

# 生姜通过器官发生途径体外再生的研究

孙霞, 亓翠英, 秦燕

(莱芜职业技术学院 生物研究所, 山东 莱芜 271100)

**摘要:**以生姜茎尖为外植体,采用正交实验设计研究了不同激素组合和浓度的培养基对茎尖分化的影响。结果表明:茎尖经无菌处理,接种于 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的培养基上,可使芽、根相继分化,形成的幼芽数平均为 3.5 个,继代培养历经 60 d 可产生大量的带根苗,为生姜通过器官发生途径体外再生扩繁种苗提供了有效方法。

**关键词:**生姜;器官发生途径;体外再生

**中图分类号:**S 632.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0121-03

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是药食两用的重要经济作物,由于开花结籽困难,通常用地下茎繁殖,即以姜块作为种姜,致使生产成本提高。据统计,山东省 1 hm<sup>2</sup>姜田的姜平均产量为 50 t,而 1 hm<sup>2</sup>姜田仅需姜种就达 5.5 t,对姜农来说是庞大的生产投入。自 1977 年, Hosoke 等<sup>[1]</sup>首次报道了生姜离体培养成功后,后人做了一系列的生姜离体培养扩繁试验,用组织培养技术获得生姜再生植株作为种苗,既可以减少姜块的消耗,降低生产投入,又可以在有限的时间和空间内培育大量无菌苗。生姜的体外再生有 2 种途径:1 种是通过器官发生途径<sup>[2-4]</sup>,另 1 种是通过体细胞胚途径<sup>[5-7]</sup>。为建立莱芜大姜持续稳定的种苗培育体系,该试验以茎尖为外植

体,研究了不同激素组合和浓度的培养基对茎尖分化的影响,以期通过器官发生途径快速获得再生植株。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取健康、无病害伤口的莱芜大姜根状茎,放于塑料袋内,置 25℃培养箱内保湿催芽。待芽长至 2 cm 左右时,取已发芽的姜块,用肥皂水清洗表面的污物,流水冲洗 15 min。将芽用手术刀全部切下,剥去外层叶鞘,流水冲洗 1~2 h,然后拿到无菌室,剥取带有 1~2 个叶原基约 3~5 mm 左右大小作为外植体,先用 70%乙醇消毒 15 s,无菌水冲洗 1 遍,再置于 0.1%的升汞中杀菌 8 min,无菌水冲洗 3~4 遍,除去表面的化学物质后备用。

### 1.2 试验方法

以 MS 为基本培养基,用 2,4-D(0、1.0、1.5 mg/L), 6-BA(0、1.0、3.0 mg/L),KT(0、0.5、2.0 mg/L),NAA(0、0.1、1.0 mg/L)4 种激素,进行 4 因素 3 水平的交互正交

**第一作者简介:**孙霞(1974-),女,博士,副教授,现主要从事经济作物的育种研究工作。E-mail:lwzysx@126.com.

**基金项目:**山东省科学发展计划资助项目(2011GGA12019)。

**收稿日期:**2012-05-21

## Cloning and Aeqence Analysis of ANS Gene from *Litchi chinensis*

ZHAO Zhi-chang<sup>1,2</sup>, HU Fu-chu<sup>2</sup>, HUANG Jian-feng<sup>1</sup>, HU Gui-bing<sup>2</sup>, YANG Zhuan-ying<sup>2</sup>, XIAO Jing<sup>2</sup>

(1. Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou, Hainan 571737; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

**Abstract:** Taking the peel and young leaves of *Litchi chinensis* 'Nuomici' at three different stages as material, its ANS gene was cloned and analyzed. The results showed that the anthocyanidin synthase (ANS) was a key enzyme in the anthocyanin biosynthesis. A ANS gene was cloned from litchi pericarp by homologous cloning method. The open reading frame was 1 074 bp, and encoding 357 amino acids. The 1 279 bp length fragment was amplified from genome and analysis, which contained five introns, respectively, in 504~708 bp. It was found that the gene encoding for the protein had close relationship with mountain grape (*Vitis vinifera*), cocoa (*Theobroma cacao*), citrus (*Citrus sinensis*), and other fruit trees through phylogenetic analysis.

**Key words:** *Litchi chinensis* Sonn.; ANS; gene cloning; sequence analysis

实验,采用  $L_{27}(3^3)$  正交表设计,共 27 个组合(表 1)。加 3%蔗糖和 0.8%琼脂粉,pH 5.8~6.0,温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,暗培养。继代培养阶段采用 16 h/8 h 光暗交替培养,培养箱湿度为 60%~70%。每个三角瓶内放 1~2 个外植体,每组培养基重复 7 瓶。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度水平的激素组合对外植体分化的影响

由表 1 可知,以茎尖为外植体,当 2,4-D 浓度在 1.0~1.5 mg/L 范围内,KT 浓度在 0~2.0 mg/L 范围内,NAA 浓度在 0~1.0 mg/L 范围内,且生长素与细胞分裂素的比例为 2:1~4:1,培养 30 d,都比较容易诱导出愈伤组织(图 1-B),其中对愈伤诱导效果较好的培养基是 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 和 MS+2,4-D 1.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 1.0 mg/L,诱导率为 83.3%。

