

姜种质资源离体保存技术研究

韦坤华^{1,2}, 李林轩¹, 缪剑华¹, 高山林²

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023;

2. 中国药科大学 遗传育种教研室, 江苏 南京 211198)

摘要:采用正交实验设计,研究了生长调节素、渗透压、温度等因素对姜种质资源离体保存的影响,以期建立姜种质资源离体保存技术体系,并通过生长恢复与遗传稳定性考察对保存材料进行初步评价。结果表明:生长调节剂、渗透压、温度等因素对姜种质资源的离体保存均有显著影响,最终确定姜离体保存的最佳保存方法为:MS+蔗糖 60 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 10 g/L+矮壮素(CCC)2.0 mg/L+多效唑(PP₃₃₃)2.0 mg/L+脱落酸(ABA)2.0 mg/L,培养条件为光照时间 14~16 h/d,光照强度 1 500 lx,温度 20℃,在此条件下保存 300 d,存活率在 50%以上,保存材料生长恢复情况良好,染色体保持稳定。

关键词:姜;种质资源;离体保存;生长恢复;遗传稳定性

中图分类号:S 632.502 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0112-05

植物种质资源的保存方法很多,广义上可分为原地保存、异地保存和离体保存 3 种^[1]。前 2 种方法保存植物种质资源均需要大量的土地和人力资源,成本高,易遭受各种自然灾害的侵袭^[2]。作为无性繁殖材料,姜的种质资源保存主要是依靠用种姜不断进行田间种植来进行,但是这种方法存在很多缺点,如繁殖系数低,耗费大量人力、物力和财力等,而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^[3]。而离体保存可以将大批量的样品储存在一个较小空间内,且便于管理和运输,已经逐渐发展成为目前研究最广泛的保存方法^[4]。

该研究通过考察植物生长调节剂、温度、渗透压等因素对脱病毒姜试管苗生长状况的影响,进行姜种质资源的离体保存研究,并对长期保存的材料进行生长恢复和遗传稳定性的初步评价,以期姜种质资源的长期保存提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取姜优良品种莱芜大姜的脱病毒试管苗在繁殖培养基上培养 20 d 获得的丛生芽作为试验材料。培养

条件:培养温度(25±2)℃,光照强度 1 500 lx,每天光照时间 14~16 h。

1.2 试验方法

1.2.1 植物生长调节剂对姜试管苗离体保存的影响以矮壮素(CCC)、脱落酸(ABA)、多效唑(PP₃₃₃) 3 种调节剂为试验因素,进行 3 水平正交实验设计,考察各因素对试验材料生长状况的影响,以试验材料存活率不低于 50%的保存时间作为种质保存的评价指标(表 1)。每处理接种 10 瓶,每瓶 5 株单芽。光照时间 14~16 h/d,光照强度 1 500 lx,室温(25±1)℃。

表 1 脱毒姜种质保存培养基筛选激素正交实验因素水平(生长调节剂)

Table 1 The hormone factors and levels of orthogonal test of filtration of germ plasm conservation medium of *Z. officinale* Rosc.

水平 Level	因素 Factor		
	A:矮壮素 CCC /mg·L ⁻¹	B:多效唑 PP ₃₃₃ /mg·L ⁻¹	C:脱落酸 ABA /mg·L ⁻¹
1	0.0	0.0	0.0
2	1.0	1.0	1.0
3	2.0	2.0	2.0

1.2.2 渗透压及其它因素对脱毒姜离体保存的影响以蔗糖、甘露醇、琼脂为试验因素,进行 3 水平正交实验设计,考察各因素对试验材料生长状况的影响,以试验材料存活率不低于 50%的保存时间作为种质保存的评价指标(表 2)。每处理接种 10 瓶,每瓶 5 株单芽。光照时间 14~16 h/d,光照强度 1 500 lx,室温(25±1)℃。

1.2.3 温度对脱毒姜离体保存的影响 将脱毒姜试管苗的健壮单芽接种于姜繁殖培养基(MS+6-BA 2.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L)上,分别置于 10、15、20 和

第一作者简介:韦坤华(1983-),女,博士,助理研究员,现主要从事中药生物技术和资源保护等研究工作。E-mail:divinekh@163.com.

责任作者:高山林(1946-),男,教授,博士生导师,现主要从事中药生物技术研究工作。E-mail:shlingao@163.com.

