

离体保存技术在植物种质资源保存中的应用

洪森荣, 郭连金

(上饶师范学院, 江西 上饶 334001)

摘 要:植物种质资源的保存研究对于生物多样性保护和新品种选育均具有十分重要的意义。文章介绍了利用组培技术和低温生物技术对不同植物组织器官进行组织培养保存、超低温保存的研究现状和应用前景,并提出了有待继续研究的相关问题。

关键词:种质资源; 离体保存; 组织培养; 超低温保存

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2237(2006)03-0092-06

种质资源是大自然留给人类的宝贵遗产,是物种进化、遗传学研究及植物育种的物质基础,是保障人类良好生存环境和衣食住行必不可少的财富,是关系到一个国家和民族竞争力的重要战略物质。因此,植物种质资源保存已成为全球性关注的热点课题^[1]。

种质资源的保存方式从大的方面分为两大类^[2]:原地保存(*in situ conservation or on-site maintenance*)和异地保存(*ex situ conservation or off-site maintenance*),这两种方法保存植物种质资源均需要大量的土地和人力资源,成本高,且易遭受各种自然灾害的侵袭^{[3][4][5][6]}。所以寻找一种更好的保存方法迫在眉睫。自1975年 Henshaw 和 Morel 首次提出离体保存(*conservation in vitro*)植物种质的策略以来,该项技术受到植物界的高度重视。常用的离体保存方法有组织培养保存法(*tissue culture conservation*)和超低温保存法(*cryopreservation*)。前者适合中短期保存,后者用于长期保存。

1 组织培养保存法

利用组织培养技术保存种质资源的理论基础是植物细胞具有全能性的学说。该技术只适合于试验材料、育种材料等的短期保存,一般采用正常生长的途径,也就是将带有腋芽的茎段接种在 MS 半固体培养基上或液体培养基的滤纸上,然后放在 20-25℃ 的条件下培养,并适时进行继代培养,一般 60-90 d 繁殖一次。按组织培养技术保存种质的原理,可将该保存方法分为常温继代保存法(*room temperature subculture conservation*)和缓慢生长保存法(*slow growth conservation*)^[7]。

1.1 常温继代保存法

指在常温条件下,每隔一段时间,将植物细胞或组织进行新一轮的继代培养,以达到保存种质的目的^[8]。芋无根试管苗在 MS + BA $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基中,可在常温下保存 370 d,苗存活率达 92%^[9]。

1.2 缓慢生长保存法

缓慢生长保存,是指通过在培养基中加入化学物质或采用一些物理方法,限制或延缓培养物的生长,使组织或细胞的生长速率降至最小限度,但不死亡,从而达到延长继代培养时间的目的^[10]。限制细胞生长速

度的途径主要有:改变培养物最适生长温度;调整培养基养分水平;应用渗透性化合物或生长抑制剂;降低培养环境中氧含量等。

1.2.1 降低培养温度

降低培养温度是植物组织培养物缓慢生长保存最常用的方法。较低温度可以减缓植物的生长速度,在一定温度范围内试管苗的存活率随保存温度的降低而提高,这种方法适合于保存中短期的种质材料。一般用1~9℃低温保存外植体,但热带、亚热带植物在10~25℃之下也能延缓外植体的生长。此法已在众多无性繁殖的园艺植物上应用,如葡萄、草莓、苹果和一些茄属植物等。张玉进等^[11](1999)指出花魔芋(*Amorphophallus Konjac* K. Koch)的不定芽在附加6-BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 0.05 - 0.1 mg·L⁻¹的MS - NN₄⁺培养基上,在4℃黑暗条件下保存180 d后,存活率仍为100%;兰芹英等^[12](2004)在12℃、18℃和24℃条件下对蒙自凤仙花茎尖进行离体保存,结果表明,蒙自凤仙花茎尖最适保存温度为12℃,保存1 a(年)后存活率为100%;刘月学等^[13](2004)研究了低温条件下枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)试管苗离体保存的效果,结果表明,在低温条件下,枇杷试管苗生长缓慢,保存时间较长,在11℃和15℃条件下,品种“解放钟”和“早钟6号”1 a后的死亡率分别为20%、25%和15%、20%。

