

ICS 65.020.20
B 23
备案号：44848-2015

DB63

青 海 省 地 方 标 准

DB63/T 1348—2015

马铃薯茎尖超低温离体保存技术规范

地方标准信息服务平台

2015 - 02 - 09 发布

2015 - 03 - 15 实施

青海省质量技术监督局

发布

前 言

本规范的编写符合GB/T 1.1-2009的规定。

本规范由青海省农林科学院提出并归口。

本规范起草单位：青海省农林科学院生物技术研究所。

本规范主要起草人：王芳、贺苗苗。

地方标准信息服务平台

马铃薯茎尖超低温离体保存技术规范

1 范围

本规范规定了马铃薯茎尖超低温保存的技术、工作程序、恢复培养和抽检，以及超低温保存的注意事项。

本规范适用于青海省农业科研、技术推广、种子部门对马铃薯茎尖进行超低温保存时使用。

2 术语定义及缩略语

2.1 术语与定义

下列术语和定义适用于本规范。

2.1.1

超低温保存

指在液氮液相(-196℃)或液氮雾相(-150℃)中对马铃薯试管苗的茎尖进行长期保存。

2.1.2

玻璃化

用一定比例的渗透性和非渗透性保护剂组成的玻璃化溶液处理材料，在投入液氮中，保护剂和细胞内的水分子不会形成冰晶，固化成无定形的玻璃化状态，保证细胞有再生的活力的过程。

2.2 缩略语

MS—基础培养基

KT—激动素

GA3—赤霉素

IAA—吲哚乙酸

3 超低温保存技术与工作程序

3.1 环境要求

操作过程中所需器械均需灭菌；整个操作过程在超净工作台内进行；操作人员均需严格按照无菌操作条件进行。

3.2 茎尖处理

选用2.00 cm试管苗顶端置于40倍（目镜10倍，物镜4倍）的体视镜下，用镊子夹住茎段，用解剖针（刀）除去生长点周围的幼叶，露出顶端分生组织圆锥体，切取附带1个-2个叶原基的茎尖，其大小为

1.5 mm–2.00 mm。剥离后的茎尖立即置于保存液中，保存液成分：0.10 mol/L 蔗糖+MS基础培养基，pH 5.8，高温灭菌。

3.3 茎尖预培养

将保存液中的茎尖在预培养基上培养4h。预培养基的成分：MS基础培养基 + 0.04 mg/L KT+ 0.10 mol/L 蔗糖、pH 5.80，过滤灭菌。

3.4 装载处理

将经过预培养的茎尖在室温下浸泡于装载液中进行装载处理，装载时间为40 min。装载液的成分：MS基础培养基 + 2.00 mol/L 甘油 + 0.400 mol/L 蔗糖，pH 5.8，高温灭菌。

3.5 玻璃化

茎尖经过装载处理后，用滤纸吸去残留的液体，放入经过0℃预冷的玻璃化液中，冰浴30 min–40 min。玻璃化液成分：MS基础培养基 + 30.00% 甘油 + 15.00% 乙二醇 + 15.00% 二甲基亚砷 + 0.40 mol/L蔗糖，PH 5.80，高温灭菌。

3.6 保存

将按4.1–4.5条处理后的茎尖，装入1.80 mL的冷冻管中，加入新的玻璃化液后注入液氮，盖上盖子迅速投入液氮罐中进行保存。

超低温保存技术注意事项，见附录1。

4 恢复培养与检测

4.1 化冻、洗涤技术

将冷冻管从液氮中取出，室温下将冷冻管打开盖子后注入恢复培养液90 s左右，用吸管吸出解冻液体，加入恢复培养液，轻微混匀，在第5 min、15 min时更换新的恢复培养液，第25 min用滤纸吸去茎尖上的恢复培养液，将茎尖转接在恢复培养基中。恢复培养液成分：MS基础培养基 +1.2 mol/L 蔗糖，pH 5.8；恢复培养基成分为：MS基础培养基 +12.00 mol/L 蔗糖+0.5 mg/L IAA + 0.04 mg/L KT + 0.1 mg/L GA3，pH 5.80。

4.2 恢复培养条件

恢复培养条件：暗培养10 d，弱光条件（光照500 lx–800 lx）下培养10 d，正常条件2000 lx–3000 lx。培养温度均为21.00℃±2.00℃。

4.3 成苗率统计

茎尖在恢复培养基上培养40 d后观察成苗率。

经恢复培养后，茎尖发育成苗的百分率不能低于40%。

4.4 抽检

每半年抽检一次，当成苗率低于20%时，该批次材料淘汰。

附 录 A
(规范性附录)
液氮保存注意事项

- A.1 根据需要使用和使用的次数，分别包装成不同量的小包进行冷冻保存。避免大包装因启封而使保存材料受外界温湿度急剧升高的影响。
- A.2 包装茎尖分生组织选用冷冻管。
- A.3 将冷冻管装入布口袋中，口袋里放上小铁块等重物，可以使布袋放入液氮后能浸入到液氮中，口袋要用细绳系好后才能投入液氮罐中保存，留在外面的细绳要附上标记。
- A.4 条件允许时，也可用专用的超低温保存液氮罐，样品放在保存架上，直接浸入到液氮内。
-

地方标准信息服务平台