收稿日期:2012-12-20

25℃条件下培养,每瓶接种5株,每处理接种10瓶,以试验材料存活率不低于50%的保存时间作为种质保存的评价指标。每天光照14~16 h,光照强度1500 lx。

表2 脱毒姜种质保存培养基筛选
正交实验因素水平(渗透压)

Table 2 The factors and levels of orthogonal test of
filtration of germ plasm conservation medium

水平 Level	因素 Factor		
	A:蔗糖 Sucrose /g·L ⁻¹	B:琼脂 Agar /g·L ⁻¹	C:甘露醇 Mannite /g·L ⁻¹
1	30	3.2	0
2	60	3.6	5
3	90	4.0	10

1.2.4 离体保存的脱毒姜试管苗的生长恢复情况考察

将健壮的莱芜大姜脱毒株系‘M2-2’的试管苗单芽接种到最佳保存培养基上20℃下保存300 d后存活的姜试管苗接种到MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.4 mg/L+ABT 0.3 mg/L上,每30 d继代1次,继代3次后,以平均生长率、芽增殖倍数、叶长、叶宽和单株生根率为指标考察试管苗的恢复情况。

1.2.5 离体保存试管苗的遗传稳定性考察 将继代3次已恢复生长的保存材料长至0.5~1.0 cm的幼根于上午8:00切下,用蒸馏水洗净表面残存的培养基后,放入0.2%的秋水仙碱溶液中浸泡4 h,蒸馏水冲洗3次后,放入卡诺氏固定液(冰醋酸:无水乙醇=1:3)中固定2~24 h。依次用95%、75%乙醇、蒸馏水冲洗3次后,放入0.1 mol/L HCl溶液中60℃下解离12 min,蒸馏水洗净酸液后,切下根尖于载玻片上,加1滴改良苯酚品红染液染色30 min,压片,Olympus BX 40显微镜下镜检观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对姜试管苗离体保存的影响

该试验选取矮壮素(CCC)、脱落酸(ABA)、多效唑(PP₃₃₃)3种调节剂的3个水平进行正交实验,以半数成活的保存时间为考察指标,比较不同的植物生长调节素配比对试管苗生长的影响。

由表3正交实验结果可知,3种生长调节剂对脱毒姜试管苗种质保存的影响顺序为A(CCC)>B(PP₃₃₃)>C(ABA),最适的保存培养基配比为A₃B₃C₃,即MS+CCC 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 2.0 mg/L+ABA 2.0 mg/L。表4方差分析表明,CCC对试管苗的保存时间有显著影响,最适浓度为2.0 mg/L;在此浓度下,脱毒姜试管苗的保存时间最长,苗生长最为缓慢。CCC能够控制植株徒长,使植株节间缩短,植株长得矮、壮、粗、根系发达。在保存期内观察发现培养基内添加高浓度CCC的试管苗膨大,长出类似试管小姜块的结构,即使上部的苗叶枯死,使用这些小姜块也可以使材料的生长恢复。PP₃₃₃对

试管苗的离体保存也有显著影响,当PP₃₃₃的浓度为2.0 mg/L时植株的生长最为缓慢。PP₃₃₃能抑制顶端分生组织生长,延缓生长速度,抑止茎秆伸长,能促进植株分蘖或分枝,有利根系生长,提高植株抗逆能力,这就使得在需要对保存的姜试管材料进行大量扩繁时,保存的材料能够迅速恢复生长,满足生产上的需要。

表3 脱毒姜种质保存培养基筛选
激素正交实验L₉(3⁴)结果(生长调节剂)

Table 3 The results of orthogonal test of
filtration of germplasm conservation medium of *Z. officinale*

	A 矮壮素 (CCC)	B 多效唑 (PP ₃₃₃)	C 脱落酸 (ABA)	D	保存时间 Conservation time/d
1	1	1	1	1	116
2	1	2	2	2	138
3	1	3	3	3	187
4	2	1	2	3	176
5	2	2	3	1	273
6	2	3	1	2	257
7	3	1	3	2	215
8	3	2	1	3	302
9	3	3	2	1	290
K1	441	507	675	679	$\sum_{i=1}^9 \frac{1}{i} = 1.933$ CT=415 165.4
K2	706	713	604	610	
K3	807	734	675	665	
R	122.00	75.67	23.67	23.00	A>B>C

表4 脱毒姜种质保存方差分析(生长调节剂)

Table 4 Variance analysis of conservation time of *Z. officinale* Rosc.

