

离体保存技术在无性繁殖蔬菜 种质资源保存中的应用

王海平, 李锡香, 沈 镒, 宋江萍

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要:概述了无性繁殖蔬菜种质资源的重要性及保存现状、离体保存技术及其国内外研究进展,着重介绍了我国无性繁殖蔬菜种质资源离体保存技术的研究进展和应用情况,展望了离体保存技术在无性繁殖蔬菜种质保存中的应用前景。

关键词:离体保存技术;无性繁殖蔬菜;种质资源

Application of *in Vitro* Conservation Technique in Vegetative Vegetable Germplasm Resources

WANG Hai-ping, LI Xi-xiang, SHEN Di, SONG Jiang-ping

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Importance and conservation status of vegetative vegetable germplasm resources were reviewed in this paper. Brief methods of *in vitro* conservation were given. The paper mainly focused on the status and advance of *in vitro* conservation of vegetative vegetable germplasm in china. Some emergent questions and prospect of *in vitro* conservation were presented and discussed.

Key words: *In vitro* conservation technique; Vegetative vegetable; Germplasm resources

无性繁殖蔬菜既是构成我国蔬菜产业特色的重要作物,又是生物多样性的重要组成部分。我国无性繁殖蔬菜种质资源丰富,分布广泛;各种无性繁殖蔬菜的生物学特性各不相同,异地保存存在适应性问题;田间保存、收获、贮藏过程中不仅需要大量的人力和物力,同时易受自然灾害,使种质资源安全保存面临技术挑战。离体保存技术可在一定程度上解决无性繁殖蔬菜种质资源田间保存中的部分问题,受到了国内外研究者的高度重视,在技术研究和应用方面都取得了很大成效。我国在大蒜、姜和百合等无性繁殖蔬菜种质的离体保存技术方面研究较为深入,并成功地应用于资源的复份保存。由于无性繁殖蔬菜种类繁多,基因型对离体保存技术影响很大,所以离体保存技术在研究与应用方面任重道远。

1 无性繁殖蔬菜种质资源保存现状及 离体保存技术的重要性

1.1 无性繁殖蔬菜种质资源的重要性及保存现状

无性繁殖蔬菜包括姜、薯芋、芋头、魔芋、豆薯、葛等薯蓣类蔬菜,大蒜、葱、韭菜等葱蒜蔬菜,食用百合、竹笋、黄花菜、芦笋、香椿、枸杞等多年生蔬菜^[1]。无性繁殖蔬菜在世界人民膳食结构和经济生活中占有重要的地位,又是生物多样性的重要组成部分。无性繁殖蔬菜也是构成我国蔬菜产业特色的重要作物,是蔬菜出口创汇的主要种类。我国的大蒜、姜、百合等无性繁殖蔬菜的生产不仅在国内占有很大比重,在世界蔬菜贸易上也占据相当份额。

收稿日期:2008-09-06

修回日期:2009-01-20

基金项目:国家科技基础条件平台(2005DKA21002-33)

作者简介:王海平,助研,研究方向为蔬菜种质资源与分子生物学。E-mail:haipingping@126.com

通讯作者:李锡香,研究员,博导,主要从事蔬菜种质资源研究工作。E-mail:lee0612@sina.com

世界各国非常重视无性繁殖蔬菜种质资源的收集和保存,如印度、法国、德国、英国、美国、俄罗斯等都保存有相当数目的无性繁殖蔬菜种质资源,并开展了相关的离体保存技术研究。

通过国家基础性工作项目“无性繁殖蔬菜种质资源的收集整理和保护”及国家科技基础条件平台项目“无性及多年生繁殖蔬菜资源标准化整理、整合与共享试点”的实施,中国农业科学院蔬菜花卉研究所率先在全国 28 省(市)抢救性地收集了 736 份无性繁殖蔬菜种质资源(包括葱蒜类、薯蓣类、多年生和野生蔬菜种质资源),分属 26 科,58 属、102 种,保护了一批濒临灭绝的名、特、优蔬菜地方品种和野生资源。首次建立了我国规模较大的综合性无性繁殖蔬菜资源圃,整理入圃种质 656 份,填补了我国蔬菜种质资源保护领域的一项空白。这些无性繁殖蔬菜种质资源主要以田间种植的方式保存于资源圃,通过各种田间保存技术的研发和设施的改善,已经能够保证资源的正常生长,但田间保存费用高、费工、易受病虫害的侵染。对这些资源,尤其是珍稀、濒危的资源进行室内离体复份保存,是确保种质安全保存的重要途径^[2-7]。

