

# 生姜玻璃化法超低温保存技术

杜来顺, 冯建军, 李晓华, 赵风芝, 吴永清, 于洪涛

(内蒙古科右中旗农业局, 内蒙古 科右中旗 029400)

**摘要:**以生姜的脱病毒试管苗在繁殖培养基上培养 25 d 获得的丛生芽为试材, 探讨生姜超低温玻璃化法保存的最优程序。结果表明: 采用继代培养 45 d 的丛生芽, 切取 2~3 mm, 于 0.5 mol/L 蔗糖浓度的 MS 培养基内预培养 2 d, 60% PVS2 室温处理 5 min, 100% PVS2 0℃下处理 30 min, 迅速投入液氮, 48 h 后, 37~40℃水浴快速化冻 2 min, 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 培养液洗涤 20 min, 在 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+0.3 mg/L GA<sub>3</sub>+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂的培养基上恢复培养的成活率最高, 为 57.7%。

**关键词:**生姜; 玻璃化法; 超低温保存

**中图分类号:**S 632.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0123-03

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.) 属姜科姜属多年生宿根草本植物<sup>[1]</sup>。其种质资源的繁殖和保存主要依靠用种姜作繁殖材料每年进行田间种植<sup>[2]</sup>, 存在很多缺点, 如繁殖系数低, 耗费大量人力、物力和财力等, 且还容易受到自然灾害和病虫害的影响, 导致资源材料的丢失<sup>[3-4]</sup>。试管苗保存生姜种质需要按期继代, 有可能发生污染导致材料丢失, 随着培养时间的延长, 试管苗在贮藏时有可能发生一些变异, 且变异的可能性将随着保存时间的增加而增大<sup>[5-6]</sup>。玻璃化法超低温保存技术, 可以在很小的空间保存大量的基因型, 且打破了植物生长的季节性, 可以进行周年生产, 可满足生姜种源的需要<sup>[7-8]</sup>。同时可有效的逃避病虫害和自然灾害对种质的威胁<sup>[9-10]</sup>。现以姜的脱病毒试管苗在繁殖培养基上培养 25 d 获得的丛生芽为试材, 对生姜超低温保存技术进行研究, 以为生姜种质资源保存提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取姜的脱病毒试管苗, 以在繁殖培养基上培养 25 d 获得的丛生芽作为试验材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 丛生芽大小和冰冻保护剂的筛选 将扩繁得到的无菌丛生芽在无菌条件下切取 1~2、2~3、3~4 mm, 分别用复合冰冻保护剂 PVS1、PVS2 和 PVS3(表 1) 处理 30 min, 投入液氮, 48 h 后取出, 40℃水浴快速化冻

2 min, 然后在 25℃水浴 10 min。采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法检测成活率。每个处理 40 个芽, 3 次重复。

**表 1 复合冰冻保护剂及组成**

冰冻保护剂	组成/W·V <sup>-1</sup>
PVS1	22% Glycerol+13% EG+13% PEG+10% DMSO
PVS2	30% Glycerol+15% EG+15% DMSO+0.4 mol/L Sucrose
PVS3	40% Glycerol+10% EG+20% DMSO

注: Glycerol 为甘油, EG 为乙二醇, PEG 为聚乙二醇, DMSO 为二甲亚砜, Sucrose 为蔗糖。

1.2.2 化冻条件的筛选(文中洗涤和恢复培养只有一种方法, 不需要筛选) 选用 1.2.1 中筛选出的最佳大小丛生芽和冰冻保护剂处理后, 在液氮中保存 48 h, 取出冷冻管并化冻处理, 采用 3 种化冻方式, (1)40℃水浴快速化冻 2 min, 然后在 25℃水浴 10 min。(2)37~40℃水浴快速化冻 2 min。(3)25℃空气中自然化冻 10 min。采用含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 培养液洗涤 20 min, 将洗涤过的丛生芽转移至 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+0.3 mg/L GA<sub>3</sub>+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂的培养基上恢复培养, 先在 20℃条件下暗培养 1 周, 然后在温度 25℃、光照强度 1 500 lx 的光照培养箱中培养 2 周后, 统计存活率。每个处理 40 个芽, 3 次重复。

