

Union Medical College, Beijing 100094, China;

2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

3. Zhejiang Forestry College Research Centre for Natural Pharmacology, Lin'an 323000, China;)

[Abstract] **Objective:** To study the genetic relationship and diversity of 3 species which belong to *Tripterygium*. **Method:** Samples were collected and divided into 4 types: typical *T. wilfordii*, typical *T. hypoglaucum* and their middle type according to morphological characters, and *T. regelii*. RAPD markers were used to measure the genetic relationship and diversity of 110 individuals from 22 natural populations in China. **Result and Conclusion:** 10 primers were selected from 100 ones screened. A total of 128 bands were scored and 123 of them were polymorphic. Cluster analysis indicated that all the samples could be divided into 3 parts: 5 individuals from *T. regelii* gathered closely and were separated from other population and formed single branch. All 4 populations from *T. hypoglaucum* gathered directly. The middle type showed a nearer relationship with *T. wilfordii* than with *T. hypoglaucum*, although there was genetic differentiation between populations from middle type and those from *T. wilfordii*. The middle type has more diversity than *T. wilfordii*. The distance between different middle type populations and *T. wilfordii* was different. The existence of middle type populations between *T. wilfordii* and *T. hypoglaucum* suggested that the 2 species should be combined into one species. Considering all populations except *T. regelii*, the generic differentiation among populations was significant and the genetic diversity existed mainly among different populations. So samples of *Tripterygium* should be collected from different populations for the reservation of the genetic diversity.

[Key Words] *Tripterygium wilfordii*; *T. hypoglaucum*; middle type; RAPD; genetic relationship; genetic diversity

[责任编辑 张宁宁]

怀姜试管姜诱导技术的研究

薛建平^{1,2*}, 黄月琴², 张爱民²

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 淮北煤炭师范学院 生物系, 安徽 淮北 235000)

[摘要] 目的:以清化姜脱毒苗为材料,研究不同浓度的蔗糖, NAA, PP₃₃₃, 6-BA 对试管姜诱导的影响。方法:采用正交实验方法配制成不同的培养基。结果与结论:蔗糖是试管姜形成的主要影响因素, PP₃₃₃, NAA 次之, 6-BA 则抑制试管姜的形成。诱导试管姜的适宜培养基为 MS + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + PP₃₃₃ 0.2 mg · L⁻¹ + 8% 蔗糖。

[关键字] 姜; 试管姜; 组织培养; 正交实验

[中图分类号] S 567 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2007)16-1621-04

姜 *Zingiber officinale* Rosc. 为多年生单子叶草本植物, 以地下根状茎入药, 具有发汗解毒、温中止吐、抗晕止咳等功效。近年研究表明, 姜具有降血脂、抗肿瘤、抗氧化作用^[1]。河南怀姜也叫清化姜、上庄姜, 已有 1 700 多年的栽培历史, 它块大皮薄、丝细肉腻、

香辣浓郁宜口, 百煮不烂, 畅销于华北、东北、西北诸省及东南亚和欧美市场^[2]。但由于怀姜生产上长期采用根状茎进行无性繁殖和栽培, 病毒^[3,4]、病菌^[5]易在体内积累, 导致生长势衰退, 品种退化, 产量品质下降, 病毒病、癞皮病以及姜瘟病发生日趋严重, 成为制约怀姜生产的重要因素。通过姜茎尖脱毒技术, 以上问题已能得到有效地解决^[6], 但姜脱毒苗移栽成活率低、育苗周期长、运输不便利, 从而大大限制了其在生产上的推广^[7]。近年来, 随着植物生物技术的发展, 人们先后在试管中诱导出了半夏^[8]、马铃薯^[9]、

[收稿日期] 2006-09-14

[基金项目] 安徽省“十五”二期重点项目(03013003); 郑州轻工业学院博士基金资助

[通讯作者] * 薛建平, Tel: (0371) 63627070, E-mail: xuejp2000@yahoo.com.cn

芋^[10]等,尝试替代试管脱毒苗,其中试管半夏的培养技术日趋成熟,完全可以替代试管苗作为商品供应^[11,12]。但试管姜的研究刚刚起步,国内仅有山东莱芜大姜^[13,14]和江西兴国九山生姜^[15]等试管姜诱导成功的报道,由于姜品种不一样,研究结果相互矛盾。目前关于河南怀姜试管姜的诱导技术尚未见报道,因此作者采用多因素正交实验,研究不同因素对怀姜试管姜诱导的影响,从中筛选适宜的培养基,为怀姜试管姜的规模化生产提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料 怀姜脱毒试管苗,由淮北煤炭师范学院药用植物细胞工程研究室提供。

