

通过薄片培养技术建立白姜花 高效植株再生体系

肖 望, 涂红艳, 张爱玲, 吴松斌, 陈慧妍

(广东第二师范学院 生物与食品工程学院, 广东 广州 510303)

摘 要:以白姜花(*Hedychium coronarium*)试管苗为外植体,采用薄片培养技术,研究了试管苗苗龄、薄片所在位置、植物生长调节剂的浓度及组成对薄片不定芽诱导的影响。结果表明:从苗龄为 28 d 试管苗的第 1 条根所在部位切取的薄片,出芽能力最强,每棵苗可获得 9.5 个芽;在含有 3 mg/L 6-BA 的不定芽诱导培养基中,从 1 株试管苗最多可获得 9.9 个不定芽;在含有 0.1 mg/L TDZ 的不定芽诱导培养基中,从 1 株试管苗最多可获得 12.8 个不定芽;将所获得的不定芽接种在成苗培养基 1/2 MS+1 g/L 活性炭中能有效促进根的发育,植株生长健壮;成熟试管苗驯化后移栽室外,存活率达 95%。

关键词:白姜花;薄片培养;植株再生

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)03-0096-04

白姜花(*Hedychium coronarium*)属姜科姜花属(*Hedychium*)多年生宿根草本植物,因其色彩艳丽且气味芬芳,主要用作香型鲜切花、庭院绿化和园林景观植物,为广受青睐的庭园芳香花卉,市场需求量大^[1]。此外,白姜花还是一种很好的芳香调味植株,其植株中含有沉香醇、金合欢烯等多种芳香化合物,可以提取芳香油,用作高档香精^[2]。

目前在白姜花的大规模应用上还存在许多问题,例如鲜切花瓶插期短(2~3 d)、花色品种单一、有效药用成分提取效率低下、植株分蘖系数低下和繁殖速度缓慢等,不能很好地满足商品化生产的要求^[3]。通过育种获得优良的白姜花新品种是解决问题的有效办法。但白姜花在广州少育或不育限制了通过人工有性杂交的方法进行品种改良,通过生物工程方法有望解决问题,前提条件是建立高效的植株再生体系。目前主要是采用白姜花成熟种子的无菌苗的下胚轴作为外植体,通过诱

导丛芽繁殖并再生完整植株^[2,4]。HAMIDOU等^[5-6]通过体胚发生途径建立了姜花属植物 *Hedychium muluense* 和 *Hedychium bousigonianum* 的植株再生体系,但体胚诱导频率和植株再生频率很低,不足以应用于进一步的生物技术研究。

薄片培养是指将外植体横切成厚大约 0.3~1.0 mm 的薄片进行培养获得再生植株的方式,具有取材范围广、激素用量少、培养周期短、再生频率高等优点^[7]。由于所切薄片具有细胞少、面积大、培养过程中可充分接触培养基、接触药液面积大等优点,在植物基因工程中,利用薄片作为外植体可以提高转化效率和减少嵌合体的出现^[8]。现采用薄片培养技术建立白姜花的高效植株再生体系,以期采用生物技术进行白姜花品种改良提供良好的技术平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料白姜花(*Hedychium coronarium*)地下根茎购自广州芳村岭南花卉市场。

1.2 试验方法

1.2.1 试管苗的获得 切取白姜花根状茎上新长出的 1~2 cm 长的健壮吸芽,自来水冲洗干净后,用洗洁精浸泡 25~30 min,再用流水冲洗 25~30 min,于超净工作台内用 75% 乙醇溶液进行表面消毒 30 s,再用 1 g/L HgCl₂ 消毒 15~20 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次,每次 2~3 min,用消毒滤纸吸干水分,将吸芽切成 0.5~

第一作者简介:肖望(1970-),女,博士,教授,现主要从事植物生理学等教学与科研工作。E-mail:xiaowang@gdei.edu.cn.

