

# 甜瓜未授粉子房超低温保存方法初探

李海伦, 高宁宁, 李晓慧, 康利允, 常高正, 梁 慎, 王慧颖, 徐小利, 赵卫星

(河南省农业科学院园艺研究所 郑州 450002)

**摘要:**为延长甜瓜未授粉子房取材时间,克服甜瓜子房取材受生长季节、发育期限制的缺点,以厚皮甜瓜晚熟品种众云18和早熟品种锦绣的子房为试材,对其进行超低温保存和恢复培养研究。结果表明,4℃暗处理的甜瓜子房随着预培养和保护液(PVS2)处理时间的增加,子房的存活率呈先增高后降低的趋势,其中,预培养24h和PVS2处理30min时效果最佳,子房存活率均在82%以上;子房经过-196℃超低温保存后,在38、40、42℃卸载液解冻5min时,子房存活率没有明显差异;超低温保存60d后的子房,经过恢复培养后,众云18和锦绣子房最高存活率分别达到80.83%、82.43%。采用包埋法和玻璃化法结合的改良超低温保存法可以有效解决甜瓜大孢子培养供体无法持续获得的问题,加速了甜瓜单倍体培育的进程。

**关键词:**甜瓜;未授粉子房;超低温保存

中图分类号:S652

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2023)04-076-05

## Cryopreservation method of unpollinated ovary in melon

LI Hailun, GAO Ningning, LI Xiaohui, KANG Liyun, CHANG Gaozheng, LIANG Shen, WANG Huiying, XU Xiaoli, ZHAO Weixing

(Horticulture Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China)

**Abstract:** In order to prolong the time of melon unpollinated ovary sampling and overcome the disadvantage that the ovary of melon sampling is limited by the growing season and development period. In this experiment, the ovaries of the late-maturing variety Zhongyun-18 and the early-maturing variety Jinxiu were used as test materials for cryopreservation and recovery culture. The results showed that: With the increase of preculture and protection solution (PVS2) treatment time, the survival rate of melon ovary treated at 4℃ in the dark showed increase first and then decrease, and the best results were obtained after 24 h of preculture and 30 min of PVS2 treatment, and the survival rate of ovary was above 82%. After cryopreservation at -196℃, there was no significant difference in the survival rate of ovary when the unloading solution was thawed at 38, 40℃ and 42℃ for 5 min. After 60 days of cryopreservation, the highest survival rates of Zhongyun-18 and Jinxiu ovaries were 80.83% and 82.43%, respectively. In this study, the improved cryopreservation method combining the embedding method and vitrification method could effectively solve the problem that melon megaspore culture materials cannot be continuously obtained, and accelerate the process of melon haploid cultivation.

**Key words:** Melon; Unpollinated ovary; Cryopreservation

甜瓜(*Cucumis melo* L.)是葫芦科甜瓜属一年生草本植物,具有丰富的营养价值和可观的经济价值,在全球范围内广泛种植。甜瓜产业在我国农业产业结构中占据重要地位,具有广阔的前景。目前,甜瓜优异种质资源更新滞后且无法满足市场需求,因此亟需加速育种工作的进度。单倍体培养是创制新种质的重要手段,利用甜瓜未授粉子房或胚珠离体培养获得单倍体,将有效加速甜瓜育种进程,其中,材料是培养成功的先决条件。同时甜瓜

离体雌核培养获取单倍体技术还处于初级阶段,并未获得较成熟的技术,加快培养进度需大量的供试材料,而甜瓜未授粉子房的取材受生长季节的限制。为解决材料供应问题,笔者通过在甜瓜生长季节大量取样,并进行超低温保存,增加供材量和延长供样期,从而加速甜瓜单倍体的培育进程。