1.2.3 继代培养时间的筛选 切取 1.2.1 中最佳大小丛生芽, 分别转接于扩繁丛生芽较好的培养基中, 进行 15、30、45、60 d 继代培养后, 其它操作同 1.2.1, 每个处理 40 个丛生芽, 3 次重复。

1.2.4 冰冻保护剂处理方式的筛选 将 1.2.3 得出的最佳继代培养的丛生芽用 60% 冰冻保护剂(PVS2)室温处理 5、10 min, 再转入 100% 冰冻保护剂 0℃处理 15、30、45、60 min, 投入液氮后其它同 1.2.1 处理, 按 1.2.2 下恢复培养, 统计存活率。每个处理 40 个芽, 3 次重复。

**第一作者简介:**杜来顺(1959-), 男, 中级农艺师, 现主要从事农业技术推广等工作。E-mail: 535356233@qq.com。

**基金项目:**内蒙古民族大学校级课题资助项目(S265)。

**收稿日期:**2014-03-19

1.2.5 预培养时间的筛选 切取 1.2.1 中得出的最适大小的丛生芽,将其转接到含 0.1、0.3、0.5、1.0 mol/L 蔗糖 MS 培养基上预培养 1~4 d,按 1.2.4 中得出的冰冻保护剂方式处理,其它同 1.2.1 处理,按 1.2.2 下恢复培养,统计存活率。每个处理 40 个芽,3 次重复。

### 1.3 数据分析

采用 DPS 软件对数据进行显著性差异分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 丛生芽大小对保存后丛生芽成活率的影响

材料大小直接影响脱水的难易,故对保存后成活率影响较大。由表 2 可知,丛生芽在 2~3 mm 可得到最高存活率,丛生芽 1~2 mm 存活率最低。不同的保护剂对生姜的玻璃化保存影响很大,从表 2 可以看出,2~3 mm 丛生芽 PVS2 的效果最好,成活率达 40.5%;PVS3 效果最差,1~2 mm 丛生芽 PVS3 处理成活率为 0%。

表 2 丛生芽大小对保存后丛生芽成活率的影响

丛生芽大小/mm	冰冻保护剂	成活率/%
1~2	PVS1	5.0 d
	PVS2	12.5 c
	PVS3	0.0 d
2~3	PVS1	27.5 b
	PVS2	40.5 a
	PVS3	22.5 b
3~4	PVS1	24.5 b
	PVS2	28.5 b
	PVS3	12.5 c

注:Duncan's 新复极差法进行显著性测验,不同字母表示处理之间存在显著差异 ( $P<0.05$ )。下同。

### 2.2 继代时间对保存后丛生芽成活率的影响

由表 3 不同继代时间对保存后丛生芽成活率的影响可知,继代 15 d 的丛生芽保存后成活率最低 (10.1%),继代 30 d 和继代 60 d 丛生芽保存后成活率差异不显著,但均显著低于继代培养 45 d 的丛生芽 (47.1%)。

表 3 继代时间对保存后丛生芽成活率的影响

继代时间/d	成活率/%
15	10.1 c
30	34.2 b
45	47.1 a
60	37.9 b

### 2.3 冰冻保护剂处理方式对保存后丛生芽成活率的影响

从表 4 可知,PVS2 处理不同方式对冻存后丛生芽有较大影响,60%PVS2 室温下处理 5 min,再转至 100%PVS2 中处理比 60%PVS2 室温下处理 10 min 再转至 100%PVS2 中处理成活率高。60%PVS2 室温下处理 5 min,再转至 100%PVS2 中处理,随 100%PVS2 处理时间延长,冻存后丛生芽成活率先升后降,100%PVS2 处理 30 min 成活率最高为 53.3%。

表 4 冰冻保护剂处理方式对保存后丛生芽成活率的影响

60% PVS2 处理时间/min	100%PVS2 处理时间/min	成活率/%
5	15	39.2 c
	30	53.3 a
	45	42.2 b
	60	37.1 c
10	15	20.1 d
	30	35.1 c
	45	23.2 d
	60	31.4 c

