

张珏, 杨轶滢, 王跃华. 峨眉大黄姜的茎尖脱毒与植株再生[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 77-79.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.021

峨眉大黄姜的茎尖脱毒与植株再生

张珏, 杨轶滢, 王跃华

(成都学院生物产业学院, 四川成都 610106)

摘要:为提高姜茎尖成苗率及试管苗的增殖效率,以峨眉大黄姜为供试材料,以 MS 为基础培养基,研究了不同激素配比对峨眉大黄姜茎尖成芽率、试管苗增殖率、生根效果的影响。试验结果表明,激素配比为 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L+GA₃ 0.3 mg/L 时,诱导茎尖成芽效果最好,成芽率为 83.3%。脱毒苗丛生芽诱导最佳激素配比为:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,诱导率为 92.5%,平均芽数为 12.4 个;生根效果激素配比以 MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最佳,诱导率为 100%,平均生根数为 17.6 条。

关键词:峨眉大黄姜;茎尖脱毒;激素配比;植株再生

中图分类号: S632.504 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0077-03

姜(*Zingiber officinale* Rose)^[1]为姜科姜属多年生宿根草本植物。姜科植物姜的根茎,形如掌状,它含有挥发油、姜辣素、黄酮类、酚类等物质及多种氨基酸^[2],是一种用途广泛的药食兼用植物。近年来,随着食疗保健在全世界范围的兴起,各国食品、医药、生物学家对姜的研究日益广泛,姜在食品工业中的开发前景广阔。人们已经对姜的成分、药理、栽培技术和快速繁殖等方面有了较多的研究。姜以根状茎作为繁殖材料,繁殖系数低,容易通过种姜传播病害而且长期无性繁殖造成种性退化。1977 年 Hosoki 等首先进行姜组织培养的研究^[3],迄今为止,在脱毒快繁、花器官培养、体细胞胚胎发生、器官发生、原生质体培养和种质保存等方面取得了一定进展^[4]。目前对姜的茎尖脱毒及植株再生研究较多,但对于较有四川特色的峨眉大黄姜的茎尖脱毒及离体快繁还未见报道。本试验通过对峨眉大黄姜的茎尖剥离和离体培养来快速繁殖姜脱毒种苗,研究不同浓度激素对比对茎尖的成苗率、丛生芽诱导率、生根的影响,以期筛选出大黄姜繁殖速度快、缩短培养周期、建立快繁技术体系的最佳激素配比,为解决峨眉大黄姜品种退化问题和实现脱毒种苗的规模化、工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

峨眉大黄姜的根状茎由四川农业大学农学院药用植物园惠赠。

1.2 方法

1.2.1 外植体的获取及消毒

收稿日期:2014-11-19

基金项目:四川省教育厅科研项目(编号:13ZB0342);成都学院人才工程科研启动项目(编号:20819031)。

作者简介:张珏(1976—),女,四川成都人,博士,讲师,主要从事药用植物资源开发及利用研究。Tel:(028)84616308;E-mail:zhangjue@cdu.edu.cn。

通信作者:王跃华,教授,主要从事药用植物资源开发及利用研究。E-mail:wangyao888@yahoo.com.cn。

危害的健壮根状茎作为外植体,洗净表面泥土后,用 50% 多菌灵可湿性粉剂 800 倍液对其进行消毒 15 min,置于(37±2)℃条件下恒温培养箱热处理 28 d 钝化病毒,待姜芽长至 1.0~2.5 cm 时,将姜芽掰下,用自来水冲洗 1~2 h,移入接种室。在超净工作台上剥去姜芽表层叶片,用 75% 乙醇消毒 20 s,用无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% 氯化汞消毒 10 min 后,用无菌水洗 5 次,用无菌滤纸吸干表面水分,体视显微镜下用解剖针剥离茎尖(约 0.3~0.5 mm)并将其接种于诱导培养基上。

