生物资源　2026,48(5):483～493
Biotic Resources

综述

DOI:10.14188/j.ajsh.20260014

兰科石斛属植物种质超低温保存研究进展

池　淼[1],朱　帆[1],白舒羽[2],王国强[1],王　涛[1*]

(1. 北京市植物园管理处 植物迁地保护国家林业和草原局重点实验室,北京 100093;
2. 山西农业大学 园艺学院,山西 太谷 030801)

摘要:兰科石斛属(*Dendrobium*)植物具有极高的药用和观赏价值,已有多种兰科石斛属植物种质资源开展超低温保存。综述了国内外石斛属超低温保存的方法、重要影响因素、恢复再生的评价方法、生理机理等研究进展;主要有快冻法、干冻法、包埋干燥法、玻璃化法、小滴玻璃化法和包埋玻璃化法等6种保存方法;植物材料含水量的多少、解冻复温过程和保护剂的使用等均是影响超低温保存后恢复萌发效果的重要因素;还总结了石斛属种子、原球茎、花粉、类原球茎和原生质体等不同类型种质超低温保存及冻后再生等关键技术,其中干冻法超低温保存技术已成功保存多种石斛属种子及花粉,玻璃化法超低温保存被认为是目前对含水量较高的新鲜种子、原球茎和类原球茎、茎尖等最有效的保存方法之一。濒危兰科种质超低温保存相关研究尚在起步阶段,仍需开展大量研究工作。

关键词:超低温保存;石斛属;兰科
中图分类号:Q-33　　文献标志码:A　　文章编号:2096-3491(2026)05-0483-11

Progress of cryopreservation for *Dendrobium* (Orchidaceae) germplasm

CHI Miao[1], ZHU Fan[1], BAI Shuyu[2], WANG Guoqiang[1], WANG Tao[1*]

(1. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Plant Ex Situ Conservation, Beijing Botanical Garden, Beijing 100093, China; 2. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China)

Abstract: Cryopreservation of various germplasm resources of the Orchidaceae *Dendrobium* has been carried out due to their high medicinal and ornamental value. This paper reviews the progress on cryopreservation methods, important influencing factors, evaluation of recovery and regeneration, and physiological mechanisms of the *Dendrobium* plants. There are mainly six preservation methods: rapid freezing method, dry freezing method, embedding drying method, vitrification method, small droplet vitrification method, and embedding vitrification method. The amount of water content in the plant materials, the thawing and rewarming process, and the use of protective agents are all important factors affecting the recovery and germination effect after cryopreservation. It also summarizes the key technologies of cryopreservation and post-freezing regeneration of different types of germplasm such as seeds, protocorms, pollen, protocorm-like bodies and protoplasts of the *Dendrobium*. The dry freezing cryopreservation technology has successfully preserved various seeds and pollen of the *Dendrobium*, and the vitrification cryopreservation method is considered to be one of the most effective preservation methods for fresh seeds, protocorms, protocorm-like bodies, and stem tips with higher water content at present. The research on cryopreservation of endangered Orchidaceae germplasm is still a long and arduous task, but the related work is still in its infancy and more research work needs to be carried out.

收稿日期:2026-04-20　修回日期:2026-06-08　接受日期:2026-10-19
作者简介:池淼(1990-),女,硕士,高级工程师,主要从事植物种质资源保育与管理,E-mail:chimiao@chnbg.cn
*通信作者:王涛(1983-),女,博士,正高级工程师,主要从事濒危植物资源保育,E-mail:wangtao@chnbg.cn
基金项目:北京市公园管理中心科技课题(ZX2024008);中央财政国家级自然保护区补助项目(2025 ZK-XZ-6)

引用格式:池淼,朱帆,白舒羽,等. 兰科石斛属植物种质超低温保存研究进展[J]. 生物资源, 2026, 48(5): 483-493.
Chi M, Zhu F, Bai S Y, et al. Progress of cryopreservation for *Dendrobium* (Orchidaceae) germplasm [J]. Biotic Resources, 2026, 48(5): 483-493.

Key words: cryopreservation; *Dendrobium*; Orchidaceae

0 引 言

石斛属(*Dendrobium*)植物是兰科(Orchidaceae)最大的属之一,全世界约有1 800种,中国自然分布约有106种[1]。该属植物不仅观赏价值极高,许多种类还具有重要的药用价值和经济价值,但中国有些地区野生石斛资源濒临枯竭,所以石斛属植物种质资源保存对于生物多样性保护、育种和产业发展等均具有重要意义。

目前,在组织离体培养技术的基础上发展起来的超低温保存技术是植物种质长期保存的最佳方法之一,可最大程度延长保存材料的寿命。将植物组织经干燥脱水或保护液处理后,在液氮等超低温度条件下进行冻存,植物体内生理生化活动几乎停止,生物反应保持在相对稳定的状态,降低了在贮藏过程中遗传变异的风险,因此在理论上超低温保存技术可以无限期地储存植物材料[2-4]。

超低温保存技术是目前石斛属植物种质资源保存的重要方法,其相关研究已在至少17种9个品种中开展,保存的种质类型主要有种子、花粉、原球茎、类原球茎和茎尖等,但不同种或品种超低温保存后恢复生长的生活力差异明显不同(表1)。其超低温保存的长期有效开展主要受多种因素影响,如植物物种本身特性、外植体类型、含水量、解冻复温、保护剂的使用等[2,5],所以探索科学合理的兰科石斛属种质超低温保存方法对石斛属种质资源研究及其产业的可持续发展有重要意义。

表1 兰科石斛属植物超低温保存生活力差异

Table 1 Differences in viability of *Dendrobium* plants from the Orchidaceae family during ultra-low temperature preservation

