

doi:10.11937/bfyy.20170859

沙姜的组织培养与快繁技术

梁春辉¹, 黄敏¹, 李秀平¹, 董斌¹, 闫晓东²

(1. 广东农工商职业技术学院 热作系, 广东 广州 510507; 2. 广州出入境检验检疫局, 广东 广州 510623)

摘要:以沙姜芽为外植体,研究不同因子对沙姜消毒、增殖、生根的影响,以期建立沙姜组培快繁体系,并为其脱毒技术研究提供参考。结果表明:沙姜芽使用 75%酒精 60 s + 0.1%升汞(HgCl₂) 8 min 灭菌效果最好,污染率为 13.33%,成活率达 86.67%;不同激素组合对沙姜不定芽的继代增殖效果各异,以 2.00 mg · L⁻¹6-BA + 0.25 mg · L⁻¹NAA 的激素配比的增殖效果最好,增殖系数为 6.30,沙姜组培苗最佳的生根培养基为 1/2MS + NAA 0.50 mg · L⁻¹,平均生根数为 15.32 条。

关键词:沙姜;不定芽;组织培养

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)19-0011-05

沙姜(*Kaempferia galanga* L.)属姜科(Zingiberaceae)山奈属(*Kaempferia*)多年生宿根草本植物,又名山奈、三奈、山辣等,原产于热带地区。沙姜根茎是著名的中药,据《中国药典》记载,具有行气、温中和止痛作用,常用于治疗胸膈胀满、心腹冷痛、寒湿吐泻、牙痛等症^[1]。现代药理学研究表明,沙姜根茎还具有杀虫^[2]、抑制胃溃疡^[3]和抗癌^[4]等功效。此外,沙姜也作为香料和食物调味料^[5],广泛用于食品加工。沙姜在我国广东、海南、台湾、广西、云南等省区均有栽培,在广东则以阳春、饶平、普宁、揭阳和揭西等地栽培为主,其中阳春市最负盛名^[6]。沙姜一般采取无性繁殖的方式,以块状茎为繁殖材料。这种繁殖

方式不仅速度缓慢,而且容易造成病毒和病菌感染。侵染沙姜的主要病原是枯假单胞杆菌、烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)^[7-8],最常见的病害是沙姜瘟(又称沙姜青枯病)^[9-11]。植株被侵染后成片枯死、腐烂,姜农损失严重,这已成为沙姜生产持续发展的主要制约因素之一,目前尚未有特效药进行防治。随着植物组培技术的不断推广,利用茎尖脱毒培养,快速繁殖无病毒种苗已成为一大趋势^[12],可解决病毒病菌侵染的难题,然而却鲜见关于沙姜组培的报道。因此,该研究以沙姜芽为外植体,经过多种灭菌方式处理,比较不同激素配比对沙姜组培苗增殖和生根的影响,以期对沙姜优良品种的快速繁殖、脱毒和无病毒苗的大量繁殖提供参考。

第一作者简介:梁春辉(1985-),女,硕士,实验师,现主要从事植物组织培养的教学与研究等工作。E-mail: chh-liang@gdaib.edu.cn.

责任作者:闫晓东(1987-),男,博士,农艺师,现主要从事出入境植物研究等工作。E-mail: yanml6@163.com.

基金项目:广东省高等职业教育作物生产技术品牌专业建设资助项目(粤教高函[2015]191号);广东省高等职业教育园林技术品牌专业建设资助项目(粤教高函[2016]293号);广东农工商职业技术学院科研资助项目(xyyb1402)。

收稿日期:2017-04-06

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择出芽率高、芽眼饱满、大小适宜、无病虫的广东沙姜作为试验材料。将沙姜姜块埋于清洗过的细沙中,置于(25±2)℃的培养箱内催芽,期间定期浇适量的水。经过 15 d 左右,当沙姜芽长至 1.5~2.0 cm 时,用经过 75%酒精消毒处理过的解剖刀切下沙姜芽,用纱布包好放在自来水下

冲洗1~2 h,随后去掉外部叶片,平均分装到9个锥形瓶中并标号,置于超净工作台上备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒与初代培养

