

农作物种质资源超低温保存技术规程

1 范围

本规程规定了农作物种质资源超低温长期保存的工作程序和技术要求。

本规程适用于种子、胚轴、花粉、休眠冬芽、茎尖分生组织等种质资源的超低温保存。

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 19489-2004 生物安全通用要求

GB/T1.1-2000 标准的结构和编写规则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程。

3.1 超低温保存

在液氮液相(-196℃)或液氮雾相(-150℃)中对生物器官、组织或细胞等材料进行长期保存。其原理是植物材料的代谢和生长活动在这样低的温度条件下几乎完全停止，因此能够有效保持材料的遗传稳定性，同时又不会丧失其形态发生的潜能。

3.2 顽拗型种子 (Recalcitrant seed)

指对干燥脱水和(或)低温敏感的种子。产生顽拗型种子的农作物大多数是热带、亚热带的多年生木本植物，如热带的可可、椰子等作物和热带亚热带的芒果、油梨、榴莲、红毛丹、木菠萝、荔枝、龙眼、黄皮等水果。通常种子较大，含水量较高。这类种子对脱水伤害的反应高度敏感，采收后如果置于室内通风处，一般只有几天或十几天的寿命；如果采用湿境贮藏一般只有几个月的寿命。同时

这类种子对冰点以上低温敏感，易遭受冷害。

4 基本原则

超低温保存与资源的种质库保存、试管苗库保存、种质圃保存、原生境保存等途径构成了互补的保存体系，是安全复份保存的重要方法之一。

由于物种之间，甚至是同一物种不同品种之间，其超低温保存技术差异很大，且许多技术仍处于试验研究阶段，还未进行规模化、标准化实践验证，因此任何作物或某一类种质材料在进行常规超低温保存之前，都应进行试验研究，并制定出相应的操作处理程序手册。

5 仪器与常用试剂

5.1 仪器设备

(1) 用于组织、细胞和原生质体培养的全套设备，如超净工作台、高压灭菌锅、培养瓶、培养架、光照培养箱、空调、除湿机、电子天平、pH计、电磁炉、微波炉、酒精灯、记号笔、封口膜、坩埚钳等。

(2) 普通冰箱和 $-60\sim-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。

(3) 程序降温仪、分光光度计、光学显微镜和紫外光荧光显微镜。

(4) 铝箔袋、塑料袋、布袋和细线绳、安瓿瓶、不锈钢冷冻筒、塑料管或冷冻管等，容积规格为5ml或10ml等，要求封盖严密，不进液氮。

(5) 进行种子解剖、脱水、含水量测定和活力检测的仪器与工具，如解剖针、医用剪刀、镊子、培养皿等。

(6) 蒸馏水和充足可靠的液氮(LN)源供应。液氮通常由专门的公司供应，也可以利用每个月可生产100~900L的小型LN生产设备生产液氮。

(7) 液氮贮藏罐、操作罐和专用运输罐(通过邮寄或快运方式进行长途运输冷冻植物材料)。YNZ-35-120或YDS-35-125等型的一般液态氮冷冻罐，具有一个抽成真空的双层壁，使装入罐内的液态氮在大气压力下保持最大限度的绝缘。

5.2 常用试剂

超低温保存常用试剂除组培常用试剂，即大量元素(硝酸钾、硝酸铵、硫酸镁、磷酸钾、氯化钙)、微量元素(硫酸锰、硫酸锌、硼酸、碘化钾、钼酸钠、硫

酸铜、氯化钴)、铁盐(硫酸铁、乙二胺四乙酸二钠)、有机物(甘氨酸、维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 B₂、烟酸、肌醇等)、蔗糖、琼脂、酒精、次氯酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、氯化汞、激素(IAA、NAA、IBA、BA 等)外,还应包括:(1)用于配制饱和盐溶液的试剂,如氯化锂、碘化锂、碘化钠、硝酸镁、氯化钠、硫酸铵、氯化钡等;(2)冷冻保护剂,如甘油、乙二醇、聚乙二醇、二甲基亚砷、乙烯乙二醇、山梨糖醇、甲酰胺、丙烯乙二醇;(3)变色硅胶、海藻酸盐、液氮等。

6 基本程序

工作内容主要包括入库保存、保存过程中的监测、种质提取利用和信息资料处理等。其中入库保存又包括材料的选择与准备、预处理、冷冻前处理、降温冷冻处理、液氮超低温处理、初始活力检测、液氮超低温长期保存等。整个处理程序见图 4-1。

7 入库保存

7.1 材料选择与准备

7.1.1 花粉

采集花粉时要根据每种作物花粉的散粉特点、产量及外界环境条件、采集的难易程度等的不同而采取不同的处理方法。

在采集花粉时要注意以下事项:

(1) 气温条件

花粉采集者应注意散粉临近期的气温变化情况。如在散粉期前气温偏高,花药则会提前开裂,采粉期就要提前。

另外,对于一些果树,可直接剪取花枝培养于室内,在人工控制的条件下,如提高温度、增强或延长光照等,以加速花粉成熟,提早采粉时间。一般在室温 27℃,用 600w 白炽灯在距离 1m 远处,每天光照 20h。