### 2.4 预培养时间对保存后丛生芽成活率的影响

用含有不同浓度蔗糖的 MS 培养基进行了预培养丛生芽,再超低温保存可提高保存后丛生芽成活率。由表 5 可知,0.5 mol/L 蔗糖浓度培养基预培养 2 d,冻存后丛生芽成活率显著提高,达到 55.7%。不同蔗糖浓度处理中,随蔗糖浓度升高,保存后丛生芽成活率先升高后降低,蔗糖浓度太高,会降低保存后丛生芽成活率,预培养时间越长越明显,1.0 mol/L 蔗糖浓度,预培养 4 d,保存后丛生芽成活率为 0%。

表 5 预培养时间对保存后丛生芽成活率的影响

蔗糖浓度 /mol·L <sup>-1</sup>	预培养时间/d			
	1	2	3	4
0.1	11.2 e	19.7 d	27.4 c	27.9 c
0.3	19.4 d	21.4 d	38.3 b	31.0 c
0.5	33.2 c	55.7 a	40.2 b	22.1 d
1.0	10.9 e	7.1 e	3.4 f	0.0 g

### 2.5 化冻方式对保存后丛生芽成活率的影响

由表 6 可以看出,3 种化冻方式对冻存后丛生芽成活率差异达显著水平,37~40℃水浴快速化冻 2 min 成活率最高为 57.7%,40℃水浴 2 min,25℃水浴 10 min 成活率为 18.3%,25℃自然化冻 10 min 成活率最低为 11.4%。

表 6 化冻方式对保存后丛生芽成活率的影响

化冻方式	成活率/%
40℃水浴 2 min,25℃水浴 10 min	18.3 b
37~40℃水浴快速化冻 2 min	57.7 a
25℃自然化冻 10 min	11.4 c

## 3 讨论与结论

处理材料的大小和冰冻处理方式对玻璃化法保存种质资源成活率有很大影响。不同保存材料其差异很大,柑桔茎尖 2~2.5 mm 长,室温下 60% PVS2 装载 20~30 min,再用 PVS2 于 0℃处理 50~60 min 保存后成活率为 100%<sup>[11]</sup>。怀山药切取 1~1.5 cm 的带芽茎段,用 60%的 PVS1 在室温下处理 60 min,再用 100%的 PVS1 在 0℃条件下处理 60 min,成活率可达 77.14%<sup>[12]</sup>。菠萝 0~2.5 mm 长的茎尖,室温(25℃)下用 LS 装载液预处理 50 min,再用 PVS2 溶液于 0℃下处理 40 min,成活率 87.7%~96.9%<sup>[13]</sup>。该研究中,生姜丛生芽 2~

3 mm, 60% PVS2 室温处理 5 min, 100% PVS 20℃ 下处理 30 min, 成活率最高。

继代时间和预培养时间对不同保存材料玻璃化保存后成活率有较大影响, 预培养的目的是增加含糖量使茎尖脱水, 提高胞液的渗透势及降低冰点, 这样能够减少液氮冻存过程中水分结冰对细胞膜的伤害<sup>[14]</sup>。通过继代培养提高细胞分裂与分化的同步化频率, 亦提高超低温保存的存活率。但不同材料继代时间和预培养时间有很多差别。百合离体茎尖用含有 0.3 mol/L 蔗糖的培养基进行预培养可提高冻存后的存活率<sup>[10]</sup>。苹果茎尖继代培养 70 d, 0.7 mol/L 蔗糖的 MS 固体培养基上预培养 1 d, 成活率达 60%<sup>[15]</sup>。将在高浓度蔗糖溶液 (1.5 mol/L) 和脱落酸 (ABA 0.5 mg/L) 的逆境培养基上生长的苹果试管苗继代培养 3 个月以上, 成活率达 69%<sup>[15]</sup>。猕猴桃茎尖在含 5% 二甲基亚砷 + 5% 蔗糖浓度的 MS 培养基上预培养 4 d, 于室温下用 2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖溶液预处理 40 min, 存活率高于 56.7%<sup>[16]</sup>。该研究中, 生姜丛生芽继代 45 d, 0.5 mol/L 蔗糖的培养基上预培养 2 d, 成活率最高, 达 55.7%。可能继代达到 45 d 左右时, 丛生芽生长已经非常缓慢, 培养基中的水分已很少, 渗透压增高, 茎尖的含水量明显下降, 细胞液泡化程度降低。预培养 2 d, 丛生芽处于有丝分裂前后, 细胞抗冻能力强<sup>[17]</sup>, 所以处于这个时期的细胞在超低温保存后存活率高。

