

第八章 种质保存 (P285)

一、种质资源保存的一般概念

种质: 指亲代通过生殖细胞或体细胞传递给子代的遗传物质

种质保存: 利用天然或人工创造的适宜环境,使个体中所含有的遗传物质保持其遗传完整性,高活力,能通过繁殖将遗传物质传递下去。

- 种质保存

原地保存和异地保存两种方式。

1, 原地保存:指在自然生态环境下, 就地保存, 自我繁殖种质。

这种方式不仅可以保存种质, 还可以保护不同的生态系统。如各类保护区的建立。世界第一个保护区是1872年美国建立的黄石公园。

2. 异地保存:将种子、植物体保存于该植物原产地以外的地方，主要形式有植物园、种质圃、种子库、组织培养物的试管保存（离体保存）等。

种子保存所占空间小并能保存多年，且易于干燥和包装便于运输。但处于易受病虫害侵害；遗传性状不稳定有些种子含水量高难于脱水保存。

离体保存是将单细胞、原生质体、愈伤组织、悬浮细胞、体细胞胚、试管苗等植物组织培养物储存在使其抑制生长或无生长条件下，达到保存目的的方法。该法具有省时省力，不受自然生态因素影响，便于交流运输等优点。主要有**低温保存**和**超低温保存**两种方式

离体保存的意义:

- 可使一些无性繁殖作物种质资源低温长期保存，避免资源的丢失。
- 节省土地和劳力，方法简单，花费少并能在保存中脱毒。
- 一旦利用可快速繁殖；也利于种质交换。

一、常温保存（离体）

● 温度：20~30℃

改变培养基中营养物质的浓度

降低无机盐浓度

提高渗透压：甘露醇、蔗糖

增加生长调节物质

改变培养的环境条件：降低氧的含量

覆盖矿物油

降低氧压

● 特点：保存时间短，1年转3~5次

二、常低温和低温保存

● 常低温:0~15°C

● 低温:-80~0°C

● 方法:

低温保存

改变培养基成分

改变培养条件

特点: 简便易行, 投资小. 1年转1~3次

—80°C以下的低温称为超低温
干冰温度(—70°C)称为极低温

- 一般**5~10℃**适宜保存温带起源植物的试管苗
- **15~18℃**可用于热带植物试管苗的保存。

适当缩短光照时间，降低光照强度，也能减缓材料的生长速度，延长保存时间。但也要防止光照过弱使材料生长纤细，形成弱苗。导致生长不能维持。

- 改变培养基成分，在培养基中添加脱落酸、矮壮素和甘露醇等生长延缓剂和渗透剂。其中以对材料遗传稳定性影响小的甘露醇为最好，培养基中加入较低含量的甘露醇可以明显提高材料的存活率。

