

# 春秋姜黄组培快繁技术研究

寇亚平, 张施君, 熊友华, 刘 念

(仲恺农业工程学院 园林园艺学院, 广东 广州 510225)

**摘 要:**以春秋姜黄根茎腋芽为外植体,采用添加 6-BA、NAA、TDZ 不同浓度和不同组合的 MS 基本培养基,进行不定芽诱导、丛生芽继代增殖和生根、壮苗培养等研究,探索其组织培养和离体快繁技术的适宜条件。结果表明:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基腋芽诱导率高达 86.7%,且生长速度快;MS+6-BA 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L 最有利于芽增殖,继代 3 次后,增殖系数达 14.1;MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基的壮苗生根效果最好。试管苗长至 6 cm 时移栽,成活率可达 90%以上。

**关键词:**春秋姜黄;腋芽;组培快繁

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)07-0142-03

春秋姜黄(*Curcuma attenuata* Wall.)为姜科姜黄属多年生球根草本花卉,原产缅甸和泰国<sup>[1-2]</sup>,是集观赏和食用等价值于一体的多用途新型花卉。植株丛生,高 40~60 cm,叶片狭长椭圆形,亮绿色或中脉略带紫色带,可以作为盆栽观叶植物。花期长,4~10 月,作为鲜切花,瓶插寿命可达 20 d 左右;春季穗状花序宝塔状,从根茎抽出,长 20~35 cm,直径 5~10 cm;不育苞片紫红色卵形或长圆形,长 1~3 cm,可育苞片先端紫红渐绿色或绿色。可用作盆栽、花台、花境或热带亚热带园林植物造景。此外,通过光温调控,对球茎进行催芽催花水培,调至春节开花,作为新型年宵花,具有高观赏开发价值和市场潜力;其幼嫩花序作为一种食用花卉在广州地区正受青睐。

春秋姜黄主要是采用休眠根状茎繁殖,繁殖速度慢,加之该属植物在栽培过程中易受叶枯病和根腐病的影响,如 *C. aromatica*<sup>[3]</sup> 和 *C. amada*<sup>[4]</sup>,通过传统根茎繁殖方式很难满足市场开发的需求。通过组织培养技术大量快速繁殖春秋姜黄,将是解决上述问题的一个行之有效的办法。除 Apavatjirut P 等<sup>[1]</sup>和 Jana L S 等<sup>[2]</sup>曾报道春秋姜黄染色体为  $4n=84$  之外,该材料其它方面的研究在国内外尚未见报道。该研究旨在采用春秋姜黄未成熟的花序作外植体,通过 MS 培养基添加 2,4-D、6-BA、NAA 和 TDZ 等激素进行不定芽萌发从而建立离体快繁技术体系,为组织培养的工厂化育苗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011 年 3 月从广东省农业技术推广中心采集 3 a

**第一作者简介:**寇亚平(1988-),女,在读硕士,研究方向为园林植物与观赏园艺及植物遗传育种。E-mail:kou\_yaping@163.com。

**基金项目:**仲恺农业工程学院研究生创新基金资助项目(H1410011)。

**收稿日期:**2012-02-01

生的春秋姜黄根状茎。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的处理** 将越冬的根状茎埋在冲洗干净的沙中,放在 25℃ 的培养箱中培养至腋芽长到 1.0~1.5 cm,用解剖刀切取腋芽。先放在流水下冲洗 0.5 h,然后用蘸取 75% 酒精溶液的脱脂棉擦洗 20~30 s。在超净工作台上,先将上述处理的腋芽用 2% 的 NaClO 溶液消毒 15 min,无菌水冲洗 3~5 遍,再用 0.1% 的升汞消毒 8~10 min,无菌水冲洗 5~8 遍。

**1.2.2 腋芽萌发的诱导** 将已经消毒的外植体放在消毒滤纸上,吸取水分,剥腋芽外层至 0.5~1.0 cm,接种在添加 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基上进行芽萌动培养。每个处理 5 瓶,每瓶接种 3 个腋芽。1 周后腋芽开始萌动,叶逐渐伸展,1 个月后统计腋芽诱导率。诱导率(%)=(萌发的外植体数/接种外植体数)×100。

