

生姜芽的组培快繁

戴水莲, 谢绍辉, 李涛 (怀化职业技术学院, 湖南怀化 418000)

摘要 [目的]寻找生姜芽组培快繁的最佳方案。[方法]以MS为基础培养基,设计生姜芽组培快繁的两条途径,选择生姜芽组培快繁的最佳培养基配方。[结果]结果表明,茎尖 $\rightarrow$ 芽最适培养基为:改良MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;茎尖 $\rightarrow$ 愈伤组织 $\rightarrow$ 芽,茎尖诱导愈伤组织的最适培养基为:改良MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L,愈伤组织诱导芽分化的最适培养基为:改良MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。采用超净工作台上用75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L青霉素与台外消毒相结合对外植体进行表面消毒,去污效果最佳。[结论]对愈伤组织进行切割并继代培养后再诱导芽分化,可获得较大的增殖倍数。

关键词 生姜; 组织培养; 愈伤组织; 表面消毒

中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)28-12112-02

Tissue Culture Propagation on Bud of Ginger

DAI Shui-lian et al (Huaihua Vocational and Technical College, Huaihua, Hunan 418000)

Abstract [Objective] The study was to search the optimal scheme of tissue culture propagation on bud of ginger. [Method] With MS as basic medium, two approaches of propagation were designed in culture experiment to choose the optimal mediums of tissue culture propagation on bud of ginger. [Result] The results indicated that the optimal mediums was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L of stem tip $\rightarrow$ bud, MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L for bud callus induction and MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L for callus induce buds of stem tip $\rightarrow$ callus $\rightarrow$ bud, respectively. The decontamination effect was best through the surface disinfection on explant by combination of 75.0% alcohol 30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L penicillin and out-table disinfection on super-clean worktable. [Conclusion] The big multiplication multiple will be obtained by induction bud differentiation after cutting callus and then subculture.

Key words Ginger; Tissue culture; Callus; Surface disinfection

生姜是我国的种植面积日益增大,形成了规模化、产业化格局。生姜栽培中采用姜块作种需种姜4 500~7 500 kg/hm²,随着植物组培技术的不断推广,采用生姜组培苗替代姜块作种已成为一大趋势^[1],这将大大节省种姜用量,提高生姜的产量和质量,获得更好的经济效益^[2]。因此,笔者进行了生姜芽的组培快繁试验。以改良MS为基础培养基,设计两种途径:1. 茎尖 $\xrightarrow{6-BA}$ 芽,选出最佳配方;2. 茎尖 $\xrightarrow{2,4-D}$ 愈伤组织 $\xrightarrow{6-BA}$ 芽,选出最佳配方。在接种外植体的过程中,污染率太大是一个严重的问题,对此,设计6种不同的消毒方案,寻找最好的消毒方法。

1 材料与方法

1.1 材料 精选块大、肉厚、皮色黄亮和无病虫害的健壮姜块,在自来水下洗掉泥巴。再用少量洗衣粉浸泡10 min,用毛笔轻轻刷洗种姜表面,用自来水冲洗2 h,沥干水分。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒。在配药室内用解剖刀截取0.5~1.0 cm长的带茎尖的姜块,按照6种不同的消毒方案处理,作为外植体。6种消毒处理分别为:①75.0%酒精30 s+0.1% HgCl₂ 10 min;②75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min;③75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L青霉素30 min;④75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L青霉素60 min;⑤先在超净工作台外消毒,然后在超净工作台上消毒,75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min和75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L青霉素30 min;⑥先在超净工作台外消毒,然后在超净工作台上消毒,75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+

0.1% HgCl₂ 10 min和75.0%酒精30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L青霉素60 min。

1.2.2 茎尖 $\rightarrow$ 芽。在无菌条件下,将消毒好的外植体接种到不同配方的改良MS培养基上,3个/瓶。设置8个处理(BA 1.0为BA 1.0 mg/L, NAA 0.1为NAA 0.1 mg/L,下同),分别为:①BA 1.0;②BA 2.0;③BA 3.0;④BA 4.0;⑤BA 1.0+NAA 0.1;⑥BA 2.0+NAA 0.1;⑦BA 3.0+NAA 0.1;⑧BA 4.0+NAA 0.1。置于光照培养箱中培养,温度22℃,光照时间12 h/d,光照强度2 000 lx。定期观察记录试验现象。