1.2.2 茎尖离体培养 以 MS 培养基为基础培养基,添加不同浓度激素,研究不同浓度对比对茎尖分化成苗的影响。主要采用不同浓度 GA₃ 和 6-BA 进行试验设计,GA₃ 浓度为 0.1、0.3 mg/L,6-BA 浓度为 0.1、0.2 mg/L,并结合 0.05 mg/L NAA 作为茎尖培养的培养基,每处理 10 个茎尖,重复 3 次。各处理培养基配方分别为:(1):MS+0.05 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃;(2):MS+0.05 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA₃;(3):MS+0.05 mg/L NAA+0.2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃;(4):MS+0.05 mg/L NAA+0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA₃。将姜茎尖接种至上述培养基中,黑暗培养,每 3 d 观察 1 次,待茎尖伸长膨大后,置于光照度为 1 800~2 000 lx、光照时数 14 h/d、温度 26℃条件下进行培养,每 3 d 观察 1 次,60 d 后统计成活率,80 d 后统计成苗率,比较各处理的成活率、成芽率的差异。待茎尖成苗后,繁殖到一定量剪其叶片进行病毒检测(酶联免疫吸附法),经检测合格后进行继代培养。

1.2.3 脱毒苗丛生芽诱导增殖培养 将病毒检测合格的脱毒苗转接于含不同浓度激素配比的 MS 快繁诱导培养基中进行培养,筛选最佳增殖培养基配方。各处理的培养基配方分别为:(5):MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;(6):MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;(7):MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;(8):MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;(9):MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;(10):MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。每

处理接种 5 瓶,每瓶 6 苗,重复 3 次。每 5 d 观察 1 次,比较不同激素配比对姜脱毒苗丛生芽诱导增殖效率的影响,并筛选最佳诱导培养基。

1.2.4 根的诱导 将苗高 3 cm 左右的丛生芽分成单株,转入不同浓度激素配比的 1/2MS 生根培养基。生根培养基配方分别为:(11): 1/2MS + 0.5 mg/L NAA;(12): 1/2MS + 1.0 mg/LNAA;(13): 1/2MS + 0.1 mg/L IBA;(14): 1/2MS + 0.5 mg/L IBA;(15): 1/2MS + 0.1 mg/L IBA + 0.5 mg/L NAA。培养基中加入 3.0% 蔗糖、0.45% 琼脂、0.2% 活性炭,pH 值 5.6~5.8。每处理接种 10 瓶,每瓶 3 苗,重复 3 次。每 7 d 观察 1 次,比较不同激素配比对姜组培苗生根的影响,并筛选最适生根培养基。最后将生根诱导成功的组培苗移栽到基质中,在大棚中进行炼苗,培养 10 d 后,统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比培养基对峨眉大黄姜茎尖分化成芽的影响 将体视显微镜下剥离的茎尖培养在不同激素配比的培养基中,培养 18 d 左右开始出现愈伤组织,27 d 左右茎尖基部膨大(图 1)。30 d 后观察其成活率,60 d 后观察成芽率,试验结果见表 1。峨眉大黄姜茎尖在 3 号培养基中的成活率最高,达 100%,但成芽率仅为 60.0%,并且在茎尖与培养基的接触面形成大量愈伤,生长速度较快;2 号培养基成活率其次,成活率为 93.3%,成芽率最高,达 83.3%,无愈伤形成,茎尖膨大伸长、生长速度较快;1 号培养基的成芽率最低,为 46.7%,茎尖基部膨大有少量愈伤形成,生长速度较慢;4 号培养基中茎尖的成活率低于其他处理组,成芽率比 2 号培养基低,但茎尖与培养基的接触面与 3 号一样也形成大量愈伤且生长速度较快。因此采用 2 号培养基对峨眉大黄姜茎尖进行培养效果较好。