**1.2.3 丛生芽的继代增殖** 将诱导获得的不定芽转接到添加不同浓度不同组合 6-BA、NAA 和 TDZ 的 MS 培养基上继代增殖,30 d 后统计芽的增殖系数、芽的高度和生根数;以后每隔 40 d 进行 1 次继代增殖培养,连续统计继代 4 次的丛生芽增殖系数。芽增殖系数(%)=(芽增殖数/接种芽数)×100。

**1.2.4 壮苗生根培养** 将生长到 3~5 cm 的丛生芽切出转接到添加低浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基上进行壮苗生根培养。壮苗 3 周,植株高 6 cm 左右,叶片浓绿,根数达 10 条左右时进行移栽。

**1.2.5 驯化移栽** 将在壮苗生根培养基上培养 3 周,植株长至 6 cm 以上的幼苗拿到室温为 25~30℃ 的环境里放置 1 周。然后用镊子取出试管苗,冲洗掉根上的培养基,移栽至泥炭土:珍珠岩为 2:1 的基质上,浇透水放在 25~30℃ 的环境下培养,1 个月后统计成活率。

**1.2.6 培养条件** 以上培养基中均添加 30 g/L 蔗糖,7 g/L 琼脂,pH 灭菌前调至 5.8~5.9。培养条件为温度

(25±3)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 14 h/d。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽的诱导

接种的外植体(图 1A)约 1 周后开始萌动,包在外面的叶片逐渐伸长并展开,10 d 左右陆续开始有根长出;3 周后,叶片形成,并陆续产生不定芽(图 1B)。由表 1 可知,6-BA 和 NAA 组合培养基均能诱导不定芽生长,其中以 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养最好,不定芽生长健壮,并有增殖。当 6-BA 浓度为 6 mg/L 时,外植体的外部苞片皱缩,颜色变浅,芽稍有膨大,未见不定芽萌动生长。降低 6-BA 浓度为 4.0 或 2.0 mg/L,同时添加 NAA 则有利于不定芽的粗壮生长,前者不定芽的生长速度缓慢,后者能快速诱导不定芽的生长,并有不定芽增殖的迹象(图 1B)。NAA 浓度为 0.5 mg/L 时可以诱导出大量根生长,降低 NAA 浓度,不定根的生长量减少。

从不定芽诱导培养中可以看出,单独使用 6-BA 和 NAA 均不能诱导外植体长出不定芽,高浓度的 6-BA 和 NAA 组合抑制萌动芽的生长。当 6-BA 浓度相同时,NAA 浓度为 0.1 mg/L 较好,此时不定芽长根比较少,有利于芽快速生长和不定芽增殖。NAA 浓度为 0.5 mg/L 时会因大量的根生长而降低不定芽的生长速度和增殖效果。

表 1 不同浓度的 6-BA 和 NAA 对不定芽诱导的影响

植物生长调节剂 /mg·L <sup>-1</sup>		外植体 数/个	产生不定芽 外植体数/个	外植体诱 导率/%	外植体生长状况
6-BA	NAA				
6	0	15	0	0	外部苞片皱缩,颜色变浅,稍微萌动膨大
4	0.5	15	6	40.0	芽粗壮,外部稍皱缩,有根长出,生长慢
2	0.5	15	13	86.7	芽粗壮,有不定芽增殖,大量根长出,生长快
2	0.1	15	12	80.0	芽粗壮,少量芽增殖,少量根长出,生长快
1	0.5	15	10	66.7	芽粗壮,有大量根长出,生长缓慢
0	0.5	15	0	0	芽有膨大,基本不生长,基部有毛细根

### 2.2 丛生芽的继代增殖

将上述诱导出来的不定芽接种到丛生芽继代增殖培养基上,比较添加不同浓度不同组合的 6-BA、NAA、TDZ 培养基对不定芽继代增殖效果的影响。由表 2 可知,6 种培养基均能使丛生芽继代增殖,经过 4 次继代培养,以 MS+6-BA 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L 培养基对丛生芽继代增殖效果最佳,增殖系数高达 14.1,增殖速度快,丛生芽生长粗壮有活力。6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,生长缓慢,且增殖系数较低。浓度降为 2.0 mg/L 时,不定芽能正常增殖,增殖系数第 1 代达 3.8~5.8。当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L,在 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,不定芽的增殖系数明显降低,且生长缓慢,但是增殖