适宜的保存条件可以使细胞分裂和代谢暂时处于停滞状态从而延长生命周期,还可以最大程度保持材料的遗传稳定性。其中,超低温保存方法是

收稿日期:2022-08-22;修回日期:2022-12-06

基金项目:财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-25);河南省西甜瓜产业技术体系建设项目(HARS-22-10-G1);河南省科技攻关项目(222102110208);河南省农业科学院自主创新项目(2022ZC25)

作者简介:李海伦,女,助理研究员,主要从事园艺作物生物技术研究。E-mail:704522973@qq.com

通信作者:赵卫星,男,副研究员,主要从事西甜瓜遗传育种与栽培生理生态研究。E-mail:wzxzhao2008@163.com

将植物的细胞、组织、器官等离体材料存放于液氮(-196℃)中保存<sup>[1]</sup>,该方法备受青睐,在花粉、茎尖、休眠芽、愈伤组织等离体组织中被广泛应用<sup>[2-6]</sup>,但对甜瓜子房的保存鲜见报道。笔者的研究结合包埋法和玻璃化法对超低温保存方法进行改良,旨在探索最适合甜瓜子房的保存方法,最大限度减少材料损伤,并保持较高的活性,以期加速甜瓜单倍体育种的进度,为创制新种质提供技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试厚皮甜瓜品种为晚熟品种众云18(网纹红肉)和早熟品种锦绣(白皮红肉),均由河南省农业科学院园艺研究所西瓜甜瓜课题室提供。

### 1.2 设 计

众云18和锦绣于2019年5月在河南现代农业开发研究基地连栋大棚种植,采用常规管理。每个材料种植20株。在甜瓜花期,于开花前一天09:00—11:00取长势健壮无损伤的未授粉子房,带回实验室4℃暗处理2d。2种材料的每一批取样的样本数量相同,每个处理各取30个甜瓜子房,每个处理每个材料分别设置3次重复。

### 1.3 方 法

1.3.1 甜瓜子房消毒灭菌 把2d暗处理后的子房用流水冲洗0.5~1.0h,去除子房表面茸毛,洗净后在超净工作台上用70%乙醇消毒30s,再用无菌水清洗3遍,接着用0.2%次氯酸钠灭菌10min,最后用无菌水冲洗3~5遍,备用。

1.3.2 改良超低温保存方法建立 (1)预处理:把子房分别进行纵切和横切,放入0.4 mol·L<sup>-1</sup>的蔗糖溶液中,置于培养间中暗培养8、24、48、72、96h。(2)包埋:取出预培养的子房,晾干表面液体,用3%海藻酸钠将子房完全包裹,再用0.1 mol·L<sup>-1</sup>氯化钙固定10min,取出晾干。(3)加载:把包裹的子房放入加载液(1/2 MS+136 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+180 g·L<sup>-1</sup>甘油)中,处理20min,取出晾干。(4)脱水:用PVS2玻璃化液(MS+300 ml·L<sup>-1</sup>甘油+150 ml·L<sup>-1</sup>乙二醇+150 ml·L<sup>-1</sup>二甲基亚砷+136 g·L<sup>-1</sup>蔗糖)给予30、60、90min处理,取出晾干。(5)低温保存:用无菌铝箔纸把处理过的子房包裹好迅速放入液氮(-196℃)中保存。

1.3.3 低温保存后恢复培养 (1)解冻:将保存0、20、40、60d的子房放入25、38、40、42℃恒温的卸载液(MS+410 g·L<sup>-1</sup>蔗糖)中解冻5min,最后再用

新卸载液清洗一遍,晾干。(2)接种:将解冻的子房接入诱导培养基中(MS+0.03 mg·L<sup>-1</sup>TDZ+0.2 mg·L<sup>-1</sup>KT+150 mL·L<sup>-1</sup>椰汁+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+7 g·L<sup>-1</sup>琼脂)。(3)培养:接种后的子房在黑暗条件下,培养箱中34℃热激3d,光照度1500~2000 lx、16 h/8 h光暗周期的培养室中进行培养。(4)恢复培养后甜瓜子房存活率:子房存活率/%=接入子房成活数/接入子房的总数×100。