种/品种	外植体	方法	关键技术	恢复生活力	参考文献
束花石斛(*D. chrysanthum*)	种子	玻璃化法	室内风干,MC27.8%;PVS2冰上45 min	萌发率80%	[12]
	种子	干冻法	室内风干,MC27.8%	萌发率52%	[12]
铁皮石斛(*D. officinale*)	授粉4个月种子	干冻法	干燥至MC 8%~19%。	萌发率95%	[9]
	授粉4个月种子	干冻法	硅胶干燥至MC 12%~19%	萌发率95%	[11]
	原球茎	玻璃化法	PVS2冰上15 min	88%	[9,11]
	原球茎	玻璃化法	25%PVS2过渡处理10 min(22℃),再用100%PVS2浴脱水15 min	88%	[24]
	成熟种子	干冻法	$LiCl_3$干燥至MC10%~20%	萌发率94.06%	[13]
	类原球茎	干冻法	含水量下降为0.1~0.5 g/g DM时,冻后存活率达最大值	冻后最大增重2~3倍	[14-15]
	类原球茎	包埋玻璃化法	MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.75 mol/L蔗糖25℃光照预培养5 d;2 mol/L甘油+1 mol/L蔗糖25 ℃ 80 min,0.5 mol/L蔗糖+0.5 mol/L $CaCl_2$;PVS2冰上150 min	40 ℃水浴3 min,MS+1.2 mol/L蔗糖洗涤,再生率85%	[73]
	类原球茎	干冻法	缓慢脱水干燥至MC30%左右后直接液氮冷冻	48%~80%	[11]
	原生质体	玻璃化法	材料用25%PVS2,冰浴过渡5 min,离心去上清液,在100%PVS2中冰浴脱水3 min	荧光素双醋酸酯染色法,存活率48%	[24]
细茎石斛(*D. moniliforme*)	种子	干冻法	MC18%	萌发率92%~95%	[14]
檀香石斛(*D. anosmum*)	种子	干冻法	—	萌发率25%	[10]

续表

种/品种	外植体	方法	关键技术	恢复生活力	参考文献
血色石斛（*D. cruentum*）	种子	包埋玻璃化法	2%海藻酸钠处理后用100 mmol/L $CaCl_2$包埋；PVS2处理30min	萌发率64.7%	[28-29]
	种子	玻璃化法	—	萌发率32%	[21,67]
	原球茎	玻璃化法	PVS2	33%	[21,23]
	原球茎	包埋干燥法	海藻酸钠包埋；PVS2	27%	[21,23]
龙石斛（*D. draconis*）	种子	玻璃化法	—	萌发率95%	[21-22]
重唇石斛（*D. heteroglossum*）	种子	包埋玻璃化法	—	萌发率80%	[21,30]
石斛杂种*Dendrobium* Dong Yai	种子	玻璃化法	PVS2冰上60min	萌发率48.9%	[26]
	种子	玻璃化法	PVS2＋1%间苯三酚，冰上60 min	萌发率76.3%	[26]
	原球茎	小滴玻璃化法	0.3 mol/L蔗糖预培养24 h；PVS2冰上15 min	0%	[26]
	原球茎	小滴玻璃化法	0.3 mol/L蔗糖预培养24 h；PVS2＋1%间苯三酚，冰上15 min	14%	[26]
石斛杂种*Dendrobium* Sena Red	种子	玻璃化法	—	/	[11,68]
	成熟种子	玻璃化法	PVS2冰上3h	萌发率63.8%	[25]
石斛杂种*Dendrobium* Mini WRL	成熟种子	玻璃化法	PVS2冰上1 h	55.2%	[25]
石斛杂种*Dendrobium* Jaquelyn Thomas	成熟种子	玻璃化法	PVS2冰上1 h	60.4%	[25]
石斛杂种*Dendrobium* BFC Pink	成熟种子	玻璃化法	PVS2冰上2 h	51.5%	[25]
石斛杂种*Dendrobium* Sena Red & Mini WRL	花粉	玻璃化法	PVS2室温（27±2）℃或冰上3 h	萌发率＞80%，授粉后结实种子活力（TTC）＞90%	[25]
翅萼石斛（*D. cariniferum*）	原球茎	包埋玻璃化法	液体VW培养基＋0.3 mol/L蔗糖25℃ 110 r/min震荡预培养；2%海藻酸钠＋2mol/L甘油＋0.4mol/L蔗糖处理1 h；PVS2 25℃处理60 min	15%	[31]
独龙石斛（*D. draconis*）	原球茎	玻璃化法	PVS2	95%	[21,23]
杯鞘石斛（*D. gratiosissimum*）	原球茎	包埋干燥法	液体ND＋1 mg/L ABA预培养7 d；硅胶风干5 h	67%	[18]
重唇石斛（*D. hercoglossum*）	原球茎	玻璃化法	PVS2	80%	[21,23]
尖刀唇石斛（*D. heterocarpum*）	原球茎	包埋干燥法	0.25 mol/L蔗糖0 ℃暗培养7 d；风干12 h	8%	[69]
维珍石斛（*D. virgineum*）	原球茎	包埋干燥法	—	57%	[70]
金钗石斛（*D. nobile*）	原球茎	玻璃化法	PVS2＋1%PGL室温25 ℃处理10 min	68%	[71]

