生姜组织培养快繁技术研究与应用

杭 玲, 黄卓忠, 江 文, 苏国秀

(广西农业科学院生物技术研究所, 广西南宁 530007)

摘要: 以生姜茎尖为外植体, 接种在以 MS 为基本培养基、外加不同激素浓度配比的 4 种培养基上进行分化新梢和幼芽继代增殖培养。结果以 3 号培养基上芽的分化率和增殖率最高, 分化率为 100%, 增殖率为 405%。生根培养基以 2 号培养基最好, 幼苗植株生根率达 100%, 且根多、粗壮, 叶色浓绿, 移栽至熟土 + 腐熟有机农家肥(2:1)的营养杯中, 成活率达 95% 以上。生姜脱毒苗经在大田试种繁殖均表现植株生长旺盛, 叶色浓绿, 茎秆粗壮, 无变异植株和病毒病植株, 遗传性状稳定; 抗姜瘟性能好; 组培苗比本地生姜增产约 10%, 第一代原种于第二年种植, 比普通姜增产 30% 左右。

关键词: 生姜; 组织培养; 快繁脱毒

中图分类号: S632.504⁺.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)05-0125-03

生姜 (*Zingiber officinale* Rose) 属姜科姜属多年

收稿日期: 2006-02-15

基金项目: 广西科技三项项目(编号: 桂科攻 0235017-2)。

作者简介: 杭 玲(1953—), 女, 广西南宁人, 副研究员, 主要从事植物组织培养应用研究工作。Tel: (0771) 3246907; E-mail: youhanging@163.com。

(上接第 124 页)

生草本植物, 也是一年生蔬菜作物。生姜营养丰富, 且具有药用价值^[1-2], 需求量很大。生姜是一种重要的调味品并具有独特风味, 可以加工成多种食品, 在市面上深受欢迎。生姜还具有耐贮藏、适应性强、易种植、产量高、成本低、经济效益好的特点。近年来姜的出口贸易额大增, 市场非常好, 种植面积也逐

目也得以增加。冰水冷处理不用其他药物, 比较安全, 但所需时间过长。8-羟基喹啉处理会引起细胞质黏度的改变, 导致纺锤体活动受阻, 但并不影响分裂前期细胞的正常分裂, 使细胞分裂停在中期, 从而可获得较多中期分裂相。这两种处理方法都可使染色体收缩变短, 从而更易分散。其中又以 8-羟基喹啉处理黄芩离体根尖使染色体收缩程度更深, 且随时间延长而加深。故此种方法处理的细胞染色体分散性较好, 而冰水冷处理者则分散性较差。另外, 8-羟基喹啉处理所得染色体缢痕区比较清晰。

(0~1 h) 压片细胞易分散, 细胞的分散程度随解离后时间的延长而变差。另外, 实验对酸解法和酶解法进行了比较, 发现酶解后染色体较难染色, 需用蒸馏水漂洗 5~10 min, 才可以较好地染色。酸解后再酶解, 细胞背景较清晰, 染色体分散性无明显差异, 仅用酸解即可获得良好的解离效果。

材料预处理起始时间对染色体中期分裂相多少有影响。细胞有丝分裂中期分裂相的多少是随时间的变化而改变的, 一般中期持续时间约 10~30 min^[8], 故以 30 min 为时间间隔取样进行观察, 从而确定中期分裂相所处高峰期分别为 8:30、12:00 和 16:00, 此时间段中细胞中期分裂相较多, 分散性好, 着丝点清晰, 最适于做核型研究。

在黄芩染色体制片过程中, 采用了酸解法对黄芩根尖进行解离, 经多次实验证明, 采用 0.2 mol/L 盐酸解离 12 min 为最佳, 且解离后根尖在短时间内

参考文献:

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 211.
- [2] 张 虹, 罗 鹏. 四川几种常见五味子的核型研究[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 177-180.
- [3] 杨九艳. 桔梗的染色体核型分析[J]. 内蒙古医学院学报, 1998, 20(3): 185-186.
- [4] 张贵友. 普通遗传学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003.
- [5] 陈瑞阳. 中国主要经济植物基因组染色体图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 561.
- [6] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 201-220.
- [7] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London: Edward Arnold Ltd, 1971: 85.
- [8] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302.

