

# 姜黄愈伤组织再生体系的建立

张施君<sup>1</sup>, 刘念<sup>1</sup>, 盛爱武<sup>1</sup>, 吴国江<sup>2</sup>

(1. 仲恺农业工程学院 园艺与园林学院, 广东 广州 510225; 2. 华南植物园, 广东 广州 510650)

**摘要:**以姜黄无菌芽的芽基为外植体, 进行愈伤组织的诱导和无菌苗再生的研究。结果表明: 在 MS 培养基中添加 2,4-D 或 2,4-D 与 6-BA 的激素组合能够诱导外植体的切口部位产生愈伤组织, 但愈伤生长缓慢; 在 2,4-D 和 6-BA 的激素组合中再加入 TDZ, 愈伤组织能够不断增殖生长; 在 MS+0.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L BA+0.3 mg/L 2,4-D 培养基中, 愈伤的诱导率和生长量最高, 诱导率达到 80%, 每个月愈伤生长量为 148.6 mg; 愈伤组织再分化出芽的适宜培养基为 MS+0.5 mg/L TDZ+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA, 再分化率为 90%, 外植体的平均出芽数为 5.1。当试管苗长至 5 cm 时出瓶移栽, 成活率可达 90% 以上。

**关键词:**南昆山莪术; 组织培养; 芽基; 愈伤; 再生

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)06-0096-03

姜黄(*Curcuma longa*)为姜科姜黄属多年生草本, 在我国广东、广西、海南、云南、福建、四川、贵州及台湾广泛栽培<sup>[1]</sup>。该植物株高 100~150 cm, 植株丛生, 叶片长椭圆形。姜黄的用途广泛, 既有药用价值, 又可以作食品

调料, 还可作观赏植物, 适于庭园栽培或作大型盆栽。穗状花序秋季从叶鞘内抽出, 白色的苞片在花序上呈覆瓦状排列, 可用来布置花境、花坛, 也适合作切花。

目前, 姜黄属植物的组织培养报道主要是进行不定芽直接再生方式的研究, 在不定芽的诱导和增殖培养基中通常附加不同浓度的细胞分裂素(6-BA、KT 等)和生长素类物质(NAA)<sup>[1-3]</sup>, 而通过愈伤组织再生植株的报道则很少。该试验的目的是建立姜黄通过愈伤组织再生的体系, 为规模化快繁和开展转基因工作奠定基础。

**第一作者简介:**张施君(1974-), 女, 博士, 副教授, 现从事植物分子育种研究及教学等工作。E-mail: guanyehuazu@163.com。

**基金项目:**广东省科技攻关资助项目(2006B20201044); 中科院百人计划资助项目。

**收稿日期:**2011-12-22

[3] 范俊芳, 文友华. 南昌艾溪湖滨水鸟类栖息地的景观设计[J]. 湖南农业大学学报, 2007(12): 64-67.

[4] 张纵, 梁南南, 郭玉东, 等. 鸟类保护的城市园林多样性途径探析[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(4): 511-515.

[5] 俞孔坚, 李迪华. 生物多样性保护的景观规划途径[J]. 生物多样性, 1998, 6(3): 205-212.

[6] 陈水华, 丁平, 郑光美, 等. 岛屿栖息地鸟类群落的丰富度及其影响因子[J]. 生态学报, 2002, 22(2): 141-149.

[7] De Graaf R M. Effects of even-aged management on forest birds at northern hardwood stand interfaces[J]. Forest Ecology Management, 1992, 47

(1): 95-110.

[8] 唐仕敏, 唐礼俊, 李惠敏. 城市化对上海市五角场地区鸟类群落的影响[J]. 上海环境科学, 2003, 22(6): 406-410.

[9] 王彦平, 陈水华, 丁平. 惊飞距离—杭州常见鸟类对人为侵扰的适应性[J]. 动物学研究, 2004, 25(3): 214-220.

[10] 严少君, 朱曦, 俞益武, 等. 城市绿地引鸟设计的探索与实践—长兴龙山鹭鸟公园设计方案浅析[J]. 华中建筑, 2006, 24(12): 186-188.

