

DOI:10.11937/bfyy.201705021

花叶良姜组培无菌体系的建立

刘玉军, 刘芳, 孙灿岳, 俞建妹, 沈遐

(广西壮族自治区南宁树木园, 广西南宁 530031)

摘要:以花叶良姜袋苗为试材,根茎腋芽为外植体,研究外植体预处理、灭菌消毒和外植体长度等因素对其无菌体系建立的影响。结果表明:实验室水培植株3 d,根茎腋芽长3~5 cm作外植体,用1.25% HgCl_2 灭菌消毒16 min,花叶良姜外植体污染率24.2%,萌芽率72.7%,较有利于建立花叶良姜无菌体系。

关键词:花叶良姜;无菌体系;建立

中图分类号:S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)05-0089-04

花叶良姜(*Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*)属姜目姜科山姜属多年生草本植物,是山姜花的变种,又称花叶艳山姜,叶片长达1 m,叶色深绿色带有金色斑纹,是室内盆栽、园林绿化常用的观叶、观花植物^[1]。因其叶色艳丽,花姿优美,花香清纯,观赏价值甚高,深受消费者的青睐。目前主要采用萌蘖分株法繁殖花叶良姜种苗,此方法受气候因子的限制,生长缓慢,难以满足市场需求。也可以采用种子繁殖方法,但种子繁殖在有性生殖过程所造成的分离使90%以上的实生苗叶片变为绿色,失去黄绿嵌合的条纹^[2]。以芽繁芽的组织培养技术既可以保持植物优良性状的遗传稳定性,又能在短时间内快速繁殖苗木,所以组培技术是促进花叶良姜苗木快速发展的有效途径。当今市场尚鲜见有花叶良姜组培苗

销售。为了培育保持叶片金黄、翠绿相间彩色条纹优良性状的花叶良姜,课题组于2014—2015年对其进行了组织培养技术研究,以期在花叶良姜组培苗广泛应用提供技术基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料来源于广西南宁花鸟市场销售的叶色艳丽、有光泽、无病虫害、生长健壮的花叶良姜袋装苗,种植于良凤江树木园种苗繁育中心苗圃,选取种植半年以上的丛生植株,以丛生植株的根茎腋芽为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体预处理 在天气连续放晴3 d时,采集健壮花叶良姜植株,清洗干净根部泥土后,采用表1中的5种方法进行外植体预处理。

表1 外植体预处理方法

序号 Number	处理方法 Pretreatments
1	剪去全部叶片和根,根茎腋芽长3~5 cm处切断,浸泡于5%洗衣粉溶液中,用软毛刷刷洗5 min,纯净水清洗3次(自来水未冲洗)
2	整株苗木自来水冲洗3 h,剪去全部叶片和根系,根茎腋芽长3~5 cm处切断,将根茎腋芽浸泡于5%洗衣粉溶液中,用软毛刷刷洗5 min,纯净水清洗3次(自来水冲洗3 h)
3	整株苗木置于自来水中培养1 d,之后剪去全部叶片和根系,根茎腋芽长3~5 cm处切断,浸泡于5%洗衣粉溶液中,用软毛刷刷洗5 min,纯净水清洗3次(自来水水培1 d)
4	整株苗木置于自来水中培养3 d,每1 d换水1次,之后剪去全部叶片和根系,根茎腋芽长3~5 cm处切断,浸泡于5%洗衣粉溶液中,用软毛刷刷洗5 min,纯净水清洗3次(自来水水培3 d)
5	整株苗木置于自来水中培养6 d,每1 d换水1次,之后剪去全部叶片和根系,根茎腋芽长3~5 cm处切断,浸泡于5%洗衣粉溶液中,用软毛刷刷洗5 min,纯净水清洗3次(自来水水培6 d)

第一作者简介:刘玉军(1969-),男,广西全州人,本科,林业工程师,现主要从事绿化苗木及珍贵树种苗木培育等研究工作。E-mail:598623826@qq.com

收稿日期:2016-09-28

1.2.2 外植体灭菌消毒 采用双因素正交实验设计, HgCl_2 浓度(1.00%、1.25%、1.50%),处理时间(10、13、16 min)共9个处理,每个处理11瓶,每瓶1个外植体,重复3次,接种第10天起至第30天止统

计外植体污染率和褐化率。

1.2.3 杀菌剂 以表 1 中处理 4 的预处理方法(即 75%酒精 30 s, 1.25% HgCl₂ 灭菌消毒 16 min)的外植体分别接种于表 2 培养基内,第 10 天起至第 30 天止,统计外植体污染率、褐化率及芽萌发数量。