芽比较粗壮。NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,不定芽增殖过程中会产生大量的根,当降低 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时不定芽增殖过程中的根生长数量较少,不定芽生长较迅速。TDZ 0.1 mg/L 和 TDZ 0.5 mg/L 均可以明显促进不定芽的增殖,在与 6-BA 2.0 mg/L 组合时,TDZ 0.1 mg/L 可以诱导大量健壮的不定芽增殖,增殖系数在第 3 代达到最大为 14.1。TDZ 0.5 mg/L 诱导的不定芽生长速度快,但是苗比较纤细,叶色发黄,不利于生根壮苗。

表 2 不同植物生长调节剂组合对不定芽继代增殖的影响

植物生长调节剂 /mg·L <sup>-1</sup>			接种外 植体数	增殖系数				丛生芽生长状况
6-BA	NAA	TDZ	/个	1代	2代	3代	4代	
3.0	0.5	0	15	1.6	1.8	2.1	2.0	芽粗壮,生长较缓慢
2.0	0.5	0	15	3.8	4.3	5.7	4.9	芽壮,大量根产生,生长较快
2.0	0.1	0	15	4.5	5.6	8.6	7.8	芽壮,有较多根,生长快
1.0	0.5	0	15	1.7	2.4	3.5	3.4	芽粗壮,大量粗壮根,生长慢
2.0	0	0.1	15	5.8	8.6	14.1	13.2	芽粗壮,有根,生长很快
2.0	0	0.5	15	5.5	8.8	13.1	10.9	芽纤细,叶片黄,生长快

6 种培养基组合在经过 4 代增殖培养之后,统计丛生芽增殖系数,发现相同的培养基随着继代次数增加,增殖系数会增大。在继代培养的第 3 代达到最大,继代 4 次及之后增殖系数会趋于稳定并稍有降低。这种现象与植物生长调节剂在丛生芽中积累有密切相关性,也说明春秋姜黄在不定芽增殖过程中需要持续的生长素积累才能诱导出最多的不定芽,这为该植物组培快繁的规模化生产提供了指导性的理论基础。

### 2.3 试管苗的生根移栽

春秋姜黄在有 NAA 存在的条件下极易生根(图 1E),无论是单独使用 NAA 的 MS 培养基还是添加了 6-BA 的培养基,均能长根。由表 3 可知,MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基的壮苗生根效果最好,芽和根粗壮。单独使用 NAA 时,随着浓度增加,生根数量会增加,NAA 浓度为 0.5 mg/L 时最好,生根数和根长均较理想。在相同浓度下添加了 6-BA 更有利于根和芽的粗壮生长。

表 3 不同浓度生长调节剂对植物生根壮苗的影响

植物生长调节剂 /mg·L <sup>-1</sup>		接种苗 数/个	生根苗 数/个	生根率 /%	生根植株状况 (根芽状况、生根数及根长)
6-BA	NAA				
0	0.1	15	15	100	生根较慢,3 条左右,长 2 cm 左右
0	0.2	15	15	100	生根慢,4 条左右,根细长,2 cm 左右
0	0.5	15	15	100	生根快,6 条左右,根上有绒毛,长 3 cm 左右
1.0	0.5	15	15	100	芽根粗壮,生根快,变绿根 6 条左右,长 3 cm 左右

## 3 结论与讨论

关于姜黄属植物的组织培养国内外进行了一些研究。张施君等<sup>[6-7]</sup>使用添加了 6-BA、NAA、TDZ 的 MS 培养基,从 *Curcuma kwangsiensis*<sup>[5]</sup> 的茎尖腋芽诱导不定芽及愈伤组织和器官发生,以 *Curcuma nankunshanen-*

sis, *C. kwangsiensis* var. *nanlingensis* 根状茎腋芽为外植体进行组培快繁; Salvi N D 等<sup>[8-10]</sup>、Prathanturug S 等<sup>[11-12]</sup>、Tyagi R K 等<sup>[13]</sup>使用添加了 6-BA、NAA、IBA 和 KT 等的 MS 培养基,在以 *C. longa* 的芽苞、茎尖诱导不定芽和器官发生方面均有报道。该试验以春秋姜黄根状茎腋芽为外植体进行组培快繁,并且采用 0.2% 次氯酸钠和 0.1% 升汞 2 次消毒,大大降低了接种的污染率。通过采用 MS 培养基添加 6-BA、NAA 和 TDZ 进行不定芽诱导、增殖和壮苗生根培养,并进行了继代跟踪不定芽增殖的效果,得出在丛生芽继代培养的第 3 代,增殖系数高达 14.1,之后继代芽增殖系数会略有下降,这为通过工厂化育苗快速获得大量高质的无病毒组培苗提供了理论基础。

