北方园艺 2009(2):18~21

南姜组培快繁技术研究

张振霞,郑玉忠,黄 泓

(韩山师范学院 生物系,广东 潮州 521041)

摘 要:对具有药用与调味价值的植物南姜进行了组培快繁技术的研究。结果表明:南姜块茎的幼芽是理想的外植体;消毒方式选用 75%乙醇 30 s+0.1%$HgCl_2$处理 10~15 min,污染率可降低至 12%,成活率可达 64%; MS+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 激素配比有利于诱导芽分化及腋芽的萌发,其诱导率可达 83.3%;生根培养基采用 1/2MS+0.1 mg/L NAA+0.05 mg/L 6-BA,其生根率达 100%,平均生根数 12~15 条。

关键词:南姜;组织培养;快繁

中图分类号:S 632.503.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2009)02-0018-04

南姜(*Alpinia galanga*(L.) Willd.)也称红豆蔻、大高良姜,为姜科多年生草本植物。在亚洲热带地区广布,广东、台湾、广西、湖南和云南等省区也有分布[1]。其果实与根茎可供药用[1-2],自中世纪以来,南姜就用作药材与辛香调料使用,如今,中国依然是食用南姜的主要国家之一[3]。近年研究发现其根茎中含有多种芳香油、类黄酮、矿物质、醣类等物质[4],对肌肤具有振奋、活化与抗自由基等多重特性,因此南姜也具有美容效果的巨大商业价值[5-6]。

目前,南姜只是作为一些中药配伍以及地方风味小吃的调味品,我国对它的研究与开发相对滞后,它的价值还未得到开发与应用。南姜种植范围小,品种质量良莠不齐,这严重制约着南姜的生产与推广。为了提高南姜的利用价值,就必须加强南姜优良种质的培育研究,同时也能顺应绿色食品工程和中药事业的发展。组培快繁技术是培育优良种质资源和提供大量优质种苗的有利手段,因此,南姜组培快繁技术的研究势在必行。

1 材料与方法

1.1 材料

将供试南姜根状块茎冲洗干净后,覆盖于洗净的河沙中,置于(25±3)℃通风处催芽培养。生长成幼株后,分别取其幼芽、嫩叶、茎、根等作为组织培养的外植体。将获取的材料置于低浓度的肥皂水中浸泡约 30 min,清水冲洗干净,晾干。放入已灭菌的三角瓶中,分别采用不同浓度的次氯酸钠、$HgCl_2$、乙醇单独或相配合的消毒方法处理。

1.2 培养基

选用 MS 基本培养基,在培养的不同阶段分别添加不同种类的植物激素,在蔗糖 30 g/L、7 g/L 的琼脂中固化,pH 5.8,经配制分装后于 121 ℃(1.1 kg/cm^2)条件下灭菌 20 min,备用。

1.3 方法

1.3.1 不同部位外植体的诱导效果 分别取南姜幼株上的刚萌动的幼芽、嫩叶、茎、幼根等作为组织培养的外植体,分别接种在愈伤组织诱导培养基和芽增殖培养基上,观察不同部位外植体的诱导效果。

1.3.2 愈伤组织的诱导 将经过消毒后的外植体接种在已灭菌好的诱导愈伤组织培养基上。培养基中的激素成分配比为:0.05 mg/L 6-BA+1、3、5、8 mg/L 2,4-D,0.1 mg/L 6-BA+1、8 mg/L 2.4-D,0.05 mg/L 6-BA+5 mg/L NAA。

1.3.3 芽增殖的诱导 在 0.5 mg/L NAA 的培养基上,设定了、1、3、5、8、10 mg/L 5 个不同 6-BA 浓度作为试验处理,研究了南姜芽增殖的诱导。