在相同的培养基上继代培养,65%的愈伤组织首先产生根(图 1-C),其中最适宜生根的培养基是 MS+2,4-D

1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L,每愈伤平均生根 9.8 条,将愈伤组织连同根一起转到相同的培养基上继代培养,皆没有观察到芽分化。

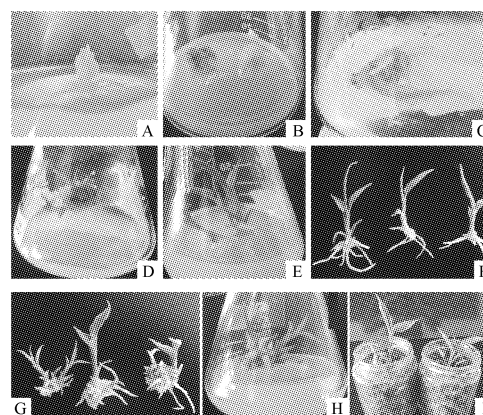


图 1 生姜器官发生途径离体培养

注:A:愈伤组织开始分化芽;B:愈伤组织;C:愈伤组织分化根;D:丛生芽;E、F:单株苗;G、H:带根苗;I:移栽于沙壤土的带根苗。

表 1 培养基不同激素浓度对比对生姜愈伤组织及根、芽分化的影响

处理	2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	KT /mg · L <sup>-1</sup>	NAA /mg · L <sup>-1</sup>	接种外植体数 /个	产生愈伤组织数 /个	诱导率/%	分化芽数/外植体	每愈伤平均 生根/条	每株带根苗 平均生根/条
1	0.0	0.0	0.0	0.0	12	0	0	0	0	0
2	0.0	0.0	0.5	0.1	12	0	0	0	0	0
3	0.0	0.0	2.0	1.0	12	5	41.6	3.5±1.0	0	7.4±1.2
4	0.0	1.0	0.0	0.1	12	0	0	0	0	0
5	0.0	1.0	0.5	1.0	12	3	25.0	0	8.5±0.7	0
6	0.0	1.0	2.0	0.0	12	0	0	0	0	0
7	0.0	3.0	0.0	1.0	12	2	16.7	1.2±0.6	0	5.8±0.6
8	0.0	3.0	0.5	0.0	12	2	16.7	0	0	0
9	0.0	3.0	2.0	0.1	12	3	25.0	0	2.6±1.0	0
10	1.0	0.0	0.0	0.1	12	7	58.3	0	0	0
11	1.0	0.0	0.5	1.0	12	10	83.3	0	4.7±1.5	0
12	1.0	0.0	2.0	0.0	12	8	66.7	0	9.8±2.1	0
13	1.0	1.0	0.0	1.0	12	9	75.0	0	7.7±0.4	0
14	1.0	1.0	0.5	0.0	12	6	50.0	0	4.5±0.7	0
15	1.0	1.0	2.0	0.1	12	3	25.0	0	5.7±1.2	0
16	1.0	3.0	0.0	0.0	12	3	25.0	0	0	0
17	1.0	3.0	0.5	0.1	12	5	41.7	0	7.8±0.9	0
18	1.0	3.0	2.0	1.0	12	2	16.7	0	5.2±1.3	0
19	1.5	0.0	0.0	1.0	12	6	50.0	0	0	0
20	1.5	0.0	0.5	0.0	12	9	75.0	0	1.4±0.8	0
21	1.5	0.0	2.0	0.1	12	8	66.7	0	2.3±0.5	0
22	1.5	1.0	0.0	0.0	12	5	41.6	0	0	0
23	1.5	1.0	0.5	0.1	12	8	66.7	0	2.7±1.3	0
24	1.5	1.0	2.0	1.0	12	10	83.3	0	2.2±1.0	0
25	1.5	3.0	0.0	0.1	12	3	25.0	0	1.6±0.5	0
26	1.5	3.0	0.5	1.0	12	4	33.3	0	3.0±0.9	0
27	1.5	3.0	2.0	0.0	12	2	16.7	0	0	0

### 2.2 不同浓度水平的激素组合对生姜器官发生途径离体再生的影响

在试验的 27 组浓度组合中,只有 2 组培养基上的外植体先分化成幼芽,继而生根。其中 1 组培养基为 MS+2.0 mg/L KT+1.0 mg/L NAA,外植体在该培养基上培养 20 d 就明显膨大并分化幼芽(图 1-A),30 d 后

将整个幼芽组织转到相同的培养基中继续培养,培养 15 d 可分化多个幼芽(图 1-D),形成的幼芽数平均为 3.5 个,每个幼芽都能产生正常的叶和根,形成丛生苗,且生长健壮(图 1-H)。当丛生苗长至 2~3 cm 时,从培养基表面处剪断,再插到相同的新鲜培养基上继续培养,大约 15 d 左右即可成带根苗(图 1-E)。每株带根苗形成的

根数平均为 7.4 条。能形成再生植株的第 2 组培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA,产生的幼芽数平均为 1.2 个,每株带根苗的根数平均为 5.8 条。