分别采用9组不同的消毒时间处理沙姜芽(表1):先用75%酒精消毒,无菌水冲洗2次,再用0.1%升汞(HgCl_2)消毒,期间需要不停地摇晃锥形瓶促使沙姜芽充分消毒,再经过3次无菌水冲洗,无菌滤纸吸干沙姜芽表面水分,沙姜芽向上接种于 $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH } 5.8$)培养基中,每个处理接种15瓶,每瓶接种2个。将接种后封口的组培瓶置于温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度 $1500 \sim 3000 \text{ lx}$ 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的环境条件下培养。接种6 d后第1次统计污染率,24 d后第2次统计污染率、成活率。污染率($\%$)=污染的外植体个数/接种的外植体总数 $\times 100$;成活率($\%$)=成活的外植体个数/接种的外植体总数 $\times 100$ 。

表1 不同处理的消毒时间

Table 1 Sterilize duration of treatments

处理 Treatments	75%酒精 75% alcohol/s	0.1%升汞 0.1% mercuric chloride/min
T1	30	8
T2	30	10
T3	30	12
T4	45	8
T5	45	10
T6	45	12
T7	60	8
T8	60	10
T9	60	12

1.2.2 增殖培养

把沙姜芽培养所得的不定芽分成单株,转接到以MS添加不同激素浓度配比的培养基中(表2),每个处理10瓶,每瓶3个茎段,重复3次,培养条件同1.2.1(下同),培养30 d后调查芽的增殖系数、芽高、长势。增殖系数=芽增殖数/接种的芽数。

1.2.3 生根培养

将继代增殖培养出的不定芽分成单株,转接到以 $1/2\text{MS}$ (大量元素减半,蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH } 5.8$)为基本培养基、附加一定浓

度NAA($0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭的生根培养基中,每个处理15瓶,每瓶2株,重复3次,接种40 d后观察组培苗的生根情况,并统计生根率、平均生根数、平均根长。生根率($\%$)=生根的芽数/接种的总芽数 $\times 100$;平均生根数($\%$)=总出根数/接种的总芽数 $\times 100$;平均根长($\%$)=总根长/总根数 $\times 100$ 。

表2 不同激素浓度配比的培养基设计

Table 2 Hormone proportion in medium of treatments

处理 Treatments	6-BA	NAA
A	1.50	0.10
B	2.00	0.10
C	2.50	0.10
D	1.50	0.25
E	2.00	0.25
F	2.50	0.25
G	1.50	0.50
H	2.00	0.50
I	2.50	0.50

1.3 数据分析

利用SPSS 19.0统计分析软件对试验数据进行统计及单因素方差分析,采用Duncan's新复极差法统计各处理显著性水平。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对沙姜芽消毒效果的影响

接种24 d后观察不同消毒时间对沙姜芽消毒效果的影响(图1)。可以看出,各处理均出现污染现象,以细菌污染为主,其中T5处理的污染率最高,为63.33%。T1、T4、T7处理的污染率依次降低,表明 HgCl_2 灭菌8 min时,酒精消毒时间越长,消毒效果越好。然而,酒精消毒60 s的处理(T7、T8、T9)时,不论 HgCl_2 灭菌时间是多少,污染率均低于30 s和45 s,所以酒精灭菌时间对消毒效果的影响最大。该试验中T9处理(75%酒精60 s+ HgCl_2 12 min)的污染率最低,仅6.67%,但结合成活率认为,使用75%酒精60 s+0.1% HgCl_2 8 min的效果最佳,成活率86.67%,污染率为13.33%。