1.2.2 调整培养基养分水平

植物生长发育状况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。通过调整培养基的养分水分,可有效限制细胞生长,使培养植物处于最小生长阶段,也称“饥饿法”。Zee 和 Munekata^[14](1992)在无茵水、完全MS及1/4 MS(即无机盐浓度只有完全MS的25%,有机物含量与完全MS等同)等几种培养基中保存菠萝试管苗(*Ananas spp.*),结果显示在无茵水中保存1 a后,81%的植株仍保持活力,且比保存在完全的MS培养基中的试管苗活力强,在1/4 MS培养基中保持菠萝试管苗效果最好,存活率及再生率都达到100%;铁皮石斛试管苗接种在MS、1/2 MS和1/4 MS培养基上,在低温下保存80 d后发现,MS培养基上的植株生长势最旺,但根少而短,保存1 a后,情况发生了变化,MS培养基保存效果最差,存活率只有41.67%,而1/4MS和1/2MS培养基上的存活率分别为91.67%和100%^[15];咖啡分生组织培养的小植株在无蔗糖的1/2MS培养基上,可保存2~2.5 a^[16]。

1.2.3 添加化学物质

生长抑制物质是一类天然的或人工合成的外源激素,具有很强的抑制细胞生长的生理活性。试验表明,完善和调整培养基中的生长调节剂配比,特别是添加生长抑制物质,利用激素调控技术,不仅能延长培养物在试管中的保存时间,而且能提高试管苗素质和移植成活率。目前,常用的生长抑制物质种类有CCC、B₉、PP₃₃₃、S3307、ABA、TIBA、麟甘酸、甲基丁二酸等。在MS + IBA 0.984 μmol·L⁻¹培养基中添加0.216~28.8 μmol·L⁻¹浓度的PP₃₃₃,可使甘薯品种“徐薯18”试管苗在常温下保存1 a以上,外源赤霉素能消除甘薯试管苗的多效唑处理后效应,0.289~0.434 μmol·L⁻¹浓度的赤霉素可使保存后的甘薯试管苗生长量恢复到正常水平^[17];PP₃₃₃与6-BA, NAA配合使用明显抑制水稻试管苗上部生长,促进根系发育,延长常温保存时间^[18];但PP₃₃₃对草莓试管苗保存成活率差异不十分明显^[19]。S3307能显著抑制葡萄试管苗茎叶的生长从而促进其根系的加粗,提高根冠比,使试管中扦插的葡萄茎段产生极度缩小的微型枝条,宜于在试管内进行中长期保存^[20]。在室温(10~30℃)条件下,含有0.1 μg·g⁻¹ ABA的MS培养基可以有效地减少猕猴桃试管苗继代培养的次数,延长保存时间,随着ABA浓度的增加和保存时间的延长,猕猴桃试管苗丙二醛含量积累,超氧化物歧化酶活性下降^[21];适宜含量的脱落酸也具有延缓葡萄试管苗的生长效果,可用于葡萄试管苗的常温保存,延长转接时间^[22]。

在培养基中添加一些高渗化合物,如蔗糖、甘露醇、山梨醇等,也是一种常用的缓慢生长保存手段。对蒙自凤仙花茎尖的离体保存研究结果表明,添加1%~5%甘露醇的MS培养基对茎尖的生长有抑制作用,甘露醇最适浓度为3%,保存1 a后存活率为100%^[23];附加不同浓度甘露醇的MS培养基,具有增加百合离体种质存活率的作用,其中MS + 2%甘露醇的处理效果最好,保存1 a后的存活率高达92.9%^[24];但权银等^[25](1996)发现用高浓度甘露醇取代蔗糖不利于柑桔种质的离体保存,培养物用蔗糖保存1 a后的成活率为60

