

农作物种质资源试管苗库保存技术规程

1 范围

本规程规定了无性繁殖作物种质资源离体培养和试管苗保存的工作程序和技术要求。

本规程适用于无性繁殖的块根块茎类作物种质资源的试管苗库种质保存。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规程的引用而成为本规程的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规程。然而，鼓励根据本规程达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规程。

GB 7331-2003 马铃薯种薯产地检疫规程

GB 18133-2000 马铃薯脱毒种薯

GB 7413-1987 甘薯种苗产地检疫规程

NY/T 401-2000 脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程

NY/T 402-2000 脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程。

3.1 外植体

在组织培养中，用于初始培养以产生无病植株的茎尖、顶尖、分生组织和顶端分生组织统称为外植体。

3.2 分生组织

植物枝条活跃的生长点就是分生组织。是由快速分裂的细胞组成的一个很小区域。

3.3 顶端分生组织

枝条顶端分生组织圆锥体并产生末端最幼小的叶原基，其大小为 100~500

μm 的顶端分生组织，带有 1~3 个叶原基作为种质离体培养材料。

3.4 无病毒植株

经过特定测定，确定不存在病毒的植株。由于植株可能还带有一些尚未知名而未检测到的病毒类型。因此，无病毒植株仅系指无携带特异病毒的植株。

3.5 缓慢生长保存

在培养基中加入适量生长抑制剂，结合低温低光照控制，降低生长速率，使细胞生长降至最小限度但不死亡，从而使植株缓慢生长，延长继代培养时间的目的。

4 内容与工作程序

内容主要包括：种质样本获得与预处理，茎尖培养与增殖，入库保存与监测管理，种质分发，信息资料处理等。工作流程见图 3-1。

5 种质样本获得

获得种质样本途径：一是从国内相关单位或个人搜集的种质材料，二是从野外收集的种质材料，三是从国外引进的种质材料。收集获得的种质材料应是健壮、健康的母体植株或块根块茎。但在野外采集时，可将相关器官组织直接收集带回，或是经表面消毒后，接种到加有杀真菌剂和抗菌素的培养基上再带回。在获得种质材料时应同时登记种质的基本资料信息。

6 田间或温室种植

收集获得的种质材料在组培前一般需进行预处理，即把植株、块根、块茎或球茎等种质材料表面冲洗干净，放在比较干净的环境中发芽，然后进行温室种植或田间种植成苗，以便获得较多的外植体材料。

① 温室种植：将试材假植在装有消毒土的花盆里并置于温室中。植株成活后，有时需喷洒农用杀菌剂和杀虫剂，以除虫灭菌，提高试验材料的清洁度。喷药后 7~10d 方可取材。

