

超低温保存技术在热带作物种质资源保存中的应用与展望

王敏瑞^{1,2}, 荆永琳^{1,2*}, 陈浪欣^{1,2}, 王小冰^{1,2}, 孟春阳^{1,2,3}, 黄碧兰^{1,2,3},
徐立^{1,2,3**}, 李志英^{1,2,3**}

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 2. 农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点实验室/农业农村部中药材生物学与栽培重点实验室, 海南海口 571101; 3. 国家热带作物中期库/海南省热带作物离体资源库/海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南儋州 571737

摘要: 热带地区植物资源种类丰富, 有极大的种质资源安全保存需求。超低温(液氮)冻存是植物种质资源长期保存的重要手段, 虽需针对特定物种进行技术优化, 但在实际应用后最为节省空间, 且只需定期补充液氮, 极大降低了种质资源长期保存过程中的人力物力投入。经过半个多世纪的发展, 植物超低温保存技术现已在种子、茎尖、花粉等多种类型材料上实现冷冻后成活与再生。为系统总结并全面介绍超低温保存技术在热带作物种质资源安全保存和农业科技中的应用, 本综述以休眠茎段和试管苗茎尖的超低温保存为主线, 回顾了植物超低温保存的研究历史与科技发展, 侧重介绍了超低温保存技术在热带作物茎尖、种子(胚)、花粉、细胞悬浮系和愈伤组织中的研究进展; 同时也对热带作物超低温保存后遗传稳定性评价研究进行介绍, 展望了超低温保存在热带作物茎尖、顽拗性种子和胚性愈伤组织和细胞等材料长期保存中的重要作用。

关键词: 热带作物; 超低温保存; 种质资源; 遗传稳定性

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

Applications and Prospects of Cryogenic Technology in the Conservation of Tropical Crop Germplasm Resources

WANG Minrui^{1,2}, JING Yonglin^{1,2*}, CHEN Langxin^{1,2}, WANG Xiaobing^{1,2}, Meng Chunyang^{1,2,3},
HUANG Bilan^{1,2,3}, XU Li^{1,2,3**}, LI Zhiying^{1,2,3**}

1. Tropical Crop Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China / Key Laboratory of Biological and Cultivation of Herb Medicine (Haikou), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 3. National Gene Bank of Tropical Crops / Hainan in vitro Gene Bank of Tropical Crops / Hainan Province Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Tropical region is rich in plant genetic diversity with great demand for the safe preservation of plant germplasm resources. Cryopreservation [with liquid nitrogen (LN)] is an important method for the long-term preservation of plant germplasm resources. Although cryopreservation protocol often requires optimization for different species, it ensures the use of minimum space and the regular LN supply to facilitate the long-term preservation of genetic resources once established, thereby greatly reducing the labor input and costs in the long run. The cryogenic technique has been studied for more than half a century and has achieved survival and regeneration of plant materials such as seeds, shoot tips and pollen, as well as cell suspension and callus tissue after cryopreservation. To fully introduce the use of cryopreservation to secure valuable tropical plant species and support the development of tropical agricultural sciences, this review first focuses on the shoot tip and dormant shoot segment cryopreservation to review the research history and

收稿日期 2024-09-05; 接受日期 2024-11-11

基金项目 国家重点研发计划项目(No. 2021YFC2600603); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No. 1630032023011)。

作者简介 王敏瑞(1990—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 热带作物超低温离体保存; *同等贡献作者: 荆永琳(1992—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 热带作物离体保存与鉴定评价。**通信作者(Corresponding author): 徐立(XU Li), E-mail: xllzy@263.net; 李志英(LI Zhiying), E-mail: xllizhiying@vip.163.com。

technological development of plant cryopreservation. The research advances of cryopreservation in tropical plant species were emphasized using shoot tips, seeds (zygotic embryos), pollen, cell suspension, and callus. The importance of genetic stability analysis after cryopreservation was also introduced before highlighting the importance and prospects of applying cryopreservation for long-term preservation of shoot tips, recalcitrant seeds, and embryogenic tissues and cells of tropical crops.

Keywords: tropical crops; cryopreservation; germplasm resources; genetic integrity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.010

植物种质资源保存是种质创制和作物育种工作的基础,目前主要有栖息地原位保存、种质圃和种子库保存、离体试管保存和离体超低温保存等方式^[1-3]。我国十分重视作物种质资源的安全保存工作,现已建立一系列的国家级自然保护区、植物园和种质资源圃(库)以安全保存作物及其野生资源^[3]。热带地区植物遗传多样性丰富,其多样的种质资源经过人类数千年的驯化和传播,形成众多全球性的重要作物。2022 年全球产量最高的十大作物中有 6 种(甘蔗、玉米、水稻、油棕、木薯和番茄)起源于热带地区^[4]。这些作物的产业发展在保障全球粮食安全和助力消除贫困上具有极大的发展前景^[5-6]。然而传统的热带作物资源田间保存受到极端天气和病虫害的威胁;其野生资源也受到耕地开垦和土地开发等人为因素的影响,亟需加强重要热带作物资源的离体保存工作^[1]。

种子冻存是最为简单的作物离体资源保存方式^[7]。然而多数热带作物种子不耐低温和脱水干燥,无法干燥后直接冻存;甘蔗、香蕉和甘薯等重要热带作物资源主要依赖无性繁殖,难以获得种子进行冻存^[8],因此,试管苗保存和超低温保存是热带作物资源离体保存的 2 种主要方式^[8-9]。

超低温保存技术可将种质资源冻存在液氮($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)或液氮蒸汽($-196\sim-150\text{ }^{\circ}\text{C}$)中,该温度下细胞分裂和代谢等生命活动停滞,由此降低离体组织培养长期继代导致的遗传变异风险,是长期保存种质资源的理想方式^[7-8,10]。植物离体材料超低温保存工作开展前需要建立和优化超低温冷冻再生体系,经过 60 余年的发展,目前已在植物上实现种子(胚)、冬季休眠茎段、茎尖、花粉、悬浮细胞和胚性愈伤组织等材料的冷冻后再生^[11]。超低温保存体系主要依赖于植物组织培养,虽体系优化耗费一定时间和人力物力,但体系建立后只需定期补充液氮,可大大降低后续人力物力投入,是国际公认最为经济的种质资源长

期保存方式^[8]。

面对种质资源安全保存技术的实际需求,本研究将对植物超低温保存技术的发展与应用进行综述,并介绍该技术在重要热带作物种质资源安全保存的研究和实际应用,有利于促进超低温保存技术更好地服务于热带作物种质资源安全保存和科研育种工作。

1 植物超低温保存技术的历史与发展

20 世纪中叶,温带木本作物冬季休眠枝条的液氮超低温保存首次获得成功^[12]。随后超低温保存技术在试管苗茎尖上的发展极大地促进了植物无性繁殖材料的超低温保存,也影响了其他类型植物材料的超低温保存方式。

1.1 休眠茎段的超低温保存

20 世纪 50 年代末,超低温保存首先在温带桑树冬季休眠枝条上开展优化^[12]。该研究切取直径 0.8 cm、长度为 2~15 cm 的休眠茎段,在程序降温仪中以 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后迅速投入液氮中进行保存。茎段超低温保存结束后移入 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 4 h,随后转入 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境进一步恢复^[12]。该体系应用扦插技术对茎段恢复培养,并成功获得柳树(*Salix* sp.)和杨树(*Populus* sp.)的超低温保存再生植株^[12]。该技术后续应用芽接等技术对超低温保存后的休眠茎段进行恢复再生,并在苹果、梨、树莓等木本作物的超低温保存中获得成功^[13]。美国农业部的作物种质资源保存中心应用超低温保存技术保存超过 2100 份的苹果资源(*Malus* spp.),超过 90%的基因型材料能够达到 40%的再生率^[14]。然而该技术仅适用于温带耐寒作物的超低温保存,且需要在休眠期取材,无法应用于热带作物的安全保存。

1.2 早期试管苗茎尖一步与两步冷冻法

基于植物组织培养技术的发展,20 世纪 70 年代后期有学者开始研究植物离体资源的超低温保存,并在马铃薯(*Solanum tuberosum*)试管苗

茎尖上获得植株再生^[15]。该方法切取马铃薯带2~4片叶原基的试管苗茎尖,在含有1.0 mg/L Benzyladenine (BA)的培养基上稳定培养3 d后置于10%的二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液进行1 h冷冻保护,随后投入液氮进行冷冻保存。解冻时将茎尖快速转入35℃的液体培养基中浸没1 min,随后转入再生培养基中恢复培养,得到11%的茎尖再生率。早期的试管苗茎尖超低温保存体系多用DMSO进行冷冻保护,且多参照休眠茎段超低温保存方法应用两步法进行冷冻,在马铃薯^[16]、草莓(*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Redcoat)^[17]和木薯(*Manihot esculenta* Crantz)^[18]等作物上获得冷冻后再生。然而两步冷冻法需将茎尖缓慢降温至-30~-20℃,会给非休眠状态的茎尖组织带来极大的低温伤害,因此,在热带作物超低温保存中的实际应用极其有限。

1.3 包埋干燥法

受20世纪80年代应用海藻酸钙包埋植物组织制作人工种子的启示^[19],FABRE等^[20]在马铃薯茎尖超低温保存中先将浸有茎尖的3%海藻酸钠溶液滴入0.1 mol/L的氯化钙溶液,生成包裹着茎尖的海藻酸钙小球。随后应用0.5 mol/L蔗糖对包埋后的茎尖进行预培养,接着在无菌空气流中干燥4 h后将包埋有茎尖的小球转入冷冻管中投入液氮进行冻存,由此建立包埋干燥法。在随后的十多年间,此方法在苹果、柑橘(*Citrus* spp.)、葡萄(*Vitis* spp.)和菊花(*Chrysanthemum morifolium*)等作物的茎尖、愈伤组织、体胚等材料上获得成功^[21]。该方法应用物理干燥的方式对材料进行冷冻保护,不适合对脱水干燥敏感的物种。包埋干燥法在热带作物如木薯^[22]和咖啡(*Coffea* spp.)^[23]茎尖的超低温保存中也有报道,但获得较低再生率并表现很强的基因型差异性。

1.4 玻璃化法与包埋玻璃化法

1990年,一种名为植物玻璃化溶液(plant vitrification solution, PVS)的冷冻保护剂首次应用于柑橘悬浮细胞的超低温保存^[24]。该溶液包含有甘油(30%, W/V)、乙二醇(15%, W/V)、二甲基亚砷(15%, W/V)和0.4 mol/L的蔗糖,且冷冻和解冻过程中在-115℃附近表现明显的玻璃态转变^[24]。应用该溶液作为冷冻保护剂可极大地减少冷冻和解冻中植物细胞内外的自由水结晶,降低冷冻伤害^[24]。在茎尖超低温保存中,PVS2溶液于1991年首次应用于康乃馨(*Diathus caryo-*

phyllus L.)的茎尖,该方法将茎尖使用海藻酸钙包埋后进行PVS2冷冻保护,被称为包埋玻璃化法(encapsulation-vitrification)^[25]。一年后,PVS2溶液成功应用于甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)非包埋茎尖的超低温保存中并获得64%的再生率,该方法被称为玻璃化法(vitrification)^[26]。