1.2 离体保存技术的缘起与重要性

对无性繁殖蔬菜种质资源而言,因为不能以种子形式进行低温保存,所以离体保存技术是理想的保存途径之一。离体保存是将植物外植体在无菌环境下进行组织培养,将这些外植体贮存在各类生长抑制条件下,使其缓慢生长或停止生长,以达到长期保存的目的。此项技术由 Henshaw 和 Morel 在 1975 年首次提出,并受到植物界的极度重视。1980 年,国际植物遗传资源委员会增加了对无性繁殖材料收集、保存研究的支持,1982 年专门成立了离体保存咨询委员会,随后,许多国家和相关国际组织相继建立了植物种质离体基因库,许多不能用常规种子保存的植物已经采用这种方法得以保存^[2]。

离体保存技术与田间种植保存相比具有明显的优点:首先,离体保存所占空间小,在较小的空间内可保存大量的基因资源,克服了田间保存需占用土地面积大、管理费用高的缺点;离体保存技术在无菌条件下进行保存,易于控制,同时可在离体保存的任何阶段进行脱毒处理,避免了病害及自然灾害,减少了田间保存过程中易发生自然变异和种质退化的现象;离体保存技术打破了植物生长的季节性,可以在人工条件下繁殖不同生育阶段的植物体,以保证引种者的不同需要;离体保存技术可在很短的时间内

繁殖大量的种质个体,繁殖个体小,便于运输,从而更有利于种质资源的分发、交换和利用;离体保存技术对一些稀有、珍贵和濒危植物资源的保存具有极其重要的意义。所以,离体保存作为种质资源圃活体保存的补充甚至替代技术,大大提高了种质资源保存的安全性,已成为资源研究领域的重要课题和热点。

2 无性繁殖蔬菜种质资源离体保存技术

植物种质资源保存主要有原生境保存和非原生境保存,非原生境保存包括种质库、种质圃、离体保存,有的学者将离体保存作为第 3 种保存方式^[3]。离体保存,就是利用超低温库、组织培养室等保存植物的配子体、枝条、花粉、组织、细胞等,来达到保存植物种质资源的目的。离体保存技术是指通过无菌操作,使植物体的各类结构材料(外植体)在人工控制的环境条件下,进行离体培养的一套技术与方法,其中植物的细胞与组织培养,是在上述条件下将植物外植体接种于培养基上保存。与其他植物一样,用于无性繁殖蔬菜种质资源常用的离体保存方法有缓慢生长保存(slow growth conservation)和超低温保存(cryopreservation),前者适合中短期保存,后者用于长期保存。

2.1 缓慢生长保存

缓慢生长保存是指通过调节培养条件,抑制培养物生长,但不死亡,从而延长继代培养时间,减少操作和劳力的保存方法^[4]。抑制培养物生长的途径主要有:降低培养温度,调整培养渗透性,控制养分水平,应用化合物或生长抑制剂,控制培养基营养物质,降低培养环境中氧含量,调节光照和应用适当的包扎物等。

降低培养温度 降低培养温度是缓慢生长保存最常用的方法,得到了国内外学者广泛的研究,已经在许多植物的保存中得到研究和应用。如草莓、苹果、梨、猕猴桃和属于无性繁殖蔬菜的芋头和马铃薯等作物,通过降低培养温度,都得到了很好保存效果^[8-10]。正确选择适宜低温是提高保存存活率的关键,不同植物乃至同一种植物不同基因型对低温的敏感性不一样^[11]。

提高培养基渗透压 提高培养基渗透压也可以抑制培养材料的生长。一般是在培养基中添加一些高渗物质化合物以提高培养基的渗透势负值,造成水分逆境,降低细胞膨压,使细胞吸水困难,减弱新陈代谢活动,延缓细胞生长。研究实验证明,通过增

加如蔗糖、甘露醇等高渗物质,可延长生姜、百合等离体保存的时间^[11-12]。

培养基中添加生长调节物质 在常规培养基中添加生长延缓剂或生长抑制剂,可有效地抑制保存材料的生长,延缓其继代周期。目前,常用的生长抑制剂有:氯化氮胆碱(矮壮素,CCC)、N,N-二甲基胺琥珀酸(B9)、多效唑(PP333)^[13]、高效唑(S3307)、脱落酸(ABA)、三碘苯酸(TIBA)、麟甘酸、甲基丁二酸等^[8]。