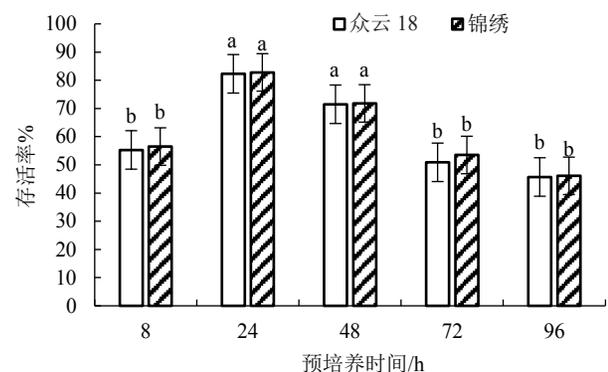
### 1.4 数据统 计与分 析

采用Excel 2016工具进行数据统计、分析和制图,采用SPASS 21软件进行One-way ANOVA法单因素方差分析。

## 2 结果与分 析

### 2.1 预培养时间对甜瓜子房存活率的影响

预培养可通过减少细胞内含水量和提高细胞分裂分化能力来改善材料的生理状态,提高材料的抗冻性。笔者通过高浓度蔗糖溶液进行预培养来提高超低温保存后材料的存活率。如图1所示,子房预培养的时间不同,超低温保存后子房的存活率也存在差异。随着预培养时间的增加,子房的存活率呈先增高后降低的趋势。预培养8h时,冷冻20d后子房的存活率只有55%左右;预培养24h时,众云18和锦绣的子房存活率分别高达82.30%和82.80%;预培养48h时,子房存活率开始降到71%左右;预培养72h时,子房存活率持续降低到50%左右;预培养96h时,子房存活率低至45%左右。预培养的时间过长易导致细胞过度脱水而造成损伤,进而影响子房的存活率。在0.4 mol·L<sup>-1</sup>的蔗糖溶液中预培养24h和48h时子房存活率的差异不显著,但24h的预培养极大地缩短了培养时间,所以预培养24h效果最佳。



注:不同小写字母表示不同处理间在0.05水平差异显著。下同。

图1 预培养时间对低温保存子房存活率的影响

## 2.2 PVS2 玻璃化液处理时间对甜瓜子房存活率的影响

超低温保存的程序中玻璃化过程是最关键的环节,其中,玻璃化液处理时间也至关重要。由图2可知,随着PVS2处理时间的增加,子房冻后的存活率逐渐降低。处理30 min时存活率最高,2个甜瓜品种的子房存活率均在82%以上。处理60 min时也在81%左右,与处理30 min时存活率无显著差异,但都显著高于处理90 min。随着PVS2脱水处理时间的增加,PVS2的毒害作用也逐渐增强,从而导致子房存活率下降。为避免PVS2玻璃液的毒害作用加剧,以30 min为最佳处理时间。

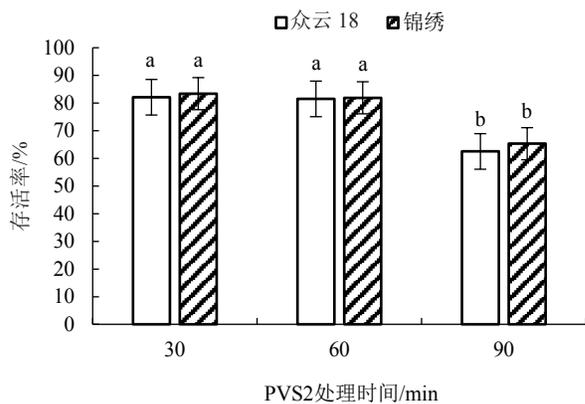


图2 PVS2处理时间对低温保存子房的影响

## 2.3 解冻温度对甜瓜子房存活率的影响

解冻是材料恢复培养最关键的一步,迅速解冻可以避免细胞内再次出现结冰而造成细胞死亡。采用MS+410 g·L<sup>-1</sup>蔗糖卸载液解冻,分析不同解冻温度对子房存活率的影响,由图3可知,当解冻温度为25℃时,子房的存活率远低于50%,随着解冻温度的升高,子房的存活率也随之增高。解冻温度在38℃时,子房存活率最高,晚熟品种众云18和