续表

种/品种	外植体	方法	关键技术	恢复生活力	参考文献
	类原球茎	包埋玻璃化法	0.4 mol/L蔗糖+2 mol/L甘油预处理,3%海藻酸钠+0.1 mol/L $CaCl_2$包埋;PVS2	存活率53.33%,再生率50.2%	[17]
	类原球茎	包埋干燥法	0.4 mol/L蔗糖+2 mol/L甘油预处理,3%海藻酸钠+0.1 mol/L$CaCl_2$包埋	存活率78.1%,再生率75.9%	[17]
	原球茎	玻璃化法	1/2 MS固体培养基+ 0.8mol/L蔗糖4 ℃ 暗培养6 d;1/2MS+2.0 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖室温40 min;PVS2 冰上40 min	20%	[72]
石斛品种*Dendrobium*‘Walter Oumae’	茎尖	包埋干燥法	去钙离子VW液体培养基+3%藻酸钙+0.4 mol/L蔗糖包埋,滴入0.1mol/L $CaCl_2$处理40 min;VW固体培养基预培养2d;风干脱水	再生率13.33%	[19]
密花石斛(*D. densiflorum*)	新鲜花粉	快冻法	新鲜花粉含水量43.26%	萌发率27%	[6]
	新鲜花粉	玻璃化法	PVS2在0 ℃处理1 h	萌发率最高,达17.25%	[6]
黄喉石斛(*D. signatum*)	花粉	玻璃化法	0.6 mol/L蔗糖+2 mol/L甘油处理15 min;PVS2室温(29±2)℃ 40 min	55.6%	[20-21]
	花粉	包埋干燥法	0.6 mol/L蔗糖+ 2 mol/L甘油处理15 min;室温(29±2) ℃风干3 h	50%	[20-21]
鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*)	花粉	玻璃化法	PVS2冰上20 min	40%	[21]
束花石斛(*D. chrysanthum*)	类原球茎	包埋玻璃化法	0.4 mol/L蔗糖+2 mol/L甘油预处理;3%海藻酸钠+0.1 mol/L $CaCl_2$包埋;PVS2冰上100 min	存活率63.2%	[32]
石斛品种*Dendrobium*‘Sonia-28’	类原球茎	包埋干燥法	1.0 mol/L蔗糖预培养;3%海藻酸钠包埋	伊万思蓝染色	[57]
	类原球茎	包埋玻璃化法	0.5 mol/L蔗糖6 d;PVS2冰上150 min	TTC染色	[74]
	类原球茎	玻璃化法	PVS2	16%	[75-76]
	类原球茎	小滴玻璃化法	1/2MS半固体培养基24 h+0.5 mol/L蔗糖;装载10 min;PVS2冰上20 min	TTC染色13.3%,再生率%	[27]
石斛品种*Dendrobium*‘Sonia-17’	类原球茎	包埋干燥法	0.5 mol/L蔗糖24 h;脱水3 h	TTC染色	[77]
石斛品种*Dendrobium*‘Bobby Messina’	类原球茎	玻璃化法	1/2MS半固体培养基+2 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖,25 ℃ 20 min;PVS2冰上20 min。	再生率40%	[78]
	类原球茎	包埋干燥法	/	再生率0%	[79]
	类原球茎	玻璃化法	MS+0.5 mol/L蔗糖24 h;2 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖25 ℃ 20 min;PVS2冰上处理20 min	40 ℃水浴90 s,MS+2 mol/L蔗糖恢复生长;3个月后,3~4 mm直径的原球茎恢复生活率明显高于1~2 mm	[80]

1 石斛属植物保存的主要方法

1.1 快冻法

快冻法是将新鲜植物组织快速投入液氮进行快冻保存，但新鲜未经干燥处理的植物组织水分含量较高，细胞内水分在快速冷冻过程中极易形成冰晶而对组织细胞造成伤害[2]，此种方法应用种类较少，兰科石斛属植物种质超低温保存研究中，通过快冻法保存含水量43.26%的新鲜密花石斛(*Dendrobium densiflorum*)花粉，冻后萌发率为27%[6]。

1.2 干冻法

干冻法是对组织进行干燥脱水后快速投入液氮保存。干燥处理可以控制脱水速度与脱水程度，增强细胞抗冻性[7]。脱水后，细胞液浓度增高，投入液氮后的冷冻过程易进入玻璃化状态。植物组织的最佳含水量是进行干冻法超低温保存的关键[2]，且不同种类的兰科石斛属种质含水量不同。干冻法已成功保存部分石斛属种子[8-14]和类原球茎[11,15-16]。分别用干冻法成功保存授粉4个月、5个月和成熟的铁皮石斛(*D. officinale*)种子，冻存24～96 h后萌发率高达92%～95%[8-9,11,13]。用干冻法成功保存束花石斛(*D. chrysanthum*)种子，冻后萌发率约52%[12]。国外学者通过干冻法也成功保存细茎石斛(*D. moniliforme*)[14]和檀香石斛(*D. anosmum*)[10]种子，但二者的冻后萌发率差异较大，分别为92%～95%和25%。

1.3 包埋干燥法

包埋干燥法是将植物组织包埋处理，经特殊溶液脱水后超低温保存，可有效实现组织在超低温环境下长期保存。目前已有至少10种(含品种)石斛属植物种质利用包埋干燥法实现了超低温保存。金钗石斛(*D. nobile*)原球茎经0.4 mol/L蔗糖＋2 mol/L甘油预处理，进行3%海藻酸钠＋0.1 mol/L $CaCl_2$包埋后超低温保存，冻后存活率78.1%，再生率75.9%[17]；杯鞘石斛(*D. gratiosissimum*)原球茎在添加1mg/L脱落酸(abscisic acid，ABA)的液体ND培养基上预培养7 d，经由硅胶脱水干燥5 h，后超低温保存，冻后再生率67%[18]；石斛品种*D.* 'Walter Oumae'组培幼苗的茎尖组织经包埋干燥后超低温保存，冻后再生率13.33%[19]。黄喉石斛(*D. signatum*)花粉经0.6 mol/L蔗糖＋2 mol/L甘油处理15 min，室温(29±2) ℃风干脱水3 h后超低温保存，冻后萌发率可达50%[20-21]。

1.4 玻璃化法

在玻璃化法超低温保存过程中，生物组织必须经玻璃化溶液充分脱水，胞内外溶液才能在液氮快速冷冻时完成由液态向玻璃态的直接转变，可有效防止组织内冰晶的形成；细胞内被玻璃化溶液填充，可以避免细胞在液氮冷冻-解冻时遭受冰晶损伤[2,5]。因此，玻璃化法超低温保存被认为是目前最有效的超低温保存方法之一。

玻璃化法对于兰科石斛属植物种质是一种非常有效的保存方式，目前已在至少17种(含品种)石斛属植物中开展(表1)，其中种子(9种)、原球茎(6种)、类原球茎(2种)、原生质体(1种)、花粉(3种)。用到的玻璃化溶液主要是PVS2，处理时间和温度因物种而异，目前石斛属种质的处理条件大多为冰上20 min～3 h或室温10 min等。在已开展的石斛属种子玻璃化法超低温保存研究中，鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*)种子冻后恢复萌发率最高为99%，其次为龙石斛(*D. draconis*)95%[21-22]和束花石斛80%[12]。