~70%, 而用2%甘露醇取代蔗糖的处理, 其成活率仅为50%。

在培养基中同时添加不同的化学物质, 也可达到较好的保存效果。铁皮石斛试管苗在 $1/2$ MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭 + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基上, 连续保存1 a, 存活率达100%^[26]; 马铃薯茎尖在含有脱落酸和甘露醇或山梨醇的培养基上保存1 a后, 生长很健壮, 转移到MS培养基上生长正常^[27]。

1.2.4 降低培养环境中氧含量

降低培养环境中氧气浓度或培养基中氧分压, 抑制外植体的细胞生理活动, 减慢培养材料的生长速度, 也可以达到种质保存的目的。最简单的方法是在保存材料上加盖一层如液态石油、石蜡等物质, 从而使其氧气量降低^[28]。Bridge 和 Staby^[29] (1981) 首次采用降低培养物周围的氧含量来保存烟草、菊的小植株, 保存42 d后取出, 其整个生长发育过程中没有发生表型变化; Dorion^[30] (1994) 的研究表明, 桃及桃 × 柠檬杂种茎尖在低氧(0.20% ~ 0.25%)条件下保存1 ~ 2 a, 不仅全部成活, 而且后期再生能力强, 但是如果氧的含量降得过低, 则其生长速度下降, 并导致毒害。因此, 有关低氧对离体保存的影响还有待研究。

2 超低温保存法

19世纪末, 诞生了一门新的科学——低温生物学(Cryobiology)。1949年发现了甘油可以防止冰冻对活细胞的伤害, 对低温生物学有重要贡献, 从而导致了在许多不同领域内广泛应用低温保护技术^[10]。超低温保存是指在-80℃(干冰温度)到-196℃(液氮温度)甚至更低温度下保存生物材料, 是目前植物种质资源长期稳定保存的最好方法, 它是将低温生物学和微型繁殖(Micropropagation)相结合的一种新型的离体保存技术(或称细胞工程技术)^[7]。自Nag 和 Street^[31] (1973)首次成功地超低温保存了胡萝卜的悬浮细胞以来, 超低温保存技术日趋完善。到目前为止, 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、花粉、胚或体胚、种子等, 大部分已成功地实现了植株再生^[32]。

2.1 种子的超低温保存

种子蕴藏着极为丰富的遗传信息, 它的长期保存是解决当前及今后品种退化问题、增强抗性的基础, 同时还可防止由于单一保存无性系可能造成的基因特异性丧失。郑郁善等^[33] (2002)研究了板栗种子的超低温保存, 结果表明, 超低温保存后板栗种子能保持较高的萌发率, 其离体胚也能维持较高的脱氢酶和 α -淀粉酶活性; 刘燕等^[34] (2001)对18个科47种花卉种子进行了超低温保存研究, 认为花卉种子在自然含水量状态即可存于液氮(LN)中, 超低温保存对一些花卉种子萌发表现出促进作用; 通过控制芝麻种子的含水量和冷冻速率, Stanwood^[35] (1987)成功地保存了芝麻种子, 超低温保存后存活率可达80%以上。

2.2 芽及茎尖分生组织的超低温保存

芽的超低温保存是保存无性繁殖植物种质的方便途径。章志宏等^[36] (2000)对水稻单倍体不定芽的超低温保存进行了研究, 发现经继代培养的不定芽超低温保存后的存活率为21% ~ 29%, 再生出苗率为14% ~ 18%, 而未经继代培养的不定芽超低温保存后的存活率仅为8%, 且均不能再生成苗; 大麦幼穗经添加 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的2 d预培养, 用玻璃化保护剂冰浴处理5 min后, 直接投入液氮贮存, 三个品种“81G1”、“戈贝纳”和“旭9”的存活率分别为100%、82.5%和50%, 存活的幼穗能形成愈伤并能再生植株^[37]; Yakuwa H 和 Oka S^[38] (1988)报道, 桑树芽经液氮保存后, 能够再生正常植株。

