

花叶姜离体再生体系的建立

陈泽雄, 刘奕清, 黄登艳

(重庆文理学院 花卉研究所, 重庆高校园林花卉工程研究中心, 重庆 永川 402160)

摘要:以花叶姜茎块为外植体进行离体培养与植株再生研究。结果表明:花叶姜的启动培养基以改良 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 较适宜, 继代增殖以改良 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为宜, 增殖系数可达 3.8, 生根培养基以 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L 为适, 生根率达 96%, 试管苗移栽成活率达 97% 以上。

关键词:花叶姜; 离体培养; 快速繁殖; 植株再生

中图分类号: S 632.503.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)08-0205-03

花叶姜 (*Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*) 又名花叶艳山姜, 为姜科山姜属, 原产东南亚热带地区, 是多年生

草本植物。其根茎横生, 肉质, 叶面深绿色, 并有金黄色的纵斑纹、斑块, 富有光泽。圆锥花序下垂, 苞片白色, 边缘黄色, 顶端及基部粉红色, 花弯近钟形, 花冠白色。花叶姜喜高温多湿, 是较好的阴生植物, 其叶色艳丽, 花姿优美, 花香清纯, 适用于庭园美化, 作林下的地被栽植, 或做建筑的层基绿化, 也是很有观赏价值的室内观叶观花植物^[1]。花叶姜常规的繁殖方法为块茎进行分株繁殖, 繁殖系数低。目前, 国内关于花叶姜的组培快繁报道较少, 现通过建立花叶姜高效离体培养体系, 为短期内获得大量的组培种苗提供参考, 以期满足城市园

第一作者简介: 陈泽雄(1979-), 男, 湖北黄冈人, 硕士, 讲师, 现从事植物组培和细胞工程的科研与教学工作。E-mail: chenxiong1979@163.com。

通讯作者: 刘奕清(1964-), 男, 四川大竹人, 硕士, 教授, 现从事植物细胞工程方面的科研和教学工作。E-mail: liuying906@163.com。

基金项目: 重庆市教委能力创新建设资助项目 (GCZX0713)。

收稿日期: 2009-03-20

根数多。

4.5 移栽

当根长至 4~5 cm 时, 在自然光下练苗 7 d 后出瓶移栽至营养土中(草炭土:珍珠岩=4:1), 在 25℃ 下培养。移栽前将根部培养基洗净, 整株苗用多菌灵水溶液浸洗 1~2 min。移栽成活率可达 80%。

5 结论

中间锦鸡儿为豆科锦鸡儿属的一种, 分布广泛, 具有防风固沙、保持水土的生态作用, 而且具有饲用、绿

肥、薪炭、蜜源、入药、木质纤维等资源价值, 既是木本油料植物, 亦是一种潜在的食用植物蛋白资源。TDZ 用于锦鸡儿属的组织培养属首次, 且芽诱导率比 BA 等高 4~5 倍。建立中间锦鸡儿高效离体快繁体系, 不仅为锦鸡儿转基因育种提供了一个平台, 诱导其组培苗加倍还具有容易控制试验条件和重复试验结果、提高工作效率、减少嵌合体、诱发频率高, 加倍、选择和快速繁殖同步进行等诸多优点, 是培养优质高抗中间锦鸡儿新品种的高效途径之一。

Inducing Regeneration of *Caragana intermedia* by TDZ

HU Namei^{1,2}, HAN Suying², LIANG Guo-lu¹, QI Li-wan²

(1. College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Laboratory of Cell Biology, The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: An effective protocol for plant generation was developed from young stem segments of *C. intermedia* aseptic seeds. The results showed that the most suitable medium for inducing adventitious buds was MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.02 mg/L+sugar 30.0 g/L+agar 9 g/L, and the adventitious buds induction is up to 220% after 46 days cultivation. Regenerated buds grew strongly on MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.4 mg/L+sugar 30.0 g/L+agar 9 g/L. The rooting rate was 85% in the rooting medium 1/2MS+IAA 0.5 mg/L+sugar 30.0 g/L+agar 9 g/L after 40 days cultivation. The suitable proportion of transplanting medium (mixed turfy soil plus perlite) was 4:1, and in which the transplanting survival rate of plantlets was 80%.

