

植物种质保存技术

山东农业大学生命科学学院

- 生物多样性国际备受重视。
- 自然环境与生态平衡已遭到破坏，而且在加剧。
- 大量物种在丧失或毁灭，生物多样性越发成了传说。



1

生物多样性

气象
多样性

环境
多样性

自然界生态多样性的三要素

制约依存统一
矛盾对立统一
相互影响相互作用
互促互动主次之分

2

动物多样性

植物
多样性

微生物
多样性

生物多样性三要素

3

遗传物质多样性

基因表达
多样性

遗传信息
多样性

生物遗传多样性三要素

- 影响生物多样性的因素(自然和人为):
- 长期、大量、主观的人工选择及良种的大范围推广，农业种植品种构成逐渐单一化，致使许多珍贵（或潜在的）种质资源丢失。
- 种质资源是植物育种工作的基础。
- 搜集和保存种质资源已受到世界各国的重视。

加之人类社会文明及其发展的多样性，形成了人类自然生态的多样性

- 1. 植物种质资源保存方式

- 植物种质资源保存的方式，依据是否尊重其自然生存的传承选择，大致可分为两类：

原生境保存

异生境保存



- 原生境保存

在植物原来的生存地，采取适当保护性管理，使之可持续地生存下去，并不断繁衍扩大，具体形式有：

①主要针对植物的自然保护地。

②综合性生态保护地，规模比较大，跨国界，跨州界。

- 异生境保存

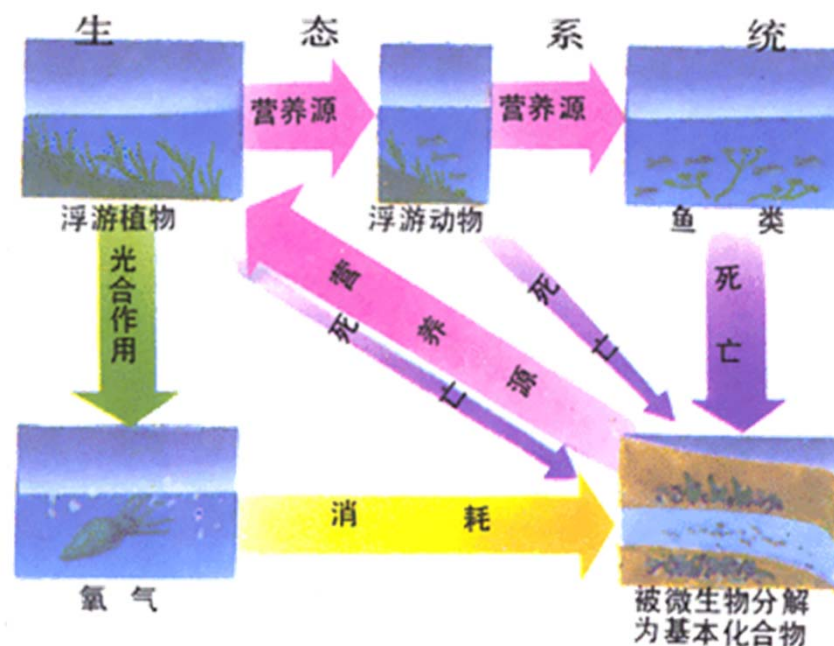
人为地使种质材料离开原来自然生存环境异地安家，避免自然灾害，满足人的需要。

◆ 移植地保存

◆ 种质库保存

◆ 离体保存等

自然选择与人工选择的本质不同



水里微生物 - 浮游动植物 - 鱼类之间的生态平衡

- 移植地保存

- ①主要形式：

- ◆植物种质资源圃

- ◆植物园

- ◆生态园保存等

- ②可与城市建设、环境美化等相结合；

- ③可与教学、科学研究、生产相结合。



移植地保存(即异地保存)