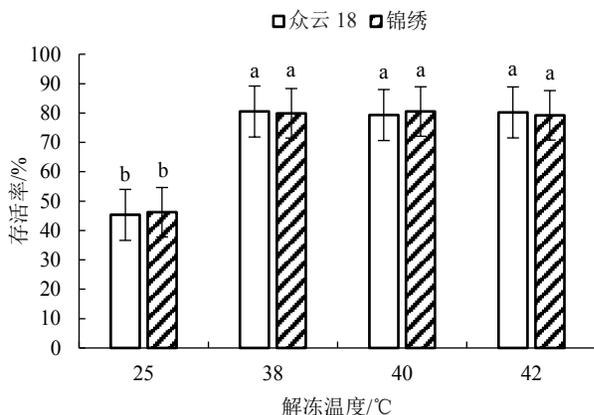


图3 解冻温度对低温保存子房的影响

早熟品种锦绣都在80%左右;解冻温度在40℃和42℃时,子房存活率略低于38℃,但无显著差异,以38℃为最佳解冻温度。

## 2.4 超低温保存时长对甜瓜子房存活率的影响

理论上材料保存在液氮中保存时间的长短不会对其存活率。采用改良的超低温保存方法把众云18和锦绣未授粉子房预培养24 h,经过3%海藻酸钠包埋,0.1 mol·L<sup>-1</sup>氯化钙固定,加载液处理20 min,PVS2脱水30 min,铝箔纸包裹迅速放入液氮中保存。为分析保存时长对材料存活率的影响,将保存了0、20、40、60 d的子房在38℃的卸载液中处理5 min进行解冻,再接入诱导培养基中培养,结果如表1所示,0 d时2个甜瓜材料子房的存活率都在92%以上;随着保存时间的延长,子房的存活率也开始降低;保存20、40 d和60 d时存活率在80%~87%之间,子房存活率无显著差异,表明液氮保存时长对冻后子房的存活率无明显影响,且保存60 d时子房的存活率仍在80%以上。

表1 低温保存不同时间未授粉子房的存活率 %

材料	保存时间/d			
	0	20	40	60
众云18	92.53±0.86 a	85.57±0.49 b	81.93±0.86 b	80.83±0.73 b
锦绣	93.93±0.13 a	87.27±0.54 b	83.33±0.34 b	82.43±0.33 b

注:表中数值均为平均值±标准误。不同小写字母表示子房保存不同时间间在0.05水平差异显著。

## 3 讨论与结论

超低温保存法可以保持材料正常的细胞活性、全能性和遗传性,且操作简单、成本低,并能长期保存,适用于细胞、组织等离体材料的保存。笔者采用包埋法和玻璃化法结合的改良超低温保存法对甜瓜离体子房进行保存。经过4℃暗处理2 d的子房,先用0.4 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液预培养24 h,再用3%海藻酸钠包埋并用0.1 mol·L<sup>-1</sup>氯化钙固定,经过加载液(1/2 MS+136 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+180 g·L<sup>-1</sup>甘油)处理后,再用PVS2(MS+300 ml·L<sup>-1</sup>甘油+150 ml·L<sup>-1</sup>乙二醇+150 ml·L<sup>-1</sup>二甲基亚砷+136 g·L<sup>-1</sup>蔗糖)脱水,接着用铝箔纸包裹迅速放入液氮中保存,最后用卸载液(MS+1.2 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖)解冻接入诱导培养基中进行恢复培养。笔者使用改良超低温保存法对甜瓜离体子房组织进行保存,可解决甜瓜未授粉子房离体培养材料受生长季节和生长期的影响而导致的供应不足的问题。