CHAROENSUB等^[27]在木薯上建立了较为成熟的玻璃化法茎尖超低温保存体系。该体系在冷冻保护前首先将茎尖预培养在含有0.3 mol/L蔗糖的固体培养基上16 h,随后使用含2 mol/L甘油和0.4 mol/L蔗糖的加载液处理茎尖20 min。冷冻保护应用PVS2溶液在常温下进行45 min的处理,该方法在木薯茎尖超低温保存后获得75%的再生率。CHAROENSUB等^[28]还建立了包埋玻璃化法木薯茎尖超低温保存体系。包埋后的茎尖较直接处理相比,往往需要更长的预培养和冷冻保护时间,对于PVS2耐受性差的茎尖,延缓PVS2的渗透速率有助于减轻冷冻保护时所受的渗透胁迫。

玻璃化法克服了许多物种不耐物理干燥的缺点,至今仍是种子、愈伤组织和胚性细胞悬浮系等材料超低温保存的主要方法之一^[10]。

1.5 小滴玻璃化法

由于玻璃化溶液在茎尖超低温保存获得巨大成功,加之应用铝箔条为载体实现快速“冷冻—解冻”能够获得更高的茎尖冷冻后再生率,PANIS等^[29]以铝箔条为载体与PVS2冷冻保护相结合,在香蕉(*Musa* spp.)上优化建立了广谱性更高的香蕉超低温保存体系,并将其命名为小滴玻璃化法(droplet vitrification)。该方法应用1.0 mm的香蕉试管苗茎尖为材料,经过30 min含有2 mol/L甘油和0.4 mol/L蔗糖的加载液预处理后,在冰上应用PVS2进行30 min冷冻保护,随后将茎尖转至铝箔条上预先准备好的PVS2小液滴中并快速投入液氮进行冷冻^[29]。冷冻保存结束后将茎尖同铝箔条一起快速装入充分预冷的冷冻管后在液氮中进行长期保存^[29]。解冻时在液氮表面拧开冷冻管后将带有茎尖的铝箔条快速转入预先备好的1.2 mol/L蔗糖卸载液中快速解冻,并短暂浸泡20 min以稀释茎尖中的PVS2冷冻保护剂,之后将茎尖转至恢复培养基上再生培养^[29]。小滴玻璃化法可基于已有的玻璃化和包埋玻璃化体系进行快速优化,操作简便,现已广泛应用于马铃薯、大蒜(*Allium sativum*)、苹果等试管苗茎尖的超低

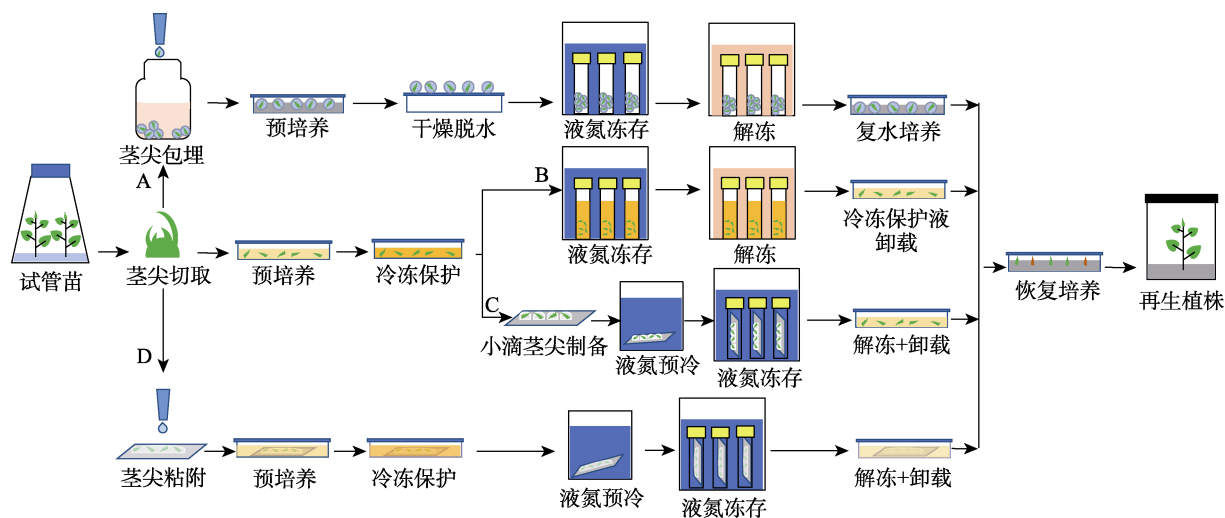
温保存^[30], 在热带作物木薯、甘蔗 (*Saccharum* spp.)、菠萝 (*Ananas comosus*) 等作物也有研究和应用^[31-32]。

1.6 铝盘玻璃化法/干燥法

为提高茎尖冷冻保护过程的简便性, 降低冷冻保护操作中对茎尖造成的机械损伤, HIRAI^[33]将茎尖应用海藻酸钙包埋的技术粘附在铝箔条上, 随后进行冷冻保护的各项操作, 该方法被命名为 gelled droplet-vitrification。该研究团队随后定制有凹槽的铝片, 以方便茎尖更好地粘附在铝盘上。茎尖粘附后可参照小滴玻璃化和包埋玻璃化法的体系进行冷冻保护, 并由此建立铝盘玻璃化法 (vitrification Cryo-plate, V Cryo-plate)^[34]; 也可冷冻保护时采用空气流干燥的方式, 由此建立了铝盘干燥法 (dehydration Cryo-plate, D Cryo-plate)^[35]。2 种方法都能实现快速冷冻和解冻操

作, 并在马铃薯上获得 80%~100% 的超低温保存再生率^[36]。热带作物茎尖超低温保存主要应用 V Cryo-plate 的方式进行。VIANNA 等^[37]应用铝盘玻璃化法建立了细柱西番莲 (*Passiflora suberosa*) 的茎尖超低温保存体系: 该方法从萌发 40 d 腋芽上切取茎尖, 经过 0.3 mol/L 蔗糖预培养对茎尖进行粘附。茎尖先转入添加有 3% 海藻酸钠溶液的凹槽中, 随后在凹槽中滴入 0.1 mol/L 的氯化钙溶液与海藻酸钠发生反应, 由此完成粘附并进行后续的冷冻保护操作^[37]。经过优化, 该研究在 PVS3 溶液常温下冷冻保护 45~90 min 后获得最高再生率 (50%~60%)^[37]。

铝盘玻璃化法可基于小滴玻璃化法进行建立, 且能获得更加一致的再生率^[38]。包埋干燥和应用玻璃化溶液进行冷冻保护和茎尖超低温保存的主要流程见图 1。



A: 包埋干燥法; B: 玻璃化法; C: 小滴玻璃化法; D: 铝盘玻璃化法。

A: Encapsulation-dehydration; B: Vitrification; C: Droplet-vitrification; D: Vitrification cryo-plate.

图 1 目前应用最为广泛的茎尖超低温保存技术

Fig. 1 Illustration of most widely used techniques for shoot tip cryopreservation

2 重要热带作物茎尖超低温保存研究进展

植物茎尖是植物生长与发育的重要器官, 具有较高的遗传稳定性, 保存有特定的植物性状, 是植物开展超低温保存的重要材料来源, 尤其适用于以无性繁殖为主作物的超低温保存。茎尖超低温保存依赖成熟的茎尖离体培养和再生体系, 目前已在香蕉、木薯、菠萝、甘蔗等重要热带作物上获得成功应用。

2.1 香蕉

香蕉是目前开展超低温保存最为成功的热带作物。早期香蕉茎尖的冷冻保护主要在高浓度蔗

糖预培养后通过空气流干燥进行^[39]。随后有研究者将此方法与 PVS2 冷冻保护做对比, 结果表明结合 PVS2 冷冻保护与快速冷冻/解冻的操作步骤获得最高的再生率^[40]。该方法随后经过优化并命名为小滴玻璃化法^[29], 并在香蕉种质资源的实际保存中获得极大成功^[41]。国际香蕉交换中心 (International Musa Transit Center) 应用小滴玻璃化法开展香蕉茎尖超低温保存工作近 20 年, 截至 2020 年已成功保存 1100 份香蕉资源^[8]。

2.2 木薯

木薯是开展茎尖超低温保存研究最早的作物

之一,早期先后试验了DMSO两步冷冻法^[18]和包埋干燥法^[22],在部分木薯基因型上获得冷冻后再生。随着玻璃化溶液在香蕉茎尖超低温保存上的成功应用,DUMET等^[42]参照香蕉小滴玻璃化体系,应用PVS2冰上处理30 min对木薯试管苗茎尖进行“快速冷冻—超低温保存—快速解冻”试验,获得38%~48%再生率,高于包埋干燥法7%~14%的再生率。国际热带农业研究中心CIAT随后应用小滴玻璃化法对100份经包埋干燥法冷冻再生率低于30%的基因型进行超低温保存,超过70个木薯基因型材料获得高于30%的再生率^[43]。上述研究表明小滴玻璃化法在木薯茎尖超低温保存上有极大的应用潜力。然而上述方法借鉴香蕉茎尖超低温保存技术,并未针对木薯进行优化,在木薯上还有极大的提升潜力。

2.3 菠萝

茎尖超低温保存对菠萝的特异种质保存具有重要的意义。GONZÁLEZ-ARNAO等^[44]于20世纪90年代末对比了包埋干燥法与PVS2玻璃化法对菠萝茎尖的保存效果,结果表明只有玻璃化法能够获得稳定的茎尖再生。随后冷冻保护液PVS3也成功应用于菠萝茎尖的超低温保存^[45],且应用PVS3建立的包埋玻璃化法在菠萝上获得更高的超低温保存再生率^[46]。应用最新的小滴玻璃化超低温保存方法,SOUZA等^[31]应用0.5~1 mm的菠萝茎尖为外植体,在共计16个菠萝栽培和野生种中得到90%的平均再生率,表明小滴玻璃化法在菠萝茎尖超低温保存中具有广谱性,可以应用于菠萝种质资源的实际保存^[31]。