- **种质库保存**

利用温室等保护设施，建立专业性植物资源保存库，如小麦种质资源及其远缘杂交材料。主要形式包括：

- ◆植物种质资源圃

- ◆植物园保存

可与教学、科学研究
以及生产相结合。



- 离体保存

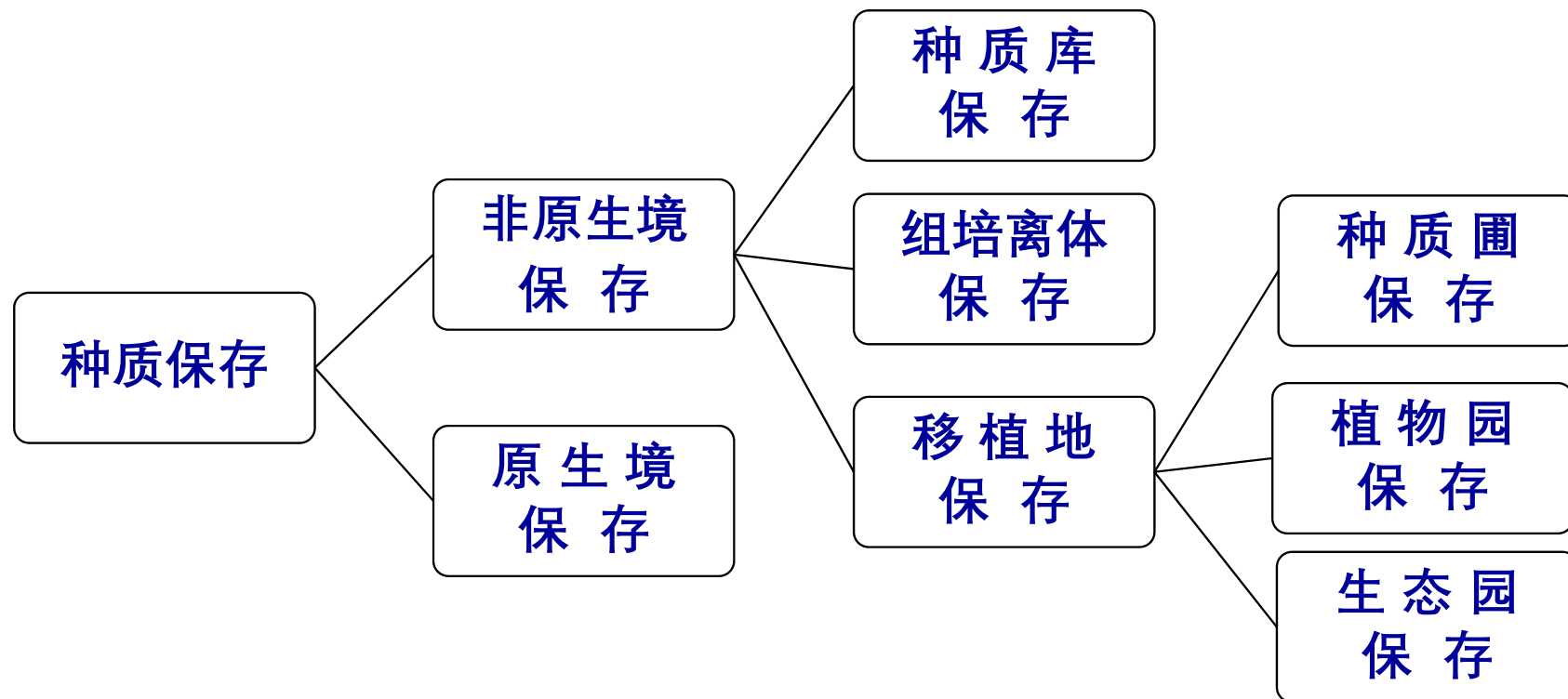
人工实验条件或工厂化保存，主要形式：

- ◆ 利用组织培养手段保存

- ◆ 冷冻等限制生长手段保存

- ◆ 多种手段相配合的综合性保存

可与教学、科学研究、生产相结合。



植物种质资源保存方式

- 原生境保存和移植地保存固然很重要，但要长期保存大量种质材料很困难。
- 需要耗费巨大的人力、物力、财力和土地，实际上很难实施。
- 容易受到风、雨、地震、干旱、冷害、冻害等极端天气自然灾害的危害，以及病虫害和草害的侵袭，人为破坏等，造成植物种质资源的丧失。

- 1992年和2000年两次大的冻害，福建省国家龙眼种质资源圃，野生龙眼等极其重要的多份种质材料被冻死。
- 国家枇杷种质资源圃也因多种自然生态的不良因素破坏，造成多份种质材料丧失。

这两种方式保存种质材料，难以有效保存运输，不利于种质资源的交流及科研合作。

- 2. 种子保存

- 限制因素：

- ◆种子生活力，随着贮存期延长会逐渐丧失。

- ◆无性繁殖植物 (如香蕉) 难于或不宜用种子保存。

- ◆有些植物用种子繁殖，后代会发生变异，也必须采用无性繁殖来保持其优良性状（如果树）。

◆**顽拗型种子植物不宜种子保存（或保存难度很大）。**

◆**易遭自然灾害袭击而丢失。**

◆**人为破坏。**

◆**环境污染。**

- 20世纪60年代，人们开始利用组织培养技术，进行离体保存种质的研究。



- **3. 种质资源离体保存**

- **对离体培养**（小植株、器官、组织、细胞或原生质体等）**材料，采取措施限制**（延缓或停止）**其生长，使之保存，在需要时可重新恢复其生长，并再生植株。**
- **植物茎尖或分生组织、胚、花粉等也常直接用作超低温保存材料。**