培养基的营养控养 植物生长发育依赖于外界养分的供给,如果养分供应不足,植物生长缓慢,植株矮小。国内外学者通过对生姜、百合、香蕉、咖啡等^[11-12,14-15]作物的研究,表明降低培养基中的养分水平也可有效地限制细胞生长,达到保存的目的。

降低培养环境中的氧气浓度 1959年Caplin^[16]提出低氧分压用于植物组织培养物保存的设计。1981年Bridgin等^[17]采用降低培养物周围的大气压力或改变氧含量来保存植物组织培养物。Dorion^[18]用矿物油覆盖技术成功地保存了多种植物愈伤组织。但此项技术的研究尚不成熟,尤其有关低氧对细胞代谢功能影响还有待进一步研究。

调节培养光照 愈伤组织需要在黑暗中保存,植物组织培养物一般在缓慢生长过程中对光照的需要因材料不同,要求不一。一些研究认为,适当缩短光照周期有利于延缓培养物生长;也有的研究认为,强光有利于保存^[11]。

适合的包扎物 研究表明,包扎物对试管中材料的保存效果影响也很大。辛淑英^[19]在甘薯种质苗的保存研究中发现,以铝箔封口保存效果最佳;周明德^[20]也报道了在马铃薯种质保存中铝箔的封口效果较好,长期保存草莓种质试管苗以塑料薄膜封口效果好;在柑橘的保存中,棉塞+聚乙烯膜和封口的效果较好^[21]。所以在具体的保存实践中,可能需要根据不同作物和培养容器,选择合适的包扎物。

2.2 超低温保存

低温保存操作简便,适于中短期种质保存,但需多次继代培养才能延长保存期。而多次继代后,又会引起染色体和基因型的变异,如多倍体、非整倍体、染色体缺失和易位等结构变异^[11]。超低温保存技术在一定程度上克服了上述缺点。离体保存技术中的超低温保存除了要求设备较简便,不需要大量的基本建设投资外,在长期保持遗传的稳定性上具有明显的优势;另外,经过超低温保存后的再生植株,有可能产生高抗寒性的新品种。利用超低温保

存的植物材料涉及到细胞(悬浮细胞)、原生质体、愈伤组织、分生组织(茎尖)、芽、枝条、花粉、活体胚等,大部分已成功地实现了植株再生^[11-22]。近年来关于植物材料的超低温保存的报道越来越多,特别是在以无性繁殖为主的园艺植物的种质保存方面研究更多^[8,22-26]。

超低温常指低于 -80°C 的低温,现在较常用的超低温保存技术有:逐步冰冻法、脱水干燥方法、玻璃化方法、胶囊化/脱水方法、胶囊化/玻璃化方法等。在无性繁殖蔬菜种质资源超低温保存中主要以玻璃化方法研究最热,技术相对更成熟。玻璃化超低温保存是指在液氮中保存植物组织的一种方法。一般是以足够快的降温速度,使植物液相固化成无定形的玻璃化状态而非尖锐的冰晶形式,即所谓的玻璃化状态。玻璃化状态是一种透明的“固态”,没有冰晶和溶液效应对细胞造成损伤,植物的物质代谢、生命活动几乎完全停止,而细胞活力和形态发生的潜能得以保存。这种保存方法,保持了培养物的遗传稳定性,是植物种质保存的有效方法,近年来受到国内外学者的广泛关注。

玻璃化法超低温保存原理是利用高浓度的复合保护剂(如PVS2)等处理植物培养物一定时间后立即投入液氮,以足够快的降温速度,使细胞连同保护剂本身在快速降温中都进入玻璃化。玻璃化超低温保存的关键在于脱水过程的控制以及保护剂对细胞渗透以减轻化学毒性和溶液效应。玻璃化法超低温保存的基本程序为:(1)材料的选择;(2)材料预处理;(3)冰冻保护剂处理;(4)投入液氮;(5)化冻、洗涤;(6)活力鉴定、再培养;(7)遗传性状的分析。