(2) 采粉时期

要在盛花期采集花粉,避免在扬花期之前或盛花期之后采集花粉。

(3) 采粉时间

对大多数作物而言，采集花粉时要根据花序发育的形态及其色泽变化的特点，于晴天上午或中午进行采集。

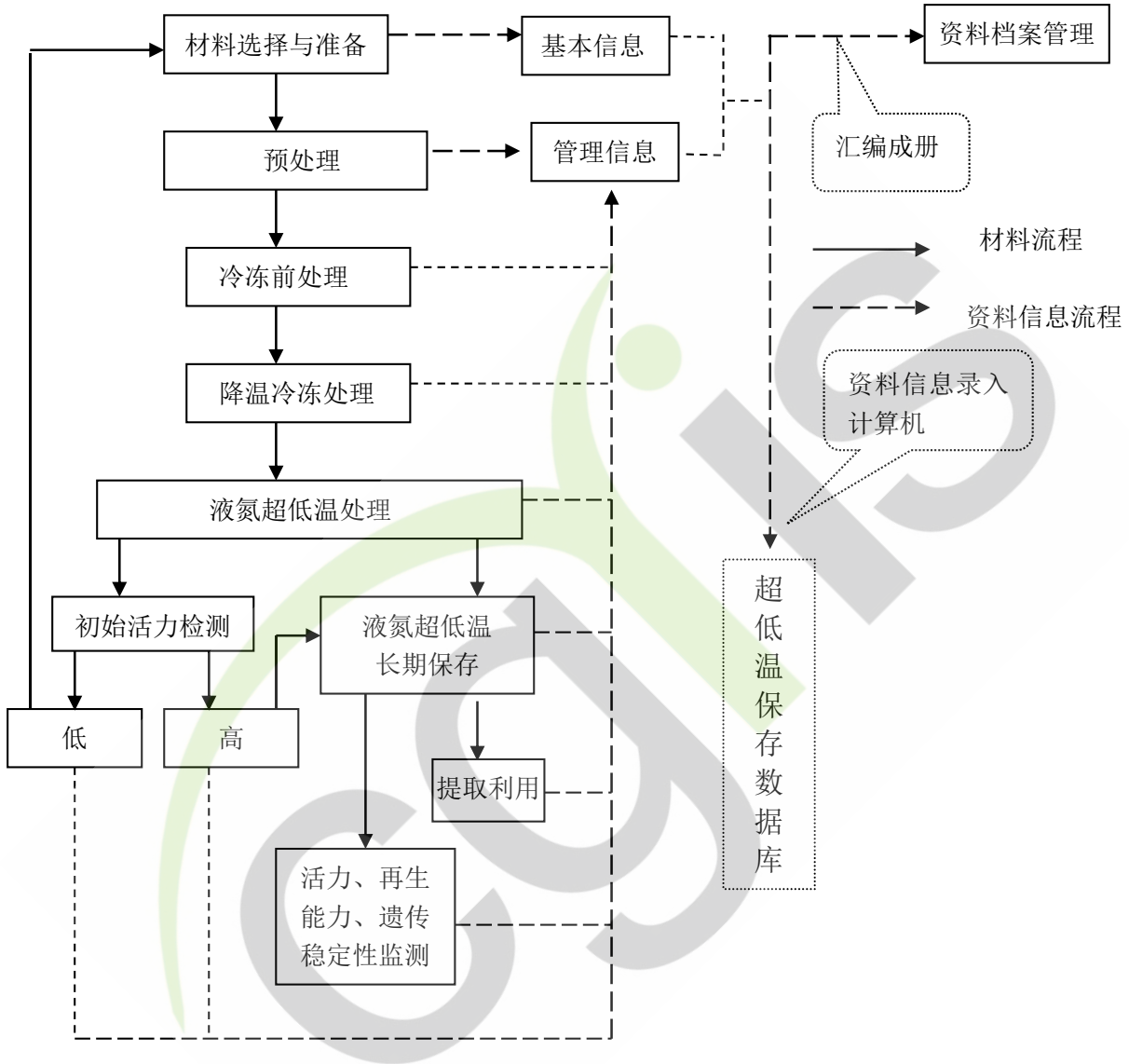


图 4-1 超低温保存工作程序

(4) 采粉植株

不要采集受干旱或热胁迫过的植株花粉，要从发育良好但尚未开放的花朵上采集花粉。

(5) 采粉数量

要根据保存目的和保存数量要求而定。一般采集 200~500 朵花就可提供几千次授粉所需的花粉，对桃、梨花朵而言，1000 个花蕾约可得 1ml 花粉。

(6) 花粉采集后的处理

① 采摘后要及时将采摘到的花药放在筛状容器中通风干燥,待花药开裂后,即可筛出散落的花粉。

② 对产粉量较少的植物,可直接采摘未开放的花朵,置于塑料容器中摇晃,使花粉粒因静电吸附作用而附着在容器壁上,然后将吸附的花粉刮拨下来。或者将花朵带回室内,在一块具有4~6mm网眼筛子或金属布上轻轻地揉擦。注意压力不能太大,否则会损坏花药,并使之不能很好地裂开,而且用筛子分离时易导致碎片与花药混杂。碎片可用适当大小网眼的滤器使之与花药分开。将花药筛到无光、具渗透性的纸上,薄薄地摊平。

对于量少的花朵,可垂直切开或撕裂,用手指碾动,使之展开,用小梳子或剪刀的刀背取下花药,以保证得到最大量的花药。

如果花容易取得,可采集更多的花并用粗眼筛子分离比较快。最好是当花朵处于鲜嫩、饱满状态时尽可能快地将花药取出。

③ 如果花药在采集后几小时内不能从花朵中分离,则必须将花朵留在袋内,贮藏于2~4℃的冰箱内,一直到分离时为止。

④ 在处理每一品种的花粉前须用70%的酒精洗涤所有用具,以免发生混杂。

7.1.2 种子

(1) 选择适宜的成熟期从生长健壮的植株上采摘种子。

(2) 种子采摘后立即进行原始含水量和活力的测定。使种子含水量在最高冻结含水量和最低安全含水量(多数顽拗型种子的最低安全含水量临界值为12%~31%之上)之间。如果含水量较高,可以适当干燥,但切不可低于其临界值,否则将遭受脱水损伤。种子的原始活力一般应 $\geq 85\%$ 。

(3) 顽拗型种子应保存于潮湿而疏松的物质中,并使用杀菌剂以防真菌滋生。

(4) 种子应保存在较低的温度,但要在受冷冻损害的临界温度之上。

(5) 最好使种子处于休眠状态。

7.1.3 胚轴

(1) 采摘种子

选择适宜的成熟期从生长健壮的植株上采摘种子。

(2) 检测种子质量

检测种子原始含水量、原始活力、胚轴含水量、胚轴的颜色、状态和在种子中的着生部位等。

(3) 种子表面灭菌

① 用自来水将种子上的泥沙冲洗干净。

② 用 0.1%洗衣粉水或洗涤剂漂洗 10~15min。

③ 用自来水冲洗干净，约 10~20min。

④ 在无菌条件下，把种子置于消毒的玻璃杯内。

⑤ 用 70%酒精浸泡 5~10S 后立即倒掉酒精。

⑥ 倒入 2.5%~5%次氯酸钠溶液消毒 7~12min（或用 2.5%次氯酸钙溶液消毒 15min 或 1%氯化汞消毒 10min）后倒掉消毒液。

⑦ 用无菌水冲洗 3~4 次，每次约 3~5min，以除去过量的次氯酸盐。

(4) 拨取胚轴

在无菌条件下将种子切开，除去胚乳和子叶，得到胚轴。在取胚轴时要特别小心，不要损伤胚轴，特别是不能损伤胚根和胚芽的生长点。有时胚轴上需保留部分子叶（约 1/3），有利于胚轴的生长。

7.1.4 休眠冬芽

对象为可以进行芽接或嫁接的耐寒温带木本植物的休眠冬芽或带芽枝段。

在冬芽的深度休眠期（1月中下旬至2月上旬）从壮年的树上剪取健壮的一年生春梢枝条，枝条上的冬芽要饱满、无病虫害。将从田间母株上选取经过足够低温驯化的枝条剪成带有 1 个腋芽，约 15cm 左右的枝段，或从枝条上切取带有约 10mm 维管组织的腋芽，干燥至含水量 30%后用双层塑料薄膜包裹或放入聚乙烯袋，置于不锈钢冷冻筒（直径 37mm，长 135mm）内，于 0℃冰箱贮藏备用（1 个月内）。

7.1.5 茎尖分生组织

对象为除休眠芽以外的茎尖分生组织。不耐寒，没有进行低温锻炼或处于生长状态的材料，需培养成试管苗以获得离体芽或侧芽以取其茎尖作为超低温保存材料。

茎尖的生理状况要适于耐渗透，而且具有旺盛的恢复生长的能力，应该从生长健壮的植株上选择处在指数增长期的细胞。

7.2 预处理

7.2.1 预处理目的

使保存材料达到最适于超低温保存的生理状态。

7.2.2 预处理方法

茎尖分生组织、胚（轴）和顽拗型种子预处理的一般方法是在 0~4℃ 进行人工低温锻炼不同时间（一般 1~6W）或（和）用不同浓度蔗糖或（和）甘露糖的培养基进行不同时间（一般 1~7d）的预培养。在预培养时有的需要逐步提高蔗糖浓度，有的需要添加 ABA 等激素，有的则要缩短光照时间。

