

## 고구마 품종 '율미' 배발생 캘러스의 초저온 동결보존

박종숙, 김석원<sup>1</sup>, 인동수<sup>2</sup>, 은종선\*

전북대학교 농과대학 생물산업연구소, <sup>1</sup>한국생명공학연구원 생물자원센터, <sup>2</sup>(주)유진텍

### Cryopreservation of Embryogenic Callus in Sweetpotato cv. 'Yulmi'

Jong-Suk Park, Suk-Weon Kim<sup>1</sup>, Dong-Su In<sup>2</sup>, Jong-Seon Eun\*

Research Institute of Bioindustry, College of Agriculture, Chonbuk National University, Jeonju 561-756

<sup>1</sup>Bioresources Center and <sup>2</sup>Eugentech Inc., KRIBB, Oun-dong 52, Yusong, Daejeon 305-333, Korea

**ABSTRACT** Cryopreservation of embryogenic callus derived from apical meristem culture was attempted by slow prefreezing method (two-step method) with various cryoprotectants in sweetpotato cv. 'Yulmi'. Precultured embryogenic calli on medium containing 10 mg/L ABA prior to slow prefreezing in liquid nitrogen indicated higher survival rate than 1.0 mg/L ABA pretreatment. The cryoprotectant comprising 1.28 M DMSO in 0.4 M sucrose solution gave the best survival (over 46%) of sweetpotato cells exposed to liquid nitrogen as determined by TTC reduction and FDA staining method. Cryopreserved calli cultured on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D were grown for 4 weeks in the dark and induced embryos after another 4 weeks. They were subcultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L kinetin for 2 weeks and regenerated into normal plantlets in MS basal medium.

**Key words:** Cryoprotectant, liquid nitrogen, slow prefreezing method

#### 서 론

고구마 (*Ipomoea batatas* Lam.)는 세계적으로 중요한 작물로서 그 유전자원은 주로 영양번식에 의해 포장에서 혹은 기내배양에 의해 보존되고 있으나 이 방법은 장기간 보존에는 적합하지 않고 많은 비용과 노동력을 필요로 하기 때문에 영양번식작물의 유전자원보존에 있어서 기내보존법에 관한 중요성에 대한 인식이 날로 증가하고 있으며 다양한 방법과 기술들이 연구되고 있다. 동결보존에 가장 적합한 식물재료는 정단분열조직인데 그 이유는 기관분화가 이루어지지 않은 캘러스나 현탁배양계에 비해 유전적으로 상당히 안정되어 있고 상대적으로 쉽게 식물체가 재생되기 때문이다. 그러나 일부 식물 종에 있어서 정단분열조직배양을 쉽게 이용할 수 없거

나 기술면에서 어려운 것으로 판명될 때 배발생 조직이나 체세포배가 대체방법으로 사용될 수 있으며, 이런 조직은 캘러스나 현탁배양계보다 유전적으로 훨씬 안정적이다. 또한, 배발생 조직은 흔히 형질전환에 사용되고, 합성종자 기술과 미세번식이 가능하며, 세포주에 배발생능과 유전적 안정성을 유지할 수 있는데, 장기간 저장할 때는 매우 노동 집약적이기 때문에 배발생 조직에 대한 동결보존에 관한 연구는 매우 중요하다.

최근 초저온냉동 기술은 세포, 원형질체, 분열조직, 배, 캘러스 등 다른 종류의 식물 재료를 이용하여 괄목할 만한 진보를 보였는데 열대, 아열대 작물의 동결보존에 관한 연구는 내한성 작물에 비해 적으며 열대작물기원의 44종이 액체질소 (-196°C)에 저장, 동결보존되었다 (Engelmann 1991). 식물조직의 일반적인 동결보존법은 sample 내로 동결보호제를 침투시키는 것을 기본으로 하여, 세포 내 수분을 감소시키고 세포 내의 용질의 농도를 향상시키며, 프로그램 동결기를 이용하여 세포 외 동결을 시켰으나, 동결보호제의 농도, 조합과 형태가

\*Corresponding author Tel 063-270-2576 Fax 063-270-2581

E-mail jseun@moak.chonbuk.ac.kr

각 식물 재료에 따라 결정되어야 하는 복잡한 문제를 안고 있다 (Sakai 1985).

