

浅层液体培养在生姜脱毒苗快繁体系中的应用

罗天宽^{1,2}, 张小玲¹, 陈珍¹, 唐征¹, 刘庆¹, 祝水金²

(¹温州市农业科学研究院, 温州 325006; ²浙江大学农业与生物技术学院农学系, 浙江杭州 310029)

摘要:对浅层液体培养与固体培养在生姜脱毒苗继代、生根及移栽过程中进行了比较研究;结果表明浅层液体培养继代增殖系数、生根长度及株高均优于固体培养;根数、生根率在两种培养方式中没有明显差异;来源于浅层液体培养生根的生姜脱毒苗移栽成活率明显高于来源于固体培养基的脱毒苗;使用浅层液体培养节约化学药品成本 66.7%以上,同时减少大量用工;据此认为,浅层液体培养更适合于脱毒生姜种苗的大量繁殖。

关键词:浅层液体培养, 生姜脱毒, 快速繁殖

中图分类号:S632.5 **文献标识码:**A

Application of Shallow Liquid Culture System for the Rapid Propagation Technology of Virus-free Ginger

Luo Tiankuan^{1,2}, Zhang Xiaoling¹, Chen Zhen¹, Tang Zheng¹, Liu Qing¹, Zhu Shuijin²

(¹Wenzhou Academy Of Agricultural Science, Wenzhou 325006;

²Department of Agronomy, College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: This paper studied on the difference of a shallow liquid culture system and the solid culture system in the system of rapid propagation technology of virus-free ginger. The multiplication coefficient, the length of root and plant height in shallow liquid culture were prior to those of solid culture. As the regeneration frequency of root and the average root number of each explant were analyzed, there was no significant difference between the two systems. The survival rate of transplantation of seedlings from the shallow liquid system was much higher than that from solid culture system. Furthermore, the cost of chemicals of shallow liquid system was only less than 1/3 compared to that of solid system. Meanwhile, the load of manual work and time were reduced much more. So it was more economical and convenient. For all of the above, the shallow liquid culture system was proposed during rapid propagation process of virus-free ginger.

Key words: Shallow liquid culture, Virus-free ginger, Rapid propagation technology

生姜为姜科姜属多年生草本,也是药食两用的经济作物,具有栽培容易、产量高、经济效益好等特点。近年在全国各地发展很快,除东北地区外广有种植^[1]。在生姜生产中长期采用无性繁殖,反复重茬,致使生姜体内积累多种病菌病毒,对生姜种植构成严重的威胁。同时使生姜品质变劣、叶片皱缩、生长缓慢,减产幅度可达 30%~50%^[2];浸染生姜的主要病毒病是烟草花叶病毒 TMV 和黄瓜花叶病毒 CMV^[3],通过组培-热处理可以得到脱菌脱毒种苗,消除种姜的病菌病毒,提高生

姜的产量和品质。如何快速获得大批量的脱毒种苗,以及如何降低脱毒种苗的生产成本成为脱毒种苗大量推广的技术关键。笔者在生姜组培苗继代和生根阶段进行了浅层液体培养实验;加快了生姜脱毒苗繁殖速度,同时很大程度的降低了的生产成本。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验材料为台湾肉姜。取表面光泽好、健壮的种姜在流水下冲洗,去除表面附着的泥土后,用 2%的 KM-

基金项目:温州市科技局资助项目“生姜脱菌脱毒与无菌无毒种苗生产技术研究”(N2004A001)

第一作者简介:罗天宽,男,1976年出生,湖南张家界人,农艺师,在读硕士研究生,主要从事生物技术与育种方面的研究。通信地址:325006 浙江省温州市永庆街1号,温州农科院生物所, Tel: 0577-88413632, E-mail: wzltk@126.com。

收稿日期:2005-12-13, 修回日期:2005-12-19。

NO₂ 进行表面消毒 15min, 再放入 38℃ 恒温培养箱进行热处理, 待长出 3cm 左右的芽后, 将长出的芽切下经流水冲洗后放入广口瓶中, 用 75% 酒精浸渍 30S 后, 将酒精倒出, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10min, 无菌水洗涤 3 次。在 40 倍双目体式显微镜下剥取 0.1~0.3mm 的茎尖分生组织。并迅速接种到不同诱导培养基中诱导培养, 40 天后出芽分化。