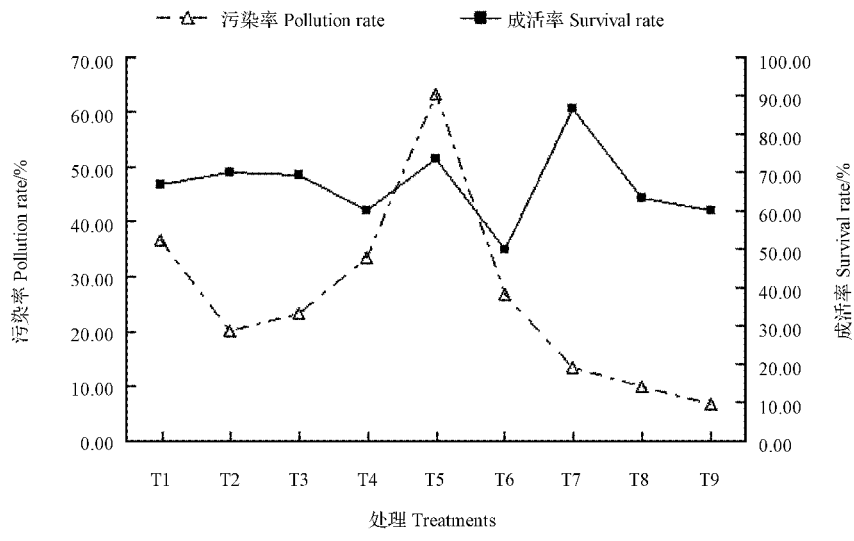


图 1 不同消毒时间对沙姜芽消毒效果的影响

Fig.1 Effect of duration on sterilize consequence of the buds

2.2 不同激素比对沙姜不定芽增殖的影响

将初代诱导出来的不定芽转接到以 MS 添加不同激素配比的培养基中,观察不定芽的增殖效果。从表 3 可以看出,在 A~I 等 9 种培养基中沙姜不定芽均有增殖,具体增殖效果受激素配比影响。当 NAA 浓度为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随 6-BA 浓度的增加,不定芽的增殖系数逐渐增大。当 NAA 浓度增加到 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着 6-BA 浓度的增加,不定芽的增殖系数呈现出由升到降的变化趋势,且 6-BA 浓度为 $2.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增殖系数最高,达 6.30,显著高于其它处理,且不定芽的长

势最好。而当 NAA 浓度增加到 $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽的增殖系数均低于其它浓度。而当 6-BA 浓度一定时,NAA 在 $0.10\sim0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内,随着 NAA 浓度的增加不定芽增殖系数逐渐增加,而 NAA 浓度达到 $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽增殖系数反而下降。因此,沙姜不定芽的增殖与 6-BA 和 NAA 浓度的比值有关,在这 9 种配方中,增殖系数最高且不定芽的长势也最优的配方为 E($\text{MS}+6\text{-BA } 2.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

表 3 不同激素比对不定芽增殖的影响

Table 3 Effect of different hormone proportion on the proliferation of adventitious bud

处理 Treatments	6-BA /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	增殖系数 Proliferation coefficient	芽高 Bud height/cm	芽长势 Growth potential of bud
A	1.50	0.10	3.70c	5.34bc	* *
B	2.00	0.10	4.30d	4.80abc	*
C	2.50	0.10	5.60f	4.78abc	* *
D	1.50	0.25	5.90g	4.65ab	* * * *
E	2.00	0.25	6.30h	5.45c	* * * *
F	2.50	0.25	5.10e	5.32bc	* * * *
G	1.50	0.50	3.60c	4.82abc	* * *
H	2.00	0.50	3.20b	4.56a	* * *
I	2.50	0.50	2.90a	4.75abc	* *

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),* 表示生长状况,数量越多表示生长情况越好。
Note:Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level,* indicates the growth status,the more * indicate the better growth situation.

2.3 不同浓度 NAA 对组培苗生根的影响

由表 4 可以看出,组培苗接种到 1~5 号生根培养基上 40 d 左右均能生根,生根率达 100.00%,没有不定芽的生长,根色白而粗。但是在不同浓度 NAA 培养基上的生根数和根长有所不同,随着 NAA 浓度的增加,生根数逐渐增多,以 NAA 0.50 mg · L⁻¹ 中最多,平均生

根数达 15.32 条,平均根长达 7.25 cm。NAA 浓度为 0.30 ~ 0.50 mg · L⁻¹ 时,平均根长无显著性差异。NAA 浓度为 0.10 mg · L⁻¹ 时最差,平均生根数仅 8.55 条,平均根长为 4.33 cm。表明以高浓度的 NAA 诱导沙姜试管苗生根的效果最好,移栽后成活率最高。