- 离体保存优点

- ◆所占空间较少, 节省人力. 物力. 财力和土地。
- ◆便于种质资源交流利用。
- ◆当教学. 科研. 生产需要时, 可用离体培养大量快繁。
- ◆避免自然灾害引起的种质丢失。
- ◆有利于开展教学与科学研究。

- 离体保存不足

- ◆限制或延缓生长处理需定期转移，连续继代培养，需要一定的经费支持和人力物力投入。

- ◆易受微生物污染或发生人为差错。

- ◆长期多次继代培养可能造成遗传性变异及材料的分化。

- ◆再生能力可能逐渐丧失，即细胞全能性丧失。

- 1970年以来，人们把冷冻生物学和植物离体快繁结合起来，发展了离体冷冻保存技术或超低温保存技术。
- 离体种质保存技术不断发展，日趋完善，建立了各种生物材料的离体种质保存库，极大地推动了教学、科研、生产的发展。

第1节 限制生长保存技术

- 限制生长保存

利用各种物理化学因素限制离体培养物的生长速度，以长时间保存之。是离体种质资源保存的一种常用策略。

- 限制离体培养物生长速度的方法：

- ◆低温处理

- ◆提高渗透压

- ◆使用生长延缓剂（或抑制剂）

- ◆干燥

- ◆降低氧分压

- ◆矿物油覆盖 —— 等。

- 这些方法基本原理类似，即严格控制培养条件，限制培养物的生长，使其以极慢的速度生长，继代间隔延长。
- 通过控制培养条件，可使继代间隔超过1年以上。
- **应用这些方法时必须注意：**
- **◆**为了降低培养基水分蒸发速度，要注意贮存容器的类型和密闭方式。在四季橘胚培养离体种质保存中，多数情况是培养基失水而导致组培苗干枯死亡。

- ◆有较大的变异可能性，必须定期对保存材料进行检测鉴定：

- ◆细胞学

- ◆遗传学

- ◆生产农艺性状

- ◆细胞全能性



一、低温保存的方法

- 1. 低温保存

利用较低的温度限制 (或抑制) 生长，以长期保存生物种质材料。

是应用最广泛的种质材料保存方法。

- 一般在1~9℃下培养，可适当提高培养基的渗透压。
- 一些热带、亚热带植物在10~20℃。
- 在这种条件下，培养物的生长受到限制，继代间隔达数月至1年以上。合适于中短期种质保存。
- 一旦要利用这些种质材料，只要把培养物转移到常温下培养，即可迅速恢复生长，并快速扩繁。

- 2. 葡萄的低温保存

- 葡萄再生植株9℃时几乎停止生长，只需1年继代1次，可保存15年。
- 1个分生组织每年可生产1 000万个以上茎段，即可获得大量种苗。
- 已成功保存了800个葡萄种质材料，每种样品设有6个重复，全部仅占用2 m²。

做法：

- ①在附加高浓度钾和IAA $0.1\text{mg} / \text{L}$ 的培养基上 20°C 12h / d光照培养形成小苗。
- ②将小苗移到无生长素、含低钾的 Knop培养基上培养。
- ③当小苗10cm 高时，取出切成带叶的茎段转到新的培养基上， 20°C 光照条件下再生小植株。
- ④把小植株移到 9°C 条件下令其停止生长。
- ⑤需要时，转移到 20°C 条件下，又可以恢复生长，并立即快速繁殖
- 若在田间保存同样数量的葡萄种质，则需要占地 1hm^2 ，还要花费大量的人力物力，且易受环境影响及病虫害侵袭。

• 3. 有关情况与讨论

- ①低温保存已在柑橘、苹果、草莓、梨、香蕉、甘薯、甘蔗、马铃薯、芋头等植物上得到应用。
- ②苹果金冠茎尖，在MS培养基上1~4℃可保存12个月，移到 26℃下便可恢复生长。1个0.25m³电冰箱，可保存2 000个试管，如要种植这些苹果，则需约5.7hm²土地。
- ③4℃暗保存培养的脱毒草莓，每3个月加几滴新培养液，可成功保存6年。
- ④一些热带亚热带植物，可在相对低温 (20℃左右)下保存。

