

降低茄子茎段组培染菌率的初步研究

乔军¹ 石瑶¹ 连勇² 刘富中² 陈钰辉² 张映² 李素文¹ 王利英^{1*}

(¹天津科润蔬菜研究所, 蔬菜种质创新国家重点实验室, 天津 300384; ²中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 茄子茎段组培容易染菌, 为了测试 15 种灭菌方法的灭菌效果, 选取紫圆茄、紫长茄、绿茄 3 种类型茄子品种, 根据染菌率和植株再生成活率判断最佳灭菌方法。结果表明, 不同类型茄子适用的灭菌方法不同。紫圆茄茎段适宜的灭菌方法为: 2% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min; 紫长茄茎段适宜的灭菌方法为: 4% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.3% HgCl₂ 浸泡 10 min; 绿茄茎段适宜的灭菌方法为: 6% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min。绿茄茎段保存试验结果表明, 低温保存有利于降低茄子茎段组培染菌率, 其中最适保存条件为 5 °C 下保存 3 d 以内, 染菌率在 20% 以下, 再生成活率保持在 60% 左右, 可以满足植株再生要求。

关键词: 茄子; 茎段; 组培; 染菌率

植物组织培养技术对单倍体育种、诱变育种及种质保纯脱毒等方面具有重要意义(王利英等, 2015, 2016), 经过近一个世纪的发展, 已经在科研和生产上广泛应用(周俊辉, 1999)。污染、褐化和玻璃化是组培中经常碰到的问题, 尤其细菌污染最为普遍(胡凯等, 2007)。采取有效的灭菌方法对外植体进行彻底灭菌, 同时又不伤害生长点, 保证外植体较高的成活率是组培成功的关键(穆红梅等, 2015)。近年来由于基因工程的快速发展, 茄子再生体系研究受到重视, 前人主要从外植体类型(俞琼等, 2007; 方岩岩等, 2013)、激素(洪晓华等, 2009; 李焯等, 2014)、无菌苗生产(谢超等, 2012)、不定芽及根诱导(黄志银和曹必好, 2012; 张明华等, 2014)等方面进行了广泛的再生体系研究。国外学者对组培相关研究主要集中在单倍体诱导和茎尖脱毒上(Salas et al., 2011; Wang et al., 2016)。染菌是所有茄子再生研究中经常碰

到的问题, 亟待找出更好的灭菌方法以降低染菌率。

茎段培养可以快速、有效地繁殖所需材料, 尤其对于无种子种质资源及野生资源保存意义重大(黄碧兰等, 2008)。本试验研究了不同品种、不同灭菌方式和保存条件对茄子茎段组培染菌率和植株再生成活率的影响, 旨在为构建茄子茎段离体再生体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2014 年在天津科润蔬菜研究所进行, 供试茄子类型共 3 种, 均为天津科润蔬菜研究所自育品种。圆茄品种圆丰园为紫圆茄一代杂种, 紫红茎, 茎有白色绒毛; 长茄品种津丰长茄 4 号为紫长茄一代杂种, 紫黑茎, 茎有白色绒毛; 绿茄品种青丰 1 号为绿茄一代杂种, 绿茎, 茎有白色绒毛。6 月 15 日播种育苗, 7 月 25 日定植于日光温室, 每份材料种植 50 株, 株距 50 cm, 行距 70 cm, 高垄地膜覆盖, 正常栽培管理。

1.2 试验设计

1.2.1 灭菌方法 试验在超净工作台中进行, 共设置 15 种灭菌方法(表 1), 选取 3 个类型茄子品种, 每个品种 3 次重复, 分 3 d 进行。10 月 1 日开始采集带有生长点的幼嫩茎段, 茎段长度为 5~8 cm,

乔军, 男, 助理研究员, 专业方向: 茄子生物育种, E-mail: sxdtqj886@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 王利英, 女, 研究员, 专业方向: 茄子育种, E-mail: sun_hwg@126.com

收稿日期: 2016-01-15; 接受日期: 2016-05-26

基金项目: 天津市农业科技成果转化与推广项目 (201304020), 黄瓜等主要蔬菜商业化育种技术研究与示范项目 (2014BAD01B0802), 天津市财政项目高端设施茄果类蔬菜新品种示范推广项目

每个品种采集 39 个茎段, 3 个品种共计 117 个茎段, 分别装在 1 000 mL 透明试剂瓶中。采样后 1、2、3 d 采用第 1 种灭菌方法, 每天每个品种取 13 个茎段进行灭菌组培; 之后继续采集 3 个品种共计 117 个茎段, 每天每个品种取 13 个茎段采用第 2 种灭菌方法进行灭菌组培; 以此类推, 直到 15 种灭菌方法全部试验完毕。茎段组培 10 d 后统计染菌率。