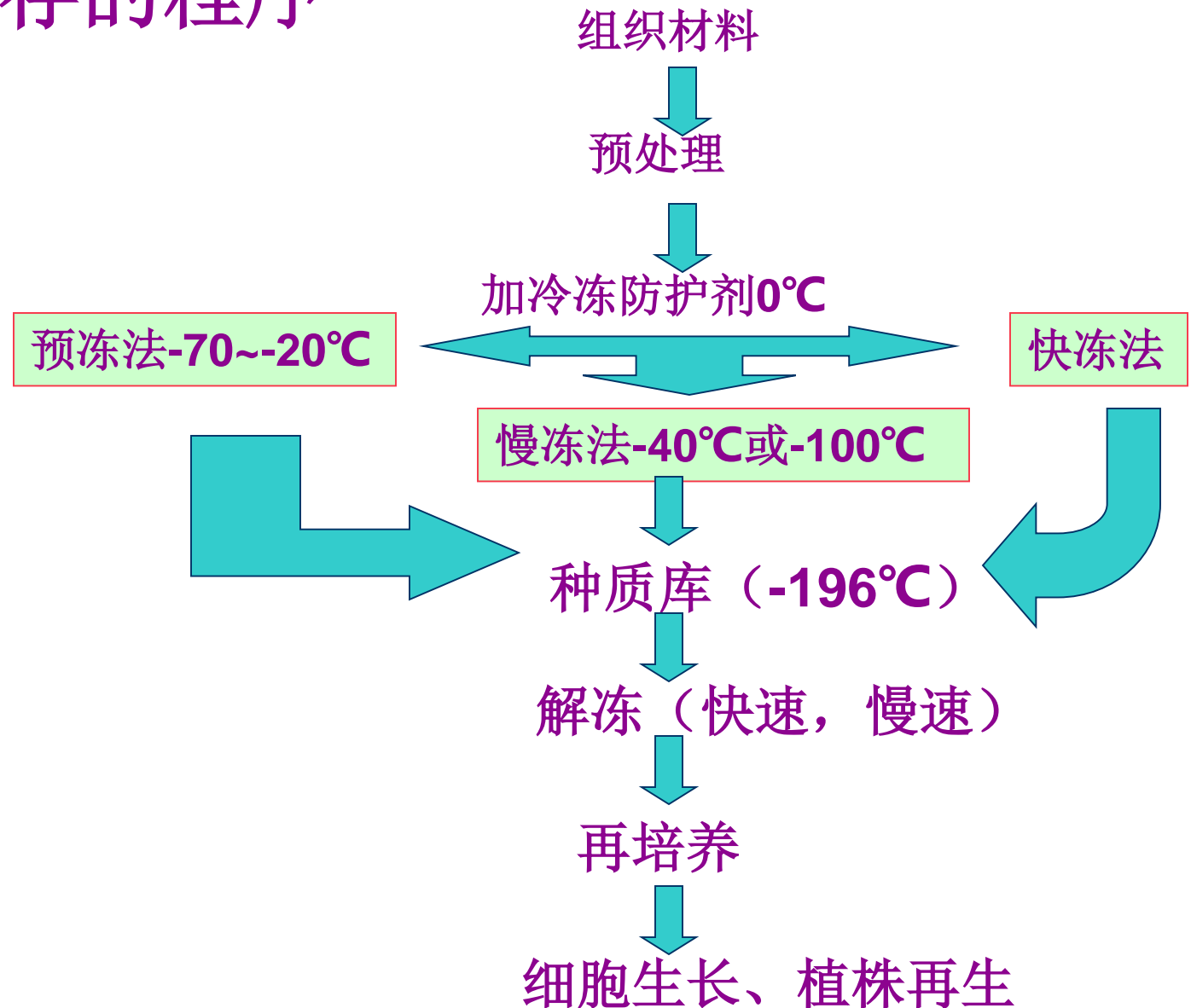
- 低温保存的技术操作简单。以魔芋为例，选取茎尖分生组织为外植体，建立试管苗无性系；选取生长健壮的、芽大小为**1.5cm**的材料移入保存培养基，于**25℃**，光照度**1000lx**，**12h**条件下培养一周；转入**4℃**黑暗中保存。材料每**6**个月继代培养一次，继代培养时，从形态、经济性状、生理生化等方面进行遗传稳定性鉴定。

三、超低温保存

超低温保存：也叫冷冻保存，指在-196℃的液氮超低温下使细胞代谢和生长处于基本停止的状态，在适宜条件下可繁殖，再生出新的植株，并保持原来的遗传特性。

超低温保存植物种质资源的程序包括培养材料的准备、预处理、冰冻及保存、化冻处理、细胞活力和变异的评价、植株再生等几个步骤。

超低温保存的程序



1、冷冻的方法

快速冷冻法
慢速冷冻法
分步冷冻法
干燥冷冻法

(1) 快速冷冻法

本法是将植物从**0°C**或其他预处理温度直接投入液氮。其降温速度在每分钟**1000°C**以上。在降温冷冻过程中，从**-10°C**到**-140°C**是植物体内冰晶形成和增长的危险温度区，在此以下冰晶不再增生。因此，快速冷冻成功的关键在于利用超速冷冻，使细胞内的水迅速越过冰晶生长的危险温度区。细胞内的水形成“玻璃化”状态。采用快速冷冻方法，要求细胞体积小，细胞质浓厚，含水量低，液泡化程度低的材料。如：高度脱水的种子、花粉、球茎或块根，茎尖分生组织等