表 4

不同浓度 NAA 对生根的影响

Table 4

Effect of different NAA concentration on the rooting

培养基编号 Medium No.	NAA /(mg · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Number of rooting/条	平均根长 Mean value of root length/cm
1	0.10	100.00	8.55a	4.33a
2	0.20	100.00	10.26b	5.80bc
3	0.30	100.00	14.23c	6.31c
4	0.40	100.00	15.02cd	7.22c
5	0.50	100.00	15.32d	7.25c

3 讨论与结论

在沙姜离体快繁中,外植体的表面灭菌是沙姜组培成功的关键。沙姜芽剥去外部叶片后,在流水下冲洗 1~2 h,然后用 75% 酒精和 0.1% HgCl₂ 消毒,发现不同消毒时间对沙姜芽的灭菌效果差异较大,以 T9 处理(75% 酒精 60 s + HgCl₂ 12 min)的污染率最低,仅 6.67%。但结合成活率认为,T7 处理(75% 酒精 60 s + 0.1% HgCl₂ 8 min)的效果最佳,成活率最高为 86.67%,污染率为 13.33%,其原因可能是 T9 处理的 HgCl₂ 时间太长,导致细胞死亡、成活率低。接种 24 d 后无污染的沙姜芽基部稍增大,并形成少量愈伤组织,沙姜芽颜色逐渐变绿并伸长,部分愈伤组织分化成不定芽,未分化的沙姜芽可能是在消毒时细胞被杀死,失去生长能力,这与易诚等^[13]的研究结果一致。因此在试验中应当选择适宜的消毒时间,降低污染率,提高沙姜芽的成活率。

据黄菊辉^[14]报道,6-BA 和 NAA 可促进生姜幼芽发生,且具有相互增益效应,葛胜娟^[15]、杭玲等^[16]的研究也证实,在添加不同生长激素(2,4-D、KT、6-BA 和 NAA)的培养基配方中,以添加 6-BA 和 NAA 的激素组合生姜幼芽的分化率和增殖率最高。沙姜不定芽的增殖与 6-BA 和

NAA 浓度的比值有关,当 NAA 浓度为 0.25 mg · L⁻¹ 时,随着 6-BA 浓度的增加,不定芽的增殖系数呈现出由升到降的变化趋势,当 6-BA 浓度为 2.00 mg · L⁻¹ 时增殖系数最高,达 6.30,且不定芽的长势最好。而当 NAA 浓度增加到 0.50 mg · L⁻¹ 时,不定芽的增殖系数均低于其它浓度。因此,在这 9 种配方中,增殖系数最高且不定芽的长势也最优的为配方 E (MS + 6-BA 2.00 mg · L⁻¹ + NAA 0.25 mg · L⁻¹)。这与梁称福等^[17]报道的黄姜茎段在 6-BA 2.00 mg · L⁻¹ + NAA 0.20 mg · L⁻¹ 的培养基上诱导出愈伤组织和丛生芽结果相似,而张玲等^[18]认为诱导生姜芽分化的培养基以 6-BA 2.00 mg · L⁻¹ + NAA 0.50 mg · L⁻¹ 效果较好,这与该研究结果不一致,初步分析原因可能与姜的基因型和外植体类型有关。大量试验结果证明,高浓度 6-BA 和低浓度 NAA 配合有利于芽的诱导和增殖,而过高或过低时对不定芽的增殖不利,只有二者浓度比例合适才能发挥其作用^[19],该试验中不同激素组合对沙姜快繁有明显的影响,以 6-BA 2.00 mg · L⁻¹ + NAA 0.25 mg · L⁻¹ 的效果最好。

姜的试管苗很容易生根,梁称福等^[17]研究认为 1/2MS 与 MS 相比,用 1/2MS 生根更粗壮,在含有不同激素的培养基上产生根的数量、粗细、长度不同。黄菊辉^[14]提出 NAA 对生根是绝对且

