

香石竹种质离体保存研究进展

张晓宁^{1,2,3}, 陈晓玲², 卢新雄², 徐有明¹, 张金梅², 辛霞², 张志娥²

(¹华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081; ³江西省农业科学院水稻研究所, 南昌 330200)

摘要: 香石竹是世界四大切花之一, 具有重要的观赏价值。其种质资源主要依靠田间种质圃和离体库进行保存。离体保存包括试管苗保存和超低温保存, 这两种方法作为田间种质圃保存的补充可以分别对种质资源进行短中期和长期保存。本文对香石竹离体保存的相关研究进行了概括总结, 旨在为香石竹种质资源的保存提供参考。

关键词: 香石竹; 种质; 离体保存; 超低温保存

Research Progress on *in vitro* Conservation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Germplasm

ZHANG Xiao-ning^{1,2,3}, CHEN Xiao-ling², LU Xin-xiong², XU You-ming¹,
ZHANG Jin-mei², XIN Xia², ZHANG Zhi-e²

(¹ College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ² Key Laboratory of Crop Germplasm Resources and Utilization, Ministry of Agriculture / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³ Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200)

Abstract: Carnation is one of the world's four cut flowers with important ornamental value. Its germplasm resources are mainly conserved in field genebanks and *in vitro* genebanks, which including tissue culture and cryopreservation. As complementary to conservation in field genebanks, *in vitro* genebanks can conserve the germplasms in short, medium and long-term. In this paper, the related researches in the carnation germplasms *in vitro* conservation were studied summarily, aims at providing references to carnation germplasm conservation.

Key words: Carnation; Germplasm; *in vitro* conservation; Cryopreservation

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 又称康乃馨, 属石竹科 (Caryophyllaceae) 石竹属 (*Dianthus* L.)。香石竹是世界四大切花之一, 在花卉市场占有重要的地位。由于人口增加、土地开发、环境恶化等原因造成香石竹种质资源丢失, 长期扦插繁殖引起品质退化, 现代农业的发展和商业品种的推广导致品种单一, 使得香石竹种质资源的保存更显重要。香石竹种质资源主要依靠田间种质圃和离体库进行保

存。离体保存以其无菌培养、占用空间小、所需劳动力和维持开支少、易于国际间交换等特点越来越受到世界各国的重视^[1]。

1 香石竹试管苗保存

1.1 培养条件

光照强度一般在 2000 ~ 3000 lx, 光照时间多为 12 ~ 14 h/d, 温度为 20 ~ 25℃。MS 培养基是最适合

收稿日期: 2011-03-02 修回日期: 2011-05-31

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2006BA013B10); 中国农业科学院作物科学研究所, 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目 (1610032012006); 农业部农作物种质资源保护利用专项资助项目 (2130135)

作者简介: 张晓宁, 硕士研究生。研究方向: 香石竹种质资源保存。E-mail: sflzxn@163.com

通讯作者: 陈晓玲, 副研究员, E-mail: xlchen@caas.net.cn; 卢新雄, 研究员, E-mail: xlucaas@126.com; 徐有明, 教授, E-mail: xuyouming@mail.hzau.edu.cn

香石竹生长的基本培养基,pH在5.8~7.0时,香石竹均可正常生长,但生根时以pH为6.7~7.0为好^[2],这与其栽培上要求较碱性环境的特性相符^[3]。最常用的激素有细胞分裂素(BA、KT)和生长素(IAA、NAA)。细胞分裂素浓度在0.2~2.0mg/L时,均可从茎段外植体上再生不定丛生芽。对于芽增殖而言,一般认为BA较KT有效^[4]。生长素的作用是促进生长和生根,浓度从0.01~1.0mg/L不等,一般在0.1~1.0mg/L之间。

1.2 外植体种类

在香石竹的组织培养中,目前已从茎尖、茎段、叶片、萼片、花芽、花瓣、花托、花丝、花粉、胚珠、原生质体及体细胞胚^[5-7]等多种外植体中获得了再生植株,且多以器官直接再生不定芽为主。