[11] 徐晓俊, 葛振鸣, 裴恩乐, 等. 上海世界博览会园区内及周边地区鸟类多样性及其影响因子[J]. 生态杂志, 2007, 26(12): 1954-1958.

## The Eco-design for Bird Habitats of Urban Waterfront

JIANG Xiao-wei, CHEN Chu-wen

(Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300)

**Abstract:** Considering the urban waterfront habitat types and conditions of birds, proposed that building an urban open waterfront suitable the bird habitat and activities should be based on the concept of science and ecology from the landscape pattern, plant communities, ecological revetment and so on.

**Key words:** urban open waterfront; birds; habitat; landscape design

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

姜黄根状茎采自仲恺农业工程学院的农场,取根状茎上的腋芽进行消毒和组织培养,建立丛生芽的组织培养体系,再以姜黄无菌组培芽的基部为外植体进行愈伤组织的诱导。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌芽的培养** 从田间挖取姜黄的根状茎,切下约1~2 cm长的腋芽,用自来水洗净,在超净工作台上用75%酒精浸泡20~30 s,再用0.1%的升汞消毒10 min,无菌水冲洗6遍。将已消毒的芽接种到MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基上进行不定芽的诱导。约3周后,外植体的基部有新的不定芽产生,将不定芽分切出来,转接到增殖培养基MS+TDZ 0.5 mg/L上,能够不断产生新的丛生芽。以30 d为1个周期进行继代培养。

**1.2.2 愈伤组织的诱导** 选取2~3 cm的组培芽,将芽上部的叶片和下部的根切除,保留芽的基部约0.5 cm,以此芽基为外植体,水平放置于愈伤组织诱导培养基上。在姜黄属植物组织培养的相关报道中,BA、NAA和TDZ是促使芽再生和增殖的常用激素<sup>[3-5]</sup>,而2,4-D则常被用于诱导姜黄类的愈伤组织<sup>[6]</sup>,因此该试验的培养基中采用了6-BA、TDZ、NAA和2,4-D,各种生长调节剂配合或单独使用组成10个处理组合,筛选出适于愈伤组织生长的最佳培养基。每30 d继代1次,在60 d时统计不同处理的愈伤诱导率,诱导率(%)=(愈伤数/接种数)×100,并对愈伤组织进行称重。

**1.2.3 芽的再分化** 将培养获得的愈伤组织切成约1 cm的小块,分别接种于不同的芽分化培养基中,观察芽的诱导与生长情况。接种1个月时统计再生芽的愈伤个数和每块愈伤诱导出的芽数。再分化率(%)=(诱导出芽的愈伤个数/接种的愈伤总数)×100。

**1.2.4 壮苗培养** 将芽分化培养基中获得的芽转移到MS基本培养基中,芽抽生出叶片和根,长成完整植株。壮苗培养1个月,可将试管苗移栽出瓶。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽的诱导

由表1可知,在MS基本培养基中只添加2,4-D无法诱导愈伤组织的形成,2,4-D必须在BA或TDZ的配合下才能诱导出愈伤。经过10 d的黑暗培养,2,4-D和BA的激素组合以及2,4-D和TDZ的激素组合均诱使外植体的切口部位长出了浅黄色、潮湿、松软的愈伤组织。外植体对2,4-D的浓度变化十分敏感,0.3~0.5 mg/L的2,4-D能够诱使愈伤组织产生,2 mg/L的2,4-D会使芽/苗基逐渐褐化并死亡。然而无论是BA+2,4-D的组

合,还是TDZ+2,4-D的组合,愈伤的生长均十分缓慢。经过1个月的培养,BA+2,4-D的组合诱导出了21.4 mg的愈伤组织,TDZ+2,4-D的组合诱导出了23.7 mg的愈伤组织。如果将BA、2,4-D和TDZ 3种激素组合到一起,外植体的愈伤诱导率增加(图1-a~b),同时愈伤生长旺盛(图1-c),生长量显著增加到148.6 mg(表1)。NAA的效果与2,4-D不同,无论是单独使用,还是与BA配合,均诱导出褐色、硬而脆的愈伤组织。NAA并没有表现出与TDZ的协同效应,如果将NAA与TDZ配合使用,不能产生愈伤组织,只能使外植体的叶片不断伸长,基部长出根系。

