

玻璃化法及小液滴玻璃化法对香石竹茎尖超低温保存效果的影响

林田, 杨华, 韩静, 魏仕伟, 李天菲* (上海市农业生物基因中心, 上海 201106)

摘要 [目的] 探索更有效的香石竹茎尖超低温保存方法, 为球宿根花卉的超低温保存提供相关技术支持。[方法] 以香石竹茎尖为材料, 研究预培养条件(蔗糖浓度、预培养时间)、玻璃化处理时间和玻璃化方法(常规玻璃化法、小液滴玻璃化法)对香石竹茎尖超低温保存效果的影响。[结果] 在 0.5 mol/L 的蔗糖浓度培养基上预培养 5 d 香石竹茎尖成活率最高, 为 88.3%; 玻璃化处理 80 min 成活率最高, 可达 86.7%; 常规玻璃化法成活率及再生率在 80% 以上, 小液滴玻璃化法成活率可达 90% 以上且全部再生, 小液滴玻璃化法再生天数比常规玻璃化法少 3~5 d。[结论] 小液滴玻璃化法是一种有发展前景的超低温保存方法。

关键词 香石竹; 茎尖; 玻璃化法; 小液滴玻璃化法; 超低温保存

中图分类号 S682.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)19-0105-03

Effects on Cryopreservation by Vitrification and Droplet-Vitrification of *Dianthus caryophyllus* L.

LIN Tian, YANG Hua, HAN Jing et al (Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106)

Abstract [Objective] To explore a more effective technique for *Dianthus caryophyllus* L. shoot-tips cryopreservation, and to provide technical basis for the bulbs flowers cryopreservation. [Method] With *D. caryophyllus* shoot-tips as the materials, the effects of pre-culture treatments (sugar concentrations, pre-culture time), vitrification time and vitrification methods on survival rate, regeneration rate and regeneration time of cryopreservation were studied. [Result] When pre-cultured in the medium with 0.5 mol/L sucrose for 5 d, the survival rate was 88.3%. The survival rate was up to 86.7% under the vitrification treatment for 80 min. The survival rate and regeneration rate of conventional vitrification method were above 80%, the survival rate of droplet-vitrification method could reach more than 90% and regeneration rate was 100%. The number of regeneration days of droplet-vitrification was 3-5 d less than conventional vitrification. [Conclusion] Droplet-vitrification is a promising method for bulbs shoot-tips cryopreservation.

Key words *Dianthus caryophyllus* L.; Shoot-tip; Vitrification; Droplet; Cryopreservation

香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)为石竹科石竹属常绿亚灌木宿根花卉,是世界著名的四大切花之一,其栽培种及野生种资源的有效保存对香石竹的国产化至关重要。香石竹种质资源通常通过品种圃扦插及组织培养定期继代保存,但香石竹一旦被病毒侵染,长期的无性繁殖易导致病毒在植物体内不断积累,难以有效长期保存种质,需寻找更安全长效的保存方法。

超低温保存是指液氮(-196℃)下的低温保存。在此条件下,植物生命活动近乎停止,贮藏过程中的生理和遗传变化能够控制在最低限度内,具有资源保存的长期性和稳定性优点。此外,病毒在超低温保存处理过程中会失活,因此可通过超低温手段进行脱毒,这是营养繁殖植物种质资源长期保存的最优选择^[1]。超低温保存有多种方法,近年经常运用的以 PVS2^[2] 作为冷冻保存液的玻璃化法,是将植物材料经高浓度的保护液处理后,迅速投入液氮中,使其组织中的水分转变为玻璃化状态,从而避免形成冰晶造成机械损伤,达到有效保护植物的目的。玻璃化法已被运用于 100 多种植物不同组织的超低温保存中。在常规玻璃化法上发展出来的小液滴玻璃化法,是将植物材料经玻璃化处理后,在铝箔上滴成小液滴,然后直接投入液氮进行迅速冷冻。由于其冻存及解冻速度快,组织不易形成冰晶,并且易成活再生,因此是一种有发展前景的超低温保存方法^[3]。