基金项目:广东省创新强校工程省级重大资助项目(自然科学类,2014KZDXM076);广东省自然科学基金资助项目(10451030301004286);广东省科技计划资助项目(2015A030302097);广东省高等院校学科与专业建设专项资金资助项目(2013KJ CX0137);广州市科技计划科学研究专项资金资助项目(2014J4100151);国家级大学生创新创业训练计划资助项目(1427815060)。

收稿日期:2015-10-13

1.5 cm 的长度,接种在不定芽诱导培养基上,培养基组成为 MS+5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA^[9]。待不定芽萌发至 1~2 cm 后接种到成苗培养基获得健壮的试管苗。成苗培养基的组成为 1/2MS+1 g/L 活性炭+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。

1.2.2 薄片培养 不定芽接种到成苗培养基后,将苗龄分别为 14、28、42、56 d 的试管苗从茎段基部第 1 条根部位起,向上 2.0~2.5 mm、向下 2.0~2.5 mm 作为切取薄片的部位(图 1A 所示 2~3 间的位置),从下向上依次切取 0.3~0.5 mm 厚的薄片,以第 1 条须根部位切薄片编号为 0,向上切的薄片依次编号为 1、2、3,以此类推,向下切的依次编号为-1、-2、-3,以此类推(图 1B)。将薄片分别接入含有不同浓度的 6-BA(1、3、5 mg/L)和 TDZ(0.05、0.10、0.20 mg/L)的不定芽诱导培养基中,研究试管苗苗龄、薄片所在位置以及植物生长调节剂的浓度和组成对薄片不定芽诱导的影响。将所获得的不定芽从薄片上分离出来,接种到成苗培养基中,并比较成苗培养基的组成对不定芽成苗的影响。

1.2.3 植株室外驯化栽培 将种有试管苗的瓶盖打开,放置于室内阴凉处 3~4 d,然后将试管苗从成苗培养基中取出,用自来水洗去附着于其根部的培养基,种植于培养土中,并一次性浇透 1/40 MS 无机盐营养液。

1.3 项目测定

所有培养条件均为室内温度(25±2)℃,16 h(光照)/8 h(黑暗),光照强度 30 μmol·m⁻²·s⁻¹。做好常规水肥管理并观察记录苗的生长情况,于 1 个月后统计植株的成活率。试验重复 3 次,取平均值,植株成活率(%)=(成活株数/移栽株数)×100。

1.4 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 薄片所在位置对薄片出芽的影响

薄片在不定芽诱导培养基中培养 7 d 开始出芽点。开始时芽生长缓慢,经过 12 d 左右生长速度加快,10~20 d 可获得健壮的芽。由表 1 可知,通过培养,所切薄片都可以出芽,但薄片所在位置不同,出芽能力不同,其中第 1 条须根部位所切薄片出芽能力最强,其次为紧邻其下、其上的薄片,随后向上、向下的薄片出芽能力依次递减,往上第 4 片不再有芽发生。大多数薄片可出 1~2 个芽(图 1C),有时出 3 个芽。1 株试管苗所有薄片经过 1 个周期(28 d)的培养平均可获得 9 个芽。

2.2 试管苗苗龄对薄片出芽的影响

从苗龄 28 d 的苗获得的薄片出芽率最高,每棵苗可获得 9.5 个芽;14 d 苗龄小,出芽率很低;随着苗龄的增加,出芽率有下降的趋势。苗龄 56 d 时,出芽率下降,可能与苗开始老化有关。

表 1 薄片所在位置对薄片出芽的影响(培养 28 d)

Table 1 Effect of the relative position of layer on shoot regeneration of *Hedychium coronarium* (cultivated for 28 days)

薄片编号 Layers number	出芽数 Average number of shoots per layer/个
-4	0.5±0.05d
-3	0.6±0.07d
-2	1.1±0.09b
-1	1.6±0.03b
0	2.1±0.11a
1	1.5±0.25b
2	1.2±0.12b
3	0.8±0.05c

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Note: The lowercase letters within the same column mean significant difference at 0.05 level. The same below.