表1 1 不同激素组合对愈伤生长的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulator combinations on calli induction

激素及浓度 Hormone and concentration/mg · L <sup>-1</sup>	愈伤诱导率 Calli induction rate/%	愈伤量 Calli/mg · 月 <sup>-1</sup>	愈伤质地 Calli character
2,4-D 0.5	0	0	—
2,4-D 2.0	0	0	—
BA 0.5+2,4-D 0.3	66.7	21.4	浅黄色、潮湿、松软
BA 0.5+2,4-D 0.5	46.7	23.7	浅黄色、潮湿、松软
NAA 2.0	0	0	—
NAA 5.0	70.0	89.5	褐色、硬、致密
TDZ 0.5+BA 0.5	0	0	—
TDZ 0.5+NAA 5.0	0	0	—
TDZ 0.5+2,4-D 0.3	70.0	38.8	浅黄色、潮湿、松软
TDZ 0.5+BA 0.5 +2,4-D 0.3	80.0	148.6	浅黄色、潮湿、松软

### 2.2 愈伤再分化与植株再生

将NAA诱导出的质地紧密的愈伤组织转接到不同的芽分化培养基中,无论在培养基中使用生长素NAA、2,4-D,还是细胞分裂素BA、KT,或者使用生长素和细胞分裂素的组合,均无法使其再分化出芽,愈伤只能转变成一团根状组织。扩大激素组合的类型,包括TDZ、赤霉素(GA<sub>3</sub>)和三碘苯甲酸(TIBA)等,也无法使NAA诱导出愈伤组织再分化出芽,愈伤仍然转变成根状组织。如果将在TDZ+BA+2,4-D激素组合下诱导出的松软的愈伤组织转到芽分化培养基,此愈伤组织能够再分化成芽。在BA+NAA的作用下,愈伤逐渐变绿形成芽点。如果在BA+NAA的组合中再加入TDZ,愈伤的分化出芽率和芽数增加(表2)。芽分化培养约1周,愈伤组织的表面开始出现白色的芽点,芽点逐渐长大并转绿,整个愈伤块也逐渐变为绿色,不断有芽和叶片生长(图1-d)。

### 2.3 试管苗的生根与移栽

将再生的芽丛分切成单芽,转接入MS基本培养基中,3~5 d后叶片和根再生出来,长成完整植株(图1-e)。当苗长至5 cm以上(图1-f),将苗从培养瓶中取出,洗净根部的培养基,栽入河沙基质中,浇透水,保持环境温度25~30℃,湿度80%~90%,成活率达到90%以上。

表2 不同激素组合对愈伤再分化成芽的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulator combinations on shoot differentiation from calli

激素及浓度 Hormone and concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再分化率 Regeneration rate/%	出芽数/外植体 number per explant	芽长 Buds length /cm
BA 2.0	0	0	0
TDZ 0.5	0	0	0
BA 2.0+TIBA 0.2	0	0	0
BA 2.0+GA <sub>3</sub> 0.5	0	0	0
BA 2.0+NAA 0.2	80	3.0	4.4
BA 2.0+TDZ 0.5	0	0	0
BA 2.0+TDZ 0.5+NAA 0.2	90	5.1	5.7

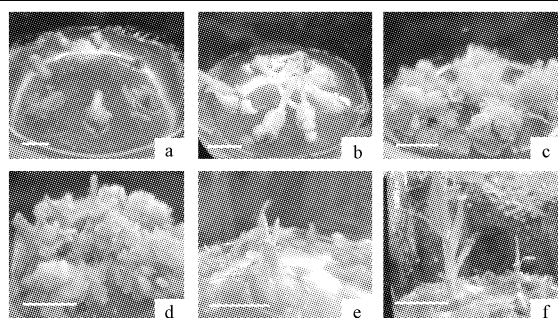


图1 姜黄愈伤途径的植株再生

Fig. 1 Calli-mediated shoot regeneration of *C. longa*

注:(a)以芽/苗基为外植体接种到 MS+0.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L BA+0.3 mg/L 2,4-D 培养基上;(b)外植体接种 1 周开始产生愈伤;(c)愈伤生长 4 周;(d)愈伤转接到 MS+0.5 mg/L TDZ+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 培养基上分化出芽;(e)单芽在 MS 基本培养基上生长;(f)完整试管苗;标尺为 1 cm。