变异来源 Source of variance	平方和 Sum of variance squares	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	F 值 F value	P 值 P value
A	23 820.22	2.00	11 910.11	23.74	0.01<P<0.05
B	10 489.56	2.00	5 244.78	10.45	0.05<P<0.1
C	1 120.22	2.00	560.11	1.12	P>0.1
D	886.89	2.00	443.44	0.88	
SE=SC+SD	2 007.11	4.00	501.78		

注:F1-0.01(2,2)=99.0,F1-0.05(2,2)=19.0,F1-0.1(2,2)=9.0。

大部分的试验材料在添加了生长调节剂的培养基上的保存时间都在半年以上,其中5号、8号和9号处理组的保存时间超过9个月,且存活下来的试管苗接种到繁殖培养基上能够正常生长。

2.2 渗透压及其它因素对脱毒姜离体保存的影响

由渗透压对姜离体保存影响的正交分析结果表5可知,3种因素对离体保存时间的影响顺序为A(蔗糖)>B(琼脂)>C(甘露醇),最适培养基配比为A₂B₃C₃,即MS+蔗糖60 g/L+琼脂4.0 g/L+甘露醇10 g/L。表6方差分析结果表明,蔗糖对材料的保存时间具有显著影响,适当浓度的蔗糖可以延长材料的保存时间,因为在离体培养条件下,糖类物质是试管苗生存和生长的主要碳源^[5],适当增加蔗糖含量,可以为试管苗的生长提供更多的营养成分,大大提高成活率。但蔗糖浓度过高,植株吸水困难,也会导致不良后果^[6]。在保存过程中观

察发现,蔗糖浓度低(30 g/L)时,材料的颜色偏淡,分蘖多,试管苗生长较快,后期养分无法满足生长需要后材料逐渐枯死。当蔗糖浓度升高时,植株生长受到明显的抑制,表现出生长缓慢的迹象,材料分蘖减少,茎基部出现膨大,形成试管小姜块样结构。但蔗糖浓度增加到90 g/L时,虽然也能形成试管小姜块结构,但是材料的叶片过早枯黄,材料死亡率较高。因此,培养基中添加60 g/L的蔗糖比较适合用于材料的保存。方差分析结果也表明,琼脂和甘露醇的浓度对材料的保存时间没有显著影响。

表5 脱毒姜种质保存培养基筛选
激素正交实验 $L_9(3^4)$ 结果(渗透压)

Table 5 The results of orthogonal test of
filtration of germplasm conservation medium of *Z. officinale*

	A 蔗糖 (Sucrose)	B 琼脂 (Agar)	C 甘露醇 (Mannite)	D	Conservation time/d
1	1	1	1	1	116
2	1	2	2	2	165
3	1	3	3	3	208
4	2	1	2	3	286
5	2	2	3	1	305
6	2	3	1	2	325
7	3	1	3	2	205
8	3	2	1	3	218
9	3	3	2	1	232
K1	489	607	659	653	$\sum_{i=1}^9 y_i = 2\ 060$ CT=471 511.1
K2	916	688	683	695	
K3	655	765	718	712	
R	142.33	52.67	19.67	19.67	A>B>C

表6 脱毒姜种质保存方差分析(渗透压)

Table 6 Variance analysis of conservation time of *Z. officinale*

变异来源 Source of variance	平方和 Sum of variance squares	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	F 值 F value	P 值 P value
A	30 889.56	2.00	15 444.78	51.41	0.01<P<0.05
B	4 161.56	2.00	2 080.78	6.93	P>0.1
C	586.89	2.00	293.44	0.98	P>0.1
D	614.89	2.00	307.44	1.02	
SE=SC+SD	1 201.78	4.00	300.44		

注: $F_{1-0.01}(2,2)=99.0$, $F_{1-0.05}(2,2)=19.0$, $F_{1-0.1}(2,2)=9.0$ 。

2.3 温度对脱毒姜离体保存的影响

接种到繁殖培养基上的材料在不同温度下保存的结果见表7。在10℃下保存的材料基本停止生长,而且出现萎缩白化的现象,2个月以后已经有一半以上的材料枯死。15℃下的材料生长非常缓慢,材料的颜色也偏淡,但保存时间较10℃下有所延长。而20℃下保存的材料生长速度也较慢,材料颜色正常,分蘖数量适中,保存时间327 d,是常规继代培养的10倍以上,保存效果最好。25℃虽然是培养室的常规温度,保存材料可以与普通材料一起存放,但在25℃下保存的材料,保存初期生长旺盛,分蘖多,45 d就长高至瓶盖,瓶中培养基逐渐