1.2 培养条件

以 MS 为基本培养基, 蔗糖浓度 3.0%, pH 为 5.8, 分装于广口瓶, 于 121℃, 1.1kg/cm 的高温、高压消毒灭菌 15min, 冷却后备用。培养温度 25℃, 光照 2000~3000Lx, 光周期 12h 的培养室内进行培养。

1.3 培养基

以下培养基分别配置成固体和液体两种状态的培养基, 其中固体培养基加入 0.7% 的琼脂, 30ml/ 瓶; 液体培养基 10ml/ 瓶, 其它同固体培养基。

表 1 培养基

培养基编号	基本培养基	激素 (mg/L)	
		6-BA	NAA
M1	MS	2	0.2
M2	MS	6	0.2
M3	MS	4	0.2
M4	MS	1	0.2
M5	MS	—	0.5
M6	MS	—	—
M7	1/2MS	0.2	0.3

2 结果与分析

2.1 不同培养基状态对生姜继代的影响

表 2 不同培养基状态对生姜继代的影响

培养基	增殖系数	
	固体	液体
M1	2.80±0.8	2.81±1.1
M2	2.77±0.6	2.82±0.4
M3	3.83±1.0	3.87±0.9
M4	2.22±0.5	2.30±0.3
M5	0.00	0.00

注: 此表数据为第 28 天每株出芽个数(个)

从表 2 可以看出表中, 在不同激素水平的培养基中液体培养基增殖系数均略高于固体培养基; 另外生姜脱毒苗继代培养中增殖系数与 BA 浓度有着密切的

联系, 以 BA4mg/L 为最高, 低于 4mg/L 的培养基随着 BA 浓度的降低而降低, BA 为 6mg/L 时比 BA4mg/L 要低, 说明 BA 浓度过高对生姜脱毒苗有抑制作用。在实验中发现液体培养基中培养的植株的生长情况更加优于固体培养基; 液体培养基中叶片更宽, 植株更健壮。

2.2 不同培养基状态对生姜生根的影响

在 26d 时(表 3), 固体、液体培养基的出根率在不同激素浓度的培养基中的出根率均达到 100%, 根长总体来看, 液体培养基比固体培养基的要长; 液体培养中植株的株高比固体培养的要高, 另外叶片要大, 植株生长也更旺盛; 但根的数量在不同激素水平的培养基中表现不一致。

2.3 生姜脱毒苗的移栽

移栽基质: (1) 土壤, (2) 土壤 / 珍珠岩 = 3: 1, (3) 珍珠岩。试验设 2 次重复。

将试管苗瓶盖打开, 在室温下炼苗 3 天后移栽到不同的基质中; 移栽后第 29 天对移栽后的成活率进行统计, 表 4 可以看出, 基质以珍珠岩 + 土为佳, 比较液体和固体培养基培养的植株, 可以发现无论是哪种介质, 来源于液体培养基的生姜脱毒苗的成活率在不同的以在基质中均高于来源于固体培养基。

2.4 浅层液体培养与固体培养之间成本的比较

使用浅层液体培养很大程度降低了生姜脱毒苗的生产成本, 包括化学药品和人工等, 由于每瓶体积只有固体体积的三分之一, 同时不用添加琼脂, 所以其化学药品成本不到固体培养基的三分之一; 另外, 因为使用液体, 不需要加热溶解, 节省了加热所耗的电费; 在接种阶段(继代和生根), 因为生姜继代生根过程中都会有大量的根生出, 所以在转接的时候需要将根剪掉, 从液体转入液体时, 没有琼脂的存在, 剪根时就会比较快速方便; 移栽时, 由于液体培养基中没有琼脂, 不需仔细清洗, 在此阶段可节省大量人工; 移栽过程中来源于液体培养基的生姜苗成活率高, 从而降低了成活单株

表 3 不同培养基状态对生姜生根的影响

培养基	出根率(%)	出根数(条)		根长(mm)		株高(cm)	
	固体培养	液体培养	固体培养	液体培养	固体培养	液体培养	固体培养
M1	100.0%	6.03 ± 1.12	5.38 ± 1.63	35.8 ± 2.14	30.9 ± 1.78	10.02 ± 1.03	8.48 ± 0.63
M4	100.0%	5.82 ± 1.33	5.80 ± 1.55	33.7 ± 1.06	31.3 ± 2.30	9.31 ± 0.99	8.00 ± 1.78
M5	100.0%	4.23 ± 0.32	5.20 ± 1.18	41.0 ± 2.41	38.1 ± 3.96	9.83 ± 1.84	8.02 ± 0.92
M6	100.0%	4.36 ± 1.51	4.20 ± 2.40	36.0 ± 5.01	35.4 ± 3.21	10.19 ± 1.36	9.46 ± 2.05
M7	100.0%	4.67 ± 0.98	4.50 ± 0.72	34.2 ± 3.20	33.2 ± 2.77	10.24 ± 1.89	10.06 ± 2.51