(2) 慢速冷冻法

本法是以每分钟**0.1~10°C**的降温速度（一般**1~2°C/min**）使材料从**0°C**降至**-10°C**左右，随即浸入液氮，或者降至**-196°C**。在此条件下可以使细胞内的水有充足的时间不断地转移到细胞外结冰，从而使细胞内的水分减少到最低限度，避免在细胞内结冰。本法适用于成熟的、含有大液泡和含水量高的细胞，对于保存在县浮培养中的细胞特别有效。

(3) 分步冷冻法

此法是指植物的组织和细胞在放入液氮前，经过一个短时间的低温锻炼。可分为两步冷冻法和逐级冷冻法两种。

a. 两步冷冻法

此法实际是慢速冷冻法和快速冷冻法的结合。它的第一步是采用**0.5-4°C/min**的慢速降温使温度从**0°C**降至**-40°C**；第二步是投入液氮迅速冷冻。植物材料在第一步冷冻后，必须停留一段时间，使材料充分脱水。材料是悬浮培养细胞和愈伤组织的冷冻保存多使用此法。

b. 逐级冷冻法

此法是在程序降温仪或连续降温冷冻设备的条件下采用的一种冷冻保存方法，一般先制备不同等级温度的溶液。如**-10°C**、**-15°C**、**-23°C**、**-35°C**、**-40°C**等。植物材料经冷冻保护剂在**0°C**处理后，逐级通过这些温度。在每一级别温度中停留一定时间（**4-6min**）然后浸入液氮。这种方法使细胞在解冻后呈现较高的活力。

(4) 干燥冷冻法

此法是将植物材料置于**27~29℃**烘箱内，使其含水量由**72-77%**降至**27-40%**后，再浸入液氮，可以使植物材料免遭冻死。用真空干燥法使细胞脱水则效果更好。

2、解冻方法

(1) 快速解冻法

把冷冻材料直接投入**37~40℃**的温水中。解冻速度为**500~700℃/min**。化冻后转入冰槽中保存。材料解冻时的再次结冰危险区域是**-50至-10℃**。该法可能尽快过这一区域。

(2) 慢速解冻法

- 把冷冻材料先置于**0°C**下，然后逐渐升至室温，让其慢慢解冻。适用于细胞含水量较低的物种或材料。如木本植物的冬芽等。
- 解冻方法的选择不仅与材料特性有关，还与冷冻时采用的方法有关。**快速冷冻的材料也应快速解冻**。同时还要注意材料的避免机械损伤；一旦解冻，就应把试管转至**20°C**水浴中，并尽快洗涤材料和再培养，以免热伤害。

3、 重新培养

- 将解冻的材料，重新置于培养基上使其恢复生长。如加了防护剂，则应当先将材料洗涤几次。以去除防护剂的毒害作用。但此过程中也将一些冷冻过程中细胞渗漏出来的对于培养有利的物质去除了，因此有时不去除防护剂也可。
- 此外，在再培养早期，一般有一个生长停滞期。它的长短取决于细胞的损伤程度、保护剂的浓度，也与植物材料和基因型有关。