1.2.1 含分生组织的外植体 Aamir等^[8]以顶芽和腋芽为材料,接种6~7d后生成芽,其最适培养基为MS+4.0mg/L BAP,顶芽效果优于腋芽;最佳增殖和生根培养基分别为MS+1.0mg/L BAP和MS+1.0mg/L NAA。哈梅娟等^[9]以顶芽为外植体的研究认为,分化继代的最适培养基为MS+0.3mg/L 6-BA+0.5~1.0mg/L IAA或MS+0.3mg/L 6-BA+0.1~0.2mg/L NAA,最适的生根培养基为1/2MS+1.0mg/L IBA+0.01mg/L NAA。周长东^[10]以顶芽为外植体时组培增殖阶段的最佳培养基为MS+2.0mg/L 6-BA+0.3mg/L NAA,不定芽的分化系数达到6.45,最佳生根培养基为1/2MS+0.5mg/L NAA+0.5mg/L IBA+10g/L AC,生根率达90%。Miller等^[11]认为腋芽外植体再生不定芽的最佳培养基为MS+15μmol/L BA+0.5μmol/L a-NAA。房立晶^[12]在大量实验的基础上总结出取用带腋芽的茎段为外植体比叶片更有利于香石竹的快速繁殖,6-BA和NAA浓度分别为2.0mg/L和0.5mg/L的组合时,腋芽和叶片的诱导率最高分别达到87.9%和11.2%。

1.2.2 不含分生组织的外植体除了分生组织,其他不同种类的外植体也都被成功地再生。许多研究证明在以叶、茎、花瓣为外植体时,分化一般发生在该外植体与其他器官相分离的基部伤口处,如以叶为外植体时,叶片基部与茎分离的伤口处直接分化不定芽^[13-15];同样,茎节是在与叶片分离后的伤口部位具有分化能力^[16];花瓣在与花托连接的部位才具有分化能力^[17]。Van Altvoest等^[13]认为叶片的最佳分化培养基为MS+0.3mg/L NAA+0.9mg/L BA,分化率达65%。余义勋等^[18]认为BA和TDZ

两种激素均可诱导叶片分化不定芽,AgNO₃(0~25mmol/L)抑制不定芽的分化。暗培养和增加蔗糖浓度有利于不定芽分化^[14]。刘丽娜^[19]公开了香石竹茎段诱导无菌芽的培养基:MS+1mg/L 6-BA诱导率为83.3%。Nakano等^[20]以香石竹花瓣、叶片和茎段为外植体诱导不定芽,发现只有花瓣具有较高的再生率,适宜的培养基为MS+1.1~2.2mg/L BA和MS+0.9mg/L NAA。

1.3 保存时间或周期

香石竹一般通过分生组织的培养得到再生植株,通过切取带节的茎段进行无菌微繁殖。继代时间一般为1~2个月,对如何延长香石竹试管苗的继代时间国内外研究相对较少。目前主要通过降低温度、提高渗透压、进行饥饿处理、添加生长延缓剂或抑制剂、减少氧气供应、减少光照等来降低组织培养物的生长速度,以达到延长保存时间的效果。De-reuddre等^[21]研究认为香石竹试管苗在3~5℃或4h光照下,生长显著减缓或停止,可被保存1年以上。在本实验中,培养基中加入B9,香石竹试管苗可保存9个月以上。

1.4 保存过程中存在的问题

试管苗玻璃化现象是香石竹组织培养中的一大障碍,多年来不少学者致力于研究其原因和克服方法^[22-25]。采用强光照10000~20000lx,延长光照时间,在培养基中提高糖和琼脂的浓度,降低细胞分裂素的用量,提高培养基中铁离子和镁离子的浓度,使用透气性封口膜,筛选抗玻璃化无性系等来减少玻璃化现象的发生^[26-28]。此外,周音等^[29]、沈宁东等^[30]认为AgNO₃和活性炭可以有效防止或降低试管苗的玻璃化现象。活性炭的作用机理可能是通过吸附培养基中的生长调节剂(6-BA)从而降低玻璃化现象发生。胡继金^[31]、高疆生等^[32]认为青霉素可以克服香石竹试管苗玻璃化现象,而赵艳岭等^[33]认为青霉素对克服玻璃化苗无明显效果,对生根有作用。