고구마에 있어서 동결보존에 관한 연구는 건조 단계를 이용한 체세포배의 동결 (Yoshinaga and Yamakawa 1994), 캡슐법을 이용한 배발생 조직의 동결 (Bhatti et al. 1997), sucrose 전처리와 탈수를 병행한 캡슐화하지 않은 배발생 조직을 이용한 급속동결방법 (Blakesley et al. 1996), 프로그램 동결기를 이용하여 냉동시킨 후 액체질소에 저장하는 완만동결법에 의한 체세포배의 동결 (Shimonishi et al. 2000), PVS II 용액 (Sakai et al. 1990)을 이용한 vitrification에 의한 기내 식물체의 경정조직의 동결 (Pennycooke and Towill 2000) 등이 보고되고 있다.

본 연구에서는 고구마 품종 '율미'의 정단분열조직배양을 통한 배발생캘러스를 이용하여 ABA의 전처리 효과, 동결보호제의 종류와 적합한 농도를 구명하여 유전자원의 기내 장기보존체계를 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

고구마 품종 '율미'에서 1매의 엽원기가 부착된 정단분열조직을 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 6주일간 암배양한 후 발생한 배발생 캘러스를 4주일 간격으로 계대배양하여 재료로 사용하였다.

### 전처리

ABA의 전처리 효과를 조사하기 위해 배발생 캘러스를 0, 1, 10 mg/L ABA가 함유된 MS액체배지에서 배양하였으며, 동결보호제를 달리한 실험에서 전처리 효과가 가장 좋았던 ABA 10 mg/L가 함유된 MS액체배지에 3일 동안 암상태에서 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 배양하였다.

### 동결보호제처리

전처리된 현탁배양 캘러스를 conical tube에 5 mL씩 담고 ABA 용액을 제거한 후 미리 차갑게 해 놓은 동결보호제를 각각 1 mL씩 cryovial에 재빨리 넣고 얼음 위에서 30분간 저온배양하였다. ABA의 전처리 효과를 조사한 실험에서 동결보호제는 0.4 M sucrose를 포함하는 MS배지에 0, 1, 3, 10, 30% DMSO의 농도를 사용하였으며, 전처리로 ABA 10 mg/L를 처리한 경우는 동결보호제로 0.4 M sucrose를 포함하는 MS배지에 각각 0.54, 1.08, 1.62, 2.0 M glycerol과 0.64, 1.28, 2.0 M DMSO, 2.0 M DMSO+0.54 M glycerol, 2.0 M glycerol+0.64 M DMSO를 사용하였으며, 용액의 pH는 5.8로 조정하

였고 모두 여과멸균한 후 사용하였다. 또한 DMSO의 독성효과를 알아보기 위해 캘러스를 동결 처리하지 않고 4.0 M DMSO에 40분간 저온 배양하여 생존율을 조사하였다.

## 동결과 해동

동결보호제 처리 후 cryovial을 parafilm으로 밀봉한 후 동결기 (cryomed model 1010 micro computer programmable freezer unit)에 넣고  $-40^\circ\text{C}$ 까지 1분당  $1^\circ\text{C}$ 씩 동결시킨 후 45분간  $-40^\circ\text{C}$  상태로 유지시킨 다음 액체질소통에 넣었다. 액체질소 속에 3일간 보존시킨 후 캘러스를 꺼내어  $40^\circ\text{C}$ 의 수조에 약 1분간 급속 해동하였다. 배양세포가 vial의 바닥에 침전되도록 방치한 다음 상등액을 제거한 후 세포를 고체배지에 옮겨주었으며, 동결보호제 용액은 멸균된 여과지를 이용하여 제거하였다. 1시간 경과 후 세포증식배지인 1.0 mg/L 2,4-D가 함유된 MS 배지에 옮겨주었다.