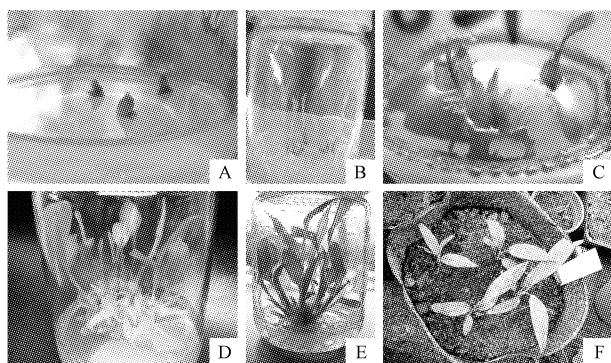


图 1 春秋姜黄组培快繁

注:A:接种的不茎尖腋芽;B:在 不定芽诱导培养基上诱导 30 d; C、D:不定芽的增殖培养;E:壮苗生根培养;F:移栽成苗。

该试验比较了不同浓度 6-BA 与 NAA 和 TDZ 对不定芽增殖的影响,6-BA 过高或过低均不利于芽增殖,6-BA+NAA 和 6-BA+TDZ 的组合均能使芽增殖,在 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,增殖系数分别高达 8.6 和 14.1,并且有根长出。当组合中的 TDZ 浓度增加为 0.5 mg/L 时,反而降低了芽增殖系数,增殖芽生长纤细。由此可知,6-BA 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L 的组合既可以促进芽增殖,又可以发挥生长素的作用,促进根的生长。这与张施君等<sup>[7]</sup>在南岭姜黄中报道的 TDZ 具有生长素

和细胞分裂素的双重作用相符。

### 参考文献

- [1] Apavatjirut P, Sirisawat T, Siriruga P, et al. Studies on chromosome number of seventeen Thai *Curcuma* species [J]. Proceedings of 2<sup>nd</sup> National Conference on Flower and Ornamental Plant, 1996, 2: 86-99.
- [2] Jana L S, Otakar S, Vlasta J, et al. Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae) [J]. Ann. Bot., 2007, 100: 505-526.
- [3] Nayak S. *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb [J]. Plant Growth Regul, 2000, 32: 41-47.
- [4] Prakash S, Elangomathavan R E, Seshadri S, et al. Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. Plantlets from rhizome and leaf sheath explants [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2004, 78: 159-165.
- [5] 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: 141-145.
- [6] 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.
- [7] 张施君, 刘念, 盛爱武, 等. 南岭姜黄的组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2011(8): 151-153.
- [8] Salvi N D, George L, Eapen S. Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2000, 62: 235-238.
- [9] Salvi N D, George L, Eapen S. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2001, 66: 113-119.
- [10] Salvi N D, George L, Eapen S. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2002, 68: 143-151.
- [11] Prathanturug S, Soonthornchareonnon N, Chuakul W, et al. High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 1054-1059.
- [12] Prathanturug S, Soonthornchareonnon N, Chuakul W, et al. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2005, 80: 347-351.
- [13] Tyagi R K, Yusuf A, Dua P, et al. *In vitro* plant regeneration and genotype conservation of eight wild species of *Curcuma* [J]. Biologia Plantarum, 2004, 48: 129-132.

## Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Curcuma attenuata*

KOU Ya-ping, ZHANG Shi-jun, XIONG You-hua, LIU Nian

(College of Horticultural and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

**Abstract:** Taking rhizomes axillary buds of *Curcuma attenuata* as explants with adding 6-BA, NAA, TDZ different concentration and various combinations of MS basic medium, the optimal conditions of tissue culture and rapid propagation technology about shooting induction, multiple shoot subculture, proliferation, rooting, and seedling cultivation were studied. The results showed that the optimal medium for shooting induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L with an inducing rate of 86.7% and rapid growth. The proliferation efficiency of adventitious shoots increased 14.1-fold after subculture for three times on MS medium containing 2.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L TDZ. Medium containing 1.0 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA served as the rooting medium. Over 90% of the plantlets survived when they grow more than 6 cm tall.

**Key words:** *Curcuma attenuata*; axillary bud; tissue culture and rapid propagation