

生姜组织培养的影响因子

尚小红, 周生茂, 文俊丽, 梁任繁, 康红卫

(广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007)

摘要:生姜是重要的辛辣类蔬菜作物, 长期以来用地下块根无性繁殖, 所带的病毒病菌常常导致产品产量和品质降低。目前组织培养是提高生姜产量和品质最为有效的方法。现从外植体选择、外植体消毒方式、培养基、蔗糖浓度、生长调节物质及培养条件等方面对生姜组织培养进行综述, 并阐明了目前生姜组织培养存在的问题及其应用前景。

关键词:生姜; 组织培养; 影响因子

中图分类号:S 632.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)01-0173-04

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是姜科多年生单子叶草本辛辣类蔬菜作物, 生产上多为1 a生栽培^[1], 现已广泛栽培于世界各亚热带、热带地区。生姜由于其营养丰富, 药用效果好, 已成为重要的调味蔬菜和医药、化工及食品工业原料; 加上其经济价值高, 耐贮藏, 近年来一直受到外商的青睐, 出口量呈逐年增加趋势, 成为我国主要的特产创汇蔬菜之一。

由于生姜不开花或很少开花, 在育种上很难利用有性繁殖, 而只能靠少数品种长期无性繁殖, 从而导致姜植株体内积累多种病毒, 产量下降, 品质退化, 抗性下降^[1]。生姜种质资源的繁殖和保存也主要依靠种姜在田间种植来进行, 这样不仅繁殖系数低、费用高, 也容易导致资源材料的丢失。随着生物技术的发展, 近年来, 植物组织培养技术有了很大发展, 一大批植物的组织培养获得了成功, 并取得了显著的经济效益和社会效益^[2]。组织培养技术也应用到了生姜的生产上, 取得了良好的经济效益, 在生姜生产上越来越显出广阔的应用价值。

组织培养在生姜上的应用首先体现在脱毒上, 生姜脱毒以后, 植物长势强, 产量显著提高, 抗病(特别是姜瘟病)性增强^[3]。目前在我国许多地区都建立了生姜无病毒繁殖体系, 并逐渐走向市场化。此外, 采用生姜组培苗替代姜块将大大节省种姜用量, 提高生姜的产量和品质, 获得更好的经济效益^[4]。同时, 使用组织培养可以克服生姜种质资源因为自然灾害和病虫害所导致的

丢失, 并可对植物品质进行改良, 通过改变生姜染色体组成和基因结构, 达到改良生姜品质的目的。生姜的组织培养受到多方面因素的影响, 现从外植体选择、外植体消毒方式、培养基、蔗糖浓度、生长调节物质及培养条件等方面对生姜组织培养的影响因子进行综述。

1 外植体的选择

由于植物不同器官和组织对离体培养的反应不同, 导致其形态发生的能力也不同^[5], 所以外植体的种类是影响组织培养效果的主要因素之一。生姜组织培养常用的外植体有茎尖分生组织、幼茎、叶片、叶鞘组织、芽尖、花粉、子房、花芽等, 其中最常用的外植体是茎尖分生组织, 尤其在生姜组培脱毒上, 茎尖分生组织被选为唯一的外植体, 进行了较多的研究, 取得了较好的效果^[4-7]。此外, 梁称福等^[8]以黄姜幼茎为外植体, 诱导出愈伤组织和丛生芽; 郭启高等^[9]利用叶片或叶鞘组织进行培养, 由叶或叶鞘切段经诱导愈伤组织成苗; 薛寒青等^[10]以生姜芽尖组织进行培养; 黄学林^[11]利用生姜花粉诱导出愈伤组织。Nazeem等^[12]以成熟的花序为材料, 从中剥取子房进行培养, 在离体条件下对其授粉, 得到的种子用来培养成苗, 所得苗经锻炼具有较高的移栽成活率; Neeta等^[13]以花芽为外植体, 培养得到了再生植株。

此外, 即使是同样的器官, 由于其生理或年龄的差别, 也会影响组织培养的效果。一般情况下幼嫩的外植体较容易获得再生植株。春季植物生长旺盛, 再生能力最强, 是进行组织培养的最适季节。因此, 生姜组培应根据实际条件选择适宜的外植体与时间。