## 생존율 조사

세포의 생존율은 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reduction 분석방법을 사용하였다. 세포를 0.18 M TTC 용액에 침지하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 16시간 처리한 다음 여과지위에 plating한 후  $1\text{ cm}^2$  안의 세포괴 중 적색으로 착색된 개체 수를 육안으로 식별하여 전체에 대한 백분율로 3반복씩 계산하였다 (Steponkus and Lanphear 1967). 또한, 미세한 세포의 생존율 조사는 fluorescent diacetate (FDA)를 이용하여 (Kantha 1981) 형광현미경 (Olympus, BX50-FLA)에 UV과장 (excitation: B, cube: U-MWB, dichroic mirror: DM500, exciter filter: BP 450-480 nm, barrier filter: BA515)을 이용, 검경하여 생존을 확인하였다. 각 처리구별로 해동된 세포괴를 FDA ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 용액 20  $\mu\text{g}$ 과 혼합한 후 30분 동안 eppendorf tube에서 침지시킨 다음, 증류수로 세척, 형광현미경을 이용하여 형광의 녹색 세포괴를 식별하여 생존여부를 확인하였다. 동결보존된 캘러스로부터 식물체를 재생시키기 위하여 온수에 급속해동시킨 캘러스를 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에서 6~8주일간 암배양 후 0.1 mg/L 2,4-D와 kinetin 혼용구에 2주일간 계대배양하고 MS기본배지로 옮겨 생장상태를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### ABA 전처리 효과

배발생 캘러스를 ABA 무처리와 1, 10 mg/L ABA가 함유된 액체 MS배지에서 3일간 전처리한 후 0.4 M sucrose가 함유된 DMSO 0, 1, 3, 10, 30%를 처리한 다음 2단계 냉동과정을 걸쳐 생존율을 조사하였다. 생존율 조사를 위해 TTC reduction

방법과 FDA 방법을 사용하였는데, 그 결과 DMSO 10%가 첨가된 처리구에서만 생존한 세포괴를 확인할 수 있었으며, DMSO 0, 1, 3, 30% 첨가구에서는 전처리와 무관하게 모든 캘러스가 죽었다. 10% DMSO가 첨가된 경우 ABA 전처리 효과는 10 mg/L가 함유된 배지에서 초저온냉동 후 54.0%의 생존율을 보여 가장 좋았으며, ABA 1 mg/L 전처리에서 34.7%, ABA 무처리에서 30.0%를 보였다 (Figure 1).

동결보존을 위한 전처리 효과에 관한 연구는 Shimonishi 등 (1993)이 토란의 배발생 캘러스를 10 mg/L ABA, 0.5 M proline, 1 mM proline + 1 mg/L ABA 혼합처리, 무처리의 4가지 전처리를 한 다음 동결보호제로는 10% sucrose + 10% DMSO + 5% glycerol를 사용하였으며 동결보존 후 전처리를 하지 않은 무처리구는 40% 정도 생존, proline의 경우는 75% 이상, ABA 전처리는 40% 미만, proline + ABA 혼합처리는 0%의 생존율을 보여 proline 0.5 M의 전처리 효과가 있음을 보고하였다. Hirata 등 (1998)은 겨자무 (*Armoracia rusticana*)의 실뿌리 배양에서 2  $\mu$ M ABA 전처리로 냉동한 후 약 60% 재생률을 보였다. 또한, 좁은잎 빈카 (*Vinca minor*)의 실뿌리배양에서 10  $\mu$ M ABA + 0.3 M sucrose 1일 전처리로 encapsulation-dehydration 방법에 의한 초저온냉동 후 70%의 생존율을 보였으며, 0.3 M sucrose과 0.5 M glycerol 전처리에서는 생존율이 10% 정도로 저조하여 ABA 전처리 효과가 뛰어난 것을 보고하였다 (Hirata et al. 2002).

