植物学通报 2005, **22** (2): 238~245
Chinese Bulletin of Botany

专 题 介 绍

包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展①

[1] 吴雪梅 [2] 汤浩茹②

[1](中国科学院成都分院山地灾害与环境研究所 成都 610041)
[2](四川农业大学林学园艺学院 雅安 625014)

摘要 包埋玻璃化法是在玻璃化法和包埋脱水法基础上发展起来的超低温保存植物种质的新技术。它具有能同时处理大量材料，处理后恢复生长快，对材料的毒害作用较小及成芽率高等优点，已成功地用于辣根、山嵛菜等20余种植物，在植物种质资源的保存上显示出了巨大的应用潜力。本文介绍了包埋玻璃化法产生的背景及其优点，阐述了包埋玻璃化法的基本方法和预培养、包埋、脱水、化冻及恢复培养等过程，比较了该法冻存后的效果和冻存后所形成植株的遗传稳定性，同时指出了进一步研究的重点。

关键词 包埋玻璃化，超低温保存，植物种质保存

Research Advances in Cryopreservation of Plant Germplasm by Encapsulation-vitrification Method

[1]WU Xue-Mei [2]TANG Hao-Ru②

[1] (*Institute of Mountain Hazards and Environment, the Chinese Academy of Sciences*, Chengdu 610041)
[2](*Forestry and Horicultural College of Sichuan Agricultural University*, Yaan 625014)

Abstract Encapsulation-vitrification, a new method for cryopreservation of plant germplasm in recent years, was developed on the basis of vitrification and encapsulation-dehydration. It has many advantages over vitrification and encapsulation-dehydration, because more materials can be treated at the same time, growth is recovered more rapidly after treatment, it is less harmful to the material, and allows for a higher shoot regeneration rate. It has been successfully used to preserve more than 20 species, such as pear, horseradish and wasabi, and shows great application potential in the preservation of plant germplasm resources. This paper introduces the development and advantages of encapsulation-vitrification and the main methods and procedures such as preculture, encapsulation, dehydration, thawing and recovery of culture. The effects of freezing protection and the genetic stability of plant materials preserved with encapsulation-vitrification are discussed as well. Further research on encapsulation-vitrification of plant tissue is also suggested.

Key words Encapsulation-vitrification，Cryopreservation，Plant germplasm preservation

①教育部优秀青年教师计划和全国优秀博士学位论文作者博士专项基金(200253)项目资助。
②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: htang@sicau.edu.cn
收稿日期：2003-11-17 接受日期：2004-03-05 责任编辑：孙冬花，于昕

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

植物种质资源是植物遗传育种的原始材料，也是物种进化和遗传学研究的物质基础。但是，由于人口增加、工业高速发展以及农业上的良种种植化趋势等原因，使得植物遗传基础越来越趋向于单一化，一些地方品种及珍贵稀有的植物资源也正从地球上逐渐消失。据资料统计，现在全世界已有10 %的高等植物物种的生存受到威胁(国家环保局, 1991)，估计到2050年将有25%的物种陷入灭绝的境地(王献溥, 1994)。因此世界各国对种质资源的收集和保存都非常重视。目前常用的保护植物种质资源的方法主要是建立自然保护区、建立植物种子库以及组培技术离体保存植物3种，但这几种方法都有着各自的局限性。在自然保护区或田间圃地保存容易遭受各种自然灾害，导致植物种质资源的丢失，且费时费力，成本高。建立种子库只适用于产生“常规”种子的植物，无法用于“顽拗型”种子或营养繁殖的植物。组培离体保存省时省力，适用于大多数植物，但因为长期离体培养需要定期继代，并且可能会引起遗传性状的改变(梁永恒等, 1999; 赵艳华等, 1999; 徐刚标, 2000)。为了克服以上保存方法的缺点，更有效地保存种质资源，一些学者开始尝试使用超低温法保存。众多试验结果证明，超低温(一般指液氮-196 ℃)保存是植物种质保存技术中较为理想的方法(Takagi *et al.*, 1997; 吴诗光等, 1999)。随着方法的不断改进，超低温保存成功的样品越来越多。继20世纪80年代末90年代初出现的玻璃化法(vitrification)和包埋脱水法(encapsulation-dehydration)之后，近年来出现的包埋玻璃化法(encapsulation-vitrification)兼容了前两者保存种质的优点，显示了巨大的应用潜力。