表 2 不同激素配比对峨眉大黄姜茎尖脱毒苗分化出丛生芽的影响

培养基号	丛生芽诱导率 (%)	平均芽数 (个/株)	试管苗生长情况
5	75.4	3.5	芽数较少、浅绿色、纤细、生长较快
6	85.7	8.4	芽数较多、浅绿色、较纤细、生长快
7	92.5	12.4	芽数多、绿色、较健壮、生长快
8	66.5	5.6	芽数较少、黄绿色、较健壮、生长较快
9	72.4	4.6	芽数少、黄绿色、较纤细、生长较慢
10	56.2	3.1	芽数少、黄绿色、较纤细、生长慢



图2 峨眉大黄姜培养 30 d 诱导产生的丛生芽

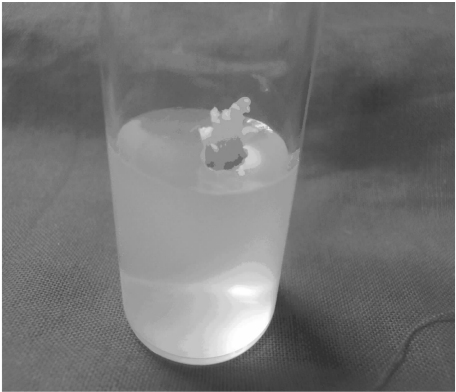


图1 峨眉大黄姜培养 18 d 后茎尖膨大

表 1 不同激素配比对茎尖成活率及成芽率的影响

培养基号	成活率 (%)	成芽率 (%)
1	86.7	46.7
2	93.3	83.3
3	100.0	60.0
4	80.0	76.7

2.2 不同激素配比对峨眉大黄姜丛生芽诱导的影响

选取生长状况良好且相对一致的脱毒苗分别接入不同激素配比丛生芽诱导培养基中,试验结果见表 2。7 号培养基诱导的丛生芽分化快、生长旺盛、芽数最多且健壮,丛生芽诱导率为 92.5%,诱导效果最佳;6 号培养基诱导的丛生芽芽数为 8.4 个/株,生长较快,芽色浅绿,但芽较纤细,丛生芽诱导率为 85.7%,诱导效果次之;10 号培养基诱导产生的丛生芽分化慢、芽量少且植株细弱,丛生芽诱导率为 56.2%,诱导效果最差。因此,选择 7 号培养基为峨眉大黄姜丛生芽诱导培养基,培养 30 d 后,产生的丛生芽见图 2。

2.3 试管苗根的诱导

选取生长状况基本一致且生长良好的丛生芽,分成单芽后接入诱导生根的培养基中。每个培养瓶接种 3 个单芽,每组接种 10 个培养瓶,试验结果见表 3。5 种培养基的生根诱导率均为 100%。其中 15 号培养基平均根数 17.6 条,根量最

表 3 不同激素配比对峨眉大黄姜丛生芽诱导生根的影响

培养基号	生根诱导率 (%)	平均根数 (条)	根生长情况
11	100	12.9	根量一般、较粗壮
12	100	11.7	根量少、纤弱
13	100	12.0	根量一般、较纤弱
14	100	16.3	根量较多、较粗壮
15	100	17.6	根量多、粗壮发达

多,且粗壮发达,根生长情况良好;其次为 14 号培养基,平均根数为 16.3 条,根量较多,根较粗壮,根的生长情况较 15 号培养基略差;12 号培养基平均根数为 11.7 条,根量少且根纤弱。试验结果表明,15 号培养基为最佳诱导生根的激素配比。使用 15 号培养基诱导丛生芽生根,培养 25 d 后的诱导生根约 1.5 cm(图 3)。

将生根成功后的组培苗接种到基质培养基中,在大棚中进行炼苗,培养 10 d 后,成活率可达 90% 以上,移栽成活的组培苗见图 4。



图3 峨眉大黄姜根诱导 25 d 后的生根效果



图4 峨眉大黄姜移栽成活的组培苗

3 结论与讨论

在姜茎尖的离体培养中不同激素配比对其成活率、成芽率及生长状态的影响是一个极为重要的环节^[5-8]。试验结果表明,MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L + GA₃ 0.3 mg/L 为诱导茎尖的最佳激素配比,茎尖诱导的成活率为 93.3%,成芽率为 83.3%。本结论与周庆红等在姜茎尖脱毒培养研究得出的研究结果^[9]不一致,成活率和成芽率与其研究结果相比均有所提高。王桂梅等认为在加入外源激素 6-BA 和 NAA 时,都能诱导茎尖萌动和愈伤组织产生,但添加 GA₃ 后可提高茎尖的生长速度和成芽率^[10]。