2.4 甘蔗

20世纪90年代初,在法国、意大利和古巴等国家科研人员的合作下,应用包埋干燥法的甘蔗茎尖在超低温保存中获得成功再生^[47-48]。该体系应用3%的海藻酸钠包埋茎尖,在5个基因型上获得38%~91%的再生率^[47-48]。参照香蕉小滴玻璃化法的流程,BARRACO等^[49]在2份甘蔗资源上对PVS2和PVS3的冷冻保护时间进行优化后获得20%~37%的再生率,低于包埋干燥法的53%~60%。为了提高小滴玻璃化法甘蔗茎尖超低温保存后的再生率,VOLK等^[50]在冷冻保护中添加谷胱甘肽、抗坏血酸等物质,但没有进一步提升再生率。KAYA等^[51]在甘蔗茎尖超低温保存上对比了包埋玻璃化法与小滴玻璃化法,结果表明小滴

玻璃化法能够获得更高的再生率。VOLK等^[50]还应用包埋干燥法^[49]和铝盘玻璃化法对甘蔗茎尖进行超低温保存试验,获得0~50%的再生率。上述研究表明现有的甘蔗茎尖超低温保存体系存在明显的基因型差异性,除继续对冷冻保护步骤进行优化外,还需加强在蔗糖预培养、加载等步骤的优化工作。

2.5 其他热带作物

甘薯主要依赖无性繁殖,也是开展茎尖超低温保存研究最早的作物之一。最新的甘薯茎尖超低温保存主要应用小滴玻璃化法^[52]:国际马铃薯中心的研究团队在2014年首次报道了甘薯小滴玻璃化法超低温保存体系的构建与优化,该体系应用30~45 min PVS2冰上冷冻保护,在24份甘薯资源中获得1.7%~66%的再生率^[53]。WILMS等^[54]应用甘薯诱导的腋芽进行体系优化,茎尖在短暂加载液(2 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖)处理后,进行PVS2冷冻保护,在10个甘薯基因型上获得10%~84%的再生率,其中7份资源的冷冻后再生率达到40%以上^[54]。小滴玻璃化法由于其操作更为简便,是热带作物茎尖超低温保存应用最多的技术手段,已在山药、芋头等根茎类作物^[52],牛大力(*Millettia speciosa* Champ.)^[55]、巴戟天(*Morinda officinalis* How.)^[56]等热带药用和濒危物种,兰花(*Orchidaceae*)^[57]、巢蕨(*Neottopteris nidus*)^[58]和红掌(*Anthurium andraeanum* Lind.)^[59-60]等热带花卉资源,油梨等热带木本作物^[61]上获得成功。小滴玻璃化法和铝盘玻璃化法在重要热带作物茎尖超低温保存中的主要步骤详见表1。

3 热带作物种子超低温保存研究进展

3.1 种子

种子是植物种质资源保存主要的材料来源之一^[64],根据种子的贮藏行为可分为3类:(1)正常型种子,可干燥至含水量低于7%,并能在-10℃下长期保存^[65];(2)顽拗型种子,不耐干燥且对低温非常敏感,无法直接干燥后冷冻保存^[66];(3)中间型种子,可以干燥至含水量为6%~12%,但与正常型种子相比,其活力丧失相对较快^[67]。据估计,全世界8%的开花植物的种子为顽拗型种子,但在热带地区,这一比例高达50%^[65,68]。液氮超低温保存可以延长传统型种子的冻存期

表 1 热带作物茎尖应用小滴玻璃化法和铝盘玻璃化法开展超低温保存的主要步骤

Tab. 1 Main steps applying Droplet-vitrification and Vitrification cryo-foil for shoot tip cryopreservation of tropical crops

物种名称 Species	所用材料 Explant	预培养方式 Preculture	冷冻保护方式 Cryoprotection	再生率（测试基因型数） Shoot tip regrowth (Number of tested genotypes)	参考文献 Reference
芭蕉属和象腿蕉属 (<i>Musa</i> spp. and <i>Ensete</i> spp.)	试管苗 1.0 mm 茎尖，带 1~2 个叶原基	2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温预培养不超过 7 h	PVS2 冰上处理 30~50 min	平均再生率 53%（8 个芭蕉属和 1 个象腿蕉属基因组型的 56 份资源）	[29]
芭蕉属 (<i>Musa</i> spp.)	试管苗 1.5~2.5 mm 茎尖，带 1~2 个叶原基	2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温预培养 20 min~2 h	PVS2 冰上处理 30~50 min	42%~78%（5 个基因组型 15 份资源）	[41]
木薯 (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	试管苗 0.5 mm 茎尖，带 1~2 个叶原基	2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温预培养 20~60 min	PVS2 冰上处理 30 min	平均 79%（9）	[42]
	试管苗 1~2 mm 茎尖	2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温预培养 2 h	PVS2 冰上处理 30 min	>30%(97 个测试基因型中的 76 个)	[43]
菠萝 [<i>Ananas comosus</i> (L.) Mer.]	试管苗 0.5~1.0 mm 茎尖，带 1 个叶原基	0.3 mol/L 蔗糖预培养 2 d	PVS2 冰上处理 40 min	60%~100%（16）	[31]
甘蔗 (<i>Saccharum officinarum</i> Linn.)	试管苗 1.5~2.0 mm 茎尖	0.5 mol/L 蔗糖预培养 1 d 后，将茎尖黏附在铝盘上，接着 2 mol/L 甘油+1.6 mol/L 蔗糖预处理 30 min	PVS2 室温处理 30 min（铝盘玻璃化法）	56.7%~100%（10）	[62]
番薯 [<i>Ipomoea batatas</i> (L.)]	诱导 3~9 周的试管苗 1.0 mm 腋芽茎尖，带 2~3 个叶原基	2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温处理 20 min	PVS2 冰上处理 30 min	9.5%~83.9%（10）	[54]
三角叶薯蓣 (<i>Dioscorea deltoidea</i> Wall. Ex Griseb.)	试管苗茎尖 2.0 mm	0.3 mol/L 蔗糖预培养 16 h，2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温处理 20 min	PVS2 冰上处理 90 min	30%~54%(Vi); 21%~51% (Dr-vi), 15 个基因型	[63]
油梨 (<i>Persea americana</i> Mill.)	0.3 mol/L 蔗糖或 10 ℃ 预处理 2 周的试管苗茎尖，1.5 mm×1.5 mm 大小带 2 个叶原基	2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖室温处理 20 min	VSL 冷冻保护剂冰上处理品种 Velvick 20 min; Reed10 min	35%（品种 Velvick）45%（品种 Reed）	[61]

注：除有特殊标注，该研究所用超低温保存方法均为小滴玻璃化法。
Note: Unless otherwise specified, the protocol applied in these studies was droplet-vitrification.

限，也是目前顽拗性种子长期保存唯一可行的技术手段^[69]。种子冷冻保存后的存活率与含水量密切相关，因而需在冷冻保存前确定种子的最佳含水量^[70]。

咖啡是种子超低温保存研究较多的热带作物，BECWAR 等^[71]研究表明咖啡(*Coffea arabica*)种子能够耐受 8%的水分含量，但直接液氮冻存后无法萌发^[71]。该研究还表明缓慢冷却能够提高咖啡种子超低温保存后的萌发率。DUSSERT 等^[70]随后在 9 份咖啡资源上开展种子保存试验，同样发现咖啡 *C. arabica* 缓慢冷却比快速冷却获得更高的再生率，而 *C. racemosa* 等 3 个咖啡种应用 2 种冷冻方式均能获得较高再生率（67%~81%）。该研究还发现咖啡种子中的结合水含量与脂质含量呈负相关，脂质含量较高的种子更容易在冷冻

中受到伤害。针对咖啡 *C. arabica* 保存需缓慢冷却带来的操作不便，COELHO 等^[72]优化了该种咖啡种子快速冷冻保存体系，使该种子缓慢干燥至 20%含水量后可直接投入液氮保存。

为对空气凤梨资源 (*Tillandsia* spp.) 开展长期保存，OLIVEIRA 等^[73]将 20 种空气凤梨种子放入冷冻管中，并于活性硅胶上干燥至 7%的种子含水量后快速浸入液氮进行 450 d 的冷冻保存，13 种空气凤梨的种子获得 80%的再生率。多数兰科植物的种子能够忍受一定程度的脱水干燥^[74]，PRITCHARD^[75]将兰花 7 个属的成熟种子干燥至 5%~11%后直接投入液氮冷冻处理，解冻后种子萌发率没有下降，其中 *Anacamptis morio*（蓝紫倒距兰）的种子超低温保存后获得更高的萌发率^[74-78]。此外包埋干燥与玻璃化等茎尖超低温保存技术也

应用于兰科种子的超低温保存，为无法直接干燥的兰科种子提供了新的冷冻保护方法^[79-80]。HU等^[81]将台湾本地兰（*Bletilla formosana*）的种子应用玻璃化法于PVS2中脱水处理30 min，经超低温保存后获得91%的萌发率，且保存1 a的种子萌发率维持不变。

3.2 种胚

种胚承载种子的遗传信息，体积小，与其他材料相比耐脱水和耐低温能力强，是影响种子成功保存的关键^[82-84]。一些热带作物的种子体积过大或者种皮过厚，无法对种子内的种胚进行有效干燥，因而需在冻存前将种胚取出，对其干燥后冷冻保存。

椰子种子体积过大，为了长期保存其种质资源，SISUNANDAR等^[85]将其种胚取出，直接干燥后进行液氮冻存。该研究表明种胚8 h快速干燥后经快速冷冻—解冻处理获得最高的萌发率，此外新鲜种胚的冷冻后萌发率（40%）也高于与经过12 d运输的离体种胚（20%）。基于此干燥方法，SISUNANDAR等^[86]对不同成熟度的椰子种胚进行超低温保存试验，结果表明11月龄的种胚冷冻后再生率最高（60%），但椰子采摘后需在3周内分离种胚。在咖啡和菠萝蜜的冷冻保存中，与未成熟或完全成熟的种胚相比，成熟中期收获的种胚更适合超低温保存^[87-88]。棕榈科植物的种胚对直接干燥耐受性较强，相似的种胚超低温保存技术也实现了油棕（*Elaeis guineensis*）和布迪椰属（*Butia capitata*）种胚的长期保存^[89-90]。

芭蕉属植物种皮较为坚硬，为更有效地干燥脱水，ESQUIVEL等^[91]将2种不同基因型的野蕉种胚在超净工作台中干燥后浸入液氮进行保存，解冻后得到最低80%的萌发率。SINGH等^[92]研究了野蕉（*Musa balbisiana*）种子的冷冻保存特性，结果表明种胚可以在超低温保存前干燥脱水至5%~10%的相对含水量，该研究还发现种胚离体培养是野蕉种子冷冻后萌发的必须手段。

对于种胚无法直接干燥的顽拗型种子，参照茎尖冷冻保护方式对种胚进行脱水干燥能够提高种胚超低温保存后的成活与萌发率。在咖啡种胚超低温保存研究中，VALDÉS等^[93]应用PVS3玻璃化冷冻保护液对咖啡（*Coffea arabica*）种胚脱水干燥后进行冷冻，获得了100%的种胚萌发率。为对鳞花木属（*Lepisanthes fruticosa*）植物种子