休眠冬芽或枝条预处理的一般方法是在 0℃ 进行低温锻炼不同时间。有的则需逐步在 0℃ 以下温度处理不同时间，如 -3℃，14d → -5℃，3d → -10℃，1d。

花粉一般不需要进行预处理。

7.3 冷冻前处理

7.3.1 冷冻前处理目的

利用干燥、包埋、冷冻保护剂渗透调节、玻璃化液等对材料进行处理，以避免在降温过程中出现冻伤。不同物种或不同种质材料类型所要求的冷冻前处理方法不同。

7.3.2 冷冻前处理方法

7.3.2.1 干燥（脱水）法

干燥（脱水）方法有慢速脱水、中速脱水、快速脱水、超速干燥（Ultra-rapid drying）或瞬间干燥（flash drying）等方法。主要应用于种子、合子胚、顽拗型和中间型种子离体胚轴的冷冻保存。

种子一般放置在干燥和 15℃ 的环境中脱去水分。在脱水时应定期监测材料

的含水量。种子最低含水量依种子的脱水耐性而定。正常型种子可以脱水至含水量 5%~10%，耐超干种子含水量可更低些。可以用变色硅胶或无水氯化钙实现材料的快速脱水。小批量种子的慢速脱水可以用饱和盐溶液；大批量种子的慢速脱水需要在干燥间（15℃和 45%RH 的恒温恒湿条件）内进行，不能采取暴晒或加热的方法。

胚（轴）的脱水方法有慢速脱水法、中速脱水法和快速脱水法，其中最常用的方法是将胚轴摆放在超净工作台上，让无菌气流把水分带走，使胚轴中速脱水。也可以使用变色硅胶或无水氯化钙实现材料的快速脱水。慢速脱水可以用饱和盐溶液完成，还可以将材料依次转移到相对湿度递减的不同饱和盐溶液中进行分步脱水。

如果采用压缩干气流进行超速干燥或瞬间干燥，材料的含水量可以相对高些，含水量为 10%~20%（以鲜重为基础），以减少干燥损伤。

7.3.2.2 预培养方法

将材料在加有冷冻保护剂的培养基中预培养不同时间后直接投入液氮中进行快速冷冻。例如，芭蕉需用高浓度蔗糖培养基进行预培养，此方法将成为芭蕉最简单和普遍适用的超低温保存方法。小麦和豆类合子胚需用聚乙二醇和二甲基亚砷培养基进行预培养。

常用的冷冻保护剂有蔗糖、甘油、甘露醇、聚乙二醇、二甲基亚砷等，浓度为 5%~15%。若将不同的冷冻保护剂配制成混合液使用，效果更好。

如果种子的最低安全含水量比较高，而最高冻结含水量又比较低，则脱水预处理的效果是不理想的，需要添加冷冻保护剂进行预处理，如中间型、顽拗型种子以及吸胀后的正常型种子。具体做法为：首先让种子在室温条件下吸湿一定时间后再在 100%相对湿度的密闭容器中让种子吸湿，最后将种子放入冷冻保护剂中浸泡。这一过程可以在室温下进行，也可以事前将冷冻保护剂在 4℃进行预冷并保持在 4℃条件下浸泡种子，其效果更好。浸泡时间到后，取出种子，用滤纸吸去多余的冷冻保护剂。

在处理胚（轴）和茎尖培养物时应先将冷冻管和冷冻保护剂在冰箱中预冷

30min，再把材料放入冷冻管，用尖嘴吸管向冷冻管逐滴加入冷冻保护剂，然后在冰箱中放置不同时间。

7.3.2.3 预培养干燥法

将材料在加有冷冻保护剂的培养基中进行预培养后在无菌空气流或硅胶中进行干燥脱水，然后直接投入液氮中进行快速冷冻。芦笋茎段、油棕体胚和椰子合子胚可以采用此方法进行超低温保存。此方法已成为 80 个油棕无性繁殖系体细胞胚长期保存的常规技术。

7.3.2.4 包埋脱水法

包埋脱水法是基于人工种子包被原理，将外植体用海藻酸盐包埋成球后用含 $0.3\sim 1.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高浓度蔗糖液体培养基进行几小时至几天的预生长后置于流动的无菌空气流或硅胶中进行脱水，使含水量降至 20%左右（以鲜重为基础）后快速投入液氮中进行冷冻保存。通常是采用逐渐提高蔗糖浓度的方法来克服直接用高浓度蔗糖培养基培养的敏感性。这种方法通常应用于许多温带和热带作物的茎尖、悬浮细胞和体细胞胚的超低温保存。

包埋球的制作方法为：将材料悬浮于含 3% (w/v) 海藻酸钠和 0.4mol/L 蔗糖而不含钙离子的 MS 培养基中，再用注射器或滴管吸取包含材料的培养基，逐滴滴入含 100mmol/L 氯化钙和 0.4mol/L 蔗糖的培养基中，然后在 25°C 保持 30min，让包埋球固化。

7.3.2.5 玻璃化法

将材料用高浓度玻璃化溶液（PVS）进行脱水处理后直接投入液氮，使材料连同玻璃化溶液发生玻璃化转变，进入玻璃态。在玻璃化法中，细胞和离体茎尖通常用含高浓度蔗糖或山梨糖醇的培养基进行预培养 1~2d 和（或）装载液（Loading solution, LS 液）进行渗透调节预处理 20~90min，以诱导材料的耐脱水性。LS 液通常为 MS+0.4M 蔗糖+2M 甘油溶液。在应用这种方法时，关键是正确选择冷冻保护剂种类。另外，还要掌握好处理时间的长短，因为处理时间太短，脱水效果不理想，处理时间太长对植物产生毒害。

许多用玻璃化法处理的材料（不论包埋与否）的成苗率均比用包埋脱水法高。

而且用玻璃化法保存的茎尖恢复生长比用包埋法保存的要快。

目前报道的植物玻璃化液主要有以下几种,但同一种玻璃化液的配方却不尽相同,其组分见表 4-1。通常使用的玻璃化溶液为 PVS2,其配方为 MS + 30%(w/v)甘油 + 15%(w/v)乙二醇 + 15%(w/v)二甲基亚砷 + 0.4mol.L⁻¹蔗糖。