1.3.4 对已发芽的外植体生根诱导 外植体诱导出芽后,将其接种到加入不同配比激素的 1/2 MS 培养基上,观察其对根诱导的结果。

2 结果与分析

2.1 南姜无菌系建立的选择

南姜生长于地下,根状块茎作为外植体携带有大量微生物,建立组织培养的无菌体系有一定的难度。如何成功的对生长地下的植物外植体进行消毒处理,是建立无菌培养的前提[7]。该试验从外植体的消毒处理入手,研究了不同消毒方式对外植体生长情况的影响。表 1 的研究结果显示,单独使用过高浓度的 $HgCl_2$及长时间的 $HgCl_2$处理虽然杀菌效果好,但是对植物体的损伤也较大,从而降低了外植体的成活率。使用 NaClO 作为消

第一作者简介:张振霞(1975-),女,甘肃兰州人,博士,副教授,研究方向为生物技术。E-mail:zhangzhenxia@yahoo.com.cn。

基金项目:国家星火计划资助项目(2005EA780080)。

收稿日期:2008-08-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

毒剂则容易使外植体产生褐变,且杀菌效果也较差。所以,对于南姜的外植体的消毒处理,应选择75%乙醇短时间处理,再使用较低浓度的 $HgCl_2$(0.1%)处理10~15 min,这样的处理方式可以最大限度的降低污染率,减少对外植体的损伤,提高其成活率。此外,消毒过程中滴加适量的吐温作为表面活性剂,并不断的振荡摇晃,可增加消毒效果。

表1　南姜无菌系建立的选择

Table 1　Effect of the different disinfection methods of *Alpinia galangal*

消毒方式 Disinfection methods	接种个数 No. of explants	污染个数 No. of pollution	成活个数 No. of survival	污染率 Pollution /%	成活率 Survival /%
0.1% $HgCl_2$ 10 min	50	16	29	32	58
0.1% $HgCl_2$ 15 min	50	11	30	22	60
0.2% $HgCl_2$ 10 min	50	8	32	16	64
75%乙醇30 s+0.1% $HgCl_2$ 10 min	50	8	30	16	60
75%乙醇30 s+0.1% $HgCl_2$ 15 min	50	6	32	12	64
75%乙醇30 s+0.2% $HgCl_2$ 15 min	50	5	26	10	52
2%NaClO 15 min	50	32	24	64	48
2%NaClO 10 min+0.1% $HgCl_2$ 5 min	50	17	25	34	50

注:表中的数据为接种后7 d的统计结果。成活数=接种数-污染数-变黑死亡数;污染率=污染数/接种数;成活率=成活数/接种数。

2.2　不同外植体对南姜诱导愈伤组织的影响

将南姜幼株的刚萌动的幼芽、嫩叶、茎、幼根等不同部位作为外植体分别接种到MS+3 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA诱导愈伤组织培养基上,经过30 d的培养,结果见表2、图1。

外植体接种到诱导愈伤组织培养基中1~2星期后部分幼芽切片呈现细胞疏松膨大;其余部分则相继干枯、褐化、死亡。嫩叶部分颜色微绿伸展,微膨大,但非呈现明显的愈伤化组织;接种数日后呈现黄褐色的斑点,并相继干枯。幼根中只有极少数的个体出现组织膨大、泛白,但多数组织则变褐、干枯。从试验结果看,嫩叶及幼根外植体难于脱分化形成愈伤组织,但利用刚萌动的幼芽作为外植体诱导愈伤组织的效果较好。

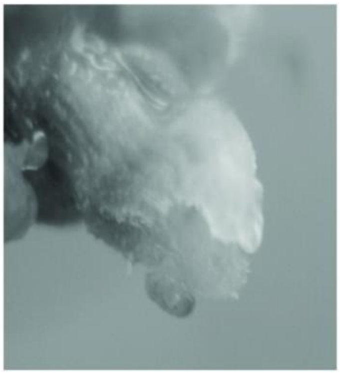

图1　幼芽诱导的愈伤组织

Fig.1　Inducing callus of young shoots

2.3　不同激素配比对南姜愈伤组织诱导的影响

采用1.3.2的试验处理,以南姜刚萌动的幼芽切片为外植体进行不同培养基对其愈伤组织诱导的研究,试验结果显示:除2,4-D 3~5 mg/L+6-BA 0.05 mg/L的激素配比对南姜幼芽切片诱导出少量的愈伤组织外,其余的激素配比均难以诱导出较理想的愈伤效果。

