

生姜脱毒和组培快繁技术的优化及应用推广研究

田 晖

(杭州职业技术学院,杭州 310002)

摘要:以经过热处理的生姜不定芽为外植体。研究表明,0.1%升汞灭菌8 min,以MS + 6-BA 1.5mg/L + NAA 0.1mg/L为茎尖诱导分化培养基,成活率76%,以MS + 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.2mg/L为生姜最适继代培养基,增殖倍数为4.7倍,生根培养基MS + NAA 0.2mg/L中,生根率100%,相应蛭石 + 泥炭基质中,移栽成活率在95%以上。

关键词:生姜 组培 推广

生姜属姜科姜属多年生宿根植物,营养丰富,是药、食、加工等多用途经济作物,是我国重要的外贸产品。生产上生姜只能靠少数品种长期无性繁殖,易感染多种病毒,使姜体内积累多种病毒,从而导致生姜产量下降、品质降低,种性退化,一般减产30% - 50%,严重制约了生姜的生产发展。国内外目前尚无高抗病病的生姜品种和高效杀病毒药剂,因此采用茎尖组织培养脱毒生姜苗,成为防治病毒,提高生姜产量和品质的首选方法。

本研究旨在通过热处理和茎尖培养相结合的方法,以优质姜种为材料,通过热处理法催芽、表面消毒、茎尖分生组织剥离、无菌苗诱导培养(基本培养基为MS附加不同比例的激素)、增殖诱导培养、生根诱导等一系列实验操作及培养基配方优化,并在每个不同的培养阶段进行检测,建立脱毒良种繁育体系的工艺流程,有效去除引起生姜种性退化的烟草花叶病毒(TMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)两种主要病毒。该项研究为脱毒姜种的快速繁殖提供了技术保障,为生产应用提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料与方法

供试品种为浙江台州地区生产的大姜。3-4月从大田选取表面光泽好、健壮的种姜沙藏在38℃恒温培养箱进行热处理4周,使病毒钝化失活,同时可诱导出不定芽,待长出2-5cm左右的芽后再进行茎尖脱毒。将长出新芽切下,用流水冲洗干净,置超净工作台上,用75%酒精处理30秒,再用0.1%升汞消毒数分钟,无菌水冲洗6-8次后,在40倍体式显微镜下剥取0.2-0.3毫米茎尖分生组织,接种于诱导培养基上。待成苗后应用血清学鉴定,获得脱毒苗。

1.2 培养条件

总结前人工作经验,基本培养基为MS,诱导与分化培养基:MS + 6-BA 1.5mg/L + NAA 0.1mg/L;继代增殖培养基:(1)MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L,(2)MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L,(3)MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L,(4)MS + 6-BA 3.0 mg/L

+ NAA 0.05 mg/L处理号依次为处理1~4;生根培养基:MS + NAA 0.2mg/L。所配制的培养基中,蔗糖浓度为3%,琼脂为0.7%,pH值为5.8。培养温度24-26℃,光照度3000-4000Lux,光照时间每天8-10小时。

1.3 驯化及移栽

待培养瓶里的生姜苗具有3~4片叶,5~6条根,根长至2-4cm时即可移栽。第1d在培养室里打开瓶盖(即半开半盖),第2d把瓶盖揭掉,并在培养瓶中放入少许水,以防止组培苗的失水及培养基的污染,第3d移出培养室,放在室温中,以逐渐适应室外温度。移栽前应洗净附着在组培苗根部的培养基,以免招致细菌繁殖,导致组培苗感染腐烂死亡,冲洗时谨防伤根,以确保移植成活。以蛭石 + 泥炭为移栽基质,移栽后每天喷雾保湿,栽后3d棚内相对湿度保持在85%~90%,1个月后就即可考查移栽成活率。田间肥水管理与普通生姜相同,11月可收获姜种。