材料的选择对超低温保存后植物的存活率起

决定性作用<sup>[7]</sup>。已报道的超低温保存的研究材料有胚性愈伤组织、原生质体、体细胞胚、小孢子、花粉、不定芽、腋芽、休眠芽、茎尖、种子、幼苗等<sup>[6,8-17]</sup>,但还未发现对甜瓜子房保存研究的相关报道。甜瓜子房体积偏大,在超低温保存的程序中需要先通过预处理来减少细胞内含水量,避免其在 PVS2 脱水过程中细胞脱水死亡而影响存活率。预培养、低温锻炼等<sup>[18-19]</sup>是常用的预处理方法。预处理的目的是改善材料的生理状态,使细胞内自由水含量减少以提高材料的抗冻性<sup>[20]</sup>。笔者采用  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的蔗糖保护液预培养 24 h,众云 18 和锦绣子房的存活率均在 82% 以上。白建明等<sup>[21]</sup>在马铃薯茎尖研究中用  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的蔗糖溶液,李泳<sup>[22]</sup>在罗汉果茎尖中用  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖溶液,均预培养 24 h,获得最高的存活率。也有研究表明,高洁等<sup>[23]</sup>在红掌腋芽中用  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖溶液预培养 96 h 效果最佳,说明不同种植物的预培养时间可能与其保存的组织部位以及预培养液的浓度有关。

玻璃化液处理是将细胞内的自由水从液态转变为玻璃化状态,避免细胞内形成冰晶来提高细胞的抗冻能力<sup>[24]</sup>。PVS2 是最常使用且效果最佳的玻璃化保护液。笔者采用 PVS2 玻璃化液处理 30 min,众云 18 和锦绣子房存活率分别高达 82.13%、83.40%,软枣猕猴桃茎尖用 PVS2 处理 40~60 min,而休眠芽需要 120 min 效果最好<sup>[4,14]</sup>;扁桃休眠芽则需要 70 min<sup>[25]</sup>;羽状鸡冠花幼苗需要处理 60 min<sup>[17]</sup>;越橘腋芽需要 40 min<sup>[13]</sup>;九里香种子处理 30 min<sup>[26]</sup>。但也有研究表明,PVS2 处理反而降低存活率<sup>[27]</sup>。不同材料的组织部位 PVS2 处理存在较大的差异,因此,需要筛选适合的 PVS2 玻璃化液处理时间。晋玲等<sup>[28]</sup>认为 PVS2 处理时间一般是在 20~100 min。

解冻是超低温保存过程中防止材料受到损伤的关键,在解冻过程中若不能快速解冻材料,容易使细胞内再次结冰造成细胞死亡,所以要针对保存的材料选择适合的解冻方式。理论上一般采用 37~40 °C 恒温解冻。梨茎尖在 25 °C 水浴解冻效果好<sup>[29]</sup>;白菜小孢子 37 °C 恒温水浴 40 s 解冻效果最佳<sup>[10]</sup>;柿子休眠芽在 40 °C 时快速解冻的效果较好<sup>[30]</sup>;而密花石斛花粉在室温和 37 °C 解冻无明显差异<sup>[27]</sup>。笔者的研究中甜瓜子房在卸载液中恒温 38 °C 解冻 5 min 效果最好。在解冻时为避免 PVS2 在材料细胞内的毒害作用,需要卸载液洗涤。笔者的试验使用的卸载液是  $\text{MS}+410 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖。有研

究表明,在解冻时高浓度的蔗糖可防止水分的快速进入,降低冰晶对细胞的损伤。软枣猕猴桃休眠芽<sup>[14]</sup>和蓝果忍冬茎尖<sup>[31]</sup>在卸载液  $\text{MS}+1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖中处理 30 min 达到最好效果,与笔者试验的卸载液配方相同,但笔者的研究缩短了解冻时间。九里香种子<sup>[26]</sup>只要 40 °C 温水解冻 2 min 就能达到理想效果,说明解冻方式以及解冻的温度和时间与物种及材料部位和大小密切相关。