Keywords: *Caragana intermedia* TDZ Regeneration

林绿化需求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从花叶姜植株中取新鲜块茎, 自来水冲洗干净后置于阴凉处晾干, 选取其中健康饱满的块茎为试验材料, 将其埋藏于温室沙床中, 定期喷洒多菌灵, 保持沙床湿润以诱导花叶姜嫩芽萌发。

1.2 初代培养

切取萌发至 2~3 cm 长的嫩芽, 在自来水下冲洗干净后用 0.5% 的洗衣粉溶液浸泡 15 min, 无菌水冲洗干净后置于超净工作台中, 用 0.1% 氯化汞浸泡约 10 min, 期间不停振荡, 无菌水冲洗 4~6 次。在无菌条件下切除基部组织, 将长约 1 cm 的嫩芽接种于诱导培养基(见表 1)中。每处理接种 20 个外植体, 试验重复 3 次, 30 d 后统计诱导率和芽丛生情况。

1.3 继代培养

1.3.1 不同激素浓度对比对继代增殖的影响 诱导出的芽丛切成带 2 个芽的团块, 接种于不同浓度配比的继代培养基(见表 2)中, 每个培养瓶接种 1 团块, 每处理接种 15 块, 相同浓度配比连续继代 3 次, 统计其增殖系数和芽生长情况。

1.3.2 不同切割工艺对继代增殖的影响 将诱导出的花叶姜芽丛按照 2 种不同的工艺进行切割^[2]: 丛生苗快繁法, 是指试管苗分割成单株或带 2 个芽重新接种到新的增殖培养基上进行繁殖。试管微型团块快繁法, 是指将试管苗丛生苗分割成单株或 2 个芽丛后, 再将其茎基部 0.5~1 cm 以上部分切除, 形成微型团块转接到最佳增殖培养基上繁殖。每种切割工艺重复处理 30 瓶, 30 d 后统计增殖系数。

1.4 生根培养

将高于 2 cm 以上的芽从基部切下, 转接到以下生根培养基中培养: 1/2MS+NAA 0.2; 1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.1; 1/2MS+IBA 0.2。每处理接种 20 幼苗, 试验重复 5 次, 30 d 统计生根率。

以上改良 MS 培养基中蔗糖为 30 g/L, 1/2MS 培养基中蔗糖为 20 g/L, 琼脂为 4.5 g/L, pH 5.8。培养条件均为温度 25℃, 光照强度为 1 500 lx, 光照时间为 12 h/d。

1.5 驯化移栽

当生根苗长出 4~5 条根时移入温室, 练苗 3~4 d

后, 移栽到蛭石+珍珠岩+泥炭土(体积比 1:1:3)的混合基质中, 定期喷水、施肥。30 d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对比对花叶姜外植体诱导的影响

从表 1 可以看出, 不同浓度的激素对比对花叶姜外植体诱导率的影响差别较大, 合适的 NAA 和 BA 配比是花叶姜芽丛诱导的关键。表 1 中显示, NAA 为 0.02 时 BA 浓度从 1.0 上升到 3.0, 其诱导率均不超过 25%, 芽质量差、生长缓慢, 且有随着 BA 浓度升高诱导率愈低的趋势。当 NAA 浓度为 0.1 时, 随着 BA 浓度从 1.0 上升到 3.0, 诱导率均超过 90%, 芽生长较正常, 且随着 BA 浓度的升高, 芽数量增多, 但同时苗健壮程度降低。NAA 浓度升高到 0.5 时, BA 浓度不论是 1.0、2.0 还是 3.0 诱导率急剧下降, 且整体表现出芽数量少、生长缓慢的特点。综合来看, NAA 0.1+BA 2.0 的处理诱导芽数量较多、萌芽速度较快且生长健壮, 效果最好。