Shimonishi 등 (2000)은 고구마의 체세포배를 이용한 prefreezing method에서 5~10 mg/L ABA에 전처리된 체세포배는 대체적으로 80%이상의 생존율을 보여 ABA 전처리 효과가 있음을 보고하였다. 또한 proline의 전처리 효과는 없으며, ABA 전처리 기간은 3일이나 6일에 차이가 명확하지 않았다고 하였다 (Shimonishi 1996). ABA와 같은 전처리와 단순한 건조방법은 동결보존 중 치명적인 세포 내 결빙을 막는 또 다른 효과적 방법으로서 전처리된 식물재료가 액체질소에 의한 상해를 덜 받으며, 동해 내성이 생기고, ABA 전처리 후

건조방법은 용질 축적을 증가시킴으로써 세포 내 동결을 피할 수 있게 해주는 역할을 한다.

본 실험에서도 ABA 전처리 효과를 알아보기 위하여 동결보호제로 10% DMSO를 사용하고 0~10 mg/L ABA를 처리한 결과, 다른 연구 보고와 마찬가지로 ABA 전처리 효과가 있음을 알 수 있었는데 무처리구와 1 mg/L ABA 처리구보다 10 mg/L ABA 처리구에서 가장 생존율이 높았다.

#### Sucrose와 동결보호제의 효과

배발생 캘러스를 10 mg/L ABA가 함유된 액체 MS배지에서 3일간 전처리한 후 0.4 M sucrose가 함유된 동결보호제 0.54, 1.08, 1.62, 2 M glycerol과 0.64, 1.28, 2 M DMSO의 단용처리, 2 M DMSO + 0.54 M glycerol, 2 M glycerol + 0.64 M DMSO 혼용처리를 한 다음 2단계 냉동과정을 걸쳐 생존율을 조사하였다.

먼저 동결보호제의 영향을 조사하기 위하여 2단계 냉동과정 없이 4.0 M DMSO에 40분간 처리한 후 TTC 방법에 의해 생존율을 확인한 결과 76.9%의 높은 생존율을 얻어 동결보호제의 해가 없는 것으로 판단되었다. 동결보존 후 해동된 배발생 캘러스를 증식에 적합한 배지인 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에 치상한 다음 암배양 후 변화를 조사한 결과 TTC reduction 방법에서 가장 높은 생존율을 보인 1.28 M DMSO 단독처리구에서 캘러스의 증식이 가장 활발하였다.

미세한 세포의 생존을 조사는 FDA를 이용하여 형광현미경에 UV과장을 이용하여 형광의 녹색 세포괴를 육안으로 식별하여 생존을 확인하였다 (Figure 2-A, B). 0.4 M sucrose와 0.54 M glycerol이 첨가된 처리구는 100% 세포가 죽어서 동결보호제로서 적합하지 못하였다. 모든 농도에서 glycerol 처리구는 생존율이 0~7.5%이었는데 DMSO가 첨가된 처리구는 생존율이 14.9~46.8%로 높아서 동결보호제로서 더 효과적이었다. 특히 1.28 M DMSO 단독처리구와 2 M glycerol + 0.64 M DMSO 혼용처리구에서 46.8%와 46.5%의 비교적 높은 생존율을 보였다 (Table 1).

동결 후 급속해동시킨 배발생 캘러스를 증식배지인 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에서 암배양한 결과 배양 4주일 후부터 1.28 M DMSO 단독처리구에서 캘러스가 자라나는 것을 육안 관찰할 수 있었으며 (Figure 2-D), 배양 8주일 후에는 배발생캘러스가 발생하였으며 (Figure 2-E), 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin 혼용구에 2주일간 계대배양한 다음 MS기본배지에서 정상적인 shoot로 발달하였다 (Figure 2-F).

Blakesley 등 (1996)도 고구마의 배발생 조직을 sucrose 전처리와 여러 가지의 dehydration 방법에 의해 급속 냉동저장하였는데, 전처리로 0.4 M 또는 0.7 M sucrose 단용처리 후 50%까지 생존하였으며, 실리카겔을 이용한 탈수에 의해 함유량을 18~41% 범위로 유지하여 동결보존한 다음 생존율을 증가시켰다.

