
ICS 07.080

C 04

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 130-2015

植物种质资源离体保存库建设规范

2015 -02 - 27 发布

2015- 03 - 01 实施

深圳市市场监督管理局 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 植物种质资源离体保存库建设.....	3
5 操作规范.....	6
6 样本的信息化管理.....	8
附录 A（规范性附录） 离体保存库整体操作流程.....	9
附录 B（规范性附录） 植物种质资源样本采集信息单.....	10
附录 C（规范性附录） 植物种质资源离体保存信息单.....	11
参考文献.....	12

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由深圳市经济贸易和信息化委员会归口。

本标准负责起草单位：深圳华大基因研究院。

本标准主要起草人：周欣 潘竟丽 王雪兵 田晓俊 侯丽丽 朱艳苹 宋爱松

本标准首次发布。

植物种质资源离体保存库建设规范

1 范围

本标准规定了植物种质资源离体保存库建库的相关术语和定义、设施及环境的要求、实验室设计、实验室管理、植物离体保存技术等相关内容。

本标准适用于植物种质资源离体保存库和植物遗传资源保护类机构的建设与管理。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写
- GB 2894-2008 安全标志及其使用导则
- GB 7000.2-2008 灯具 第2-22部分：特殊要求应急照明灯具
- GB 13690-2009 化学品分类和危险性公示通则
- GB 15258-2009 化学品安全标签编写规定
- GB/T 18883-2002 室内空气质量标准
- GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求
- GB/T 22278-2008 良好实验室规范原则
- GB/T 25915.1-2010 洁净室及相关受控环境 第1部分：空气洁净度等级
- GB/T 25915.4-2010 洁净室及相关受控环境 第4部分：设计、建造、启动
- GB/T 25915.5-2010 洁净室及相关受控环境 第5部分：运行
- GB 28235-2011 紫外线空气消毒器安全与卫生标准
- GB 50016-2006 建筑设计防火规范
- GB 50052-2009 供配电系统设计规范
- GB 50073-2013 洁净厂房设计规范
- GB 50140-2005 建筑灭火器配置设计规范
- GB 50346-2011 生物安全实验室建筑技术规范
- CNAS-CL05-2009 实验室生物安全认可准则
- HJ 628-2011 生物遗传资源采集技术规范（试行）
- LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程
- SN/T 2294.5-2011 检验检疫实验室管理 第5部分：危险化学品安全管理指南
- AQ 3013-2008 危险化学品从业单位安全标准化通用规范
- DB 33/T 752-2009 植物种苗组培快繁技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 种质 germplasm

在物种繁衍过程中，从亲代传递给子代的遗传物质。

3.2 植物种质资源 plant germplasm resource

在自然演变过程中形成的,能在一定环境作用下,通过世代演替传递给后代,并发育为具有各种形状特征植物的可遗传的物质资源的总称。

3.3 种质保存 germplasm conservation

利用天然或人工创造的适宜环境,借以保存种质资源,使个体中所含有的遗传物质保持其遗传完整性,并且有高的生活力,能通过繁殖将其遗传特性传递下去。

3.4 离体 *in vitro*

与“活体”(in vivo)相对的意义,指器官、组织、细胞和原生质体离开母体的状态。

3.5 植物组织培养 plant tissue culture

植物的组织培养,又称离体培养。指在无菌条件下,将离体的植物器官(如根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织(如形成层、胚乳、皮层等)、细胞(体细胞和生殖细胞)或原生质体等,培养在人工配制的培养基上,在人工控制条件下,使之生长、分化并发育、再生成完整小植株的培养技术。