本研究峨眉大黄姜丛生芽诱导最佳增殖培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 时,丛生芽的数目较多,平均数达 12.4 个,出芽率为 92.5%,且生长健壮,本结论与黄

远新等的生姜茎尖离体培养研究结果^[11]不一致,原因可能是姜的不同品种间及发育状态可能存在一定差异,导致其叶片内的内源激素水平以及对外源激素的敏感性不同^[12],从而对相似激素配比的反应有较大差异,这不仅表现在对丛生芽的诱导上,对茎尖、生根等的诱导同样会产生影响。

生根培养结果,生根培养基为 MS + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 时诱导效果最好,生根率为 100%,平均生根数达 17.6 条,即 IBA 与 NAA 配合使用的诱导生根效果更好。当只用 1 种激素时,NAA 诱导生根效果优于 IBA。这与潘雪峰等的研究结论^[13]有所差异,本试验 11 号培养基(MS + NAA 0.5 mg/L)为最佳生根培养基,本结论与杭玲等对生姜茎尖离体培养研究得出的结论^[14]相似,他们认为 IBA 或 NAA 均可进行生根诱导,但配合使用效果更佳。

峨眉大黄姜茎尖离体培养及植株再生的影响因子中,不同组合的激素配比起着非常重要的作用。试验中选择了利用茎尖成芽后直接诱导丛生芽成苗,然后再进行根的诱导,简化了培养步骤,缩短了整个培养周期,能很好保持植株的优良性状,有效提高了茎尖脱毒快繁的速度,降低了生产成本,更有利于脱毒苗的工厂化生产。

参考文献:

- [1] 杨云颖,乔晓峰,李庆宏,等. 生姜种苗组培及栽培技术[J]. 贵州农业科学,2009,37(9):210-212.
- [2] 熊 华. 生姜的应用研究进展[J]. 中国调味品,2009,34(11):38-40,54.
- [3] Hosoki T, Sagawa Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through tissue culture[J]. Hort Science, 1977(12):451-452.
- [4] 刘 波,缪 军,吴 雄. 生姜研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2011(5):135-138.
- [5] 余桂红,张 旭,孙晓波,等. 大麦苏啤 4 号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):953-956.
- [6] 曾爱松,宋立晓,高 兵,等. 结球甘蓝小孢子胚植株再生体系的优化[J]. 江苏农业学报,2013,29(1):228-230.
- [7] 石 虎,杨永智,周 云,等. 马铃薯新品种青薯 9 号高效再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):14-19.
- [8] 杜敏华,柯 涛,韩雪梅,等. 连香树下胚轴高频离体再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):47-49.
- [9] 周庆红,曾勇军,龚伙平,等. 生姜茎尖脱毒培养研究[J]. 江西农业学报,2010,22(3):97-98.
- [10] 王桂梅,杨林栋. 马铃薯茎尖组织培养方法优化研究[J]. 安徽农学通报,2012,18(9):48-49.
- [11] 黄远新,王季春,唐道彬,等. 生姜茎尖的离体培养研究[J]. 贵州农业科学,2005,33(1):24-25.
- [12] 陈耀锋. 植物组织与细胞培养[M]. 北京:中国农业出版社,2007:62.
- [13] 潘雪峰,李绍良,符 明. 生姜茎尖离体培养的研究[J]. 海南大学学报:自然科学版,1999,17(1):59-63.
- [14] 杭 玲,黄卓忠,江 文,等. 生姜组织培养快繁技术研究与应用[J]. 江苏农业科学,2006(5):125-127.