2 外植体的消毒方式

生姜的组培研究中, 初代接种污染率高, 因此外植体消毒是影响试验成败的关键环节。目前对生姜外植体的消毒方式主要包括以下几种。

第一作者简介:尚小红(1982-), 女, 湖北随州人, 硕士, 研究实习员, 研究方向为蔬菜育种及栽培。

责任作者:周生茂(1970-), 男, 广西桂林人, 博士, 副研究员, 研究方向为蔬菜育种及栽培。

基金项目:广西农业重点科技计划资助项目(NK200813)。

收稿日期:2011-10-10

2.1 表面消毒

多数试验采用先将外植体洗干净后,在自来水下冲洗 30 min,移到接种室,在超净工作台上用 70%酒精消毒 30 s,再用浓度 0.1% HgCl_2 浸泡灭菌 10~20 min,无菌水洗涤 5~6 次,无菌吸水纸吸干外植体表面水分后进行接种^[14-16]。有些研究者在酒精处理之后,加上 1% 的 NaClO 溶液浸泡灭菌 30 min,进一步降低了污染率^[7,17]。

2.2 热处理脱菌

传统的植物脱菌一般在 35~38℃ 条件下持续对种苗处理 5~6 周,使病菌钝化失活,但效果不理想。高山林等^[18] 根据热处理脱菌原理,改进了热处理方法,即在 50℃ 下处理 5 min,然后在无菌条件下取分生组织进行培养,脱菌效果良好。在刘小阳等^[14] 和宣朴等^[19] 的研究中有相同的结果。

2.3 抗生素处理

生姜通常带有内生细菌,纯粹的表面消毒不能有效控制其对生姜的污染,如果加大表面消毒的强度,则生姜的芽点变黑,出现药害现象,抑制其后期的生长,因此需要采取表面消毒与适宜的抗生素处理相结合的方式。薛寒青等^[10] 在基本培养基中外加 1 g/L 青霉素 10 mL、1 g/L 卡那霉素 10 mL,姜芽脱菌试验染菌率为 0,脱菌效果良好;韦金洋等^[15] 将生姜茎尖接种于含 20~40 mg/L 利福平抗生素的培养基中消毒灭菌效果佳,但茎尖分化率比不加利福平的有所降低。Singh D K 等^[20] 在生姜初代接种时,将茎尖接种到含抗生素(尤其是硫酸链霉素或青霉素-链霉素 500 倍混合液)的分化培养基中,可以抑制杂菌丛生。表面消毒是最基本也是必要的消毒方式,实际操作中,可根据需要辅以热处理脱菌及抗生素处理,以更好的降低生姜外植体的初代接种污染率。

3 培养基

随着植物生理学和生物化学研究的不断深入,培养基越来越复杂,成分也越来越多,组织培养的基础培养基有 MT、MS、SH、White、B₅ 等,生姜的组织培养一般采用较多的是 MS 培养基^[5]。张延国^[21] 的研究表明,当添加 6.0% 蔗糖时, B₅ 培养基培养的组培苗平均每株结 0.77 个姜块,且重量小,而 MS 培养基上的组培苗平均每株能结 2.59 个姜块,且重量大,计算结姜指数(单株结姜数×平均重量×平均直径),MS 指数为 0.28,而 B₅ 仅为 0.05,说明同等条件下,MS 培养基比 B₅ 更适宜生姜组培。梁称福等^[8] 的研究表明,1/2MS 培养基与 MS 相比生根更粗壮,在空白的 1/2MS 上添加一种生长素或生长素和分裂素的培养基上都能生根,但是根的数量、粗细、长度不同。郑永强^[22] 的研究表明,适当提高诱导培养基中的大量元素至 2MS,可以提高根状茎平均单球重

以及诱导率。刘建成等^[7] 在诱导生姜试管苗生根时,直接使用自来水或干净的河水作为生根培养液,且没有灭菌,生根率达 99.5% 以上,但前提条件是茎苗长到了 5~9 cm 高,而且生根所需要的时间也相对较长。

4 蔗糖浓度

碳源是植物组织培养不可缺少的物质,它不仅能够给外植体提供能量,而且也能维持一定的渗透压,生姜组织培养中常用碳源为蔗糖,且在组织培养各个阶段所需要的蔗糖浓度是不一样的。宣朴等^[19] 指出茎尖分化的培养基 3% 的蔗糖浓度;张耀华等^[23] 发现最适宜鲁大姜试管苗增殖的蔗糖浓度为 6%;张延国^[21] 认为蔗糖浓度在 4%~12% 时有试管姜形成,当蔗糖浓度为 8% 时,诱导形成的试管姜总数、姜块直径、姜块总重皆是同水平下的最高值;郑永强^[22] 对生姜组培各个阶段的适宜蔗糖浓度均进行了研究,发现生姜试管苗快繁培养基的蔗糖浓度以 5% 为好,生根培养基的蔗糖浓度应为 2%,进行根状茎诱导时的蔗糖最佳浓度为 8%~11%;Bhat S R 等^[24] 研究表明,培养基中蔗糖的浓度在 9%~12% 时,生姜组培苗有根状茎产生,并且蔗糖浓度 12% 的培养基产生的根状茎,在土壤中的发芽率最高;此外,生姜试管苗生根后移栽成活率较低,这可能与组培苗直接利用培养基中的碳源,自养能力较弱有关。但是,在生姜组织培养生根阶段,转接到含谷氨酸的无糖培养基中培养,可以大大提高移栽成活率^[25-26]。因此,在生姜组织培养的各个阶段,对蔗糖浓度进行调整,以达到最佳的效果很有必要。

