

DOI:10.3865/j.issn.1001-3547(x).2008.09.020

生姜组织培养中脱菌试验研究

薛寒青 王舰

(青海省农林科学院生物所, 青海西宁, 810016)

摘要 选用姜块进行3步复合消毒法脱菌试验, 试验结果表明, 试验最佳处理组合为0 min 5%次氯酸钠(NaClO)、0.5 min 70%乙醇(C_2H_5OH)和15 min 0.1%升汞($HgCl_2$)。

关键词 生姜 组织培养 脱菌

对生姜进行脱菌脱毒快繁后的植株, 其长势强, 产量显著提高, 抗病(特别是姜瘟病)性增强; 其繁殖的效率也能大大的提高, 且移栽成活率也高^[1]。生姜脱菌快繁技术的发展及应用具有广阔的前景, 比如创造遗传变异、离体种质保存、脱菌种子包衣和离体小块茎生产等, 可以降低种植成本, 创造出巨大的经济价值, 但目前国内关于生姜脱菌脱毒快繁技术还不够完善, 污染率较高, 因此, 本试验选用姜块进行3步复合消毒法脱菌试验, 现将试验结果总结如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山东莱芜片姜, 山东黄苗生姜。

1.2 试验方法

选用5%次氯酸钠(NaClO)、70%乙醇(C_2H_5OH)及0.1%升汞($HgCl_2$)对黄苗生姜的姜块进行3因素4个不同时间水平的正交消毒灭菌试验, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计。处理水平如表1, 共16个试验组合(表2)。把随机选取的姜块用自来水冲洗1~1.5 h后切成边长1.0 cm左右的小块按处理设计进行消毒(不破坏姜皮), 处理后均用无菌水冲洗4~5次, 再把处理好的姜块切成4块, 分别接种在对应的培养基中培养, 10 d后观察试验结果, 统计污染率。数据采用DPS统计分析系统软件分析。

1.3 组织的病菌检测

随机抽取适量的培养组织、原始未消毒的姜芽和愈伤组织, 在超净工作台里分别进行适当的快速研磨, 用无菌水将研浆稀释50倍, 最后取1 ml的稀释液转入标记好的无菌培养皿中, 再把灭好菌的培养基冷却到35℃左右, 加入20 ml培养基在预先放好稀释液的培养皿中, 将其混匀制成细菌平板计数培养皿, 每个样品4个重复, 其中愈伤组织的培养基各留1个空白作为对照。在25℃下培养5~8 d后观察菌落的生长状况(菌落的颜色、形状及大小)。经过细菌平板计数, 对未脱菌的山东莱芜片姜和黄苗生姜姜芽与愈伤组织中进行病菌检测试验比较, 各组设计了4个重复。

2 结果与分析

2.1 脱菌组合的筛选

①正交设计方差分析表(随机区组模型) 将16个组合的试验统计数据结果进行正交设计方差分析(表3)。根据以往经验, 假设3个因子间无交互作用, 由表3方差分析的结果可知, 次氯酸钠的作用不显著, 各处理水平间无显著差异; 而乙醇、升

表1 不同灭菌剂的处理水平

5%NaClO	70%乙醇	0.1% $HgCl_2$
处理时间/min	处理时间/min	处理时间/min
0	0	0
5	0.5	10
10	1.0	15
15	1.5	20

薛寒青(1965-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为蔬菜和花卉的组织培养和脱毒, 电话: 0971-5312581。

E-mail: hanqx77@sina.com

收稿日期: 2008-05-14

表 2 不同脱菌试验组合

处理水平	5%NaClO 处理时间/min	70%乙醇 处理时间/min	0.1%HgCl ₂ 处理时间/min	污染率 %
1	0	0	0	100.00
2	0	0	0	46.67
3	0	1.0	15	20.00
4	0	1.5	20	13.33
5	5	0	10	80.00
6	5	0.5	0	93.33
7	5	1.0	20	6.67
8	5	1.5	15	28.30
9	10	0	15	53.33
10	10	0.5	20	26.67
11	10	1.0	0	66.67
12	10	1.5	20	33.33
13	15	0	20	33.63
14	15	0.5	15	26.67
15	15	1.0	10	46.67
16	15	1.5	0	73.33

表 4 各个处理间差异显著性检验 (Duncan 多重比较)

处理号	接种的 块数/块	污染数/块		污染率/%		差异显著
		I	II	I	II	
8	30×2	4	1	13.33	3.33	aA
7	30×2	2	5	6.67	16.67	abA
3	30×2	6	2	20.00	6.67	abA
14	30×2	8	4	26.67	13.33	abcAB
4	30×2	4	9	13.33	30.00	abcABC
10	30×2	8	6	26.67	20.00	abcABC
12	30×2	10	7	33.33	23.33	abcdABCD
2	30×2	14	8	46.67	26.67	bcdeABCD
9	30×2	16	10	53.33	33.33	cdefABCDE
13	30×2	10	16	33.33	53.33	cdefABCDE
15	30×2	14	19	46.67	63.33	defgBCDEF
11	30×2	20	17	66.67	56.67	efghCDEF
5	30×2	24	16	80.00	53.33	fghDEF
16	30×2	21	27	73.33	90.00	ghEF
6	30×2	28	22	93.33	73.33	hF
1	30×2	30	30	100.00	100.00	iG

表 3 正交设计方差分析 (随机区组模型)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
区组	79.420 0	1	79.420 0		
5%次氯酸钠	255.508 0	3	85.169 3	1.495 7	0.256 1
70%乙醇	2 564.969 0	3	854.989 5	15.014 6	0.000 1
0.1%升汞	8 979.393 0	3	2 993.131 0	52.562 7	0.000 1
第 4 列	359.303 5	3	119.767 8	2.103 3	0.142 7
第 5 列	171.031 6	3	57.010 5	1.001 2	0.419 4
误差	854.160 6	15	56.944 0		
总和	13 263.780 0				