② 田间种植：试材在田间种植后使用杀真菌剂（0.1%Benlate）和抗菌素（0.1%链霉素）混合组成的内吸性消毒剂给植物定期喷雾。喷药后 7~10d 需

及时取材，即从植株中取小切段种在实验室卡诺普溶液中，以备从插条获得腋芽枝条。该法可降低污染率。

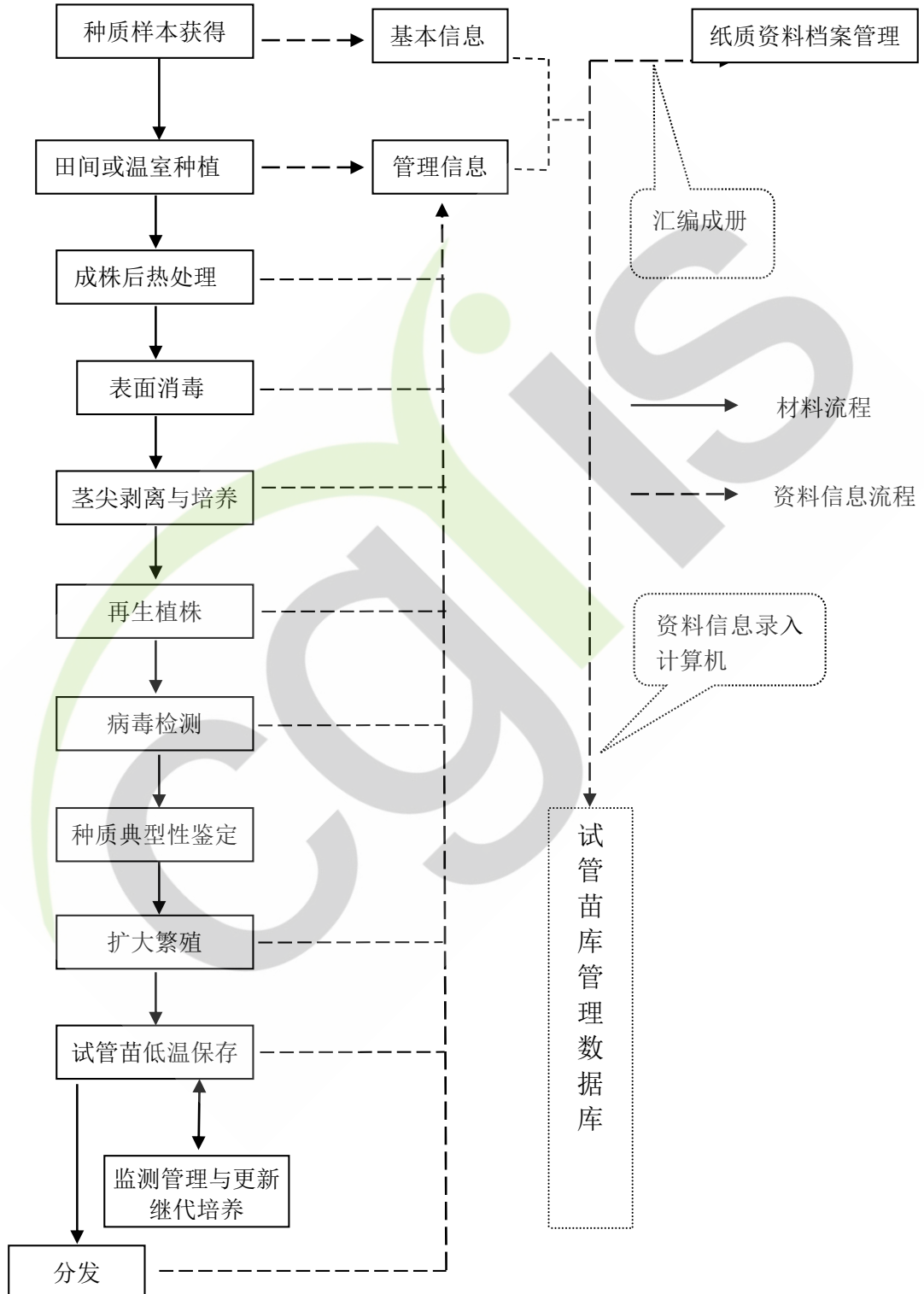


图 3-1 离体种质入库保存工作程序

取材时要注意选择表现该种质典型特性，且生长健壮，无明显病毒性、真菌性、细菌性病害症状的植株或其健康块茎、块根或球茎等作为试材。

7 成株后热处理

热处理是获得无病毒植株的一种有效方法，已长期应用并证明是有效的。一般健康材料不用热处理，只有当种质材料带有很难脱除的病毒如马铃薯 PVS 和 PVX 病毒时，才需进行热处理。热处理可通过热水或热空气进行，热水处理对休眠芽较好，热空气处理对象为休眠器官、整个植株和试管培养物，它对消除病毒和保持旺盛生长的枝条存活有利，而且比较容易应用。热处理又分为恒温处理和变温处理，不同病毒对热处理温度和时间反应都不一样。

热处理已成为脱除多种马铃薯病毒的标准途径，此法也适用于其它无性繁殖作物。在使用这一标准途径中，在热处理之前切除顶芽并使腋芽在热处理条件下生长，可获得最佳效果。每天以 36℃ 处理 16h 和 30℃ 处理 8h 并用连续高强光照（10000Lx）可以提高脱毒效果。植株在这种条件下保持 4 个星期，从顶芽和腋芽把分生组织分离出来，接种在分生组织培养基上，按分生组织培养法进行培养。

试管内热处理是一种可以替代标准途径的新方法。试管植株经切段接种在固体繁殖培养基的试管或塑料盒子中，当小植株长至 3~4cm 高并有良好的根系时，就可以进行热处理（同标准途径），处理一个月以后，进行分生组织培养。