2 香石竹超低温保存

2.1 研究概况

香石竹的超低温保存在国外开展的较早,较为成功。国内近两年才有相关研究报道。1976年Seibert^[34]以5% DMSO处理无菌分离的香石竹茎尖后投入液氮,得到33%的存活率,这是香石竹超低温保存的首例报道。1年后Seibert等^[35]采用4℃低温锻炼3~10d后,进行超低温保存,80%的茎尖得

到恢复生长。Uemura 等^[36]结合以上两种方法以 DMSO 作为冷冻保护剂在 0℃ 培养几天后两步降温投入液氮,得到 60% ~ 80% 的存活率。1991 年 Fukai 等^[37]利用 10% DMSO 在 0℃ 预培养 1h,采用两步冰冻法成功地对石竹科 5 个属 38 个品种的茎尖进行了超低温保存,并将其中一个品种保存长达 4 年,几乎得到 100% 存活率和再生率,冻存后的材料能正常地生长和开花。1987 年, Dereuddre 等^[38]提出以高浓度蔗糖溶液预培养可以代替低温处理,这在超低温保存技术上是一个很大的进步。Tannoury 等^[39]于 1991 年采用包埋玻璃化法对香石竹进行超低温保存,获得 70% 以上的存活率,这是包埋玻璃化法的首例报道。Halmagyi 等^[40]于 2002 年对香石竹顶芽玻璃化法超低温保存过程中的一些影响因素如玻璃化液的种类、浓度、处理温度、处理时间等进行了研究,结果表明:采用 100% PVS2,即 30% 甘油 + 15% 乙二醇 + 7% 二甲基亚砷(DMSO)在 0℃ 下处理 10min 效果较好。2007 年, Halmagyi 等^[41]采用包埋玻璃化法对 3 个香石竹品种的茎尖进行保存,获得 60% ~ 73% 的再生率。周旭红等^[42]2011 年采用玻璃化法对香石竹茎尖进行了超低温保存,获得了 44.13% 的存活率,具体程序如下:取继代 30d 的无菌组培苗,切取 1cm 的茎段于 MS + 0.5mol/L 蔗糖 + 5% DMSO 预培养 1d, 2mol/L 甘油 + 0.4mol/L 蔗糖装载 40min, PVS2 脱水 40min。

2.2 保存方法

已报道的香石竹超低温保存方法可以概括为传统的两步降温法和现代的包埋脱水法、玻璃化法和包埋玻璃化法。传统的超低温保存方法是 20 世纪 70、80 年代发展起来的,主要包括低温冷冻剂处理及随后的程序降温仪缓慢降温。该法的主要程序:蔗糖或多元醇预培养 - DMSO 装载 - 冷冻诱导的细胞脱水 - 投入液氮 - 快速化冻。该法主要是通过细胞外结冰对细胞进行脱水。包埋脱水法是基于人工种子的生产技术发展而来的。将香石竹茎尖包埋成球后,在富含蔗糖的液体培养基中预培养 18h,将包埋球置于无盖培养皿中,在无菌空气流下脱水 0 ~ 6h。该程序脱水时间要受无菌空气流的温度和它的相对湿度等参数的影响。玻璃化法是将茎尖用蔗糖和(或)DMSO 预培养后进行装载处理,然后用玻璃化液脱水后快速投入液氮,并要求快速化冻。装载一般用 2M 甘油 + 0.4M 蔗糖或稀释的玻璃化液。该法主要是通过高浓度玻璃化液诱导脱水,快速降温使细胞连同玻璃化液迅速进入玻璃化态,快速化冻以避免升

温过程中次生结冰^[40,42]。包埋玻璃化法将包埋脱水法和玻璃化法相结合,以极端浓度混合的低温保护剂在室温下脱水取代了冷冻诱导的脱水和无菌空气流的脱水,降低了包埋脱水法中不可控因素的影响。