玻璃化法在石斛属原球茎和类原球茎超低温保存中也已开展一些研究，其中独龙石斛(*D. praecinctum*)原球茎冻后恢复生长率最高为95%[22-23]，其次为铁皮石斛88%[9,11,24]和重唇石斛(*D. hercoglossum*)80%[22-23]。利用25%PVS2将铁皮石斛原生质体冰浴5 min，再用100%PVS2冰浴脱水3 min进行玻璃化处理后超低温保存，荧光染色后恢复生活率为48%[24]。将密花石斛新鲜花粉利用玻璃化法通过PVS2冰上处理1 h后进行超低温保存，其冻后萌发率最高为17.25%[6]；通过PVS2室温(27±2) ℃或冰上3 h处理石斛杂种*Dendrobium* Sena Red和Mini WRL，冻后萌发率＞80%，而且授粉后顺利结实获得高质量种子，其种子活力TTC＞90%[25]。

1.5 小滴玻璃化法

小滴-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后直接投入液氮进行迅速冷冻的方法。在玻璃化法基础上发展起来的小滴玻璃化法，其冷冻和解冻速率更快，组织不易形成冰晶，易成活再生，在植物种质超低温保存技术中具有较好的应用发展前景。目前已有3个石斛品种的原球茎或类原球茎利用小滴玻璃化法开展超低温保存[26-27]。石斛杂种*Dendrobium* Dong Yai原球茎利用小滴玻璃化法处理过程中，添加1%间苯三酚的PVS2冰上处理15min可显著提高原球茎再生率[26]。

1.6 包埋玻璃化法

包埋玻璃化法是包埋干燥法和玻璃化法的结合。利用包埋玻璃化法超低温保存的血色石斛(*D. cruentum*)[28-29]和重唇石斛[21,30]种子冻后萌发率分别为64.7%和萌发率80%；翅萼石斛(*D. cariniferum*)

原球茎利用包埋玻璃化法超低温保存后再生率为15%[31];3种石斛属植物原种和1个品种的类原球茎经包埋玻璃化法超低温保存后再生率最高的为铁皮石斛85%,其次为束花石斛63.2%[32]和金钗石斛50.2%[17]。

2 石斛属种质超低温保存的重要影响因素

2.1 含水量

石斛属植物种质的含水量是影响其超低温保存的一个关键因素,尤其是对于种子的超低温保存。国际上一般以含水量5%~7%作为种子保存的最佳干燥条件[33-34]。不添加保护剂的条件下,含水量高的种子直接储存于液氮,细胞内易出现冰晶而失活[35]。高含水量种子须通过干燥脱水、使用冷冻保护剂等方法来进行超低温保存[36]。

研究发现,不同种类兰科植物的种子对超低温保存要求的最适含水量不同,而且低含水量的种子具有较强的超低温耐性。新鲜的束花石斛种子直接超低温保存后的存活率为零;当脱水至含水量为27.8%时,快速冷冻法存活率提高为52%[37]。铁皮石斛种子含水量降到8.21%~18.79%时,冷冻后种子的萌发率与正常种子没有明显差别[38]。液氮保存和玻璃化法已是实现兰科种子低温保存的重要处理方法[39],应在冷冻保存前确定保藏植物种子的含水量和初始活力。

对于完全耐干燥的种子,成功的冷冻保存是通过将种子干燥到低于其冷冻极限的含水量来实现的[40]。然而,在非常低的含水量下(例如,在大约5%RH下与硅胶平衡),可能存在累积的干燥胁迫,将影响种子在储存过程中的存活率[41]。

2.2 解冻复温

在植物种质超低温保存过程的降温和解冻复温阶段,极易引起冰晶的形成及生长,而冰晶引起的细胞结构破坏是造成细胞死亡的重要原因[42-43]。超低温保存过程中,投入液氮前的系列脱水处理和低温锻炼可将细胞调整至适于液氮保存的含水量和生理状态,最大程度避免冰晶形成,以确保超低温冷冻后植物种质的存活[44-45]。解冻复温环节升温速率不够快,很可能会发生再结晶/重结晶或反玻璃化现象而造成细胞致命伤害。

目前绝大多数兰科石斛属植物组织经超低温保存后经37~40 ℃水浴(或预热的蔗糖溶液)加热约1 min,或在室温下平衡来化冻复温[46]。研究表明,在玻璃化超低温保存过程中的各环节均会对细胞结构造成改变,其中部分细胞的结构改变在再生培养中可以恢复,这是植物在超低温保存后能够再生长的重要条件[47-48];改变的结构不能恢复的细胞即造成破坏或损伤而失去再生活能力。对春石斛类原球茎的超低温保存研究发现,类原球茎的相对存活率在各环节处理后呈不同程度的下降,其中的冷冻-解冻环节是春石斛类原球茎相对存活率下降程度最大的环节之一,类原球茎受到严重的损伤[45]。

解冻复温过程需突破并实现快速、均匀、内外同步复温等关键技术,相对于降温过程而言解冻复温过程更加难以控制[49]。鉴于此,开展超低温保存对石斛属种质恢复生长影响的研究,尤其是降温和复温过程关键技术和参数的优化至关重要。

2.3 保护剂的使用

传统的玻璃化技术是超低温保存高含水量组织的最常用方法[50],将植物组织放入系列浓缩的冷冻保护剂中渗透,可降低细胞内溶质的冻结温度,减少生物材料中可冻的水分含量,抑制冰晶形成和生长[51]。常用的冷冻保护剂主要有加载液和植物玻璃化液(plant vitrification solution,PVS)等,其中加载液主要由培养基中特定比例的甘油+蔗糖组成,PVS一般含有特定浓度/比例甘油、二甲基亚砜、乙二醇和蔗糖等。蔗糖、甘油等常用保护剂的羟基基团,可以帮助在脱水和解冻中稳定膜构象并降低膜相变温度[52],使其即使在种子低温冷冻和干燥失水的情况下,仍可保持蛋白质等细胞大分子结构与功能的完整性[53]。一些冷冻保护剂还具有自由基清除剂作用,表现出抗氧化活性[54]。玻璃化超低温保存石斛种子过程中,PVS2溶液添加1%间苯三酚可显著提高石斛杂种*D.* hybrid 'Dong Yai'种子的恢复萌发率[26]。