- ⑤柑橘试管苗可在普通培养室温度和光照条件下长期处于生长停滞状态，转到新培养基上可迅速恢复生长。
- ⑥四季橘胚培养苗，在约25℃下可连续无继代保存3年以上。
- ⑦20℃保存四季橘花培苗，不需继代可保存8年，但在15℃条件下培养，保存时间反而明显缩短，并发生落叶等症状。

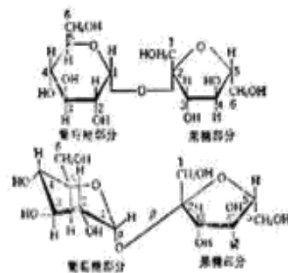
二、高渗透压保存方法

- 1. 高渗透压保存法
- 通过提高培养基渗透压，抑制培养物生长速度。
- 2. 基本原理
- 主要是通过影响离体培养物的吸收作用而减缓培养物的生长。

- 3. 常用方法

- ①提高蔗糖浓度

- 一般来说，离体培养物正常生长所用培养基蔗糖浓度为2%~4%，提高蔗糖浓度到10%左右，就可抑制培养物生长。



- ②添加惰性物质

添加甘露醇、山梨醇等不易被培养物吸收的惰性物质来提高培养基的渗透压，可使其限制培养物生长的作用维持更久。

一般可用2%~3%蔗糖+2%~5%甘露醇处理。



- 马铃薯的离体保存
- 培养基加入8%蔗糖或3%甘露醇，可降低培养物生长速度，延长继代间隔。
- 要注意渗透压太高可能导致培养物死亡。
- 芋头的离体保存
- 培养基添加甘露醇，外植体不经继代保存14个月，培养物存活率(以不添加为对照)见下表。

甘露醇	6%	4.5%	3%	1.5%
存活率	98%	90%	74%	0

- 该试验结果看出：
- 6%甘露醇培养基存活率最高，但甘露醇的浓度并非越高越好。
- 用 6% 甘露醇保存的培养物恢复生长较慢，继代恢复生长培养数周后，有50%外植体死亡。
- 保存在4.5%的甘露醇培养基中，虽然存活率为90%，但恢复生长的情况正常。

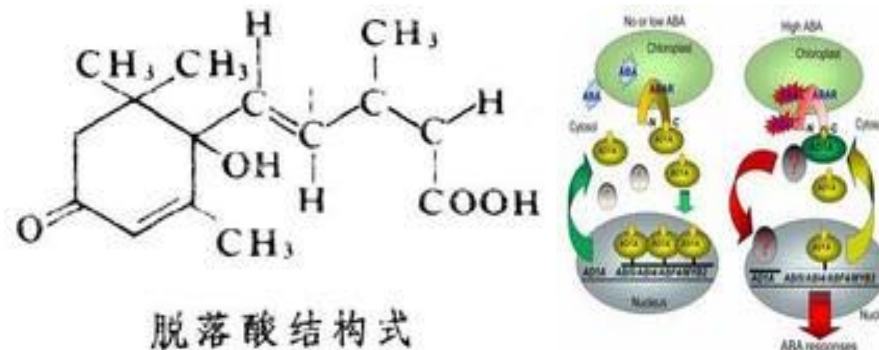
- ③增加琼脂用量

- 增加培养基中琼脂用量可提高渗透压。
- 猕猴桃离体茎尖组织培养，琼脂浓度由0.55%提高到0.8%，可有效延缓培养材料的生长，继代时间延长达到3~6个月。
- 用此法成功保存了40多个猕猴桃离体种质材料。

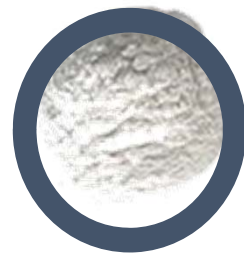
三、生长抑制剂保存方法

- 常规培养基，常添加生长素或细胞分裂素，促进外植体生长发育。
- 但是，离体种质资源保存，则采取一定措施来延缓或抑制培养物生长，达到保存种质的目的。

- 常添加外源生长抑制剂，抑制生命活动，延缓培养物的生长。
- 常用的天然生长抑制剂有脱落酸 (ABA) 具有抗赤霉素的作用， 阻碍RNA聚合酶的活性， 抑制DNA合成， 达到抑制材料生长的目的。



- 在马铃薯等茄属植物中应用最多，在培养基中加入5~10mg/L ABA，使外植体继代间隔延长至1年以上。
- 常用的还有青鲜素、矮壮素、二甲氨基琥珀酸酰胺(B9)、多效唑等人工合成植物生长抑制剂。