马铃薯等作物热处理条件和周期见表 3-1。

表 3-1 马铃薯等作物热处理条件和周期

作物 \ 条件	温度	光照 (Lx)	处理时间 (周)
马铃薯	36℃/昼 16h 30℃/夜 8h	10000	4
甘薯	42℃/昼 16h 38℃/夜 8h	高湿 3000	4~6
木薯	40℃/昼 16h	3000	3

	35℃/夜 8h	5000	
--	----------	------	--

8 表面消毒

茎段试材选取后需进行表面消毒处理，其步骤如下：

- ① 取 4~5cm 长的枝条顶端，去掉叶片。
- ② 用 0.1%洗衣粉水漂洗 10~15min。
- ③ 用自来水冲洗干净，约 10~20min。
- ④ 在洁净工作台内，把外植体切成每段带一腋芽的小段后置于消毒的玻璃杯内。
- ⑤ 用 75%酒精浸 5~10s 后将酒精倒掉。
- ⑥ 加入 2.5%~5%次氯酸钠溶液消毒 15~20min（或用 2.5%次氯酸钙溶液消毒 15min），将消毒液倒掉。
- ⑦ 用无菌水冲洗 3~4 次，每次约 3~5min。

表面消毒剂类型和使用见附录 3-A。

9 茎尖分生组织剥离和培养

9.1 茎尖分生组织剥离

将表面消过毒的茎段置于双目解剖镜下，切取附带 1~2 个叶原基的茎尖，其大小约为 0.1~0.3mm。在剥离茎尖分生组织过程中，应严格做到：

- ① 无菌操作：剥离茎尖使用的解剖针、刀具、镊子要消过毒，并且使用后要用 75%酒精浸泡并在火焰上燃烧消毒。
- ② 防止烫伤组织：为了让解剖针、刀、镊子在使用前充分冷却，至少要准备三支以上或者通过浸泡在无菌水中加以冷却。
- ③ 防止茎尖干燥：由于通过洁净工作台的空气不断流动，解剖镜照明的聚光灯会产生热量。解剖茎尖分生组织时，必须尽可能地缩短操作时间，并在衬有无菌湿滤纸的培养皿内进行，以防止细小的外植体干燥。照明时最好使用冷光源（荧光灯）。

9.2 茎尖分生组织培养

将剥离的茎尖分生组织接种于茎尖再生培养基中，以获得再生植株。每次配制培养基时都要对配制成分作记录，记录表见附录 3-B。再生培养基成分因作物而异，见表 3-2。茎尖培养结果用表 3-3 记载。

表 3-2 无性繁殖作物茎尖再生培养基

作物名称	外植体	培养基	研究者
甘 薯	茎尖分生组 织	MS+KT2.0mg/L+IAA0.5mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.6%	辛淑英 1989
马铃薯	茎尖分生组 织	MS+KT0.04mg/L +GA0.1mg/L +蔗糖 2.5%+ 琼脂 0.6% MS+NAA0.07mg/L+GA0.04mg/L	CIP. 1989 Pennabio 等 1976
木 薯	茎尖分生组 织	MSB+BA0.1mg/L+NAA0.2mg/L+GA0.035mg/L MSB+BA0.1mg/L+ZEA0.2mg/L+NAA2.0 mg/L +GA0.035mg/L	Kartha 等 1974 Nair 等 1979
草 莓	茎尖	MS+BA0.5~1.0mg/L +IAA1.0mg/L MS+BA0.5~1.0mg/L +NAA0.1mg/L MS+BA0.5~1mg/L	周 明 德 1989
香 蕉	茎尖分生组 织	MS+BA0.5~2mg/L+NAA0.5mg/L	辛淑英（未发 表）
百 合	茎尖	MS+BA2.0mg/L +NAA0.2mg/L	辛淑英 1990.
芋	茎尖	LS+KT1.0mg/L +IAA1.5mg/L	Jackson 等 1977
山 药	茎尖	MS+KT2.0mg/L	Lakshmi 等 1976
大 蒜	顶端分生组	MS 或 MS+NAA1.0mg/L	Wang 等 1947

织			
芽顶端	B ₅ +2iP0. 5mg/L +NAA0. 1mg/L		Bhojwani 1980
	B ₅ +2iP0. 01mg/L +NAA0. 2mg/L		
咖啡 茎尖	MS(或 MS 中的维生素换为 B ₅ 维生素)+BA0. 02~0. 2mg/L		Kartha 1981
葡萄 茎尖	MS+NAA0. 1mg/L		Chee 1982