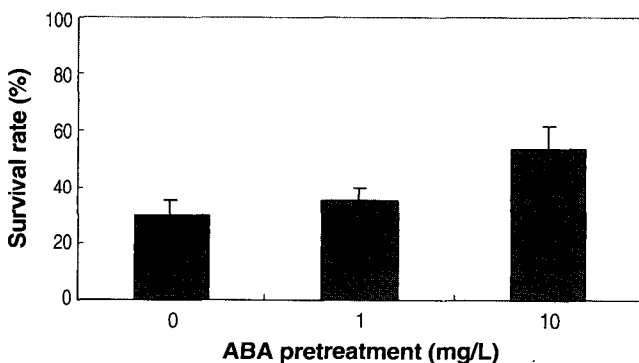
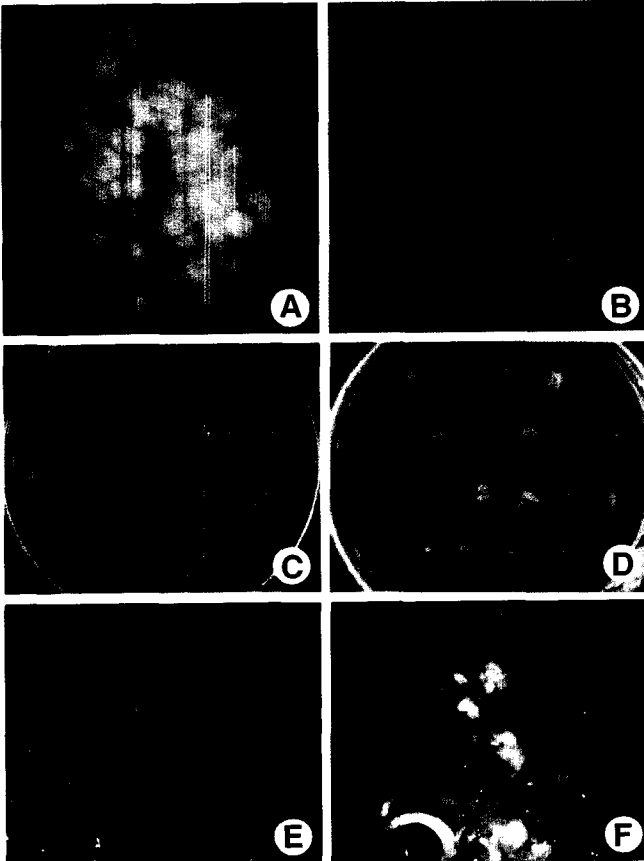


Figure 1. Effects of ABA pretreatment with 10% DMSO on the survival rate of embryogenic callus by TTC reduction method after cryopreservation. Vertical bars represent mean  $\pm$  SE of 3 replicates.

동결보존에 있어서 sucrose는 osmotic dehydration의 유도뿐만 아니라 배발생 조직에 의해 흡수되어 원형질의 유지와 내부 막의 보존 역할을 하는 것으로 보고 있다 (Plessis et al. 1993). Blakesley 등 (1995)은 고구마의 배발생조직을 이용하



**Figure 2.** Cryopreservation of embryogenic callus. A, FDA test, live clump; B, dead clump after cryopreservation; C, non-cryopreserved callus; D, cryopreserved callus by 1.28 M DMSO cultured on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D for 8 weeks; E, F, somatic embryos and shoot formation from cryopreserved embryogenic callus.

**Table 1.** Effects of cryoprotectant on the survival rate of embryogenic callus by TTC reduction method in sweetpotato.

Treatment	Survival rate (%)
Control <sup>a</sup>	100±0 <sup>b</sup>
0.40 M sucrose	0
0.54 M glycerol	0
1.08 M glycerol	4.3±2.1
1.62 M glycerol	7.4±1.6
2.00 M glycerol	7.5±2.2
0.64 M DMSO	14.9±2.0
1.28 M DMSO	46.8±4.2
2 M DMSO	19.5±2.2
2 M DMSO + 0.54 M glycerol	22.1±1.5
2 M glycerol + 0.64 M DMSO	46.5±7.8

<sup>a</sup>Control: no freezing. <sup>b</sup>Values represent the mean ± SE.