四、降低氧分压保存方法

- 通过降低培养环境氧分压，改变培养环境的气体状况，能够抑制离体培养物细胞的生理活性，延缓衰老，达到离体保存种质材料的目的。
- 其原理类似于果蔬类的贮藏保鲜。
- 要严格控制氧分压，如果培养容器内氧分压太低，则会产生毒害作用。

- 1980年以来，此法用于烟草离体茎尖组织培养和愈伤组织培养保存。
- 把培养容器内可利用的氧气降低到60%，培养物的生长速度下降，继续培养6周内生长量就减少了60%~80%。
- 但氧的含量如果降得过低，烟草离体培养的茎尖和愈伤组织生长速度会急剧下降，而产生毒害。



五、干燥保存法

- 水是生物体的有机组分之一，也是生命活动的最重要的基质之一，降低培养物的游离态水分的含量，生理生化代谢就会被抑制，其生命活动就能够得以延缓而维持较长的时间。
- 这与传统的种子等生物材料的干燥贮存类似。

- 将胡萝卜体细胞胚、愈伤组织放在空气流动的无菌滤纸上风干 4~7d, 进行脱水处理, 然后置于加生长延缓剂或限制蔗糖的培养条件下可长时间保存。
- 在不含蔗糖而其他条件正常的培养基上, 可保存2年。
- 在保存过程中, 脱水和限制糖的供给量常是一个正常种子成熟经历的类似过程。

- 利用限制生长方法进行植物无性系的离体保存，简便易行，材料恢复生长快，适于现代化种质库的管理。
- 具体方法与品种特性和基因型有关。
- 不同植物、不同基因型或同一品种的不同材料，保存方法不同。
- 不同实验目的所采用的保存方法不同。
- 在实际操作中，常把多种保存方法结合使用，有助于延长保存年限。

第2节 超低温保存技术

- **超低温种质保存**
- **将植物离体材料** (包括茎尖或芽、分生组织、胚胎、花粉花药、愈伤组织、悬浮细胞、原生质体等) **经过一定方法进行处理，置于超低温** (即液氮温度， -196°C) **条件下进行保存。**

- **1970年:**

Nay和Street, 首先证明植物悬浮培养细胞在液氮中经过长期保存后, 仍能恢复生长, 从而导致了种质资源超低温保存技术的发展与应用。

- 1993年:
- 英国采用超低温保存离体的苹果种质。
- 将苹果芽苗快速脱水后，放到液氮容器内冷冻保存，每年春季，从容器中取出一批芽苗，重新解冻，观察能否复活生长。
- 经过连续几年观察比较，产自世界北部地区的苹果，芽苗复活率达到 100%，其他地区的苹果芽苗复活率从 10%到 100%不等。

超低温保存成功的植物材料：



草莓茎尖



香蕉茎尖



薯蓣茎尖



苹果根尖

苹果冬眠芽



猕猴桃茎尖



马铃薯茎尖



甘薯茎尖等



一、超低温保存的基本原理

- 将离体种质材料经过一定方法进行处理然后保存在液氮中，几乎所有的细胞代谢活动、生长都停止（滞）了，排除了遗传性状的变异，保存了细胞的活力和形态发生潜能。

液氮中 (-196°C)

- 在降温冷冻过程中，如果生物细胞内水分结冰，细胞结构就会遭到不可逆的损坏，导致细胞和组织死亡。
- 植物材料在超低温条件下经长期保存并能在离开保存环境后正常进行细胞分裂和分化，在冰冻过程中有效避免了细胞内水分结冰的伤害，在解冻过程中防止细胞内水分次生结冰损伤。

- 植物细胞含水量比动物细胞高，在冷冻过程中，会形成冰晶和过度脱水，在解冻过程中会重新形成冰晶和遭受温度冲击，保存难度大。
- 如果直接将材料投于液氮，由于细胞内水分结冰，引起组织和细胞死亡。
- 植物种质材料超低温保存必须采取适当措施。

通常可从以下几个方面采取适当措施：

- ①选择细胞内自由水含量较少、抗冻能力强的植物材料。
- ②采取一些预处理措施，提高植物材料的抗冻能力。
- ③在冷冻过程中尽量减少冰晶的形成，控制冰晶的生长，避免组织细胞过度脱水。
- ④在解冻过程中，要避免冰晶的重新形成（即次生结冰），以及温度冲击导致的渗透冲击等。