表 3-3 茎尖培养试验记录表

日期	种质名称	统一编号	培养基	接种数	污染数	生长状况		
						成活数	成苗数	生根数
20050801	徐薯 18	25648	A	30	2	28		

甘薯和马铃薯茎尖培养如下：

甘薯

培养基:MS+KT2. 0mg/L+IAA0. 5mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0. 6%。

培养温度: 28±2℃。

光照强度: 3000~4000Lx。

光照时间: 16h。

培养时间: 7~14d。

待茎尖发绿后移到无激素的 MS 或 1/2MS 培养基可直接发育成完整植株, 成苗时间大约 1~2.5 个月。尚若有个别的芽不长根, 可转移到新鲜的 1/2MS 培养基上即可发育成完整植株。

马铃薯

培养基：MS+BA0.05~0.1mg/L+NAA0.01~0.1mg/L+GA₃0.05~0.1mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%。

培养温度：20~30℃均可发育成苗，较适宜温度为20~23℃。

光照强度：2000~3000Lx。

光照时间：14~16h。

培养3~4周后将茎尖转接在MS+GA0.1mg/L+盐酸丁二胺20mg/L+蔗糖2.5%+琼脂0.6%的新鲜培养基上培养6~8周后，小植株可继代培养。

10 再生植株

要成功获得再生植株，应把握好以下几方面的操作：

- ① 正确选择培养基。重点考虑其营养成分、生长调节剂和理化性质。培养基中的无机元素要注意钾离子和铵离子的比例。
- ② 附加植物生长调节剂是必不可少的。培养基中的激素类型、比例和浓度直接影响着分生组织的生长和分化，直至植株再生。培养基的附加成分因作物不同而异。
- ③ 外植体应从具有典型基因型的母株上选取，且应是植株最有活力的部位。顶芽和腋芽均可用于分生组织培养，但腋芽的性能比顶芽差些，距离顶芽越远腋芽活力越低，若腋芽伸长成枝则例外。
- ④ 外植体的大小和附带叶原基的数目将影响分生组织分化成苗的能力，一般带2~3个叶原基的茎尖再生植株频率比较高，带1个叶原基的茎尖较难成苗。
- ⑤ 离体茎尖的大小与脱病毒效果显著相关。茎尖越小，脱毒效果越好，但成苗越难。一般认为，茎尖的大小在0.1~0.4mm之间比较合适。对一些难以用常规的茎尖培养脱除的病毒如马铃薯X病毒、马铃薯S病毒，经过高温处理，能大大提高脱毒的效果。
- ⑥ 适宜的培养温度和光照等。

11 病毒检测

将再生苗按株系进行扩繁，取其中一部分进行病毒检测，筛选出表现阴性的脱毒苗，以备用于种质无毒化保存和种质典型性鉴定。马铃薯脱毒苗病毒检测方法按 GB 18133-2000 马铃薯脱毒种薯标准、NY/T 401-2000 脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程中的方法进行。甘薯脱毒苗病毒检测方法按 NY/T 402-2000 脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测技术规程种的方法进行。其他常用的病毒检测的方法见附录 3-C。

12 种质典型性鉴定

脱毒苗扩繁前，首先进行种质典型性鉴定。可以采用形态标记、同工酶生化标记和分子标记技术相结合的方法，鉴定结果未发生变异时，再进行扩大繁殖。

13 扩大繁殖

经过病毒检测呈阴性反应的脱毒植株且经鉴定未发生变异后，用单节切段的方法，转接到 MS 或含有多种附加物的固体培养基的试管内进行增殖。培养 1 个月，单节切段就可长成一株具有 4~5 片叶的健壮完整植株。用此方法，一个芽一年可以繁殖 3000 多株试管苗。繁殖出的试管苗可用作试管保存，或作为种质资源交换材料和再扩繁后提供生产上应用。

14 试管苗低温保存

将繁殖试管苗切段转入保存培养基上生长 15~30d，然后放入试管苗保存库进行保存。每份种质保存时应选用 5 个株系，每株系取 3 个带芽节段，每个芽段接种在一个试管内，每份种质保存总数为 14~15 支管。