国外关于香石竹的超低温研究始于 20 世纪 70 年代,其成活率仅为 2%^[4]。Uemura 等^[5]将 4~8℃ 驯化处理的香石

竹茎尖通过慢冻法进行超低温保存,成活率提高到 70%~80%。后通过两步冷冻法及程序降温法可使香石竹的成活率达 90%^[6-7]。随着玻璃化试剂的发明,Langis 等^[8]于 1990 年采用玻璃化法成功保存了香石竹茎尖。此后,在常规玻璃化方法上又发展出包埋玻璃化法及小液滴玻璃化法。Hal-magyi 等^[9]将香石竹 3 个品种的茎尖用海藻酸钠包埋玻璃化处理后进行冻存,成活率为 60%~73%。笔者分别采用常规玻璃化法和小液滴玻璃化法对香石竹茎尖的超低温保存技术进行探索,比较 2 种方法对超低温保存效果的影响,为搭建球宿根花卉的超低温保存技术平台提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 茎尖准备 供试材料主要为香石竹茎尖生长点。茎段诱导无菌苗在含 6-BA1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+60 g/L 蔗糖的 MS 培养基上,在温度为(25±2)℃、光照强度 2 000 lx、光暗周期 16 h/8 h 条件下培养,继代 30 d。解剖镜下剥离切取 2~3 mm、带 2 片护叶的茎尖生长点(图 1)。

1.2 常规玻璃化法冻存

1.2.1 预培养。将茎尖接种到含 0.1、0.3、0.5、0.7 mol/L 蔗糖的 MS 培养基中,在 10℃ 下培养 1、3、5、7 d。

1.2.2 装载及玻璃化。将预培养后的材料在预处理溶液^[10](含 2 mol/L 甘油及 0.4 mol/L 蔗糖的 MS 液体培养基)中室温下处理 30 min 后,转入玻璃化保护剂 PVS2 进行 80 min 的冰水浴处理。为得出最佳玻璃化时间,将在 0.3 mol/L 蔗糖浓度的 MS 培养基预培养 5 d 的茎尖分别进行 15、30、60、80、120 min 的玻璃化处理。

1.2.3 冻存及解冻。将茎尖转移至装有预冷新鲜 PVS2 的 2 mL 冷冻管中(10 茎尖/管),迅速投入液氮中保存。取出在液氮中冻存 1 h 以上的冷冻管,立即放入 40℃ 水浴中快速解

基金项目 上海市科委研发平台专项(18DZ2293700)。

作者简介 林田(1976—),女,广东揭阳人,硕士,助理研究员,从事植物生物技术与种质资源保存技术工作。*通讯作者,副研究员,硕士,从事植物生物技术与种质资源保存评价工作。

收稿日期 2018-03-13; **修回日期** 2018-04-04



图1 香石竹组培苗(右下角为剥取的茎尖)

Fig. 1 Plantlets of *D. caryophyllus* (the lower right corner is the peeled shoot tips)

冻2 min。茎尖在室温下用含1.2 mol/L蔗糖的MS培养基洗涤2~3次,每次5~10 min。

1.2.4 恢复培养。将洗涤后的茎尖在滤纸上吸干后,转移至含6-BA 0.5 mol/L, NAA 0.1 mol/L 和 GA₃ 0.5 mol/L 的MS半固体培养基中暗培养,等茎尖返绿并有萌动迹象时再转入MS固体培养基中常光培养,培养条件同茎段诱导。定期观察,记录开始恢复生长的天数,20 d后计算成活率及再生率。已恢复生长(萌发根、芽或愈伤组织)的茎尖视为成活;茎尖直接分化而不形成愈伤为再生。试验中每个处理20个茎尖,3次重复。

1.3 小液滴玻璃化法冻存 将“1.1”所得茎尖按“1.2”的优化方案进行玻璃化处理。仅在冻存前5 min将含有1个茎尖的液滴(约5 μL)滴在5 mm×20 mm的无菌铝箔条上(图2),再直接投入装满液氮的安培管中。解冻时直接将含液滴的铝箔条投入洗涤液中解冻5~10 min,恢复培养同“1.2.4”。对照为常规玻璃化程序冻存后恢复培养的茎尖。