萎缩减少,保存后期培养基养分耗尽,材料逐渐枯死,保存效果不理想。将20℃下保存10个月的材料接种到MS+6-BA 2.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L的繁殖培养基上,单芽在1周内即恢复生长,生长速度较快,丛生芽数量较多,与正常繁殖的丛生芽无异。可见适当的低温不仅可以延长保存时间,而且对保存材料的伤害较小,保存材料可以在较短时间内恢复正常的生长状态,满足生产上的需要。

表7 温度对保存时间的影响

Table 7 The results of the test of conservation temperature

温度 Temperature/℃	保存时间 Preservation time/d	芽的生长状况 Growth of buds
10	56	单芽基本不生长,材料颜色逐渐变淡,30 d后开始逐渐枯萎、死亡
15	215	生长速度非常缓慢,材料颜色偏淡,80 d时开始逐渐枯萎、死亡
20	327	生长速度较慢,材料颜色正常,5个月后开始逐渐枯萎、死亡
25	186	生长速度较快,颜色正常,70 d后培养基养分耗尽,材料枯萎、死亡

综合生长调节剂、渗透压、温度等因素对脱毒姜试管苗的离体保存结果,确认适宜脱毒姜试管苗离体保存的培养基为MS+蔗糖60 g/L+琼脂4.0 g/L+甘露醇10 g/L+CCC 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 2.0 mg/L+ABA 2.0 mg/L,培养条件为光照时间14~16 h/d,光照强度1 500 lx,温度20℃。

2.4 离体保存试管苗的生长恢复情况考察

将保存材料接种到繁殖、生根同步化培养基上恢复生长,对第3次继代培养的材料进行生长考察,结果见表8。对于离体保存材料而言,保存材料的生活力不能降低是离体保存的一个重要指标。从试验结果可知,离体保存300 d的试验材料经3次继代恢复后,平均生长率和丛生芽倍数略低于正常水平,但无显著差异,叶片长度和宽度变化不大,试管苗长势旺盛,颜色浓绿。生根情况基本恢复,根系发达,单株根数约为2~3条,根长也在3~4 cm左右。保存后恢复的试管苗外观形态与保存前试管苗形态差异不大,材料经过离体保存并没有受到明显生长抑制、形态变异或其它不良影响。表明在MS+蔗糖60 g/L+琼脂4.0 g/L+甘露醇10 g/L+

表8 离体保存后恢复的试管苗和
保存前试管苗的比较

Table 8 Compare of the material between
conservation treatment and Control

材料 Material	平均生长率 Average growth rate/%	芽的增殖时间 Times of buds multiplication/d	单株生根率 Rooting rate per plant/%	叶长 Leaf length /cm	叶宽 Leaf width /cm
保存前	9.15±0.47	8.96±0.72	98.4±1.98	3.12±0.17	0.48±0.20
Control					
保存后	8.36±1.05	8.32±0.59	96.7±2.35	2.89±0.32	0.51±0.19
Conserved					

CCC 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 2.0 mg/L+ABA 2.0 mg/L 培养基上 20℃ 下保存 300 d 的材料能够保持较强的生活力,符合离体保存的基本要求,获得理想的保存效果。

2.5 离体保存试管苗的遗传稳定性考察

除了保存材料的生活力不能降低外,遗传上保持稳定也是离体保存的一个重要指标,通过根尖染色体鉴定法对离体保存的试管苗的染色体变化情况进行考察,结果发现,在 MS+蔗糖 60 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 10 g/L+CCC 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 2.0 mg/L+ABA 2.0 mg/L 培养基上 20℃ 下保存 300 d 的试管苗的染色体数量没有发生变化,为 $2n=2x=22$ 条,染色体形态正常,没有因为长时间的离体保存而发生改变,说明保存后材料的遗传稳定性良好。