材料在超低温保存的过程中生理活动处于近乎停止的状态,理论上可以长久保存。早在 1997 年对樱桃茎尖超低温保存 1 d 和 10 min 的研究结果发现,二者并没有表现出明显差异<sup>[32]</sup>;芍药花粉超低温保存 4 a 和美国山核桃花粉保存 10 a 上都还具有生活力<sup>[33-34]</sup>;秦艽休眠芽在超低温保存 1、14、28、46 d 存活率也没差异<sup>[35]</sup>;软枣猕猴桃茎尖在液氮中保存时间长短并未对材料的存活力造成明显区别<sup>[4]</sup>。这些报道与笔者的研究结果一致,甜瓜子房在超低温保存 20、40、60 d 后子房存活率并无显著差异,说明超低温保存时长对子房的存活率影响不明显。本试验结果表明,甜瓜子房在超低温保存 60 d 后仍可维持较高的存活率,随着低温保存时间的延长,其存活率虽然开始降低,但保存时长之间的差异并不显著。

笔者首次尝试以子房作为保存材料进行研究,甜瓜子房通过预培养 24 h,用海藻酸钠包埋,氯化钠固定,经加载液处理 20 min,PVS2 脱水 30 min,用铝箔纸包裹放入液氮中保存,之后卸载液在 38 °C 恒温解冻 5 min,接入诱导培养基中即可恢复培养。初步得到甜瓜子房超低温保存的条件,建立适合甜瓜子房超低温保存及恢复培养的体系。该技术有效地解决了甜瓜大孢子培养供体不足且无法长期持续供应的问题,为葫芦科作物大孢子超低温保存提供了可靠的技术参考。

#### 参考文献

- [1] ED B M, OKUT N D, ACHINO J, et al. Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus L.*) shoot cultures through application of standard protocols[J]. *CryoLetters*, 2003, 24(6): 389-396.
- [2] 刘林,曹春信,刘新华. 瓜菜类植物花粉超低温保存研究进展[J]. *中国瓜菜*, 2015, 28(2): 1-4.
- [3] 张金梅,闫文君,李雪,等. 桃花粉低温和超低温保存方法比较研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(4): 670-675.
- [4] 白晓雪. ‘魁绿’‘绿王’等六份软枣猕猴桃资源超低温保存方法研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2020.
- [5] 康媛. 马铃薯茎尖超低温保存方法研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2014.