实现长期保存，BUSTAM等^[94]应用PVS2冷冻保护液优化建立了玻璃化法种胚超低温保存体系，获得67%的萌发率。超低温保存技术在重要热带作物种子（胚）保存中的研究成果见表2。

4 热带作物花粉、悬浮细胞与愈伤组织超低温保存研究进展

4.1 花粉

花粉是单细胞雄配子体，包含了物种单倍体基因组的所有信息，使其成为种质资源保存和交换的重要材料^[101]。花粉保存不仅有效地克服了亲本在不同时间和不同地理位置杂交的障碍，也是保护植物遗传多样性的有效手段。在各种花粉冷冻保存方法中，含水量高低是影响保存成功的关键要素，且超低温保存能够极长地延长花粉保存时间^[102]。

在热带作物花粉保存中，KARUN等^[103]将椰子2个品种的花粉干燥至含水量7.5%后，用铝箔进行包裹直接浸入液氮中，解冻后获得26%~32%花粉萌发率；长期保存试验表明花粉活力连续3 a保持25%以上，由此验证了椰子花粉超低温长期保存的可行性。在重要热带油料作物油棕上，TANDON等^[104]将新鲜开放的雄花序花粉干燥1 h至含水量23.3%后投入液氮进行超低温保存，保存8 a后解冻获得54%的花粉萌发率，与对照相比没有显著变化。花粉超低温保存的成功受到花期和花粉的成熟度的影响。ANILKUMAR等^[105]发现在火龙果花朵完全开放时采集的新鲜花粉超低温保存后萌发率最高，达到71.26%，而在开花前2 h和开花后10 h采集的花粉冷冻后无法萌发。CHAUDHURY等^[106]于晴天上午8:00—10:00间的花药开裂时收集芒果与荔枝花粉并用环己烷对花粉在运输过程中进行短暂保存，超低温保存前将保存液滤除后进行干燥，随后投入液氮超低温保存。该方法现已应用于180份芒果资源花粉与19份荔枝资源花粉的长期保存，且超低温保存4 a后的花粉未发现活力下降^[106]。VEENA等^[107]发现芒果花粉存活力短、对干燥敏感性高的特点，可考虑到基因型、季节和区域的差异，适当延长干燥时间。超低温保存技术在重要热带作物花粉保存中的研究成果详见表3。

4.2 悬浮细胞

植物悬浮细胞是一种能够持续增殖、保持均

表 2 重要热带作物种子（胚）超低温保存主要步骤
Tab. 2 Main steps for cryopreserving seeds and seed embryos of tropical crops

物种名称 Species	所用材料 Explant	预培养方式 Preculture	冷冻保护（脱水）方式 Cryoprotection	萌发率 Germination rate	参考文献 Reference
香蕉（ <i>Musa acuminata</i> , <i>M. balbisiana</i> ）	种胚		无菌空气流中干燥 2.0 h 至含水量 11%~14%	80%~92%	[91]
香蕉（ <i>M. balbisiana</i> ）	种胚		无菌空气流中干燥 5.0 h 至含水量 5%~10%，环境温度 25℃，湿度 55%	>80%	[92]
咖啡（ <i>Coffea</i> spp.）	种子		饱和盐溶液中 25℃下梯度浸泡 3 周，含水量 14%~24%	73~81% （3 个咖啡种）	[70]
咖啡（ <i>C. arabica</i> L.）	种子		硅胶干燥至含水量 20%	>80%	[72]
	种胚	0.3 mol/L 蔗糖预培养 18 h, 2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖处理 20 min	（小滴玻璃化）PVS3 溶液 23℃脱水 40 min	100%	[93]
油棕（ <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.）	合子胚		带胚乳的种胚，室温下干燥 3 d	90%	[89]
西番莲（ <i>Passiflora edulis</i> Sims）	种子		40℃干燥 70 min 至含水量 10%	4%~100%	[95]
椰子（ <i>Cocos nucifera</i> ）	种胚		干燥室脱水 8 h 至含水量 20%	40%	[86]
椰子（ <i>Cocos nucifera</i> L.）	种胚	0.6 mol/L 蔗糖室温预培养 3 d	（玻璃化）PVS3 脱水处理 16 h	20%~25%	[96]
凤梨（ <i>Vriesea bahiana</i> ）	种子		活性硅胶上干燥 24 h 至含水量 5.9%	95%	[97]
空气凤梨（ <i>Tillandsia</i> spp.）	种子		硅胶 3 h 至含水量 7%	20 个种中有 13 个种萌发率≥80%	[73]
番木瓜（ <i>Carica papaya</i> L.）	种子		干燥至含水量 5%~30%	>70%（解冻后 2 mmol/L GA ₃ 处理 15 min）	[98]
兰花（白芨）[<i>Bletilla formosana</i> (Hayata) Schltr.]	成熟种子		（玻璃化）2.0 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖中脱水 10~30 min，PVS2 冰上处理 30 min	91%	[81]
兰花（五唇兰）(<i>Doritis pulcherrima</i> Lindl.)	种子		（玻璃化）PVS2 室温下处理 50 min	62%	[99]
兰花（白芨）(<i>Bletilla striata</i> Rchb. f.)	未成熟种子	（玻璃化）0.3 mol/L 蔗糖室温预培养 3 d	（玻璃化）PVS2 冰上处理 2 h	92%（存活率）	[79]
	成熟种子和发芽种子	0.3 mol/L 蔗糖室温预培养 3 h, 2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖处理 15 min	（小滴玻璃化）PVS2 室温下处理 60 min	93%（成熟种子） 91%（发芽种子）	[100]

一分散的细胞团，由多个未分化的单细胞组成，是遗传转化的良好受体^[113-114]。细胞悬浮系的建立花费大量时间，且需不断地继代以保持细胞活力，对胚性悬浮细胞开展超低温保存，能够降低其在长期继代培养过程中导致胚性特征丧失以及发生遗传变异的风险^[115-116]。悬浮细胞冷冻保存前主要应用冷冻保护液对细胞脱水干燥^[117-118]。早期的冷冻保护液种类较多，在甘蔗细胞悬浮系的低温保存中 FINKLE 等^[117]发现含有 8%葡萄糖、10%

DMSO 与 10% PEG（均为 w/V）的冷冻保护液能使悬浮细胞忍受冷冻保存。GNANAPRAGASAM 等^[118]在甘蔗悬浮细胞超低温保存研究中发现细胞经 0.33 mol/L 山梨醇预培养 3 d 后，应用添加 0.5 mol/L 甘油、0.5 mol/L 山梨醇和 1.0 mol/L 蔗糖的冷冻保护剂能够获得最高的冷冻后成活率。在香蕉悬浮系的超低温保存研究中，PANIS 等^[119]采用甘油和 DMSO 混合液进行低温保护，结果显示 DMSO 占 5%时效果最好。在此基础上 GEORGET

表 3 重要热带作物花粉超低温保存主要步骤
Tab. 3 Main steps for cryopreserving pollens of tropical crops

物种名称 Species	冷冻保护（脱水）方式 Cryoprotection	萌发率/成活率 Germination or survival rate	参考文献 Reference
椰子（ <i>Cocos nucifera</i> L.）	干燥至含水量 7.5%	26%~32%	[103]
油棕（ <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.）	37 ℃下干燥 2~8 h	未表明	[108]
	干燥 1 h 至含水量 23.3%	49%	[104]
芒果（ <i>Mangifera indica</i> L.）	干燥器中干燥 1 h	未表明	[107]
火龙果（ <i>Hylocereus undatus</i> ）	干燥器中干燥 2 h	71.26%	[105]
番石榴（ <i>Psidium guajava</i> ）	无需干燥	1.78%~81.67% （7 个基因型）	[109]
菠萝蜜（ <i>Artocarpus heterophyllus</i> ）	干燥器中干燥 2 h	未表明	[110]
菠萝（ <i>Ananas</i> spp.）	硅胶干燥 6 h 至含水量 25~30%	8.24%~94.25%	[111]
		（3 个基因型 10 份资源）	
番木瓜（ <i>Carica papaya</i> L.）	明胶胶囊包裹，于含硅胶冻存管中-20 ℃预冷 2 h	54.33%~56.51%	[112]

等^[120]对香蕉悬浮系超低温保存的预培养步骤进行优化,最终在冷冻保护前采用三步蔗糖预培养。上述香蕉悬浮系的超低温保存均采用两步冷冻法进行冷冻^[119-120]。

目前在植物上冷冻保护应用最广的 PVS2 玻璃化溶液同样适用于热带作物悬浮系超低温保存。李艳娜等^[121]应用两步梯度 PVS2 冷冻保护对巴西蕉、北大矮蕉和粤优抗 1 号的香蕉悬浮细胞进行超低温保存,获得较高的再生率。谢玉明等^[122]在荔枝上建立了玻璃化法胚性悬浮细胞超低温保存体系,该体系采用山梨醇预培养结合两步 PVS2 冷冻保护,获得 27.1%的超低温保存成活率。为了对油棕细胞悬浮系进行超低温保存,WEI 等^[89]应用蔗糖预培养结合 PVS2 冷冻保护的方式进行超低温保存,获得 68.33%成活率。李运合等^[123]应用 30 min PVS3 玻璃化溶液冷冻保护对芒果胚性培养物细胞和愈伤组织细胞进行超低温保存,存活率分别为 94.7%和 0,表明胚性培养物细胞较普通愈伤组织相比具有更强的耐脱水和冷冻能力。

4.3 愈伤组织

愈伤组织由薄壁细胞组成,一般被分为非胚性愈伤和胚性愈伤^[124]。胚性愈伤组织可能会因长期继代而造成体细胞变异,或致使体胚潜力下降甚至彻底丧失^[125]。超低温保存可以有效遏制愈伤组织变异的发生,降低长期保存带来再生能力丧失的风险。早在 1979 年,ULRICH 等^[126]已对甘蔗愈伤组织超低温保存开展研究,发现复合冷冻保护剂(8%葡萄糖+10% DMSO+10% PEG)能够获得较好的冷冻保护作用。简令成等^[127]将上述冷

冻保护剂与 0.5 mol/L 山梨糖醇+10% DMSO 溶液在甘蔗愈伤组织超低温保存中进行对比,发现后者冷冻保护效果更好,这可能与试验材料基因型的不同有关。MARTÍNEZ-MONTERO 等^[128]还应用 0.3~0.75 mol/L 蔗糖+10% DMSO 为冷冻保护剂成功保存了 3 个甘蔗杂交种的胚性愈伤组织。MARTÍNEZ-MONTERO 等^[129]随后对甘蔗胚性愈伤组织诱导的体胚团进行超低温保存试验,并应用小滴玻璃化法获得了 55%的成活率。除甘蔗之外,应用 PVS2 玻璃化溶液还建立了橡胶^[130]、龙眼^[131-132]、荔枝^[133]等热带作物愈伤组织的超低温保存体系(表 4)。