表 1 茎段组培灭菌方法

编号	灭菌方法
1	2% NaClO 浸泡 20 min
2	4% NaClO 浸泡 20 min
3	6% NaClO 浸泡 20 min
4	0.1% HgCl ₂ 浸泡 20 min
5	0.2% HgCl ₂ 浸泡 20 min
6	0.3% HgCl ₂ 浸泡 20 min
7	2% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.1% HgCl ₂ 浸泡 10 min
8	2% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.2% HgCl ₂ 浸泡 10 min
9	2% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.3% HgCl ₂ 浸泡 10 min
10	4% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.1% HgCl ₂ 浸泡 10 min
11	4% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.2% HgCl ₂ 浸泡 10 min
12	4% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.3% HgCl ₂ 浸泡 10 min
13	6% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.1% HgCl ₂ 浸泡 10 min
14	6% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.2% HgCl ₂ 浸泡 10 min
15	6% NaClO 浸泡 10 min, 再用 0.3% HgCl ₂ 浸泡 10 min

1.2.2 茎段组培方法 提前配制 MS 基本培养基, 主要成分: MS+3% 蔗糖 +7 g·L⁻¹ 琼脂 +0.5 g·L⁻¹ 活性炭, 调节 pH 值为 5.8, 分装在 200 mL 组培瓶中, 每瓶 40 mL。高温 121 ℃、高压 0.1 MPa 下灭菌 20 min。灭菌后及时放在超净工作台中通风保存, 待瓶内基本无水滴时进行茎段培养。

先用自来水将外植体茎段冲洗干净, 再在超净工作台中用表 1 所列灭菌方法进行灭菌, 最后用无菌水冲洗 3 次后转接到 MS 培养基。1 瓶培养基只转接 1 个茎段, 记录品种名称和转接时间, 放置在光照强度 2 000 lx、光照 14 h·d⁻¹、温度 25 ℃ 的组培架上培养 30 d 后调查植株再生成活率。

植株再生成活率 = (无菌苗数 / 转接茎段数) × 100%

1.2.3 绿茄茎段保存试验 采集绿茄茎段, 分别保存在 5、10、15、25 ℃ 避光恒温箱里 1、2、3 d 后进行茎段组培试验, 选取灭菌方法 13, 即 6% NaClO 浸泡 10 min、再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min。组培 10 d 后统计染菌率, 组培 30 d 后调查植株再生成活率。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对组培染菌率的影响

15 种灭菌方法的染菌率差异明显 (表 2)。采用灭菌方法 7, 即用 2% NaClO 浸泡 10 min、再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min, 普通 MS 培养基转接紫圆茄茎段培养 10 d 后染菌率仅为 9.2%; 但该灭菌方法并不适用于紫长茄和绿茄。采用灭菌方法 12, 即用 4% NaClO 浸泡 10 min、再用 0.3% HgCl₂ 浸泡 10 min, 普通 MS 培养基转接紫长茄茎段培养 10 d 后染菌率最低, 为 40.8%。采用灭菌方法 13, 即用 6% NaClO 浸泡 10 min、再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min, 普通 MS 培养基转接绿茄茎段培养 10 d 后染菌率最低, 为 27.5%。可见, 不同类型茄子适用的灭菌方法也不同。这可能是因为不同类型的茄子茎段表面绒毛多少不一, 抗氧化能力各有差异, 导致使用同一种灭菌方法染菌率会有明显差异。

由表 2 还可以看出, 0.1% HgCl₂ 是一种有效的杀菌剂, 配合使用 2% ~ 6% NaClO 可以达到较好的灭菌效果。

表 2 不同灭菌方法下 3 种类型茄子茎段组培 10 d 后染菌率

灭菌方法	染菌率/%		
	紫长茄	紫圆茄	绿茄
1	100.0 a	100.0 a	95.8 abc
2	100.0 a	100.0 a	93.3 abc
3	100.0 a	100.0 a	97.5 ab
4	71.7 b	20.8 bc	47.5 h
5	59.2 bc	26.7 bc	50.0 gh
6	75.8 b	19.2 c	100.0 a
7	57.5 bc	9.2 c	55.0 fgh
8	41.7 c	28.3 bc	67.5 efg
9	77.5 b	95.8 a	81.7 bcde
10	71.7 b	96.7 a	79.2 cde
11	74.2 b	91.7 a	83.3 abcd
12	40.8 c	41.7 b	40.0 hi
13	48.3 c	30.0 bc	27.5 i
14	53.3 c	84.2 a	28.3 i
15	52.5 c	88.3 a	70.0 def

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($\alpha=0.05$), 下表同。

2.2 不同灭菌方法对植株再生的影响

如表 3 所示, 采用灭菌方法 7 处理的紫圆茄植株再生成活率最高, 为 64.5%; 采用灭菌方法 12 处理的紫长茄植株再生成活率最高, 为 50.4%; 采