5 生长调节物质

基本培养基能保证培养物的生存与最低生理活动,但只有配合使用适当的外源生长调节物质才能诱导细胞分裂的启动、愈伤组织生长及根、芽的分化等合乎理想的变化。植物组织培养中,影响培养力的因素是多方面的,而外源生长调节物质是愈伤组织诱导和绿苗分化的关键因素。常用于生姜组织培养的生长调节物质生长素类(吲哚乙酸 IAA、萘乙酸 NAA、2,4-D、吲哚丁酸 IBA 等)、细胞分裂素类(6-苄基腺嘌呤 6-BA、玉米素 ZT 和激动素 KT 等)和生长抑制剂。这 3 类激素在生姜组织培养的各个阶段,所需的种类及浓度是不同的。

单独添加生长素或者细胞分裂素的诱导效应都不明显,二者同时使用具有相互增益效应。研究表明,生姜芽的诱导和增殖需要高浓度的细胞分裂素和低浓度生长素配合。罗天宽等^[27] 报道,将台湾大肉姜的茎尖接种在 MS+6-BA 5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上,出芽率最高,在继代培养基 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 中其繁殖系数能达到 6.8 倍/28 d;唐燕梅等^[17] 使用 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 作为

初代培养基诱导发芽,继代增殖培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,然后使用 1/2MS+NAA 0.1 mg/L 的培养基诱导生根,达到了很好的效果;刘小阳等^[14]的研究表明,初代培养基使用 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,增殖培养基使用 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,而壮苗诱导生根使用 1/2MS+6-BA 0.15 mg/L+NAA 0.1 mg/L 效果最佳;生姜增殖与生根诱导可以同时进行,雷开荣^[28]以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基同时进行生姜增殖与生根诱导,继代繁殖周期为 25~30 d,繁殖系数 7 以上,生根诱导率达 100%。张耀华等^[23]报道 6-BA 对鲁大姜茎尖增殖系数为 3.83,效果较优于 KT,其最适浓度为 2.0 mg/L,说明 BA 比 KT 更有利于生姜愈伤组织的产生。此外还发现,6-BA 对试管姜的形成有降低作用,6-BA 有促进细胞分裂的作用,同时也有抑制衰老的作用,可能是由于生殖器官一般在植物衰老过程中形成,从而导致 6-BA 对试管姜形成起衰老作用。总之,高浓度的细胞分裂素及低浓度的生长素被用来诱导愈伤及不定芽,而在诱导生根时,则需要适当降低细胞分裂素的浓度,甚至只需要添加生长素就能达到很好的诱导生根效果。

除生长素类及细胞分裂素类调节物质外,生姜组培中用得较多的还有生长抑制剂,多效唑(PP₃₃₃)是 20 世纪 80 年代新开发的一种广谱高效低毒的植物生长延缓剂,属于三唑类化合物,可使试管苗生长健壮,抗逆性增强,移栽成活率提高^[29]。陈传红等^[30]研究表明,在兴国九山姜试管苗扩繁培养基中,补加 1.5 mg/L 多效唑可使试管苗增殖与壮苗同步进行,得到的试管苗矮壮,根系发达;补加 2.5 mg/L 多效唑有利于提高试管姜的诱导率和大小;在 MS+8.0~10.0 mg/L 多效唑的培养基中,生姜试管苗的种质保存期可延长至 4~5 个月。李锡香等^[31]通过在培养基中添加多效唑,可使茎尖组织培养一次成苗和微型姜形成,简化了微型姜生产程序。此外,郑永强^[22]与韦金洋^[32]的研究表明,培养基中添加生长抑制剂 B₉ 可以提高根状茎平均单球重以及诱导率。