保存培养基一般采用固体培养基，是液体培养基加琼脂固化而成。选择适宜的试管苗低温保存条件将有效延长更新继代培养的间期。保存条件因作物种类不同而异。温带作物可以在 4℃ 或者更低的条件下贮存，而热带作物则要求 15~28℃；光照可以是黑暗或者 12~16h 光周期，光强度随作物变化，每种作物都有其特定的光强度要求；现以薯类作物为例，列出薯类的适宜保存条件：

- ① 培养基：MS 培养基+生长抑制剂甘露醇，马铃薯 3%~4%，甘薯 1%~

0.5%。

- ② 保存温度：甘薯 16~18℃，马铃薯为 6~10℃。
- ③ 光照：1000Lx，8h。
- ④ 库房湿度：在夏季高温高湿条件下，控制空气湿度 50%以下，其余时间不控制。
- ⑤ 试管口封装：使用棉球、塑料盖或 0.01mm 厚度的二层铝箔封口。
- ⑥ 试管规格：为 18mm×180mm。
- ⑦ 培养基用量：每管加培养基 10ml。

存放种质前应对保存库的保存架进行架、层的编号，种质材料放到保存架后，应记录所存放种质的种类、份数、架、层的编号、入库时间。每份种质必须携带双标签，并标明品种名称和全国统一编号，并放在每份材料的烧杯里或泡沫塑料盘上。

试管苗种质库的基本条件见附录 3-D。

15 监测管理与更新继代培养

15.1 监测管理

试管苗植株活体保存，生命的维持主要依靠培养基供给营养和植株的光合作用自养。因此，库房内要求控制植株最小量生长的条件，即需要一定的温度，光照，湿度和通气等。活体保存的期限受到营养供应，生长速度和库房清洁程度等制约。所以，除选择好保存条件外，在保存中要做好以下监测管理。

- ① 定期监测检查：试管苗存入试管苗库保存后，要定期观察检查，内容包括：管中苗高，叶子变化，根（系）发育状况，气生根状况，培养基变化状况，污染情况，试管苗存活率，继代保存期限。定期观察记录每月一次，发现污染要及时消除，保持清洁，防止丢失。
- ② 保持保存库的清洁：第一，种质入库之前库房的清洁，可采用的熏蒸剂为高锰酸钾（少量）加甲醛，熏蒸 24 小时；第二，种质保存过程中的清洁，定期清洗和消毒制冷设备和除湿设备上的过滤网，以防止病原菌附着在上面而成为污染源，同时保持操作人员进出库时的清洁。

- ③ 维持保存条件的稳定。维持试管苗库适宜的保存条件是确保种质安全保存的保障。应维护好保存库设备的正常运转。在夏天高温高湿季节更要确保温湿度、通风透气、光照条件的稳定，尤其是将保存库湿度控制在50%以下，以防止病原菌的滋生而减少污染。此外要定期检查通风换气系统，因保存库往往是密闭的，且在光照强度弱、光照期缩短、黑暗时间长的条件下，植物体暗呼吸过程中放出 CO₂ 气体，为乙烯等有害气体产生提供了条件。而乙烯具有催化贮存材料的老化作用，因此，需确保保存库通风换气系统的正常工作，或定期进行通风换气。
- ④ 遗传稳定性监测：可采用形态标记、同工酶生化标记和分子标记技术相结合的方法进行。

15.2 更新继代培养

由于试管中培养基供给植株营养是有限的，因此，需不断地进行更新继代培养，才能延续试管苗的保存。更新培养的标准为保存的试管苗存活率降到50%左右。更新时取出植株转接在新配制的保存培养基上，常规培养15~30d后再转入库房内保存。要注意的是每株存活苗都要切取一定数量茎段接种，以保持品种的种性或遗传完整性。

16 分发

根据国家有关规定，把可对外交换种质资源和农业生产上需要利用和发展的品种，应用试管苗作短期保存，其保存数量要比在低温保存库内保存的数量大些。一旦需要即可切段快繁，培养一个月后，切断长成4~5叶片的完整植株时就可提供交换和分发利用。

提供交换和分发利用的材料，一定要提供清单，标明材料的全国统一编号，品种名称，品种来源，主要农艺特性等。

从国外引进和交换的资源材料，要登记编号，记载主要特性，引入国，引入时间等，然后快速繁殖成苗，一部分转入保存培养基培养入库保存，另一部分发给有关单位，如委托资源管理单位和育种中心等。