表 4-1 各种玻璃化液的组分

玻璃化液	组分	参考文献
PVS1	① MS + 22%甘油 + 13%乙二醇 + 13% 聚乙二醇	Uragami <i>et al.</i> , 1989
	② MS + 22%(w/v)甘油 + 13%(w/v)聚(丙烯)乙二醇 + 13%(w/v)乙二醇+ 6%(w/v)二甲基亚砷+ 0.4 mol.L ⁻¹ 蔗糖	
	③ MS + 22%甘油 + 13%乙二醇 + 13% 聚乙二醇 + 15% 二甲基亚砷	
PVS2	① MS + 30%甘油 + 15%乙二醇 + 30% 二甲基亚砷	Sakai <i>et al.</i> 1990
	※② MS + 30%(w/v)甘油 + 15%(w/v)乙二醇 + 15%(w/v)二甲基亚砷 + 0.4mol.L ⁻¹ 蔗糖	
PVS3	① MS + 40%甘油 + 10%乙二醇 + 10% 二甲基亚砷 + 45%蔗糖	Nishizawa <i>et al.</i> , 1993
	② MS + 50%(w/v)甘油 + 50%(w/v)蔗糖	
PVS4	① MS + 30%甘油 + 25%聚乙二醇+ 10% 二甲基亚砷	Matsumoto, 1999
	② MS + 5%甘油	
	③ MS+35%(w/v)甘油 + 20%乙烯乙二醇 + 0.6 mol.L ⁻¹ 蔗糖	
PVS5	MS + 15%甘油 + 15%乙二醇 + 15%蔗糖 + 15%甘露醇 + 13%聚乙二醇	
Steponkus	MS+50%(w/v) 乙二醇 + 15%山梨糖醇 + 6%牛血清白蛋白(BSA) + 0.4 mol.L ⁻¹ 蔗糖	Langis <i>et al.</i> , 1989
Towill	MS + 35%(w/v) 乙二醇 + 1M 二甲基亚砷+ 10%聚乙二醇 8000 + 0.4 mol.L ⁻¹ 蔗糖	Towill, 1990
Fahy	20%二甲基亚砷+ 20% 甲酰胺 + 15%(w/v)丙烯乙二醇	Fahy <i>et al.</i> , 1984

7.3.2.6 包埋玻璃化法

将包埋脱水法和玻璃化法相结合。材料首先用藻酸盐包埋成球,然后用玻璃化溶液进行脱水处理后直接投入液氮。此方法的全过程可在室温下完成,比较简单,而且完成整个程序的时间少。

7.3.2.7 小滴冷冻法

将材料用加有冷冻保护剂的液体培养基进行预处理,然后将材料连同冷冻保

护剂一起滴在铝箔条上使之成为小滴，让小滴在铝箔条上停留几分钟，并将沾有小滴的两条铝箔背靠背装入盛有液氮的冷冻管后直接投入液氮中进行冷冻保存。这种技术已成功应用于马铃薯茎尖（快速冷冻）、芦笋和苹果茎尖（慢速冷冻）的冷冻保存中。

7.4 降温冷冻处理

将经过冷冻前处理的材料装入容器中，如冷冻管、不锈钢冷冻筒、铝箔袋等投入液氮。在放入液氮进行冷冻之前要设置对照。依据种质材料类型及冷冻前处理方法，选择下列4种降温冷冻处理方法之一进行：

(1) 慢速降温法

用程序降温仪或电子计算机将降温速度控制在每分钟 $0.1\sim 10^{\circ}\text{C}$ （一般以 $0.5\sim 2^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 较好），从 0°C 降到 -100°C 左右后即将材料浸入液氮，或者以此种速度连续降到 -196°C 。慢速降温法比较适合于液泡化程度较高的植物材料，如原生质体、悬浮培养细胞等细胞类型一致的培养物。

(2) 逐级降温法

使保存材料经冷冻保护剂在 0°C 预处理后，逐级通过零下温度，如 -10°C 、 -15°C 、 -23°C 、 -30°C 、 -35°C 、 -40°C 等，在每级温度处停留一定时间（ $4\sim 6\text{min}$ ），然后浸入液氮。

(3) 两步降温法

是将慢速降温法和逐级降温法相结合的一种方法，有时也叫改良降温法。首先是用慢速降温法将材料逐渐冷却（通常以 $0.5\sim 4^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的速度）到一个适宜的预冻温度（ $-30\sim -50^{\circ}\text{C}$ ）后，停留一段时间（ $1\sim 3\text{h}$ ），诱导细胞外溶液结冰，使细胞内外产生蒸气压差，进行保护性脱水，然后即将材料浸入液氮中迅速冷冻。具体的降温速度和预冷温度依材料而定。

(4) 快速降温

将材料从 0°C ，或者其它预处理温度（如木本作物的冬芽在 $-3\sim -10^{\circ}\text{C}$ 预处理20天左右）或不经预冷直接投入液氮保存，降温速度达 $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。该方法对高度脱水的材料，如正常型种子、花粉及很抗寒木本作物枝条或冬芽和用玻璃化液

处理过的材料较适宜。

7.5 液氮超低温处理

将经过降温冷冻处理后的材料投入液氮蒸汽相(-150℃~-180℃)或液态氮(-196℃)中。多数种子贮藏在液氮蒸汽相中，其他材料则贮藏在液态氮中。

在进行液氮超低温处理时要注意以下事项：

(1) 事先根据需要使用和使用的次数，将材料分别包装成不同量的小包进行冷冻保存。这样可以避免大包包装因启封而使保存材料受外界温湿度急剧升高的影响，而且分生组织一经化冻就不能再进行冷冻保存了。

(2) 包装超低温保存材料可以用冷冻管（茎尖分生组织、胚轴）、铝箔袋（花粉、冬芽、种子）、不锈钢冷冻筒（枝条）和能密封的金属小盒（花粉、冬芽、种子）。一般不用密封罐，因在保存期间液态氮能渗入容器内。

(3) 根据液态氮罐的颈口大小和形状而定铝箔袋等包装容器的大小。

(4) 在用铝箔袋封装时，要将封装机调节至 500 hPa 气压下密封。

(5) 如果是将材料保存在液态氮时，要将冷冻容器放进布口袋里，口袋里放上少量小铁块等重物，使冷冻容器放入液氮后能够下沉浸入液氮中。

(6) 口袋要用细绳系好后才能投入液氮保存，留在外面的细绳要附上标记。

7.6 初始活力检测

7.6.1 初始活力检测原则

液氮超低温处理后 1~7d 之间至少要解冻一个管（袋、筒或盒）中的冷冻保存材料作为对照样品，检测其初始活力，以估计保存样品的预期恢复率并确定保存数量。如果初始活力高于 30%，则可进行液氮超低温长期保存，否则需重新选择材料顺序进行以上处理。

7.6.2 化冻

不同类型的保存材料及其用不同的冷冻前处理和降温冷冻处理方法所得材料，要求的化冻方式不同，主要有快速化冻、常温化冻和慢速化冻3种方法。用玻璃化液处理后的材料和（或）采用快速降温法处理的材料一般在37~45℃温水浴中进行快速化冻1~3min，具体时间长短依材料而定，如小滴冷冻法处理的材

料化冻时间有的只需几秒。有些材料需进行缓慢化冻，即分步化冻，如将材料取出后先移入超低温冰箱（ $-80^{\circ}\text{C}\sim-60^{\circ}\text{C}$ ）停留1h，然后移入家用冰箱（ $-20^{\circ}\text{C}\sim-15^{\circ}\text{C}$ ）停留1h，再放在室温条件下保存一段时间，如休眠冬芽需在 0°C 进行缓慢化冻。花粉通常放在室温下进行常温化冻或置于 $37\sim 38^{\circ}\text{C}$ 温水中进行快速化冻2min。花粉在室温下进行常温化冻时要防止发生冷凝作用。有的材料则需在 25°C 水浴中进行化冻。