但不合理的玻璃化法保护剂浓度和处理时间等均可能对植物组织产生损伤[55]。经玻璃化法超低温保存的石斛种质,经蔗糖溶液多次清洗,可减轻保护剂对细胞的毒害,但这也增加了玻璃化法的技术要求。优化加载液、玻璃化液、保护剂浓度、处理时间等条件参数,有针对性地开展科学合理的玻璃化超低温保存关键技术攻关,对兰科特定物种种质的长期有效保存至关重要。

3 石斛属超低温保存中恢复再生的评价方法

研究发现超低温保存各环节均会对石斛原球茎造成损伤[45],所以评估组织材料在超低温保存过程中受损伤的程度尤为重要。对标分析造成损伤的关键环节及其可能因素,便于进一步优化技术体系。

植物组织在超低温保存后可再生长形成完整植

物是检验超低温保存成功的最终标准[45]。目前,兰科石斛属植物超低温保存后恢复再生的评价方法主要有再生培养法和活力染色法。如鼓槌石斛种子超低温保存后再培养萌发率高达99%,独龙石斛原球茎经玻璃化法超低温保存后恢复萌发率为95%。

目前常用的活力染色法主要有2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色法、伊万思蓝(Even's blue)染色法和二乙酸荧光素(fluorescein diacetate,FDA)染色法。大苞鞘石斛(*D. wardianum*)原球茎超低温保存后经TTC染色存活率为46.6%[56],铁皮石斛原生质体超低温保存后经FDA染色法结果存活率为48%[24],石斛品种*Dendrobium* 'Sonia-28'类原球茎经超低温保存后通过伊万思蓝染色来检测存活率[57],说明染色法可以一定程度评估石斛细胞或组织经超低温保存后的存活的变化规律[45]。也有研究发现,染色法测定的存活率高于培养法统计的再生率,如金钗石斛类原球茎经包埋玻璃化法超低温保存后TTC染色法的存活率为78.1%,高于再生率75.9%[17],石斛品种*Dendrobium* 'Sonia-28'类原球茎经超低温保存后TTC染色率为13.3%,再生率为0%[27]。相对于再培养法,活力染色法虽简单快速,但不能真实反映组织冻后恢复再生长可形成的状态,所以石斛组织经超低温保存后的再生培养仍是检验其存活能力的最可靠标准。

可结合育种实践来检验超低温冻存后组织活力。将石斛杂种*Dendrobium* Sena Red & Mini WRL的花粉经玻璃化法超低温保存后再培养,萌发率大于80%,利用冻后花粉进行授粉后顺利结实并获得高质量种子,其活力(TTC)大于90%[25]。

4 石斛属超低温保存的生化机理

研究发现膜脂过氧化作用是影响大苞鞘石斛原球茎冻后成活的重要生理生化基础,而且显微结构观察发现,淀粉粒和蛋白质的多集中在未受损伤的顶端分生组织中,分布变化和质量分数均呈显著上升后明显下降的单峰变化曲线[56]。在低温条件下,可溶性糖能促使细胞内的水分跨膜外渗,降低胞内含水量[58];而可溶性蛋白质量分数的增加会使细胞内亲水性胶体增加,进而提高植物组织中束缚水的含量,并降低自由水/束缚水的比值[59];在铁皮石斛类原球茎受到严重脱水时,脱水蛋白大量积累[16],以应对环境胁迫。

冷冻前的预处理和脱水可减少细胞内自由水含量,避免胞内结冰引起细胞结构和细胞膜损伤[60],但也会对一定比例的细胞造成伤害。研究发现春石斛类原球茎的超低温保存预处理和解冻升温环节会造成细胞膜结构的改变,甚至是破坏[45]。也有研究发现,在超低温保存大苞鞘石斛原球茎的预处理和脱水过程中细胞膜受到明显破坏[56]。通过观察细胞是否具有完整的细胞膜和结构也是判断组织在超低温保存中细胞改变程度和存活状态的重要方法[45,61]。

多项研究发现,在超低温保存中会产生一系列的活性氧,产生氧化应激等胁迫反应,以损坏细胞膜的完整性,降低植物材料超低温冻存后的存活率[62]。有研究发现添加抗氧化剂或抗应激剂可提高超低温保存种质的成活率。将抗氧化的根皮酚添加到冷冻保护剂中可使金钗石斛原球茎保存后的成活率从31.0%提高到68.0%[63]。在PVS2溶液中添加1%间苯三酚可显著提高石斛杂种*D.* hybrid 'Dong Yai'种子和原球茎的再生率[26]。在春石斛'红梦幻'类原球茎玻璃化法超低温保存过程中导入不同浓度外源抗氧化剂可不同程度地影响冻后存活率,且在去装载时导入400 U/mL过氧化氢酶(catalase,CAT)和0.1 mmol/L抗坏血酸(ascorbic acid,ASA)可提高体内抗氧化酶或非酶等物质的含量,减轻膜脂过氧化程度,提高PLBs冻后存活率[64]。外源乙烯调节剂——乙烯利和硝酸钴通过调节内源乙烯含量而对玻璃化超低温保存的春石斛类原球茎存活率产生显著影响,乙烯不仅参与类原球茎超低温保存中PCD的发生,且对PCD存在负调控;乙烯与H_2O_2在超低温保存中存在互相作用关系,而且H_2O_2和AsA-GSH循环在乙烯调控超低温保存PCD发生中有重要作用[65-66]。