因此,在生姜组培的各个阶段,应该根据诱导目的选择添加不同类型及浓度的生长调节物质,才能达到较好的培养效果。

6 其它影响因素

6.1 试管苗转接继代方式

试管苗转接继代方式分为分割丛生苗法和试管微型姜快繁法。前者是将试管丛生苗分割成单株,重新接种到新的快繁培养基上进行组培快繁,后者是将试管丛生苗分割成单株后,再将其茎从基部 0.5~1 cm 处剪掉,并去掉所有根,仅剩余微型姜转接于新的快繁培养基上进行组培快繁。许多研究者的结果均表明,使用微型姜

快繁法,成苗率提高,植株粗壮,根系发达,有利于试管苗的移栽成活,且易形成试管姜^[1,16,31]。

6.2 低温处理

唐玉明等^[33]将接种材料置于冰箱中低温处理 48 h 后再接种,褐化率降低,苗数量和高度,分化出根的数量及根长亦明显高于对照,表明前期低温处理有利于提高生姜苗和根的分化。

6.3 光照时长

大多数研究者在姜苗生长过程中,光照时间保持在 10~15 h/d 不等^[1,7,14-15,17,30]。但是,张延国^[21]研究表明,就平均姜块数量、重量和直径而言,全光照处理效果最好,而且和其它时间处理都存在极显著差异。这个结果在郑永强^[22]的研究中也观察到。生姜在田间栽培中是短日照作物,但组织培养过程中全光照反而取得更好的效果,有待于进一步的研究。

6.4 培养方式

李红梅等^[16]在生姜快繁时,采用了液体浅层静止培养,发现试管苗增殖速度显著提高,增殖系数比固体培养基提高了 31%,且根系发达,有利于试管苗的移栽成活。

6.5 其它添加物

韦金洋^[32]研究表明,在生姜继代增殖培养基中,添加 15 mg/L 的椰子汁对不定芽的诱导有一定的促进作用。由上可知,生姜组织培养是受到多种因素影响的,在具体的应用中,应充分考虑多方面的因素。

7 问题和前景

生姜通过组织培养,可以起到脱毒、快繁、种质资源保存、品质改良的作用,大幅度提高了生姜产量和品质,扩大了生姜的种植规模。生姜的组织培养技术虽取得了很大的进展,但是仍未能实现工厂化生产,存在生长成本高,初代接种污染率高,试管苗玻璃化,分化能力自衰,移栽程序繁琐和成活率低等问题。目前为止,生姜组织培养快繁技术的研究重点,在于确定组织培养中控制分化、继代生长、生根、根状茎诱导的培养基成分,生长调节物质的种类、浓度以及培养条件的最佳优化选择。然而生姜品种的多样化,要求在具体培养时选择不同的培养基和不同的培养条件,以完善生姜组织培养技术,从根本上解决其存在的问题。此外,生姜试管苗运输损耗率高,且移栽成活率不如试管姜高,所以,提高试管姜的诱导率将是生姜组织培养在将来一段时间的研究重点。在蔬菜中,马铃薯试管薯的诱导技术已经非常成熟,大蒜、百合等蔬菜在组织培养器皿中可以直接由组培苗诱导形成鳞茎、球茎,因此,同样以根茎进行无性繁殖的生姜,也可能基于组织培养及相关的诱导技术,建立起成熟的微型姜又到体系以加快优质种姜繁殖,缩

短生长周期,形成工厂化生产。

此外,生姜的组织培养技术结合细胞融合技术创制丰富生姜的种质资源,结合基因工程的方法和技术,提高生姜抗病虫害、抗逆性和改善品质等,将是今后生姜组织培养技术应用的研究重点方向之一。