二、超低温保存的基本程序

种质材料超低温保存有一套比较复杂的技术操作程序。



- 如果操作不当，例如冷冻、融化环节没掌握好，就会造成细胞的损害：
- ①细胞内形成大冰晶，超微结构发生空间位移或损伤，导致细胞器和细胞瓦解。
- ②细胞内的溶解物浓度达到毒害水平。
- ③细胞活性物质漏出，造成细胞伤害。必须掌握好各个技术环节。

(一)植物材料的选取

- 已经研究用过的植物材料有三类：
 - ◆愈伤组织、悬浮细胞、原生质体。
 - ◆花粉和花粉胚。
 - ◆茎尖、腋芽原基、胚、幼龄植株。
- 超低温保存实际应用，需综合考虑材料的再生能力、变异性和抗冻性。
- 选择遗传稳定性好、易再生和抗冻性强的材料是超低温保存成功关键。

- 早期离体种质保存研究，主要用悬浮细胞和愈伤组织为材料，建立离体超低温保存的基本技术程序。
- 实际上悬浮细胞和愈伤组织并不是理想的离体种质保存材料，普遍存在着遗传不稳定现象，现有技术条件，尚无有效控制措施，有些植物的悬浮细胞和愈伤组织经长期保存，再生能力较差。

- 采用茎尖、腋芽原基、胚、幼龄植株等有组织结构的离体材料，由于其遗传稳定性好，易于再生，且细胞体积小、液泡小，含水量较低，细胞质较浓，比含有大液泡的愈伤组织细胞更抗冻，因此是理想的离体保存材料。
- 此外，选择合适生理状态和树龄的材料作为培养物，也是超低温保存应考虑的重要因素。

(二) 材料预处理

1. 预处理的目的是

使材料适应低温条件，提高新分裂细胞的比例。新分裂细胞小，胞内自由水含量少，在冷冻过程中细胞内不易有大冰晶形成，细胞不易受害。

2. 提高材料抗寒能力

在实际操作中，往往采取一些措施提高材料的抗寒能力，提高冷冻后材料的存活率和再生能力。

- 常对材料低温预处理和加入冷冻防护剂。
- ①低温预处理
 - 将离体培养物置于一定的低温环境中，接受低温锻炼，提高抗寒力。
 - 如苹果离体根尖要在4℃下锻炼4~5周，再超低温保存。
 - 低温预处理有部分培养物死亡，但超低温保存后存活率比未经低温预处理的高。

- ②冷冻防护处理

- 冷冻前或期间，细胞脱水导致细胞内原生质中可溶物浓度增加，冷冻防护剂可防止这种溶解效应
- 冷冻防护剂可提高水溶液的黏滞性，降低细胞内盐的浓度和冰晶的形成，使细胞免受冻害。
- 冷冻防护剂可能直接或间接作用于细胞膜减少冰冻伤害。

- ③常用冷冻防护剂

甘油	二甲基亚砷 (DMSO)
脯氨酸	糖类
聚乙二醇	乙酰胺
糖醇	福美氧化硫

- 3. 冷冻防护剂的使用

- ①DMSO是植物最好的防护剂，培养细胞的适宜使用浓度5%~8%。
- 浓度太高 (10%~15%) 会干扰RNA和蛋白质代谢。
- 但是，有一些植物可耐受5%~20%浓度。
- ②实际操作时，常把几种冷冻防护剂混合使用，使各种冷冻防护剂相互协调、共同作用，降低冷冻防护剂的毒性效应，提高细胞存活率和再生能力。

- ③为了防止细胞的渗透冲击，防护剂应慢慢加入(30~60min)，如使用甘油，还需延长时间(30~90min)，因为甘油的渗透性低。
- 脯氨酸对于许多植物来说也是较好的防护剂，最适浓度是10%。
- ④冷冻防护剂用离体培养物的培养基来配制，整个处理期间，材料应保持在 0℃ 左右，一般静置0.5h后，再进行冷冻操作。

- 4. 材料预处理

- 冷冻前材料预处理方法：

- ①选取生理状态良好和年龄适当的植物材料，在固体或液体培养基上预培养一段时间，使细胞达旺盛分裂生长状态，频繁继代可提高细胞的质量。
- ②然后，把茎尖或细胞等培养物，放在提高蔗糖浓度、添加二甲基亚砷和(或)脯氨酸、温度接近0℃的条件下培养数日。

(三) 冷冻处理

常采用四种冷冻方法：

- ❑ 慢速冷冻法 (slow cooling method)
- ❑ 快速冷冻法 (fast cooling method)
- ❑ 预冷冻法 (pre-freezing method)
- ❑ 干燥冷冻法 (dry-freezing method)