年扩大。但是生产上生姜长期以来是以地下块茎进行无性繁殖,不仅繁殖系数低,并且易通过带病的种姜传播病害,例如姜青枯腐烂病(姜瘟)、猝倒病(根腐病),目前尚无理想的杀菌药剂和抗病品种,因此造成了生姜优良种性退化,品质变劣,药用成分含量不稳定,产量降低,严重的可造成30%~50%的减产^[3]。近几年来利用组织培养技术进行生姜脱毒繁殖已有不少报道,用生姜茎尖分生组织培养可减少甚至免除姜瘟病和茎腐病危害^[4]。我们于2002年以靖西大肉姜品种为材料,进行茎尖离体培养繁殖脱毒组培苗,并对组培苗移栽、大田生产试种等进行试验,获得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为广西靖西县本地大肉姜品种。在生姜发芽期鳞片发生阶段芽长3~5 cm时,取细嫩芽尖为外植体进行组织培养。材料用自来水冲洗20~30 min,晾干约5~6 h,用70%酒精擦拭消毒生姜的表皮,切取1 cm左右长的茎尖经0.1% HCl消毒10~12 min,无菌水冲洗3~4次,再切取0.15~0.1 cm的茎尖分别接到4种培养基上诱导芽分化。

1.2 培养基

以MS为基本培养基,附加不同浓度激素作为芽分化培养基和幼芽增殖培养基。1~8号培养基激素配比依次为:BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、KT 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、NAA 0.5 mg/L、NAA 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L、IBA 1.0 mg/L。1~4号为芽分化培养基,5~8号为生根培养基。琼脂3.5 mg/L,白砂糖30 g/L,pH值5.8~6.0。

1.3 培养条件与移栽

接种后,材料放在1 000 lx光照强度下培养,温度25~28℃,湿度70%~80%左右。幼苗移栽基质为园地熟土:有机农家肥=2:1。于当年10月初将生姜营养杯苗移栽到大田种植,采取大田姜种植特殊管理方法进行栽培管理。

2 结果与分析

2.1 培养基不同激素和浓度对生姜分化及增殖的影响

生姜茎尖在培养基上培养30~35 d后,部分不

断膨大和伸长形成新芽,小部分则形成淡黄色或白色致密愈伤组织。50 d后大部分分化成新芽,其新芽分化数目在不同培养基上差别较大。由表1可见,在4种培养基上外植体平均分化新芽为1.50~4.05个。3号培养基芽分化效果最好,分化率达100%,培养50 d后总苗数为81株,增殖倍数4.05倍。其次是2号培养基,芽分化率为75%,幼芽增殖倍数为2.35倍。1号培养基的幼芽分化度最低,只有60%,有40%的茎尖褐化并逐渐死亡,幼芽增殖倍数只有1.5倍,而且部分幼芽还有不少新根分化,根粗且长,占总分化苗的50%,增殖率很低。在4号培养基中用KT代替6-BA,幼芽分化率和增殖倍数都比2号和3号培养基低,苗也比较细弱,不够粗壮,部分芽慢慢褐化、死亡。

表1 培养基不同激素浓度对比对生姜幼芽分化和增殖的影响

培养基号	激素配比 (mg/L)	接种数 (芽)	分化数 (株)	分化率 (%)	总苗数 (株)	增殖倍数
1	BA 1.0 + NAA 0.1	20	12	60	30	1.5
2	BA 2.0 + NAA 0.1	20	17	75	47	2.35
3	BA 3.0 + NAA 0.1	20	20	100	81	4.05
4	KT 2.0 + NAA 0.1	20	14	70	38	1.9

2.2 培养基不同激素与浓度对比对姜芽生根诱导的影响

从表2中可以看到,单独或者混合使用不同浓度生长素对生姜诱导生根和根长有比较大的影响。在6、7、8号3种生根试验培养基中,幼苗均能产生白根,以7号培养基中的平均生根数最多,达4.8条根,且每条根都有须根,平均根长4.5 cm,根系粗短,移栽后植株成活率在95%以上。其次是6号和8号培养基,分别单独使用NAA和IBA,两者效果差不多,生根数比7号培养基少,而6号培养基的根系比较长,对幼苗移栽不利。8号培养基上的根系短,且较细,苗不够粗壮。把NAA和IBA按一定比例混合使用有利于生姜组培苗的生根和移栽。

表2 培养基不同生长素及浓度对比对生姜芽生根的影响

培养基号	生长素 (mg/L)	接种数 (株)	生根总数	平均生根数 (条/株)	平均根长 (cm)	根长势
5	NAA 0.5	35	87.5	2.5	5.2	根少,细长,须根少
6	NAA 1.0	35	112.0	3.2	6.7	根细长
7	NAA 0.5 + IBA 0.5	35	168.0	4.8	4.5	根粗,须根多
8	IBA 1.0	35	108.5	3.1	3.5	根细,白

2.3 幼苗移栽

生姜幼苗在瓶内生根后,在自然光照和温度28

~30℃的条件下炼苗25d左右,当苗高7~10cm、有4~5条白色长根时,从瓶内取出洗净培养基,然后移栽至大棚盛有熟土+腐熟有机肥(2:1)的营养杯种植。此时棚内温度保持在25~30℃,相对湿度80%,棚顶覆盖遮阳网。2周后移栽幼苗基本成活,有的植株基部有小芽长出,1个月后,植株高达10~15cm,揭开棚顶遮阳网炼苗1周,然后直接进行大田定植。