1 包埋玻璃化法产生的背景

玻璃化法是Luyet于1937年提出的。之后，经历了长期的理论与实践探索，20世纪80年代中后期才在动植物的种质保存中取得了突破性进展。Sakai等于1990年建立了玻璃化冻存的简单高效的技术体系：在材料冰冻之前用高浓度冰冻保护剂(plant vitrification solution，PVS)处理，再投入-196 ℃液氮，使脱水样品玻璃化而没有冰的产生。此法具有设备简单，材料处理简单，效果和重演性好等优点(Langis *et al.*, 1990; Niino *et al.*, 1992; Lu and Steponkus, 1994; Takagi *et al.*, 1997)。但由于PVS保护剂浓度很高，对材料毒害性极大(Matsumoto *et al.*, 1994, 1995a)，因而需严格控制脱水过程及冰冻保护剂的渗透性。此外，该法较难在同一时间内处理大量材料。

包埋脱水法最早出现在法国学者Fabre和Dereuddre(1990)保存马铃薯茎尖的研究中。它参照了人工种子的技术，结合低温保存的需要，将包埋与脱水相结合，应用于超低温保存中。用藻酸盐包埋样品，在含一定浓度蔗糖(一般为0.3~0.75 mol·L^{-1})的培养基中预培养，然后在通风橱中处理2~6小时，或用硅胶处理，通过空气蒸发脱水。其优点在于容易掌握，缓和了脱水过程，简化了脱水程序，减少了环境因子波动对样品造成的影响，而且一次能处理较多的材料，避免了使用二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)和乙二醇(ethylene glycol, EG)等对细胞有毒性的冰冻保护剂。但是，包埋脱水法与玻璃化法相比组织恢复生长慢，脱水所需时间长，而且在一些植物中存活率、成苗率低。为克服玻璃化法和包埋脱水法的缺点，Matsumoto等(1995b)开始使用包埋玻璃化法保存植物样品，发现同包埋脱水法相比，以包埋玻璃化法冻存‘Wasabi’3天后，存活率可达96%，较后者提高了30%；且材料恢复生长快，方法易于掌握，还大大节省了脱水时间。

2 包埋玻璃化法基本操作程序

预培养和包埋→玻璃化溶液脱水→液氮

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

保存→化冻→恢复培养

2.1 预培养

预培养的目的在于提高植物抗冻能力及渗透忍耐力，减少或避免冷冻伤害。包埋玻璃化法冻存研究中常用的预培养方式有以下几种。

2.1.1 在添加高渗物质的培养基中预培养 将材料在含蔗糖(或山梨醇、脯氨酸、甘露醇、海藻糖)等渗透剂的培养基(通常是用于培养该材料的培养基)上，常温条件下预培养数日，以减少细胞内自由水含量，增强组织细胞抗寒能力，增加其保护性物质含量。

2.1.2 零上低温冷驯化 将小的试管苗置于正常培养基上，在零上低温、黑暗条件下冷驯化一段时间(3~5天)，以形成保护性物质和结构，增加其耐冷冻能力，然后在无菌条件下切取茎段或茎尖为保存材料。

2.1.3 包埋后预培养 材料包埋后在含高浓度蔗糖的培养基中预培养一段时间(1~6天)。Phunchindawan 等(1997)采用此法，将辣根芽原基包埋后，放入含0.5 mol·L^{-1}蔗糖的MS培养基上预培养 1 天，取得了较好的效果，冻存后成活率达 69%。