Note:(a) Taking base of shoot/seedling as explant vaccination for to MS+0.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L BA+0.3 mg/L 2,4-D medium;(b) Explant vaccination 1 week began to produce of callus;(c) Growth 4 weeks of callus;(d) Callus transfer to MS+0.5 mg/L TDZ+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA medium differentiation budding;(e) Growth of single buds in basic medium MS;(f) Complete tube seedlings;Scaleplate is 1 cm.

### 3 讨论

在姜黄属的组织培养报道中,多数是关于不定芽的

直接再生方式的研究<sup>[4-6]</sup>,而通过愈伤组织再生植株的报道则很少。该试验的目的是建立姜黄愈伤途径的再生体系,为进行农杆菌介导的遗传转化和基因枪法遗传转化研究奠定基础。

TDZ 兼有细胞分裂素和生长素的双重功能,已被广泛应用于植物的组织培养和快速繁殖<sup>[7]</sup>。TDZ 对姜科植物的组织培养有促进不定芽直接再生的作用<sup>[5]</sup>,而该研究是首次将 TDZ 用于姜科植物愈伤组织的诱导和植株再生,TDZ 不仅诱导出了姜黄的愈伤组织,还在不定芽分化阶段显著地增加了芽的分化率。在该试验中,NAA 也能够诱导出愈伤组织,但这种愈伤组织在下一阶段的再分化培养中不能转变成芽,而是再生出了不定根,说明 NAA 诱导的愈伤组织的器官发生方式不同于 TDZ 诱导出的愈伤组织。而这 2 种愈伤组织的结构和功能差异则有待于通过制作组织解剖切片来进一步研究。

### 参考文献

- [1] 牟小翎,李文金,王均华,等.姜黄的组织培养和快速繁殖[J].北方园艺,2006(5):23.
- [2] 李春斌,方宏筠,王关林.药用植物姜黄的组织培养快速繁殖与植株再生的研究[J].中草药,2000,31(11):853-856.
- [3] 吕平,韦丽君,庞新华,等.印尼姜黄快速繁殖技术初步研究[J].中药材,2007,30(4):383-385.
- [4] 张慧英,唐秀桦,王建.姜黄的组织培养[J].农业与技术,2006,26(5):62-65.
- [5] 张施君,刘念,盛爱武,等.南昆山姜黄的组培快繁技术研究[J].北方园艺,2011(4):161-163.
- [6] Zhang S J, Liu N, Sheng A W, et al. *In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma kwangsiensis* Lindl (Zingiberaceae) [J]. Plant Growth Regul, 2011, 64(2):141-145.
- [7] Singh N D, Sahoo L, Sarin N B, et al. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Mill.) [J]. Plant Sci., 2003, 164:341-347.

## Establishment of Calli-mediated Regeneration System in *Curcuma longa*

ZHANG Shi-jun<sup>1</sup>, LIU Nian<sup>1</sup>, SHENG Ai-wu<sup>1</sup>, WU Guo-jiang<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225;  
2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650)

**Abstract:** A protocol was investigated for callus induction using bud base from tissue-cultured *Curcuma longa* explants. The results showed that MS media supplemented with 2,4-D or with 2,4-D+6-BA could successfully induce calli formation at cut positions of explants. However, the calli grew slowly. The optimal calli induction medium was MS+0.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L BA+0.3 mg/L 2,4-D, which showed the highest induction rate and calli growing mass, with an inducing rate of 80% and growing mass of 148.6 mg per month. The optimal plantlet regeneration medium was MS+0.5 mg/L TDZ+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA, with a regeneration rate of 90% and the average shoot number of 5.1 per explant. Regenerated plantlets (5 cm at length) were transferred to soil in greenhouse. More than 90% of plantlets could survive.

**Key words:** *Curcuma longa*; tissue culture; bud base; calli; regeneration