17 种质信息处理

17.1 基本信息

每份离体种质的原始信息和农艺特性检测信息，由提供者提供，以便查询母体植株的信息。基本信息内容包括：全国统一编号，原保存单位编号，种质名称，学名，提供者，原产地，地理信息等。

17.2 管理信息

管理信息包括入库初始信息、监测信息、更新信息和利用信息。入库初始信息有入库保存日期、库编号、库位号、保存量、种质典型性鉴定、培养基污染情况等。

17.3 建立计算机资料管理系统

利用计算机建立离体种质保存信息数据库，包括基本信息资料、系统信息资料和管理信息资料、茎尖培养试验记录项目、离体种质保存观察项目。



附录 3-A

(资料性附录)

表面消毒剂和抗菌素类型与使用

A. 1 酒精

一种常用的消毒剂，在进行其它表面消毒处理前，常做一般消毒用。它表面张力低，容易渗入叶毛，湿润植物表面。

A. 2 次氯酸钠或次氯酸钙溶液

用作表面消毒，使用浓度在 1%~7% 左右，用作甘薯表面消毒，浓度在 2.5%~5%，7~12min 为好。因毒性较小，使用较佳。实验室中还可使用漂白粉(如 Corox)，这些商品通常含 5.25%NaOCL，用水稀释(漂白粉:水=1:9)，配成的溶液含 NaOCL 的浓度应低于 0.5%。

A. 3 升汞

氯化汞(HgCl_2)的水溶液称为升汞，毒性很大，其溶液可在室温下挥发，会造成水银中毒。因此，在一般情况下不要用它作消毒剂，只有当污染严重而其它表面消毒剂很难去除时才使用。

A. 4 双氧水和“新洁尔灭”

双氧水(H_2O_2)和医用的皮肤和器械消毒剂“新洁尔灭”也可作为表面消毒剂。

A. 5 灭菌剂

对于严重污染的材料，一些研究者推荐在使用表面消毒剂之前，先用市售的杀菌剂溶液清洗，如国际马铃薯中心(CIP)使用杀螨剂浸泡材料 10min。也可以在消毒前用 0.1%洗衣粉漂洗 10~15min，用自来水冲干净后，再作表面消毒处理。但要注意，这种处理对于系统侵染并无效果。

A.6 抗菌素

常用于动物细胞培养中防治细菌的污染。因植物组织对抗菌素敏感，在一定浓度范围内会使植物中毒，而且基因型不同反应各异。同时抗菌素价格昂贵，专一性强，故未广泛应用。仅是在当其它手段难以消除的微生物体时作为辅助手段。

S. Y, Ng & J. H. Dodds 认为分布在植物体表面和内部组织的细菌、真菌和支原体等病害，通常在维管束内传递，可以作一些预处理。推荐在植株上喷洒抗菌素水溶液或将接种材料在抗菌素溶液中浸泡几小时。已经使用的抗菌素有：放射菌霉素，利富霉素，制真菌素加羧苄青霉素，放射菌霉素加两性霉素 B，盐酸万古霉素加制菌霉素和链霉素加羧苄青霉素等。

为了防止接种后的污染，可以利用浓度为 40mg/L 的利福霉素。消除真菌污染可利用浓度 0.25~0.5mg/L 的两性霉素 B 溶液。具体操作需在无菌条件下进行。滴一滴经过滤消毒，浓度为 12000mg/L 的利福霉素溶液在消过毒的 5×5mm 滤纸上，将这沾有抗菌素滤纸移到准备好的培养基上，接着将茎尖分生组织接种在滤纸上，每隔 3~5d 将培养物转移到另一具有抗菌素的滤纸上，原液每滴应达到 0.02ml。

附录 3-B
(资料性附录)

培养基配制成分记录表

年 月 日

培养基名称	用途	配制人
配制总量	培养基成分	实际加入母液量
	无 机 盐 (1) 大量元素 (2) 微量元素 (3) 铁 盐 维 生 素 (1) (2) (3) 氨 基 酸 (1) (2) (3) 植物生长调节剂 (1) (2) (3) 肌 醇 蔗 糖 琼 脂 pH 值	

附录 3-C (资料性附录) 病毒检测方法

再生植株试管苗在快速繁殖之前应进行病毒检测，以确保快繁获得的大批试管苗没有携带病毒。常用的病毒检测方法有：生物学法（指示植物嫁接或机械接种），血清学法（酶联免疫吸附检测即ELISA）和生物化学法（聚丙烯酰胺凝胶电泳）。