3 无性繁殖蔬菜种质资源离体保存技术的研究进展及应用现状

3.1 国外离体保存技术研究和应用现状

蔬菜作物的离体繁殖技术已经取得了很大进展,离体繁殖方法在很多蔬菜作物中的快繁方面得到了较为广泛的研究和应用,如大蒜、石刁柏、花茎甘蓝、抱子甘蓝、洋葱、大蒜、洋白菜、胡萝卜、木薯、花椰菜、芹菜、黄瓜、茄子、羽衣甘蓝、菜豆、豌豆、莴苣、辣椒、马铃薯、西葫芦、甘薯、番茄、参薯等^[11]。

离体保存技术的研究和应用也得到了一定的发展。大蒜的离体保存技术应用于保存实践,如印度利用常温离体保存技术保存大蒜种质85份。薯蓣类蔬菜低温和超低温保存技术得到了广泛的研究,部分技术已经应用于种质资源的保存。在法国,通

过缓慢生长法中期保存薯蓣种质资源 21 种 301 份,每 6~8 个月继代 1 次,已经保存两年。印度自 20 世纪 90 年代开展姜种质资源的离体保存技术研究,通过离体保存技术保存生姜种质 120 份^[11],至 2006 年增加至 160 份^[27]。

3.2 我国离体保存技术的研究进展及应用现状

中国农业科学院蔬菜花卉研究所经过多年的研究,建立了大蒜^[8,23]、百合^[28-29]和姜^[11]种质组织快繁和低温离体保存技术体系;通过技术集成,建立了我国第一个蔬菜低温离体保存种质库和超低温种质保存装置,并成功地应用于种质保存实践,开辟了种质资源低成本安全保存和有效利用的可靠途径。这些技术解决了无性繁殖蔬菜种质资源田间保存中易受自然灾害等一系列问题,在生姜、百合和大蒜种质资源的安全保存和有效分发利用方面发挥了重要作用。其中微型姜组织快繁关键技术大大提高了微型姜苗健壮程度和快繁效率,降低了微型姜苗生产的成本。该技术不仅可在姜工厂化种苗生产中应用,还可用于姜种质资源离体保存和分发利用。利用相关技术现已经复份保存大蒜种质资源 146 份,姜种质资源 46 份,百合资源 9 份。

3.2.1 大蒜种质资源离体繁殖和保存技术研究 中国农业科学院蔬菜花卉所王艳军^[23]、高霞^[8]研究了不同浓度的激素对比对大蒜多芽分化的影响,筛选出了芽分化多、生长健壮、长势较均衡的大蒜多芽分化培养基配方。

对大蒜低温保存技术研究结果表明:在大蒜试管苗基本保存培养基中添加甘露醇(MNT)或脱落酸(ABA),对试管苗的生长均有抑制作用,但 ABA 的抑制作用过于强烈。蔗糖浓度对试管苗株高的影响无显著差异。1℃和 5℃两种温度保存 6 个月的试管苗长势良好,无死亡;15℃以上的温度不利于其保存。低温和黑暗有利于大蒜试管苗的保存。筛选出了适用大蒜种质的低温离体保存的培养基配方和培养环境,其中研究发现 40 份大蒜种质可安全保存 24 个月且不需继代^[23]。

高霞^[8]系统地研究了大蒜茎尖超低温保存技术,通过比较茎尖大小、预培养基蔗糖浓度及预培养时间、冰冻保护剂及其处理方式、化冻方式等因素对冻存茎尖存活率的影响,获得了优化的大蒜初生芽茎尖超低温保存程序。对 12 份不同大蒜种质超低温保存研究发现,不同的大蒜品种冻后成活率差异较大,其中成活率最高可达到 100%,最低的只有 53%。对大蒜超低温保存茎尖再生植株及其遗传稳