表 2 添加杀菌剂试验

处理 Treatment	培养基类型 Medium type
1	MS
2	MS+百菌清 130 mg·L ⁻¹
3	MS+甲基硫菌灵 200 mg·L ⁻¹

1.2.4 外植体长度 采用表 1 处理方法,将预处理完毕的外植体,从根状茎端起,分别在根茎腋芽长 1、2、3~5、6~8 cm 处切断,置于超净工作台,无菌条件下,75%酒精处理 30 s,以 1.25% HgCl₂ 灭菌消毒 16 min,接种于培养基内,培养 30 d 统计无菌外植体成活率和芽萌发率。

1.2.5 培养条件 培养基试验除外,外植体灭菌消毒后均接种于 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+琼脂粉 4.5 g·L⁻¹+白糖 30 g·L⁻¹ 培养基内,pH 5.8,培养基经高温高压(121 ℃, 0.14 MPa)灭菌 20 min。光照强度为 800~5 000 lx,光照时间为 12~14 h·d⁻¹,温度(25±3)℃。污染率(%)=外植体污染数/接种总数×100;褐化率(%)=外植体褐化数/接种总数×100;成活率(%)=外植体成活数/接种总数×100;萌芽率(%)=芽萌发外植体数/接种总数×100。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 及 DPS 7.05 统计分析软件对试验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 预处理方法对外植体污染率的影响

外植体按表 1 预处理后,置于超净工作台,75%酒精处理 30 s,1.00% HgCl₂ 浸泡 9 min,无菌水清洗 3 次,剥去根茎腋芽外层叶鞘后接种于培养基内培养。由表 3 可知,外植体污染率的大小排序为 1>2>5>3>4,除处理 5 外,外植体的污染率与自来水冲洗植株的时间呈正相关,冲洗时间(包含水培)越长,污染率越低。未经自来水冲洗直接在超净工作台用 75%酒精和 1.00% HgCl₂ 灭菌消毒的处理 1 污染率最高,为 100.0%。植株水培 3 d 再进行灭菌消毒的处理 4,污染率最低,仅 35.5%,比处理 1 低 64.5 个百分点。这可能是由于花叶良姜根状茎生长

于泥土中,表面带有大量微生物,将植株置于自来水中培养 1~3 d,微生物因缺乏生存所需营养物质活性减弱,自然死亡数量减少^[3],同时微生物活性减弱。再采用一定浓度的酒精和 HgCl₂ 灭菌消毒外植体,可以有效降低外植体污染率。水培 6 d 的处理 5 外植体污染率出现升高现象,为 58.1%,分别比处理 4 高 63.7%,比处理 3 高 12.6%。这可能是花叶良姜根状茎浸泡于水中时间过长,根系处于缺氧胁迫状态,呼吸减弱,生命力下降,抗性差,一方面容易成为微生物和病原菌侵染的目标^[4],另一方面因水中氧容量不足对植物生长的影响首先表现在植物根系容易出现腐烂等症状,导致污染率提高和后期无菌苗死亡率也较高^[5]。该试验结果与前人的研究结果一致。因此,花叶良姜外植体预处理方法以处理 4 为宜。

表 3 外植体预处理方法对污染率的影响

序号 Number	外植体数 Number of explant/个	污染数 Number of pollution/个	污染率 Contamination rate/%
1	31	31	100.0
2	31	25	80.6
3	31	16	51.6
4	31	11	35.5
5	31	18	58.1

2.2 HgCl₂ 浓度和处理时间对外植体污染率的影响

按表 1 处理 4 预处理好的外植体置于超净工作台上,75%酒精表面消毒 30 s 后倒入不同浓度的 HgCl₂ 溶液中,不同灭菌消毒时间对外植体污染率和褐化率的影响见表 4。由表 4、5 可知,HgCl₂ 溶液浓度之间、处理时间之间对外植体污染率和褐化率

表 4 HgCl₂ 溶液浓度和处理时间对外植体污染率和褐化率的影响

处理 Treatment	HgCl ₂ /%	处理时间 Time/min	污染率 Contamination rate/%	褐化率 Browning rate/%
1	1.00	10	84.8	24.2
2	1.00	13	78.8	27.3
3	1.00	16	66.7	39.4
4	1.25	10	51.5	30.3
5	1.25	13	36.4	42.4
6	1.25	16	24.2	66.7
7	1.50	10	45.5	60.6
8	1.50	13	39.4	75.8
9	1.50	16	18.2	84.8