2.2 不同浓度激素对比对继代增殖的影响

将获得的再生芽苗切成芽团接种于不同的增殖培养基中, 连续继代 3 次后, 结果见表 2。结果显示, 即使在缩小激素浓度变化范围的情况下, 不同激素浓度对比对增殖系数和芽苗生长情况的影响差别仍较大。BA 与 NAA 浓度的比值决定着花叶姜的增殖状况, 随着二者比值的增高, 增殖系数不断上升, 比值从 5 上升到 30 增殖系数也相应的由 2.8 上升到 6.7。但当二者的相对比值上升到 10 之后, 随着比值的进一步上升, 花叶姜逐渐表现出芽团泡状、叶色淡绿, 甚至白化及叶片畸形的现象, 且随着比值的不断扩大, 这种现象越来越明显。综合增殖系数和芽团生长情况来看, BA 1.5+NAA 0.2 的组合最好, 增殖系数达到 3.8, 丛生芽健壮、无泡状芽产生, 叶形正常无扭曲、叶色浓绿无白化现象。

表 1 不同激素浓度对外植体诱导的影响

BA / mg · L ⁻¹	NAA / mg · L ⁻¹	接种数	存活数	出芽数	诱导率 / %	芽分化情况
1.0	0.02	60	51	12	23.53	芽短, 生长缓慢
1.0	0.1	60	50	45	90.00	芽正常, 健壮
1.0	0.5	60	49	24	48.98	单芽, 生长缓慢
2.0	0.02	60	52	8	15.39	芽畸形, 生长缓慢
2.0	0.1	60	48	45	93.75	芽正常, 健壮
2.0	0.5	60	50	28	56.00	单芽, 生长缓慢
3.0	0.02	60	51	6	11.76	芽畸形, 泡状
3.0	0.1	60	48	44	91.67	芽数量多, 偏弱
3.0	0.5	60	49	34	69.39	单芽, 生长较慢

表 2 不同激素浓度对花叶姜增殖的影响

BA / mg · L ⁻¹	NAA / mg · L ⁻¹	接种数	出芽数	增殖系数	芽形态特征
1.0	0.1	60	252	4.2cd	芽较健壮, 叶形正常, 叶淡绿
1.0	0.2	60	168	2.8e	芽健壮, 苗较高, 叶形正常, 叶绿
1.5	0.1	60	294	4.9bc	芽偏弱, 极少数泡状, 叶淡绿
1.5	0.2	60	228	3.8d	芽健壮, 苗高, 叶形正常, 叶绿
2.0	0.1	60	336	5.6b	芽弱小, 部分泡状, 叶淡绿
2.0	0.2	60	264	4.4cd	芽较健壮, 叶形正常, 叶淡绿
3.0	0.1	60	510	6.7a	芽数量多, 泡状, 叶畸形, 部分叶白化

注: 同一列后标有相同字母表示差异不显著(P<0.05), 下同。

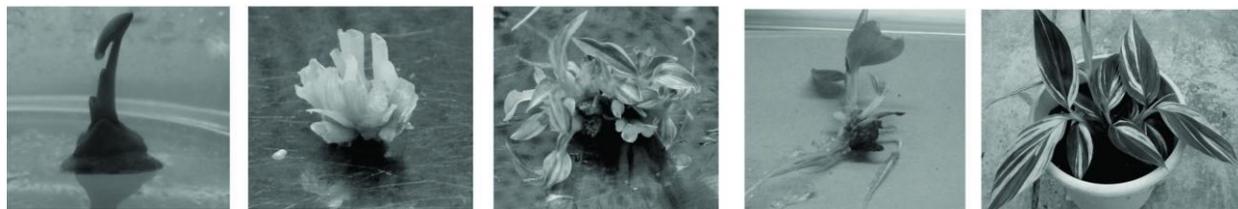


图1 花叶姜外植体启动

图2 继代培养的微型团块

图3 继代3次后的花叶姜丛生芽

图4 生根良好的花叶姜组培苗

图5 移栽成活的花叶姜组培苗

2.3 不同切割工艺对继代增殖的影响

将转代3次的花叶姜丛生芽按2种不同的切割工艺进行切割增殖,接种到改良MS+BA 1.5+NAA 0.2的培养基中,30 d后统计结果见表3。从表3可知,微型团块快繁法效果好于丛生苗快繁法,其中微型团块快繁法接种30瓶获得芽数为117,增殖系数达3.9,显著高于丛生苗快繁法获得的增殖系数2.4。2种方法获得的丛生芽均较健壮,但丛生苗快繁法获得的丛生芽中有少部分叶片出现白化现象。