茎尖分生组织作为种质超低温保存的材料, 具有许多独特的优越性如茎尖分生组织在遗传上更稳定, 具有更快的营养繁殖方式, 能产生无病植株并且可经受突然的冷冻^[39]。因此, 茎尖离体培养不仅逐渐发展成为农作物无性系的繁殖和脱毒的重要手段, 而且是超低温保存植物种质的理想材料和可靠的途径, 还可借此建立无病毒的种质库。王子成等^[40] (2004)对印度酸橘(*Citrus reticulata*)和飞龙枳(*Poncirus trifoliata*)杂交植株的茎尖进行了玻璃化法超低温保存, 结果表明, 柑橘体细胞杂种茎尖超低温保存后, 可获得92%的再生率; 曾继吾等^[41] (2004)研究了番木瓜(*Carica papaya* L.)茎尖的玻璃化法超低温保存, 发现3 ~ 5 cm番木瓜茎尖超低温保存后, 其成活率和再生率分别为53.7%和52.6%, 再生植株生根后可移栽成活; 赵艳华等^[42] (2001)对“品丽珠”葡萄离体茎尖的包埋干燥法超低温保存进行了研究, 发现葡萄侧芽茎尖, 经蔗糖预培养3

d、干燥 5 h,两步降温 and 直接在 MS 培养基上培养,存活率可达 40%; Fukai 等^[43](1991)对石竹科的 5 个属 38 个种和栽培种进行了茎尖的液氮保存,冻后所有种的茎尖均能存活并发育为正常植株; Dereuddre 等^[44](1988)从离体培养的石竹植株上切取茎尖分生组织成功地进行了超低温保存,并且认为茎尖分生组织冻后发育的离体植株无病毒,生长容易控制,所以它们是种质保存的更佳来源。

2.3 花粉的超低温保存

超低温保存花粉可延长花粉寿命,解决花期不育和异地植物的杂交困难,减少病虫害传播。建立起花粉种质库,可以为国际间的种质交换提供便利。王家福等^[45](2004)采用花粉干冻法对枇杷花粉超低温保存进行了研究,结果表明,脱水至 30% 左右的含水量能够保证超低温保存后花粉的生活力,解冻温度及方式对超低温保存后花粉的生活力没有明显的影响;王玉萍等^[46](2003)报道,冷冻前干燥处理 18 h 的马铃薯花粉,超低温保存后其生活力优于干燥处理 12 h 和 24 h 的花粉,超低温保存对花粉萌发表现出某些促进作用;玉米自交系“黄早四”和“郑 1142”的花粉在超低温(-196℃)保存 1~2 a 后,冷冻花粉的过氧化物酶同工酶谱类型没有发生变化,冷冻保存的“郑 1142”花粉授粉后所产生的种子的过氧化物酶同工酶和可溶蛋白电泳图谱没有发生变化,并且其花粉母细胞减数分裂时染色体数目和结构均属正常,保持了原自交系的特征^[47]。

2.4 幼胚及胚状体的超低温保存

幼胚诱导形成愈伤组织的分化能力很强,通过分离出顽拗型种子胚或其片段进行超低温保存,是解决其难以长期保存这一难题的有效途径,所以胚种质库在种质资源保存中起着非常重要的作用^[48]。陈礼光等^[49](2001)对锥栗种子离体胚的超低温保存进行了研究,结果表明,锥栗种子离体胚含水量为 20% 时,其冻后脱氢酶活性最高;黄纯农等^[50](1992)研究了大麦幼胚的超低温保存,认为山梨醇预培养 2 d 可提高大麦幼胚的存活率,4℃ 预处理 4 h 对胚存活率的影响不大,但它使幼胚分化能力下降,冻后幼胚经过恢复培养,可长出绿苗。