定性进行分子水平检测,结果发现再生植株、田间生长植株和组培苗均未发现差异带。说明在大蒜组织培养及超低温保存过程中,再生植株保持了种质的原有遗传特性。

3.2.2 百合种质资源离体繁殖和保存技术研究 张玉芹等^[28-29]对百合低温和超低温保存技术进行了较为系统的研究,分别筛选出了百合多芽分化、继代扩繁培养及低温保存的培养基配方。通过比较同一鳞茎不同部位的鳞片及同一鳞片上不同部位组织产生芽的能力,结果表明:外层鳞片组织的芽分化数分别是中层和内层鳞片组织的 1.2 倍和 1.9 倍,鳞片下部组织的芽分化数分别是中部和上部组织的 1.3 倍和 1.8 倍,即百合组织培养的最适外植体是外层鳞片与鳞茎盘连接的下部鳞片。以鳞片组织快繁为基础的百合试管苗保存技术研究结果表明:无论是在培养基中添加 MNT 还是 ABA,在常温下保存的百合试管苗,每 3 个月继代 1 次。但在 1~5℃低温下,保存 18 个月时,大多数处理的百合试管苗生长正常。但在低温下,加 MNT 各处理的成活率总体上要高于加 ABA 各处理,生长受抑制程度低于 ABA 各处理,且鳞茎发育良好。从芽成活率、单芽增殖数及鳞茎大小等指标综合考量,筛选出了百合低温保存的适宜培养基范围为:MS + MNT10~20g/L + 蔗糖 30~60g/L。在适宜的范围内,MNT 浓度高时,蔗糖可以适当降低;MNT 浓度低时,蔗糖可以适当提高。在 1±1℃保存条件下,百合试管苗生长情况的总体趋势与 5±1℃相近,通过此离体保存技术已经复份保存 9 份。

通过比较组培苗的继代时间、茎尖大小、冰冻保护剂及其处理方式、预培养基蔗糖浓度及预培养时间、化冻方式等因素对冻存茎尖存活率的影响,系统研究了百合种质资源的离体超低温保存技术。筛选获得百合组培苗茎尖超低温保存的程序和基本条件如下:切取继代 30~45d 的百合无菌苗的茎尖 2~3mm,在 0.5mol/L 蔗糖的 MS 培养基上预培养 1~2d 后,0℃下用 100% PVS2 脱水处理 20min 后,换用新鲜的 100% PVS2,然后将材料直接投入液氮。冻后成活率最高可达到 52.6%,并能再生植株。

3.2.3 生姜离体快繁及种质资源离体保存技术研究 周逊^[11]通过对生姜离体快繁技术的研究,确定了初生芽离体培养的适宜培养基为 MS + NAA 0.1mg/L + 6-BA 3.5mg/L,对生姜芽诱导和生根成苗比较适宜,平均单株出芽数可达 2.8 个。同时发现初代接种未出芽姜块的二次转接培养增殖率高,

姜块二次培养比初次接种时的成苗快 4 倍左右;继代培养的成苗时间短于初代培养,一般约需 2 个月。多效唑 (PP333)、NAA 和 6-BA 在生姜继代培养中的效果明显。单独使用 PP333 要明显优于单独使用 NAA 或 6-BA 的效果,经 PP333 处理的组培苗生长健壮,芽分蘖多,根系发达,茎叶和根生长均衡,叶色深绿,没有出现黄化现象,且基部略有膨大,培养 2 个月的芽增殖倍数达 15.4。以继代组培苗为试验材料的试管姜诱导研究涉及蔗糖、6-BA、NAA 和 PP333 的浓度以及光照条件等因素。培养基中的蔗糖浓度、添加适宜浓度的 6-BA、NAA 和 PP333 对试管姜的诱导都有不同程度的促进作用,尤其是 PP333 对试管姜形成的促进作用更为明显。

李锡香等^[30]通过研究,筛选出了诱导试管微型姜适宜的培养基和培养条件:每升基本培养基 MS 中含有 80~110g 蔗糖、0.003~0.0042g 多效唑、6.8~7.2g 琼脂,pH 为 5.7~5.9。微型姜苗的根状茎平均纵径 0.81cm,茎粗 0.72cm,重达 0.28g。微型姜苗增殖倍数高达 21.69,平均株高 4.45cm、根状茎平均纵径为 0.70cm,根状茎粗 0.63cm、单个根状茎重量 0.24g。按照此微型姜苗组培快繁培养基及组培快繁方法,在无菌培养室中培养 60~110d,可获得大小不同的、可供保存或分发利用的微型姜苗。

将生姜继代组培苗接种在添加不同浓度的蔗糖和甘露醇的培养基上,在 20℃、光照强度 2000Lux、光照时间 12h/d 条件下,比较保存 6 个月的生姜试管苗的生长量和死亡率,结果显示:在培养基中加入甘露醇和蔗糖均可以有效抑制试管苗生长,延长其保存期。在一定范围内,蔗糖浓度越高,保存效果越好,说明高浓度的蔗糖既能提供营养又能抑制植株生长,达到试管苗保存的目的。甘露醇的抑制效果较蔗糖更强烈。通过筛选利用生姜种质资源保存的培养基,只需要每 6 个月继代 1 次,利用此技术已经成功保存生姜资源 46 份。