1.4 脱毒检测

对茎尖-热处理方法脱毒的生姜种苗不同培养阶段,选择ELISA方法进行针对性的检测烟草花叶病毒(TMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)两种主要病毒。即把切取的生姜芽洗净后先经过高温热处理,杀死部分病毒,然后在无菌条件下对经过处理的材料在解剖镜下解剖。切取分生组织尖端0.2-0.3mm生长点,迅速接种到分化培养基中,不久即产生丛生芽及绿苗,再将绿苗接种到生根培养基上进行生根培养,20d后待根长2-5cm时即可炼苗移栽,成活率可达95%以上。此脱毒苗可提供良种繁殖基地繁殖出大量的脱毒原种苗。^[1]

2 结果与讨论

2.1 消毒方法的筛选

在对生姜外植体消毒时,设置了3种消毒时间,目的是为了能准确的确定出外植体的最佳消毒时间。7天后,统计不同消毒时间对生姜外植体存活率的影响(见表1)。经过3天、5天、7天的污染颗粒观察,发现在实验中经过5min消毒的外植体污染率最高,这表明消毒时间不够长;经过8min消毒后成活的外植体存活

率最高,这表明此方式消毒时间适宜;经过 10min 消毒后,发现有部分外植体死亡,这表明此方式消毒时间过

长。从以上消毒方式的结果来看,对生姜外植体应该选用消毒时间为 8min。

表 1 生姜外植体在不同消毒时间里的存活情况

消毒时间(min)	消毒颗粒	3天后污染颗粒	5天后污染颗粒	7天后污染颗粒	存活率(%)
5	15	1	3	3	38
8	15	0	1	2	75
10	15	1	2	2	56

2.2 继代培养基配方筛选

表 2 试验结果可以看出,经过 25 天一个继代周期,在加 6-BA 的 4 个继代培养基配方处理中,处理 1 增殖倍数仅限 1.4 倍,处理 2 为 2.6 倍,处理 3 为 4.7 倍,处理 4 为 3.9 倍。从增殖梯度上,明显可以看出处理 3 的增殖率最高,处理 4,处理 2 次之,即在 MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA 均能诱导产生丛芽,并以 MS +

6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L 培养基配方处理(处理 3)的效果较好。在 6-BA 2.0 mg/L 以下,增殖率随着 6-BA 的增加而趋于上升,当 6-BA 高于 2.0 mg/L 以上,则增殖率又趋于下降。试验说明,6-BA 的用量并非越高增殖率就越高。同时,在培养中过程发现,生姜的根系极为发达,无论是初代还是继代培养均会出现细根,有利于生根培养。

表 2 继代培养基的培养增殖率分析

处理	基本培养基	6-BA mg/L	总植数	增殖率
1	MS + NAA0.05	0.5	20	1.4
2	MS + NAA0.05	1.0	20	2.6
3	MS + NAA0.05	2.0	20	4.7
4	MS + NAA0.05	3.0	20	3.9

2.3 生根及移栽

切取继代培养基中的增殖芽,分别将高度小于 3cm 的芽,接种至继代增殖培养基中继续壮苗增殖培养,高度大于 3cm、生长正常的单芽,转接至生根培养基中,生根率达 100%,经炼苗后,以新鲜配制蛭石 + 泥炭为基质,瓶苗移栽成活率高达 95% 以上。

2.4 脱毒检测

茎尖培养脱毒法脱毒率高,脱毒速度快,能在较短的时间内得到较多的原种繁殖材料,但这种方法存在的缺点是植物的存活率低。为了克服这一缺点,在前

人工作基础上,本试验是将热处理与茎尖培养相结合来使用。热处理与茎尖培养相结合之所以能够提高脱毒效果,是由于热处理可使植物生长本身所具有的顶端免疫区得以扩大(一般为 0.2mm),有利于切取较大的茎尖(在 1mm 左右),从而能够提高培养或嫁接成活率。董雅风等在梨树苹果茎沟病毒的脱毒技术研究中发现,梨茎尖培养比较困难,且脱毒效果差,成活率仅为 28%。热处理后进行茎尖培养,成活率和脱毒率比单纯茎尖培养平均增加 11.7% 和 54.3%。