2.5 愈伤组织及悬浮培养细胞的超低温保存

愈伤组织和悬浮培养细胞也可进行超低温保存。胡明珏等^[51](2004)报道了拟南芥悬浮细胞系的玻璃化超低温,指出冻后细胞能恢复生长,恢复生长的细胞能够保持植株再生能力;陈勇等^[52](2004)对瓯柑愈伤组织的玻璃化超低温保存进行了研究,指出瓯柑愈伤组织在液氮中保存 24 h 后,用 TTC 法检测,其存活率可达 85.62%,冻后的愈伤组织转移到 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 继代培养基上,存活率可达 76.32%; Kuriyama A 等^[53](1990)发现,薰衣草细胞冻后恢复生长时,其培养基成分需做适当改变,若培养基中加入活性炭则可大大提高其存活率; Chulafich L. 等^[54](1994)研究了山药 *Dioscorea caucasica* Lipsky 和 *Dioscorea balcanica* Kosanin 体细胞胚的离体培养,并且对其器官诱导出来的愈伤组织成功地进行了超低温保存。

2.6 原生质体的超低温保存

原生质体具有多种用途,特别是在开辟作物育种新途径方面有着广阔的应用前景。它是进行细胞杂交和基因工程的基础材料,也是进行植物生理学和植物病理学研究的良好的实验体系,对原生质体进行超低温保存的初步研究结果表明,这种保存不仅是必要的,而且冷冻原生质体优于冷冻细胞,由于原生质体没有细胞壁,排除了冷冻期间细胞中产生的张力,所以受伤害较少,存活率提高,同时能筛选出抗逆性强、生长处于优势的细胞系。但原生质体的超低温保存由于操作复杂、技术难度大,故成功的例子不多。王子成等^[55](2002)对柑橘原生质体的超低温保存进行了研究,发现玻璃化保护剂加入小牛血清蛋白对原生质体的超低温保存有利,不同品种的胚性愈伤组织原生质体超低温保存后的成活率不同,不同倍性的“伏令夏橙”原生质体超低温保存后的成活率也不同,其中二倍体成活率最高,其次为四倍体、六倍体成活率最低;马锋旺等^[56](1998)研究发现,不同品种和不同供体材料的原生质体超低温保存的效果不同,“龙王帽”杏悬浮培养物分离的原生质体超低温保存后的成活率可达 40%,保存后成活的原生质体分裂频率和植板率均有所提高。

3 结语

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,目前正广泛用于生产实践的各个领域。我国从 20 世纪 70 年代开始试管苗种质资源保存技术的研究,通过大量试验研究已解决了试管苗离

体保存的一系列技术条件。离体保存技术的应用可保存特殊基因型、无病毒材料,也可保持愈伤组织和细胞株(系)的特殊生化能力和其形态发生的潜能以及降低其代谢水平,延缓衰老等。此外,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,这也是此项技术具有广阔应用前景的一大优点。