- 离体生物材料冷冻时，细胞外的水首先形成冰晶核，冰晶增长速度与溶液成分、降温速度有关，一般在 $-26^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C}$ 范围内冰晶增长最快，形成较大的冰晶，以后减慢，到 -140°C 时完全停止增长。
- 快速冷冻时，细胞内的自由水来不及扩散到周围溶液中，在细胞内形成冰晶，对细胞损害严重。

- 缓慢冷冻时，细胞外水先结冰，水汽压产生变化，细胞内的自由水可扩散到细胞外的冰晶表面结冰，细胞发生保护性脱水，可避免细胞内形成冰晶。
- 然而温度下降太慢，导致细胞脱水过头，又会发生盐析效应，不利于细胞存活。不过，在加防护剂之后，许多情况有所改善，细胞存活率明显提高。

- 1. 慢速冷冻法

- 慢速冷冻法应用较普遍，材料投入液氮前先有一个降温过程。

- 基本操作：

- ①先以 $1\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度缓慢降温至 $-30^{\circ}\text{C}\sim -40^{\circ}\text{C}$ 或 -100°C ，静置1h左右，细胞内游离态水分减少到最低限度。

- ②再将样品放入液氮中(至 -196°C)保存。

- 慢冻法即使体积较大含水量高植物材料，也可得到好的保存效果，适于多数植物种质保存，对茎尖和悬浮培养物尤其适用，要严格控制降温速度。
- 草莓茎尖降温速度需严格控制在 $0.5\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，否则影响其存活率。
- 经低温锻炼苹果茎尖以 $0.1\sim 0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度分步冷冻为佳，在 10°C 停留15min， -40°C 时停留1h。随后迅速置于液氮中。

- 2. 快速冷冻法

- 以 $100\sim 1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降温冷冻，直至 -196°C 保存。
- 冰晶增大的临界温度很快过去，细胞内形成的冰晶没达到使细胞致死的程度。
- 如草莓茎尖 $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷冻，材料不能成活，采用快速冷冻，茎尖则能存活。

- 3. 玻璃化冷冻保存法

- 20世纪90年代初发展起来的一种快冻法。
- 将预处理过的材料直接投入液氮中快速冷冻，冷冻速度约 $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，能够控制冰晶的形成，使细胞快速进入玻璃化状态，避免较大冰晶形成造成的细胞损伤。
- 植物的花粉、种子等高度脱水的材料以及经低温锻炼的木本植物的枝条和芽，均可用快冻法保存。
- 采用此法，已成功保存了一些植物的离体种质材料，如草莓、马铃薯、薯蓣、苹果根。

- 4. 预冷冻法

- 将植物材料放入液氮冷冻之前，先经过几个阶段的预冷冻处理，如 -20°C 、 -40°C 、 -50°C 、 -70°C 等，然后再转入 -196°C 液氮中。
- 此法已较少使用。

- 5. 干燥冷冻法

- 把样品放入烘箱内或真空中脱水，提高其抗冻性，再置液氮中保存。
- 不易产生脱水损伤的植物材料，采用此法有利于提高冷冻保存的存活率。
- 豌豆幼苗在27~29℃烘箱干燥后，水分由约75%降至约30%，在液氮保存后全部存活。
- 香蕉茎尖、体胚、悬浮细胞脱水处理后，再快速冷冻超低温保存效果好。

(四) 冷冻贮存

液氮不断挥发，必须定时补充液氮以持续保存。

- 材料要在液氮中长期贮存，则需一个液氮罐。
- 一个冰箱大约保存4000个容量为2ml的样品瓶，每周消耗20~25L液氮。
- 液氮贮存随着时间延长，细胞活力会下降，技术仍需改进。

(五) 解冻

将液氮中保存的材料取出，使其融化，以便进一步恢复培养。

- 解冻速度是解冻技术的关键，解冻可分为快速解冻和慢速解冻两种方法。
- 解冻速度慢，细胞内容容易发生再结晶，导致细胞死亡；解冻速度快，再结晶的过程来不及发生，或者即使发生时间也很短，细胞的存活率高。

- 1. 快速解冻法

- 取出冷冻的材料，迅速放入 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ (该温度下解冻速度一般为 $500\sim 700^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 温水浴中，小心而缓慢轻轻摇动 (因为冷冻后的组织脆弱易受损伤)，直到材料中的冰晶完全融化消失为止。
- 多数研究者采用快速解冻法。
- 一次保存样品的容量和大小需要按照标准制备，否则温度升降不易精确控制。