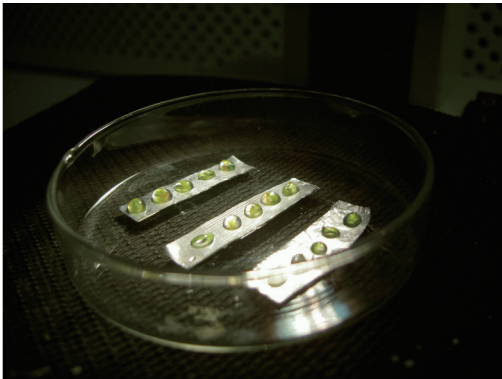


图2 小液滴玻璃化法处理的香石竹茎尖

Fig. 2 Shoot-tips of *D. caryophyllus* after droplet-vitrification treatment

1.4 数据统计与分析 试验中每个处理20个茎尖,3次重复。成活率=成活茎尖数/处理茎尖数×100%;再生率=再生植株数/成活茎尖数×100%。试验结果用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 预培养条件对成活率的影响 由表1可知,在所设的4个蔗糖梯度下,冻存茎尖成活率随预培养时间增加而上升,到5 d时达最高,预培养时间大于7 d时,成活率下降。预培养时间为1 d时,成活率随蔗糖浓度增加而减少,茎尖切面渗出较多,其中0.7 mol/L的培养基中茎尖明显变软呈水渍状,成活率仅为33.3%。较低蔗糖浓度下预培养3 d以上,茎尖伤口愈合,成活率随蔗糖浓度增加而增加,但蔗糖浓度高于0.7 mol/L,预培养时茎尖易褐变及水渍化,成活率显著下降($P<0.05$)。在含0.5 mol/L蔗糖培养基上预培养5 d,可达最高成活率88.3%。

表1 蔗糖预培养浓度及预培养天数对成活率的影响

Table 1 Effect of sugar concentrations in the pre-culture medium and pre-culture time on survival rate %

蔗糖浓度 Sugar concentration mol/L	成活率 Survival rate			
	1 d	3 d	5 d	7 d
0.1	63.3±2.9	66.7±5.8	73.3±2.9	66.7±12.6
0.3	58.3±2.9	73.3±5.8	86.7±2.9	83.3±5.8
0.5	46.7±7.6	71.7±2.9	88.3±2.9	50.0±10.0
0.7	33.3±5.8	36.7±2.9	23.3±10.4	15.0±13.2

2.2 玻璃化时间对成活率的影响 在对茎尖进行玻璃化处理时,处理时间小于15 min,由于保护剂处理时间过短,材料成活率仅为13.3%,随玻璃化时间延长,成活率也上升,到80 min时可达86.7%,但随时间延长成活率略有下降。120 min时,成活率仍可达72.5%(图3)。冻后恢复培养茎尖在3~5 d内萌动,在5~15 d内直接长出新芽,个别茎尖形成愈伤组织。

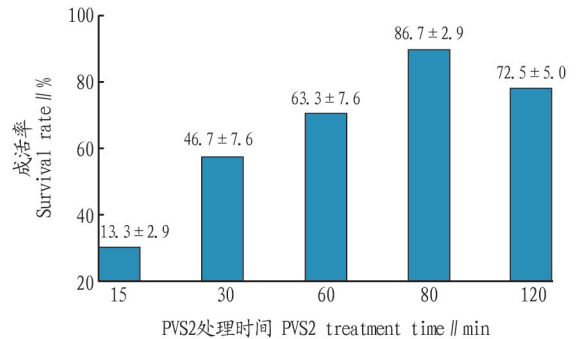


图3 PVS2处理时间对成活率的影响

Fig. 3 Effect of PVS2 treatment time on survival rate

2.3 小液滴玻璃化法茎尖冻存效果 与常规玻璃化方法冻存香石竹茎尖相比,小液滴玻璃化法在优化玻璃化程序下进行冻存,成活率可达95.0%,显著高于常规玻璃化法的成活率86.7%($P<0.05$)。小液滴玻璃化法冻存恢复培养时,最快1 d即可见茎尖萌动,再生时间较常规玻璃化法要短3~5 d,成活植株全部再生,长势较常规玻璃化法冻存再生植株强(表2,图4)。

3 讨论

3.1 预培养对冻后成活率的影响 茎尖的生理状态对冻后

成活率有着显著影响。通过低温驯化及短期高浓度蔗糖预培养,可使组织较缓和地脱去部分水分,同时促使细胞分泌保护物质,有利于冻后存活。香石竹植株4~8℃冷驯化后冻存,成活率可达70%~80%^[11]。在薄荷^[12]及苹果^[13]茎尖冻存中蔗糖预处理可显著提高成活率。但渗透压过大,易对植物组织造成伤害,需找到合适的浓度。在该试验中以0.5 mol/L的蔗糖浓度培养基预培养成活率最高,而蔗糖浓度为0.7 mol/L时因高渗透压对组织造成伤害,茎尖在预培养时易褐变及水渍化,成活率显著下降。