- [6] 刘莹莹. 水曲柳胚性愈伤组织超低温保存技术优化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [7] 姜喜, 赵书珍, 党艳青, 等. 扁桃小滴玻璃化超低温保存研究[J]. 果树学报, 2018, 35(3): 367-375.
- [8] 王子成, 邓秀新. 柑橘原生质体的超低温保存[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2002, 32(3): 38-41.
- [9] 谢玉明. 荔枝体细胞胚胎发生及种质超低温保存研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2003.
- [10] 谭舒心, 张淑江, 章时蕃, 等. 白菜小孢子超低温保存及复苏后胚状体诱导[J]. 中国蔬菜, 2022(7): 52-61.
- [11] 宋常美, 文晓鹏, 李庆宏. 红枫樱桃花粉超低温保存探究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 117-120.
- [12] 刘婧. 蓝莓、苹果不定芽超低温保存新技术的建立[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [13] 李娟, 张志东, 刘海广, 等. 越橘离体腋芽小滴玻璃化超低温保存[J/OL]. 吉林农业大学学报 [2021-02-20]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVI2pW9UrhTDCdPD65smUY22K1s2EQg6gOcjeAg3ORsWSxNDy7kIUtD-6amJgRy8dGi8Qif&uniplatform=NZKPT>. DOI: 10.13327/j.jjlau. 2020.1009.
- [14] 白雪雪, 秦红艳, 韩先焱, 等. 软枣猕猴桃休眠芽超低温保存技术研究[J]. 果树学报, 2020, 37(8): 1247-1255.
- [15] 苏仕林. 草莓茎尖超低温保存体系建立及脱除 SMYEV 和 SVBV 研究[D]. 四川绵阳: 西南科技大学, 2022.
- [16] 宋常美, 文晓鹏, 李庆宏. 红水樱桃种子玻璃化超低温保存[J]. 种子, 2019, 38(4): 156-158.
- [17] 李秉玲, 贾梦雪, 李珂珂, 等. 羽状鸡冠花无菌幼苗的超低温保存研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(5): 59-65.
- [18] 冯超红. 苹果茎尖超低温保存技术及脱毒效率的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [19] PYYNANEN L. Cold hardening and slow cooling: tools for successful cryopreservation and recovery of *in vitro* shoot tips of silver birch[J]. Canadian Journal of Forest Research, 1996, 26(11): 2015-2022.
- [20] 严庆丰, 黄纯农. 植物组织和细胞的玻璃化法冻存研究[J]. 细胞生物学杂志, 1994, 16(3): 117-122.
- [21] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 马铃薯茎尖小液滴玻璃化法超低温保存及其再生植株的遗传稳定性[J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1431-1438.
- [22] 李泳. 罗汉果茎尖小液滴玻璃化法超低温保存及其遗传稳定性研究[D]. 广西桂林: 广西师范大学, 2014.
- [23] 高洁, 李志英, 张玄兵, 等. 红掌小滴玻璃化法超低温保存研究[J/OL]. 热带作物学报 [2021-04-09]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVI2pW9UrhTDCdPD64vrMaLVC4\\_sSLB2jggIRErRz8xrqgtcWSi3y20rHKuNHbsyLWGzk0U&uniplatform=NZKPT](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVI2pW9UrhTDCdPD64vrMaLVC4_sSLB2jggIRErRz8xrqgtcWSi3y20rHKuNHbsyLWGzk0U&uniplatform=NZKPT).
- [24] 王仁睿. 菊花、枣和马铃薯种质资源超低温保存技术与脱毒的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [25] 姜喜, 张琦, 赵书珍, 等. ‘矮丰’扁桃休眠芽玻璃化超低温保存条件优化[J]. 北方园艺, 2018(1): 62-66.
- [26] 顾雅坤, 吴怡, 符丽, 等. 九里香种子超低温保存研究[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 760-766.
- [27] 欧阳英, 李秉玲, 刘燕. 密花石斛花粉的保存方法研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(6): 151-154.
- [28] 晋玲, 刘进, 张延红, 等. 麻花秦艽休眠芽的玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1374-1377.
- [29] 赵艳华, 吴雅琴, 李春敏. 梨离体茎尖超低温保存方法的比较研究[J]. 河北农业科学, 2004, 8(4): 93-95.
- [30] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿休眠芽茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 553-556.
- [31] 梁杉, 张志东, 刘海广, 等. 蓝果忍冬离体茎尖小滴玻璃化超低温保存体系优化[J/OL]. 吉林农业大学学报 [2021-06-09]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVI2pW9UrhTDCdPD65smUY22K1s2MJELQQbpXlhOJle1T--3dZQLgAkJFXPFj-MnBACkXqP&uniplatform=NZKPT>.
- [32] NIINO T, TASHIRO K, SUZUKI M, et al. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification[J]. Scientia Horticulturae, 1997, 70(2/3): 155-163.
- [33] 李秉玲, 尚晓倩, 刘燕. 芍药花粉超低温保存 4 年后的生活力检测[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(6): 145-147.
- [34] SPARKS D, YATEI I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability[J]. HortScience, 2002, 37(1): 176-177.
- [35] 张延红, 秦艽和党参的休眠芽培养与玻璃化超低温保存研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.