2.3 影响因素

2.3.1 取材部位 香石竹超低温保存所选取的材料有腋芽^[42]和顶芽^[40]的茎尖。香石竹顶芽的存活率高于腋芽的存活率,随距离顶端节数的增加,存活率下降。Dereuddre 等^[43]以继代 2 个月的植株为材料,以距离该植株顶芽的节数为对象进行研究。结果表明:1 ~ 4 节腋芽的抗冻性与顶芽相似,存活率为 90%,第 5 节存活率为 68%,从第 5 节开始抗冻性逐渐下降,接近茎基部的腋芽存活率为 10%。继代两个月的腋芽比来自相同植株的顶芽对深度低温更敏感,且这种敏感性随距顶芽距离的增加而增加。这可能与顶端优势产生的相关抑制物所导致的生理差异密切相关,也可能与生理年龄、生理活性、内源糖含量、含水量以及体积大小等因素有关。这种现象在甘薯、欧洲板栗中也有类似的报道^[44,45]。但刘艳霞、艾鹏飞等分别在对菊花、柿、君迁子的研究中认为,腋芽较顶芽数量多,容易剥取且不易造成机械损伤,存活率也较高^[46,47]。

2.3.2 继代时间 以继代两个月的植株 5 ~ 9 节的腋芽为材料,对其进行茎段培养^[43],通过观察培养天数与存活率的关系发现:没有进行茎段培养的腋芽,存活率为 30% (相同条件下顶芽的存活率 90%),培养 2d 内,存活率迅速上升到 61%,第 3 天降为 21%,4 ~ 5d 存活率逐渐下降,在第 5 天以后存活率逐渐上升,一直到 14d 达到相对稳定,在 14d 和 21d 存活率分别为 94% 和 98%。去掉顶芽后腋芽的抗冻性在 1 ~ 2d 内被迅速激活,但需经过几周的继代培养才能获得与顶芽相似的最大的抗冻性。这似乎暗示了器官所处的生理阶段的重要性。

2.3.3 预培养 DMSO 和蔗糖是香石竹预培养最常用和最有效的两种物质^[21],DMSO 的浓度影响存活率。单独在含 0.75mol/L 蔗糖和 1mol/L 蔗糖的培养基中预培养时,存活率为 35% 和 42%。当 0.75mol/L 蔗糖与 2.5% DMSO 混合时,存活率提高到 93%,与 5% ~ 15% DMSO 混合时存活率将近 100%。产生 100% 存活率的 DMSO 的浓度也依赖于蔗糖的浓度,即当蔗糖浓度为 0.3mol/L 时,达到 100% 存活率所需的 DMSO 的浓度为 10% ~ 15%;而当蔗糖浓度为 0.5mol/L 或 0.75mol/L 时,达到 100% 存活率所需的 DMSO 的浓度则为 5% ~ 15%。

对大多数植物而言,预培养可以显著提高其冻后存活率,但也有一些植物不需预培养,如香蕉、石楠、扶芳藤等^[48-50]。香蕉经预培养后并没有提高存活率,且茎尖褐化变黑,推测可能是受损组织释放的多酚物质发生氧化,在表面形成一种不可渗透的物质,从而影响冷冻保护剂的渗透和组织脱水。

2.3.4 装载和脱水 常用的装载液是 2mol/L 甘油 + 0.4mol/L 蔗糖或稀释的玻璃化液。但有一些材料不需装载,如柿子、苹果、梨^[51-52]的茎尖及一些物种的休眠芽等,推测可能是经过了自然或人工的抗寒锻炼已经发生了保护性脱水及其他提高抗寒力的变化。投液氮前一般用玻璃化液 PVS2 (30% 甘油 + 15% 二甲基亚砷 + 15% 乙二醇 + 0.4 mol/L 蔗糖)或 PVS3 (50% 甘油 + 50% 蔗糖)在 0℃ 对材料进行脱水。Kim 等^[53]以两种模式植物大蒜和菊花为材料,对 PVS2 和 PVS3 玻璃化液及其改进液(改变 PVS2 和 PVS3 中各组分的含量)进行研究,认为 PVS2 适合中等大小、耐化学毒性、对渗透胁迫中度敏感的材料,而 PVS3 适用于对化学毒性非常敏感、耐受渗透胁迫的较大异质体材料。周旭红^[42]利用玻璃化法对香石竹腋芽进行超低温保存,认为合适的装载(2mol/L 甘油 + 0.4mol/L 蔗糖)和脱水(PVS2)时间均为 40min。Halmagyi 等^[41]则将含香石竹茎尖的包埋球在 0.75mol/L 蔗糖中预培养 2d 后不经装载直接 PVS2 脱水 4h,二者都得到了较高的存活率。