3.6 离体保存 *in vitro* conservation

对离体培养的小植株、器官、组织、细胞或原生质体等材料,采用一些方法延缓或停止其生长,需要时可立即恢复其生长,并再生植株的方法。

3.7 离体保存库 *in vitro* conservation library

规范化和系统化进行离体保存和实验操作的植物种质资源机构或实体。

3.8 常温保存 room temperature conservation

在 25℃±2℃下,通过改变培养基成分和光照条件使离体培养物生长缓慢的保存方法。

3.9 低温保存 low temperature conservation

通过低温降低离体培养物生长速度的保存方法。

3.10 珍稀濒危植物 rare and endangered plant

列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》CITES附录和《国家重点保护野生植物名录(第一批)》(1999)中的植物。

3.11 无菌操作室 clean chamber

无菌操作室亦叫接种室,是进行外植体灭菌,培养材料接种,培养物继代转移,芽条生根以及其它无菌操作的场所。

3.12 培养室 culture room

培养材料和组培苗在人工控制温度、相对湿度和光照等条件下培养和生长的场所。

3.13 ISO 8级 ISO class 8

国际空气洁净度分级标准中,当1m³空气中最大允许粒子数(粒径≥0.5μm)不超过3 520 000个时,空气洁净度定义为ISO 8级。亦相当于中国空气洁净度标准中的十万级。

3.14 外植体 explant

用于植物组织培养的离体植物器官、组织、细胞以及原生质体等起始培养材料。

3.15 接种 inoculation

在无菌条件下将植物材料接种到具有各种发育导向作用培养基上进行培养的过程。

3.16 诱导培养 induction culture

使用一定的诱导因子获得目标生物的培养过程。

3.17 继代培养 subculture

把保存的植物材料，接种到新鲜的培养基上继续保存的过程。

3.18 增殖培养 multiplication culture

将诱导产生的芽、苗、愈伤组织、原球茎或胚状体等培养材料重新分割，接种到新鲜培养基中进一步扩大培养的过程。

3.19 壮苗培养 strong seedlings culture

在继代培养过程中，随着增殖系数的提高，有的增殖材料会出现生长势减弱，不定芽短小细弱，无法进行生根培养，或移栽成活率低的现象，通过选择适宜的细胞分裂素和生长素的种类及不同浓度配比，实现增殖和壮苗的过程。

3.20 生根培养 rooting culture

外植体经继代培养后形成无根的芽，进一步接种于生根培养基上诱导生根，形成完整植株的过程。

3.21 组培苗 plantlet

利用植物组织、器官、细胞等作为外植体，通过植物组织培养技术产生的植物种苗。

4 植物种质资源离体保存库建设

4.1 离体保存方法

本标准适用于离体保存库采用常温和低温保存法保存植物种质资源。

4.2 设施、设备与环境

4.2.1 空调、通风和净化

通风系统应符合GB/T 18883的规定，气流由“清洁”空间向“污染”空间流动，最大限度减少室内回流与涡流。离体保存库空调系统应符合GB 19489的规定，有足够的温度和湿度控制能力。离体保存库空调净化系统应符合GB 50346的规定，有利于实验室系统设置和节能运行。

4.2.2 照明系统

离体保存库，应符合GB 19489的规定，实验室核心工作区的照度不低于350 lx，其它区域不低于200 lx。

4.2.3 备用电源

实验室的供电系统应符合 GB 50052 和 GB 19489 的规定。应急照明不得少于 30 min，需安装后备电池或者与后备发电机相连，并符合 GB 7000.2 的规定。

4.2.4 安全设施

离体保存库的安全设施应符合 GB 19489 中的规定，包括门禁、监控、报警和危险处理系统。

4.3 实验室设计

4.3.1 实验区域

离体保存库实验区域的设计应符合 GB 19489 的规定，实验区域应包括制备室、洗涤室、灭菌室、处理室、更衣室、无菌操作室、培养室、观察室和温室等区域。每个区域标识洁净和风险级别，组培室间用彩钢板隔断包围。

4.3.2 制备室

制备室的功能是完成药品准备和培养基配制，主要设施设备包括操作台、水池、药品柜、防尘柜、冰箱、电子天平、pH 酸度计、蒸馏水器、微波炉等。制备室要求宽敞明亮，通风干燥，便于多人同时操作，配备给水排水设施。