5 展 望

鉴于兰科石斛属植物重要的药用和经济价值,其种质资源保存工作非常重要,国内外研究者已利用多种方法开展多种形式的保存研究,本文综述了已开展的石斛属不同类型种质超低温保存及冻后再生等关键技术,但鉴于物种特异性、不同形式的材料本身的差异性等多种因素,对石斛属植物种质超低温保存工作的研究和探索仍处于起步阶段,亟须从深层次开展多方面研究工作。实现种质资源超低温保存不仅要求保存种质具有较高的生活力,还要求保持该种质的遗传完整性和稳定性,种质保存的目的在于保持其基因的稳定。因此,跟踪研究超低温保存石斛属种质恢复生长后成苗的植物生长状况和遗传稳定性非常重要,深入研究超低温保存对遗传性状的影响,加强冻存机制的分子基础研究,更加深入解析和掌握超低温保存技术,切实做到对兰科石斛属植物种质的长期有效超低温保存。

参考文献

[1] 中国科学院生物多样性委员会. 中国生物物种名录2025版[M]. 北京, 2025.
Chinese Academy of Sciences Biodiversity Committee. List of Chinese Biological Species (2025 edition)[M]. Beijing, 2025.

[2] 姚昕, 兰芹英, 李枝林. 兰科植物种子及圆球茎的超低温保存研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(6): 891-895.
Yao X, Lan Q Y, Li Z L. Advances of cryopreservation of orchid seed and protocorm [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2013, 28(6): 891-895.

[3] Kaur S. Cryopreservation of orchids - a review[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2019, 13(2): 114-123.

[4] Kolomeitseva G L, Nikishina T V, Babosha A V, et al. Morphophysiology and cryopreservation of seeds of *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) at different stages of development[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2022, 44(3):36.

[5] Das M C, Devi S D, Kumaria S, et al. Looking for a way forward for the cryopreservation of orchid diversity [J]. Cryobiology, 2021, 102:1-14.

[6] 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.
Ouyang Y, Li B L, Liu Y. Preservation of *Dendrobium densiflorum* pollen[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(6):151-154.

[7] 王敏瑞, 荆永琳, 陈浪欣, 等. 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[J]. 热带作物学报, 2025, 46(3): 611-628.
Wang M R, Jing Y L, Chen L X, et al. Applications and prospects of cryogenic technology in the conservation of tropical crop germplasm resources[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2025, 46(3): 611-628.

[8] 张治国, 刘骅, 夏志俊, 等. 铁皮石斛种子的超低温保存研究[J]. 安徽中医学院学报, 1997, 16(5): 40-42.
Zhang Z G, Liu H, Xia Z J, et al. Study on cryopreservation of *Dendrobium candidum* seeds[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 1997, 16(5): 40-42.

[9] Wang J H, Ge J G, Liu F, et al. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum* [J]. Cryoletters, 1998, 19(2):123-128.

[10] Pritchard H W, Poynter 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.

[11] 王君晖, 张毅翔, 刘峰, 等. 铁皮石斛种子、原球茎和类原球茎体的超低温保存研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(1): 59-61.
Wang J H, Zhang Y X, Liu F, et al. Cryopreservation of seeds, protocorms and protocorm-like-bodies of *Dendrobium candidum* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26(1): 59-61.

[12] 何明高, 王瑞霞, 宋希强, 等. 束花石斛种子超低温保存的研究[J]. 云南植物研究, 2010, 32(4): 334-338.
He M G, Wang R X, Song X Q, et al. Study on cryopreservation of *Dendrobium chrysanthum* (Orchidaceae) seeds [J]. Plant Diversity, 2010, 32(4): 334-338.

[13] 耿丽霞. 铁皮石斛试管开花、种子保存及杂交种鉴定的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2015.
Geng L X. Research on the *in vitro* flowering of *Dendrobium candidum*, seed preservation, and identification of hybrid varieties[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2015.

[14] Popova E, Kim H H, Saxena P K, et al. Frozen beauty: the cryobiotechnology of orchid diversity[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(4): 380-403.

[15] Bian H W, Wang J H, Lin W Q, et al. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum*by the air-drying method[J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(10): 1139-1145.

[16] 林伟强, 边红武, 王君晖, 等. 铁皮石斛类原球茎空气干燥法超低温保存中的脱水蛋白分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 64-68.
Lin W Q, Bian H W, Wang J H, et al. Analysis of dehydrins in cryopreservation of protocorm-like-bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31(1): 64-68.

[17] Mohanty P, Das M C, Kumaria S, et al. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2012, 109(2): 297-305.

[18] Bunnag S, Maneerattanarungroi P, Sumanagul A. Effect of sucrose and ABA on survival rate of cryopreserved protocorms of *Dendrobium gratiosissimum*, Rchb. f.[J]. Agriculture and Natural Resources, 2009, 43:245-253.

[19] Lurswijidjarus W, Thammasiri K. Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium* Walter Oumae by encapsulation/dehydration [J]. ScienceAsia, 2004, 30(3): 293-299.

[20] Jitsopakul N, Sangyojarn P, Homchan P, et al. Efficiency of aluminum cryo-plates for cryopreservation of *Dendrobium signatum* Rchb. f. *pollinia*[J]. Acta Hor-

ticulturae, 2019(1234): 279-286.

[21] Thammasiri K. Conservation of some endangered Thai orchid species using cryopreservation[J]. Acta Horticulturae, 2022(1334): 163-170.

[22] Thammasiri K. Conservation of some endangered Thai orchid species using cryopreservation methods[J]. Journal of the Orchid Society of India, 2022, 36(1/2): 51-58.

[23] Thammasiri K. Cryopreservation of some Thai orchid species[J]. Acta Horticulturae, 2008(788): 53-62.

[24] 陈勇, 王君晖, 黄纯农. 铁皮石斛种质资源的玻璃化法超低温保存[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(4): 436-438.
Chen Y, Wang J H, Huang C N. Germplasm cryopreservation of *Dendrobium candidum* by vitrification [J]. Journal of Zhejiang University, 2001, 27(4): 436-438.

[25] Vendrame W A, Carvalho V S, Dias J M M, et al. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen[J]. HortScience, 2008, 43(1): 264-267.