表2 冻存方式对成活率及植株再生的影响

Table 2 Effect of cryopreservation method on survival rate and regeneration rate

冻存方式 Cryopreservation method	成活率 Survival rate %	再生率 Regeneration rate %	再生天数 Regeneration days//d
常规玻璃化法 Vitrification	86.7±2.9	90.4±3.2	7~15
小液滴玻璃化法 Droplet-vitrification	95.0±5.0	100±0	3~12
未经液氮冻存 Without liquid nitrogen cryopreservation	100±0	100±0	0~7

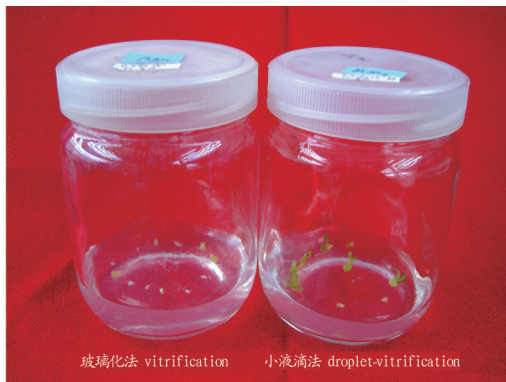


图4 常规玻璃化法(左)及小液滴玻璃化法(右)冻存恢复培养7 d后茎尖

Fig. 4 Shoot-tips cryopreserved by vitrification (left) and droplet-vitrification (right) recovered 7 d

此外, Bouman等^[14]指出预培养一段时间除了提高抗冻性外,还促进切取过程中的伤口修复,提高成活。但如预培养时间过长,则不利于茎尖成活,如在石蒜^[15]及百合^[16]的超低温保存中预培养时间超过7 d,茎尖褐变及生长点顶端闭合,成活率下降。在该试验中,预培养1 d时成活率随蔗糖浓度上升而下降,蔗糖浓度为0.7 mol/L时显著下降,这可能与茎尖伤口在高浓度蔗糖下渗出较多、受伤害较大有关。而预培养3 d时,伤口修复,成活率上升;预培养5 d成活率最高;预培养大于7 d则因护叶闭合、褐变而引起成活率下降。

3.2 玻璃化时间对成活率的影响 玻璃化试剂可使组织脱去水分,这样在冻存中可进入玻璃化状态而不形成伤害性冰晶,有效地保护细胞。但由于试剂的高渗透压伤害及保护剂中DMSO使植物遗传物质改变的潜在性,需严格把握玻璃化处理过程,使植物在达到一定成活率的同时,尽量减少暴露在

玻璃化试剂中的时间^[17]。在超低温冻存中,不同植物所需玻璃化时间不同,菊花超低温冻存中,玻璃化处理15 min可达到最高成活率^[18]。而该试验中玻璃化处理时间少于15 min,由于保护剂处理时间过短,材料脱水不够,成活率仅为13.3%,随时间延长成活率上升,到80 min时成活率最高,若延长至120 min时,仍可达较理想的效果,可见香石竹在较大时间范围内进行玻璃化处理,成活率变动不大,这样就使操作时间相对宽裕。

不同冻存方法所需玻璃化时间也不同,如在香石竹包埋玻璃化冻存中,品种“Wanessa”在PVS2中处理200 min,可达到最高成活率^[8]。相较而言,该试验采用未经包埋的茎尖进行玻璃化冻存达到最高成活率只需80 min,这可能是由于海藻酸钠包埋层在茎尖与玻璃化试剂中起缓冲作用,从而需较长的时间达到完全玻璃化。小液滴玻璃化法因冻存体积小,冻存解冻中容易玻璃化,故在保证一定成活率条件下,采用时间更少,从而减少处理过程中变异及受伤害的可能。