4 应用前景

离体保存技术由于其具有省时、省地、省空间和无病虫害侵染等优点,尤其用于植物种质资源离体保存的设备简单,不需要大量的基本建设投资,具有广阔应用前景^[31]。

不可否认,植物种质的离体保存技术研究及其应用已取得一定进展,但因其研究历史较短,已有的结果仍是初步的,许多问题尚需进一步探讨。已有保存试验的存活率一般还较低,特别是目前保存的

时间还较短,超低温保存在长期(10 年、20 年甚至更长时间)保存后,材料的生活力和存活率、再生植株的能力,这些问题都需要进一步研究^[31-32]。在进行多代的离体繁殖和保存过程中,可能会造成种质遗传漂移。由于近亲繁殖也有可能造成种质原有生长习性的衰退、生物竞争性和病害抗性的减弱。另外,现有的技术还不能像非离体保存那样为育种者及时提供所需要的大量的成株苗。

不过,离体保存技术在植物育种和生物多样性保护上的巨大潜力已经得到国内外学者的公认。我们相信通过技术和设施的不断改进,离体保存技术将日臻成熟,必将在无性繁殖蔬菜,尤其是珍稀和濒危种质资源的保存中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 李锡香,王海平,沈锦. 无性繁殖蔬菜种质资源的收集、保存、鉴定与利用[M]//多年生和无性繁殖作物种质资源共享研究. 北京:中国农业出版社,2006:62-71
- [2] 徐刚标. 植物种质资源离体保存研究进展[J]. 中南林学院学报,2000,20(4):81-87
- [3] 林富荣,顾万春. 植物种质资源设施保存研究进展[J]. 世界林业研究,2004,17(4):19-23
- [4] Malaurie B, Marie F T, Berthaud J, et al. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 1998, 1(3):1-15
- [5] 黄清俊,丁雨龙,谢维荪,等. 多肉植物离体种质保存的迫切性、可行性及研究现状[J]. 上海农业学报,2003,19(1):41-45
- [6] Sarasan V, Cripps R, Margaret M, et al. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2006, 42:206-214
- [7] Shibli R A, Shatnawi M A, Subaih W S, et al. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review[J]. World Journal of Agricultural Sciences, 2006, 2(4):372-382
- [8] 高霞. 大蒜种质资源超低温保存研究[D]. 重庆:西南农业大学园艺园林学院园艺系,2004
- [9] 宋明,王晓佳,陈世儒. 马铃薯试管芽保存研究[J]. 西南农业大学学报,1994,16(3):247-249
- [10] 闫爱玲,张国军,徐海英,等. 园艺植物种质常温离体保存研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(11):4496-4497,4499
- [11] 周逊. 生姜种质资源离体保存技术研究[D]. 武汉:华中农业大学园艺林学学院蔬菜学系,2004
- [12] 陈辉. 百合种质离体保存技术研究[D]. 武汉:华中农业大学园艺林学学院园林系,2005
- [13] 赵密珍,刁曼妮,钱亚明,等. 多效唑对草莓种质离体保存的影响[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(3):242-244
- [14] Ko W H, Hwang S C, Ku F M. A new technique for storage of meristem-tip cultures of 'Cavendish' banana[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 25:179-183
- [15] Naidu M M, Sreenath H L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 55:227-230
- [16] Caplin S M. Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures[J]. Amer Jour Bot, 1959, 46(5):324-329

(下转第 64 页)