采用继代培养 45 d 的丛生芽, 切取 2~3 mm, 于 0.5 mol/L 蔗糖浓度的 MS 培养基内预培养 2 d, 60% PVS2 室温处理 5 min, 100% PVS 20℃ 下处理 30 min, 迅速投入液氮, 48 h 后, 37~40℃ 水浴快速化冻 2 min, 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 培养液洗涤 20 min。将洗涤过的丛生芽转移至 MS + 0.5 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA + 0.3 mg/L GA<sub>3</sub> + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂的培养基上恢复培养, 成活率达 57.7%。

## 参考文献

- [1] 刘波, 缪军, 吴雄. 生姜研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2011(5): 135-138.
- [2] 黄菊辉. 生姜种质资源的离体繁殖和保存[J]. 中国农业科学, 1995, 28(2): 24-30.
- [3] Villabos V M, Engelman F. Exsitu conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. Biotechnol, 1995, 11(4): 375-382.
- [4] 周逊, 李锡香, 向长萍, 等. 生姜种质资源的常温离体保存[J]. 遵义师范学院学报, 2008, 8(4): 50-52.
- [5] Kartha K K, Engelmann F. Cryopreservation and germplasm storage [M]//Plant Cell and Tissue Culture. Springer Netherlands, 1994: 195-230.
- [6] Ozudogru E A, Prevati A, Lambardi M. *In vitro* conservation and cryopreservation of ornamental plants[M]//Protocols for *in vitro* Propagation of Ornamental Plants. Humana Press, 2010: 303-324.
- [7] Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, et al. Cryopreservation of apple in vitro shoot tips the droplet freezing method[J]. Cryo Letters, 1999, 20: 109-112.
- [8] 曲先, 王子成. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 茎尖的超低温保存及其遗传变异的初步观察[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(1): 11-16.
- [9] 张巧仙. 植物种质资源保存[J]. 生物学教学, 2009, 34(2): 3-5.
- [10] 张玉芹, 李锡香, 马庆. 食用百合种质资源玻璃化法超低温保存技术[J]. 中国蔬菜, 2004, 20(7): 53-57.
- [11] 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306.
- [12] 李明军, 洪森荣, 徐鑫. 怀山药种质资源的玻璃化法超低温保存[J]. 作物学报, 2006, 12(2): 201-203.
- [13] 傅翠娜, 肖远辉, 曾继吾. 菠萝茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 西南农业学报, 2011, 24(5): 1875-1878.
- [14] Rymamnen L. Cold hardening and slow cooling: tools for successful cryopreservation and recovery of in vitro shoot tips of sliver birch[J]. Hort-Science, 1982, 17(2): 122.
- [15] 赵艳华, 陈霜莹, 吴永杰, 等. 玻璃化法超低温保存苹果离体茎尖[C]. 北京: 中国科学技术协会第二届青年学术年会, 1995.
- [16] 徐小彪, 辜青青, 蔡祖国, 等. 玻璃化法超低温保存猕猴桃离体茎尖及其植株再生[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 842-844.
- [17] Withers L A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts [C]//Kartha K K. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Boca Raton: CRC Press, 1985: 243-267.

## Ginger Vitrification Cryopreservation Technology

DU Lai-shun, FENG Jian-jun, LI Xiao-hua, ZHAO Feng-zhi, WU Yong-qing, YU Hong-tao  
(Agricultural Bureau of Keyouzhongqi Banner, Keyouzhongqi, Inner Mongolia 029400)

**Abstract:** Taking buds obtained from the shoot of ginger by vitrification virus-free cuvette plantlet cultured 25 days in medium as material, the optimal vitrification procedure of cryogenic preservation of ginger was explored. The results showed that the shoot were subcultured by 45 days and detached the size of 2~3 mm, shoot was precultured on MS medium with 0.5 mol/L sucrose for 2 days, then it was dehydrated with 60% PVS2 solution for 5 minutes at room temperature, then with 100% PVS2 solution for 30 minutes at 0℃. The materials were plunged into liquid nitrogen. After 48 h, the material was taken off from liquid nitrogen and thawed in 37~40℃ 2 minute, then it was cultivated on MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.3 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 7 g/L, the highest survival rate was 57.7%.

**Key words:** ginger; vitrification method; cryop reservation