可见不论是预培养、装载还是脱水最终目的都是使材料达到超低温保存所要求的生理特性,使细胞的含水量降到维持生理活性的最低水平,防止冷冻和化冻过程冰晶的形成,提高材料的抗冻能力。

2.3.5 冷冻和化冻 一般而言,在玻璃化程序中,细胞或器官只有快速冷冻和化冻以避免冰晶的形成,才能得到高的存活率。Tannoury^[39]对香石竹超低温保存过程中冷冻速度对存活率的影响进行了研究:包埋的茎尖经 0.75mol/L 蔗糖预培养和空气干燥后,直接投入液氮或两步冷冻投入液氮,都能获得高的存活率,降温速率(0.5 ~ 200℃/min)对存活率没有显著影响。经过预培养和高浓度冷冻保护剂处理后,香石竹茎尖包埋球含水量接近 20%,认为此时茎尖的存活率不依赖于冷冻和化冻的速率,而是依赖于冷冻和化冻过程中对玻璃态转化的耐受力。

目前最常见的是快速化冻,即冻存材料经 40℃ 水浴化冻后用含 1.2mol/L 蔗糖的 MS 液体培养基洗涤 2~3 次或在室温下直接用此培养基洗涤 2~3 次。

2.3.6 恢复培养 冻存后的材料对光照比较敏感,

一般要先进行一段时间的暗培养,再放到光下培养。另外,有的材料化冻后需要先在渗透势较高的半固体培养基中过渡培养一段时间,然后转到正常的恢复培养基中。恢复培养基通常需要加一定的激素,如赤霉素、细胞分裂素、玉米素等以促进存活和再生。细胞分裂素、玉米素分别对白杨和白桦的存活和再生是必需的^[54-55]。香石竹恢复培养基中一般添加 6-苄基嘌呤(6-BA)、生长素(IAA)、萘乙酸(NAA)。周旭红等^[42], Halmagyi 等^[41], Halmagyi 等^[40]采用的恢复培养基分别是 MS + 0.2mg/L BA + 0.1mg/L NAA, MS + 1.5mg/L BA + 0.5mg/L IAA, MS + 1.0mg/L BA + 0.2mg/L NAA。一般恢复培养一段时间需要转到新鲜的培养基中。

2.4 超低温保存效果的评价

2.4.1 存活率的鉴定 冻后存活率的快速鉴定通常采用染色法,如荧光双醋酸酯法(FAD)、氯化三苯四氮唑还原法(TTC)、Evans 蓝法、FDA-酚藏红花双染色法等。近年来发展了一些物理手段,如检测材料产生挥发性碳氢化合物(如乙烯、乙烷)的含量,检测某一部位离子流或分子流的情况等。染色法有时不能完全反映细胞或组织的再生能力,不足以衡量冻后材料的活力状况,而物理手段目前还没有得到广泛的应用。

2.4.2 遗传稳定性的检测 许多研究都证明超低温保存后材料未发生染色体或 DNA 水平的变化^[56-57],说明超低温保存在保持种质资源遗传稳定性方面具有其他保存方法所不具有的优越性。但是目前为止还没有关于香石竹冻存后再生苗遗传稳定性的研究报道。

3 问题及展望

香石竹种质资源离体保存主要包括试管苗保存和超低温保存。对于试管苗保存,国外开展研究较早,成果较多,技术较为成熟。相比而言,国内主要存在两个问题:(1)多以分生组织及茎段为外植体再生植株,而关于花瓣、花药、花丝等器官再生的报道相对较少。(2)关于延长继代时间的限制生长保存也鲜有报道。今后可以在这两个方面进行更多的研究,以完善国内试管苗保存体系。