① 生物学法

通过汁液摩擦、嫁接或昆虫接种在特定的植物上，病毒在特定植物上会产生特有的症状，根据有无特有的症状，确定被鉴定植株（试管苗）有无病毒、带什么病毒。

常用的指示植物有：

千日红（*Gomphrena globosa*）用于检测马铃薯 X 病毒、马铃薯杂斑病毒和马铃薯茎杂色。

指尖椒（*Capsicum annuum*），用于检测马铃薯奥古巴花叶病毒，马铃薯 X 病毒。

莨苳（*Sopolia sinensis*）用来检测马铃薯纺锤块茎类病毒。其他指示植物还有酸浆（*Physalis flordana*）、野生马铃薯（*Solanum demissum*）、豇豆（*Vigna sinensis*）等。

巴西牵牛（*Ipomoea setoas*）用来检测甘薯病毒。是一种较好的检测寄主，与甘薯嫁接易成活，且病毒侵染后叶片易产生系统症状。以巴西牵牛作砧木检测病毒，总阳性反应率达 88.75%，该法适用于试管苗脱毒鉴定和无病症甘薯样本的检测，但从指示植物症状上难以区分病毒种类。

应用嫁接检测方法时，采用先行隔离栽培，长成正常植株后再做两次嫁接检测，每次需嫁接 3-5 株巴西牵牛，只要有一株发病，予以淘汰。裂叶牵牛（*I. nil*）与巴西牵牛同为牵牛属的不同种，亲缘关系极近，也可作为一种指示植物使用。

② 血清学法

常用的免疫血清方法有酶联免疫吸附检测法即 ELISA 法和酶标免疫吸附检测法也称 ELA 法。

由于甘薯病毒病症状较复杂，往往同种病毒在不同品种上的症状差别很大，生长环境也能改变症状类型，因此，采用抗血清检测尤为重要，甘薯病毒的血清学法 NCM-ELISA 是利用硝酸纤维膜代替聚苯乙烯微量反应板来完成酶联免疫试验的方法，该法的优点是简便易行、快速，适宜进行大量样品的检测，但受提供血清种类的限制，不能检测所有甘薯病毒，而且灵敏度不及嫁接法。

采用血清学法 NCM-ELISA 和嫁接指示植物法两个方法结合使用，先让病毒在指示植物上增殖，提高浓度后，再用 NCM-ELISA 方法检测。这样不仅可以区分病毒种类，而且检测效果会更好。

③ 生物化学法

采用 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳法，主要用于检测马铃薯纺锤体块茎类病毒。

④ 免疫电镜法（ISEM）

虽然灵敏准确，但此法需要电镜等仪器设备，成本昂贵，不宜做较多样品检测。

⑤ PCR 法分子水平检测

附录 3-D (资料性附录)

试管苗种质库的基本条件

试管苗种质库，也称离体种质库，其保存的种质为活的离体植株。因活体植株保存过程中生命的维持是依靠培养基供给营养和植株光合作用自养，而培养基供给的营养是有限的。因此，需周期性地再进行再培养与再保存，形成周而复始，延续不断的过程。试管苗种质库的主要基本条件应包括：仪器设备、保存库、培养室和组培操作室、培养基、温室等。保存库是用于进行试管苗中短期保存，不同作物有不同保存的温湿度要求，其作用是使组培苗处于缓慢生长状态而达到中短期保存目的。培养室用于种质材料组织培养与扩大繁殖组培苗。组培操作室用于对获得种质材料茎尖分离、接种及灭菌脱毒等处理。

D.1 仪器设备

包括电子天平、磁力搅拌器、pH 测定计、体视显微镜（附带照明设备）、高压灭菌锅、定量加样器、洁净工作台、冰箱、烘箱、药品柜、玻璃器具、洗涤架、空调器、培养箱、制冷设备及除湿设备。

