and subsequent plant regeneration. Conference on Plant Biotechnologies-Present and Future Prospects Genetically Modified Crops in Romania and the National Biosafety Framework, Pitesti, Romania. Romania: Ars Docendi, Sos Panduri, 79~85
- Heliot B, Swennen R, Poumay Y (2003). Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Rep*, 21: 690~698
- Hong SR, Yin MH, Shao XH, Wang AP, Xu WH (2009). Cryopreservation of embryogenic callus of *Dioscorea bulbifera* by vitrification. *CryoLetters*, 30 (1), 64~75
- Jitsopakul N, Thammasiri K, Ishikawa K (2008). Cryopreservation of *bletilla striata* mature seeds, 3-day germinating seeds and protocols by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29 (6): 517~526
- Kartha KK, Engelmann F (1994). Cryopreservation and germplasm storage. Canada: Kluwer Academic Publisher, 195~230
- Kartha KK, Leung NL, Moroginski L (1982). *In vitro* growth response and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Z Pflanzenphysiol*, 107: 133~140
- Kentaro S, Shin-ichi Y, Tariq R, Kuniaki F, Takao N (2011). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryoplates. *Plant Biotechnol J*, 11: 1~5
- Kim HH, Lee JK, Hwang HS, Engelmann F (2007a). Cryopreserva-

- tion of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique. *CryoLetters*, 28 (6): 471~482
- Kim HH, Lee YK, Kim T, Cho EG, Lee JK, Ji JJ, Nam SS, Engelmann F (2007b). Implementation of cryopreservation for garlic genetic resources by the droplet vitrification procedure. *Acta Hort*, 760: 209~215
- Kim HH, Lee YG, Park SU, Lee SC, Baek HJ, Cho EG, Engelmann F (2009a). Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30 (4): 291~299
- Kim HH, Lee YG, Shin DJ, Ko HC, Gwag JG, Cho EG, Engelmann F (2009b). Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 31 (5): 320~334
- Kim HH, Lee JK, Yoon JW, Ji JJ, Nam SS, Ko HC, Hwang HS, Engelmann F (2006a). Cryopreservation of garlic bulbil primordia by the droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, 27 (3): 143~153
- Kim HH, Popova EV, Yi JY, Cho GT, Park SU, Lee SC, Engelmann F (2010). Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (nakai) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, 31 (6): 473~484
- Kim HH, Yoon JW, Park YE, Cho EG, Sohn JK, Kim TS, Engelmann F (2006b). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. *CryoLetters*, 27 (4): 223~234
- Langis R, Sohnabel B, Earle ED, Steponkus PL (1989). Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *CryoLetters*, 10: 421~428
- Leunufna S, Keller ERJ (2003). Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep*, 21 (12): 1159~1166
- Leunufna S, Keller ERJ (2005). Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: effects of cold acclimation and sucrose. *CryoLetters*, 26 (2): 93~102
- Mallon R, Bunn E, Turner SR, Gonzalez ML (2008). Cryopreservation of *Centaurea ulreia* (compositae) a critically endangered species from Galicia (Spain). *CryoLetters*, 29 (5): 363~370
- Marco-Medina A, Casasi JL, Swennen R, Panis B (2010). Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet vitrification. *CryoLetters*, 31 (1): 14~23
- Martinez-Montero ME, Martinez J, Engelmann F (2008). Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. *CryoLetters*, 29 (3): 229~242
- Maruyama E, Ishii K, Kinoshita I (1998). Alginate encapsulation technique and cryogenic procedures for long-term storage of the tropical forest tree *Guazuma crinita* Mart. *in vitro* cultures. *Arq Jpn Agr Res Quart*, 32: 301~309
- Nag KK, Street HE (1973). Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 245: 270~272
- Niino T, Tanaka D, Tantely RR, Fukui K, Shirata K (2007). Cryopreservation of basal stem buds of *in vitro*-grown mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification. *CryoLetters*, 28 (3): 197~206
- Oh SY, Wu CH, Popova E, Paek KY (2009). Cryopreservation of *Panax ginseng* adventitious roots. *J Plant Biol*, 52 (4): 348~354
- Ozudogru EA, Kirdok E, Kaya E, Capuana M, Benelli C, Engelmann F (2011). Cryopreservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (d. Don.) Endl.) *in vitro* buds using vitrification-based techniques. *CryoLetters*, 32 (2): 99~110
- Panis B, Piette B, Swennen R (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Sci*, 168: 45~55
- Pinker I, Halmagyi A, Olbricht K (2009). Effects of sucrose preculture on cryopreservation by droplet-vitrification of strawberry cultivars and morphological stability of cryopreserved plants. *CryoLetters*, 30 (3): 202~211
- Rall WF, Fathy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313: 573~575
- Sakai A, Engelmann F (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 28 (3): 151~172
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep*, 9 (1): 30~33
- Sanchez-Romero C, Swennen R, Panis B (2009). Cryopreservation of olive embryogenic cultures. *CryoLetters*, 30 (5): 359~372
- Sant R, Panis B, Taylor M, Tyagi A (2008). Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 92 (1): 107~111
- Schafer-Menuhr A, Schumacher HM, Mix-Wagner G (1997). Cryopreservation of potato cultivars-design of a method for routine application in genebanks. *Acta Hort*, 447: 477~482
- Senula A, Keller ERJ, Sanduijav T, Yohannes T (2007). Cryopreservation of cold-acclimated mint (*Mentha* spp.) shoot tips using a simple vitrification protocol. *CryoLetters*, 28 (1): 1~12
- Shatnawi MA, Shibli RA, Abu-Romman SM, Al-Mazra'awi MS, Al Ajlouni ZI, Shatanawi WA, Odeh WH (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Span J Agric Res*, 9 (1): 213~220
- Sopalun K, Thammasiri K, Ishikawa K (2010). Vitrification-based cryopreservation of *Grammatophyllum speciosum* protocorms. *CryoLetters*, 31 (4): 347~357
- Thammasiri K (2008). Cryopreservation of some Thai orchid species. Belgium: International Society Horticultural Science, 788: 53~62
- Tokatli YO, Akdemir H (2010). Cryopreservation of *Fraser photinia* (*photinia*×*fraseri* dress.) via vitrification-based one-step freezing techniques. *CryoLetters*, 31 (1): 40~49
- Tsvetkov I, Benelli C, Capuana M, De Carlo A, Lambardi M (2009). Application of vitrification-derived cryotechniques for long-term storage of poplar and aspen (*Populus* spp.) germplasm. *Agr Food Sci*, 18 (2): 160~166
- Uragami A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T (1989). Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep*, 8: 418~421
- Vujovic T, Sylvestre I, Ruzic D, Engelmann F (2011). Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. *Sci Hort*, 130 (1): 222~228
- Wang QC, Mawassia M, Li P, Gafny R, Sela I, Tanne E (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci*, 165: 321~327
- Withers LA (1985). Cell culture and somatic cell genetics of plants. *CryoLetters*, 2 (1): 253~316
- Withers LA (1987). Some lateral thoughts on cryopreservation. *CryoLetters*, 8 (2): 60~63
- Yoon JW, Kim HH, Cho EG, Ko HC, Hwang HS, Park YE, Engelmann F (2007). Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification procedure. *Acta Hort*, 760: 203~208
- Yoon JW, Kim HH, Ko HC, Hwang HS, Hong ES, Cho EG, Engelmann F (2006). Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters*, 27 (4): 211~222