- 遗传差异[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1061-1066
- [13] Bohn M, Utz H F, Melchinger A E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis on RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance[J]. Crop Sci, 1999, 39: 228-237
- [14] Smith J S C, Kresovich S, Hopkins M S, et al. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats[J]. Crop Sci, 2000, 40: 226-232
- [15] Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 43-48
- [16] Liu Z W, Biyashev R M, Saghai-Marof M A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 869-876
- [17] Ivandic V, Hackett C A, Nevo E, et al. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 511-527
- [18] Russell J, Fuller J, Young G, et al. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers[J]. Genome, 1997, 40: 442-450
- [19] Struss D, Plieske J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley population[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 308-315
- [20] Thruspekoy Y, Nakamura K, Waugh R, et al. Application of SSR markers for genetic diversity assessment barley (*H. vulgare* L.) [C]//Logue S. Barley Genetics VIII. Proceedings of the 8th International Barley Genetics Symposium. Australia, Adelaide, 2000: 66-68
- [21] Feng Z Y, Liu X J, Zhang Y Z, et al. Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR markers[J]. Acta Genetic Sinica, 2006, 33(10): 917-9288
- [22] 侯永翠, 颜泽洪, 魏育明, 等. 利用 RAPD 标记分析大麦种质资源的遗传资源的多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 145-150
- [23] 张赤红, 张京. 大麦品种资源遗传多样性的 SSR 标记评价[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(2): 214-219
- [24] Sharp P J, Chao S, Desai S, et al. The isolation, characterization and application in *Triticeae* of a set of wheat RFLP probe identifying each homoeologous chromosome arm[J]. Theor Appl Genet, 1989, 78: 342-348
- [25] Devos K M, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA marker in wheat[J]. Theor Appl Genet, 1992, 84: 567-572
- [26] Ramsay L, Macaulay M, de gli Ivanissevich S, et al. A simple sequence repeat-based linkage map of barley[J]. Genetics, 2000, 156: 1997-2005
- [27] Karakousis A, Gastafson J P, Chalmers K J, et al. A consensus map of barley integrating SSR, RFLP and AFLP markers[J]. Austr J Agr Res, 2003, 54: 1173-1185
- [28] Marcel T C, Niks R E. Molecular dissection of a QTL region for partial resistance to barley leaf rust [C]// Spunar J, Janikova J. Proceedings of the 9th International Barley Genetics Symposium. Brno, Czech Republic. Agricultural Research Institute Kromeriz Ltd, 2004: 709-715
- [29] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. PNAS, 1979, 76: 5256-5273
- [30] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331
- [31] 朱彩梅, 张京. 中国糯大麦品种资源及地理分布研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4244-4249
- [32] Kimura M, Ota T. Mutation and evolution at the molecular level[J]. Genetics, 1973, 73(Suppl): 19-35
- ~~~~~
- (上接第 56 页)
- [17] Bridgen M P, Staby G L. Low pressure and low oxygen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum x Morifolium* tissue cultures[J]. Plant Science Letters, 1981, 22(2): 177-186
- [18] Dorion N. Effects of temperature and hypoxic atmosphere on preservation and further development of *in vitro* shoots of peach ('Armking') and peach x almond hybrid ('GF 677')[J]. Scientia Horticulturae, 1994, 57(3): 201-213
- [19] 辛淑英. 甘薯分生组织培养和试管苗低温保存方法的研究[J]. 作物品种资源, 1987(2): 34-36
- [20] 周明德. 马铃薯种质试管苗保存[J]. 作物品种资源, 1989(3): 42-43
- [21] 王子成. 柑橘种质资源的离体保存研究[D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院果树学系, 2003
- [22] 吴传金, 陈学森, 曾继吾, 等. 新疆野苹果 (*Malus sieversii*) 超低温保存及其植株再生[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 243-247
- [23] 王艳军. 大蒜离体保存技术初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院蔬菜学系, 2003