表 2 试管苗苗龄对薄片出芽的影响(培养 28 d)

Table 2 Effect of the plantlet age on shoot formation of *Hedychium coronarium* (cultivated for 28 days)

苗龄 Plantlet age/d	出芽数 Average number of shoots per plantlet/个
14	3.0±0.87b
28	9.5±1.21a
42	9.3±2.35a
56	8.5±1.65a

2.3 植物生长调节剂对薄片出芽的影响

从表 3 可知,当培养基不含有细胞分裂素类植物生长调节剂时,出芽频率最低,从 1 株试管苗只能获得 3.8 个不定芽,加入 6-BA、TDZ 能显著提高不定芽的诱导频率。当 6-BA 浓度为 5 mg/L、TDZ 浓度为 0.10 mg/L 时,从 1 株试管苗可分别获得 10.7 个和 12.8 个不定芽。但含有 5 mg/L 6-BA 的培养基中获得的不定芽纤细瘦弱。TDZ 显著地促进不定芽的生长,频率高,不定芽健壮,但浓度升高到 0.20 mg/L 时,不定芽有畸形矮化的趋势,且出芽频率下降。综合考虑,不定芽诱导培养基中以 6-BA 浓度为 3 mg/L、TDZ 浓度为 0.10 mg/L 较为合适。

表 3 植物生长调节剂对薄片出芽数的影响(培养 28 d)

Table 3 Effect of plant grow regulators on shoot formation of *Hedychium coronarium* (cultivated for 28 days)

植物生长调节剂浓度 Concentration of plant grow regulators /(mg·L ⁻¹)		出芽数 Average number of shoots per plantlet /个
6-BA	0 (CK)	3.8 ± 0.4c
	1	5.6 ± 1.1b
	3	9.9 ± 1.9a
	5	10.7 ± 2.1a
	0.05	9.6 ± 2.0b
TDZ	0.10	12.8 ± 2.4a
	0.20	7.5 ± 1.8c

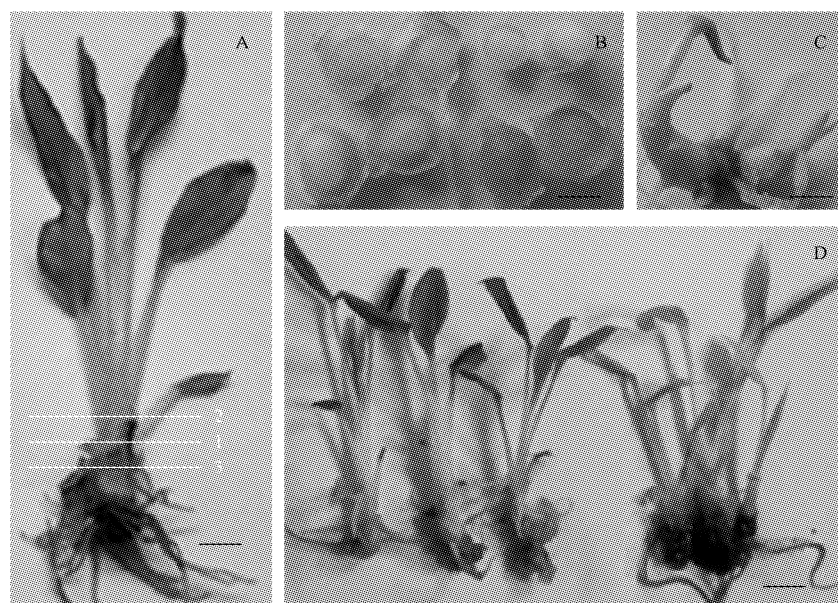
2.4 活性炭对不定芽成苗的影响

将 2.0~2.5 cm 高的不定芽转移到成苗培养基上,活性炭影响苗的生长。由表 4 可知,当培养基中不含活性炭时,苗的基部褐化,只有 1~2 条根长出,须根少,叶片发黄,难以继续生长;把不定芽转入添加 1 g/L 活性炭的培养基上,所得苗须根数量多,叶色深绿,植株健壮(图 1D)。