- 此法融冰的速度快，细胞内的水分来不及再次形成冰晶就已完全融化，因而对细胞的损伤较轻。
- 如冷冻后的胡萝卜悬浮细胞，在37℃的热水浴中解冻的成活率高于20℃下大气中的解冻成活率。
- 草莓茎尖冷冻保存材料的解冻，应放入36～40℃的温水浴中进行。
- 苹果超低温保存的茎尖，在40℃水浴中快速化冻3min为宜。
- 香蕉超低温保存的悬浮细胞，在40℃无菌水中快速化冻1～2min就完成。
- 可见，不同类型的植物材料，化冻时间是有所差别的。

- 2. 慢速解冻法

- 把材料置于0℃或2℃~3℃的低温下，让冰慢慢融化。
- 少数超低温保存的材料只有采用慢速解冻才能存活。
- 解冻速度的选择应参考冷冻速度。
- 如：木本植物的冬眠芽，因其在慢速冷冻的过程中，经受了一个低温锻炼过程，细胞内的水分已最大限度地渗透到细胞外，若解冻速度太快，细胞吸水过猛细胞膜就会受到强烈的渗透冲击而破裂，进而导致材料死亡。

(六) 保存材料的再培养

解冻后，有的材料需用培养基洗几遍，以彻底去掉防护剂，再接种到新鲜培养基上进行再培养。

- 有的材料洗涤后反而培养不成活，应直接接种于新鲜培养基上。

- 如玉米冷冻细胞不宜洗涤立即进行培养，应将融解后的样品直接置于琼脂培养基上培养，1~2周后培养物即可正常生长。
- 香蕉的超低温保存也不需经过专门洗涤。
- 有的材料在冷冻保存时被冻死，使得再培养的成活率达不到 100%，需要测定培养物的活力，以剔除没有生活力的培养物。
- 测定方法有：
 - ◆ FDA染色法
 - ◆ TTC还原法
 - ◆ Evans Blue染色法等

- 多数情况下，存活率在20%~80%之间。
- 木薯分生组织，超低温保存后，存活率为21%
- 曼陀罗悬浮细胞超低温保存后，存活率为40%。
- 不同植物材料及不同保存程序的超低温保存效果不同。
- 如低温(2℃)锻炼过的金冠和富士苹果的茎尖，超低温保存后成活率可达80%。

- 薯蓣的两个种D. a和D. b的茎尖超低温保存后，成活率分别为60%和20%，并再生完整植株。
- 超低温保存已在香蕉、甘薯、芋头、马铃薯等植物上建立了较成熟的技术，并用于大规模离体种质保存。
- 植物种质离体保存目的是保持其遗传稳定性。
- 在植物离体保存过程中，会出现不同程度遗传变异。
- 了解离体种质保存过程中的变异规律及影响变异的因素，以最大限度地保持离体保存种质的遗传稳定性。

第3节 离体保存材料遗传稳定性

一、遗传稳定性的保持

- 遗传稳定性就是保持种质的原始状态。
- 种质保存成功与否就在于能否保持其遗传稳定性，在种质保存中保持最低程度遗传变异，重新繁殖后能保持最大遗传相似性。
- 长期频繁继代，离体保存材料变异性常会增加，表现为染色体畸变和基因突变。

- 无性繁殖的香蕉试管苗，继代15~20代后，开始出现形态异常(植株矮小等)和染色体畸变的芽苗。继代15代时出现染色体的混倍体。继代20、40、60代时，染色体的变异率分别达0.25%、1.25%、4.64%。
- 非整倍体则在刚开始就出现，发生比例为0.25%；至60代时为1.65%。
- 继代25代时，开始出现六倍体和九倍体等高倍体，表型为极度矮小、散把、叶小而厚等。

• 因此，必须对所保存材料，定期进行如下方面的检测：

◆ 细胞学

◆ 遗传学 (生化、分子标记检测等)

◆ 生产性状的鉴定

◆ 遗传稳定性。



二、影响遗传稳定性的因素

- 影响离体保存种质遗传稳定性的因素很多主要有外植体的类型、培养基成分、保存方法保存时间等。
- 为了提高离体保存种质的遗传稳定性，需全面考虑，尽量减少离体种质保存过程中的遗传变异。
- 外植体在遗传上要能代表需保存植物材料的遗传特性。

- 培养基中尽量减少易导致染色体畸变和基因突变物质的使用。特别是 2,4-D 等生长调节剂，高浓度 2,4-D 常会明显增加组织细胞染色体畸变频率。
- 采用限制生长保存，不管采用何种培养基，随着保存时间的延长及继代次数增加，变异可能性就随之增大，因此要尽量减少继代次数。
- 检测遗传稳定性，要注意区分可遗传变异与非遗传变异。

