

黄姜根茎组培快繁技术研究

易 诚¹, 张天晓², 梁称福¹

(1. 湖南环境生物职业技术学院, 衡阳 421005; 2. 邵阳学院, 邵阳 422000)

摘要:探索了黄姜离体培养快速繁殖的有效途径。结果表明:在附加6-BA的MS培养基上,外植体可诱导出大量的致密愈伤组织,而且致密愈伤组织在分化培养基中能分化产生大量圆球茎和幼苗;而在附加2,4-D的MS培养基中,外植体被诱导出疏松愈伤组织,在随后的分化培养基上只能产生数量有限的幼苗。带枝条的圆球茎在MS+NAA0.5 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹生根培养基上的生根率达到88.2%;移栽成活率达85%。

关键词:黄姜;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S632.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2008)01-0011-03

Studies on Rhizome Culture and Rapid Propagation of *Dioscorea Zingi berensis* C. H. Wright

YI Cheng¹, ZHANG Tian-xiao², LIANG Cheng-fu¹

(1. Hunan Environment-biological Polytechnic, Hengyang 421005; 2. Shaoyang College, Shaoyang 422000)

Abstract: The effective approach of rhizome culture and rapid propagation of *Dioscorea Zingi berensis* C. H. Wright was probed into in this paper. The results showed that: a great quantity of compacted callus were induced on the MS medium supplemented with 6-BA and a large amounts of corms and young seedlings were differentiated on the differentiation medium, but plenty of loosened callus on the MS medium supplemented with 2,4-D and limited young seedlings on the differentiation medium. The rooting rate of the corms with branches amounted to 88.2% on the medium of MS+NAA0.5 mg·L⁻¹+IAA0.5 mg·L⁻¹ and the transplanting survival rate reached 85%.

Key words: *Dioscorea Zingi berensis* C. H. Wright; tissue culture; rapid propagation

黄姜是薯蓣属的一种重要药用植物,为我国特有种。其根状茎内有高含量的薯蓣皂素,是合成甾体类激素药物的重要原料,具有抗炎、避孕、镇痛、麻醉、杀虫等功效;根状茎可直接入药,有祛湿和清热解毒之功效;水溶物可生产治疗冠心病的良药;其活性物质还是杀灭钉螺,防治血吸虫病的理想药物^[1]。黄姜快速繁殖及皂素含量高的优良单株选育具有十分重要的意义。因为黄姜是雌雄异株,有性繁殖会导致后代性状发生变异,同时种子的萌发比较困难,在优化条件下,成苗率也只有45%^[2]。黄姜的无性繁殖可以保持后代性状的稳定,但年繁殖率仅为3~6倍,不能快速推广黄姜的优良单株或品种。组

织培养技术是快速繁殖植物优良单株的有效方法,一些有重要经济价值的薯蓣属植物的组织培养已有报道,如通过茎段培养方法快速繁殖小花黄姜^[3]和菊叶薯蓣^[4],陈永勤等报道了以成熟叶片为外植体快速繁殖黄姜的方法^[5]。我们以高含量单株根状茎萌发的幼茎为材料,采用两种不同的诱导方法进行对比研究,建立了黄姜高效的离体再生技术。

1 材料与方法

1.1 材料

黄姜单株的根茎由衡东县黄姜生产基地提供。

1.2 培养基和培养条件

以MS作为基本培养基,附加蔗糖3%,琼脂0.7%。愈伤诱导在黑暗条件下进行,30 d后继代并光照培养,光照强度为1 000 lx,光周期为12 h·d⁻¹,培养温度25~28℃;诱导分化和生根培养的光照强度为1 500~2 000 lx,14 h·d⁻¹。

收稿日期:2007-06-06

基金项目:湖南教育厅科技计划项目(04C027);湖南省科技厅科技计划项目(01JZY2095)

第一作者简介:易诚(1970-),男,湖南衡阳人,博士,副教授,从事资源开发与环境生物技术研究。E-mail: yicheng5231@163.com.

1.3 无菌外植体的获得

将根茎切块,每块留1~2个芽眼;然后种于盆中,覆以5~6 cm厚的土层,室内培养,并保持土层湿润,温度约25℃;15~20 d后,可见嫩芽冒出土层。轻轻挖土,取出整个嫩芽,用毛刷在自来水下轻轻刷洗后用70%的乙醇消毒8 s,无菌水冲洗3~4次,再用0.1%的升汞消毒8~10 min,无菌水冲洗3~5次。接种时将幼茎切成0.5 cm长的组织块置于不同的诱导培养基上。