均有明显影响,但以 HgCl₂ 的浓度起主导作用,不同 HgCl₂ 浓度和处理时间组合,对污染率和褐化率影响的结果不一致。外植体污染率大小排序为 1>2>3>4>7>8>5>6>9,外植体褐化率大小排序为 9>8>6>7>5>3>4>2>1。HgCl₂ 浓度相同时,随着处理时间的增加,外植体污染率不断下降,外植体褐化率在不断提高。处理时间相同时,随着 HgCl₂ 溶液浓度的提高,外植体污染率不断地下降,褐化率不断地提高。处理 9 污染率最低为 18.2%,但褐化率

最高达 84.8%。可见,高浓度的 HgCl₂ 处理时间过长,不仅杀死了微生物,同时对外植体也产生了毒害。因此,处理 9 存活的无菌外植体不仅始芽萌发时间长,萌芽率偏低,且萌芽脆弱,生命力不强。处理 6 污染率 24.2%,仅次于处理 9,但褐化率 66.7%,比处理 9 褐化率的低 27.1%。比处理 9 存活的外植体始芽萌发快,且萌芽率高,芽健康。所以,处理 6 采用的 HgCl₂ 浓度和处理时间比较适宜花叶良姜外植体灭菌消毒。

表 5 方差分析结果

Table 5 Analysis of variance

因变量 Dependent variable	差异源 Difference source	III 型平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
污染 Contaminate	HgCl ₂	1.173 8	2	0.586 9	35.913	0.000 1
	时间	0.336 9	2	0.168 5	10.309	0.001 0
	HgCl ₂ ×时间	0.015 6	4	0.003 9	0.239	0.912 8
	误差	0.294 2	18	0.016 3		
	总计	1.820 5	26			
褐化 Browning	HgCl ₂	0.988 9	2	0.494 4	91.179	0.000 1
	时间	0.341 1	2	0.170 5	31.450	0.000 1
	HgCl ₂ ×时间	0.041 9	4	0.010 5	1.930	0.149 1
	误差 Error	0.097 6	18	0.005 4		
	总计 Total	1.469 4	26			

2.3 添加杀菌剂对外植体污染和褐化的影响

将灭菌消毒好的外植体,分别接种于表 2 的 1、2 号和 3 号培养基内,培养 30 d,外植体污染率和褐化率见图 1,污染率大小排序为 1>3>2,褐化率大小排序为 2>3>1。说明在培养基中添加甲基硫菌灵和百菌清对微生物有一定的杀死作用。添加杀菌剂的 2 号和 3 号培养基外植体污染率分别为 10.0%、12.5%,比未添加杀菌剂的 1 号培养基外植体的污染率分别低 60.0%、50.0%。2 号培养基灭菌效果稍好,但褐化率比 3 号培养基稍高。为了获取较多的无菌活外植体,以采用 2 号培养基最好,3 号培养基次之。

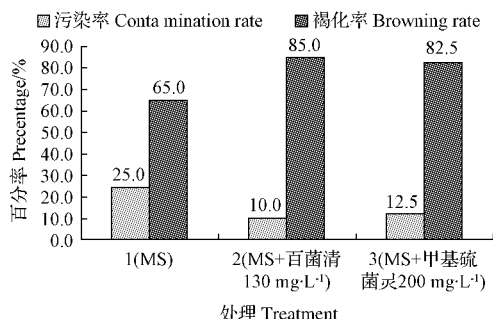


图 1 杀菌剂对外植体污染率和褐化率的影响

Fig.1 Effect of contamination rate and browning rate by different mediums ingredient(including and excluding bactericides)

花叶良姜结构疏松,水分循环比较快,培养物生长于含有杀菌剂的 2 号和 3 号培养基中,杀菌剂很快随水分渗入到花叶良姜体内,毒害外植体,导致外植体褐化死亡。为了避免或减轻外植体死亡,外植体在 2 号或 3 号培养基内培养时间不超过 20 d,转接到 1 号培养基内培养。

2.4 不同长度外植体对成活率和萌芽率的影响

图 2 所示,不同长度的外植体灭菌消毒后成活率和萌芽率存在较大差异,外植体成活率和萌芽率大小排序一致,以长度(cm)3~5>2>6~8>1。外植体长度 1 cm 时成活率和萌芽率分别为 36.4%和 27.3%,外植体长度 6~8 cm 时成活率和萌芽率分别