여 sucrose와 탈수방법으로 동결보존을 실시하였는데, 2단계 동결은 급속동결에 비해 훨씬 효과적이었으며, 계통 'TIB 10'에서는 0.1 M sucrose 3일, 0.4 M에서 3일, 0.7 M에서 7일 전처리 후 탈수 4시간 후에 0.1 M sucrose에 옮기기 전 0.7 M sucrose에 1일, 0.4 M에 2일간 처리한 다음 alginate encapsulation 후 동결방법으로는 2단계 동결에서 배발생 조직이 74.1%, 비배발생조직이 35.9%로 모두 생존하였다고 보고하였다.

동결보존의 동결속도에 있어서 급속동결과 2단계 동결방법이 있는데 냉각속도가 생존율에 중요한 영향을 미쳐 식물 종류나 재료에 따라 효과에 차이가 있다. 배양된 식물세포나 분열조직은 적합한 동결보호제가 처리될 때 액체질소에 담기 전에 약 -40°C까지 0.5~1.0°C/min로 천천히 냉동하고 동결보존 후 빠르게 해동되면 높은 수준의 생존율을 보인다고 하였다. 그러나, 완만한 동결은 시간이 많이 걸리므로 민감한 동결기를 필요로 한다. Ishikawa 등 (1996)은 bromegrass의 현탁배양 세포를 이용하여 동결보존을 하였는데, 동결보호제로 CSP I (10% DMSO, 10% sucrose, 5% glycerol)을 사용하여 -8°C와 -12°C에 바로 노출시킨 후 0.3~0.5°C/min으로 -30°C까지 동결하여 액체질소에 저장하였는데, 생존율이 80% 이상을 나타냈다. 온도 25°C에서 CSP I 용액에 30분간 처리한 후 PVS II 용액에 2~4분 노출시키고 액체질소에 저장하여 생존율을 조사한 결과 30~40%의 생존율을 보여 2단계방법에 비해 효과적이지 못하였으며, CSP I 용액 처리없이 바로 PVS II 용액에 처리한 후 액체질소에 냉동시킨 경우 bromegrass는 생존하지 못했다고 보고하였다. Shimonishi 등 (1993)은 토란의 배발생 캘러스를 동결보호제를 사용하여 -30°C까지 0.5°C/min으로 완만하게 예비동결한 후 액체질소에 저장하여 75% 이상의 생존율을 얻었다고 하였다.

초저온에 동결보존된 식물재료는 비교적 높은 온도인 37~40°C의 온수에서 급속해빙 시키는 것이 생존력 유지에 효과적이라고 하였으며, 완만한 해빙과정을 거치게 되면 세포가 재결빙될 위험성이 높아지기 때문에 오히려 급속 해빙이 유리하다고 하였다 (Withers and Street 1977). 해빙된 조직의 동결보호제를 살균수로 직접 세척하게 되면 오히려 세포의 탈원형질분리 장애를 조장시킬 수도 있어서 액체배지로 희석시켜가면서 배양하는 것이 좋으며, 배지 내에 sorbitol과 같은 삼투압조절물질을 첨가하면 더욱 효과적이라고 하였다.

본 연구에서도 다른 연구 결과에서 전처리 효과가 좋은 것으로 나타난 10 mg/L의 ABA를 배발생 캘러스의 동결보존에 사용하였을 때 가장 효과가 좋았으며, 0.3°C/min 조건으로 -30°C까지 냉동시킨 후 액체질소에 저장하여 80% 이상의 생존율을 보인 Shimonishi 등 (2000)의 연구에서보다는 저조하였으나, 동결보호제로 0.4 M sucrose가 첨가된 1.28 M DMSO 처리구에서 동결 후 재생률이 46.8%로 가장 높게 나타났으며 DMSO와 glycerol 단용처리에서 glycerol 단용처리보다 DMSO 단용처리가 효과적인 결과를 보여 DMSO를 이용한 고구마의 배발생 캘러스의 초저온보존방법은 유전자원의 효