5 遗传稳定性检测与农艺性状对比

茎尖与体胚等无性繁殖材料携带原始母株的遗传信息,超低温保存可降低上述材料长期继代培养带来的遗传变异风险,但保存操作中的脱水干燥和冷冻解冻分别给细胞带来渗透胁迫和冷冻伤害,给 DNA 带来损伤,对再生植株的遗传稳定性造成不利影响^[134]。因而对超低温保存后的再生植株开展遗传稳定性检测十分必要。

由于茎尖的遗传稳定性强,目前绝大多数经过优化的茎尖超低温保存体系能够维持冻存资源的遗传稳定性^[30, 135]。AGRAWAL 等^[136]对超低温保存后的香蕉 Sommarani Monthan(AAB 基因型)开展农艺性状评价和遗传稳定性检测,研究表明除 1 棵再生植株果皮颜色更绿外,其余植株与对照相比表现相同的生长和产量特性;同时应用 SSR 分子标记进行遗传稳定性检测并未发现多态性位点。AGRAWAL 等^[137]随后还对香蕉田间吸

表 4 重要热带作物悬浮细胞和愈伤组织超低温保存主要步骤
Tab. 4 Main steps for cryopreserving cell suspensions and callus of tropical crops

物种名称 Species	所用材料 Explant	预培养方式 Preculture	冷冻保护（脱水）方式 Cryoprotection	成活率 Survival rate	参考文献 Reference
油棕（ <i>Elaeis guineensis</i> ）	悬浮细胞	0.3 mol/L 蔗糖预培养 12 h	PVS2 冰上处理 5 min	68%	[89]
甘蔗（ <i>Saccharum</i> sp.）	悬浮细胞	0.33 mol/L 山梨醇预培养 3 d	0.5 mol/L 甘油+0.5 mol/L 山梨醇+1 mol/L 蔗糖冷冻保护 1 h	92%	[118]
香蕉（ <i>Musa</i> spp.）	悬浮细胞	无	甘油和 5% DMSO 混合液冷冻保护	64%	[119]
		0.13 mol/L 蔗糖与 0.39 mol/L 蔗糖预培养依次 15 min，0.5 mol/L 蔗糖预培养 30 min	室温下加入 DMSO，占总体积 7.5%冷冻保护 30 min	未表明	[120]
		无	25% PVS2 室温处理 30 min，100% PVS2 冰上处理 5 min	90%左右（3 份 AAA 基因型资源）	[121]
				27.1%	[122]
荔枝（ <i>Litchi chinensis</i> Sonn.）	悬浮细胞	0.4 mol/L 山梨醇预培养 2 d	PVS2 冰上处理 15~20 min		
芒果（ <i>Mangifera indica</i> L. var Zi-hua）	悬浮细胞	无	PVS3 处理 30 min，更换新鲜冷冻保护剂	94.7%	[123]
甘蔗（ <i>Saccharum</i> sp.）	愈伤组织	N6 培养基继代 10~15 d	0.5 mol/L 山梨糖醇+10% DMSO 处理 30~45 min	97%	[127]
		0.2 mol/L 蔗糖+3.8 μmol/L 脱落酸预培养 3 d	PVS2 冰上处理 20~40 min	55%	[128]
橡胶（ <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg.）	愈伤组织	5%蔗糖+5%DMSO 预培养 3 d	PVS2 冰上处理 40 min	71.7%	[130]
龙眼（ <i>Dimocarpus longan</i> Lour.）	愈伤组织	20 g/L 蔗糖预培养 12 d	PVS2 冰上处理 60 min	13.5%~43.6%（2 个基因组型）	[131]
荔枝（ <i>Litchi chinensis</i> Sonn.）	愈伤组织	20 g/L 蔗糖+5% DMSO 5℃下预培养 2 d	PVS2 冰上处理 40 min	78.61%	[133]

芽、试管苗单芽和丛芽超低温保存后的再生植株应用 SSR 分子标记进行遗传稳定性检测，并未发现超低温保存过程带来的变异率增加。在菠萝和三角叶薯蓣（*Dioscorea deltoidea*）上应用分子标记技术进行遗传稳定性检测同样表明玻璃化法超低温保存体系能够保持资源的遗传稳定性^[63, 138]。然而在甘蔗中的研究表明茎尖超低温保存获得的再生植株遗传稳定性存在基因型差异，其中基因型 NG 57-024 超低温冷冻后表现 98.5%的基因一致性，且变异差异发生在 PVS2 冷冻保护之后，而其余两份甘蔗基因型 Halaii 与 H83-6179 中未检测到 DNA 多态性^[51]。

胚性愈伤组织的诱导经历脱分化过程，该过程可能给组织带来更高的遗传变异风险^[139]，因而更需关注其超低温保存后的遗传稳定性。GANTAIT 等^[140]对油棕胚性悬浮系诱导获得的多胚体超低温保存后，应用 RAPD 和 ISSR 分子标记进行遗传稳定性测定，未发现多态性条带。WELEWANNI 等^[141]对椰子花序诱导所得的胚性愈伤组织在超低温保存前后进行遗传稳定性评估，该研究对 11

个 SSR 分子标记的位点进行检测，同样未发现变异位点。SISUNANDAR 等^[142]还对 4 个椰子品种的合子胚进行超低温保存，并对保存后得到的再生植株与保存前后的材料进行对比，未发现在形态学和染色体数上的变异；应用 SSR 分子标记和基因组甲基化水平检测同样未发现保存前后的明显差异。

然而超低温保存过程中胁迫处理会给组织带来表观遗传水平的变化，且变化具有一定的可逆性^[135]，可能会对再生植株性状产生影响^[143]，但在热带作物的研究上十分缺乏。ADU-GYAMFI 等^[144]在可可（*Theobroma cacao* L.）上的研究发现其体胚经超低温保存后得到的再生植株形态发生变化，且该变化与表观遗传水平的变化有关，但其变化部分可逆。综上所述，虽然超低温保存不会明显提高保存材料的遗传变异水平，但其带来的表观遗传变化值得深入研究。

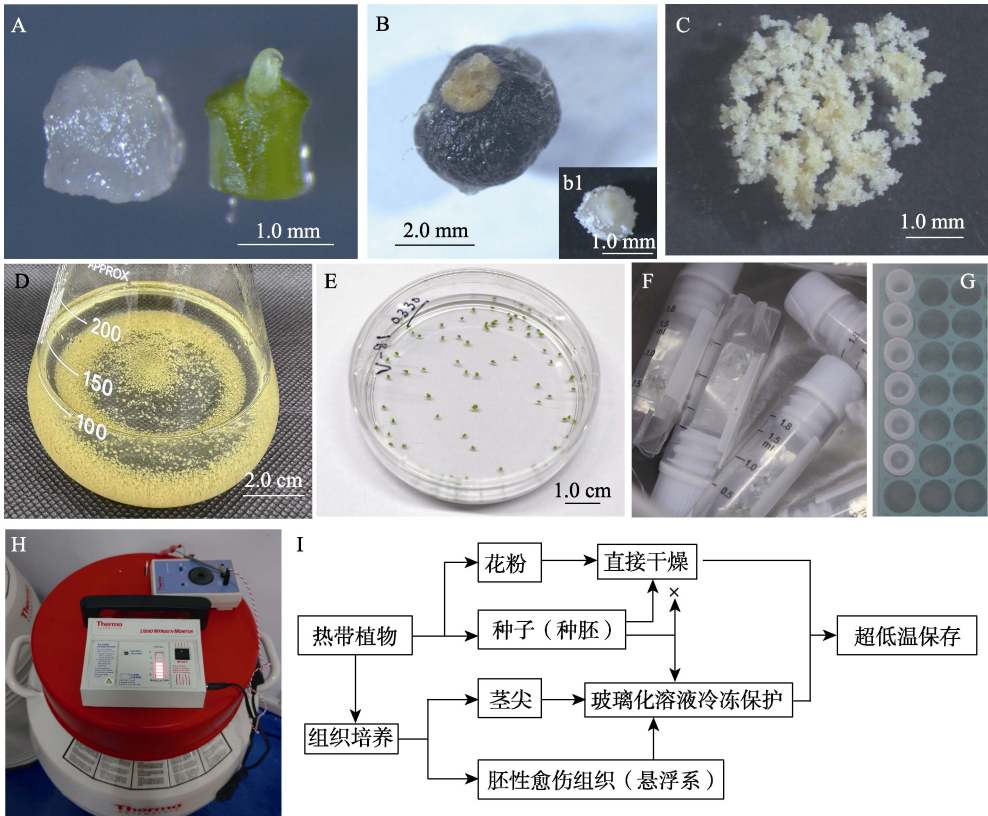
6 展望

随着国家对植物种质资源安全保存的重视和种业振兴工作的开展，植物野生资源、作物育种

中间材料和优良商业品种的安全保存变得尤为重要。许多发达国家的农业科研单位和重要国际农业组织已经开展植物资源的超低温保存工作，以减少种质资源长期保存的人力物力投入。热带作物与温带作物相比耐冷性和干燥耐受性较差，超低温保存体系建立的难度更大。

茎尖由于遗传稳定性高，取材较为方便，是香蕉、甘蔗、木薯等以无性繁殖为主的热带作物开展超低温保存的重要材料来源。目前最有效的

茎尖超低温保存技术应用 PVS2 等冷冻保护液进行脱水干燥，并结合小滴玻璃化、铝盘玻璃化法等快速冷冻—解冻手段冷冻保存。茎尖超低温保存体系依赖成熟的茎尖和茎段组织培养再生技术(图 2),虽然在香蕉和菠萝等作物上获得成功，但在甘蔗、木薯等重要热带作物上还需优化。此外咖啡、可可和芒果等热带木本作物超低温保存工作的开展还需克服组织离体再生困难带来的挑战。



A: 茎尖 (左为香蕉茎尖, 右为木薯茎尖); B: 香蕉种子 (b1 为香蕉种胚); C: 香蕉花粉; D: 香蕉胚性细胞悬浮系; E: 木薯茎尖 PVS2 冷冻保护; F: 木薯茎尖小滴玻璃化超低温保存所用的冷冻管; G: 冷冻管转入冷冻盒中准备长期冷冻; H: 超低温长期保存所用的生物液氮储存罐; I: 热带作物不同类型种质超低温保存方法选择。

A: Shoot tip of banana(on the left) and cassava(on the right); B and b1: Seed and embryo of *Musa* sp.; C: Pollens of *Musa* sp.; D: Embryogenic cell suspensions of *Musa* sp.; E: Cassava shoot tips treated for cryoprotection; F: The cryotubes used in droplet vitrification technique for cassava shoot tip cryopreservation; G: Cryotubes transferred to cryobox before long-term cryopreservation; H: A liquid nitrogen tank for conserving biological samples; I: A flow chart of method selection for cryopreserving various tropical plant materials.