2.2 包埋

将茎尖悬浮于不含 Ca^{2+} 但含藻酸钠的 MS 液体培养基上，再将该混合液滴于 Ca^{2+} 溶液中，因藻酸钠钙的生成而固化成球状颗粒。褐藻酸钠常用浓度为 2%~3%，$CaCl_2$ 浓度为0.1 mol·L^{-1}或0.5 mol·L^{-1}，保证固化完成所维持时间为30 分钟。褐藻酸钠中一般加入2 mol·L^{-1}甘油和0.4 mol·L^{-1}蔗糖作为渗透保护剂(Matsumoto *et al.*, 1995b; Hirai *et al.*, 1998; Hirai and Sakai, 1999a)。如果样品在包埋前经过高浓度的蔗糖预培养，包埋液中必须含更高浓度的蔗糖，否则会使材料重新回到低渗状态。该渗透保护剂相当于玻璃化法保存样品的装载液，其作用在于进一步降低组织含水量，同时增加其保护性物质含量，提高抗冻能力。

2.3 玻璃化溶液脱水

包埋后的材料投入高浓度冰冻保护剂中，之后在冰浴条件下处理一定时间。

高浓度的冰冻保护剂(PVS)，又称玻璃化溶液，可以降低冰点，提高玻璃化消失点，增强溶液粘滞性，阻止冰晶生长，防止细胞因脱水而瓦解。水与大分子的亲水位点形成氢键，维持大分子物质的结构，能减轻因冰晶形成而产生的电解质浓度增加造成的伤害(Fukai *et al.*, 1991)。

最常用的植物茎尖PVS是日本北海道国家农业试验育种部的 Sabai 所推出的 PVS2，其组成是：在MS 培养基中附加 0.4 mol·L^{-1} 蔗糖(sucrose, Suc)，30% 甘油(glycerine, Gly)，15% 二甲亚砜(DMSO)，15% 乙二醇(EG)。一般在 0 ℃脱水 1.5 到 4 小时。脱水时间与温度有关，温度高时，脱水时间要减少(Matsumoto *et al.*, 1998)。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)对细胞无毒性也无保护作用，但使用 PEG+Glucose+DMSO(10:8:10, V/V)成功地保存了多种植物材料(Reinert and Bajaj, 1977)。Maruyame(1998)在冻存热带树 *Guazuma crinita* Mart.时，将其不定芽外植体用冰冻保护剂(含 15%Suc，25%Gly，15%EG，13%DMSO，2%PEG-4000)在25 ℃时脱水 15~60 分钟获得约 80% 的存活率。研究发现，保护剂混合使用比单独使用效果更好，其优越性在于各种成分之间具有协同效应和累加效应(毒性不累加)。Bnernard 等(1979)在冻存甘蔗细胞时以葡萄糖和二甲亚砜混合(1:3, V/V)作为保护剂，脱水后细胞的存活率较单独使用葡萄糖(glucose, Glu)或二甲亚砜的提高了一倍。Chen 等(1984)的试验证明DMSO与山梨醇(sorbitol)混合作为保护剂更有利于提高长春花悬浮细胞的存活率。马锋旺等(1999)也发现，以 10%DMSO 作为杏细胞悬浮培养物超低温保存的冰冻保护剂

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

时，其相对存活率最低；而采用10% DMSO + 0.5 mol·L^{-1}山梨醇时，相对存活率最高(20.6%)。臧新等(2002)单独使用DMSO作为冰冻保护剂时，红豆杉细胞存活率仅为28.7%，将10%的DMSO与8%的葡萄糖相混合使用，存活率提高到了88%。

2.4 保存

玻璃化液处理后，快速将材料直接投入液氮中保存。

2.5 解冻与恢复培养

冻存的材料在保存终止后，要求快速化冻，以防止由于次生结冰对组织、细胞造成的伤害。一般将装有材料的冻存管从液氮中迅速取出，插入25~40 ℃水浴中化冻。Hirai等(1998)将草莓茎尖冻存后迅速放入38 ℃水浴中(解冻速度约为200 ℃ min^{-1})，化冻后将冻存管中的PVS2液吸干，装入1 mL 1.2 mol·L^{-1}蔗糖液放置10分钟。化冻后包埋的茎尖比裸露茎尖较耐机械操作，且不需除去包裹的褐藻酸钙，直接放在基本培养基上进行恢复培养。

3 冻存效果

3.1 冻存材料的存活率

包埋玻璃化法能同时处理大量材料，而且恢复生长比包埋脱水法快得多，它减少了脱水时间，简化了冻存程序。这种方法已成功地用于辣根(*Armoracia rusticana*)、山嵛菜(*Wasabia japonica*)、橄榄树(*Olea europea* L.)和梨(*Prus communis* cv.‘Beurre Hardy’)等20余种植物(表1)。