表2　不同部位外植体的愈伤组织诱导效果

外植体 Explant	接种个数 No. of explants	诱导个数 Initiated callus	愈伤率 Initiation rate/%	状态描述 Status
幼芽	40	4	10	部分幼芽切片呈现细胞疏松膨大
嫩叶	40	2	5	叶片微膨大,但非呈现明显的愈伤组织
茎	40	0	0	外植体几乎没有膨大现象
幼根	40	1	2.5	极少部分幼根接种后呈现组织膨大、泛白

注:表中数据为接种后30 d的统计结果。

2.4　不同外植体的分生芽的诱导效果

将南姜幼株的幼芽、嫩叶、幼根等不同部位作为外植体分别接种到MS+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA诱导分生芽培养基上,经过30 d的培养,结果见表3。可以看出利用叶芽切片诱导分生芽具有很好的效果,每个叶芽片均能长出2~3个幼芽。而利用嫩叶和幼根作为外植体时,难以诱导出分生芽。应当选择幼芽作为诱导分生芽外植体。

表3　不同部位外植体接种于诱导分生芽培养基效果

Table 3　Influence of different explant on callus differentiation rate of *Alpinia galanga*

外植体 Explants	接种个数 No. of explants	出芽个数 Differentiated callus	出芽率 Differentiated rate/%	备注 Status
幼芽	40	39	97.5	每个叶芽片均能长出2~3个幼芽
嫩叶	40	0	0	叶片变浓绿,但无明显长芽现象
幼根	40	2	5	极少个体连接块茎部位有长芽现象

注:表中数据为接种后30 d的统计结果。

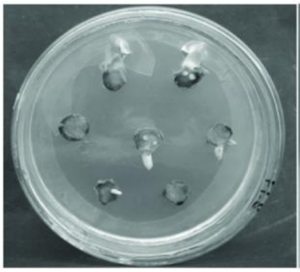

图2　幼芽切片诱导出的分生芽

Fig.2　The slice of young shoots

图3　诱导的从生芽

Fig.3　Inducing shoots

2.5　不同激素配比对南姜诱导芽分化效果

分生芽的诱导同外源激素的添加有着很重要的关系[7]。将南姜茎尖幼芽切片接种于含有不同激素组合的MS培养基中,经过25 d的培养,观察结果见表4。表

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 试验结果显示, 采用的几组激素配比的培养基均能诱导幼芽切片长出幼芽, 并且幼芽的长势良好, 活力较强。其中 0.5 mg/L NAA+3 mg/L 6-BA 诱导分生芽萌发的效果最好, 其诱导率高达 83.3%(如图 2、3), 有助于南姜组培快繁。

2.6 不同激素诱导生根效果

将已长出分生芽的组织接种到含有不同激素的 1/2 MS 培养基中, 经过 30 d 的培养, 观察到的生根效果见表 5。在试验采用的几组培养基中南姜幼芽均能生根。在无激素刺激的情况下, 生根较慢, 长出的根短细, 植株长势差, 有褪绿、白化、干枯的趋势。0.1 mg/L NAA+0.05 mg/L 6-BA 下, 根系生长快, 根粗壮、发达, 侧生根生长密集, 植株叶色浓绿, 长势良好。0.5 mg/L NAA+1 mg/L IBA 处理下, 根较细短, 侧生根根相对稀疏, 植株整体长势一般(见图 4~6)。从诱导的根数及植株的生长情况看, 选择0.1 mg/L NAA+0.05 mg/L 6-BA 的 1/2MS 培养基来作为生根培养基, 具有较好的效果。

表 4　不同激素组合诱导南姜芽分化效果

Table 4　Influence of different hormone concentration on callus differentiation of *Alpinia galanga*

激素组合 Different hormones	接种个数 No. of explants	萌芽外植体个数 Differentiated callus	总芽数 No. of shoots	诱导率 Differentiation rate/%
1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	38	16	20	42.1
3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	36	30	38	83.3
5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	40	26	38	65
8 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	34	22	28	64.7
10 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	43	31	50	72.1