图 2 热带作物种质资源超低温保存材料来源与方法选择

Fig. 2 The explants and techniques applied for cryopreservation of tropical crops

超低温保存是热带植物顽拗型种子实现长期保存的唯一手段，为更有效地对种子进行冷冻保护，往往需将种胚取出进行干燥后和超低温保存。许多热带作物的种胚能够耐受直接空气干燥后超低温保存。当种胚无法直接干燥时，可参照茎尖应用玻璃化溶液进行冷冻保护。目前种胚超低温保存技术已在咖啡、野蕉和棕榈科等植物上建立，

在橡胶、可可等重要热带木本作物长期安全保存和育种上还有更广阔的研究应用前景。种胚超低温保存同样依赖种胚离体培养技术，以促进种胚解冻后的萌发生长。

超低温保存还可应用于热带作物花粉、胚性悬浮系、愈伤组织等高价组织细胞的长期保存。热带作物花粉可直接干燥后超低温保存，操作较

为简单;而胚性愈伤组织、悬浮系和普通愈伤的超低温保存依赖冷冻保护溶液进行脱水干燥(图2)。胚性愈伤组织和悬浮系的超低温保存技术已在香蕉、甘蔗、荔枝等热带作物上成功建立,可降低上述材料长期继代导致的变异和活力下降问题,在其他重要热带作物上也有极高的研究价值。

综上所述,超低温保存技术虽然需要根据不同材料类型选用不同的方案进行优化,但体系建立后是最有效的种质资源长期保存手段。热带地区作为全球生物多样性水平最高的区域,有更多植物种质安全保存的实际需求。超低温保存体系在热带作物上的研究和应用能更好地支持热带作物品种、野生濒危资源和高价值组织细胞长期安全保存,支撑热带农业产业和科技的可持续发展。

参考文献

- [1] SALGOTRA R K, CHAUHAN B S. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources[J]. *Genes*, 2023, 14(1): 174.
- [2] VOLK G M, CARVER D, IRISH B M, MAREK L, FRANCES A, GREENE S, KHOURY C K, BAMBERG J, DEL RIO A, Warburton M L, Bretting P K. Safeguarding plant genetic resources in the United States during global climate change[J]. *Crop Science*, 2023, 63(4): 2274-2296.
- [3] 辛霞, 尹广鹏, 张金梅, 陈晓玲, 何娟娟, 刘运霞, 黄雪琦, 卢新雄. 作物种质资源整体保护策略与实践[J]. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(3): 636-643.
XIN X, YIN G K, ZHANG J M, CHEN X L, HE J J, LIU Y X, HUANG X Q, LU X X. Strategies and practices of the integrated conservation system for crop germplasm resources[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(3): 636-643. (in Chinese)
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT 2022[EB/OL]. (2024-04-12)[2024-09-05]. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- [5] TURNER W R, BRANDON K, BROOKS T M, GASCON C, GIBBS H K, LAWRENCE K S, MITTERMEIER R A, SELIG E R. Global biodiversity conservation and the alleviation of poverty[J]. *BioScience*, 2012, 62(1): 85-92.
- [6] TSCHARNTKE T, CLOUGH Y, WANGER T C, JACKSON L, MOTZKE I, PERFECTO I, VANDERMEER J, WHITBREAD A. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification[J]. *Biological Conservation*, 2012, 151(1): 53-59.
- [7] WALTERS C, PENCE V C. The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation[J]. *Plants People Planet*, 2020, 3(1): 83-91.
- [8] PANIS B, NAGEL M, VAN DEN HOUWE I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen[J]. *Plants*, 2020, 9(12): 1634.
- [9] NORMAH M N, SULONG N, REED B M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: advances and strategies[J]. *Cryobiology*, 2019, 87: 1-14.
- [10] SAKAI A, ENGELMANN F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review[J]. *Cryo-Letters*, 2007, 28(3): 151-172.
- [11] PANIS B. Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations[J]. *Acta Horticulturae*, 2019, 1234: 1-7.
- [12] SAKAI A. Survival of the twig of woody plants at -196°C [J]. *Nature*, 1960, 185: 393-394.
- [13] SAKAI A, NISHIYAMA Y. Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen[J]. *HortScience*, 1978, 13(3): 225-227.
- [14] JENDEREK M M, REED B M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2017, 53: 299-308.
- [15] GROUT B W W, HENSHAW G G. Freeze preservation of potato shoot-tip cultures[J]. *Annals of Botany*, 1978, 42(181): 1227-1229.
- [16] TOWILL L E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato[J]. *Cryobiology*, 1983, 20(5): 567-573.
- [17] KARTHA K K, LEUNG N L, PAHL K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1980, 105(4): 481-484.
- [18] KARTHA K K, LEUNG N L, MROGINSKI L A. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1982, 107(2): 133-140.
- [19] REDENBAUGH K, PAASCH B D, NICHOL J W, KOSSLER M E, VISS P R, WALKER K A. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos[J]. *Nature Biotechnology*, 1986, 4(9): 797-801.
- [20] FABRE J, DEREUDDRE J. Encapsulation dehydration a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips[J]. *Cryo-Letters*, 1990, 11: 413-426.
- [21] ENGELMANN F, ARNAO M T G, WU Y, ESCOBAR R. Development of encapsulation dehydration[M]. New York: Springer, 2008: 59-75.

- [22] ENGELMANN F, BENSON E E, CHABRILLANGE N, GONZALEZ ARNAO M T, MARI S, MICHAUX-FERRIERE N, PAULET F, GLASZMANN J C, CHARRIER A. Cryopreservation of several tropical plant species using encapsulation/dehydration of apices[M]. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 1995: 315-320.
- [23] MARI S, ENGELMANN F, CHABRILLANGE N, HUET C, MICHAUX-FERRIERE N. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) in vitro plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique[J]. Cryo-Letters, 1995, 16: 289-298.
- [24] SAKAI A, KOBAYASHI S, OIYAMA I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 30-33.
- [25] TANNOURY M, RALAMBOSOA J, KAMINSKI M, DEREUDDRE J. Cryopreservation by vitrification of coated shoot tips of carnation (*Diathus caryophyllus* L.) cultured in vitro[J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1991, 313(13): 633-638.
- [26] TOWILL L E, JARRETT R L. Cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] shoot tips by vitrification[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 175-178.
- [27] CHAROENSUB R, PHANSIRI S, SAKAI A, YONGMANITCHAI W. Cryopreservation of cassava in vitro-grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification[J]. Cryo-Letters, 1999, 20(2): 89-94.
- [28] CHAROENSUB R, HIRAI D, SAKAI A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method[J]. Cryo-Letters, 2004, 25(1): 51-58.
- [29] PANIS B, PIETTE B, SWENNEN R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*[J]. Plant Science, 2005, 168(1): 45-55.
- [30] WANG M R, LAMBARDI M, ENGELMANN F, PATHIRANA R, PANIS B, VOLK G M, WANG Q C. Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2021, 144: 7-20.
- [31] SOUZA F V D, KAYA E, DE JESUS VIEIRA L, DE SOUZA E H, DE OLIVEIRA AMORIM B, SKOGERBOE D, MATSUMOTO T, ALVES A A C, DA SILVA LEDO A, JENDEREK M M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2016, 124: 351-360.
- [32] KAVIANI B, KULUS D. Cryopreservation of endangered ornamental plants and fruit crops from tropical and subtropical regions[J]. Biology, 2022, 11(6): 847.
- [33] HIRAI D. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm[J]. Cryo-Letters, 2011, 32(4): 287-296.
- [34] YAMAMOTO S, RAFIQUE T, PRIYANTHA W S, FUKUI K, MATSUMOTO T, NIINO T. Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates[J]. Cryo-Letters, 2011, 32(3): 256-265.
- [35] NIINO T, WUNNA, WATANABE K, NOHARA N, RAFIQUE T, YAMAMOTO S, FUKUI K, VALLE ARIZAGA M, MARTINEZ C R C, MATSUMOTO T, ENGELMANN F. Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate[J]. Plant Biotechnology, 2014, 31(3): 281-287.
- [36] YAMAMOTO S, WUNNA, RAFIQUE T, VALLE ARIZAGA M, FUKUI K, GUTIERREZ E J C, MARTINEZ C R C, WATANABE K, NIINO T. The aluminium cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips[J]. American Journal of Potato Research, 2015, 92: 250-257.
- [37] VIANNA M G, GARCIA R O, MANSUR E, ENGELMANN F, PACHECO G. Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2019, 139: 369-379.
- [38] BENELLI C, CARVALHO L S O, EL MERZOUGUI S, PETRUCELLI R. Two advanced cryogenic procedures for improving *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cryopreservation[J]. Plants, 2021, 10(2): 277.
- [39] PANIS B, TOTTE N, VAN NIMMEN K, WITHERS L A, SWENNEN R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose[J]. Plant Science, 1996, 121(1): 95-106.
- [40] AGRAWAL A, SWENNEN R, PANIS B. A comparison of four methods for cryopreservation of meristems in banana (*Musa* spp.)[J]. Cryo-Letters, 2004, 25(2): 101-110.
- [41] 李建国, 张守梅, 陈厚彬, 徐春香, 王泽槐. 应用茎尖滴冻法超低温保存香蕉资源研究[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 745-751.
- LI J G, ZHANG S M, CHEN H B, XU C X, WANG Z H. Study on the cryopreservation of in vitro shoot tips of *Musa* germplasm by droplet vitrification[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(5): 745-751. (in Chinese)
- [42] DUMET D, DIEBIRU E, ADEYEMI A, AKINYEMI O, GUEYE B, FRANCO J. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources[J]. Cryo-Letters, 2013, 34(2): 107-118.
- [43] ESCOBAR R H, MUÑOZ L, RIOS A, NÚÑEZ A, TOHME