对于香石竹种质资源的超低温保存,国内研究较少,虽国外早期研究颇多,但仍存在一些问题:(1)保存材料多局限于茎尖分生组织,可以对其他器官如花粉和种子进行保存,以完善香石竹超低温保存体系。(2)冻后存活率的鉴定目前还只停留在

通过观察恢复培养后离体器官或组织的形态发生能力。该法虽然直观准确,但所需周期较长。期待建立一种简单准确、不污染、不损伤材料的方法来快速鉴定材料的存活情况。(3)有必要对冻存过程中细胞内部结构、再生植株生理生化、遗传稳定性等方面进行深入研究。(4)有研究证实香石竹顶芽的存活率高于腋芽。因此,很有必要对影响顶芽和腋芽存活率的相关生理机理进行深入系统的研究。

参考文献

- [1] Villalobos V M, Engelman F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. World J Microb Biot, 1995, 11: 375-382
- [2] 郭达初, 柴明良, 刘克斌, 等. 培养基对香石竹试管苗生长及其玻璃化的影响[J]. 浙江农业学报, 1990, 2(4): 174-180
- [3] 黄章智. 切花栽培[M]. 北京: 中国林业出版社, 1986: 25-47
- [4] 丁小维, 梁雪妮, 桂敏, 等. 不同激素配比对康乃馨芽增殖及玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 269-271
- [5] 徐玉冰, 牛维和, 刘继红. 麝香石竹的花器官培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1986(3): 42
- [6] Robinson K E P, Firoozabady E. Transformation of floricultural crops[J]. Sci Hortic, 1993, 55: 83-89
- [7] Frey L, Saranga Y, Janick J. Somatic embryogenesis in carnation[J]. Hort Sci, 1992, 27: 63-65
- [8] Aamir A, Humera A, Shagufta N, et al. An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. Pak J Bot, 2008, 40(1): 111-121
- [9] 哈梅娟, 张生清. 香石竹无性繁殖技术研究[J]. 中国农学通报, 2002, 18(2): 56-57
- [10] 周长东. 香石竹组培快繁技术的研究[J]. 山西林业科技, 2005(2): 10-18
- [11] Miller R M, Kaul V, James F, et al. Shoot regeneration from fragmented flower buds of carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. Annals of Botany, 1991, 68(6): 563-568
- [12] 房立晶. 香石竹离体培养与试管开花研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008
- [13] Van Altvost A C, Koehorst H J J, Bruinsma T, et al. Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Sci Hort, 1992, 51(3-4): 223-235
- [14] Messegue J, Arconada M C, Mele E. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Sci Hort, 1993, 54(2): 153-156
- [15] 林荣呈, 包满珠. 香石竹的叶片培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 205-206
- [16] Nontaswatsri C, Fukai S, Touma T, et al. Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explants of various carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars [J]. Hortic Sci Biotechnol, 2002, 77(5): 520-525
- [17] Frey L, Janick J. Organogenesis in carnation[J]. Am Soc Hortic Sci, 1991, 116: 1108-1112
- [18] 余义勋, 刘娟旭, 包满珠. 香石竹植株再生及基因工程研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(1): 23-28
- [19] 刘丽娜. 一种适宜香石竹茎段诱导芽的培养基组合物及其应用: 中国, 200510031007[P]. 2007-04-25
- [20] Nakano M, Mii M. Antibiotics stimulate somatic embryogenesis without plant growth regulators in several *Dianthus* cultivars [J]. Plant Physiol, 1993, 141(6): 721-725
- [21] Dereuddre J, Tannoury M. Cryopreservation of germplasm of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Biotechnol Agr For, Cryopreservation of Plant Germplasm I. 1995, 32: 459-475
- [22] 吴若菁, 尤华明, 彭东辉. 香石竹组培苗玻璃化控制的研究[J]. 福建林学院学报, 1995, 15(4): 360-363
- [23] 肖玉兰, 仇明华, 周永和. 克服香石竹试管苗玻璃化现象的研究[J]. 云南大学学报, 1997, 12(3): 188-193