包埋玻璃化法比包埋脱水法有更高的成芽率。Touchell和Dixson(1995)以木本植物Grevillea茎尖为冻存材料表明包埋脱水法成活率仅32%，而且产生大量愈伤组织后才能诱导成芽；玻璃化法冻存茎尖不经愈伤组织直接成芽，且成活率为70%~80%。Hirai等(1998)超低温保存草莓时也有相似结果：包埋玻璃化法冻存的材料一直保持绿色，化冻后一星期即直接成苗(90%)，高于包埋脱水法冻存材料的成苗率，而且较之恢复生长更早。Carlo等(2000)、Shibli和Al Juboory(2000)分别以李和橄榄为材比较了包埋玻璃化法与包埋脱水法两种方法，采用前者冻存的材料成苗率均高于后者，两种方法成苗率分别为47.5%/不足10%(李)，64%/48%(橄榄)。三俞菜茎尖包埋玻璃化法冻存后3天直接成芽率为96%，比包埋脱水法高出30%，在百合中也是如此。

但对于某些植物而言，包埋玻璃化法不一定是最适合的，这可能与基因型有关。Matsumoto等(1998)试验发现，杂种补血草茎尖分别用玻璃化法、包埋脱水法、包埋玻璃化法冻存后成活力基本一致；辣根菜包埋玻璃化冻存3天后，存活率为60%；用包埋脱水法保存存活率大于90%。酸橙的茎尖分别用包埋玻璃化法和包埋脱水法冻存后，存活率分为57%和93%(Al Ababneh *et al.*, 2002)。

3.2 冻存材料的遗传稳定性

超低温保存植物材料从理论上讲，几乎所有的细胞代谢活动和生长过程都停止进行，而细胞活力和形态发生的潜能可保存。从而降低了基因变异的可能性，有利于保持植物的遗传稳定性。包埋玻璃化法冻存植物茎尖不经愈伤组织直接成芽，发育成的植株无形态变异，与不经包埋的玻璃化法所得结论一致。石思信等(1996)在进行玉米花粉的超低温保存研究中发现，玉米自交系‘郑1142’和‘黄早四’的花粉在超低温保存1~2年后，其后代的田间农艺性状、染色体数目和结构，过氧化物酶同工酶和酶溶蛋白质图谱，都没有发现异常。Hirai和Sakai(1999a, 1999b, 2001)及Hirai(2001)以马铃薯腋芽的分生组织以及草莓、薄荷、百合和中国薯蓣等的茎尖为材料进行包埋玻璃化法冻存

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

表 1 包埋玻璃化法超低温保存植物报道一览表

Table 1 A list of published studies on cryopreservation of plant by encapsulation-vitrification method

种名	外植体	参考文献
香石竹 *Dianthus caryophyllus* L.	顶端分生组织	Tannoury *et al*., 1991
梧桐 *Guazuma crinita* Mart	不定芽	Maruyama *et al*., 1998
补血草 *Limonium* cv ‘Blue Syophonrt’	顶端分生组织	Matsumoto *et al*., 1998
桃 *Prunus persica*	茎尖	Dereuddre *et al*., 1994
咖啡 *Coffea Arabica* and *C. canephora*	体细胞胚	Dereuddre *et al*., 1994
梨 *Pyrus communis* cv ‘Beurre Hardy’	茎尖	Dereuddre *et al*., 1994
李 *Prunus domestica* L.	茎尖	Carlo *et al*., 2000
苹果 *Malus domestica* Borkh	茎尖	Paul *et al*., 2000
苹果 *Malus pumila* cv ‘Golden Delicious’	茎尖	Dereuddre *et al*., 1994
百合 *Lilium japonicum* Thumb	顶端分生组织	Sakai and Matsumoto , 1996
橄榄树 *Olea europea* L.	体细胞胚	Shibli and Al Juboory, 2000
薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino	茎尖	Hirai and Sakai, 2001
草莓 *Fragaria×ananassa* Duch	茎尖	Hirai *et al*., 1998
马铃薯 *Solanum tuberosum* L.	茎尖和腋芽	Hirai and Sakai, 1999a
薄荷 *Mencha spicata* L..	茎尖	Hirai and Sakai, 1999b
酸橙 *Citrus aurantium* L.	茎尖	Al Ababneh *et al*., 2002
枳×橙 *Poncirus trifoliate* (L.) Raf.× *Citrus sinensis* (L.) Osbeck	茎尖	Wang *et al*., 2002
山嵛菜 *Wasabia japonica*	顶端分生组织	Matsumoto *et al*., 1995b
葡萄砧木 Kober 5BB (*Vitis Berlandieri×V. riparia*)	茎尖	Benelli *et al*., 2002
蕉麻 *Musa textiles* Nee	顶端分生组织	Phothipan, 1998
辣根 *Armoracia rusticana*	芽原基	Phunchindawan *et al*., 1997
木薯 *Manihot esculenta*	茎尖	Hirai and Sakai, 2001