4.3.3 洗涤室

洗涤室的功能是完成各种培养器具的洗涤、干燥和保存，主要设施设备包括操作台、水池和落水架。洗涤室要求通风、防潮，地面应耐湿并排水良好。

4.3.4 灭菌室

灭菌室的功能是完成培养基、无菌水和器械的灭菌，要求主要设施设备为高压蒸汽灭菌锅和干燥灭菌器。针对灭菌室要求电源安全，设漏电保护装置。

4.3.5 更衣室

更衣室是供人员出入无菌操作室和培养室，穿脱工作服的场所，主要设施设备包括紫外灯、衣柜和鞋柜。更衣室的建设和布局应符合 GB/T 25915.4 的规定。

4.3.6 无菌操作室

无菌操作室，也称接种室，主要用于对植物外植体进行消毒、接种、培养物转移和试管苗继代等其它无菌操作，主要设施设备包括超净工作台、紫外灯、空调、接种器械和灭菌接种仪器。无菌操作室要求封闭性好，应设在不易受潮的地方；地面和墙壁应密闭光滑、防水、耐腐蚀，易于清洁和消毒；配置拉动门，以减少开关门时的空气流动，防止空气对流。无菌操作室室内空气洁净度应达到 GB/T 25915.1 中 ISO 8 级（十万级）洁净度，设计、建设和运行应符合 GB/T 25915.4、GB/T 25915.5 和 GB 50073 的规定。

4.3.7 培养室

4.3.7.1 环境与设施

培养室主要设施设备包括培养架（控温控光控湿）、光照培养箱、紫外灯、空调、加湿器、除湿机、温湿度计和自动控制器等。组培室室内空气洁净度应达到 GB/T 25915.1 中 ISO 8

级（十万级）洁净度，设计、建设和运行应符合GB/T 25915.4、GB/T 25915.5和GB 50073的规定。

4.3.7.2 培养架

培养架由金属制成，最低一层离地高10 cm，培养架长度和高度依据实际情况而定。

4.3.7.3 温度

培养室应具备温度调节功能，针对常温保存和低温保存的需求设置不同的温度，不同温度要求的培养室应具有独立空间。低温保存培养室的数量根据所涉及材料种类对低温限制生长的特定温度要求而设定，各特定温度的变化范围为 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

4.3.7.4 湿度

培养室室内湿度根据不同材料设定相对应的湿度范围。

4.3.7.5 光照

日光灯固定在培养架的侧面或搁板的下面，每层设置的日光灯数视具体的培养物而定，光照强度为2000-3000 lx。控制光照时间应安装定时开关装置，一般培养的光照需要为每天10 h -16 h，亦可根据实际情况设置光照时间。

4.3.7.6 面积

培养室面积根据需求而定，可根据温度和光照不同要求建立多个独立培养室，每个独立培养室空间不小于20 m²，便于对条件进行均匀控制。

4.3.8 观察室

观察室供工作人员和参观人员在不进入培养室的情况下，观察组培室整体状况使用。在室内相邻隔间之间设置透明玻璃窗，窗户应采用非开启式并密封。

4.3.9 温室

温室是用来对组培苗进行炼苗和移栽的场所，由钢架、玻璃或塑料采光板建造而成。主要设备包括苗床、遮阳网、喷灌系统、二氧化碳机等。温室要求环境清洁，具备控温、控湿、遮荫、防虫和采光良好等条件。

4.3.10 实验室布局

离体保存库实验室布局基本要求包括：应根据实验操作程序排列实验室，使各环节连接转移方便；无菌操作室和培养室应设在与外界环境隔离性好的区域，保证其无菌环境。在保障这两个前提要求的情况下，实验室可视情况自由设计。