1.4 愈伤组织的诱导和继代培养

以附加不同浓度的2,4-D及6-BA的MS培养基作为愈伤组织的诱导培养基,30 d后将所获得的愈伤组织在相应的最佳诱导培养基上继代培养。

1.5 植株再生

不定芽的分化培养基采用三因素二水平设置:6-BA、KT和NAA三种激素;6-BA设2.0、3.0 mg·L⁻¹,KT0.5、1.0 mg·L⁻¹,NAA0.5 mg·L⁻¹各2个浓度水平。不定芽生根的培养基也采用三因素二水平设计:NAA、IAA和6-BA三种激素;NAA设0.5、1.0 mg·L⁻¹,IAA设0.1、0.5 mg·L⁻¹,6-BA设0.02 mg·L⁻¹各2个浓度水平。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

在超静台上将处理好的材料切成约0.5 cm长的小段,接种在不同的愈伤诱导培养基上,暗培养30 d(见表1)。

表1 2,4-D和6-BA对黄姜愈伤组织诱导的影响

激素/mg·L ⁻¹		接种数	出愈数	出愈率/%	愈伤量	质地、颜色和形状
2,4-D	6-BA					
1.0	0.0	24	20	83.3	+	疏松、黄白色、圆球状
2.0	0.0	24	22	91.7	++	疏松、淡黄色、圆球状
3.0	0.0	24	22	91.7	++	疏松、淡黄色、圆球状
4.0	0.0	24	24	100.0	++	疏松、黄色、圆球状
5.0	0.0	24	24	100.0	+++	疏松、黄色
6.0	0.0	24	23	95.8	++	疏松、黄色
0.0	1.0	24	21	87.5	++	致密、黄白色、姜块状
0.0	2.0	24	22	91.7	++	致密、黄白色、姜块状
0.0	3.0	24	24	100.0	+++	致密、黄白色、姜块状
0.0	4.0	24	24	100.0	++	致密、黄白色
0.0	5.0	24	20	83.3	++	致密、黄白色
0.0	6.0	24	19	79.2	+	致密、白色

注:“+”越多表示产生愈伤组织的量越多。

从表1可以看出,2,4-D的诱导率均在83%以上,而且发生得快,在1.0~6.0 mg·L⁻¹的激素浓度条件下都能很快出愈,约20 d就能看到外植体周围有淡黄色的愈伤组织产生;生长也快,生长速度以5.0 mg·L⁻¹条件下最快;愈伤组织结构疏松。6-BA与2,4-D的诱导情况有相似性,愈伤组织的产生和生长较快,以3.0 mg·L⁻¹的浓度为最好。但是6-BA诱导出来的是黄白色结构致密的愈伤组织。30 d后将两种愈伤继代到各自的最佳诱导培养基上,进行光照培养,致密愈伤组织很快由黄白色转变成绿色,10 d后就可以看到许多小圆球状(圆球茎)突起,15 d后形成了芽或丛芽;而疏松愈伤没有太大的变化,只是颜色更深一些,没有芽的分化。

2.2 愈伤组织不定芽的诱导

在超静台上将两种愈伤切成约0.5 cm见方的小块,接种到不定芽分化培养基上,光照培养30 d,统计结果见表2。从表2可以看出,致密愈伤组织适合分化成苗,在所有分化培养基中,诱导率均在

73%以上。其中在MS+6-BA2.0 mg·L⁻¹+KT0.5 mg·L⁻¹培养基中,圆球茎和丛生芽的分化最快,分化率为100%,而且致密愈伤组织生长也快,达到了在同一培养基中既培养了愈伤,又高效分化成苗,因而可以长期稳定地供应幼苗;而疏松愈伤组织的分化率低得多,且芽少,生长得慢。

2.3 植株生根培养与移栽

切取2 cm长以上的健壮枝条及携带幼苗的圆球茎接种在生根培养基中,光照培养30 d。从表3可以看出,枝条直接生根比较困难,而带有幼苗的圆球茎生根容易得多,以MS+NAA0.5 mg·L⁻¹+IAA0.5 mg·L⁻¹作生根培养基,生根率最高,达到88.2%,而且根多,为生长于培养基中的营养根,适于移栽。

将根生长良好的完整植株接种在1/2MS无激素半固体(0.4%的琼脂)培养基中炼苗10~15 d,而后打开瓶盖,在温室通风炼苗5 d。轻轻洗掉附在植株上的培养基,移栽到细沙中,浇以少量液体的MS+NAA0.5 mg·L⁻¹+IAA0.5 mg·L⁻¹的生根培养