올적인 보전방법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 적 요

고구마 품종 '율미'를 이용해 2,4-D 1.0 mg/L가 첨가된 MS 배지에 정단분열조직배양을 통하여 발생된 배발생 켈러스를 실험재료로 여러 가지 동결보호제를 처리하여 2-step method에 의해 동결보존을 실시하였다. ABA 10 mg/L가 포함된 배지에서 전처리된 배발생 켈러스는 ABA 1.0 mg/L 처리구보다 액체질소에 저장 후 생존율이 더 높게 나타났다. TTC방법과 FDA 염색법을 통해 초저온 보존 후에 생존을 확인한 결과 10 mg/L의 ABA를 전처리 한 0.4 M sucrose가 포함된 1.28 M DMSO 처리구에서 46.8%의 가장 높은 생존율을 나타냈다. 켈러스를 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에서 암배양한 결과 배양 4주일 후부터 1.28 M DMSO 단독처리구에서 켈러스가 생장하는 것을 육안 관찰할 수 있었으며 배양 8주일 후에는 배가 발생하였고, 0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L kinetin 혼용구에 2주일간 계대배양한 다음 MS기본배지에서 완전한 식물체로 재생되었다.

사사 - 이 논문은 농림부에서 시행한 농림기술개발사업 연구결과의 일부입니다.

## 인용문헌

- Bhatti MH, Percival T, Davey CDM, Henshaw GG, Blakesley D (1997) Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using an encapsulation protocol. *Plant Cell Rep* 16: 802-806
- Blakesley D, Al-Mazrooei S, Henshaw GG (1995) Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*): use of sucrose and dehydration for cryoprotection. *Plant Cell Rep* 15: 259-263
- Blakesley D, Al-Mazrooei S, Bhatti MH, Henshaw GG (1996) Cryopreservation of non-encapsulated embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Rep* 15: 878-876
- Engelmann F (1991) In vitro conservation of tropical plant germplasm - A review. *Euphytica* 57: 227-243
- Hirata K, Mukai M, Goda S, Ishio-Kinugasa M, Yoshida K, Sakai A, Miyamoto K (2002) Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration. *Biotech Lett* 24: 371-376
- Hirata K, Phunchindawan M, Goda S, To T, Ishio M, Sakai A, Miyamoto K (1998) Cryopreservation of hairy root cultures of horseradish using encapsulation-dehydration. *J Ferment Bioeng* 86: 418-420
- Ishikawa M, Tandon P, Suzuki M, Yamaguishi-Ciampi A (1996) Cryopreservation of bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells using slow prefreezing and vitrification procedures. *Plant Sci* 120: 81-88
- Kartha KK (1981) Meristem culture and cryopreservation. In: Thorpe TA, (ed.), *Plant Tissue Culture - Method and Application*, Academic Press, Orlando, Florida, pp 181-211
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Pennycooke JC, Towill LE (2000) Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Rep* 19: 733-737
- Plessis P, Leddet C, Collas A, Dereuddre J (1993) Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration; Effects of pretreatment, cooling and post culture conditions. *Cryo-Letters* 14: 309-320
- Sakai A (1985) Cryopreservation of shoot-tips of fruit trees and herbaceous plants. In: Kartha KK, (ed.), *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRS Press, Boca Raton, Florida, pp 135-138
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9: 30-33
- Shimonishi K (1996) Cryopreservation for embryogenic cultures of subtropical crops. *Jap Tiss Cult* 22: 371-375
- Shimonishi K, Karube M, Ishikawa M (1993) Cryopreservation of taro (*Colocasia esculenta*) embryogenic callus by slow prefreezing. *J Jap Breeding* 43 (Suppl. 2): 187
- Shimonishi K, Karube M, Ishikawa M (2000) Cryopreservation of somatic embryos of sweet potato by slow prefreezing method. In: Engelmann F, Tokagi H, (eds.), *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm - Current Research Progress and Application*, JIRCAS International Agriculture Series No. 8, Japan, pp 368-370
- Steponkus PL, Lanphear FO (1967) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* 42: 1423-1426
- Withers LA, Street HE (1977) The freeze-preservation of plant cell cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH, (eds.), *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*, Springer-Verlag, Berlin and New York, pp 226-244
- Yoshinaga M, Yamakawa O (1994) Cryopreservation of sweet potato somatic embryos involving a desiccation step. *Jap J Breeding* 44 (Suppl. 4): 290