4.4 人员管理

离体保存库应有足够的与其功能相适应的技术和管理人员，人员需受过与从事工作相关的专业教育及技术培训，并符合《WHO 实验室生物安全生物手册》及GB 19489的规定。离体保存库要建立实验室人员工作职责和操作守则等规章制度。

4.5 安全管理

4.5.1 生物安全

离体保存库的样本采集、操作和保存的过程如涉及生物安全问题，在开展前应通过生物安全评审委员会的评审，并符合 CNAS-CL05 的规定。

4.5.2 化学安全

离体保存库要符合 GB 1369 的规定，在使用到有毒有害物质的工作区域，应符合 AQ 3013 的规定。危险化学品安全应符合 SN/T 2294.5 的规定。

4.5.3 紫外线安全

离体保存库的紫外线灭菌灯的安装、检测和使用应符合 GB 28235 的规定。

4.5.4 设施安全

离体保存库的设施及仪器设备应满足实验室科研工作的需求。除此之外，针对设施和仪器设备的安全应建立维护系统，定期进行设施的维护和检查。

4.5.5 消防安全

离体保存库防火系统的规划和设计应符合 GB 19489 和 GB 50016 的规定。离体保存库灭火器的配置应符合 GB 50140 的规定。

4.5.6 安全标志

离体保存库中相关安全标志的设计应符合 GB 15258 及 GB 2894 的规定。

5 操作规范

5.1 整体操作流程

离体保存库整体操作流程遵循附录A的要求进行。

5.2 样本采集

5.2.1 采集程序

国内植物样本采集程序应参照HJ628的规定进行。若采集国家重点保护野生植物的样本，应按照相关法律法规的规定，向相关主管部门提出申请，获批后方可采集。在自然保护区内采集样本，应向保护区管理机构提出申请，获批后方可采集。境外采集需依据《濒危野生动植物种国际贸易公约》CITES附录进行报关和检验检疫。

5.2.2 样本采集

采集无病虫害、无污染且具备优异性状材料。

5.2.3 采集信息登记

采集样本应进行详细的档案记录，记录的内容应至少包括：采集编号、样本类型、科学分类、植物习性、采集地、生境和采集者信息。植物样本采集信息按照附录B填写，并录入数据库。

5.3 外植体的选择、消毒与接种

5.3.1 外植体的选择

可采集植物的器官、组织、细胞或者原生质体等作为外植体。外植体面积根据植物种类、器官和目的来确定，一般叶片和花瓣面积为 0.5 cm^2 ，茎尖、茎段、根、子叶、鳞茎和胚珠等其它培养材料的面积为 0.5 cm^2 - 1.0 cm^2 ，如果是胚胎培养或脱毒培养的材料，则应更小于 0.5 cm^2 - 1.0 cm^2 。

5.3.2 外植体消毒

消毒前先对植物组织进行修整，去掉不需要的部分。然后将外植体流水下冲洗30 min。消毒时在超净工作台上操作，75%酒精表面消毒10-30 s，无菌水洗涤2-3次，采用2%次氯酸钠浸泡10-15 min或用0.1%升汞浸5-10 min，无菌水洗涤3-5次。

消毒时根据材料的大小、幼嫩、质地等差异，选择适宜的消毒剂种类、浓度和消毒时间。消毒的最佳效果应以最大限度地杀死材料上的微生物，而又对材料的损伤最小为宜。

5.3.3 接种

将经过消毒处理的外植体，接种在合适的培养基上进行培养。外植体接种操作流程、注意事项和安全管理应参照DB33/T 752规定进行。

5.3.4 离体培养

在无菌条件下，将外植体培养在人工配置的培养基上，在人工控制条件下，使之生长、分化、并发育再生。

5.4 常温保存

5.4.1 组织培养

按照常规组织培养方法进行外植体诱导培养、继代培养、壮苗培养和生根培养。培养室操作和培养基配置应参照DB33/T 752和LY/T 1882规定进行。

5.4.2 保存材料

继代培养产生的材料用作植物离体保存的材料。

5.4.3 保存数量

每份种质保存10瓶以上，每瓶1-10个繁殖材料。

5.4.4 保存条件

温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度适宜，光照强度1500 lx-3000 lx，光照时间每天10 h -16 h。