参考文献

- [1] 王教义.姜脱毒组培技术研究[J].山东农业科学,1999(6):7-9.
- [2] 何伯伟.浙江省发展草莓、马铃薯等脱毒种苗业的前景[J].浙江农业科学,2000(5):211-214.
- [3] 范国强,徐坤.生姜脱毒与高产栽培技术[M].北京:中国农业科技出版社,1999.
- [4] 邓年方,潘百明.姜的组织培养研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(26):12406-12407.
- [5] 张华锋.生姜离体培养器官发生生理生化特征的研究[D].重庆:西南大学,2009.
- [6] 王教义,范国强,张平.姜脱毒组培技术研究[J].山东农业科学,1999(6):7-9.
- [7] 刘建成,刘冰.姜的组织培养与快速繁殖[J].现代农业科技,2008(14):23.
- [8] 梁称福,易诚.黄姜组培快繁技术试验研究[J].湖南环境生物职业技术学院学报,2006,12(2):135-138.
- [9] 郭启高,宋明,梁国鲁.生姜脱菌及离体块繁研究[J].西南农业大学学报,1999,21(2):137-139.
- [10] 薛寒青,周淑兰.不同抗生素对生姜组织培养中姜芽脱菌效果的研究[J].北方园艺,2009(6):45-47.
- [11] 黄学林.高等植物组织离体培养的形态建成及调控[M].北京:科学出版社,1995:64-50.
- [12] Nazeem P A, Joseph L, Rani T G, et al. Tissue culture system for in vitro pollination and regeneration of plantlets from in vitro raised seed of ginger-Zingiber officinale Rosc [J]. Acta Horticulture, 1996, 426:467-471.
- [13] Neeta D, George L, Eapen S. Direct regeneration of shoots from immature in florscence cultures of turmeric[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 62:235-238.
- [14] 刘小阳,徐德聪,李红侠.潜山生姜脱毒种姜快速繁殖体系的建立[J].安徽农业科学,2009,37(32):15699-15700.
- [15] 韦金洋,韦鹏霄,杨苛,等.生姜茎尖的消毒灭菌和芽诱导的研究[J].广西园艺,2005,16(6):4-7.
- [16] 李红梅,张侠,宋莉璐,等.生姜茎尖的组织培养及试管苗快繁体系的研究[J].山东科学,2008,21(5):36-38.

- [17] 唐燕梅,梁贵秋,陆春霞.生姜的组织培养[J].广西热带农业,2005(4):3.
- [18] 高山林,卞云云,陈柏君.生姜组织培养脱毒、快繁和高产栽培[J].中国蔬菜,1999(3):40-41.
- [19] 宣朴,郭元林,岳春芳,等.生姜茎尖组培快繁技术研究[J].西南农业学报,2004,17(4):484-486.
- [20] Kim TaeSoo, Choi InLock, Kim HyunSoon. Investigation of floral Structure and plant regeneration through anther culture in ginger[J]. Korean Journal of Crop Science, 2000, 45(3):207-210.
- [21] 张延国.组织培养诱导试管姜的形成.植物组织培养与脱毒快繁技术[C].全国植物组培、脱毒快繁及工厂化生产技术学术研讨会论文集,2001.
- [22] 郑永强.生姜试管苗根状茎诱导及根状茎形成机理研究[D].泰安:山东农业大学,2004.
- [23] 张耀华,张慧英.鲁大姜快繁技术的研究[J].广西热带农业,2009(3):3-5.
- [24] Bhat S R, Chandel K P S, Kackar A. In vitro induction of rhizomes in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) [J]. Indian Journal of Experimental Biology. 1993, 32(5):340-344.
- [25] Sharma T R, Singh B M, Chauhan R S. Production of disease-free encapsulated buds of *Zingiber officinale* Rosc [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(5):300-302.
- [26] 李宗菊,桂明英.谷氨酸在无糖培养中的应用[J].西南农业学报,1999,12(3):45-49.
- [27] 罗天宽,张小玲.台湾肉姜脱菌脱毒快繁技术研究[J].温州农业科技,2005(4):22-25.
- [28] 雷开荣.生姜组织培养中增殖与生根同步培养技术研究[J].中国种业,2006(5):33-34.
- [29] 张石城,刘祖琪.植物化学调控原理与技术[M].北京:中国农业科技出版社,1999:333-339.
- [30] 陈传红,蔡奇英,管毕财,等.多效唑在生姜组织培养中的应用研究[C].第二届全国植物组织培养、脱毒快繁及工厂化生产学术研讨会论文集,2004.
- [31] 李锡香,王海平,沈镛,等.一种微型姜苗组培快繁培养基及组培快繁方法[P].200610113341,2006.
- [32] 韦金洋.生姜的组织培养与农杆菌介导遗传转化体系建立的研究[D].南宁:广西大学,2006.
- [33] 唐玉明,李兴莲,任道群,等.不同方法处理对生姜组织培养的影响[J].西南农业学报,2002,15(4):116-118.

Impact Factor of Tissue Culture of Ginger

SHANG Xiao-hong, ZHOU Sheng-mao, WEN Jun-li, LIANG Ren-fan, KANG Hong-wei

(Institute of Vegetable Research, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: Ginger as a sort of important and pungent vegetable crops has often lower yield and quality in product because its underground tuberous root is asexually propagated as annual seedling and took lots of viruses and pathogenic bacteria. To date, the most effective countermeasure for improving yield and quality of ginger is tissue culture. In this paper, tissue culture of ginger were reviewed from choice of explant, sterilizing method of explant, culture medium, sucrose concentration, growth regulator, and culture condition as well. The existing problem of ginger tissue culture at the present was elucidated and its prospect of application was done.

Key words: ginger; tissue culture; impact factor