- J. Using a droplet-vitrification method to partially overcome the recalcitrance of cassava to cryostorage[J]. *Acta Horticulturae*, 2014, 1039: 227-232.
- [44] GONZÁLEZ-ARNAO M T, RAVELO M M, VILLAVICENCIO C U, MARTINEZ-MONTERO M E, ENGELMANN F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices[J]. *Cryo-Letters*, 1998, 19: 375-382.
- [45] MARTÍNEZ-MONTERO M E, MARTÍNEZ J, ENGELMANN F, GONZALEZ-ARNAO M T. Cryopreservation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr] apices and calluses[J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 666: 127-131.
- [46] GÁMEZ-PASTRANA R, MARTÍNEZ-OCAMPO Y, BERISTAIN C I, GONZÁLEZ-ARNAO M T. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification[J]. *Cryo-Letters*, 2004, 25(6): 405-414.
- [47] GONZÁLEZ-ARNAO M T, ENGELMANN F, HUET C, URRÁ C. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology[J]. *Cryo-Letters*, 1993, 14: 303-308.
- [48] PAULET F, ENGELMANN F, GLASZMANN J C. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12: 525-529.
- [49] BARRACO G, SYLVESTRE I, ENGELMANN F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(1): 320-324.
- [50] VOLK G M, JENDEREK M M, STATTS E, SHEPHERD A, BONNART R, LEDO A, AYALA-SILVA T. Challenges in the development of a widely applicable method for sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tip cryopreservation[J]. *Acta Horticulturae*, 2019, 1234: 335-342.
- [51] KAYA E, SOUZA F V D. Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2017, 53: 410-417.
- [52] ZHANG A L, WANG M R, LI Z, PANIS B, BETTONI J C, VOLLMER R, XU L, WANG Q C. Overcoming challenges for shoot tip cryopreservation of root and tuber crops[J]. *Agronomy*, 2023, 13(1): 219.
- [53] VOLLMER R, PANTA A, TAY D, ROCA W, ELLIS D. Effect of sucrose preculture and PVS2 exposure on the cryopreservation of sweet potato shoot tips [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using the PVS2 droplet vitrification[J]. *Acta Horticulturae*, 2014, 1039: 265-272.
- [54] WILMS H, SLEZIAK N F, VAN DER AUWERAER M, BRANDS M, VERLEIJE M, HARDEMAN D, ANDRE E, PANIS B. Development of a fast and user-friendly cryopreservation protocol for sweet potato genetic resources[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 14674.
- [55] LI Z, LI T, XU L, PANIS B. Cryopreservation of *Callerya speciosa* (Champ.) schot through droplet-vitrification[J]. *Propagation of Ornamental Plants*, 2013, 13(4): 189-195.
- [56] 颜航, 李春燕, 李志英, 王敏瑞, 荆永琳, 王小冰, 李玉莲, 陈浪欣, 徐立. 巴戟天离体保存与茎尖小滴玻璃化法超低温保存体系的构建[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(19): 6477-6484.
- YAN H, LI C Y, LI Z Y, WANG M R, JING Y L, WANG X B, LI L Y, CHEN L X, XU L. Construction of *in vitro* preservation and shoot tips droplet-vitrification cryopreservation system of *Morinda officinalis* how[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(19): 6477-6484. (in Chinese)
- [57] DAS C M, DEVI S D, KUMARIA S, REED B M. Looking for a way forward for the cryopreservation of orchid diversity[J]. *Cryobiology*, 2021, 102: 1-14.
- [58] LI T, XU L, LI Z, PANIS B. Cryopreservation of *Neottia nidus* prothallus and green globular bodies by droplet-vitrification[J]. *Cryo-Letters*, 2013, 34(5): 481-489.
- [59] KHOR S P, YEOW L C, POOBATHY R, ZAKARIA R, CHEW B L, SUBRAMANIAM S. Droplet-vitrification of Aranda Broga Blue orchid: role of ascorbic acid on the antioxidant system and genetic fidelity assessments via RAPD and ScoT markers[J]. *Biotechnology Reports*, 2020, 26: e00448.
- [60] 高洁, 李志英, 张玄兵, 谢龙海, 陈莹, 朱振芬, 符运柳, 徐立. 红掌小滴玻璃化法超低温保存研究[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(9): 1909-1916.
- GAO J, LI Z Y, ZHANG X B, XIE L H, CHEN Y, ZHU Z F, FU Y L, XU L. Cryopreservation of *Anthurium andraeanum* by droplet vitrification[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(9): 1909-1916. (in Chinese)
- [61] O'BRIEN C, HITI-BANDARALAGE J C A, FOLGADO R, LAHMEYER S, HAYWARD A, FOLSOM J, MITTER N. First report on cryopreservation of mature shoot tips of two avocado (*Persea americana* Mill.) rootstocks[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2021, 144: 103-113.
- [62] RAFIQUE T, YAMAMOTO S, FUKUI K, MAHMOOD Z, TAKAO N. Cryopreservation of sugarcane using the V cryoplate technique[J]. *Cryo-Letters*, 2015, 36(1): 51-59.
- [63] SHARMA N, MALHOTRA EV, CHANDRA R, GOWTHAMI R, SULTAN S M, BANSAL S, SHANKAR M, AGRAWAL A. Cryopreservation and genetic stability assessment of regenerants of the critically endangered medicinal plant *Dioscorea deltoidea* Wall. ex Griseb. for cryobanking of germplasm[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biol-*

- ogy-Plant, 2022, 58: 521-529.
- [64] LININGTON S H, PRITCHARD H W. Encyclopedia of biodiversity[M]. San Diego: Academic Press, 2001: 165-181.
- [65] TWEDDLE J C, DICKIE J B, BASKIN C C, BASKIN J M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity[J]. Journal of Ecology, 2003, 91(2): 294-304.
- [66] SERSHEN, PERUMAL A, VARGHESE B, GOVENDER P, RAMDHANI S, BERJAK P. Effects of elevated temperatures on germination and subsequent seedling vigour in recalcitrant *Trichilia emetica* seeds[J]. South African Journal of Botany, 2014, 90: 153-162.
- [67] JOSHI G, PHARTYAL S S, KHAN M R, ARUNKUMAR A N. Recalcitrant morphological traits and intermediate storage behaviour in seeds of *Mesua ferrea*, a tropical evergreen species[J]. Seed Science and Technology, 2015, 43(1): 121-126.
- [68] MARQUES A, NIJVEEN H, SOMI C, LIGTERINK W, HILHORST H. Induction of desiccation tolerance in desiccation sensitive *Citrus limon* seeds[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2019, 61(5): 624-638.
- [69] NAGEL M, PENCE V, BALLESTEROS D, LAMBARDI M, POPOVA E, PANIS B. Plant cryopreservation: principles, applications, and challenges of banking plant diversity at ultralow temperatures[J]. Annual Review of Plant Biology, 2024, 75: 797-824.
- [70] DUSSERT S, CHABRILLANGE N, ROCQUELIN G, ENGELMANN F, LOPEZ M, HAMON S. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(4): 495-504.
- [71] BECWAR M R, STANWOOD P C, LEONHARDT K W. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1983, 108(4): 613-618.
- [72] COELHO S V B, ROSA S D V F, FERNANDES J S. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method[J]. Seed Science and Technology, 2017, 45(3): 1-12.
- [73] OLIVEIRA R S D, SOUZA F V D, SANTOS I L D, SOUZA S O, AONA L Y S, DE SOUZA E H. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Tillandsia* species (Bromeliaceae) with ornamental potential[J]. 3 Biotech, 2021, 11(4): 186.
- [74] PRITCHARD H W, POYNER A L C, SEATON P T. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation[J]. Lindleyana, 1999, 14(2): 92-101.
- [75] PRITCHARD H W. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed[J]. Cryo-Letters, 1984, 5: 295-300.
- [76] WANG J H, GE J G, FENG L, BIAN H W, HUANG C N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*[J]. Cryo-Letters, 1998, 19: 123-128.
- [77] NIKISHINA T V, POPOV A S, KOLOMEITSEVA G L, GOLOVKIN B N. Effect of cryopreservation on seed germination of rare tropical orchids[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2001, 48: 810-815.
- [78] POPOV A S, POPOVA E V, NIKISHINA T V, KOLOMEYTSEVA G L. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation[J]. Cryo-Letters, 2004, 25(3): 205-212.
- [79] HIRANO T, GODO T, MII M, ISHIKAWA K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23: 534-539.
- [80] POPOVA E, KIM H H, SAXENA P K, ENGELMANN F, PRITCHARD H W. Frozen beauty: the cryobiotechnology of orchid diversity[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(4): 380-403.
- [81] HU W H, YANG Y H, LIAW S I, CHANG C. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification[J]. Botanical Studies, 2013, 54: 33-38.
- [82] 李庆荣, 郑郁善. 顽拗性种子种质超低温保存研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 608-612.
- LI Q R, ZHENG Y S. Advances in research on cryopreservation of recalcitrant seeds[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2003, 25(4): 608-612. (in Chinese)
- [83] CHANDEL K P S, CHAUDURY R, RADHAMANI J, MALIK S K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit[J]. Annals of Botany, 1995, 76(5), 443-450.
- [84] GONZÁLEZ-BENITO M E, PEREZ C. Cryopreservation of embryonic axes of two cultivars of hazelnut (*Corylus avellana* L.)[J]. Cryo-letters, 1994, 15(1): 41-46.
- [85] SISUNANDAR, SOPADE P A, SAMOSIR Y M S, RIVAL A, ADKINS S W. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.)[J]. Cryobiology, 2010, 61(3): 289-296.
- [86] SISUNANDAR, NOVARIANTO H, MASHUD N, SAMOSIR Y M S, ADKINS S W. Embryo maturity plays an important role for the successful cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera*) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2014, 50: 688-695.
- [87] ABDELNOUR-ESQUIVEL A, VILLALOBOS V, ENGELMANN F. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp.[J]. Cryo-Letters, 1992, 13: 297-302.