植物种质的离体保存技术目前虽已取得一定进展,但因时间短,已有的结果应该是较初步的,许多问题尚需进一步探讨,例如,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,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如何?能否再生植株?这些都还没有实践的先例。另外,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还有待于进一步研究开发。离体保存技术的进一步改进以及保存后植株遗传稳定性的研究都将是今后植物离体保存的研究重点。相信随着研究工作的不断拓展和深入以及技术设施的不断改进,离体保存技术将日臻成熟,有望在不久的将来得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] Lyndsey A, Withers L A. *In vitro* approaches to conservation of plant genetic resources[A]. In: Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications (Lyndsey A. Withers and P.G. Aldersons)[C]. London: Butterworths, 1986: 261 - 276.
- [2] Hawkes J G. Germplasm collection, preservation and use[A]. In: Plant Breeding [Kenneth J. Freg ed.][C]. New Delhi: Gayatri Offsite Press, 1981: 57 - 84.
- [3] Villalobos V M, Engelman F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. *Biotechnol*, 1995, 11 (4): 375 - 382.
- [4] Marin M I, Durran - Vila N. Conservation of citrus germplasm *in vitro* [J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1991, 116(4): 740 - 746.
- [5] Tony H H, Chen and Kutty K. Karths. Cryopreservation of plant cells and organs[A]. In: Forest and Crop Biotechnology Progress and Prospects (Fredrick A. Valentine Ed) [C]. Neidelberg, London, Paris, Tokyo: Sprigner - Verlag. 1988: 217 - 240.
- [6] Ford. Lloyd B V, Jackson M T. Biotechnology and Methods of conservation of plant genetic resources[J]. *J. Biotechnol*, 1991, 43(1):247 - 256.
- [7] 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.
- [8] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 194 - 203.
- [9] 毕可华. 芋试管苗离体培养与保存技术研究[J]. 北方园艺, 1998, (2): 9 - 10.
- [10] Mantell S H, Smith H. Plant biotechnology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983: 187 - 218.
- [11] 张玉进, 张兴国, 刘佩英. 魔芋不定芽的低温保存研究[J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(4): 303 - 306.
- [12] 兰芹英, 殷寿华, 何惠英, 等. 蒙自凤仙花的离体保存[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 146 - 148.
- [13] 刘月学, 刘小军, 王家福, 等. 低温等因素对枇杷种质离体保存的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 28 - 31.
- [14] Zee F T, Munekata M. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas spp.*) germplasm[J]. *Hort Science*, 1992, 27(1): 57 - 58.
- [15] 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.
- [16] Kartha K K. Germplasm preservation of coffee (*Coffea Arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems[J]. *Plant Sci. Lett*, 1981, 22(2): 301 - 307.
- [17] 张希太. 应用多效唑常温保存甘薯试管种质的研究[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(1): 41 - 43.
- [18] Jarret R L., Gawal N. Chemical and environmental growth regulation of sweet potato *in vitro* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 25(1): 153 - 159.
- [19] 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.
- [20] 李朝周, 李唯, 曹改义. S3307 在葡萄试管苗生长和保存中的应用[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(1): 18 - 20.
- [21] 郭延平, 李嘉瑞, 吉爱梅. ABA 对猕猴桃种质离体保存的生理效应[J]. 西北农业学报, 1995, 4(1): 84 - 87.
- [22] 李唯, 曹改义, 张利平. 几种生长抑制剂对葡萄生长的影响[J]. 园艺学报, 1992, 19(3): 215 - 220.
- [23] 兰芹英, 殷寿华, 何惠英, 等. 蒙自凤仙花的离体保存[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 146 - 148.
- [24] 辛淑英, 谢欣. 甘露醇浓度对百合种质离体保存的影响[J]. 作物品种资源, 1995, (3): 50 - 52.
- [25] 权银, 陈竹生, 郭天池, 等. 柑桔种质的离体保存[J]. 中国南方果树, 1996, 25(4): 3 - 5.
- [26] 史永忠, 潘瑞炽, 王小菁, 等. 铁皮石斛种质室温离体保存[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 1999, (4): 73 - 77.
- [27] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 24 - 74.
- [28] Villalobos V M, Engelman F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. *Biotechnol*, 1995, 11 (4): 375 - 382.
- [29] Bridgin M P, Staby G L. Low pressure and low oxygen storage of plant tissue cultures[J]. *Pl. Sci. Lett*, 1981, 22(2): 177 - 186.