3.3 冻存方式对成活率及植株再生的影响 冷冻的方法因材料及超低温冰冻方法不同可分为慢速冷冻及快速冷冻法。现在被广泛使用的玻璃化法为快速冷冻,通常采用直接投入液氮以达到快速降温,以躲过最易结冰的温度区间-140~-10℃,使细胞内的水分还没来得及形成冰晶,就到达了-196℃的安全区。解冻时在40℃左右的水浴中快速化冻,避免解冻过程中重结晶现象对细胞造成伤害。根据这个速冻速溶的原理发展出的小液滴玻璃化法,由于冻存体积小,冷冻及解冻速度远高于常规玻璃化法,冰晶不易形成,恢复生长快,成活率高,目前已经成功应用于很多植物组织的超低温保存^[2]。较常规玻璃化法,小液滴玻璃化法可使香蕉的成活率提高40%~50%^[19]。Halmagyi等^[20]用程序降温法、包埋脱水法、直接投入液氮的小液滴玻璃化法和玻璃化法等多种方法对菊花进行了超低温保存,结果表明小液滴玻璃化法保存后得到了较高的成活率,这为植物的超低温保存开辟了新途径。香石竹的超低温保存曾采用慢冻法、二步冷冻法、玻璃化法及包埋玻璃化法取得成功,笔者通过小液滴玻璃化法对香石竹茎尖进行成功保存,证明其是一种有潜力的超低温保存方法,为搭建球宿根花卉的超低温保存技术平台提供了相关技术依据。

参考文献

- [1] ENGELMANN F. Plant cryopreservation: Progress and prospects [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2004, 40(5): 427-433.
- [2] SAKAI A, KOBAYASHI S, OIYAMA I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9(1): 30-33.
- [3] SAKAI A, ENGELMANN F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review [J]. Cryo letters, 2007, 28(3): 151-172.
- [4] SEIBERT M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196℃ [J]. Science, 1976, 191(4232): 1178-1179.
- [5] UEMURA M, SAKAI A. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen [J]. Plant Cell Physiol, 1980, 21(1): 85-94.
- [6] DEREUDDRE J, TANNOURY M. Cryopreservation of germplasm of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [M]//BAJAJ Y P S. Cryopreservation of plant germplasm. New York: Springer-Verlag, 1995: 458-477.

3.2 重视植物生长的地下因子——绿地土壤质量 城市绿地土壤质量直接影响植物的健康生长,同时也影响绿地植物景观功能和生态效益等方面的发挥,因此,要重视城市绿地土壤的质量。在建设城市绿地时尽量减少城市建筑垃圾的填埋,采用适宜植物生长的土壤。在城市绿地管养时尽量采取有利于土壤健康持续发展的方式进行管养,关注土壤状况,当发现土壤的质量不利于植物生长时要及时进行改良。

3.3 调整施肥结构,增加有机肥的施肥比例 通过测土了解土壤肥力状况,结合绿地植物需肥规律及肥料效应状况,优化氮、磷、钾配比,促进大量元素与微量元素配合,并合理利用有机养分资源,用有机肥代替部分无机化肥,增加有机肥的施肥比例,弥补无机肥的缺点,实现有机无机结合,提升地力水平。

3.4 减少化学农药的使用 化学农药污染环境,危害人体健康,城市绿地作为人们生活密不可分的一部分带给人们舒适的环境而不是危害,因此应尽量减少对人体健康有害的化学农药的使用,用低毒农药代替高毒农药,用生物农药代替化学农药。但这些都不是解决城市绿地化学农药的使用对环境污染和人体健康损坏的根本方法,其根本方法是增加城市绿地植物自身的抗逆性,减少病虫害的发生,这需要在精准施肥技术的基础上配合科学的管理技术。

4 结语

作为我国经济特区和全国经济中心城市,深圳从过去一个人口不足 3 万的小渔村迅速发展成一座人口超过千万的现代化国际化大都市。深圳在高速发展过程中始终坚持生态优先的发展理念,注重保护城市的自然生态,走绿色低碳的城市化道路。2016 年 12 月,深圳市提出到 2019 年底要用 3 年时间力争将深圳打造成优美、舒适、独具人文内涵的

“世界著名花城”。打造“世界著名花城”就会有更多新植物品种应用到城市绿地中,这就对周围生态环境尤其是土壤微环境提出了更高的要求,因此要重视对城市绿地土壤的养护。粗放式的养护管理已不能满足深圳市对打造“世界著名花城”的要求,打造“世界著名花城”离不开对城市绿地的精心管养。对城市绿地精心管养一个重要方面就是测土精准施肥,对各城市绿地不再采取统一的管理方式,而是根据土壤结构、土壤养分、绿地植物需肥规律以及肥料的肥效发挥规律制定适合不同城市土壤和不同城市绿地的精准施肥方案,在适当的时期采用适当的方法施用适当配方和数量的肥料,满足各绿地植物健康生长,节约肥料,保护环境。