用灭菌方法 13 处理的绿茄植株再生成活率最高，为 61.1%。可见染菌率最低的灭菌方法对应最高的植株再生成活率，证明降低染菌率是提高组培植株成活率的基础，且试验的灭菌方法对外植体伤害性不大，不影响植株再生。

表 3 不同灭菌方法下 3 种类型茄子茎段组培植株再生成活率

灭菌方法	再生成活率/%		
	紫长茄	紫圆茄	绿茄
1	0 h	0 g	0 h
2	0 h	0 g	0 h
3	0 h	0 g	0 h
4	15.3 ef	64.1 a	32.9 b
5	21.6 cd	43.8 c	18.8 d
6	10.2 g	34.3 d	0 h
7	30.6 b	64.5 a	31.4 b
8	30.2 b	51.7 b	21.0 c
9	12.1 fg	0 g	4.2 g
10	13.2 f	0 g	11.4 f
11	12.9 fg	0 g	5.7 g
12	50.4 a	26.2 e	31.3 b
13	18.7 de	34.6 d	61.1 a
14	23.9 c	4.2 f	15.7 e
15	19.6 d	3.5 f	10.2 f

2.3 不同保存条件对绿茄茎段组培染菌率和植株再生成活率的影响

由表 4 可见，5℃下保存 3 d 内的绿茄茎段培养 10 d 后染菌率在 12%~16% 之间，可以满足试验要求。5℃下保存 3 d 内的绿茄茎段植株再生成活率与其他处理差异显著，植株再生成活率达到 60% 左右。可见低温保存不仅可以降低染菌率，同样可以提高植株再生成活率。染菌率和植株再生成活率成反比，说明低温保存条件有利于外植体培养，降低染菌率的同时可以提高植株再生成活率。

表 4 不同保存条件下的绿茄茎段染菌率和组培植株再生成活率

保存温度/℃	染菌率/%			组培植株再生成活率/%		
	保存 1 d	保存 2 d	保存 3 d	保存 1 d	保存 2 d	保存 3 d
5	16 c	12 d	13 b	58.9 a	62.4 a	64.2 a
10	38 a	33 c	21 b	46.3 b	34.8 b	59.0 b
15	13 c	50 b	96 a	50.7 b	31.6 c	0 c
25	27 b	81 a	97 a	50.5 b	5.7 d	0 c

3 结论

实验室组培接种外植体后经过一段时间才会出现染菌现象，根据外植体携带菌的数量不同，染菌

暴发的时间呈现阶梯性。如果外植体接种 10 d 后没有染菌，后期继续培养就可以实现无菌植株再生，所以染菌率调查设置为接种后 10 d。

本试验结果表明，0.1% HgCl₂ 是一种有效的杀菌剂，配合使用 2%~6% NaClO 可以达到较好的灭菌效果。不同类型茄子适用的灭菌方法不同。紫圆茄茎段适合采用的灭菌方法为：2% NaClO 浸泡 10 min，再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min；紫长茄茎段适合采用的灭菌方法为：4% NaClO 浸泡 10 min，再用 0.3% HgCl₂ 浸泡 10 min；绿茄适合采用的灭菌方法为：6% NaClO 浸泡 10 min，再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min。通过进一步进行的绿茄茎段保存试验证明，样品在低温条件下保存有利于降低茄子茎段组培染菌率，其中最适保存条件为 5℃保存 3 d 以内，染菌率在 20% 以下，植株再生成活率保持在 60% 左右，可以满足植株再生要求。通过茄子茎段组培可以实现良种扩繁和工厂化生产，满足科研和生产需要。

参考文献

方岩岩, 王益奎, 王红, 李文嘉, 黎炎. 2013. 红茄子叶的不定芽诱导及植株再生. 南方农业学报, 44 (5): 751-754.

洪晓华, 王瑛华, 陈刚, 许惠诚. 2009. 茄子的组织培养和植株再生体系研究. 北方园艺, (6): 63-65.

胡凯, 张立军, 白雪梅, 崔玉娜, 阮燕晔. 2007. 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒. 安徽农业科学, 35 (3): 680-681.

黄碧兰, 徐立, 李志英, 马千全, 李克烈, 陈伟. 2008. 牛大力茎段组织培养技术研究. 安徽农业科学, 36 (32): 13993-13994.

黄志银, 曹必好. 2012. 茄子组织培养高效再生植株体系的优化. 长江蔬菜, (10): 4-7.

李焯, 金丹丹, 谢立波, 李景富. 2014. 茄子高频再生体系的建立与优化. 黑龙江农业科学, (9): 48-52.

穆红梅, 杜秀菊, 曹兴, 武彦, 孙凯. 2015. 白凤菜组培快繁技术研究. 北方园艺, (21): 96-98.

