

文章编号:1674-7054(2013)01-0189-05

黄姜花组培快繁技术

潘学峰¹,张夏莲²

(1.海南大学农学院,海南海口,570228; 2.海口市秀英区东山镇人民政府,海南海口571154)

摘要:以黄姜花的笋芽为外植体,研究了外植体的消毒、丛生芽的增殖及生根培养等关键步骤的配方。结果表明:1)利用 $\rho=1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的升汞对外植体进行消毒的最佳时间为12 min;2)黄姜花丛生芽增殖的较优配方为:3/4 MS+6-BA $3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +水解酪蛋白 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,继代周期25 d,增殖倍数为5.83;3)1/2 MS+NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生根培养基效果最好,平均生根数达9.17条,平均根长2.73 cm,植株健壮;4)将试管苗移栽在 $V_{\text{河砂}}:V_{\text{表土}}=1:1$ 的基质中,25 d后成活率可达91.67%,植株生长良好。

关键词:黄姜花;块茎;组培快繁

中图分类号: Q 944.6 **文献标志码:** A

黄姜花(*Hedychium flavum* Roxb.)是姜科(Zingiberaceae)姜花属(*Hedychium*)植物,分布于广西、贵州、云南、四川、西藏等地,性喜高温、高湿、半隐蔽的环境^[1]。黄姜花质地晶莹,白底黄斑,花形美丽,有令人愉悦的芳香^[2]。花的挥发油可作香料,具有芳香健胃的功能^[3]。其观赏价值高,是一种很好的园林观赏植物,切下后瓶插可持续开放5~6 d,是极有育种前途的芳香型切花^[2]。黄姜花传统上主要靠播种和分株繁殖^[4],分蘖系数非常低,繁殖速度缓慢,远远不能满足商品化生产的需求,因此,开展组培快繁很有必要。我国具有丰富的姜科植物资源,其观赏价值引起了国内专家学者的关注与重视^[5-7]。许多国内学者对姜科植物的组培快繁进行过研究^[8-11],但目前尚未见有黄姜花组培快繁的研究报道。本研究以黄姜花笋芽为外植体,通过比较外植体消毒时间、丛生芽的增殖及生根培养等关键步骤的配方,以期黄姜花工厂化育苗提供技术参数。

1 材料与方 法

1.1 材料 选取黄姜花地下根茎新萌发的嫩芽。

1.2 方 法

1.2.1 培养基制备 按组织培养常规方法进行配制,所有的培养基均含有质量浓度 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡拉胶, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖,pH值调至 5.8 ± 0.2 ,培养基装瓶后在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.14 MPa 高温高压下灭菌20 min,冷却备用。

1.2.2 初始培养基 本实验采用的初始培养基为MS+6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,待诱导新芽萌发后(芽长1.0~2.0 cm),再转接至继代培养基进行培养。

1.2.3 继代培养基

1)以6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为激素配比,附加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖,比较了5种不同无机盐浓度的MS基本培养基(分别为1/4 MS,1/3 MS,1/2 MS,3/4 MS,MS),每个处理接3瓶,重复3次,每瓶接种8~10个芽,30 d后观察丛生芽的增殖情况。

2)以最适的MS无机盐质量浓度为基本培养基,分别以6-BA 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行比较试验,30 d后观察结果。

3)在最适的MS无机盐质量浓度和最适6-BA质量浓度的基础上,添加500,1 000,1 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水解酪蛋白(Casein Hydrolysate, CH)与不加CH为对照进行比较,接种后30 d调查。

收稿日期:2013-05-06

基金项目:国家科技基础条件平台建设子项目(2005DKA21006)

作者简介:潘学峰(1963-),男,海南文昌人,海南大学农学院高级实验师。

1.2.4 生根培养基 当丛生芽大部分长至2.0~3.0 cm时,将其切成单株转接到生根培养基中。每个处理接种30~35株芽苗,尽量要求无根苗大小一致,25 d后统计生根率。生根培养基为:①1/2 MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹;②1/2 MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹;③1/2 MS + IAA 0.5 mg · L⁻¹;④1/2 MS。

1.2.5 培养条件 培养室温度为(25 ± 3) °C,以日光灯为光源,光照强度1 500~2 000 lx,光照10~12 h · d⁻¹。

1.2.6 试管苗的移栽 试管苗移栽时,先将培养瓶移出培养室,于室温下放置2~3 d,再将瓶盖去掉,在室温下继续炼苗2~3 d,取出苗用流水洗净根部培养基,待自然凉干后再移栽于V_{河砂}:V_{表土} = 1:1的基质中,25 d后调查成活率。