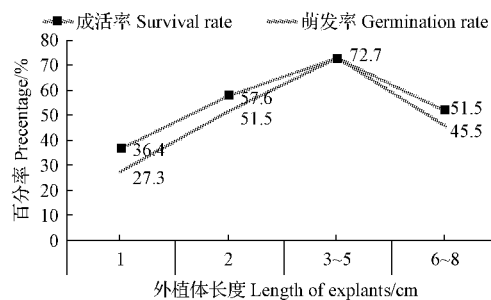


图 2 外植体长度对芽成活率和萌芽率的影响

Fig.2 Effect of survival rate and germination rate by different lengths of explants

为 51.5% 和 45.5%，比外植体长度 3~5 cm 的成活率分别低 49.9%、29.2%，萌芽率分别低 62.4% 和 37.4%。分析认为，外植体 1 cm 太短，切口距离腋芽生长点过近或已到生长点，消毒剂容易渗透到组织内部，或直接伤害到生长点，导致外植体死亡。外植体 6~8 cm 过长，一方面不易搅拌灭菌消毒，另一方面药液难以渗透到叶鞘基部，外植体消毒灭菌不彻底，从而造成污染偏高。因此，以外植体 3~5 cm 长比较适宜，无菌外植体成活率和萌芽率均较高。

3 结论与讨论

花叶良姜长期生长于泥土当中，根茎表面和叶鞘基部隐藏着丰富的微生物。植株移离土壤，水培 3 d，采用 75% 酒精处理 30 s，1.00‰ HgCl₂ 浸泡 9 min，取得较好的灭菌效果，外植体污染率仅 35.5%。水培期间，如果在水里添加一定浓度的杀菌剂，外植体灭菌效果是否有所提高，有待进一步研究。

该试验结果表明，花叶良姜外植体灭菌消毒，HgCl₂ 溶液浓度起主导作用。在相同的处理时间，随着 HgCl₂ 溶液浓度的增加，外植体污染率不断下降，褐化率不断提高。处理 9 污染率最低，仅 18.2%，但褐化率较高 84.8%。因为 HgCl₂ 在灭杀微生物的同时对花叶良姜外植体也产生一定的毒害，HgCl₂ 浓度越高对外植体损害越严重，无菌活体越脆弱。因此，分析比较认为，采用 1.25‰ HgCl₂ 溶

液灭菌消毒外植体 16 min 比较适宜，无菌活体健康，始芽萌发时间较短。

试验表明，在培养基内添加一定浓度的百菌清或甲基硫菌灵，对外植体可以进行进一步的灭菌，使外植体污染率能有效降低，分别为 10.0% 和 12.5%，比不添加杀菌剂的降低了 50.0%~60.0%，以添加百菌清 130 mg·L⁻¹ 的效果更好。但为了避免外植体受伤害，外植体在含杀菌剂培养基内培养不超过 20 d，转接到无杀菌剂的培养基内培养。

根茎腋芽保留的长度对其灭菌消毒后的成活率和萌芽率存在一定的影响，以保留 3~5 cm 长的外植体成活率和萌芽率最高，二者均为 72.7%。花叶良姜根茎腋芽生长点虽然长在根茎内，有叶鞘包庇，但根茎腋芽结构疏松，一旦有伤口，灭菌药液很快从伤口渗进体内毒害组织。所以根茎腋芽不宜留太短(长 1 cm)，否则外植体受害死亡。

参考文献

- [1] 赵秀芳. 花叶艳山姜组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报, 2014, 20(6): 34-35, 38.
- [2] 梅贝坚, 艾华. 花叶良姜的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1990(2): 44-45.
- [3] 德庆措姆, 布穷. 银白杨组织培养中外植体消毒时间初探[J]. 辽宁林业科技, 2000(4): 29-37.
- [4] ANDERSON M. The world encyclopedia of cacti & succulents [M]. Sebastian Kelly, 1999.
- [5] 邢书慧, 罗健, 陈泳慧, 等. 通气对几种水培观赏植物生长的影响[J]. 农业工程学报, 2005(21): 36-40.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*

LIU Yujun, LIU Fang, SUN Canyue, YU Jianmei, SHEN Xia
(Nanning Tree Garden, Nanning, Guangxi 530031)

Abstract: The pretreatment, sterilized factors and length of the explants were studied to establish propagation system on axillary buds of rhizome of *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*. The results showed that the contamination rate would be 24.2% and germination rate would be 72.7% when choose the axillary buds at the length of 3—5 cm from hydroponics plants for three days, the surface disinfection suitable time lasted 16 min in 1.25‰ HgCl₂, and the growth of the explants was in good condition.

Keywords: *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*; propagation system; establishment