[26] Galdiano R F, Lemos E G M, Faria R T, et al. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000 [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 148: 154-160.

[27] Poobathy R, Izwa N, Julkifle A, et al. Cryopreservation of *Dendrobium* Sonia-28 using an alternative method of PVS2 droplet freezing[J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2013, 25(7): 531.

[28] Prasongsom S, Thammasiri K, Narangajavana J, et al. Vitrification-based cryopreservation of *Dendrobium cruentum* Rchb. f. seeds[J]. Acta Horticulturae, 2019 (1234): 157-166.

[29] Prasongsom S, Thammasiri K, Narangajavana J, et al. Cryopreservation of *Dendrobium cruentum* Rchb. f. seeds by D cryo-plate and V cryo-plate techniques[J]. Walailak Journal of Science and Technology (WJST), 2019, 17(3): 181-191.

[30] Sheranaravenich K. Cryopreservation of seeds of *Dendrobium hercoglossum* Rchb. F. by vitrification[D]. Bangkok: Mahidol University, 2002.

[31] Pornchuti W, Thammasiri K. Cryopreservation of protocorms of *Dendrobium cariniferum* Rchb. f[J]. Acta Horticulturae, 2008(788): 63-68.

[32] Mohanty P, Das M C, Kumaria S, et al. Cryopreservation of pharmaceutically important orchid *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. using vitrification based method [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35 (4): 1373-1379.

[33] Vishwakarma P K, Vincent L, Vasugi C, et al. Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species[J]. Cryobiology, 2021, 98: 112-118.

[34] Santana B Í D, Paiva R, dos Reis M V, et al. Seed cryopreservation without vitrification (PVS2) induces oxidative stimuli to promote endoreplication in red pitaya seedlings[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2023, 156(1): 11.

[35] Hartati S, Muliawati E S, Pardono P, et al. Morphological characterization of *Coelogyne* spp. for germplasm conservation of orchids [J]. Revista Ceres, 2019, 66(4): 265-270.

[36] Diantina S, McGill C, McCormick A C, et al. Comparative seed cryopreservation of Indonesian and New Zealand epiphytic and terrestrial orchids[J]. Cryoletters, 2023, 44(4): 197-207.

[37] 史永忠, 潘瑞炽, 王小菁, 等. 铁皮石斛种质资源的低温离体保存[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(4): 326-330.
Shi Y Z, Pan R C, Wang X J, et al. *In vitro* conservation of *Dendrobium officinale* at low temperature[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2000, 6(4): 326-330.

[38] 张治国, 刘骅, 夏志俊, 等. 铁皮石斛种子的超低温保存[C]//中国植物生理学会全国学术年会暨成立40周年庆祝大会论文集. 杭州, 2003: 176.
Zhang Z G, Liu Y, Xia Z J, et al. Cryopreservation of seeds of *Dendrobium officinale*[C]//. Abstracts of Academic Papers from the National Academic Conference of the Chinese Society for Plant Physiology and the 40th Anniversary Celebration Conference. Hangzhou, 2003: 176.

[39] DJAMâ € ™ AN D F, Priadi D, Sudarmanowati E. Cryopreservation of dammar (*Agathis damara* Salisb.) seeds in liquid nitrogen[J]. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 2016, 7(2): 164-167.

[40] 刘燕, 周慧, 方标. 园林花卉种子超低温保存研究[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 39-44.
Liu Y, Zhou H, Fang B. Cryopreservation of seeds of ornamental plants[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2001, 23(4): 39-44.

[41] 王荷, 刘燕. 25种野生花卉种子超低温保存研究[J]. 种子, 2011, 30(4): 80-82.
Wang H, Liu Y. Study on cryopreservation of 25 kinds of wildflower species seeds[J]. Seed, 2011, 30(4): 80-82.

[42] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications [J]. American Journal of Physiology-Cell

Physiology, 1984, 247(3): C125-C142.

[43] 赵刚, 周学迅, 高大勇. 细胞低温保存原理与进展[J]. 中国科学(生命科学), 2024, 54(6): 1109-1128.
Zhao G, Zhou X X, Gao D Y. Principles and advances of cell cryopreservation[J]. Science in China (Series C), 2024, 54(6): 1109-1128.

[44] Sakai A, Yoshida S. Survival of plant tissue at super-low temperature Ⅵ. Effects of cooling and rewarming rates on survival[J]. Plant Physiology, 1967, 42(12): 1695-1701.

[45] 狄玮. 春石斛'红梦幻'类原球茎玻璃化超低温保存中损伤机制的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
Di W. Study on the damage mechanism of *Dendrobium nobile* Lindl.' Hamana lake dream' protocorm-like bodies during vitrification-cryopreservation [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018.

[46] Banasiak M, Snyman S J. Exploring *in vitro* germplasm conservation options for sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in South Africa[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2017, 53(4): 402-409.

[47] Helliot B, Swennen R, Poumay Y, et al. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(7): 690-698.

[48] 蔡祖国, 徐小彪, 赵一鹏, 等. 猕猴桃茎尖超低温保存过程中超微结构观察[J]. 西北植物学报, 2006, 26(8): 1600-1604.
Cai Z G, Xu X B, Zhao Y P, et al. Ultrastructure of *in vitro* stem apex of kivi in cryopreservation[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(8): 1600-1604.

[49] Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure[J]. Cryobiology, 2009, 59(1): 75-82.

[50] Dolce N R, González-Arnao M T. Cryopreservation as a tool for long-term storage of *Cohniella cepula* (Orchidaceae) seeds[J]. Acta Horticulturae, 2020(1297): 113-120.

[51] 杨海平, 咸洋, 韩彪, 等. 林木顽拗性种子研究进展[J]. 山东林业科技, 2021, 51(5): 88-94.
Yang H P, Xian Y, Han B, et al. Research progress on recalcitrant seeds of forest trees[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2021, 51(5): 88-94.