1.2 培养基及培养条件 以 MS 为基本培养基,用 0.8% 的琼脂固化, pH 5.8 ~ 6.0, 附加不同浓度的植物生长物质和蔗糖,分装于 100 ~ 150 mL 的三角烧瓶中,在 121 °C 湿热灭菌 15 ~ 20 min。材料接种后放在光照培养箱中培养,温度 (25 ± 1) °C, 光照强度为 2 000 ~ 3 000 lx, 光照时间 12 h · d⁻¹。

1.3 方法 采用 4 因素 3 水平的 L₉(3⁴) 正交试验方案配制培养基(表 1)。每种处理接种姜苗 20 瓶,每瓶接种 2 株,重复 3 次,定期观察记录,50 d 后分

析统计试验结果。

表 1 水平因素

水平	A 蔗糖/%	B NAA/mg · L ⁻¹	C PP ₃₃₃ /mg · L ⁻¹	D 6-BA/mg · L ⁻¹
1	4	0	0	0
2	8	0.5	0.1	0.5
3	12	1.0	0.2	1.0

2 结果与分析

2.1 PP₃₃₃对试管姜形成的影响 正交表中的均值 K 越大,则说明该因子的某水平越好。正交实验结果分析表明(表 2), PP₃₃₃ 的均值 K₃ > K₂ > K₁, 说明在 0 ~ 0.2 mg · L⁻¹ 对试管姜的诱导起促进作用。添加 PP₃₃₃ 的培养基中,根状茎膨大的效果较好,尤其是 PP₃₃₃ 为 0.2 mg · L⁻¹ 的 A₁B₃C₃D₃, A₂B₂C₃D₁ 和 A₃B₁C₃D₂ 培养基,平均诱导率为 48.5%, 平均单株根茎重最高为 0.9 g。另外,通过观察姜苗生长情况发现,加有 PP₃₃₃ 的培养基中平均单株根的数目比未加 PP₃₃₃ 的培养基多而且粗壮(图 1, 2)。这是因为 PP₃₃₃ 有促进根系生长的作用,但就株高来看,未发现 PP₃₃₃ 矮化植株的作用,可能是 PP₃₃₃ 使用的浓度较低的原因。

表 2 不同培养基对试管姜诱导的正交试验

培养基编号	因素				平均株高 /cm	诱导率 /%	单株根茎重 /g	单株根数 /个
	蔗糖/%	NAA/mg · L ⁻¹	PP ₃₃₃ /mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹				
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	4	0	0	0	1.50	12.4	0.24	4
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	4	0.5	0.1	0.5	2.00	29.8	0.4	7
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	4	1.0	0.2	1.0	4.00	46.1	0.51	9
A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	8	0	0.1	1.0	2.70	39.2	0.60	7
A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	8	0.5	0.2	0	3.60	78.9	0.90	8
A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	8	1.0	0	0.5	5.30	56.1	0.75	5
A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	12	0	0.2	0.5	0.30	20.4	0.31	8
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	12	0.5	0	1.0	3.00	12.8	0.20	5
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	12	1.0	0.1	0	4.60	31.8	0.30	6
K ₁	29.433	24.000	27.100	41.033				
K ₂	58.067	40.500	33.600	35.433				
K ₃	21.667	44.667	48.467	32.700				
R	36.400	20.667	21.367	8.333				



图 1 正常生长的试管苗



图 2 PP₃₃₃对试管苗的影响

2.2 NAA 对试管姜形成的影响 NAA 的均值 $K_3 > K_2 > K_1$, 说明在 $0 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对试管姜的诱导起促进作用。NAA 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A_1B_3C_3D_3$, $A_2B_3C_1D_2$ 和 $A_3B_3C_2D_1$ 培养基中, 平均诱导率为 44.7%, 平均单株根茎重最高为 0.75 g。观察姜苗生长情况发现, 添加 NAA 的培养基中平均株高显著高于未加 NAA 的培养基, NAA 具有促进姜苗植株生长的作用。