- [24] 王培忠, 裴崎君, 顾寒琳, 等. 植物种质资源超低温保存原理与研究进展[J]. 吉林林业科技, 2007, 36(4): 17-20
- [25] 宋尚伟, 闫锋, 蔡艳婷, 等. 桃品种 '八月香' 花粉的超低温保存[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 181-183
- [26] 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 等. 李离体茎尖的超低温保存[J]. 园艺学报, 2008, 35(3): 426-426
- [27] Tyagi R K, Agrawal A, Yusuf A. Conservation of *Zingiber* germplasm through *in vitro* rhizome formation[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 108: 210-219
- [28] 张玉芹. 食用百合离体保存技术初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学农学院园艺系, 2004
- [29] 张玉芹, 李锡香, 马庆, 等. 食用百合种质的玻璃化法超低温保存技术初探[J]. 中国蔬菜, 2004(4): 11-13
- [30] 李锡香, 王海平, 沈婧, 等. 一种微型姜苗组培快繁培养基及组培快繁方法: 中国, CN101147466A[P]. 2008-03-26
- [31] 洪森荣, 郭连金. 离体保存技术在植物种质资源保存中的应用[J]. 上饶师范学院学报, 2006, 26(3): 92-97
- [32] Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects[J]. In vitro Cellular & Developmental Biology-plant, 2004, 40: 427-433

作者: [王海平](#), [李锡香](#), [沈镛](#), [宋江萍](#)
作者单位: [中国农业科学院蔬菜花卉研究所](#), 北京, 100081
刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)
年, 卷(期): 2010, 11(1)

参考文献(32条)

1. [Sarasan V;Cripps R;Margaret M](#) [Conservation in vitro of threatened plants-progress in the past decade](#) 2006
2. [黄清俊;丁雨龙;谢维荪](#) [多肉植物离体种质保存的迫切性、可行性及研究现状](#)[期刊论文]-[上海农业学报](#) 2003(01)
3. [Malaurie B;Marie F T;Berthaud J](#) [Medium-term and longterm in vitro conservation and safe international exchange of yam \(Dioscorea spp.\)germplasm](#) 1998(03)
4. [Ko W H;Hwang S C;Ku F M](#) [A new technique for storage of meristem-tip cultures of 'Cavendish' banana](#) 1991
5. [Engelmann F](#) [Plant cryopreservation:progress and prospects](#) 2004
6. [洪森荣;郭连金](#) [离体保存技术在植物种质资源保存中的应用](#)[期刊论文]-[上饶师范学院学报](#) 2006(03)
7. [李锡香;王海平;沈镛](#) [一种微型姜苗组培快繁培养基及组培快繁方法](#) 2008
8. [宋明;王晓佳;陈世儒](#) [马铃薯试管芽保存研究](#) 1994(03)
9. [高霞](#) [大蒜种质资源超低温保存研究](#) 2004
10. [Shibli R A;Shatnawi M A;Subaih W S](#) [In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources:a review](#) 2006(04)
11. [林富荣;顾万春](#) [植物种质资源设施保存研究进展](#)[期刊论文]-[世界林业研究](#) 2004(04)
12. [徐刚标](#) [植物种质资源离体保存研究进展](#)[期刊论文]-[中南林学院学报](#) 2000(04)
13. [张玉芹;李锡香;马庆](#) [食用百合种质的玻璃化法超低温保存技术初探](#)[期刊论文]-[中国蔬菜](#) 2004(04)
14. [张玉芹](#) [食用百合离体保存技术初步研究](#) 2004
15. [Tyagi R K;Agrawal A;Yusuf A](#) [Conservation of Zingiber germplasm through in vitro rhizome formation](#) 2006
16. [赵艳华;吴雅琴;程和禾](#) [李离体茎尖的超低温保存](#)[期刊论文]-[园艺学报](#) 2008(03)
17. [宋尚伟;闫锋;蔡艳婷](#) [桃品种'八月香'花粉的超低温保存](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#) 2007(01)
18. [王培忠;裴崎君;顾寒琳](#) [植物种质资源超低温保存原理与研究进展](#)[期刊论文]-[吉林林业科技](#) 2007(04)
19. [王艳军](#) [大蒜离体保存技术初步研究](#) 2003
20. [吴传金;陈学森;曾继吾](#) [新疆野苹果\(Malus sieversii\)超低温保存及其植株再生](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2008(02)
21. [王子成](#) [柑橘种质资源的离体保存研究](#) 2003
22. [周明德](#) [马铃薯种质试管苗保存](#) 1989(03)
23. [辛淑英](#) [甘薯分生组织培养和试管苗低温保存方法的研究](#) 1987(02)
24. [Dorion N](#) [Effects of temperature and hypoxic atmosphere on preservation and further development of in vitro shoots of peach \('Armking'\)and peach x almond hybrid\('GF 677'\)](#) 1994(03)

25. [Bridgen M P;Staby G L Low pressure and low oxygen storage of Nicotiana tabacum and Chrysanthemum x Morifolium tissue cultures](#) 1981(02)
26. [Caplin S M Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures](#) 1959(05)
27. [Naidu M M;Sreenath H L In vitro culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation](#) 1999
28. [赵街珍;刁曼妮;钱亚明 多效唑对草莓种质离体保存的影响](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2003(03)
29. [陈辉 百合种质离体保存技术研究](#) 2005
30. [周逊 生姜种质资源离体保存技术研究](#) 2004
31. [闫爱玲;张国军;徐海英 园艺植物种质常温离体保存研究进展](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2008(11)
32. [李锡香;王海平;沈镡 无性繁殖蔬菜种质资源的收集、保存、鉴定与利用](#) 2006

引证文献(1条)

1. [尹明华,洪森荣 光照与温度对黄独带芽茎段和茎尖离体保存的影响](#)[期刊论文]-[贵州农业科学](#) 2011(10)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201001010.aspx