5.5 低温保存

5.5.1 保存材料

保存材料为5.4.2继代培养产生离体材料。

5.5.2 组织培养

将保存材料接种到常规继代培养基进行保存。

5.5.3 保存数量

保存数量同5.4.3。

5.5.4 保存条件

保存温度(5℃-18℃)±2℃,相对湿度适宜,光照强度1500 lx-3000 lx,光照时间每天8 h-12 h。

5.5.5 恢复生长

将试管苗转接至继代培养基上,于25±2℃温度培养,常温培养条件,即可恢复生长。

5.6 保存信息登记

植物离体保存库中保存的种质资源材料应进行详细的档案记录,记录的内容应至少包括:编号、保存材料、继代情况、保存数量、保存方法、保存者信息等。植物样本保存信息按照附录C填写,并录入数据库。

5.7 包装与运输

5.7.1 采集材料的包装与运输

从野外采集的植物材料如果不能当天及时进行外植体处理,应装在采样袋中,再放置在有胶体冰袋的容器中进行包装与运输。外包装应有标签标明材料名称、产地、日期等信息。运输可选用公路或航空运输。一般情况下公路12 h能送达的可选用公路运输,其它可选用航空运输,要求需在采集处理后不超过24 h送达。

5.7.2 组培材料的包装与运输

组培材料的包装运输应符合DB33/T 752规定进行。

6 样本的信息化管理

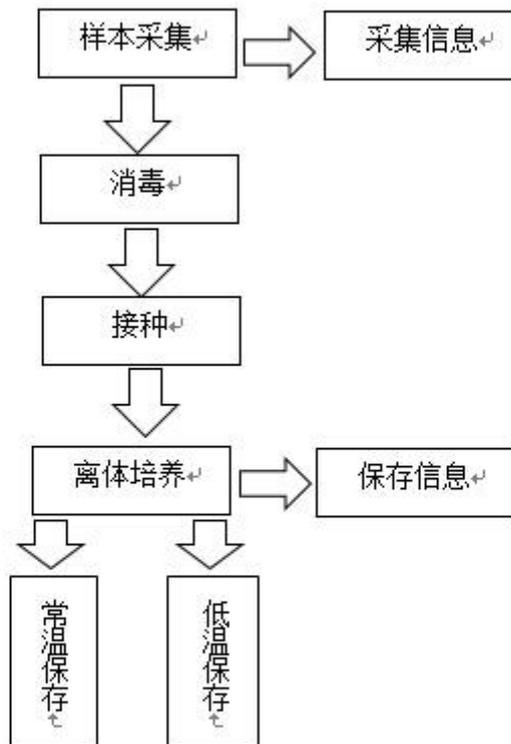
离体保存库应有统一、完整的信息管理系统,用于样本信息的记录与储存并满足样本追踪、检索的需求。此系统宜与其他相关的数据系统兼容或关联,以便共享样本信息和数据,并根据不同工作人员的职责设置相应的权限进行记录和修改,确保信息安全。

离体保存库的信息管理系统应建立安全保障,防止黑客入侵、计算机病毒传播和数据损坏等意外情况,并进行每月一次定期的维护和备份,以应对信息和数据的意外损坏,及时进行异地备份和历史备份。