生姜脱毒苗的生产成本。

3 结论

(1) 使用浅层液体节约生姜脱毒苗生产中化学成

本 66.7% 以上, 以及节省大量人工。

(2) 浅层液体培养的继代增殖速度快于固体培养, 长势好于固体培养基; 因液体培养基更利于生姜组培

表4 不同介质对生姜脱毒苗移栽成活率的影响

培养基状态	成活率(%)		
	土	珍珠岩	珍珠岩/土 (3/1)
固体	87.20±4.13	86.32±6.72	92.73±3.96
液体	92.30±5.22	93.70±5.20	96.28±5.33

苗的吸收,其生长速度较固体培养基要快,其整个繁殖(继代到生根)周期较固体培养基短;相同时间内苗的高度、增值系数和根的长度均高于固体培养基。

(3)来源于液体培养基生根的生姜脱毒苗的移栽成活率明显高于来源于固体培养基的生姜脱毒苗;这可能是以下两个因素共同影响的结果,一是在液体培养基生根的生姜苗长势比固体培养基好,移栽后成活率高;二是在固体培养基炼苗移栽时需要用水洗净粘在根上的琼脂,清洗时极易伤根,导致成活率下降。

4 讨论

利用茎尖-热处理脱毒技术,获得脱毒脱菌生姜种苗,能克服种性退化,提高抗逆抗病性,有效防治植物病毒病。脱毒姜种分为三代即原原种、原种和生产种,生产种可在生产中应用,有效期为3年,3年后需要更换1次。由于脱毒种姜的使用年限只有3年,所以制种过程中脱毒脱菌阶段如何以最快的速度 and 最低的成本进行繁殖成为脱毒生姜在生产中大量推广应用的关键。近年来,对生姜的组培快繁技术研究的报道有所增加。主要集中在激素配比在生姜继代、诱导和生根上的研究。笔者在对激素配比进行研究的基础上,对浅层液体培养在生姜脱毒苗快繁阶段的应用进行了研究;在保证快速繁殖的基础上最大程度的降低了生产成本。

液体培养由于没有固体支撑、透气性不好,很多植物组培很难应用这一体系;应用浅层液体培养进行生

姜脱毒苗快速繁殖与生根,国内未见报道。但液体培养在甘蔗^[4],甘薯^[5],水稻^[6],马铃薯^[7]几种作物上已有报道,报道中一致认为采用液体培养方式代替固体培养可降低成本,并且,在培养甘蔗时可提高增值倍数2~3倍^[4],在甘薯组织培养中液体培养比固体培养的无菌苗植株高度,单株叶片数,单叶面积均要高^[5]。在水稻花药培养中液体培养基诱导法的出愈率及绿苗分化率均提高10%左右^[6]。马铃薯在液体中培养试管苗的生长比固体培养要好^[7];在文采取了固态和液态两中培养基状态。无论是在生姜继代还是生姜生根试验中,具有相同激素水平的液态培养基增殖与生根在一定程度上均要优于固体培养基,同时液态培养基在很大程度上节省了大量人力和财力。综上所述,浅层液体培养更适合于脱毒生姜种苗的大量繁殖。

参考文献

- 1 宣朴,郭元林,岳春芳,等.生姜茎尖组培快繁技术研究.西南农业学报,2004,17(4):484~486
- 2 黄菊辉,陈世儒.生姜种质资源离体保存.西南农业大学学报,1991,13(3):310~313
- 3 王教义.姜脱毒组培技术研究.山东农业科学,1999,(6):7~9
- 4 秦廷豪,邹宗兰.新台糖22液体快繁方法的探讨.甘蔗,2004,11(1) 15~17
- 5 毕瑞明.不同培养方法对甘薯无菌苗生长的影响.生物技术,2002,12(2),26~28
- 6 柴卫淑,谭学林,师佳,等.液体培养基在水稻花药培养中的应用研究.中国农学通报,2004,20(4):145~147
- 7 董淑英,李梅,孙静,等.马铃薯试管苗低成本快繁方式研究.中国马铃薯,2002,16(1):7~10

(责任编辑:秦守亮)