注: 表中数据为接种后 25 d 的统计结果。

表 5　不同激素配比诱导生根效果

Table 5　Different concentration on rooting of *Alpinia galanga*

编号 Number	激素组合 Hormone	接种个数 No. of explants	生根数 No. of rooting/株	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Arerage number of root/条	植株生长情况 Status
R1	—	20	6	30	2~3	根短细, 无侧生根生长, 叶子有褪绿白化现象
R2	0.1 mg/L NAA+0.05 mg/L 6-BA	20	20	100	12~15	根粗壮发达, 侧生根密集, 植株叶色浓绿
R3	1 mg/L NAA+1 mg/L IBA	20	19	95	6~7	根较细短, 侧生根较稀疏, 植株长势一般

注: 表中数据为接种后 30 d的统计结果。

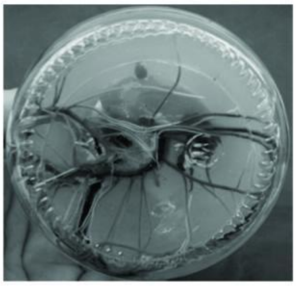

图 4　R2 培养基诱导根效果

Fig. 4　Rooting on the medium of R2

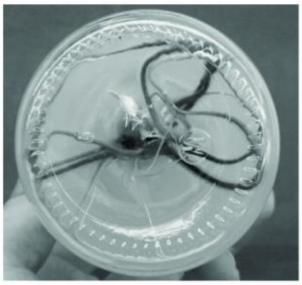

图 5 R3 培养基诱导根效果

Fig. 5　Rooting on the medium of R3

图 6　南姜组培再生苗

Fig. 6　Plant regeneration

2.7 试管苗的移栽

移栽是组培快繁过程中最后一个环节, 也是一个非常关键的环节。试管苗在试管中无论生长多好, 移栽若不成功的话, 也会导致试验前功尽弃。当试管苗具 4~5 片叶子, 7~8 条根时, 即可移栽。移栽前, 先将培养瓶移出培养室, 置于通风明亮的常温环境下练苗 3~4 d, 期间每天打开瓶盖 2~3 h。接着从瓶中取出试管苗, 用清水洗净粘附于根系上的琼脂。移栽于灭菌的陶土基质中, 淋足定根水, 再用已打孔透气的薄膜覆盖其上, 每日淋水, 以保证基质的潮湿。1 星期后可打开薄膜, 继续养护 2~3 星期后便可成活。

3 结论与讨论

采用南姜的根状块茎作为外植体, 由于该材料生长于地下, 带菌量多, 并且在其组织内部可能含有某些内生菌, 在消毒过程中消毒剂较难穿透到组织内部[7], 使消毒效果不明显, 材料污染率高。从试验消毒效果看, 南姜的外植体宜选用 75%乙醇处理 30 s+0.1% $HgCl_2$ 处理 10~15 min, 这样的不同消毒剂的搭配使用既可以最大幅度地降低污染率(可降低至 12%), 同时又能减少消毒剂对外植体的毒害作用(成活率可达 64%)。

外植体的选择应选用南姜块茎的幼芽作为接种的外植体较为理想, 每个幼芽片均能长出 2~3 个幼芽。而利用嫩叶和幼根作为外植体时, 难以诱导出分生芽和愈伤组织。这可能与刚萌动的幼芽组织中的芽原基活力较强, 细胞分化程度较低, 细胞分裂旺盛有着一定的关系[7]。已有的姜科植物组织培养研究报道中也多采用黄姜或者生姜的茎段、茎尖或者芽尖作为接种外植体

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

直接诱导芽增殖途径进行繁殖[8,11]。此外研究发现茎段、叶片作为外植体消毒效果不理想，存在着易污染的问题。南姜的芽诱导培养试验中，在0.5 mg/L NAA条件下，添加不同浓度的6-BA，芽的萌发率有一定的差别。当添加6-BA浓度为3 mg/L时，新芽的诱导率达83.3%，幼芽增殖2~3倍。幼芽较多，且粗壮。该激素配比有利于新芽的分化和幼芽增殖。