7.6.3 化冻后处理

化冻后是否需要处理以及如何处理依种质类型及前处理的具体方法而定。

种子如经过脱水前处理的，特别是脱水到含水量5%以下的材料，要进行吸湿处理以防止吸胀伤害。在大气湿度较高的地区，可以直接把种子放在大气中进行吸湿；如果大气湿度较低，则可以将种子放在盛有蒸馏水的干燥器的隔板上进行一昼夜的吸湿。

凡是用冷冻保护剂和（或）玻璃化液处理过的材料化冻后均要立即进行洗涤处理。可以用 $1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液或 $1.17\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨糖醇溶液进行直接洗涤或卸载(unloading)2次，每次10min或用浓度逐渐降低的同种冷冻保护剂或玻璃化液进行逐渐移除。

经过包埋处理的胚（轴）和茎尖分生组织必要时可以切开包埋丸以利恢复生长。

7.6.4 初始活力(存活率、成苗率)检测方法

7.6.4.1 种子

种子活力检测可以采取发芽方法、氯化三苯基四氮唑（TTC）染色法、红墨水染色法和电导法等，具体操作参见种质库种子保存技术规程。

7.6.4.2 花粉

花粉生活力的测定方法，通常可分为萌发测定和不萌发测定两种。其具体测定处理方法和步骤如下：

① 氯化三苯基四氮唑（TTC）染色法

染料成分及配制

称取 0.5g TTC 用 100ml PH7.0 的磷酸缓冲液配成 0.5%TTC 备用。

② 操作及观察

滴一滴 0.5%TTC 染色液在载玻片上，撒上少许待测花粉，盖上盖玻片，盖玻片边缘涂上少量凡士林后盖严载玻片。将制片放置于培养室中（温度为 26℃ 左右）暗培养 4~6h 或在恒温箱中 37~39℃ 培养 20~30min，然后用倒置显微镜观察并摄影，计算染色率。凡是染成红色的花粉，其生活力强，淡红的次之，无色的为不具活力的花粉或不育花粉。观察 2~3 个制片，每片取 5 个视野，统计 100 粒，然后计算花粉的活力百分率。

(2) 联苯胺染色法

① 染料成分及配制

A 液：0.2g 联苯胺溶于 100ml 50%乙醇；B 液：0.1g α -萘酚溶于 100ml 50%乙醇；C 液：0.25g 碳酸钠（钾）溶于 100ml 蒸馏水。使用时将 A、B、C、三液等体积混合，再加入 1~2 滴双氧水。

② 操作及观察

在载玻片上滴一滴混合染液，撒上少量待测花粉（应有气泡出现，若无气泡，说明双氧水不足，需再加）立即观察，有生活力的花粉被染成蓝褐色。因联苯胺有毒，操作时要小心。

上述二种染色方法测定结果往往不能与花粉离体萌发、人工授粉结实力的结果呈直线相关，但可以估计花粉群中所含良好花粉的百分率。

(3) 花粉离体萌发法

① 悬滴法

滴一滴 10%~15%的蔗糖溶液在盖玻片上，用一根起毛针或玻璃棒，将花粉撒在这滴糖液上，快速翻过盖玻片，盖在带有凹槽的载玻片上，使之与载玻片完全紧密贴合（为防止溶液挥发，预先也在载玻片的凹槽底部滴少量同样浓度的蔗糖溶液）。

② 琼脂盘法

用 10%~15%蔗糖液和 1%~2%琼脂调配而成，将它倒入培养皿，并进行高压

灭菌消毒。在 100mm 培养皿中可同时测定 6~8 个品种的花粉萌发力，环绕培养皿以等距离靠近琼脂边缘将花粉撒上。

采用上述二种方法，好的花粉在室温条件下会很快地开始萌发，总的生活力在 3~4h 内就能观察到，但用来计数的通常须经 8~12h 的培养。实践证明，柱头上的花粉萌发与在琼脂培养基上的相比，两者萌发伸长情况相同。也就是说，离体萌发培养具有萌发能力的花粉即有结实能力。

(4) 荧光染料反应法 (FCR测定方法)

① 染料成分及配制

母液1 (SS1) 的配制: $1.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $3.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸, $3.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钙, $3.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸镁, $1.98 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钾, 然后用蒸馏水定容。另外, 为了避免由渗透压引起的花粉管破裂, 可以增加蔗糖浓度, 若想得到更强的荧光反应还可加大盐的浓度。

母液2 (SS2) 的配制: $7.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 双乙酸荧光素溶于丙酮中, 放于 4°C 冰箱。

工作液的配制: 取 8~12 滴 SS2 于 10ml SS1 中, 混匀直到此混合液变为轻乳状。

② 操作及观察

取 2~3 滴工作液于样品上, 盖上盖玻片, 2min 后在荧光显微镜 (BP 450~490, RKP 510, LP 520) 下观察即可。

(5) 无机酸测定法

此测定法中首选的无机酸是硝酸, 其次是硫酸, 而盐酸不适用于此法。对于大多数作物的花粉来说, 硫酸的浓度以 14.4% 效果最佳, 而 19.2% 的浓度则会破坏花粉粒, 其中以 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸为所选试剂中最理想的试剂。在具体操作时可先设定一系列浓度梯度来选择最适合于所测样品的无机酸浓度。所以, 按此法测定花粉生活力, 只需配制合适浓度的无机酸溶液即可。

(6) p-苯二胺测定法

① 染液的配制

把一小管过氧化物酶指示剂(Sigma 390-1)和200 μ l 3%的 H_2O_2 (30% H_2O_2 和pH7.4的磷酸缓冲液1:9混合),加入到37 $^{\circ}C$ 预热的50ml稀释的Trizmal6.3 缓冲液中(用Trizmal 6.3 浓缩液“sigma90-3C”和去离子水1:9 混合)。