必要的。当沙姜组培苗长至 3~4 cm 时,及时转接到 1/2MS 添加不同浓度 NAA 的生根培养基上,其中在 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 上能获得较好的生根壮苗效果,平均生根数为 15.32 条,平均根长达 7.25 cm。杭玲等^[16]报道,NAA 与 IBA 配合使用的平均生根率比单用高,且根较粗短、苗色深绿,对幼苗移栽非常有利,因此,下一步的试验可以考虑添加不同的生长素,同时尝试沙姜组培增殖与生根壮苗同步进行,降低培养成本,缩短培养时间。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(2005 年版) [S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:21.
- [2] RUJJANAWATE C, KANJANAPOTHI D, AMOMLER-DPISON D, et al. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora* [J]. Journal of Ethnopharmacol, 2005, 102: 120-122.
- [3] STEVENSON P C, VEITCH C N, SIMMONDS M S J. Polyoxygenated cyclohexane derivatives and other constituents from *Kaempferia rotunda* L. [J]. Phytochemistry, 2007, 68: 1579-1586.
- [4] 薛颖,村上明,小清水弘一. 沙姜中抗促癌有效成分的分离鉴定[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 522.
- [5] 王锐,何娟,周云,等. 山奈不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除作用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(29): 16232-16233.
- [6] 何自福,虞皓,李志慧,等. 沙姜瘟的发生及田间遮阴防治试验[J]. 广东农业科学, 2005(5): 44-45.
- [7] 王教义. 姜脱毒组培技术研究[J]. 山东农业科学, 1999(6): 7-9.
- [8] 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.
- [9] 余小漫,何自福. 广东沙姜青枯病菌株遗传多样性研究[C]. 中国植物病理学会, 2012 年学术年会论文集, 2012.
- [10] 何自福,余小漫,虞皓,等. 沙姜瘟病原菌鉴定[J]. 农业实验与产业化, 2006(4): 142-144.
- [11] 文衍堂,郑小波. 海南岛广藿香、沙姜青枯病原菌鉴定[J]. 热带作物学报, 1984, 5(2): 113-117.
- [12] 高山林. 脱毒生姜高产栽培技术[J]. 农业新技术, 2005(1): 14-15.
- [13] 易诚,张天晓,梁称福. 黄姜根茎组培快繁技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2008(1): 11-13.
- [14] 黄菊辉. 生姜种质资源的离体繁殖和保存[J]. 中国农业科学, 1995, 28(2): 24-30.
- [15] 葛胜娟. 生姜组培苗的培育及其生产应用[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 75-78.
- [16] 杭玲,黄卓忠,江文,等. 生姜组织培养快繁技术研究与应用[J]. 江苏农业科学, 2006(5): 125-127.
- [17] 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.
- [18] 张玲,马林,李卫锋. 生姜组织培养的快繁技术[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(2): 173-175.
- [19] 邱运亮,段鹏慧,赵华. 植物组培快繁及时[M]. 北京:化学工业出版社, 2012: 58-65.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Kaempferia galangal* L.

LIANG Chunhui¹, HUANG Min¹, LI Xiuping¹, DONG Bin¹, YAN Xiaodong²

(1. Department of Tropical Crops, Guangdong Agriculture Industry Business Polytechnic College, Guangzhou, Guangdong 510507; 2. Guangzhou Entry-Exit Inspectional and Quarantine Bureau, Guangzhou, Guangdong 510623)

Abstract: The bud of *Kaempferia galangal* were was used as the materials, to study the effect of different factors on the disinfection, multiplication, root induction, so as to establish *in vitro* culture system and provide reference for detoxification. The results showed that the best disinfection method of the bulb explants of *Kaempferia galangal* was 75% ethanol for 60 seconds, followed by 0.1% HgCl_2 8 minutes, the contamination rate was 13.33%, and the survival rate was 86.67%. The effects of hormones on proliferation of adventitious bud were different, the appropriate medium for proliferation was MS+6-BA $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with the multiplication coefficient of 6.30. The best medium for root induction was 1/2MS+NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the number of roots per plantlets was 15.32.

Keywords: *Kaempferia galangal* L.; adventitious bud; tissue culture