表3 不同切割工艺对花叶姜增殖的影响

切割工艺	接种数	出芽数	增殖系数	芽形态特征
丛生苗快繁法	30	72	2.4b	芽健壮,苗高,叶形正常,少部分叶白化
微型团块快繁法	30	117	3.9a	芽健壮,苗较高,叶形正常,叶绿

2.4 不同激素浓度对花叶姜生根的影响

将高于2 cm以上的芽从基部切下,转接到不同的生根培养基中培养,1周后基部开始稍稍膨大,15 d左右陆续生根,30 d统计结果。从表4可看出,花叶姜很容易生根,供试的3个配方生根率均超过93%,1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.1的组合生根率更是达到96%。

表4 不同激素浓度对花叶姜生根的影响

编号	接种数	生根数	根数/株	生根率/%
(1)	100	95	3~5	95a
(2)	100	96	3~5	96a
(3)	100	93	3~5	93a

2.5 驯化移栽

芽苗生根约25~30 d后即可转入温室,打开瓶盖练苗3~4 d,用自来水将根系清洗干净后移栽到装有混合基质的穴盘中,保温保湿,3 d后幼苗即可伸展,10 d后可适当减低湿度和水分供应,每周浇灌复合肥1次,移栽成活率高达97%。

In vitro Culture and Plant Regeneration of *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*

CHEN Ze-xiong, LIU Yi-qing, HUANG Deng-yan

(Flower Research Institute, Chongqing University of Arts and Science, Garden and Flower Engineering Research Center of Chongqing Colleges, Yongchuan, Chongqing 402160, China)

Abstract: Using *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata* tuber as explants, *in vitro* culture and rapid propagation were studied. The results showed that the optimum medium for bud regeneration was MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, the optimum subculture medium was MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, on which each explant produced up 3.8 plant lets on the average. The frequency of rooting was over 96% on 1/2MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 0.1 mg/L IBA. The survive rate after transplant reached above 97%.

Key words: *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*; *in vitro* culture; Rapid propagation; Plant regeneration

3 结论与讨论

试验通过对花叶姜块茎进行催芽处理,将获得的幼嫩芽为外植体成功建立了花叶姜高效离体再生体系,经过多代培养表现良好,为花叶姜工厂化生产奠定了良好的基础。

试验结果表明,花叶姜的最佳启动培养基以改良MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,继代增殖以改良MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L为宜,切割工艺以微型团块快繁法为好,增殖系数可达3.9,芽苗健壮无畸形和白花苗出现。花叶姜易生根,生根培养基以1/2MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L为最适,生根率高达96%,试管苗移栽成活率达97%。

植物的离体培养是一门应用性较强的学科,实际操作中应根据不同植物的生长和发育特性来设计试验方案,才有可能获得较好的效果。该研究中花叶姜是一种较喜阴的植物,根据这一特点在初代培养开始1~2 d采用暗处理培养,随后采用单只日光灯照射^[3],成功满足了嫩芽的启动,在连续继代培养中同样采取较弱光照处理,获得了较好的增殖系数和健壮的芽苗,有效的避免了连续强光下产生叶片黄化甚至白化的现象^[4,5]。

参考文献

- [1] 赵秀芳. 花叶艳山姜组培快繁技术的研究[J]. 中国农学通报 2004 20(6): 34-36.
- [2] 花桂玲. 铜陵白姜脱毒及组织培养技术研究[J]. 安徽农学通报 2004 10(4): 59-60.
- [3] 刘奕清, 王大平. 尾细桉的组织培养与快速繁殖[J]. 西南农业大学学报, 2003, 27(2): 237-239.
- [4] 王关林. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002 71-103.
- [5] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社 2002, 60-64.