② 染液的保存

染液在冰箱中能保存15~20d ,这期间若发现染液颜色由浅棕色变为深棕色或黑色,说明染液已失效。

③ 操作及观察

取少量37 $^{\circ}C$ 预热的染液滴到待测的花粉样品上,10~15min后观察。如果花粉变黑,说明花粉具生活力。

(7) 活体萌发测定法

①将待测花粉人工授粉于柱头上,保证花粉与柱头充分接触,并把授粉的柱头与外界隔离以免被污染。

② 一段时间后(依具体作物而定),将柱头取下并小心置于1%的醋酸结晶紫水溶液内。此步骤的目的是使花粉的外壁着上深紫色以易于与浅色的柱头区别开来。

③ 用解剖镜(Zeiss, 10 \times) 对指定柱头上的花粉粒记数。

④ 将该柱头用水漂洗几次后,再对其剩余的花粉粒记数。

萌发率(%) = 漂洗后花粉粒数目/漂洗前花粉粒数目 \times 100%。

(8) 人工授粉结实力法

① 保存花粉是否存活的最终鉴定应该在正常柱头上授粉,调查是否结实,才能作最后的定论。

② 授粉结实力是用保存花粉在授粉后的结实率求得。

③ 人工授粉的工具较多,如:毛笔、铅笔的橡皮头,玻璃棒或手指等。

④ 授粉时,将花粉触及柱头表面,花粉传授常明显可见。

⑤ 授粉后将授粉工具用70%酒精擦洗以杀灭其残留的花粉,以备后用。

⑥ 为了确保授粉试验的正确可靠,必须防止其它花粉的沾染。

⑦ 为保证试验的精确性和营养条件的一致性,因而选择自花不结实、自花

不亲和或易去雄蕊的品种，在同果枝（穗）位上的花朵为授粉对象。

⑧ 要在花朵开放前一天套袋，用贮藏花粉进行人工授粉后，再用纸袋将授粉后的雌蕊罩上。同时在同一果枝（穗）上的另一朵花上用新鲜花粉进行授粉作为对照。

⑨ 待幼果生理性落果后，统计结实情况。以新鲜未干燥处理的花粉为对照。

7.6.4.3 冬芽和枝条

TTC染色法：化冻后取出冬芽（或者吸干枝段表面水分，用刀片削出冬芽），快速投入0.5 %TTC 溶液，37℃恒温水浴保温1h，用硫酸终止反应。取出冬芽，置于滤纸上少许风干，然后检查存活率（以冬芽切面1/2 染上桃红色者作为存活标准，切面发褐或未染色者为死亡）。

恢复（再）培养法：剪取枝条长约 2cm(1~2 个芽)或冬芽，用 70%酒精浸泡 2min, 0.1%HgCl₂溶液(含 0.01% Tween20)灭菌 30min, 无菌水清洗 5~6 次, 无菌条件下剥取含有分生组织和叶原基的芽(0.5~2.0mm)，然后转入适宜的培养基上进行恢复培养。各作物的恢复培养基和培养条件参见离体保存中茎尖分生组织培养条件。培养 40d 后观察存活率和成苗率。

直接培养法：将化冻枝条插入适宜水温的培养缸中，置于生长箱中培养，观察存活率。

嫁接法：化冻后将冬芽（或从枝段上切下冬芽）进行嫁接，观察生长发育情况。

7.6.4.4 茎尖分生组织和胚（轴）

茎尖分生组织和胚（轴）的活力测定有 TTC 染色法（参见 7.6.4.2 花粉）和恢复培养法。各作物的恢复培养基和培养条件参见离体保存中茎尖分生组织培养条件，有时需要添加一些植物生长调节剂，有时需要先进行暗培，然后在光照条件下培养和（或）减少光照强度和光照时间。

7.7 液氮超低温长期保存

7.7.1 保存数量

(1) 保存样品数及其重复次数取决于初始活力、作物类型、繁殖速度、培

养物的稳定性、繁殖难易程度和可用于保存的材料。

(2) 可以根据二项分布,用四个特定参数,即植物对照样品的恢复率(成苗率)(p_{obs})、对照样品数(n_1)、超低温库保存的样品数(n_2)和观测植物恢复率置信区间的概率,来推算从超低温库保存样品中恢复培养至少能获得一个(或其它任意给定数目)植株的概率(Dussert 等 2003)。用这个方法能估计在冷冻后需立即解冻的繁殖体个数,以估计出材料的恢复率,从而作为能够获得繁殖体总数的一个参数。还可以用来估算对照样品和超低温库保存样品中所需的最低植株恢复率,以确保恢复培养时至少获得一个或 A 个($A>1$)植株的概率要高于给定概率。相应地,植株恢复率一旦估计出,就能够估算超低温库需保存的样品最低数以确保在恢复培养时至少能够获得一个或 A 个($A>1$)植株的概率要高于给定的概率值。

7.7.2 材料备份

材料要分别保存在两个以上的液氮罐中。备份可以进行就地保存或异地保存。如果是就地保存,则应放置于不同的贮藏间。如果是异地保存,安全备份既可以作为“黑箱”收集品,即在另一个地点保存的备份不用作流动样品,也可以作为流动样品。

7.7.3 保存过程中的注意事项

(1) 存放液氮罐的室内要通风并且要安装监控设施。当进入房内操作时应时时对其进行监控,以防窒息。

(2) 运送或使用液氮时一定要用专用特制的容器,绝不可用密闭容器存放或运输液氮,切勿使用保温瓶存放液氮,以免爆炸。

(3) 液氮罐必须要有通风口以免爆炸。

(4) 要注意液氮罐颈口的宽窄。宽颈口的液氮罐操作方便,但液氮挥发速度要比窄颈口的挥发快。如果液氮不容易购买到的话,最好是使用窄颈口的液氮罐,以使液氮保持的时间长些。另外,每次将材料投入液氮罐时液氮均要挥发,因此液氮在液氮罐中维持的时间均要相应缩短,尽量减少取、放材料的次数。

(5) 要注意液氮罐个数。最好至少准备两个液氮罐,一个用于保存操作材料,另一个用于长期保存。可以同时将所有材料都转移到贮藏罐里,将贮藏罐

再灌满液氮并放置妥当后进行长期保存。有时还需要有一个通过快运方式进行长途运输冷冻材料的专用运输罐。

(6) 液氮罐，特别是不经常使用的贮藏罐要安装报警系统，以防失灵或当液氮低于警戒线时可以报警提示。这些报警系统在停电时可以用电池作为电源。

(7) 进行定期检查并使液氮罐始终保持有一定量的液氮。

(8) 操作时注意人身安全保护，正确配戴护目镜以保护眼睛，脸要戴上面罩，手要戴上御寒手套，脚要穿紧口高帮鞋，以防液氮进入鞋里冻伤脚。

(9) 在进行包埋处理配制包埋液时要特别小心，海藻酸钠要慢慢地加入，并且一边添加一边搅拌，以免结块糊锅。

(10) 任何时候在将冷冻材料从一个液氮罐转移到另外一个液氮罐时通常需要两个人互相配合，而且动作要非常迅速，在几秒钟之内完成，不要超过1分钟。在实际的保存工作中，从一个贮藏罐向另一个贮藏罐转移材料时要特别小心，并要设置对照以检验转移效果。

7.8 监测

7.8.1 内容

定期监测保存过程中材料的活力(存活率、成苗率)、遗传稳定性、种质健康度等。

7.8.2 活力(存活率、成苗率)监测

监测方法与初始活力检测相同。

7.8.3 遗传稳定性的监测

(1) 肉眼观察组织培养物(试管苗和恢复培养物)的植株。

(2) 在田间或温室种植恢复培养的植株，要对其整个生长期进行观察，观察植株的形态变化和生长发育状况，然后对有可能发生无性系变异的基因型进行更多的检测，或者随机选择样品进行检测。