后，分用17个和200个引物对这些材料进行RAPD分析，其结果与未冻存处理的样品相同，表明冻存后材料并未发生遗传变异说明以包埋玻璃法冻存材料的遗传稳定性好。但是，冻存后材料如果经愈伤组织诱导成苗则增加了遗传变异的机会(Haskins and Kartha, 1980; Towill, 1984)。

4 总结

综上所述，包埋玻璃化法超低温保存植物是一种极有前途的种质保存新技术，它为植物种质资源的保存开辟了广阔的前景。随着研究工作的深入进行，包埋玻璃化法将在植物工程中起着越来越重要的作用。但包埋玻璃化法研究刚刚起步(目前这方面的工作国内还未展开)，研究工作尚处于探索阶段，对材料的冻存时间及长期冻存后材料再生的研究报道较少。有关冻存后遗传稳定性的研究还不多，需要加强包埋玻璃化法超低温保存过程中对于遗传变异防止措施的研究以及保存后对遗传性状的分析。此外，目前保存的材料多限于茎尖或芽，其应用范围有待于进一步扩大。今后还需对整个操作过程(驯化，预培养，脱水时间、程度及再培养等各环节)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

进行优化组合，探索一条应用范围广、保存效果更好的包埋玻璃化途径，为安全保存营养繁殖性遗传资源提供切实可靠的技术指导，也为早日建立稀有或濒危植物的种质资源库奠定基础。

参 考 文 献

国家环保局 (1991) 珍稀、濒危植物保护研究．中国环境科学出版社，北京，15

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:** 244-250

马锋旺，张军科，李嘉瑞 (1999) 杏细胞悬浮培养物超低温保存有关因素的研究．农业生物技术学报，**7(1):** 10，16

石思信，张志娥，肖建平 (1996)玉米花粉超低温保存后遗传稳定性的研究．作物学报，**22(4):** 409-413

王献溥 (1994) 生物多样性保护与利用的主要研究方向．自然资源，**4:** 1-6

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

徐刚标 (2000) 植物种质资源离体保存研究进展．中南林学院学报，**20(4):** 81-87

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

臧新，梅兴国，龚伟，常俊丽 (2002) 中国红豆杉悬浮培养细胞的超低温保存．生物技术，**12(2):** 13-14

赵艳华，吴永杰，周明德 (1999) 马哈利樱桃离体茎尖超低温保存的研究．园艺学报，**26:** 402-403

Al-Ababneh S, Karam NS Shibli RA (2002) Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium*) shoot tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **38:** 602-607

Benelli C, Lambardi M, Fabbri A (2002) Slow growth storage and cryopreservation of the grapevine rootstocks Kober 5BB [*Vitis*]. *Atti VI Giornate Scientifiche SOI(Italy)*, **1:** 89-90

Carlo AD, Benelli C, Lambardi M (2000) Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *Cryo-Letters*, **21:** 215-222

Chen THH, Kartha KK, Constabel F, Gusta LV (1984) Freezing characteristics of cultured *Catharanthus-roseus*(L)Don, G. cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant physiology*, **75:** 720-725

