

# 大蒜茎尖玻璃化法超低温保存技术研究

王艳军<sup>1,2</sup> 李锡香<sup>1\*</sup> 向长萍<sup>2</sup> 沈 镒<sup>1</sup> 宋江萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

**摘 要:** 用山东‘苍山大蒜’进行了茎尖玻璃化法超低温保存技术的研究。5~8 mm大蒜茎尖在 MS + 0.7 mol/L蔗糖的固体培养基上预培养 7 d, 切取 3.0~3.5 mm的茎尖, 在 20 ℃下经 60% PVS<sub>2</sub> 处理 60 min, 再于 0 ℃下用 PVS<sub>2</sub> 处理 5~60 min后, 换适量新鲜 PVS<sub>2</sub>, 浸入液氮。保存 2 d或 1个月后取出, 在 37 ℃水浴中解冻 2 min, 用 MS + 1.2 mol/L蔗糖液体培养基洗涤 2次, 每次 10 min, 经过恢复培养, 茎尖成活率最高可达到 100%。

**关键词:** 大蒜; 茎尖培养; 液氮; 玻璃化法; 超低温保存

**中图分类号:** S 633.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 03-0507-03

## Studies on Cryopreservation Technology of Shoot-tips of Garlic by Vitrification

Wang Yanjun<sup>1, 2</sup>, Li Xixiang<sup>1\*</sup>, Xiang Changping<sup>2</sup>, Shen Di<sup>1</sup>, and Song Jiangping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup> Horticulture and Forest College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Studies on cryopreservation technology of shoot-tips of garlic by vitrification were conducted with ‘Cangshan Garlic’. The garlic shoot-tips of 5 - 8 mm in length were pre-cultured on MS medium with 0.7 mol/L sucrose for 7 days. Then the excised shoot-tips of 3.0 - 3.5 mm were pre-treated with 60% PVS<sub>2</sub> at 20 ℃ for 60 min, and treated with PVS<sub>2</sub> at 0 ℃ for 5 - 60 min before being immersed in liquid nitrogen directly. After rapidly thawing in a water bath at 37 ℃ for 2 min, the shoot-tips were washed twice with MS + 1.2 mol/L sucrose solution for 10 min each time and then transferred onto MS medium for recovery growth. The highest survival rate of the garlic shoot-tips reached 100%.

**Key words:** Garlic; Shoot-tip culture; Liquid nitrogen; Vitrification; Cryopreservation

## 1 目的、材料与方法

利用传统的方法保存大蒜种质资源不仅需要耗费大量的人力与财力, 而且难以长期保存, 应尽早建立操作简便、可长期安全保存大蒜种质资源的体系, 我们以山东‘苍山大蒜’为材料, 进行离体茎尖的超低温保存研究。

试验于 2002年在中国农业科学院蔬菜花卉研究所进行。新鲜的‘苍山大蒜’先在 7 ℃下存贮 1个月, 以打破休眠备用。

基本试验程序: 在超净工作台上剥取已消毒的大蒜茎尖 5~8 mm, 接种在 MS培养基 (pH 5.8) 上, 在 20 ℃下预培养不同天数后切取其茎尖, 转移到 1.8 mL冷冻管中 (10个/管), 先在 20 ℃下用 60% PVS<sub>2</sub> (0.15 mol/L蔗糖液体培养基与 PVS<sub>2</sub> 溶液体积比为 40:60) 溶液进行玻璃化预处理, 再在 0 ℃下用 PVS<sub>2</sub> (甘油 300 g/L + 乙二醇 150 g/L + DMSO 150 g/L, 以含 0.4 mol/L蔗糖的 MS液体培养基配制)<sup>[1]</sup>进行玻璃化处理, 之后在冷冻管中换上新鲜的 PVS<sub>2</sub>, 装入纱布袋迅速浸入液氮中。冻存一

收稿日期: 2004 - 06 - 16; 修回日期: 2005 - 01 - 24

基金项目: 国家基础性工作专项 (2002DB10056); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助项目

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: Lixx@sachina.pku.edu.cn)

定的时间后取出茎尖, 37℃水浴解冻 2 min, 再转到室温下用 MS 液体培养基 (蔗糖 1.2 mol/L, pH 5.8) 洗涤 2 次, 每次 10 min, 然后接种在 MS+0.3 mol/L 蔗糖的固体培养基 (琼脂 4 g/L, pH 5.8) 上暗培养 4 d, 再转到 MS+0.1 mol/L 蔗糖培养基 (琼脂 7 g/L, pH 5.8) 上, 在正常光照、(20±2)℃条件下恢复培养, 检测茎尖成活率 (存活茎尖数占冻存茎尖总数的百分比)。

在通过预备试验, 逐渐优化的基础上, 在其他因素采用最优处理的前提下进行 3 个单因子试验:

(1) 预培养天数: 1、3、5 和 7 d, 对照不进行预培养; (2) 预培养基 MS 中蔗糖的浓度: 0.3、0.7、0.9 mol/L; (3) 冻存茎尖长度: 1.5~2.5 mm、3.0~3.5 mm 和 4.0~4.5 mm。

同样, 在其余因素采用最优处理的前提下, 通过 60% PVS<sub>2</sub> 和 PVS<sub>2</sub> 的不同处理时间组合进行双因子试验设计, 60% PVS<sub>2</sub>: 0、5、15、30、60 min; PVS<sub>2</sub>: 5、15、30、60 min。

试验中每个处理 20 个茎尖, 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度蔗糖预培养对茎尖超低温保存后存活率的影响

大蒜茎尖在蔗糖浓度分别为 0.3、0.7 和 0.9 mol/L 的 MS 固体培养基中预培养 7 d, 切取预培养的茎尖 3~3.5 mm, 先用 60% PVS<sub>2</sub> 处理 60 min, 再经 100% PVS<sub>2</sub> 处理 30 min, 冻存 2 d 后进行恢复培养, 结果显示超低温保存后的茎尖成活率分别为 11.7%、100% 和 58.3%。方差分析表明, 处理间差异极显著 ( $P=0.01$ )。由此说明, 0.7 mol/L 的蔗糖浓度对提高大蒜茎尖超低温保存成活率有利。这与甘薯中的试验结果<sup>[2]</sup>不同。

### 2.2 预培养天数对超低温保存后茎尖成活率的影响

5~8 mm 长的茎尖在 MS+0.7 mol/L 蔗糖的预培养基上分别预培养 0、1、3、5 和 7 d 后, 切取 3~3.5 mm 的茎尖, 先用 60% PVS<sub>2</sub> 处理 60 min, 再经 100% PVS<sub>2</sub> 处理 30 min, 冻存 2 d 后, 恢复培养的成活率分别为 1.7%、21.7%、53.3%、100% 和 100%。说明预培养 5 和 7 d 效果较好。但试验中观察到, 在恢复生长的速度上, 预培养 7 d 的茎尖比预培养 5 d 的快。

### 2.3 茎尖长度对超低温保存后成活率的影响

大蒜茎尖在 MS+0.7 mol/L 蔗糖培养基上预培养 7 d 后, 分别切取 1.5~2.5 mm、3.0~3.5 mm 和 4.0~4.5 mm 的茎尖, 先用 60% PVS<sub>2</sub> 处理 60 min, 再经 100% PVS<sub>2</sub> 处理 30 min, 冻存 2 d 后进行恢复培养。结果表明, 长度在 3.0~3.5 mm 范围内的茎尖, 保存后的成活率最高, 为 100%, 而长度为 1.5~2.5 mm 和 4.0~4.5 mm 的茎尖保存后成活率分别为 11.7% 和 53.3%。说明冷冻茎尖长度对其在超低温保存后的成活率影响很大。

### 2.4 60% PVS<sub>2</sub> 和 PVS<sub>2</sub> 处理时间对超低温保存后茎尖成活率的影响

以 5~8 mm 长的茎尖在 MS+0.7 mol/L 蔗糖的预培养基中培养 7 d 后, 切取茎尖为 3.0~3.5 mm, 经保护剂处理后的茎尖冻存 2 d 后, 恢复培养的结果显示, 在 PVS<sub>2</sub> 处理时间一定的情况下, 随 60% PVS<sub>2</sub> 预处理时间的延长, 保存后的茎尖成活率逐渐上升, 当预处理时间为 60 min 时, 成活率可达到 100%; 60 min 的预处理效果与其他各预处理之间的差异显著 ( $P=0.05$ , 表 1)。PVS<sub>2</sub> 处理不同时间之间的平均成活率无显著差异 ( $P=0.05$ )。表明 PVS<sub>2</sub> 的处理时间对成活

表 1 60% PVS<sub>2</sub> 预处理不同时间和 PVS<sub>2</sub> 处理不同时间后的茎尖成活率

Table 1 The survival rate of shoot-tips after cryopreservation under pre-treatment with 60% PVS<sub>2</sub> and treatment with

PVS<sub>2</sub> for different time (%)

预处理时间 Pretreatment time (min)	处理时间 Treatment time (min)				均值 Average
	5	15	30	60	
0	35	50	50	55	47.5 d
5	80	50	83.3	75	72.1 c
15	75	93.3	78.3	93.3	85.0 bc
30	85	93.3	86.7	100	91.3 b
60	100	100	100	100	100 a
均值 Average	75 a	77.3 a	79.7 a	84.7 a	

注: 同行相同字母表示 PVS<sub>2</sub> 不同处理间差异不显著; 同列不相同字母表示 60% PVS<sub>2</sub> 不同处理间差异显著。

Note: The same letters in a row show no significant difference among different treatment time with PVS<sub>2</sub>; The different letters in a column show significant difference among different treatment time with 60% PVS<sub>2</sub>.