表 4 活性炭对不定芽成苗的影响

Table 4 Effect of active charcoal (AC) on plant growth of *Hedychium coronarium*

培养基组成 Composition of medium	根数 Roots number /条	根总长 Total length of roots/cm	叶片数 Leaf number /片	株高 Height of plantlet /cm
1/2MS	3.21±0.35c	5.52±0.44b	2.03±0.24b	7.83±0.39a
1/2MS+1 g/L 活性炭	5.45±0.61b	6.78±0.79b	5.87±0.67a	8.28±0.66a



注:A,成熟的试管苗,其中 1 表示第 1 条须根位置,2~3 表示切取薄片的部位,bar=0.5 cm;B,从 1 棵苗所切取的薄片,bar=0.2 cm;C,从 1 个薄片上获得的 2 个健壮芽,bar=0.5 cm;D,芽在含有活性炭(左侧 3 棵苗)和不含活性炭(右侧苗)的 MS 培养基上的生长情况,bar=0.3 cm。

Note:A, *in vitro* plantlet, 1 represented the first root, 2-3 represented positions where layer were cut from, bar=0.5 cm; B, layers cut from a plantlet, bar=0.2 cm; C, two vigorous buds obtained from a layer, bar=0.5 cm; D, plantlets derived from rooting medium adding active charcoal (left) or not (right), bar=0.3 cm.

图 1 利用薄片培养技术建立白姜花植株再生体系

Fig. 1 Plant regeneration from *Hedychium coronarium* via thin layer culture

2.5 室外驯化

将株高 8~10 cm 的试管苗驯化 4~5 d 后移栽室外,开始 2 d 叶缘会出现萎蔫;7 d 后靠近根部叶片枯黄死亡,但同时从植株基部开始长出新叶,标志着植株移栽成活。1 个月后成活率达 95%。

3 讨论

该研究采用薄层培养技术建立了白姜花的高效植株再生体系,与传统的从以芽繁芽的快繁技术相比,采用薄片培养技术,从 1 棵芽最多可获得 12.8 棵芽,远远高于以芽繁芽的再生频率^[2,4]。由于薄片培养的高效性,该技术已广泛应用于蔬菜、药用植物、花卉等植物快繁生产^[10]。通过控制外界条件,可以不经愈伤组织阶段直接从薄片外植体上得到大量不定芽,减少再生植株的变异率,同时缩短植株再生时间^[11]。由于薄层横切面伤口较大,所切薄片仅仅由几层细胞组成,用作基因工程的转化受体时可增加转化几率^[12];在基因转化、诱导突变等育种途径中,可减少植株嵌合体的出现频率^[13];

课题组采用薄层培养技术对白姜花的薄片进行体外诱变处理,成功获得了白姜花四倍体植株^[14]。所获得的四倍体植株经过近 3 年的栽培,各种性状稳定遗传。同时,与细胞培养、原生质体培养相比,薄片培养技术在操作上相对简单。这些优良特性使得薄片培养技术成为生物技术研究中的优良植株再生体系。

参考文献

- [1] 李瑞红,范燕萍. 白姜花不同开花时期的香味组分及其变化[J]. 植物生理学通讯,2007(1):176-180.
- [2] 熊友华,马国华,刘念. 白姜花的组织培养与再生[J]. 植物生理学通讯,2005(2):66-66.
- [3] 肖望,涂红艳,邓崇会,等. 姜花属植物生物技术研究进展[J]. 广东第二师范学院学报,2011(5):73-77.
- [4] 熊友华,庄雪影,刘念. 姜花离体再生体系的建立[J]. 贵州农业科学,2011,39(6):23-25.
- [5] HAMIDOU F S, ROWENA Y K, KANNIAH R K. First report of plant regeneration via somatic embryogenesis from shoot apex-derived callus of *Hedychium muluense*[J]. Journal of Crop Improvement, 2008, 21(2):191-199.
- [6] HAMIDOU F S, KANNIAH R K, ROWENA Y K. Somatic embryogene-