2.3 6-BA 对试管姜形成的影响 比较 6-BA 的均值可见 $K_1 > K_2 > K_3$, 说明在 $0 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对试管姜的诱导起抑制作用, 但促进植株形成丛生芽(图3)。6-BA 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A_1B_3C_3D_3$, $A_2B_1C_2D_3$ 和 $A_3B_2C_1D_3$ 培养基中, 平均诱导率仅为 32.7%, 平均单株根茎重最高仅为 0.6 g。



图3 6-BA 对试管苗的影响

2.4 蔗糖质量分数对试管姜形成的影响 正交分析结果的极差 R 值越大, 则该因素影响越显著。蔗糖的积差 R 值最大, 为试管姜诱导的主要影响因素, 表3 正交分析结果表明, 蔗糖对试管姜诱导率达到显著影响水平($P < 0.05$)。蔗糖的均值 $K_2 > K_1 > K_3$, 说明当蔗糖质量分数小于 8% 时, 试管姜的诱导率随蔗糖质量分数的上升而上升; 蔗糖大于 8% 时, 诱导率随着蔗糖质量分数的上升而下降, 因此 8% 的蔗糖为诱导试管姜的适宜浓度。蔗糖质量分数为 8% 的 $A_2B_1C_2D_3$, $A_2B_2C_3D_1$ 和 $A_2B_3C_1D_2$ 培养基中, 根状茎膨大较早, 平均诱导率可达 58.7%, 平均单株根茎重最高可达 0.9 g(图4)。



图4 蔗糖对试管姜诱导的影响

2.5 试管姜最佳培养基分析 正交试验结果的均值 K 越大, 则说明该因子的某水平越好。根据表2 直观分析, 诱导试管姜形成时, 蔗糖, NAA, PP_{333} , 6-BA 的最佳诱导质量浓度分别为 8%, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 则获得培养基 MS +

NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + PP_{333} $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 8% 蔗糖。配制该培养基 20 瓶进行验证实验, 结果显示试管姜诱导率高达 83.0%, 显著高于正交表中的 9 种培养基, 从而验证了该种培养基为怀姜试管姜诱导的适宜培养基。

表3 试管姜诱导率的方差分析

方差来源	S	df	F	F_{α}	P
A	2 205.149	2	20.366	19.000	<0.05
B	716.722	2	6.619		
C	719.802	2	6.648		
D	108.276	2	1.000		
Error	108.28	2			
总和	3 858.229	10			

3 讨论

姜脱毒试管苗应用于大田生产, 需要严格的驯化条件和管理操作, 且驯化过程中, 试管苗在离体条件下形成的根系往往不能发挥作用而需要新生根。但试管姜具有较强的抗逆性, 不需特殊驯化, 可直接移栽大田; 姜块又具有较好的储藏性, 不受生产季节限制, 能全年生产, 因而试管姜的高效诱导和培育可望成为脱毒苗和大田生产的对接技术^[13,14]。

NAA 能刺激细胞分裂和组织分化, 促进植株生长发育。试管姜诱导培养基中添加适宜浓度的 NAA 能促进植株长高。而未加 NAA 则会造成根状茎膨大缓慢, 生长点虽然逐渐变绿, 但多数仅形成绿色小点而难以伸长, 这可能是因为缺乏 NAA 导致生长点不能进行伸长生长, 从而植株发育质量下降, 不能进行有效的光合作用而为试管姜的形成提供所需的有机物质。6-BA 对试管姜的诱导起抑制作用, 该结论与张延国等^[14,15]的报道相一致。

在 NAA, PP_{333} , 6-BA 及蔗糖 4 种因素中, 蔗糖是诱导怀姜试管姜的主要影响因素。蔗糖质量分数为 8% 时试管姜诱导的效果较好, 这可能是因为蔗糖在培养基中不仅起碳源的作用, 而且还具有调节渗透压的作用。蔗糖质量分数过低则不能提供生长所需的足够碳源, 而难以维持植株的正常生长; 蔗糖质量分数过高则导致渗透压过大而不利于植株对养分及植物生长物质的吸收, 从而影响植株的生长。另外还可能是因为蔗糖能影响生姜试管苗内源激素的变化, 郑永强等^[15]的报道指出, 蔗糖能够显著影响生姜试管苗内源激素水平, 以 ABA, GA 变化较大, 随着蔗糖质量分数的升高, GA 呈下降趋势, 而 ABA 先上升后下降。生姜试管苗以 ABA 作为正信号, GA