2 结果与分析

2.1 升汞不同消毒时间的灭菌效果及无菌芽的获得 从表1可以看出,ρ = 1 g · L⁻¹的升汞消毒12 min对外植体灭菌效果最好,其外植体成活率为91.6%,污染率为40%。而消毒16 min和20 min的外植体成活率仅为46.1%和20%,说明消毒时间过长,对植物有明显毒害作用,容易降低外植体成活率。消毒8 min的外植体,虽然成活率达100%,但其污染率高达85%,说明消毒时间过短,没有达到消毒效果。

没有污染的笋芽茎尖,约10 d基部开始膨大,13 d后开始抽芽(见图版-1),约20 d芽基部开始出现愈伤组织,约1个月形成丛生芽(见图版-2)。

表1 升汞不同灭菌时间的效果

Tab.1 Effects of different durations of time on sterilization with mercuric chloride

消毒时间/min Sterilization time	接种外植体数/个 Number of inoculated explants	污染数/个 Number of explants contaminated	污染率/% Contamination rate	成活数/个 Number of survival	成活率/% Survival rate
8	20	17	85	3	100
12	20	8	40	11	91.6
16	20	7	35	6	46.1
20	20	5	20	3	20

注:培养基为MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 30 g · L⁻¹蔗糖,成活率 = 成活数/(接种外植体数 - 污染数)

Note: Medium: MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 30 g · L⁻¹ sucrose, survival rate = number of survival/(number of inoculated explants - number of explants contaminated)

2.2 丛生芽的继代增殖培养

2.2.1 不同MS无机盐比例对丛生芽继代增殖的影响 由表2可看出,3/4 MS的处理对丛生芽增殖率的影响极显著优于其他处理,其平均增殖倍数为4.1,芽健壮且大小均匀;MS,1/2 MS与1/3 MS处理之间无显著差异,平均增殖倍数分别为2.97,2.76和2.43,芽均较健壮;而1/4 MS的增殖效果较差,平均增殖倍数为2.16。由此可得出,3/4 MS的培养基对黄姜花的丛生芽继代增殖效果最好。

表2 不同MS无机盐比例对丛生芽增殖率的影响

Tab.2 Effects of different proportions of MS inorganic salt on proliferation of bud clusters

培养基 Medium	重复/Replication			平均增殖倍数 Average proliferation coefficient	丛生芽的生长状况 Growth of clustered buds
	I	II	III		
MS	3.0	2.8	3.1	2.97B	较健壮 Grew better
3/4 MS	4.4	4.1	3.8	4.10A	健壮、均匀 Grew well, uniform
1/2 MS	2.6	2.8	2.9	2.76BC	较健壮 Grew better
1/3 MS	2.6	2.4	2.3	2.43CD	较健壮 Grew better
1/4 MS	2.0	2.3	2.2	2.16D	较健壮、大小不一 Grew better, not of uniform size

注:激素组合为6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹; F = 45.35 > F_{0.01} = 5.99;相同大写字母为差异不显著,不同大写字母为差异极显著,下同

Note: The hormone combination was 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹; F = 45.35 > F_{0.01} = 5.99. The same capital letters mean no significant differences, and different capital letters mean significant differences, similarly hereinafter

2.2.2 不同6-BA质量浓度对丛生芽增殖的影响 将芽分别接种到以3/4 MS为基本培养基,附加不同6-BA质量浓度的培养基中进行增殖,30 d后观察芽的增殖情况,结果见表3。

从表3可以看出:在6-BA质量浓度为0.5~3.5 mg·L⁻¹范围时,丛生芽的平均增殖倍数随着浓度的升高而升高;当6-BA质量浓度达到4.0 mg·L⁻¹时,丛生芽的平均增殖倍数随着浓度的升高而降低,这表明丛生芽对6-BA质量浓度变化较敏感。6-BA质量浓度为3.5 mg·L⁻¹时,其平均增殖倍数最高,达到4.73倍,丛生芽浓绿且正常;6-BA质量浓度达到4.0 mg·L⁻¹时,平均增殖倍数随之减小;6-BA质量浓度达到5.0 mg·L⁻¹时,部分芽开始失水,生长状况较差。实验结果表明,6-BA质量浓度为3.5 mg·L⁻¹时,丛生芽的增殖效果最好(见图版-3),其增殖速度快,芽生长正常且色泽浓绿。