Dereuddre J, Bertrand DA, Brison M, de Boucaud MT, Engelmann F, Paul H, Paulus V, Sangwan NBS, Scottez C, de Boucaud MT (1994) Cryopreservation of fruit tree somatic embryos and shoot tips. *Genetics Selection Evolution*, **26:** 279-290

Fabre J, Dereuddre J (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryo - Letters*, **11:** 413-426

Finkle BJ, Ulrich JM (1979) Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physiology*, **63:** 598-604

Fukai S, Goi M, Tanaka M (1991) Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan. *Euphytica*, **54:** 201-204

Haskins RH, Kartha KK (1980) Freeze-preservation of pea meristems: cell survival.*Canadian Journal of Botany*, **58:** 833-840

Hirai D, Shirai K, Shirai S, Sakai A (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by encapsulation vitrification. *Euphytica*, **101:**109-115

Hirai D, Sakai A (1999a) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato*

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

Research, **42:** 153-160

Hirai D, Sakai A (1999b) Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Reports*, **19:** 150-155

Hirai D, Sakai A (2001) Recovery growth of plants cryopreserved by encapsulation-vitrification. *Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations*, **80:** 55-64

Hirai D (2001) Studies on cryopreservation of vegetatively propagated crops by encapsulation-vitrification method. *Report of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations*, **99:** 58

Langis R, Schnabel Preikstas BJ, Earle FD, Steponkus PL (1990) Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification. *Cryobiology*, **27:** 657-658

Li PH, Sakai A (1978) Plant Cold Hardiness and Freezing Stress-Mechanisms and Crop Implications. Academic Press, New York, pp. 373-390

Luyet BJ (1937) The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica*, **29:** 1-14

Lu S, Steponkus PL (1994) Cryopreservation of *solanum* shoot-tip by vitrification. *Cryobiology*, **31:** 569

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. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **32:** 301-309

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 Reports*, **13:** 442-446

Matsumoto T, Sakai A, Yamada K (1995a) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *The Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **41:** 237-241

Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K (1995b) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Letters*, **16:** 189-196

Matsumoto T, Takahashi C, Sakai A, Nako Y (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Scientia Horticulturae*, **76:** 105-114

Niino T, Sakai A, Yakuwa H, Nojiri K (1992) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **28:** 261-266

Paul H, Daigny G, Sangwan-Norreel BS (2000) Cryopreservation of apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports*, **19:** 768-774

Phothipan S (1998) Conservation of Abaca (*Musa textilis* Nee) *in vitro*. SPICE, Bangkok (Thailand), pp. 84

Phunchindawan M, Hirata K, Sakai A, Miyamoto K (1997) Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish(*Armoracia rusticana*) hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, **16:** 469-473

Reinert J, Bajaj YPS (1977) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cells Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, New York, pp. 757-777

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, **9:** 30-33

Sakai A, Matsumoto T (1996) *In vitro* Conservation of Plant Genetic Resources, Plant Biotechnology Lab UKM, Malaysia, pp. 105-118

Shibli RA, Al Juboory KH (2000) Cryopreservation of 'Nabali' olive (*Olea europea* L) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *Cryo-Letters*, **21:** 357-366

Takagi H, Thinh NT, Islam OM, Senboku T, Sakai A (1997) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214

tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports*, **16:** 594-599

Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, Dereuddre J (1991) Cryopreservation by vitrification of alginate-coated carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips of *in vitro* plantlets. *Comptes Rendus Academie Sciences*, **313:** 633-638

Touchell DH, Dixson KW (1995) Cryopreservation for the conservation of Australian endangered plants. In: MN Normah, MK Narimah, MM Clyde, eds, *In vitro* Conservation of Plant Genetic Resources. University Kebangsaan, Malaysia, pp. 33

Towill LE (1984) Survival of ultra-low temperatures of shoot-tips from *Solanum tuberosum* group andigena, phureja, stenotonum, tuberosum and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-Letters*, **5:** 319-326

Wang QC, Batuman O, Li P, Bar Joseph M, Gafny R (2002) A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata*(L)Raf × *Citrus sinensis*(L) Osbeck] by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, **128:** 135-142

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t23-214