王利英, 乔军, 石瑶, 李素文, 苗博琰. 2015. 茄子游离小孢子培养研究进展. 北方园艺, (13): 190-194.

王利英, 乔军, 石瑶, 连勇, 刘富中, 陈钰辉, 张映, 李素文. 2016. 基因型对茄子小孢子培养诱导单倍体的影响. 山西农业科学, (3): 284-287.

谢超, 杨清, 史策, 决登伟, 朱艳平, 刘水平. 2012. 野生茄子托鲁巴姆 *StLTPa7* 的克隆与分析. 中国农业科学, 45 (8): 1505-1512.

俞琼, 陈利, 刘鹏, 徐根娣. 2007. 茄子组织培养再生体系研究初报. 广东农业科学, (2): 24-26.

张明华, 陈钰辉, 刘富中, 张映, 连勇. 2014. 茄子遗传转化植株再生体系的优化. 长江蔬菜, (14): 15-20.

周俊辉. 1999. 植物快速繁殖中存在的问题与对策. 仲恺农业技术学院学报, 12 (4): 64-70.

Salas P, Prohens J, Seguí-Simarro J M. 2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related

species. *Euphytica*, 182 (2): 261-274.

Wang M R, Li B Q, Feng C H, Wang Q C. 2016. Culture of shoot tips from adventitious shoots can eradicate *Apple stem pitting virus* but fails in *Apple stem grooving virus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125 (2): 283-291.

Preliminary Studies on Reducing Contamination Rate of Stem Segment Tissue Culture in Eggplant

QIAO Jun¹, SHI Yao¹, LIAN Yong², LIU Fu-zhong², CHEN Yu-hui², ZHANG Ying², LI Su-weng¹, WANG Li-ying^{1*}

(¹Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, State Key Laboratory of Vegetable Germplasm Innovation, Tianjin 300384, China; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Eggplant stem segment tissue culture was easy to be contaminated. Three types of eggplant were selected to test the sterilization effects of 15 kinds of sterilization methods. The best sterilization method was judged according to the contamination rate and plant regeneration rate. The result indicated that different eggplant types were applicable to different sterilization methods. Purple round eggplant was suitable for sterilization method VII, which was soaked for 10 minutes in 2% NaClO before soaking for 10 minutes in 0.1% HgCl₂. Purple long eggplant was suitable for sterilization method XII, which was soaked for 10 minutes in 4% NaClO before soaking for 10 minutes in 0.3% HgCl₂. Green eggplant was suitable for sterilization method XIII, which was soaked 10 minutes in 6% NaClO before soaking for 10 minutes in 0.1% HgCl₂. The green eggplant stem segment storage experiment showed that low temperature storage could reduce contamination rate. The optimum storage condition was under 5 °C for 3 days, the contamination rate remained below 20% and regeneration rate was kept in about 60%. All these could meet the requirements of plant regeneration.

Key words: Eggplant; Stem segment; Tissue culture; Contamination rate

· 蔬菜史话 ·

黄花菜

黄花菜为百合科萱草属中能形成肥嫩花蕾的宿根多年生草本植物, 别名萱草, 干制品名金针菜。主要栽培种有北黄花菜、小黄花菜和萱草。

黄花菜原产亚洲和欧洲, 中国山地有野生种。黄花菜在中国自古就有栽培, 最早记载可见《诗经·卫风·伯兮》篇, 有“焉得谖草, 言树之背”之句。谖草, 即萱草。晋代周处(236~297年)编著的《风土记》中有“宜男, 妊妇佩之必生男, 又名萱草”。晋太子太傅丞崔豹编撰的《古今注》(公元290年)载“欲望人之忧, 则赠以丹棘(萱草)”。古人又称萱草为忘忧草。宋苏颂《图经本草》(1061年)记载:“萱草处处田野有之, 五月采花, 八月采根。今人多采其嫩苗及花跗作为菹食”。表明当时“萱草”处于野生, 尚未人工栽培, 但以采收“花器”入蔬。

宋代以后以食用花器及其颜色命名, 称之为“黄花菜”。而金花菜的称谓始见于明代兰茂(公元1396~1476年)编著的《滇南本草》。据记载, 明弘治元年(1448年), 湖南省祁东县官家嘴镇永年村村民管福民、管福顺兄弟在该村的大福园、豆子园开始移种培育黄花菜。成书于1573年的《本草纲目》载有:“萱草下湿地, 冬月丛生。新旧相代, 四时青翠……今东人采其花跗干而货之。”印证了明代已有黄花菜人工栽培, 并已有黄花菜的干制品应市了。

黄花菜多分布于中国秦岭以南各地, 中国主产区有甘肃庆阳、湖南邵阳、河南淮阳、陕西大荔、江苏宿迁、云南下关和山西大同等地。

张德纯(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)