作为负信号,对试管姜的形成进行有效的调控。 PP_{333} 对试管姜诱导的具有促进作用,也可能是通过抑制内源赤霉素生物的合成^[16],调节ABA/GA的比值,从而使植株体内的ABA/GA有所上升。

Kühn等^[17]研究发现,在高糖条件下,马铃薯植株内蔗糖的积累和运输加快,从而促进了块茎的形成。此外,高浓度蔗糖还能诱导块茎形成过程中特异基因的表达,促进块茎储藏蛋白的积累^[18]。在试管马铃薯诱导过程中必需在培养基中添加高浓度的蔗糖,蔗糖不单是碳源,同时会使赤霉素活性降低,从而促进结薯,而这种赤霉素活性降低是通过蔗糖与赤霉素结合形成糖配体来实现的^[19]。那么在试管姜的形成中,高浓度的蔗糖是否有着相似的作用机制,值得更加深入的研究。

[参考文献]

- [1] Ma J J. Research and prospect on pharmacological effect of ginger [J]. *Anth Med*, 1999, 18(3):471.
- [2] 李俊禄,冯峰.博爱姜的栽培与管理[J]. *河南农业*, 1995, (2):27.
- [3] 徐坤,杨俊华.脱毒生姜及高产栽培技术[J]. *长江蔬菜*, 2000, (8):8.
- [4] 高山林.脱毒生姜培育及生产栽培[J]. *四川农业科技*, 2000, (2):16.
- [5] 郭启高,宋明,梁国鲁.生姜脱菌及离体快繁研究[J]. *西南农业大学学报*, 1999, 21(2):137.
- [6] 冯英,薛庆中.生姜脱菌快繁研究进展[J]. *植物学通报*, 2002, 19(4):439.
- [7] 范国强,徐坤.生姜脱毒与生产栽培技术[M].北京:中国农业出版社,2000:46.
- [8] 薛建平,朱艳芳,张爱民,等.半夏试管块茎直接再生技术的研究[J]. *作物学报*, 2004, 30(10):1060.
- [9] 柳俊,谢从华.马铃薯块茎发育机理及其基因表达[J]. *植物学通报*, 2001, 18(5):531.
- [10] 刘玉平,柯卫东,黄新芳,等.试管芋诱导的研究[J]. *园艺学报*, 2003, 30(1):43.
- [11] 薛建平,张爱民,葛红林,等.半夏的人工种子技术[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(5):402.
- [12] 张爱民,杨生玉,薛建平,等.多因素对半夏外植体直接诱导形成试管小块茎的影响[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(8):576.
- [13] 张延国,屈冬玉,杨建荣,等.试管姜诱导初探(简报)[J]. *中国蔬菜*, 2002, (1):32.
- [14] 郑永强,刘艳梅,徐坤.生姜试管苗根状茎诱导研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 35(1):39.
- [15] 郑永强,刘艳梅,徐坤,等.蔗糖质量分数对生姜试管苗生长及内源激素变化的影响[J]. *中国蔬菜*, 2004(2):15.
- [16] 陈传红,金卫根,杨柏云,等.蔗糖和多效唑对试管生姜形成的影响[J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(2):146.
- [17] Kühn C, Hajirezaei M R, Fernie A R, et al. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131:102.
- [18] 马崇坚,谢从华,柳俊,等.内源生长物质在马铃薯试管块茎形成中的作用[J]. *华中农业大学学报*, 2003, 22(4):389.
- [19] 郭华春,林满.马铃薯块茎诱导中高浓度蔗糖对内源赤霉素活性的影响.见:高新技术与马铃薯产业[M].哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2002:35.

Study on technique of inducing microrhizome in *Zingiber officinale*

XUE Jian-ping^{1,2}, HUANG Yue-qin², ZHANG Ai-min²

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2. Department of Biology, Huaibei Coal Industry Teachers College, Huaibei 235000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of different factors on induction of microtubers in *Zingiber officinale*. These factors included NAA, PP_{333} , 6-BA and sucrose. **Method:** Orthogonal design and plant tissue culture technique were used. **Result and Conclusion:** Sucrose was the most important factor on the induction of microtubers, followed by PP_{333} and NAA. 6-BA was the factor which restrained the formation of microtubers. The optimal media to induce microtubers was MS + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + PP_{333} $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose 8%.

[Key words] *Zingiber officinale*; microrhizome of ginger; tissue culture; orthogonal design

[责任编辑 张宁宁]