### 2.3 带根苗的移栽

当带根苗长到 5 cm 左右时,揭开封口膜,将培养瓶移到 20~25℃ 的室内练苗 3~5 d,然后从瓶中取出带根苗,用流水冲洗掉粘附在根系上的培养基,然后移栽至堆肥:沙壤土=1:3 的基质中,淋足定根水,每 3 d 喷 1 次清水,以保持土壤湿润,20 d 后生姜带根苗即可成活(图 1-I)。

## 3 结论与讨论

该试验以生姜茎尖为外植体,用 MS 基本培养基附加 2.0 mg/L KT 和 1.0 mg/L NAA 继代 2 次,历经 60 d,通过器官发生途径可获得大量的带根苗。Villamor<sup>[4]</sup>曾报道以 MS 附加 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 作为培养基,通过器官发生途径每个生姜茎尖能产生 6.6 个幼芽,启示氮元素对幼芽的分化有重要作用。Sultana 等<sup>[8]</sup>以 MS 附加 1.0 mg/L KT 和 1.0 mg/L 6-BA 为培养基,通过体细胞胚发生途径每个茎尖能产生 3.6 个幼芽。说明器官发生途径比体细胞胚途径更容易促使生姜幼芽的分化和增殖,是生姜有效的离体扩繁方式。该试验没有通过体细胞胚途径诱导出再生植株,通过器官发生途径诱导出的幼芽数量较少,因此激素配比及光暗等培养基质及条件有待进一步调整。

从该试验 27 组不同激素浓度配比产生的根、芽情况看,培养基中生长素和细胞分裂素的比例(平衡)对生姜根芽的分化具有重要作用,一般来说,细胞分裂素和生长素的比例高,易于幼芽的形成,而生长素和细胞分裂素的比例高,易于根的形成。国内外许多文献强调了 6-BA 对生姜离体繁殖的影响<sup>[2,9-13]</sup>,Kavyashree 和 Muhammad 认为较高浓度的 6-BA 有利于茎尖的分化和增殖,Bhagyalakshmi 和 Balachandran 证明,低浓度的 6-BA 对生姜幼芽的分化和增殖更有效,甚至培养基中若

没有 6-BA,生姜幼芽不能增殖,而该试验以 KT 作为细胞分裂素,同样获得了较好的芽、根分化和增殖结果。可有效缩短生姜离体扩繁时间,提高繁殖速度,降低成本。

### 参考文献

- [1] Hosoke T, Sagawa Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through tissue culture[J]. Hort Science, 1997, 12(5): 451-452.
- [2] Balachandran S M, Bhat S R, Chandel K P S. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) [J]. Plant Cell Reports, 1990(8): 521-524.
- [3] Dekkers A J, Rao A N, Goh C J. *In vitro* storage of multiple shoot cultures of ginger at ambient temperature of 24~29℃ [J]. Scientia Horticulturae, 1991, 47: 157-167.
- [4] Villamor C. Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger, *Zingiber officinale* Rosc [J]. E-International Scientific Research Journal, 2010, 2(2): 150-155.
- [5] Malamug J J F, Inden A, Asahira T. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus [J]. Scientia Horticulturae, 1991, 48: 89-97.
- [6] Babu K N, Samasudeen K, Ratnambal M J. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 29: 71-74.
- [7] Kackar A, Bhat S R, Chandel K P S, et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1993, 32: 289-292.
- [8] Sultana A, Hassan L, Ahmad S D, et al. *In vitro* regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants [J]. Pakistan Journal of Botany, 2009, 41(4): 1667-1676.
- [9] Kavyashree R. An efficient *in vitro* protocol for clonal multiplication of Ginger-var. varada[J]. Indian Journal Biotechnology, 2009(8): 328-331.
- [10] Yunus M F, Aziz M A, Kadir M A, et al. *In vitro* propagation of *Etlingera elatior* (Jack) (torch ginger)[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135: 145-150.
- [11] Bhagyalakshmi, Singh N S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield of oleoresin [J]. Journal of Horticultural Science, 1988, 63(2): 321-327.
- [12] 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.
- [13] 缪静, 柏新富. 姜茎尖的离体培养与试管苗快繁[J]. 中草药, 2004, 35(10): 1178-1180.

## Study on *in vitro* Regeneration of *Zingiber officinale* Rosc. by Organogenesis

SUN Xia, QI Cui-ying, QIN Yan

(Institute of Bio-Technology, Laiwu College for Vocational Technology, Laiwu, Shandong 271100)

**Abstract:** Taking vegetative buds of *Zingiber officinale* Rosc. as explants, its differentiation with different combinations and concentrations of plant hormone were studied by the method of orthogonal design. The results showed that the aseptic buds were cultured on MS medium supplemented with a combination of 2.0 mg/L KT and 1.0 mg/L NAA gave the shoot and root differentiation, and the multiple shoot showed mean number of 3.5. The repeated subculture resulted in rapid plantlets multiplication during 60 days. It was to provide an effective method for obtaining large scale planting material of ginger by the organogenesis pathway.

**Key words:** *Zingiber officinale* Rosc.; organogenesis; *in vitro* regeneration