- [24] Budiarto K. The occurrence of hyperhydricity on several carnations (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars during low temperature storage [J]. Biodiversitas, 2009, 10(3): 104-107
- [25] Casanova E, Moysset L, Trillas M I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots [J]. Biol Plantarum, 2008, 52(1): 1-8
- [26] Yadav M K, Gaur A K, Garg G K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2003, 72(2): 153-156
- [27] 黄冬华, 周群, 陶秀花, 等. 矮生香石竹的组织培养和快速繁殖[J]. 中国农学通报, 2007, 23(9): 103-106
- [28] 黄宇翔, 李章汀, 张晓耕. 香石竹茎尖试管苗继代培养玻璃化现象的研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 81-83
- [29] 周音, 张智奇, 张建军, 等. 生菜遗传转化中克服玻璃苗的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(2): 62-64
- [30] 沈宁东, 郭辉, 韦梅琴. 活性炭对香石竹试管苗继代培养的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 979-980
- [31] 胡继金. 青霉素在香石竹组织培养中的作用[J]. 园艺学报, 1991, 18(1): 87-90
- [32] 高疆生, 张卫芳, 段黄金, 等. 克服香石竹试管苗玻璃化研究[J]. 北方园艺, 2001(3): 34-36
- [33] 赵艳岭, 刘志强, 邢红华, 等. 克服香石竹组织培养中玻璃苗的研究[J]. 河南科学, 2005, 23(5): 689-691
- [34] Seibert M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C [J]. Science, 1976, 191: 1178-1179
- [35] Seibert M, Wetherbe P J. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment [J]. Plant Physiol, 1977, 59(6): 1043-1046
- [36] 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.
- [37] Fukai S, Goi M, Tanaka M. Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals [J]. Euphytica, 1991, 56(2): 149-153
- [38] Dereuddre J, Galerme M, Gazeau C. Effets du saccharose sur la résistance à la congélation dans l'azote liquide (-196°C) des méristèmes d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* 23 L.) cultivés *in vitro*. [J] Comptes Rendus de l'Académie des Sci, 1987, 304(3): 485-488
- [39] Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, et al. Cryoconservation par vitrification d'apex enrobe's d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivé *in vitro* [J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sci, 1991, 313(3): 633-638
- [40] Halmagyi A, Schumacher M H. Cryopreservation of carnation shoot apices by vitrification [J]. Contributii Botanice, 2002, 37: 165-172
- [41] Halmagyi A, Deliu C. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification [J]. Sci Hort, 2007, 113(3): 300-306
- [42] 周旭红, 何艳, 欧阳德爱, 等. 玻璃化法超低温保存香石竹种质资源的研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 248-252
- [43] Dereuddre J, Fabre J, Bassaglia C. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. *eolo*) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets [J]. Plant Cell Rep, 1988, 7: 170-173
- [44] Pennycooke J C, Towill L E. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 733-737
- [45] Vidal N, Sanchez C, Jorquera L, et al. Cryopreservation of Chestnut by Vitrification of *In vitro*-Grown shoot tips [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2005, 41: 63-68