另外研究发现南姜组培苗生根比较容易，即使在无激素环境下也能够长出根，但效果较差。NAA和IBA搭配使用时根较细短，侧根生长稀疏。NAA与6-BA搭配使用时，生根率达100%，平均生根数12~15条，根粗壮、发达，侧根生长密集，植株叶色浓绿，长势良好。

参考文献

[1] 吴德邻.中国植物志[M].北京:科学出版社，1981，16(2):72.
[2] 赵志礼，王峥涛，董辉，等.山姜属药用植物及生药学研究进展[J].中草药，2001，32(2):171-173.
[3] 吴修仁.潮汕植物志[M].汕头:广东省汕头市生物学会，1993:119.
[4] 林新花，蔡明招，杜佳.大高良姜营养成分的分析研究[J].食品科技，2003(5):102-103.
[5] http://cn.clarins.com/main.cfm?PlanteID=341.
[6] 郭英华，张振贤，关秋竹.姜的研究进展[J].长江蔬菜，2005(9):39-42.
[7] 潘瑞炽.植物细胞工程[M].广州:广东高等教育出版社，2006:20-22.
[8] 黄远新，王季春，唐道彬，等.生姜茎尖的离体培养研究[J].广西园艺，2005，16(6):4-7.
[9] 梁称福，易诚.黄姜茎段培养快速繁殖技术研究[J].湖南农业科学，2006(5):17-19.
[10] 黄昌武，刘丰国，王光俊，等.黄姜组织培养快速繁殖技术研究[J].湖南农业科学，2002(2):70-71.
[11] 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.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Alpinia galanga*

ZHANG Zhen-xia，ZHENG Yu-zhong，HUANG Hong
(Department of Biology，Hanshan Normal，Chaozhou，Guangdong 521041，China)

Abstract: Studied tissue culture and rapid propagation of *Alpinia galangal* which was a medicinal and seasoning plant with promising development future. The results showed that the tender buds of *Alpinia galangal*'s tubers were the optimum explants of tissue culture; 75% ethanol (30 s) and 0.1% $HgCl_2$ (10~15 min.) was the best disinfectant, and the pollution rate of explants was only 12%, with the survival rate up to 64%; MS+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA was the most suitable medium for propagation in which shoots induction rate had reached to 83.3%; 1/2MS+0.1 mg/L NAA+0.05 mg/L 6-BA was the optimum medium for rooting in which the rooting rate reached 100%, with the average numbers of roots of 12~15.

Key words: *Alpinia galanga*; Tissue culture; Rapid propagation

禽流感 科普知识

由于禽流感是由A型流感病毒引起的家禽和野禽的一种从呼吸病到严重性败血症等多种症状的综合病症，目前在世界上许多国家和地区都有发生，给养禽业造成了巨大的经济损失。这种禽流感病毒，主要引起禽类的全身性或者呼吸系统性疾病，鸡、火鸡、鸭和鹌鹑等家禽及野鸟、水禽、海鸟等均可感染，发病情况从急性败血性死亡到无症状带毒等极其多样，主要取决于带病体的抵抗力及其感染病毒的类型及毒力。

禽流感病毒不同于SARS病毒，禽流感病毒迄今只能通过禽传染给人，不能通过人传染给人。感染人的禽流感病毒H5N1是一种变异的新病毒，并非在鸡、鸭、鸟中流行了几十年禽流感的H5N2。无须谈禽流感色变。目前没有发现吃鸡造成禽流感H5N1传染人的，都是和鸡的密切接触，可能与病毒直接吸入或者进入黏膜等原因造成感染。

传播途径

它可以通过消化道、呼吸道、皮肤损伤和眼结膜等多种途径传播。

传染源

流感病毒有三个抗原性不同的型，所有的禽流感病毒都是A型。A型流感病毒也见于人、马、猪，偶可见于水貂、海豹和鲸等其他哺乳动物及多种禽类。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net