A

附录 A
(规范性附录)
离体保存库整体操作流程

图A.1 给出了植物种质资源离体保存库的整体操作流程



图A.1 植物种质资源离体保存库操作流程

附 录 B
(规范性附录)
植物种质资源样本采集信息单

表B.1 给出了植物种质资源样本采集信息单的格式。

表B.1 植物种质资源样本采集信息单

采集编号 (Collection Number)					
样本类型 (Types of Samples)					
<input type="checkbox"/> 茎尖 (Stem Tip) <input type="checkbox"/> 茎段 (Stem Segment) <input type="checkbox"/> 根尖 (Root Tip) <input type="checkbox"/> 根段 (Root Segment) <input type="checkbox"/> 叶片 (Leaf) <input type="checkbox"/> 叶柄 (Petiole) <input type="checkbox"/> 鳞茎 (Bulb) <input type="checkbox"/> 块茎 (Tuber) <input type="checkbox"/> 块根 (Root Tuber) <input type="checkbox"/> 种子 (Seed) <input type="checkbox"/> 花瓣 (Petal) <input type="checkbox"/> 花粉 (Pollen) <input type="checkbox"/> 子叶 (Cotyledon) <input type="checkbox"/> 胚 (Embryo) <input type="checkbox"/> 其他 (Other)					
科学分类 (Scientific classification)					
界 Kingdom		科 Family		种 Species	
门 Phylum		亚科 Subfamily		亚种 Subspecies	
纲 Class		族 Tribe		变种 Variety	
目 Order		属 Genus		栽培品种 Cultivar	
植物习性 (Plant habit)					
<input type="checkbox"/> 乔木 Arbor <input type="checkbox"/> 灌木 Shrub <input type="checkbox"/> 半灌木 Semi Shrub <input type="checkbox"/> (草质/木质) 藤本 Vine <input type="checkbox"/> (一年生/多年生/寄生/腐生/水生) 草本 Herb <input type="checkbox"/> 附生植物 Epiphytic <input type="checkbox"/> 其他 Other _____					
采集地信息 (Locality)					
国家 Country		省/直辖市 Province		地级市 City	
县/区 City		具体地点 Place			
经度 Longitude		纬度 Latitude		海拔 Altitude	
生境信息 (Habitat)					
地形 (Landform)	<input type="checkbox"/> 平地 Flat area <input type="checkbox"/> 山坡 Hillside <input type="checkbox"/> 山顶 Hill-top <input type="checkbox"/> 山脊 Mountain ridge <input type="checkbox"/> 陡崖 Cliffs <input type="checkbox"/> 峡谷 Gorge <input type="checkbox"/> 河谷 River valley <input type="checkbox"/> 溪谷 Dale <input type="checkbox"/> 河漫地 River overland <input type="checkbox"/> 湿地 Wetland <input type="checkbox"/> 其他 Other _____				
土地利用 (Land use)	<input type="checkbox"/> 原始林 Virgin forest <input type="checkbox"/> 次生林 Secondary forest <input type="checkbox"/> 人工林 Plantation <input type="checkbox"/> 草地 Grassland <input type="checkbox"/> 耕地 Cultivated land <input type="checkbox"/> 园地 Field				
土壤质地 (Soil texture)	<input type="checkbox"/> 粘土 Clay <input type="checkbox"/> 粘壤土 Clay loam <input type="checkbox"/> 壤土 Loam <input type="checkbox"/> 沙壤土 Sandy loam <input type="checkbox"/> 砂土 Sand				
采集者信息 (Collector information)					
姓名 Name		单位 Unit		部门 Department	
电话 Telephone		Email		日期 Date	

附 录 C
(规范性附录)
植物种质资源离体保存信息单

表C.1给出了植物种质资源离体保存信息单的格式

表C.1 植物种质资源离体保存样本信息单

编号					
保存编号				采集编号	
保存材料					
科		属		种	
继代情况					
继代次数				继代时间	
保存数量					
瓶数				每瓶份数	
保存方法					
□常温保存	温度 (°C)			湿度 (RH)	
	光照强度 (lx)			光照时间 (h/d)	
□低温保存	温度 (°C)			湿度 (RH)	
	光照强度 (lx)			光照时间 (h/d)	
保存者信息					
姓名		单位		部门	
电话		Email		日期	