4、提高冷冻后细胞或组织存活率的方法

(1) 植物材料的性质

(2) 冷冻前的预处理

(3) 解冻方法

(4) 重新培养

▶ 悬浮培养或继代培养

▶ 预培养

▶ 低温锻炼

▶ 冷冻防护剂

▶ 快速解冻法

▶ 慢速解冻法

(1) 植物材料的性质

冷冻前材料材料的性质，包括物种、基因型、抗寒性、年龄、形态结构和生理状态等，都会对冷冻效果产生很大影响。一般来说，小而细胞质浓厚的分生组织或细胞，比大而高度液泡化的细胞容易存活。因此，应当选用频繁继代的愈伤组织材料。胚状体也以幼龄的球形胚存活率最高，心形胚次之，子叶胚最低。而较大的组织材料则仅有分生细胞可能重新生长。

(2) 冷冻前的预处理

a. 悬浮培养或继代培养

在悬浮培养中，可采用饥饿法使细胞分裂处于同步。增加指数生长期的细胞，能有效在提高保存存活率。

方法为：先使细胞在不含磷酸盐的培养基中饥饿4天。再转入正常培养基中进行同步化。另外，在培养基中加入细胞分裂抑制剂如5-氨基尿嘧啶、羟基脲和胸腺嘧啶核苷等。使细胞滞留在G1期和S期的边界上，去除抑制剂后，细胞即达成同步化。

b. 预培养

冷冻前对材料进行短暂培养可以提高冷冻处理后的存活率。一般加入**5%二甲基亚砷（DMSO）**预培养**48h**。将细胞适度脱水，也可提高存活率。

c. 低温锻炼

将植物茎尖在冷冻之前，放在**4°C**下处理**3天**。可提高存活率。

d. 冷冻防护剂

冷冻防护剂可以防止细胞的溶液效应的毒害。它具备以下作用：降低冰点，促进过冷却和玻璃态化的形成；提高溶液的黏滞性，阻止冰晶形成；**DMSO**可以使膜物质分子重新分布，增加细胞膜的透性，在温度降低时，加速细胞内的水流往细胞外结冰；稳定细胞内的大分子正常结构，特别是膜结构，阻止低温对膜的伤害。甘油、糖、糖醇类也是冷冻防护剂。**DMSO**应当在**30~60min**的一段时间内逐渐加入以免对细胞产生毒害作用。脯氨酸是植物体内天然的防护剂。

5、 冷冻保存后细胞和器官活力的检测

最基本的活力检测方法是再培养法。根据组织细胞的复活程度、存活率、生长速度、组织块的大小和重量的变化，以及分化产生植株的能力和各種遗传性状来表达。

- 存活率 = $\frac{\text{重新生长细胞（或器官）数目}}{\text{解冻的细胞（或器官）的数目}} \times 100\%$

- 在冷冻和化冻期间受过不同程度损伤的细胞或器官也可能再生出完整的植株。这是由于培养材料再生出了次级的分生组织的原故。

6、冷冻保存的应用前景

- 1) 长期保存种质的遗传稳定性。
- 2) 长期保存去病毒的种质。
- 3) 保持稀有珍贵及濒危植物的种质资源。
- 4) 保持不稳定性的培养物，如单倍体。
- 5) 保持培养细胞形态发生的能力。
- 6) 防止种质衰老。
- 7) 延长花粉寿命，解决不同开花期和异地植物杂交上的困难。
- 8) 冷冻解冻过程可筛选抗逆新品种。
- 9) 便于国际间的种质交换。

本章小结：

- 1、了解种质资源、种质保存的一般概念
- 2、常温保存、常低温和低温保存
- 3、超低温保存
 - (1) 冷冻方法
 - (2) 解冻方法
 - (3) 重新培养
 - (4) 提高冷冻后细胞或组织存活率的方法
 - 植物材料的性质
 - 冷冻前的预处理
 - 解冻方法
 - 重新培养
 - (5) 冷冻保存后细胞和器官活力的检测
 - (6) 冷冻保存的应用前景。

思考

1、低温保存与超低温保存有何异同？

2、根据低温保存原理，设计一种植物

保存方案

- 组织培养技术在农业生产中的应用，并举一实例。