(下转 298 页)

位推行惠益机制,以及建立执行机构。

5.5 加强利用研究

通过成功利用的业绩来促进保护,是比较符合目前经济建设需要的方法,可以通过加强种质创新,以及与育种者合作来强化利用研究,加速野生稻优异种质利用,从而促进野生稻保存条件的改善,达到安全保存的目的。

5.6 加强技术培训

广西野生稻保护涉及到行政部门领导、乡村干部群众,也涉及到科研单位,是一个社会科学与自然科学交汇的复杂系统工程。因此,必须加强沟通,强化技术培训,才能做好保护工作。应利用现有电视、广播、会议、墙报等多重形式进行培训与宣传,普及保护技术,提高意识,促进保护与利用。


参考文献

- [1] 李克敌. 广西野生稻原生境保护点建设的进展、问题和对策[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 230-233
- [2] 陈成斌, 赖群珍, 徐志健, 等. 广西野生稻种质资源保护利用现状与展望[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 338-342
- [3] 陈成斌, 李杨瑞, 黄一波, 等. 广西野生稻种质资源原保护示范区资源现状调查研究[J]. 广西农业科学, 2005, 36(3): 269-272
- [4] 陈成斌, 李杨瑞, 王启德, 等. 玉林野生稻种质资源原保护示范区生态学初探[J]. 广西农学报, 2005(6): 17-18
- [5] 陈成斌, 李杨瑞, 赖群珍, 等. 野生稻原位保护区种质资源保护管理体系探讨[J]. 广西农业科学, 2006, 37(3): 213-217
- [6] 陈家裘, 侯兆新, 覃初贤, 等. 提高野生稻种子发芽力方法研究[J]. 广西农业科学, 1989(1): 1-4
- [7] 陈成斌. 广西野生稻资源研究[M]. 南宁: 广西民族出版社, 2005: 327-370
- [8] 盖红梅, 陈成斌, 沈法富, 等. 广西武宣濠江流域普通野生稻居群遗传多样性及保护研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 156-162
- [9] 任民, 陈成斌, 荣延昭, 等. 桂东南地区普通野生稻遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1): 31-36
- [10] 李亚非, 陈成斌, 张万霞, 等. 我国北回归线区域普通野生稻遗传多样性和遗传结构研究[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 280-284
- [11] 陈成斌, 赖群珍, 梁世春, 等. 野生稻种质资源信息与实物共享机制探讨[J]. 广西农业科学, 2007, 38(4): 479-483
- [12] 陈成斌, 张烨, 梁云涛, 等. 有机大米产业化与野生稻种质利用[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 260-265
- [46] 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
- [47] 艾鹏飞, 罗正荣, 柿和君. 子试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及再生植株遗传稳定性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2023-2027
- [48] Panis B, Piette B, Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae[J]. Plant Sci, 2005, 168(1): 45-55
- [49] 王越, 刘燕. 玻璃化法超低温保存石楠茎尖的初步研究[J]. 林业科学, 2006, 42(12): 134-136
- [50] 王贞, 高建洲, 刘燕. 扶芳藤茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 303-304
- [51] 张永卓, 罗正荣. 甜柿休眠芽茎尖包埋-玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2019-2022
- [52] Niino T, Sakai A, Yakuwa H, et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1992, 28(3): 261-266
- [53] Kim H H, Lee Y G, Shin D J, et al. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures[J]. Cryo Letter, 2009, 30(5): 320-334
- [54] Lambardi M, Fabbri A, Caccavale A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(3): 213-218
- [55] Touchell D T, Turner S R, Senaratna T, et al. Cryopreservation of Australian species-the role of plant growth regulators[J]. Biotechnol Agr For, Cryopreservation of plant germplasm II., 2002, 50: 373-390
- [56] Liu Y, Wang X, Liu L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification[J]. Plant Sci, 2004, 166(3): 677-685
- [57] Harding K, Benson E E. Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato[J]. Cryo Letter, 2000, 21(5): 279-289

香石竹种质离体保存研究进展

作者：[张晓宁](#)，[陈晓玲](#)，[卢新雄](#)，[徐有明](#)，[张金梅](#)，[辛霞](#)，[张志娥](#)，[ZHANG Xiao-ning](#)，[CHEN Xiao-ling](#)，[LU Xin-xiong](#)，[XU You-ming](#)，[ZHANG Jin-mei](#)，[XIN Xia](#)，[ZHANG Zhi-e](#)

作者单位：[张晓宁, ZHANG Xiao-ning\(华中农业大学园艺林学学院, 武汉430070; 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京100081; 江西省农业科学院水稻研究所, 南昌330200\)](#)，[陈晓玲, 卢新雄, 张金梅, 辛霞, 张志娥, CHEN Xiao-ling, LU Xin-xiong, ZHANG Jin-mei, XIN Xia, ZHANG Zhi-e\(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京, 100081\)](#)，[徐有明, XU You-ming\(华中农业大学园艺林学学院, 武汉, 430070\)](#)

刊名：[植物遗传资源学报](#)

英文刊名：[Journal of Plant Genetic Resources](#)

年，卷(期)：2012, 13(2)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201202021.aspx