[52] Fu Y B, Peterson G W, Horbach C. Deleterious and adaptive mutations in plant germplasm conserved *ex situ* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2023, 40(12): msad238.

[53] Chang L, Shepherd D, Sun J, et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 94(7): 1427-1444.

[54] Pence V C, Clark J R. Desiccation, cryopreservation and germination of seeds of the rare wetland species, *Plantago cordata* Lam[J]. Seed Science and Technology, 2005, 33(3): 767-770.

[55] 李伟平. 新型白及组培快繁体系的建立及总酚含量测定研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2013.
Li W P. The establishment of new tissue culture propagation system and determination of total phenolic content of *Bletilla sfriata* (Thunb.) Reiehb. F [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2013.

[56] 刘晓东, 李晓丹, 吴元玲, 等. 大苞鞘石斛原球茎超低温保存中生理生化变化[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(7): 79-84.
Liu X D, Li X D, Wu Y L, et al. Physiological and biochemical characteristics of *Dendrobium wardianum* protocorms during cryopreservation [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2013, 41(7): 79-84.

[57] Pouzi N Z, Xavier R, Antony J J J, et al. Early investigation on cryopreservation of *Dendrobium* Sonia-28 using encapsulation-dehydration with modified Evan blue assay[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(18):3534-3539.

[58] Crowe J H, Crowe L M, Carpenter J F, et al. Interactions of sugars with membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1988, 947(2): 367-384.

[59] Koster K L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds[J]. Plant Physiology, 1991, 96(1): 302-304.

[60] 李广武. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998.
Li G W. Cryobiology[M]. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 1998.

[61] 曾继吾, 易干军, 张秋明, 等. 番木瓜茎尖超低温保存过程中的细胞超微结构[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 15-19.
Zeng J W, Yi G J, Zhang Q M, et al. Cell ultrastructure of *Papaya* shoot-tip during cryopreservation [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(1): 15-19.

[62] Uchendu E E, Leonard S W, Traber M G, et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(1): 25-35.

[63] Lyons J M. Chilling injury in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1973, 24: 445-466.

[64] 狄玮，贾梦雪，刘燕. 外源抗氧化剂对春石斛类原球茎超低温保存的影响[J]. 植物生理学报，2015，51(11)：1880-1886.
Di W，Jia M X，Liu Y. Effects of exogenous antioxidants on cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* [J]. Plant Physiology Journal，2015，51(11)：1880-1886.

[65] 张玲玲，任瑞芬，姜雪茹，等. 乙烯对春石斛类原球茎玻璃化超低温保存存活率的影响[J]. 北京林业大学学报，2021，43(6)：101-107.
Zhang L L，Ren R F，Jiang X R，et al. Effects of ethylene on the viability of cryopreserved *Dendrobium* protocorm-like bodies[J]. Journal of Beijing Forestry University，2021，43(6)：101-107.

[66] Zhang L L，Ren R F，Jiang X R，et al. Exogenous ethylene increases the viability of cryopreserved *Dendrobium* protocorm-like bodies by regulating the hydrogen peroxide and its mediated oxidative stress [J]. Plant Cell，Tissue and Organ Culture (PCTOC)，2021，145(1)：19-27.

[67] Kagawa K. Cryopreservation of *Dendrobium cruentu*m Rchb. F. [D]. Bangkok：Mahidol University，2006.

[68] Ishikawa K，Harata K，Mii M，et al. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification [J]. Plant Cell Reports，1997，16(11)：754-757.

[69] Witaya Pimda and Sumontip Bunnag. Cryopreservation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. via encapsulation-dehydration method[J]. Extreme Life，Biospeology & Astrobiology，2010，2(1)：7.

[70] Maneerattanarungroj P. Cryopreservation of *Dendrobium virgineum* Rchb. f. using an encapsulation-dehydration method[C]. Proceedings of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand，2009.

[71] Vendrame W A，Faria R T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms [J]. Scientia Horticulturae，2011，128(2)：131-135.

[72] 吴元玲，申晓辉. 大苞鞘石解原球茎玻璃化超低温保存技术的研究[J]. 中国细胞生物学学报，2011，33(3)：279-287.
Wu Y L，Shen X H. Cryopreservation of *Dendrobium wardianum* Warner. protocorms by vitrification [J]. Chinese Journal of Cell Biology，2011，33(3)：279-287.

[73] Yin M H，Hong S R. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification[J]. Plant Cell，Tissue and Organ Culture (PCTOC)，2009，98(2)：179-185.

[74] Ching L P，Antony J J J，Poobathy R，et al. Encapsulation-vitrification of *Dendrobium* Sonia-28 supported by histology[J]. Plant Omics，2012，5(4)：345-350.

[75] Poobathy R，Sinniah U R，Mahmood M，et al. Refinement of a vitrification protocol for protocorm-like bodies of *Dendrobium* Sonia-28[J]. Turkish Journal of Botany，2013，37：940-949.

[76] Poobathy R，Xavier R，Sinniah U R，et al. Molecular stability of protocorm-like bodies of *Dendrobium sonia*-28 after encapsulation-dehydration and vitrification[J]. Australian Journal of Crop Science，2013，7：189-195.

[77] Subramaniam S，Sinniah U R，Khoddamzadeh A，et al. Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium* Sonia-17 protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique [J]. African J Biotechnol，2011，10(19)：3902-3907.

[78] Antony J J J，Keng C L，Mahmood M，et al. Effects of ascorbic acid on PVS2 cryopreservation of *Dendrobium* Bobby Messina's PLBs supported with SEM analysis [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2013，171(2)：315-329.

[79] Antony J J J，Ahmad Mubbarakh S，Mahmood M，et al. Effect of plasmolysis on protocorm-like bodies of *Dendrobium* Bobby Messina orchid following cryopreservation with encapsulation - dehydration method [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2014，172(3)：1433-1444.

[80] Antony J J J，Keng C L，Rathinam X，et al. Preliminary study on cryopreservation of *Dendrobium* Bobby Messina protocorm- like bodies by vitrification[J]. African Journal of Biotechnology，2010，9(42)：7063-7070.