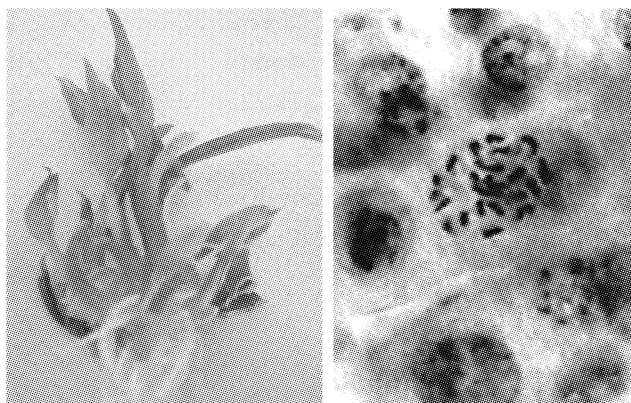


图 1 保存材料的丛生芽增殖效果和染色体

Fig.1 Shoots proliferation effect and chromosome of *in vitro* conservation materials

3 讨论

生长抑制物质是一类天然的或人工合成的外源激素,具有很强的抑制细胞生长的生理活性。完善和调整培养基中的生长调节剂配比,特别是添加生长抑制物质,利用激素调控技术,不仅能延长培养物在试管中的保存时间,而且能提高试管苗素质和移植成活率^[7]。

蔗糖和甘露醇是高渗化合物,添加到培养基中可以提高培养基的渗透势负值,造成水分逆境,降低细胞扩大生长所必需的膨压,使细胞吸水困难,减弱新陈代谢,

延缓细胞生长,同时细胞壁酶活性受到抑制,生长受阻,减少了培养基内的养分消耗,从而可以延长种质在培养基内的保存时间。琼脂是固体培养基中常用的固体剂,增加琼脂的含量,可以加大培养基的硬度,从而减少了保存材料与培养基的接触面,阻止植物对水分和养分的吸收,达到减缓生长的目的。

根据 Wither L A^[8-9] 报道,植物对低温的耐受与生长习性有关,通常认为温带植物的保存低温应该在 0~6℃,而热带植物的保存低温应在 15~20℃^[10],姜起源于热带地区,系统发育的结果使其成为喜温性的植物,不耐寒、不耐霜,15℃ 以下会停止生长,试验结果也验证了姜在低温下停止生长的习性。

材料能够迅速恢复生长并保持遗传稳定是离体保存的重要评价指标,通过上述试验,证明离体保存材料无论在外观形态、生长发育,以及染色体特征均与未经过离体保存处理材料无显著差异,表明该保存方法适合姜的种质资源长期保存,为保持姜的优良种质提供了技术指导。

参考文献

- [1] Hawkes J G. Germplasm collection, preservation and use[A]. Freged K J. In: Plant Breeding[C]. New Delhi: Gayatri Offsite Press, 1981: 57-84.
- [2] Villalobos V M, Engelman F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. Biotechnol, 1995, 11(4): 375-382.
- [3] 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.
- [4] 张巧仙. 植物种质资源保存[J]. 生物学教学, 2009, 34(2): 3-5.
- [5] 史永忠, 邓秀新, 万蜀渊, 等. 苹果种质资源的离体保存[J]. 作物品种资源, 1996(4): 42-43, 39.
- [6] Kartha K K. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems[J]. Plant Sci Lett, 1981, 22(2): 301-307.
- [7] 洪森荣, 郭连金. 离体保存技术在植物种质资源保存中的应用[J]. 上饶师范学院学报, 2006, 26(3): 92-97.
- [8] Wither L A. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm [A]. In Holden J H W, J T Williams. Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation. George Allen and Unwin (Publisher) Ltd, 1984: 138-157.
- [9] Wither L A. Cryopreservation and storage of germplasm [A]. In Dixon R A. Plant Cell Culture; A Practical Approach. IRL Press, 1985: 169-192.
- [10] Omura M, Hidak T. Shoot tip culture of citrus. II, longevity of culture shoot[J]. Bulletin of the Fruit Tree Research Station, 1992, 22(1): 33-37.

In vitro Conservation Technique of Germplasm in *Zingiber officinale* Rosc.