参 考 文 献

- [1] 李胜, 李唯. 植物组织培养原理与技术[M]. 北京: 化学工业出版社. 2007: 1-252.
- [2] 李浚明, 朱登云. 植物组织培养教程[M]. 第3版. 北京: 中国农业大学出版社. 2008: 1-348.
- [3] 连勇, 陈国忠, 沈文, 徐涵. 植物组织与细胞离体培养技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社. 2011: 1-80.
- [4] 巩振辉, 申书兴. 植物组织培养[M], 第2版. 北京: 化学工业出版社. 2013: 1-175.
- [5] 刘进平, 莫饶, 吴繁花, 韩平原, 莫廷辉, 赖杭桂. 组培工厂及植物组织培养实验室的安全管理[J]. 农业与技术, 2005, 25 (1): 125-126, 129.
- [6] 周红玲, 郑加协, 陈石头. 植物种质资源限制生长保存研究进展[J]. 中国园艺文摘, 2010, 10: 66-68.
- [7] 刘迎春. 马铃薯种质资源离体保存的研究[D]. 呼和浩特, 内蒙古农业大学, 2009, 1-18.
- [8] 陈红俊. 福州和泉州野生蕉 ISSR 分析及其离体保存初步研究[D]. 福州, 福建农业大学, 2012, 1-38.
- [9] 傅伊牵. 几种野生百合离体保存技术的研究[D]. 北京, 北京林业大学, 2012, 1-36.
- [10] 傅立国. 中国植物红皮书 (第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [11] 《中华人民共和国野生植物保护条例》. 1996年9月30日中华人民共和国国务院令 第204号发布, 自1997年1月1日起施行.
- [12] 《国家重点保护野生植物名录 (第一批)》. 国务院于1999年8月4日批准了《国家重点保护野生植物名录(第一批)》, 自发布之日起施行.
- [13] 汪松, 解焱主编. 中国物种红色名录[M]. 高等教育出版社, 2004.
- [14] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所编. 中国珍稀濒危保护植物名录[M]. 科学出版社, 1987.
- [15] 濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES). <http://www.cites.org/eng/disc/what.php>
- [16] 濒危野生动植物种国际贸易公约附录. <http://www.cites.org/eng/disc/species.php>
- [17] Normah, M.N., Kean, C.W., Vun, Y.L. & Mohamed-Hussein, Z.A. 2011. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity – achievements, challenges and future directions. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 47: 26-36.
- [18] Reed B.M., F. Engelmann, E. Dulloo & J.M.M. Engels (eds.). 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI/FAO/SGRP, Rome.
- [19] IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/>
- Rodrigues, A.S.L., Pilgrim, J.D., Lamoreaux, J.L., Hoffmann, M. & Brooks, T.M. 2006. The value of the IUCN Red List for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 21(2): 71-76.
- [20] Chin, H.F. 1996. Strategies for conservation of recalcitrant species. In *In vitro Conservation of Plant Genetic Resources*, eds Normah, M.N., M.K. Narimah and M.M. Clyde, Kuala Lumpur, Malaysia: Percetakan Watan Sdn. Bhd, pp. 203-215.
- [21] Dussert S., N. Chabrillange, F. Anthony, F. Engelmann, C. Recalt & S. Hamon. 1997. Variability in storage response within a coffee (*Coffea spp.*) core collection under slow growth conditions. *Plant Cell Reports* 16: 344-348.
- [22] Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- [23] Engelmann, F. 2011. Biotechnologies for conserving biodiversity. *In vitro Cellular and*

Developmental Biology – Plant 47: 5-16.

[24] George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The technology 2nd edition. Exegenics Limited, Whitchurch, Shropshire, U.K.

[25] Hartmann, H.T., Kesler, D.E., Davies, F.T. & Geneve, R.L. 2002. Chapters 17 & 18 in: Plant propagation – Principles and practices. 7th edition. Prentice Hall, New Jersey, USA.