- [88] CHAUDHURY R, MALIK S K. Desiccation and freezing sensitivity during seed development in jackfruit[J]. Seed Science Technology, 2004, 32(3): 785-795.
- [89] WEI Q, SHI P, KHAN F S, HTWE Y M, ZHANG D, LI Z, WEI X, YU Q, ZHOU K, WANG Y. Cryopreservation and cryotolerance mechanism in zygotic embryo and embryogenic callus of oil palm[J]. Forests, 2023, 14(5): 966.
- [90] FRUGERI G C, NOGUEIRA G F, DE SOUZA A L X, SCHERWINSKI-PEREIRA J E. Conservation strategies for *Butia capitata* [Mart. (Becc.) Arecaceae], a threatened palm tree from Brazilian savannah biome, through zygotic embryo cryopreservation[J]. International Journal of Plant Biology, 2023, 14(3): 612-624.
- [91] ESQUIVEL A, MORA A, VILLALOBOS V. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *Musa balbisiana* (BB)[J]. Cryo-Letters, 1992, 13(3): 59-164.
- [92] SINGH S, AGRAWAL A, KUMAR R, THANGJAM R, JOHN K J. Seed storage behavior of *Musa balbisiana* Colla, a wild progenitor of bananas and plantains: implications for ex situ germplasm conservation[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 280: 109926.
- [93] VALDÉS Y C, SHUKLA M R, GONZÁLEZ VEGA M E, SAXENA P K. Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation[J]. Agronomy, 2021, 11(9): 1861.
- [94] BUSTAM S, ALI M S M, SINNIH U R, SHAMSUDDIN N, KADIR A M A. Short-term storage of seeds and cryopreservation of embryonic axes of *Lepisanthes fruticose*[J]. Annual Research & Review in Biology, 2021, 36(7): 112-123.
- [95] GENEROSO A L, GARVALHO V S, WALTER R, CAMPBELL G, DA SILVA ARAÚJO L, SANTANA J G S, DA CUNHA M. Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seeds[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 256: 108638.
- [96] SAJINI K K, KARUN A, AMARNATH C H, ENGELMANN F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification[J]. Cryo-Letters, 2011, 32(4): 317-328.
- [97] SILVA S S S, SOUZA E H, SOUZA F V D, MAX D A S, ROSSI M L, COSTA M A P C. Post-seminal development and cryopreservation of endemic or endangered bromeliads[J]. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2021, 93(1): e20191133.
- [98] ASHMORE S E, DREW R A, O'BRIEN C, PARISI A. Cryopreservation of papaya (*Carica Papaya* L.) seed: overcoming dormancy and optimizing seed desiccation and storage conditions[J]. Acta Horticulturae, 2009, 839: 229-236.
- [99] THAMMASIRI K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification[J]. Cryo-Letters, 2000, 21(4): 237-244.
- [100] JITSOPAKUL N, THAMMASIRI K, ISHIKAWA K. Cryopreservation of *Bletilla striata* mature seeds, 3-day germinating seeds and protocorms by droplet-vitrification[J]. Cryo-Letters, 2008, 29(6): 517-526.
- [101] 陈珊. 花粉超低温保存的研究和应用进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(7): 39-40.
- CHEN S. Cryopreservation on pollen[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13(7): 39-40. (in Chinese)
- [102] DINATO N B, IMACULADA SANTOS I R, ZANATTO VIGNA B B, DE PAULA A F, FÁVERO A P. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation[J]. Cryo-Letters, 2020, 41(3): 115-127.
- [103] KARUN A, SAJINI K K, NIRAL V, AMARNATH C H, REMYA P, RAJESH M K, SAMSUDEEN K, JERARD B A, ENGELMANN F. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation[J]. Cryo-Letters, 2014, 35(5): 407-417.
- [104] TANDON R, CHAUDHURY R, SHIVANNA K R. Cryopreservation of oil palm pollen[J]. Current Science, 2007, 92(2): 182-183.
- [105] ANILKUMAR G S, RAJASEKHARAN P E. Pollen cryopreservation protocol for dragon fruit, pollen cryopreservation protocols[M]. New York: Springer, 2023: 113-122.
- [106] CHAUDHURY R, MALIK, S K, RAJAN S. An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of mango (*Mangifera indica* L.) and litchi (*Litchi chinensis* Soon.)[J]. Cryo-Letters, 2010, 31(3): 268-278.
- [107] VEENA G L, MASTIHO L, RAJASEKHARAN P E. Pollen cryopreservation in mango, pollen cryopreservation protocols[M]. New York: Springer, 2023: 199-211.
- [108] EKARATNE S N R, SENATHIRAJAH S. Viability and storage of pollen of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq[J]. Annals of Botany, 1983, 51(5): 661-668.
- [109] VISHWAKARMA P K, VINCENT L, VASUGI C, RAJASEKHARAN P E. Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species[J]. Cryobiology, 2021, 98: 112-118.
- [110] NAVYA B L, RAJASEKHARAN P E, GUTAM S. Pollen Cryopreservation in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) for crop improvement, pollen cryopreservation protocols[M]. New York: Springer, 2023: 135-145.
- [111] SILVA R L D, SOUZA E H D, DE JESUS VIEIRA L, PELACANI C R, SOUZA F V D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 219: 326-334.
- [112] GANESHAN S. Cryogenic preservation of papaya pollen[J].

- Scientia Horticulturae, 1986, 28: 65-70.
- [113] 李丹, 秦青, 赵琪, 戴绍军. 植物悬浮培养细胞应答非生物胁迫蛋白质组学分析[J]. 现代农业科技, 2016, 3: 225-227.
- LI D, QIN Q, ZHAO Q, DAI S J. Abiotic stress-responsive proteomics in plants suspension cultured cells[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016, 3: 225-227. (in Chinese)
- [114] BABICH O, SUKHIKH S, PUNGIN A, IVANOVA S, ASY-AKINA L, PROSEKOV A. Modern trends in the *in vitro* production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants[J]. Molecules, 2022, 27(17): 5513.
- [115] MUSTAFA N, DE WINTER W, VAN IREN F, VERPOORT R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures[J]. Nature Protocols, 2011, 6: 715-742.
- [116] WANG B, ZHANG Z, YIN Z, FENG C, WANG Q. Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 604-612.
- [117] FINKLE B J, ULRICH J M. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells[J]. Plant Physiology, 1979, 63(4): 598-604.
- [118] GNANAPRAGASAM S, VASIL I K. Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.)[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(8): 419-423.
- [119] PANIS B, WITHERS L A, LANGHE E D. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants[J]. Cryo-Letters, 1990, 11: 337-350.
- [120] GEORGET F, ENGELMANN F, DOMERGUE R, CÔTE F. Morpho-histological study of banana (*Musa* spp. cv. Grande Naine [AAA]) cell suspensions during cryopreservation and regeneration[J]. Cryo-Letters, 2009, 30(6): 398-407.
- [121] 李艳娜, 尉义明, 胡桂兵, 陈厚彬, 徐春香. 香蕉胚性细胞悬浮系玻璃化法超低温保存及再生植株遗传稳定性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 899-905.
- LI Y N, WEI Y M, HU G B, CHEN H B, XU C X. Plant regeneration via somatic embryogenesis after cryopreservation of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. AAA) by vitrification and the genetic stability of regenerated plant[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(6): 899-905. (in Chinese)
- [122] 谢玉明, 曾继吾, 张秋明, 易千军. 玻璃化法超低温保存荔枝胚性悬浮细胞[J]. 热带作物学报, 2008, 29(5): 622-625.
- XIE Y M, ZENG J W, ZHANG Q M, YI Q J. Cryopreservation of litchi embryogenic suspension cells by vitrification technique[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(5): 622-625. (in Chinese)
- [123] 李运合, 李玉生, 张金梅, 陈晓玲, 赵艳华, 吴永杰. 芒果细胞超低温保存存活机理[J]. 植物生理学报, 2016, 52(10): 1474-1480.
- LI Y H, LI Y S, ZHANG J M, CHEN X L, ZHAO Y H, WU Y J. The survival mechanism of mango cells during cryopreservation[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52(10): 1474-1480. (in Chinese)
- [124] 盛德策, 李凤兰, 刘忠华. 植物体细胞胚发生的细胞生物学研究进展[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1): 204-215.
- SHENG D C, LI F L, LIU Z H. Advances in the cytobiology of plant somatic embryogenesis[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28(1): 204-215. (in Chinese)
- [125] BRETON D, HARVENGT L, TRONTIN J F O, FAVRE J M. High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2005, 41(4): 494-504.
- [126] ULRICH J M, FINKLE B J, MOORE P H, GINOZA H. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant[J]. Cryobiology, 1979, 16(6): 550-556.
- [127] 简令成, 孙德兰, 孙龙华. 甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究[J]. 植物学报, 1987, 29(2): 123-131.
- JIAN L C, SUN D L, SUN L H. Studies on factors in cryopreservation of sugarcane calluses[J]. Acta Botanica Sinica, 1987, 29(2): 123-131. (in Chinese)
- [128] MARTÍNEZ-MONTERO M E, GONZÁLEZ-ARNAO M T, BORROTO-NORDELO C, PUENTES-DÍAZ C, ENGELMANN F. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process[J]. Cryo-Letters, 1998, 19(7): 171-176.
- [129] MARTÍNEZ-MONTERO M E, MARTÍNEZ J, ENGELMANN F. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos[J]. Cryo-Letters, 2008, 29(3): 229-242.
- [130] ZHOU Q N, SUN A H, LI Z, HUA Y W, JIANG Z H, HUANG T D, DAI X M, HUANG H S. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hevea* by vitrification[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11: 7212-7217.
- [131] 郭玉琼, 赖钟雄, 吕柳新. 玻璃化法超低温保存龙眼胚性愈伤组织的初步探讨[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(3): 262-265.
- GUO Y Q, LAI Z X, LYU L X. Preliminary study on cryopreservation of longan calli by vitrification[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2006, 35(3): 262-265. (in Chinese)
- [132] MATSUMOTO K, RAHARJO S H T, DHEKNEY S, MOON P A, LITZ R E. Cryopreservation and somatic em-

- bryogenesis of *Dimocarpus longan* calli[J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2004, 39(12): 1261-1263.
- [133] 郭玉琼, 赖钟雄, 吕柳新. 玻璃化法超低温保存荔枝胚性愈伤组织及其植株再生[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2007, 36(1): 34-37.
- GUO Y Q, LAI Z X, LYU L X. Cryopreservation of embryogenic calli by vitrification and plant regeneration via somatic embryogenesis in litchi[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2007, 36(1): 34-37. (in Chinese)
- [134] REN L, WANG M R, WANG Q C. ROS-induced oxidative stress in plant cryopreservation: occurrence and alleviation[J]. Planta, 2021, 254(6): 124.
- [135] WANG M R, BI W, SHUKLA M R, HAMBORG Z, BLYSTAD D R, SAXENA P K, WANG Q C. Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants[J]. Plants, 2021, 10(9): 1889.
- [136] AGRAWAL A, TYAGI R K, GOSWAMI R. Cryobanking of banana (*Musa* sp.) germplasm in India: evaluation of agronomic and molecular traits of cryopreserved plants[J]. Acta Horticulturae, 2011(908): 129-138.
- [137] AGRAWAL A, SANAYAIMA R, SINGH R, TANDON R, VERMA S, TYAGI R K. Phenotypic and molecular studies for genetic stability assessment of cryopreserved banana meristems derived from field and *in vitro* explant sources[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2014, 50: 345-356
- [138] LI Y R, SONG X P, WU J M, LI C N, LIANG Q, LIU X H, WANG W Z, TAN H W, YANG L T. Sugar industry and improved sugarcane farming technologies in China[J]. Sugar Tech, 2016, 18(6): 603-611.
- [139] BAIRU M W, AREMU A O, VAN STADEN J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods[J]. Plant Growth Regulation, 2011, 63: 147-173.
- [140] GANTAIT S, SINNIH U R, SURANTHRAN P, PALAN-YANDY S R, SUBRAMANIAM S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity[J]. Protoplasma, 2015, 252: 89-101.
- [141] WELEWANNI I, PERERA C, JAYASEKERA A, BANDUPRIYA D. Recovery, histological observations and genetic integrity in coconut (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli cryopreserved using encapsulation-dehydration procedure[J]. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 2020, 48(2): 175-186.
- [142] SISUNANDAR, RIVAL A, TURQUAY P, SAMOSIR Y, ADKINS S W. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings[J]. Planta, 2010, 232: 435-447.
- [143] HARDING K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review[J]. Cryo-Letters, 2004, 25(1): 3-22.
- [144] ADU-GYAMFI R, WETTEN A, LÓPEZ C M R. Effect of cryopreservation and post-cryopreservation somatic embryogenesis on the epigenetic fidelity of cocoa (*Theobroma cacao* L.)[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158857.