WEI Kun-hua^{1,2}, LI Lin-xuan¹, MIAO Jian-hua¹, GAO Shan-lin²

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Nanning, Guangxi 530023; 2. Department of Genetics and Breeding, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211198)

Abstract: To establish the optimal *in vitro* conservation technology system of *Zingiber officinale* Rosc. germplasm, the effects of phytohormone, osmotic pressure and temperature on it were tested, and the growth recovery and genetic stability were evaluated after 300 days of *in vitro* conservation. The results showed that the best conservation condition

分光光度法测定高浓度培养液下的产油酵母菌生长曲线

马 勇, 图 雅, 陈 秀 莉, 门 中 华

(包头师范学院 生物科学与技术学院, 内蒙古 包头 014030)

摘 要:采用分光光度法测定酵母菌不同生长时间高浓度培养液的 OD_{600} 值, 并对不同生长时间高浓度培养液进行相应倍数的稀释, 使用建立 OD_{600} 值回归方程的方法, 利用回归后的 OD_{600} 值绘制出产油酵母菌 Y1 的生长曲线。结果表明: 所得到的生长曲线可以准确反应菌体的生长规律。酵母菌 Y1 在适宜生长条件下菌体细胞生长出现 4 个阶段: 延滞期、对数期、稳定期和衰亡期, 其中, 0~4 h 为延滞期, 4~24 h 为对数生长期, 24~68 h 为稳定期, 68 h 以后进入衰亡期。该研究旨在为相关研究人员提供类似问题的详细解决办法和重要参考。

关键词:产油酵母; 分光光度法; 生长曲线; 回归方程

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0116-03

我国人均石化资源储量十分有限, 而能源需求量却与日俱增。微生物油脂是石化能源替代品生物柴油的潜在油源^[1]。由微生物生产富含多种生理功能的不饱和脂肪酸油脂已引起国内外的广泛重视。因此, 微生物油脂的研究将成为新世纪油脂工业的一个发展方向^[2]。在进行产油酵母的研究中, 能够准确测定所使用菌种的生长量以及后期测定所用菌种的生长曲线, 对于了解所用菌种以及后期的发酵产脂培养是十分重要的一项生理指标^[3]。生长曲线反映了酵母菌在培养过程中的生长和繁殖的规律, 同一种酵母菌因研究方法不同其生长曲线也不一样^[3]。通过测定酵母菌的生长曲线, 了解其生长繁殖规律, 这对根据不同的需要, 有效地利用和控制酵母菌的生长具有重要的意义^[4]。

该研究对实验室保藏的 1 株产油酵母菌, 通过分光

光度法测定酵母菌不同生长时间高浓度培养液的 OD_{600} 值, 并对不同生长时间高浓度培养液进行相应倍数的稀释, 使得稀释后的培养液所测得的 OD_{600} 值均保持在 0.1~0.8 之间^[3], 然后建立相关稀释倍数间的 OD_{600} 值回归方程, 使所有实际测得的 OD_{600} 值均回归到同一稀释倍数所表现的回归后 OD_{600} 值, 最终确定了其生长曲线。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种为产油酵母菌 Y1, 由包头师范学院生物科学与技术学院实验中心保藏。

培养基: YEPD 液体培养基(g/L): 1 L 培养基中含葡萄糖 20 g, 酵母粉 10 g, 蛋白胨 10 g; 液体种子培养基(g/L): 1 L 培养基中含葡萄糖 20 g, $(NH_4)_2SO_4$ 5 g, KH_2PO_4 1 g, 酵母粉 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌 Y1 种子液的培养 取活化后斜面酵母菌 Y1 一环, 接种于 100 mL 液体 YEPD 培养基中, 28℃ 180 r/min 培养 14 h, 备用。

1.2.2 酵母菌 Y1 不同生长时间培养液收集 取 20 个 100 mL 已灭菌的三角瓶分别装入 25 mL 液体种子培养基, 标签编号, 其中 1 个标注为 CK, 另外将 19 个三角瓶

第一作者简介:马勇(1980-), 男, 辽宁台安人, 在读博士, 实验师, 现主要从事微生物油脂及植物生理与农作物基因工程等研究工作。

责任作者:门中华(1975-), 男, 内蒙古包头人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事植物生理生态学及分子生物学等研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160254); 包头师范学院青年科学研究基金资助项目(BSYKJ2011-17)。

收稿日期:2012-12-13

was MS basal medium containing 6 g/L sucrose, 4.0 g/L agar powder and 10 g/L mannite supplemented with 2.0 mg/L CCC, 2.0 mg/L PP₃₃₃ and 2.0 mg/L ABA, in an illuminated chamber under 14~16 h photoperiod of 1 500 lx light intensity at 20℃, more than 50% conservation material survived after 300 days, most of them could grew well on propagation medium, and the chromosome number maintained stably.

Key words: *Zingiber officinale* Rosc.; germplasm resource; *in vitro* conservation; growth recovery; genetic stability