- sis in *Hedychium bousigonianum* [J]. Horticulturae Scientia, 2009, 44(5): 1487-1490.
- [7] 黄霞, 黄学林, 王鸿鹤, 等. 果用香蕉薄片外植体植株再生的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 19-24.
- [8] 李晓艳, 陈丽, 辛海波, 等. 百合鳞片薄层细胞培养高效再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(3): 351-355.
- [9] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiology Plantarum, 1962(5): 473-497.
- [10] JAIME A, TEIXEIRA S D, DOBRANSZK J. Plant thin cell layers: A 40-year celebration [J]. Journal Plant Growth Regulator, 2013, 32(4): 922-943.
- [11] 赵云鹏, 郭维明, 陆红梅. 细胞薄层培养在植物激素调节形态发生研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 385-390.
- [12] TEIXEIRA S D. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2013, 113: 149-161.
- [13] KOZGAR M I, KHAN S. Induced mutagenesis in crop plants [M]. Biorem Biodiv Bioavail 6 (special issue 1), 2012: 118.
- [14] 肖望, 涂红艳, 袁学文, 等. 一种通过薄片培养技术进行白姜花多倍体育种的方法[P]. 中国专利 201410460845. 9.

Plant Regeneration From *Hedychium coronarium* via Thin Layer Culture

XIAO Wang, TU Hongyan, ZHANG Ailing, WU Songbin, CHEN Huiyan

(Biology and Food Engineering Institute, Guangdong University of Education, Guangzhou, Guangdong 510303)

Abstract: Taking *Hedychium coronarium* plantlet as explants, the effect of age of plantlets, layer position, concentration of plant grow regulators on bud inducing were researched by thin layer culture. The results showed that the highest frequency of shoot regeneration (9.5 per plant) was achieved using layers, which were proximal to apical meristems, and the age of plantlet of 28 days; an average of 9.9 or 12.8 shoot buds could be obtained from thin cell layers derived from each plantlet on medium with 3 mg/L 6-BA or 0.1 mg/L TDZ, respectively; the shoots could be successfully regenerated to plantlets on MS medium with 1 g/L active charcoal. Well rooted plantlets were successfully acclimatized with a survival rate 95%.

Keywords: *Hedychium coronarium*; thin layer culture; plant regeneration

姜花的主要价值

知识窗

姜花(*Hedychium coronarium* Koen)属姜科姜花属的淡水草本植物,又名野姜花,高1~2 m,花序为穗状,花萼管状,叶序互生,叶片长狭,两端尖,叶面亮,叶背略带薄毛。不耐寒,喜冬季温暖、夏季湿润环境,抗旱能力差,生长初期宜半阴,生长旺盛期需充足阳光。土壤宜肥沃,保湿力强。姜花有清新的香味,放于室内可作天然的空气清新器。色泽圆融,一般为白色花朵。盆栽可供观赏,白色花卉如蝴蝶,所以又称蝴蝶姜、白蝴蝶花等。原产亚洲热带,印度和马来西亚的热带地区,大概在清代传入中国。另外,姜花是古巴和尼加拉瓜的国花。

药用价值 姜花的根茎及果实入药,根茎中药名为路边姜,味辛,性温。根茎冬季采收,除去泥土及茎叶后晒干;具温中健胃、解表、祛风散寒、温经止痛、散寒等功效,主治风寒表证、风温痹痛、外感头痛、身痛、风湿痛、脘腹冷痛、跌打损伤等。

果实中药名为姜花果实,味辛,性温。果实秋冬两季采收,剪下果穗晒干;具温中健胃、解表发汗、温中散寒、止痛等功效,主治脘腹胀痛、寒湿郁滞等。台湾民间相传姜花的根茎,具散寒、除风、治头痛、跌打损伤等功效,花则能治失眠。

观赏价值 花美丽,白色,芳香,是盆栽和切花的好材料,也可配植于小庭院内,十分幽雅耐看。其花可食,是一种新兴的绿色保健食用蔬菜。

姜花除作切花外,也可用于园林中,如可成片种植,或条植、丛植于路边、庭院、溪边、假山间,开花期间似一群美丽的蝴蝶,翩翩起舞,争芳夺艳,无花时则郁郁葱葱,绿意盎然。根茎还可药用,有温中散寒、止痛消食之功效。亦可浸提姜花浸膏,用于调合香精中。

(摘自:百度百科)