汞的各水平间有极显著差异,升汞的作用大于乙醇;第 4 列和第 5 列的效果不显著,这也证明了 3 因素间不存在互作,所以只考虑主效应。

②试验处理因子各水平间差异显著性检验结果 (Duncan 多重比较) 70%乙醇在 3,4,2 水平上的效果好,它们与 1 水平都存在显著差异,彼此之间无显著差异;升汞在 3,4 水平上与 2,1 水平存在极显著差异,3,4 水平间无显著差异,2,1 水平间存在极显著差异;因为不存在交互作用,次氯酸钠任何水平都可以,所以较好的脱菌组合应该是 70%乙醇的 3,4,2 水平,0.1%升汞的 3,4 水平,次氯酸钠的任意水平的组合。

③各个处理间差异显著性检验 (Duncan 多重比较) 由 Duncan 多重比较可知(表 4),8,7,3,14,

4,10,12 处理效果均显著好于其余各处理,它们之间无显著差异;1 处理因为各因素的处理时间都是零,所以它的效果最差。试验的最佳处理与②推论的最佳处理组合结果是比较相符的。

综上所述,8,7,3,14,4,10,12 处理都为最佳的脱菌组合,其各消毒剂的作用时间都比较长,由于消毒剂在对生姜组织表面消毒的同时,会对其表面组织的活性细胞造成损伤,本试验在考虑消毒时间、消毒效率、还有消毒剂对组织块细胞的杀伤力等各因素的同时,得出最佳处理组合:5%次氯酸钠的水平选 1,70%乙醇选 2,升汞选 3,即本试验最终选择了 5%次氯酸钠 (NaClO)、70%乙醇 (C₂H₅OH) 和 0.1%升汞 (HgCl₂) 的消毒时间组合为 0 min,0.5 min 和 15 min。

2.2 病菌检测

从培养皿上菌落生长的情况可以得出:莱芜片姜的脱毒效果最好,愈伤组织对应的培养基上没有任何菌落长出,而未脱菌的姜芽对应的培养基上长出了不同颜色和形态的菌落,可以初步确定其具有很多种类的菌;黄苗生姜的脱菌效果不太理想,并未脱干净,从黄苗生姜愈伤组织对应培养基上菌落的颜色和形态看,其属于一种菌(从菌落外观的形状和分布来看,未经过检测),但就总体而言,其脱菌的比未脱菌的含菌量要低。另外,在试验结果中还发现,未脱菌的黄苗生姜培养皿上还长出黄腐病菌落^[1],而经过脱菌的愈伤组织则无一感染黄腐病菌落,试验基本达到预期效果。

3 讨论与结论

生姜属于地下块茎植物,长期以来以地下块茎进行无性繁殖,极易感染细菌、病毒等,所携带的细菌和真菌较多,又因为成熟块茎的纤维较粗,薄壁细胞空隙大,消毒灭菌比较困难,使用一般灭菌方法灭菌后,其污染率仍能达到90%,成熟的茎尖也达到60%。生姜的组织培养中外植体的污染率高,是生姜组培快繁技术难点之一。要想降低污染率,提高生姜茎尖诱导率、成活率,就有必要对生姜茎尖采用复合因子消毒灭菌处理。

在此,我们选用姜块来进行3步复合消毒法脱菌试验,结果表明,5%次氯酸钠(NaClO)的作用不显著,70%乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)各水平间的差异显著,0.1%升汞(HgCl_2)各水平间的差异显著,两两之间交互不显著,又考虑时间因素和试验效率、还有消毒剂对组织块细胞的杀伤力等各因素,最佳处理应为0 min 5%次氯酸钠(NaClO)、0.5 min 70%乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)和15 min 0.1%升汞(HgCl_2)的组合。关于生姜的脱菌试验,资料记载还可以根据生姜的不同基因型选择一定的抗生素,例如:链霉素和卡那霉素等。在培养基中添加一定浓度的抗生素,也可以达到脱菌的作用,这一方面有待于进一步试验和研究。

参考文献

- [1] 冯英,薛庆中.生姜脱菌快繁研究进展[J].植物学通报, 2002, 19(4): 439-443.
- [2] 王教义,范国强,张平.姜脱毒组培技术研究[J].山东农业科学, 1999(6): 7-9.
- [3] 高山林,卞云云,陈柏君.生姜组织培养脱毒、快繁和高产栽培[J].中国蔬菜, 1999(3): 40-41.
- [4] 郭启高,宋明,梁国鲁.生姜脱菌及离体快繁研究[J].西南农业大学学报, 1999, 21(2): 137-139.
- [5] Mariska-S I, Hobir, Syahid S F. Ginger planting material production through tissue culture[J]. Journal Penelitian dan Pengembangan pertanian(Indonesia), 1998, 17(1): 9-13.

Study on Sterilization Trial of Tissue Culture in Ginger

XUE Hanqing, WANG Jian

(Qinghai Biology Institute of Academy of Agriculture and Forest Science, Xining 810016)

Abstract: Explant of ginger has high polluting rate in tissue culture, which is the keystone for the tissue culture. Multiple factor experiments for stem apex of ginger were made in order to reduce the polluting rate, to increase induction rate of adventitious bud and survival ratio of stem apex of ginger. Three steps of complex sterilization in the experiment were used, the results showed that the combination of 0 min 5% NaClO , 0.5 min 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ and 15 min 0.1% HgCl_2 was the best.

Key words: Ginger; Tissue culture; Sterilization