- [30] Dorion N. Effects of temperature and hypoxic atmosphere on preservation and further development of *in vitro* shoot of peach (Arnkink) and peach × almondhy-brid (GF677)[J]. *Scientia Horti cultures*, 1994, 57(3):201-213.
- [31] Nag K K, Street H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells[J]. *Nature*, 1973, 245: 270-272.
- [32] 刘贤旺,罗光明,杜勤.药用植物种质资源超低温保存研究概况[J].江西中医学院学报,1995,7(4):36-38.
- [33] 郑郁善,吴擢溪,陈礼光,等.板栗种子超低温保存研究[J].林业科学,2002,38(6):146-149.
- [34] 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.
- [35] Stanwood P C. Survival of sesame seeds at temperature (-196℃) of liquid nitrogen[J]. *Crop Science*, 1987, 27:327-331.
- [36] 章志宏,胡中立.水稻单倍体不定芽超低温保存和植株再生及其遗传稳定性研究[J].武汉植物学研究,2000,18(3):169-173.
- [37] 王君晖,严庆丰,黄纯农.大麦幼穗的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生[J].*Acta Botanica Sinica* (植物学报:英文版), 1996,38(9):730-734.
- [38] Yakuwa H, Oka S. Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen[J]. *Ann Bot*, 1988, 62:79-82.
- [39] 殷晓辉,舒理慧.植物种质资源的超低温保存研究进展(综述)[J].热带亚热带植物学报,1996,4(3):75-82.
- [40] 王子成,邓秀新.柑橘体细胞杂种超低温保存后的植株再生[J].园艺学报,2004,31(2):215-216.
- [41] 曾继吾,易干军,张秋明.番木瓜茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生[J].园艺学报,2004,31(1):29-33.
- [42] 赵艳华,吴永杰.“品丽珠”葡萄离体茎尖超低温保存的研究[J].园艺学报,2001,28(1):62-64.
- [43] Fukai S, et al. Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals[J]. *Euphytica*, 1991, 56:149-153.
- [44] Dereuddre J, et al. 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 Reports*, 1988, 7:170-173.
- [45] 王家福,刘月学,刘小军,等.枇杷花粉干冻法超低温保存研究[J].中国农学通报,2004,20(1):1-2,20.
- [46] 王玉萍,张峰,王蒂.马铃薯花粉的超低温保存研究[J].园艺学报,2003,30(6):683-686.
- [47] 石思信,张志娥,肖建平.玉米花粉超低温长期保存后遗传稳定性的研究[J].作物学报,1996,22(4):409-413.
- [48] 陈品良.植物组织培养的超低温保存[J].武汉植物学研究,1989,7(4):390-398.
- [49] 陈礼光,郑郁善.锥栗种子离体胚超低温保存脱氢酶活性研究[J].福建林学院学报,2001,21(1):32-35.
- [50] 黄纯农,严庆丰,王君晖,等.大麦幼胚的超低温保存[J].科技通报,1992,8(4):209-212.
- [51] 胡明珏,王君晖.拟南芥悬浮细胞系的玻璃化法超低温保存[J].细胞生物学杂志,2004,26(1):81-84.
- [52] 陈勇,陈娴婷,王君晖.瓯柑愈伤组织的玻璃化法超低温保存研究[J].浙江大学学报(理学版),2004,31(2):197-201.
- [53] Kuriyama A. et al. Effect of post-thaw treatment on the viability of cryopreserved *Lacandula vera* cells[J]. *Cryo-Let*, 1990, 11:171-178.
- [54] Chulafich, L., Grubishich, D., Vuichich, R., et al. Somatic embryo production *in vitro* in *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea balcanica* Kosarin and cryopreservation of their organogenic callus tissue[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 1994, 41: 821-826.
- [55] 王子成,邓秀新.柑橘原生质体的超低温保存[J].河南大学学报(自然科学版),2002,32(3):38-40.
- [56] 马锋旺,李嘉瑞.杏原生质体的超低温保存[J].园艺学报,1998,25(4):329-332.

[责任校对:黎爱平]

Application of Conservation Technique *in vitro* in Plant Germplasm Resources Conservation

HONG Sen-rong, GUO Lian-jin

(Shangrao Normal College, Shangrao Jiangxi 334001, China)

Abstract: The conservation research of plant germplasm resources has the extremely vital significance for the biology multiplicity protection and selective breeding of the new variety. The article introduced recent advances of conservation *in vitro* of plant germplasm resources using tissue culture technology and low temperature biological technology. The problems and the perspective of this field were also discussed.

Key Words: Germplasm resources; conservation *in vitro*; tissue culture; cryopreservation