基,过 15~20 d 后,移栽到盆栽土中或大田中,成活率达 85%。

表 2 不同激素条件对黄姜愈伤组织不定芽诱导的影响

激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			疏 松 愈 伤				致 密 愈 伤			
6-BA	KT	NAA	接种数	芽数	芽长/cm	诱导率/%	接种数	芽数	芽长/cm	诱导率/%
2.0	0.5	0.0	30	1.5	2.2	70.0	30	7.2	3.2	100
2.0	0.5	0.5	30	1.5	2.1	63.3	30	4.5	2.9	76.7
2.0	1.0	0.0	30	1.2	2.2	53.3	30	5.8	2.9	83.3
2.0	1.0	0.5	30	1.1	1.8	46.7	30	5.4	3.0	86.7
3.0	0.5	0.0	30	1.3	2.1	63.3	30	5.7	2.7	93.3
3.0	0.5	0.5	30	1.2	1.9	56.7	30	4.6	2.8	76.7
3.0	1.0	0.0	30	1.8	2.2	73.3	30	5.1	2.8	90.0
3.0	1.0	0.5	30	1.2	2.3	50.0	30	3.6	2.7	73.3

注:芽数和芽长为平均值,统计的芽长均在 0.5 cm 以上。

表 3 不同激素条件对带幼苗的圆球茎生根和枝条生根的影响

激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			带幼苗的圆球茎				枝 条			
NAA	LAA	6-BA	接种数	根数	根长/cm	生根率/%	接种数	根数	根长/cm	生根率/%
0.5	0.1	0.0	40	4.5	2.4	80.0	40	0.7	1.6	32.5
0.5	0.1	0.2	33	1.9	2.0	54.5	41	0.8	1.5	31.7
0.5	0.5	0.0	34	5.7	2.2	88.2	40	0.5	1.5	22.5
0.5	0.5	0.2	30	2.1	1.9	60.0	34	0.5	1.7	23.5
1.0	0.1	0.0	36	3.7	2.0	83.3	31	0.4	1.7	16.1
1.0	0.1	0.2	38	1.6	1.6	57.9	36	0.4	2.1	16.7
1.0	0.5	0.0	42	3.1	1.9	76.2	38	0.7	1.9	28.9
1.0	0.5	0.2	41	1.6	1.6	61.0	35	0.5	1.9	25.7

注:根数和根长为平均数,统计的根长均在 0.5 cm 以上。

3 讨论

3.1 愈伤组织的诱导和分化

2,4-D 诱导出来的是疏松愈伤组织,在分化培养基中不能产生旺盛的植株,而 6-BA 诱导产生出的致密愈伤组织,在分化培养基中能产生丛生芽,得到大量的植株,适于快速繁殖;而且致密愈伤组织的生长和幼苗的繁殖同时同一培养基中完成,可以不断地供应幼苗,达到了高效无性快繁的目的。

研究发现低浓度的 6-BA 更好地促进枝叶的生长,但是致密愈伤组织生长比较慢,不利于快速繁殖长期供应幼苗;6-BA 的浓度提高后,致密愈伤组织生长较快,可是丛芽分化不多。在 MS+6-BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中,添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KT,则兼顾了致密愈伤的生长和芽的分化,从而解决了枝叶生长和致密愈伤组织生长的矛盾,使两者都能较快生长。

与叶片外植体相比,茎段外植体的出愈时间和不定芽分化的时间要快得多^[5],分别在 30 d 内和 20 d 内就可以完成,更适于用作黄姜组织培养无性快繁的外植体材料。

3.2 生根培养和移栽

用带有幼苗的致密愈伤组织进行生根培养,移

栽后致密愈伤组织易腐烂死亡,导致移栽不能成活;然而用枝条直接进行生根培养,结果又比较困难,生根率不高。实验选择带有幼苗的小圆球茎进行生根培养,明显提高了生根率和成活率。圆球茎为致密愈伤组织上首先分化产生的小圆球状突起,具有茎的结构,在其上产生芽原基,继而形成幼苗。圆球茎容易生根,移栽易成活。有的材料在 MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上生根良好,可是枝叶枯萎或者叶片不展开,接种到 1/2MS 无激素(或添加 KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)半固体(0.4%琼脂)培养基上炼苗一段时间,发现有促进枝叶生长和叶片展开的作用,使之容易移栽成活。

参考文献:

- [1] 张永忠,余龙江,徐辉碧.黄姜的研究进展[J].中药材,2003,26(5):376-378.
- [2] 黄涛,张友德,张君芝,等.温度、光照和几种药剂对黄姜种子萌发的影响[J].华中农业大学学报,1999,18:83.
- [3] 李运合,姚家玲,张友德,等.小花黄姜的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2003,9(5):469-470.
- [4] 何惠英,兰芹英,张艳军.菊叶薯蓣的组织培养[J].植物生理学通讯,2000,36(4):337-338.
- [5] 陈永勤,樊晋宇,易飞,等.黄姜成熟叶片植株再生的研究[J].中国中药杂志,2004,29(2):129-132.