1.2.3 茎尖 $\rightarrow$ 愈伤组织 $\rightarrow$ 芽。

1.2.3.1 茎尖 $\rightarrow$ 愈伤组织。按照1.2.2中的方法将外植体接种到不同配方的改良MS培养基中,3个/瓶。设置5种对比,其配方分别为:①2,4-D 2.0;②2,4-D 3.0;③2,4-D 1.0+KT 1.0;④2,4-D 2.0+KT 1.0;⑤2,4-D 3.0+KT 1.0^[3]。置于光照培养箱中培养,温度22℃,暗培养。定期观察记录试验现象。

1.2.3.2 愈伤组织 $\rightarrow$ 芽。待1.2.3.1中的愈伤组织长到2 cm时,将愈伤组织接种到4种不同配方的改良MS再分化培养基中,分别为:①6-BA 2.0+NAA 0.1;②6-BA 1.5+NAA 0.1;③6-BA 1.0+NAA 0.1;④6-BA 2.0+NAA 0.5^[4]。接种1块/瓶,置于光照培养箱中培养,温度22℃,光照时间12 h/d,光照强度2 000 lx。定期观察记录试验现象。

2 结果与分析

2.1 消毒处理对污染率的影响 按照1.2.1的消毒处理,22℃下,20 d后,统计试验结果。

由表1可知,在处理①中,污染率最高,达91.7%,其中,杂菌大多是毛霉,也有青霉和细菌,且污染时间早。其次是处理②,污染率达66.7%。其余处理污染率都低于50%,处理⑤和⑥,是经过两次消毒,先在超净工作台外消毒,然后在超净工作台上消毒,致使污染率非常低,都在10%以下。

2.2 茎尖 $\xrightarrow{6-BA}$ 芽的试验结果 待1.2.2处理45 d后,统计试

作者简介 戴水莲(1971-),女,湖南辰溪人,在读硕士,讲师,从事生物学的教学与研究。

收稿日期 2008-09-22

验结果(表 2)。

表 1 不同表面消毒处理对污染率的影响

Table 1 Effects of different surface disinfection treatments on the pollution rate

序号 Serial number	接种数//个 Inoculated number	污染数//个 Polluted number	污染率//% Pollution rate
①	12	11	91.7
②	12	8	66.7
③	12	5	41.7
④	12	3	25.0
⑤	12	1	8.3
⑥	12	0	0

表 2 不同配方对生姜芽分化及增殖的影响

Table 2 Effects of different formula on the bud differentiation and proliferation of ginger

处理 Treatment	外植体数 Explant number 个	芽分化数 Differentiated bud number 株	分化率 Differentiation rate// %	总苗数 Total seedling number//株	增殖倍数 Proliferation multiple
①	24	4	16.7	9	0.38
②	24	6	25.0	20	0.83
③	24	12	50.0	32	1.33
④	24	10	41.7	29	1.21
⑤	24	14	58.3	38	1.58
⑥	24	18	75.0	54	2.25
⑦	24	24	100	96	4.00
⑧	24	16	66.7	48	2.00

生姜茎尖培养 28 d 后,部分外植体上有新芽长出,45 d 后大部分有新芽分化出来。由表 2 可知,共接种 192 个茎尖外植体,分化出芽的外植体数为 104 个,占总数的 54.2%,未分化的茎尖有的呈原样,无明显变化,有的虽稍微膨大,却不见芽分化出来。其中,处理⑦培养基芽分化率和增殖倍数最高,分别为 100%和 4.00,且芽生长健壮;其次是⑥号培养基,①号培养基最差。⑤、⑥、⑦和⑧号培养基上的芽,伴有少量生根现象。

2.3 茎尖^{2,4-D}→愈伤组织^{6-BA}→芽的试验结果

2.3.1 茎尖→愈伤组织培养 42 d 后的试验结果。

表 3 不同处理对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different treatments on the callus induction