表3 不同6-BA质量浓度对丛生芽增殖率的影响

Tab.3 Effects of different 6-BA concentrations on proliferation of bud clusters

$\rho(6-BA)/$ (mg·L ⁻¹)	重复 Repeat			平均增殖倍数 Average proliferation coefficient	芽的生长状况 Growth of buds
	I	II	III		
0.5	1.5	1.3	1.6	1.46F	芽较小而色淡 Buds tiny, light in color
1.0	2.0	2.2	1.9	2.03E	芽淡绿、正常 Buds light green, normal
1.5	2.0	2.6	2.7	2.43DE	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
2.0	3.2	3.0	3.2	3.13C	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
2.5	3.5	4.0	3.9	3.80B	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
3.0	4.1	4.0	4.3	4.13B	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
3.5	4.8	4.8	4.6	4.73A	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
4.0	4.0	3.7	3.5	3.73B	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
4.5	2.9	3.2	3.2	3.10C	芽绿、正常 Buds green, normal
5.0	2.7	2.5	2.5	2.56D	芽粗,呈失水状 Buds robust, wilt

$$F = 73.28 > F_{0.01} = 3.46$$

2.2.3 添加水解酪蛋白(CH)对丛生芽继代增殖的影响 将芽分别接种到附加不同质量浓度CH的3/4 MS+6-BA 3.5 mg·L⁻¹培养基中进行增殖,30 d后观察芽的增殖情况,结果见表4。

由表4可以看出:当CH质量浓度为1 500 mg·L⁻¹时,丛生芽的平均增殖倍数最高,达到5.96倍,芽浓绿且健壮,但是在实验过程中观察发现,添加1 500 mg·L⁻¹CH的培养基容易感染细菌,污染率高。而CH质量浓度为0和500 mg·L⁻¹的芽平均增殖倍数分别为4.83和5.26倍。因此,最适宜丛生芽增殖的CH质量浓度为1 000 mg·L⁻¹,其平均增殖倍数为5.83倍,芽浓绿且健壮。

综上可知,丛生芽增殖的较优配方是:3/4 MS + 6-BA 3.5 mg·L⁻¹ + CH 1 000 mg·L⁻¹。

表4 不同质量浓度的CH对丛生芽增殖的影响

Tab.4 Effects of different CH concentrations on proliferation of bud clusters

$\rho(CH)/$ (mg·L ⁻¹)	重复/Repeat			平均增殖倍数 Average proliferation coefficient	芽的生长状况 Growth of buds
	I	II	III		
0	4.8	4.9	4.8	4.83C	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
500	5.1	5.5	5.2	5.26B	芽浓绿、正常 Buds dark green, normal
1 000	5.8	5.8	5.9	5.83A	芽浓绿、健壮 Buds dark green, robust
1 500	5.8	6.0	6.1	5.96A	芽浓绿、健壮 Buds dark green, robust

$$F = 45.02 > F_{0.01} = 7.59$$

2.3 试管苗的生根 将具叶的芽苗(高约3 cm)切下转入生根培养基中,25 d后调查。由表5可知,在所试的生根培养基上,黄姜花试管苗均能生根(见图版-4),生根率达100%。其中,1/2 MS + NAA 0.5 mg·L⁻¹的平均生根条数最多,为9.17条,显著高于其他激素(IAA, IBA)组合,而对照组、添加IAA和IBA的组合间平均生根条数无显著差异。

对于试管苗根长的生长状况,1/2 MS + NAA 0.5 mg·L⁻¹培养基对丛生芽的根长促生效果最好,平

均根长为 2.73 cm, 显著优于不添加生长素的 1/2 MS 和添加生长素的 1/2 MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹, 1/2 MS + IAA 0.5 mg · L⁻¹ 培养基, 它们的平均根长分别为 1.90, 1.93 和 2.33 cm。其中, 1/2 MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基对根长的促生效果一般, 与不添加生长素的 1/2 MS 培养基无显著差异。

对于试管苗株高的生长状况, 不添加生长素的 1/2 MS 和添加生长素的 1/2 MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹, 1/2 MS + IAA 0.5 mg · L⁻¹, 1/2 MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹ 4 种培养基中, 试管苗的平均株高分别为 4.27, 5.43, 4.77 和 4.33 cm。方差分析结果表明, 1/2 MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹ 培养基对试管苗的株高作用效果最好, 显著优于不添加生长素的 1/2 MS 和添加生长素的 1/2 MS + IAA 0.5 mg · L⁻¹, 1/2 MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹ 培养基。其中, 1/2 MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹ 的作用效果一般, 与不添加生长素的 1/2 MS 培养基无显著差异。