D.2 培养与保存设施

包括培养库、保存库和培养操作室。

培养室条件：20~30℃，45%<RH<65%（控制 50% 以下），内配置附荧光灯管的培养架。

保存库条件：热带作物种质 15~22℃，温带作物种质 5~15℃，45%<RH<65%，内配置附荧光灯管的保存架。

培养操作室：20~25℃，RH 不控制。

保存和培养库的墙围结构需作保温处理，并通过制冷及除湿机组来维持库内温湿度的恒定，以满足种质培养和保存的要求。制冷设备的冷凝水排放不可与地下管道相连接，避免把地下管道中的病原菌由冷凝管导入，以造成种质材料污染。通风换气条件要求较高，库（室）内进口空气须是过滤无菌的。库内和操作室都应设计安装自动控制光照、通风换气及空气过滤系统以及故障报警系统。

无论是在 15℃或 0℃条件下保存，只要机器失灵就会使培养物过热或受冻。如果保存室的温度变化超过设定值，机器失灵安全系统就会断闸并发出警报声，以防培养物过热或受冻，那时培养物也只能回复到室温。极力推荐将报警装置连接到已有的安全系统中。墙和架子在夏天可能会结露，易引起真菌生长。因此，需要除湿设备或定期进行监测和清洗。保存室的温度随特定种属而变化。每日的 8h 光照和 16h 黑暗周期通过安装自控系统来完成。

D.3 培养基

本规程使用的所有培养基是以 Murashige 和 Skoog (1962) 无机盐类即 MS 培养基为基础，使用的化学药品及配制见表 3-D-1、表 3-D-2、表 3-D-3。

表 3-D-1 MS 培养基无机盐成份

大量盐	mg/1	微量盐	mg/1
KNO ₃	1900	MnSO ₄ •4H ₂ O	22.3
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ •2H ₂ O	440	ZnSO ₄ •4H ₂ O	8.6
MgSO ₄ •7H ₂ O	370	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ •7H ₂ O	27.8	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025

表 3-D-2 MS 培养基附加的有机物质及其浓度

化合物	mg/l
蔗糖	30000
肌醇	100
甘氨酸	2
维生素 B ₁	0.4
维生素 B ₆	0.5
烟酸	0.5
吲哚-3-乙酸 (IAA)	(母液) 1mg/ml
萘乙酸 (NAA)	
6-苄基氨基嘌呤 (BA)	
激动素 (KT)	
赤霉素 (GA)	

注：因作物种不同所用植物激素种类、浓度各异，每个激素单独配制，母液为 1mg/ml/。

表 3-D-3 MS 培养基成分及配制

	化学成分	用量(mg/l)	母液用量 (mg/500ml)	每升培养基 母液用量 (mg/l)
大量元素	KNO ₃	1900	9500	100
	NH ₄ NO ₃	1650	8250	
	MgSO ₄ •7H ₂ O	370	1850	
	KH ₂ PO ₄	170	850	
	CaCl ₂ •2H ₂ O	440	2200	
微量元素	MnSO ₄ •4H ₂ O	22.3	2230	5
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.6	860	
	H ₃ BO ₃	6.2	620	
	KI	0.83	83	
	Na ₂ MO ₄ •2H ₂ O	0.25	25	

	化学成分	用量(mg/l)	母液用量 (mg/500ml)	每升培养基 母液用量 (mg/l)
	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025	2.5	
	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025	2.5	
铁盐	Na ₂ EDTA	37.3	1865	10
	FeSO ₄ •7H ₂ O	27.8	1390	
维生素 与氨基酸	维生素 B ₁	0.4	20	10
	维生素 B ₆	0.5	25	
	甘氨酸	2.0	100	
	烟 酸	0.5	25	
有机物	肌 醇	100	5000	10
碳源	蔗 糖	30(g)		30(g)
凝固剂	琼 脂	7~9.5(g)		7~9.5(g)
激素	BA		1mg/ml	
	KT	每种激素单独配成母液		
	IAA	用时根据需要吸取, 母液		
	NAA	可配成 100~1000 倍		
	GA			
pH 值			5.7~5.8	

D.4 工作人员

组织培养人员的科技水平和经验将影响实验操作的质量和效率。需要具有植物生理和微繁殖知识, 科技水平高的研究人员重点放在发展技术和维持设施正常运转。实验室的技术人员应具有植物科学、微繁殖和组织培养方面的基础知识。在选择高学历人员的同时, 还要看其独立承担工作的能力。实验助工要经过植物学基础、园艺学和组织培养技术以及进行培养基配制、用具清洗、培养物转移、污染物检查和清除、基本数据记录和实验室其他工作方面的培训。