率的影响不大，而预处理时间则以 60 min 最佳。本试验还观察到， $PV S_2$  处理时间为 30 min 时，茎尖较易恢复生长。但在所有的处理组合中，成活后的茎尖均没有直接生长成苗，而只是局部组织恢复生长形成叶状体。而前人利用玻璃化法冻存其它植物的茎尖，经恢复生长可以直接成苗<sup>[2, 3]</sup>。这可能与本试验中的恢复培养基的选择有关。因此，玻璃化处理后成活大蒜茎尖的诱导成苗问题仍需进一步探究。

## 2.5 超低温保存不同时间的茎尖成活率

按照上述试验结果进行程序优化，切取长度为 3.0 ~ 3.5 mm 的茎尖，以 MS + 0.7 mol/L 蔗糖为预培养基，预培养 7 d，60%  $PV S_2$  预处理 60 min， $PV S_2$  处理 30 min。在液氮中保存 2 d 和 1 个月后的茎尖成活率没有差别，且均可达到 100%（图 1）。这即预示按照上述程序进行大蒜茎尖超低温长期保存是可行的。

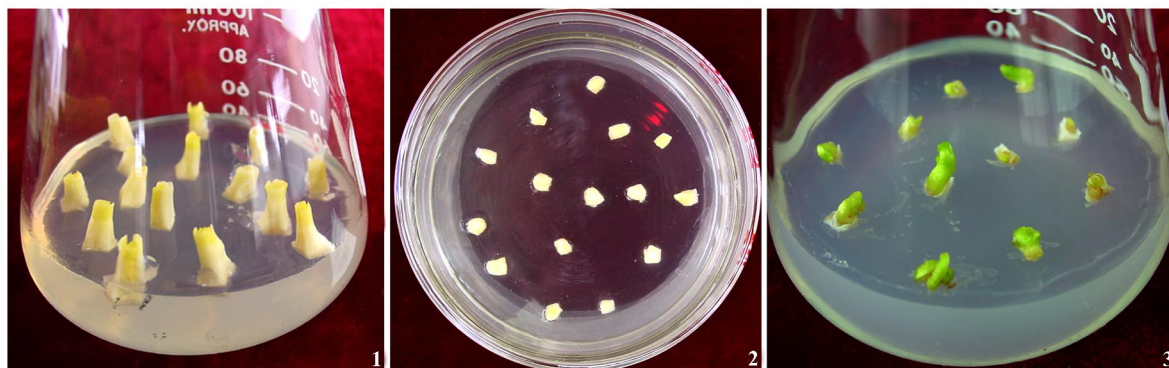


图 1 大蒜茎尖玻璃化法超低温保存部分过程

1. 经预培养的大蒜茎尖；2. 液氮取出解冻后茎尖；3. 恢复培养成活茎尖。

Fig. 1 Partly display of cryopreservation procedure of garlic shoot-tips by vitrification

1. Pre-cultured shoot-tips of garlic; 2. The shoot-tips of garlic after rapidly thawing; 3. Re-growing shoot-tips of garlic

## 参考文献：

- 1 Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osh var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports, 1990, 9: 30 ~ 33
- 2 Pennycooke J C, Towill L E Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. lam.) by vitrification. Plant Cell Report, 2000, 19: 733 ~ 737
- 3 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生. 园艺学报, 2001, 28 (4): 301 ~ 306  
Wang Z C, Deng X X. Cryopreservation of citrus shoot-tips by vitrification and regeneration. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28 (4): 301 ~ 306 (in Chinese)
- 4 曾继吾, 易干军, 张秋明. 番木瓜茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生. 园艺学报, 2004, 31 (1): 29 ~ 33  
Zeng J W, Yi G J, Zhang Q M. Cryopreservation of in vitro papaya shoot-tips by vitrification technique and its regeneration. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (1): 29 ~ 33 (in Chinese)

## 新书推荐

## 《新编拉汉英植物名称》

王宗训主编

本书收集具有经济价值和学术价值和学术价值或通俗常见的种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类植物、真菌、地衣名称约 55800 条。每种植物名称有拉、汉、英三种文字对照，按拉丁文字母顺序排列。书后附有英文俗名和汉名索引。

本书可供农、林、医药、环境保护等学科的管理机构、科研单位、大学中的科技人员以及生物工程、植物检疫、花卉园艺、新闻出版、旅游、外贸等专业的技术人员使用，也是各类图书馆典藏的重要工具书。定价：180 元（含邮费）。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。