综上所述, 1/2 MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基对黄姜花试管苗生根效果最好。

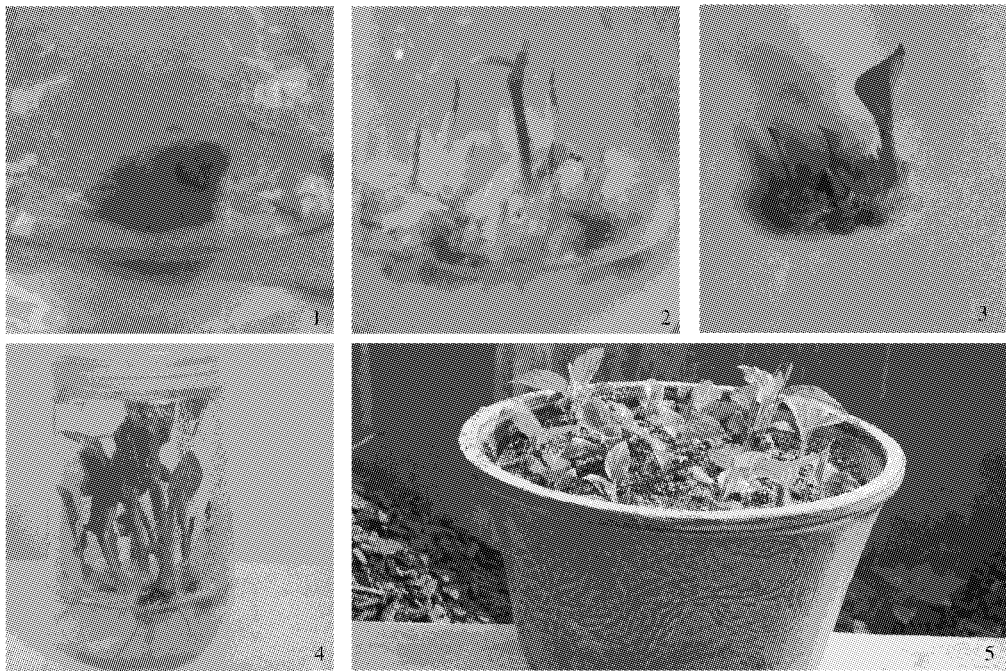
表 5 生根培养基对黄姜花试管苗生根及株高的影响

Tab. 5 Effects of rooting medium on rooting and height of *Hedychium flavum* Roxb

培养基 Medium	调查株数/株 Number of plants investigated	生根率/% Rooting rate	生根数/条 Number of roots	根长/cm Root length	株高/cm Plant height
1/2 MS	90	100	4.37C	1.90C	4.27C
1/2 MS + NAA 0.5 mg · L ⁻¹	90	100	9.17A	2.73A	5.43A
1/2 MS + IBA 0.5 mg · L ⁻¹	90	100	4.47BC	1.93C	4.33C
1/2 MS + IAA 0.5 mg · L ⁻¹	90	100	4.67B	2.33B	4.77B

注: $F_{\text{生根条数}} = 1\ 034.53$, $F_{\text{根长}} = 15.36$, $F_{\text{株高}} = 37.05$, 均 $> F_{0.01} = 7.59$

Note: $F_{\text{number of roots}} = 1\ 034.53$, $F_{\text{root length}} = 15.36$, $F_{\text{plant height}} = 37.05$, Mean $> F_{0.01} = 7.59$



图版说明

1. 外植体开始萌芽; 2. 刚形成的丛生芽; 3. 增殖的丛生芽; 4. 生根的试管苗; 5. 移栽成活的试管苗

Plates explanation: 1. The explants begin to germinate; 2. Newly formed bud clusters; 3. Proliferated bud clusters;

4. Rooted tube plantlets; 5. Survival of plantlets transplanted

2.4 试管苗的移栽 由于试管苗一直在最适宜的人工环境下生长, 一时无法适应外界的自然环境, 对外界的抵抗能力较差, 因此, 在试管苗移栽前, 需要先炼苗。先将培养瓶移出培养室, 于室温下放置 2~3 d, 再将瓶盖去掉, 在室温下继续炼苗 2~3 d, 取出苗用流水洗净培养基, 待自然凉干后再移栽于 $V_{\text{河砂}} : V_{\text{表土}} = 1 : 1$ 的基质中。移栽 25 d 后即可成活 (见图版 - 5), 成活率高达 91.67% (移栽 120 株, 成活 110 株)。