参考文献

- [1] 孔繁花,尹海伟.城市绿地功能的研究现状、问题及发展方向[J].南京林业大学学报(自然科学版),2010,34(2):119-124.
- [2] 师璟璐.城市绿地对生态园林城市建设的作用分析[J].四川建材,2017,43(11):200-201.
- [3] 张波,史正军,张朝,等.深圳城市绿地土壤孔隙状况与水分特征研究[J].中国农学通报,2012,28(4):299-304.
- [4] 史正军,卢瑛,钟晓,等.深圳城市绿地土壤质量状况研究[J].园林科技,2006(1):20-24.
- [5] 蒋炳杨,杨喜田.不同城市绿地类型对土壤微生物数量及微生物量的影响[J].湖南农业科学,2011(17):52-54,59.
- [6] 闫冰,肖能文,齐月,等.北京城市发展对土壤微生物群落功能多样性的影响[J].环境科学研究,2016,29(9):1325-1335.
- [7] 魏胜林,徐梦莹,张辉.我国城市绿地规划设计与养护管理现状及应对策略:生态理念融入城市绿地规划设计与养护管理的可持续性[J].安徽农业科学,2010,38(27):15224-15225,15289.
- [8] 曹林奎.作物精准施肥技术的研究与应用[C]//中国测绘学会.全面建设小康社会:中国科技工作者的历史责任——中国科协 2003 年学术年会论文集(上).北京:中国科学技术出版社,2003:555-557.
- [9] 陈桂芬,马丽,陈航.精准施肥技术的研究现状与发展趋势[J].吉林农业大学学报,2013,35(3):253-259.
- [10] 边贻杰.浅析农作物精准施肥技术[J].中国农业信息,2016(22):73.
- [11] 颜雄,张杨珠,刘晶.土壤肥力质量评价的研究进展[J].湖南农业科学,2008(5):82-85.

(上接第 107 页)

- [7] FUKAI S. Plant regeneration from shoot tips of *Dianthus hybrida* cryopreserved in liquid nitrogen up to 2 years[J]. Plant Tissue Cult Lett, 1989, 6(3):177-178.
- [8] LANGIS R, SCHNABEL-PREIKSTAS B J, EARLE E D, et al. Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification[J]. Cryobiology, 1990, 27(69):657-658.
- [9] HALMAGYI A, DELIU C. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification[J]. Scientia horticulturae, 2007, 113(3):301-306.
- [10] MATSUMOTO T, SAKAI A, YAMADA K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration[J]. Plant Cell Rep, 1994, 13(8):442-446.
- [11] SEIBERT M, WETHERBEE P J. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment[J]. Plant Physiol, 1977, 59(6):1043-1046.
- [12] HIRAI D, SAKAI A. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1999, 19(2):150-155.
- [13] PAUL H, DAIGNY G, SANGWAN-NORREEL B S. Cryopreservation of

apple (*Malus domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(8):768-774.

- [14] BOUMAN H, TIEKSTRA A, PETUTSCHNIG E, et al. Cryopreservation of lilyum species and cultivars[J]. Acta horticulturae, 2003, 612:147-154.
- [15] 林田,刘灶长,李天菲,等.红花石蒜茎尖的玻璃化超低温保存[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1063-1066.
- [16] 林田,刘艳霞,刘灶长,等.百合玻璃化超低温保存初步研究[C]//中国园艺学会.中国园艺学会球根花卉分会 2008 年会暨球根花卉产业发展研讨会论文集.北京:中国农业出版社,2008:121-126.
- [17] YAMADA T, SAKAI A, MATSUMURA T, et al. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification[J]. Plant Sci, 1991, 78:81-87.
- [18] 刘艳霞,刘灶长,林田,等.菊花茎尖的玻璃化超低温保存研究[J].植物遗传资源学报,2009,10(2):249-254.
- [19] PANIS B, PIETTE B, SWENNEN R. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*[J]. Plant Sci, 2005, 168:45-55.
- [20] HALMAGYI A, FISCHER-KLÜVER G, MIX-WAGNER H, et al. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches[J]. Plant Cell Rep, 2004, 22(6):371-375.