(3) 对田间材料和组织培养物进行同工酶分析。

(4) 在分子水平上对田间母体植株、组培母体植株和贮藏材料进行DNA检测，如用RFLP, RAPD或AFLP进行检测。

7.9 提取利用

7.9.1 化冻

与7.6.2的化冻技术相同。

7.9.2 化冻后处理

与7.6.3的化冻后处理技术相同。

7.9.3 恢复培养

茎尖分生组织、离体胚（轴）和冬芽需进行再培养成苗，以获得提供利用的试管苗，方法同7.6.4.3和7.6.4.4。

7.9.4 提取前提

（1）国家试管苗保存库和种质圃保存的种质资源绝种，需要从国家超低温保存库取种繁殖的。

（2）其它特别需要的。

7.9.4 提取程序

符合7.9.3条款需从国家超低温保存库提取种质需报有关主管部门审批。申请者将审批文件和提取种质清单至少提前半年交给国家超低温保存库，国家超低温保存库负责人核对签字后指派专业人员进行提取操作。申请者和提取者应当在提取种质单上签字。审批文件、提取种质清单和提取种质单应存档备案。

8 信息资料处理

超低温保存工作的主流程是材料处理，此过程还伴随着材料信息处理（见图1）。信息处理包括信息的采集、计算机化管理和资料档案管理等。同时，样品信息又是处理过程中做出决定的依据。例如，根据样品的恢复率就可以确定需要保存的样品数等。因此，材料处理和信息处理是同时进行的，是相辅相成的，两者缺一不可。

（1）基本信息

每一份入库贮存种质的名称、来源、类型等有关资料。该资料数据是不会改变的。一般由提供者提供。包括：

① 全国统一编号：又称登记材料号，即各种作物《全国种质资源目录》上

赋予每个品种的编号，是每一品种的标识号。一般规定，当这一编号被采用后，在给其它收集材料编号时，不能重复使用该编号。

② 原保存单位编号：收集单位对种质材料的编号，即收集保存单位的永久号，号前常冠以保存单位所在省市、(区)的代号。

③ 种质名称：包括系谱 / 栽培品种 / 类型的名称。

④ 学名：包括属、种(亚种、变种)的拉丁文。

⑤ 提供者：材料收集的保存单位或个人。

⑥ 原产地：国内种质材料指种质采集地（或育成地）的省(市、自治区)县名，或引进种质材料的国家名。

(2) 管理信息

建立的数据库应包括贮藏日期、材料在贮藏罐中的位置、冷冻管（袋、盒）数、每个冷冻管（袋、盒）所装的数量、预处理、冷冻前处理技术、降温冷冻处理技术、化冻技术、原始活力数据、恢复培养基和其它重要程序。

(3) 标签

用计算机打印出标签,以减少各种可能的标签错误。如果不能用计算机打印标签的话，在书写标签时要使用清晰、擦不掉的墨水书写清楚。将字母和数字混用以减少数字之间的变换错误。在整个流程中都应该使用与外植体相同的标签。

(4) 数据备份

定期对计算机里的数据进行备份并保存在安全的地方。数据要保存在两个以上的地方。

9 具体操作处理事例

不同作物，甚至同一作物不同品种超低温保存的操作处理均不一样。在应用超低温保存方法进行种质保存之前要先进行实验。附录4-A为一些作物种质超低温保存参考处理程序。

附录4-A (资料性附录) 作物种质超低温保存程序

A. 1 苹果冬芽的超低温保存程序（两步冷冻法）

A. 1.1 取材

在冬芽的深度休眠期（1月中下旬至2月上旬）从壮年的树上剪取健壮的一年生春梢枝条，枝条上的冬芽要饱满、无病虫害。

A. 1.2 枝条与芽的处理

将枝条切成小于15cm长段，立即放入聚乙烯袋中，于0℃存放。

A. 1.3 人工低温锻炼

将材料装入冷冻管中放于-3℃，14d → -5℃，3d → -10℃，1d。

A. 1.4 降温冷冻

以每小时降低5℃的冷冻速度预冻到-40℃，然后投入液氮中保存。

A. 1.5 化冻

在0℃慢速化冻。

A. 1.6 恢复培养

将化冻枝条插入20℃水的培养缸中，置于生长箱中培养，存活率达70%以上。
将存活的芽进行嫁接，表现出正常的生长发育。

A. 2 桑树冬芽的超低温保存程序（两步冷冻法）

A. 2.1 取材

在冬芽的深度休眠期（1月中下旬至2月上旬）从壮年的树上剪取健壮的一年生春梢枝条，枝条上的冬芽要饱满、无病虫害。

A. 2.2 枝条与芽的处理

从采集的枝条上切取带有约10mm维管组织的腋芽，放入聚乙烯袋中，置于

不锈钢冷冻筒（直径 37mm，长 135mm）内，于 0℃ 存放 1d。

A. 2.3 降温冷冻

以每天降低 10℃ 的冷冻速度预冻到 -30℃，并维持 1d。然后投入液氮中保存。

A. 2.4 化冻

在 37℃ 水浴锅中快速化冻。

A. 2.5 恢复培养

芽在 70% 乙醇中浸渍 1min 后再浸入次氯酸钠溶液（浓度为 0.5%）中 30min。接着用无菌水冲洗后，无菌条件下切下含有分生组织和八分之五的叶原基的芽，放入含有 2% 果糖， $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄氨基嘌呤，0.8% 琼脂的 MS 培养基（pH6.0）培养，光照强度 $52\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，时间 16h，温度 25℃。用培养 40d 后能发育成正常幼苗的芽的百分率定为出苗率。

A. 3 杏休眠芽的超低温保存程序（两步冷冻法）

A. 3.1 取材

在冬芽的休眠期从发育充实的一年枝取材。

A. 3.2 枝条与芽的处理

将休眠枝剪成带有 1 个腋芽的枝段，装入纱布袋。

A. 3.3 预处理

在 0℃ 进行低温锻炼 10h 或将枝段浸入 0℃ 的 5% 二甲基亚砷 + 5% 葡萄糖的冷冻保护剂处理 10h。

A. 3.4 降温冷冻

以 $5\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度降温至预冻温度 -30℃（在 0℃ 进行了低温锻炼的）或 -20℃（已浸入 0℃ 的冷冻保护剂）后直接投入液氮。

A. 3.5 化冻

37℃ 水浴快速化冻 5min。

A. 3.6 存活率检测

取出枝段，吸干表面水分，用刀片削出 0.4cm 长、0.3cm 宽的芽片，快速投入 0.5% TTC 溶液，37℃ 恒温水浴保温 1h，用 2N 硫酸终止反应。取出芽片，置于滤纸

上少许风干, 然后检查存活率(以芽片切面1/2 染上桃红色作为存活标准, 切面发褐或未染色者为死亡)。

A. 4 柿休眠芽茎尖的超低温保存程序(玻璃化法)

A. 4.1 取材

12月下旬采取柿的1年生枝条, 用双层塑料薄膜包裹, 在0℃冰箱贮藏备用(1个月内)。

A. 4.2 枝条与芽的处理

剪取枝条长约2cm(1~2个芽), 70%酒精消毒2min, 0.1% HgCl_2 溶液(含0.01% Tween-20)灭菌30min, 无菌水清洗5~6次, 剥取1.5~2.0mm茎尖在含有0.3、0.5和0.7mol·L⁻¹蔗糖的改良MS培养基(KNO_3 和 NH_4NO_3 减半)上预培养各1d。