2.4 生姜组培苗的大田栽培

2.4.1 大田准备和移栽 选择平坦、肥沃的土地,要求土壤湿润,不积水,开好排水沟。田块经两犁两耙后平整土地,然后按东西向挖深沟,沟深30cm,沟底宽30cm,畦高60cm,沟与沟之间约30cm。挖好沟后先在沟内覆一层熟土约10cm,将农家肥与复合肥混合放在熟土上面,再覆上一层熟土,然后把生姜组培苗去掉营养袋种入沟内。株距20~25cm,密度6000~7000株/667m²。种好后浇定根水。基肥施农家肥2500kg/667m²,复合肥50kg/667m²、两者混合施入沟底。

2.4.2 田间管理 组培苗种植后1周开始长出新根,视墒情适当浇水。第一次追腐熟粪水500~750kg/667m²,或尿素4~5kg/667m²、对水250kg/667m²。6~7月份生姜组培苗苗高30cm、有1~2个分枝时施第一次壮苗肥(复合肥75kg/667m²)。8月份植株进入生长旺盛期,植株生长速度加快,生长量大,追施长效完全肥,混适量速效肥(花生麸肥75kg/667m²,复合肥10kg/667m²),偏重施磷、钾肥,可以促进根茎肥大,减少病害。生姜喜湿润,忌水。在生姜组培苗定植约20d后结合松土除草培土。生姜苗封行后不宜中耕。11~12月份为生姜的收获期,选择晴天收获生姜,收获后的生姜放在屋内阴凉处晾干,然后贮藏,作为第二原种备用,或上市销售。

2.5 组培生姜的农艺性状及产量表现

组培生姜苗在大田生长表现植株旺盛,叶色浓绿,营养生长健壮,地上茎比普通姜苗粗壮,平均单株分枝增多2~5个,叶面积系数增加0.3~1.0。姜瘟和姜猝倒病田间发病率比普通姜低,适应性和抗逆性强,较耐高温。生姜组培苗当年种植当年收获,平均产量约2900kg/667m²,比普通姜增产10%。第二年用组培生姜原种植,平均产量可达4200kg/667m²,比普通姜增产约30%。组培姜单

重增大,均匀整齐,皮色光亮,色泽鲜黄,质量好,辣味浓,商品性好,市场销路好。

3 讨论

从生姜幼芽的分化培养基试验结果可以看出,在相同的NAA浓度条件下,添加其他激素浓度不同,幼芽的分化结果也相差很大。当添加BA浓度为3mg/L时,新芽分化率和幼芽增殖倍数最高,而且没有幼根长出,幼芽较多且粗壮。而添加BA1mg/L时,新芽分化率和幼芽增殖倍数最低,且伴有很多根出现,根系长而且须根少,幼苗细高,对幼芽增殖是极不利的。在培养基试验中使用KT取代BA,其新芽的分化率和增殖倍数都不如BA效果好。合理浓度的BA比较适合姜的新芽分化和幼芽增殖。

生姜组培比较容易长根,单独使用NAA和IBA都可以促进生姜组培苗生根。单独使用NAA根系比较长,但平均根数少。而NAA与IBA配合使用,平均生根率比单用高,根较粗短,根毛多,苗色深绿,健壮,对幼苗移栽非常有利,移栽成活率也较高。

生姜脱毒苗经过大田生产试验结果表明,经过组织培养方法培养的生姜具有脱毒率高和繁殖率高的优点,在大田种植,后代植株农艺性状及形态与普通姜没有明显的差异,遗传性状稳定,连续种两年没有变异植株产生,同时还表现了适应性强、抗姜瘟病、高产、品质好和商品率高的优点。实践证明,利用组织培养技术对姜的提纯复壮、改良和种性提高有明显作用,同时生姜组培快繁技术可应用于工厂化生产大量脱毒生姜种苗,对产业化示范具有非常重要的现实意义。但是,在生产上要大面积应用生姜脱毒组培苗还存在一定的问题,因为组培苗的生产成本过高,在生产上直接利用成本也高,必须将其种植成原种姜再在生产上利用才能降低成本,这方面需作进一步的研究与探索。

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]赵德婉,徐坤,艾然珍. 生姜高产栽培[M]. 北京:金盾出版社,2000:12-25.
- [3]高山林,卞云云,陈伯君. 生姜组织培养脱病毒、快繁和高产栽培[J]. 中国蔬菜,1999(3):40-41.
- [4]林碧英,魏郑珍,陈燕华. 生姜茎尖组织培养和快速繁殖研究[J]. 亚热带植物科学,2002,31(4):13-16.