3 讨论

6-BA 的含量对芽的增殖影响很大,实验结果表明,黄姜花丛芽增殖效果最好的是 6-BA 质量浓度为 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,增殖倍数为 4.73 倍,丛生芽浓绿、健壮;当 6-BA 质量浓度达到 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,增殖倍数开始下降;6-BA 质量浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,部分芽开始失水,生长状况较差。

在黄姜花丛生芽增殖过程中,水解酪蛋白(CH)对芽的增殖有一定的促进作用,可能与 CH 中存在一些有机天然复合物有关。CH 成分比较复杂,大多含有氨基酸、激素、酶等一些复杂化合物^[12],常被人们作为一种有机氮添加物用于植物组织培养中^[13],为组织的生长提供更丰富的有机氮素营养^[14],添加适量的 CH 到分化培养基中可刺激体细胞胚的迅速发育^[15],促进细胞分裂,对丛生芽的增殖与分化具有明显的效果^[12]。

黄姜花试管苗虽然在不添加生长素的 1/2 MS 上也能 100% 生根,但从生根条数、根长、株高等方面考量,还是 1/2 MS + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基对黄姜花试管苗的生根效果最好。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志·16 卷(第 2 分册)[M]. 北京: 科学出版社,1981,11:26-27.
- [2] 高江云,陈进,夏永梅. 国产姜科植物观赏特性评价及优良种类筛选[J]. 园艺学报,2002,29(2):158-162.
- [3] 高江云,夏永梅,黄加元,等. 中国姜科花卉[M]. 北京: 科学出版社,2006:113.
- [4] 曾宋君,段俊. 姜目花卉[M]. 北京:中国林业出版社,2003:12-13.
- [5] 吴德琳,陈忠毅. 极有前途的野生姜科花卉资源[J]. 植物杂志,1988(2):24-25.
- [6] 陈忠毅. 姜科花卉的瑰丽风采[J]. 花卉,1989(5):20-21.
- [7] 胡秀,刘念. 中国姜花属 *Hedychium* 野生花卉资源特点[J]. 广东园林,2009(4):7-11.
- [8] 潘学峰,杨海菊. 火炬姜叶片培养及植株再生[J]. 海南大学学报:自然科学版,2002,20(3):252-257.
- [9] 潘学峰,李绍良,符明. 生姜茎尖离体培养研究[J]. 海南大学学报:自然科学版,1999,17(1):59-63.
- [10] 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.
- [11] 胡玉娘. 红姜花的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1989(1):43-44.
- [12] 王家福. 花卉组织培养与快繁技术[M]. 北京:中国林业出版社,2006:54.
- [13] 兰妍,张博,李培英,等. 水解酪蛋白对诱导苜蓿愈伤组织的影响[J]. 新疆农业大学学报,2006,2(91):87-89.
- [14] 李忠光,龚明. 水解酪蛋白对烟草愈伤组织和悬浮培养细胞生长的促进作用[J]. 云南师范大学学报:自然科学版,2006,2(64):60-61.
- [15] 巩振辉. 园艺植物生物技术[M]. 北京:科学出版社,2009:32.

Rapid Propagation of *Hedychium flavum* Roxb.

PAN Xuefeng¹, ZHANG Xialian²

(College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; Haikou Dongshan Town People's Government in Xiuying District, Haikou 571154, China)

Abstract: Shoots newly sprouting from underground rhizome of *Hedychium flavum* Roxb. were used as explants for rapid propagation. The explants were sterilized, induced into clustered shoots, generated into plantlets and rooted on different media, and then transferred onto the mixed substrates of sand and surface soil for culture. The explants sterilized with HgCl_2 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) for 12 min gave best result. The optimal medium for proliferation of clustered shoots was $3/4\text{MS} + 6\text{-BA } 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{CH } 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{sugar } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. On this medium clustered shoots were subcultured for 25 days as a cycle at a proliferation coefficient of 5.83. The plantlets were best rooted on the rooting medium of $1/2\text{MS} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, producing upto 9.17 roots/plantlet with an average root length of 2.73 cm, and the rooted plantlets grew robust and 5.43 cm tall by average. The rooted plantlets transferred onto the substrate of river sand 50% + surface soil 50% (V : V) for culture gave 91.67% survival after 25 days of transfer and grew well.

Key words: *Hedychium flavum*; tuber; rapid propagation; tissue culture