A. 4.3 玻璃化液处理

室温20℃下在装载液(2M甘油, 0.4mol·L⁻¹蔗糖)中停留20min, 0℃下玻璃化液(PVS_2 或 PVS_3)处理30~40min。

A. 4.4 降温冷冻

将茎尖装入冷冻管后快速投入液氮保存。

A. 4.5 化冻、洗涤和恢复培养

40℃水浴化冻1min后用含蔗糖1.2mol·L⁻¹的改良MS培养基洗涤20min, 接种于含0.2mg·L⁻¹ CPPU、1mg·L⁻¹ BA、0.05mg·L⁻¹ IAA、500mg·L⁻¹可溶性PVP、30g·L⁻¹蔗糖和7g·L⁻¹琼脂的改良MS培养基(再生培养基)表面的滤纸上, 暗处理1d后转移到新鲜的上述再生培养基中, 暗培养1W后转到正常光下培养, 40d后统计存活率。

A. 5 甜柿休眠芽茎尖包埋-玻璃化法超低温保存程序(包埋-玻璃化法)

A. 5.1 取材

1月中旬采集甜柿的一年生枝条, 双层塑料薄膜包裹, -1℃冰箱贮藏备用。

A. 5.2 包埋

剪取长约1cm的枝段(含1个芽),70%酒精消毒2min,0.1%HgCl₂溶液(含0.01% Tween-20)处理30min,无菌水冲洗5~6次,剥取长约1mm的茎尖。离体茎尖悬浮在含有3%(w/v)海藻酸钠和0.4 mol·L⁻¹蔗糖的无钙离子改良MS培养基中。用无菌的胶头吸管或1.0ml一次性注射器吸取茎尖,转移到含有0.4mol·L⁻¹蔗糖的0.1mol·L⁻¹CaCl₂水溶液中,室温下(25℃)静置30min,形成直径约5mm的包埋丸,每个包埋丸中有1个茎尖。

A. 5.3 预处理

包埋丸在含有0.3mol·L⁻¹蔗糖的改良MS培养基上预培养1d。

A. 5.4 玻璃化液处理

用玻璃化液PVS2-2(30%甘油+15%二甲基亚砷+15%乙二醇+0.4mol·L⁻¹蔗糖)处理2h。

A. 5.5 降温冷冻

将包埋丸装入冷冻管后加入1ml新鲜的PVS₂,快速投进液氮中保存。

A. 5.6 化冻、洗涤和恢复培养

材料从液氮中取出后迅速投入40℃水浴中化冻1~2min后用含有1.2mol·L⁻¹蔗糖的改良MS培养液洗涤20min,用无菌滤纸吸去残留在包埋丸表面的洗液,接种到含有2.2mg·L⁻¹ ZT、600 mg·L⁻¹ PVP的改良MS培养基中,暗培养3~5d后,转移到正常条件下培养,40d后统计存活率。

A. 6 胡萝卜体细胞胚的超低温保存程序

A. 6.1 材料(胚状体)的制备

将胡萝卜愈伤组织接种到含25ml培养液的三角瓶中进行悬浮培养,培养基的成分是:MS培养基的大量元素和微量元素加White培养基的维生素类的活性物质,并附加0.5ml·L⁻¹ 2,4-D。在旋转摇床上进行培养,温度23℃,黑暗。每1~2星期更换一次新鲜培养基。当悬浮培养物中具有细胞聚集体和团块时(即已形成了胚状体),离心收集材料。

A. 6.2 冷冻保护剂的处理

在5ml冷冻管中加入约1ml胚状体培养物(上述的离心浓缩培养物)。将冷

冻管插入冰浴中，待温度平衡后，加入在 0℃ 预冷的 1ml 冷冻保护剂（5%~7% 二甲基亚砷），在冰浴中维持 20~30min，倒出冷冻保护剂，并吸干样品表面的液体，进行干冻保存。

A. 6.3 降温冷冻

以 2℃/min 的降温速度从 0℃ 降到 -70℃ 或 -30℃ 或 -40℃，然后浸入液氮。

A. 6.4 化冻

37℃ 温水浴中快速化冻。

A. 6.5 恢复培养

开始有 3~4W 停滞期，存活的原胚通过正常的胚胎发生途径发育成完整的植株。

A. 7 马铃薯茎尖小滴冷冻法超低温保存程序

A. 7.1 材料的选取

从健壮的试管苗上拨取直径约 1mm 大小的茎尖。

A. 7.2 预培养

在用 MSTo 培养液（MS+0.5mgL⁻¹ 玉米素核糖甙+0.5mgL⁻¹ 吲哚乙酸+0.2mgL⁻¹ 赤霉素）浸湿的滤纸上预培养过夜。

A. 7.3 冷冻保护剂处理

用加有 10% 二甲基亚砷的 MSTo 培养液孵化 2h。

A. 7.4 小滴形成

用吸管吸取含有一个茎尖的 10% 二甲基亚砷的 MSTo 培养液 2.5 μL 左右滴在铝箔条上成为小滴，让小滴在上面停留 1~2min 以固定茎尖。

A. 7.5 降温冷冻

将粘有小滴的两条铝箔背靠背装入冷冻管，然后在冷冻管中加入液氮并盖紧后快速投入液氮保存。

A. 7.6 化冻、洗涤

在 37℃ 温水浴中快速化冻 1-2min。然后用含有 1.2mol.L⁻¹ 蔗糖的 MS 培养液洗涤 20min。

A. 7.7 恢复培养

将洗涤后的茎尖在 MSTo 培养液上培养 8W 后观察存活率和成苗率。

A. 8 草莓茎尖玻璃化法超低温保存程序

A. 8.1 材料的选取

选择健壮的试管苗。

A. 8.2 低温锻炼

将选取的试管苗置于 5℃ 低温锻炼 20~30d。

A. 8.3 预培养

低温锻炼后拨取直径约 1mm 大小的茎尖，在 MS+0.3M 蔗糖+ 2M 甘油的培养基上于 5℃ 进行预培养 1d。

A. 8.4 渗透保护处理

将预培养后的茎尖转移到冷冻管中，于 25℃ 用 2M 甘油+0.3M 蔗糖混合液进行渗透保护处理 20min。

A. 8.5 玻璃化液处理

将经过渗透保护处理后的茎尖于 25℃ 用 PVS2 [MS + 30% (w/v) 甘油 + 15% (w/v) 乙二醇 + 15% (w/v) 二甲基亚砷 + 0.4mol. L⁻¹ 蔗糖] 溶液处理 50min。

A. 8.6 快速降温冷冻

玻璃化液处理完后盖紧冷冻管，快速投入液氮保存。

A. 8.7 化冻、洗涤

从液氮中取出冷冻管在 35℃ 水浴中快速化冻 1~2min，用含有 1.2mol. L⁻¹ 蔗糖的 MS 培养液洗涤 20min。

A. 8.8 恢复培养

将洗涤后的茎尖转移到 MS+1g. L⁻¹ PVP+0.2mg. L⁻¹ BA 的培养基上培养观察存活率和成苗率。