处理 Treatment	接种外植体数 Inoculated explant number//个	出愈数 Induced calli number//个	出愈率 Induced calli rate// %
①	30	11	36.7
②	32	14	43.8
③	25	14	56.0
④	39	23	59.0
⑤	42	30	71.4

由表 3 可知,在 22℃下,茎尖经过 20 d 的暗培养,5 种处理的培养基先后都能诱导愈伤组织。但处理①、②培养基上形成灰黄色或粉色的疏松愈伤组织,在随后的暗培养中,能够长大,另做了芽诱导试验,不能成芽。⑤号培养基上形成白色或淡黄色的致密愈伤组织,质量较好,再暗培养 20 d 后,多数愈伤组织块生长达 2 cm,给予光照,颜色由白色或淡

黄转绿,效果最好。其次是④号和③号,也能形成一些好的愈伤组织,但数量要少于⑤号。

2.3.2 愈伤组织→芽培养 40 d 后的试验结果。

表 4 不同配方对愈伤组织芽分化影响

Table 4 Effects of different formula on the bud differentiation of calli

处理 Treatment	接愈伤组织数 Inoculated calli number//块	成芽数 Formed bud number//个	增殖倍数 Proliferation multiple	幼芽质量 Tender bud quality
①	10	15	1.5	多单生、细弱
②	16	32	2.0	多单生、细弱
③	18	42	2.3	多丛生、长势较好
④	12	35	2.9	多丛生、健壮

将 1.2.3.1 中⑤号培养基上的愈伤组织分别接种于表 3 中的①、②、③和④号培养基上,在 22℃下,经过 30 d 的光照培养后,所有培养基上的愈伤组织都能分化出丛生芽,再在同样的条件下培养 10 d,多数芽可长至 1~2 cm 高。由表 4 可知,愈伤组织的分化率为 100%,平均每个愈伤组织分化 2.2 个芽。其中,④号培养基的效果最好,其次是③号,最差的是①号。

3 结论与讨论

(1)不同植物激素浓度对比对生姜幼芽分化以及增殖的影响。对生姜芽的组培快繁途径茎尖→芽,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,加入一定浓度的 NAA,能增大其繁殖系数,当 NAA 为 0.1 mg/L 时,添加 6-BA 浓度不同,幼芽的分化结果差异很大。

(2)不同激素组合对茎尖诱导愈伤组织再诱导芽的影响。对途径 2 茎尖→愈伤组织→芽,改良 MS+2,4-D 3.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 的效果最好,诱导出来的为白色或米黄色致密愈伤组织,且出愈率高,达 71.4%。这说明 2,4-D 能有效诱导茎尖形成愈伤组织,且在 2,4-D 中添加适当浓度的 KT 能提高愈伤组织的数量和质量。由茎尖形成 2 cm 大小的愈伤组织约需 40 d。改良 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 对愈伤组织芽分化效果最佳^[5],平均每个愈伤组织分化产生 2.9 个芽,且生长健壮。从 2 cm 大小的愈伤组织分化产生 1~2 cm 高的芽约需 40 d。但如果对愈伤组织进行切割并继代培养后再诱导芽分化,则可以获得较大的增殖倍数。

(3)生姜组培中不同表面消毒方式的应用效果。⑤、⑥号处理的污染率很低,均在 10%以下。这说明超净工作台外消毒与台上消毒相结合,台上使用 75.0%酒精 30 s+10.0% NaClO 15 min+0.1% HgCl₂ 10 min+50 ug/L 青霉素 30 或 60 min 的处理效果很好,能大大降低污染率。

参考文献

- [1] 高山林,卞云云,陈柏君.生姜组织培养脱病毒、快繁和高产栽培[J].中国蔬菜,1999(3):44-45.
- [2] 徐刚.生姜脱毒苗的高产栽培技术[J].浙江农业科学,2002(3):151.
- [1] 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.
- [3] 张玲,马林,李卫锋.生姜组织培养的快繁技术[J].山地农业生物学报,2003,22(2):173-175.
- [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.
- [5] 徐美玲,葛胜娟,费伟英,等.生姜快繁及移栽技术[J].浙江农业科学,2005(6):444-445.