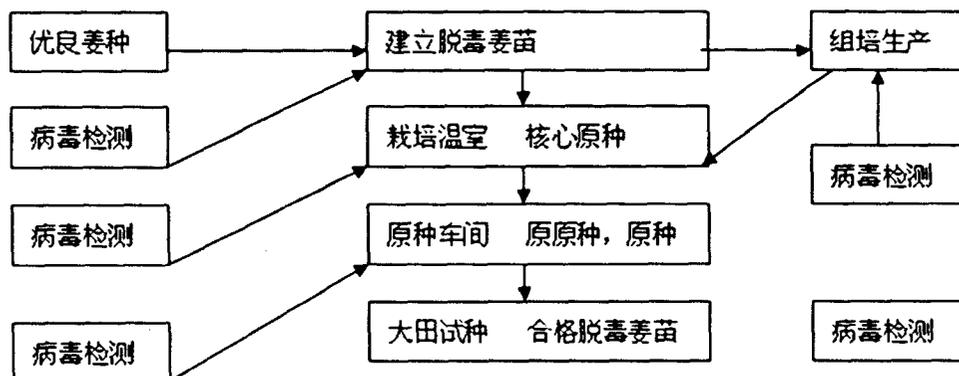


图 1 生姜脱毒良种繁育体系工艺流程

图1为建立脱毒良种繁育体系的工艺流程,也就是脱毒技术在生产中的应用途径。从图上可知,虽然脱毒技术是整个工艺中的核心技术,但其它的辅助过程仍然是脱毒种苗产业化所必须的。特别是核心原种、原原种及商品脱毒苗的繁殖对防虫网的标准、土壤消毒处理和隔离措施都有严格的要求。特定植物的脱毒技术研究成熟以后,在实现工厂化育苗过程中还包括4个额外技术环节:无菌条件下脱毒苗的快繁;组培苗的移栽驯化;种苗的避毒繁殖;种苗质量检测等等。成熟的快繁技术经无菌快繁增殖、生根等工序,获得健壮的瓶苗。移栽驯化和避毒繁殖同样是实现优质脱毒商品种苗的关键。其中考虑的主要因素是保证瓶苗移栽及田间繁殖过程中的避毒条件和通过高效的移栽成活率以降低原种苗成本。避毒条件的实现包括标准防虫网的应用和有效的土壤消毒;高效的移栽成活率的关键因素主要是适度空气湿度和合理的基质配比。脱毒商品苗的质量检测主要包括商品性状、遗传稳定性等等,同时这也是保护种植者和种苗定价的重要依据,在发达国家已经建立了完善的种苗上市前的检测制度

和检测标准,但我国在这方面还不完善。

3 小结

对生姜茎尖-热处理脱毒培养,在培养基中添加适当浓度的细胞分裂素6-BA,能快速诱导丛生芽的产生。通过芽的继代繁殖,可得到大量的无菌组培苗。组培苗田间移栽成活率达95%。生姜茎尖组织培养不仅能快速繁殖幼苗,节省种姜成本,而且可通过生姜茎尖生长点的脱毒接种培养,培育健康的优良种苗,其径粗,苗壮,叶色浓绿,移栽成活率高,适用于试管苗的工厂化生产,为脱毒姜大规模生产提供优质的种苗。

参考文献

- [1]浙江大学,蔬菜栽培学各论[M],北京:中国农业出版社1985.
- [2]葛胜娟,平培元,徐美玲等,不同苗质及移栽条件对新丰生姜组培苗成活率的影响[J],中国农学通报,2003,(4):54—56.
- [3]徐刚,生姜脱毒苗的高产栽培技术[J],浙江农业科学,2002,(3):151.

TIAN Hui

(Hangzhou Vocational and Technical College, Hangzhou, 310002)

Abstract: Using the axilla bud of Moziebuster as explant, destroyed the bacterium with 0.1% Hg, the inducement of 1/2MS is 58.3%, in the multiplication substrate of MS + BA0.2 + NAA0.05, the multiple is 10.04, in the rhizogenesis substrate of 1/2MS + IBA0.05 (liquid), the rhizogenesis is 100%, in vermiculite & turf, the survive rate of transplant is above 95%.

Keywords: