

圆瓣姜花种子胚的组织培养与快速繁殖

熊友华¹, 马国华¹, 刘念^{2*}, 黄邦海³

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 仲恺农业技术学院, 广东广州 510225; 3. 广州市农业技术推广中心, 广东广州 510520)

摘要: 采用广西百色地区野生圆瓣姜花的种子胚作外植体, 成功地进行了离体组织培养与快速繁殖, 建立了高频率的丛芽繁殖体系。实验结果表明, 诱导种子胚萌芽的最适培养基为 MS 附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; 在 MS+6-BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上最有利于诱导丛芽及增殖, 芽的增殖系数达到 5.28; $1/2\text{MS}+\text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基最易诱导生根, 生根率达 97.7%。

关键词: 圆瓣姜花; 种子胚; 组织培养; 速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0241-04

Tissue culture and rapid propagation of zygotic embryo of *Hedychium forrestii*

XIONG You-hua¹, MA Guo-hua¹, LIU Nian^{2*}, HUANG Bang-hai³

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China; 3. Guangzhou Agricultural Technology Extension Center, Guangzhou 510520, China)

Abstract: Tissue culture of *Hedychium forrestii* was studied, using the zygotic embryo as explants. The results were as follows: The suitable condition for germination of zygotic embryo was in MS supplemented with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; The best medium for propagation of multiple-shoot was MS+6-BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $1/2\text{MS}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA could effectively promote the root emergence of the shoots, and the percentage of the root emergence accounted for 97.7%; The medium for transplanting was the mixture of perlite and peat(1:1).

Key words: *Hedychium forrestii*; zygotic embryo; tissue culture; rapid propagation

大部分的野生姜科(Zingiberaceae)植物从植株外形到叶、花、果都呈现出丰富的多样性, 有的花序极其美丽, 构型奇特, 有的则具有巨大而鲜艳的苞片(Endress, 1994), 这使得它们具有不同的观赏应用价值。圆瓣姜花(*Hedychium forrestii*)是姜科姜花属多年生草本植物(吴德邻, 1981), 花形奇特优美、花色淡雅且花香芬芳纯正, 在生产中主要用作香型鲜切花、庭院绿化、园林景观点缀植物等, 是一种深受人们青睐的庭园芳香花卉, 市场需求量大。此外, 赵庆等(1995)从圆瓣姜花的根中分离到 4 个重

要的半日花烷型二萜; 其花瓣中还含有大量的桉叶素、芳樟醇和橙花叔醇等多种高价值的芳香化合物, 从中提取的天然高档香精广泛用于食品和化妆品加工。因此, 圆瓣姜花是一种具有很高观赏价值和经济价值的植物。陈薇等(2002)以茎尖作外植体成功地进行了组织培养, 其再生途径为外植体完全脱分化形成愈伤组织, 再从愈伤组织分化出芽, 但该途径较繁琐, 培养周期较长, 种质也易产生变异, 通常由不定芽形成的个体遗传和形态是彼此相同的, 这对圆瓣姜花工厂化育苗是十分有利的(朱至清, 2003)。

收稿日期: 2004-07-05 修订日期: 2004-12-24

基金项目: 广东省科技项目(20037C201029)

作者简介: 熊友华(1979-), 男, 江西南昌人, 硕士, 主要从事园林植物组培与育种方面的研究。* 通讯作者

本实验以圆瓣姜花的成熟种子胚为外植体,通过调节外源生长激素,在诱导种子胚萌芽、不定芽增殖方面进行了广泛的探索和大量的试验,摸索出了一种诱导圆瓣姜花丛芽高频率繁殖的组织培养方法,此方法操作简便且快捷。同时也进一步表明圆瓣姜花的组织培养至少可以通过先诱导愈伤组织再分化出芽(陈薇等,2002)和直接诱导不定芽这两种不同的途径实现植株再生和快速繁殖。在姜科植物的组织培养中,以该科植物的种子胚进行离体培养在国内外尚未见报道过,所以本实验结果可以对其他姜科植物离体胚的培养具有一定的参考价值。

1 材料与方 法

1.1 材料和处理

供试的圆瓣姜花野生于广西百色市龙和乡的一个山坡上(106°23'25" E, 23°44'56" N, 海拔 791.57 m),我们于 2003 年 1 月从其植株上采下一些刚成熟并已自然开裂的蒴果,在室内剥开果,挑选子粒饱满且色泽好的新鲜种子(其种壳鲜红色),先用 0.2% 的洗洁精将种壳清洗干净,然后放入超净工作台内,在无菌烧杯中用 75% 酒精浸泡 10 s,再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 15 min。取出后以无菌水冲洗 5~6 次,用消毒滤纸吸干种子表面水分,再用解剖刀剥去种皮后取出种胚,然后接种于种胚萌发诱导培养基上。

1.2 培养基

以 MS 培养基为基本培养基(Murashige 等, 1962),并根据试验目的需要附加不同浓度配比的 6-BA (6-Benzyl-aminopurine)、NAA (Naphthalene acetic acid) 及 IBA (Indole-3-butyric acid)。各培养基均附加 3.0% 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH 值为 5.8。按常规的方法配制(李浚明, 1992)分装后,于温度为 121 °C、压力为 1.1 kg/cm² 的条件下灭菌 20 min。

1.3 培养条件

在诱导种子胚萌发阶段,先在培养箱中暗培养,待幼苗形成后再转入光照度为 2 000 lx 的光下培养, 12 h/d, 温度 26±1 °C;其它阶段的培养均在光照度为 2 000 lx 的光下培养,光照时间为 14 h/d, 温度 26±1 °C。

1.4 培养方法

首先将消毒后的种子胚接种到诱导种子胚萌发的培养基中使其萌发出芽,一般经 8~11 d 培养后,

种胚开始膨胀并萌发,当萌发出芽的子叶展开后,将芽的下胚轴切成 0.5 cm 左右的小段,按原生长极性方向接种于丛生芽的诱导培养基中进行不定芽的诱导,增殖后的不定芽,一部分接入新鲜的增殖培养基中进行扩繁;另一部分则在不定芽开始展叶时,将其及时分割成单苗转入生根培养基中诱导生根,待单苗生根并形成完整的再生植株后,将其炼苗后再移栽。以上实验均重复 3 次,每次每种培养基接种 30~50 个,每瓶接种 1~2 个外植体。

1.5 统计和分析

在圆瓣姜花培养的各个诱导阶段分别统计不同培养基上的出芽率、增殖芽数、丛生芽增殖系数、生根率。通过观察其生长情况,分析各个培养阶段圆瓣姜花的最佳诱导培养基。统计方法为:出芽率=出芽的胚数/接种的胚数×100%;增殖芽数为每种培养基上全部单芽所诱导出丛生芽的总数量;增殖系数=增殖芽数/接种的芽数×100%;生根率=生根的幼苗数/接种的幼苗总数×100%;移栽成活率=移栽成活的苗数/移栽苗的总数×100%。

2 结果与分析

2.1 诱导种子胚的萌发

种子胚一般经 8~11 d 培养后,各种培养基上的种子胚开始膨胀并萌发,胚根、胚芽伸长,生长迅速。30 d 后统计出芽数,发现不同培养基对胚萌芽的效果差异较大(表 1),在③中萌芽效果最好,出芽率高达 93.3%,并且有的产生较多生长健壮的丛生芽,根系也很发达,所以 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹ 为最佳的种子胚诱导培养基。

2.2 不定芽的诱导与增殖

大约接种 5~10 d 后,可看见外植体的基部开始膨胀,20 d 后膨胀的部分长出小芽,形成丛生芽。统计结果表明(表 2):不同培养基对不定芽诱导的差异较大,其中④号培养基对丛生芽的诱导效果最好,丛生芽粗壮且生长良好,增殖系数达 5.28,所以 MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹ 为最适合诱导丛生芽产生的培养基。当丛生芽长至 3.0 cm 时可切下单芽转入新鲜的④号增殖培养基中进行扩繁,35 d 继代培养 1 次,增殖迅速。从表 2 中我们还可发现:当 6-BA 浓度从 0.5 mg·L⁻¹ 增加到 4.0 mg·L⁻¹ 时,丛生芽的增殖系数明显增加;当 6-BA 浓度从 4.0 mg·L⁻¹ 增加到 8.0 mg·L⁻¹ 时,丛生芽的增殖

系数又明显降低, 这表明其对 6-BA 浓度变化较敏感。

2.3 不同外源激素配合对再生苗生根的影响

一般培养 8 d 时可见幼苗下端周围出现数个白色小突起, 13~16 d 后, 幼苗的基部长出许多白色、肉质的不定根, 呈辐射状, 形成完整的再生植株。我们在转入生根培养基 15 d 和 30 d 后分别统计各种培养

基中的生根率。统计结果(表 3)表明, 以 1/2MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹ 效果最好, 根多且较粗、分枝也多, 植株生长健壮, 生根率达 97.7%; 在③中植株生长较差, 幼苗较单弱且根少, 有的会产生褐化; 在①号培养基上生根率最低, 但根比较粗壮。通过比较可以得出: IBA 在诱导圆瓣姜花生根方面比 NAA 效果更好。

表 1 培养基中不同生长调节剂对圆瓣姜花种子胚出芽的影响

Table 1 Effects of growth regulators on germination of zygotic embryo of *Hedychium forrestii*

培养基 Medium(mg·L ⁻¹)	萌发率(%) Germinating rates	芽的生长情况 Situation of bud growth
①MS0	89.1	芽较粗壮, 生长较好, 并伴有较多的根
②MS+6-BA 0.1+NAA 0.1	86.7	芽形较差, 生长缓慢, 伴有少量疏松的愈伤组织、根系较发达
③MS+6-BA 1.0+NAA 0.2	93.3	芽生长健壮且高, 生长快, 有的产生较多的丛芽, 根系很发达
④MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	77.5	芽非常纤细, 但很高, 生长较快, 较少量的细根
⑤MS+GA3 2.0	73.4	芽非常的纤细, 生长较慢, 根多且细长

表 2 BA 和 NAA 对丛生芽诱导及芽增殖的影响

Table 2 Effects of BA and NAA on formation clustering shoot and bud propagation

激素浓度 Auxin concentration(mg·L ⁻¹)	Auxin concentration(mg·L ⁻¹)		增殖系数 Propagation index	丛生芽生长情况 Situation of clustering shoot growth
	6-BA	NAA		
①	0.5	0.2	1.73	丛生芽非常粗壮, 生长较快, 有少许较粗的根
②	1.0	0.2	1.81	丛生芽较粗壮, 生长较慢, 基部有少许细根
③	2.0	0.2	2.47	丛生芽较纤细, 生长很慢, 有少许细根
④	4.0	0.2	5.28	丛生芽非常粗壮, 生长快, 很少有根产生
⑤	8.0	0.2	2.34	丛生芽非常细小, 生长较慢, 很少有根产生

表 3 不同培养基及激素对根诱导的影响

Table 3 Effects of 1/2MS and MS with different auxins on rooting rate

基本培养基 Basal medium	激素 Auxin (mg·L ⁻¹)	15 d 的生根率(%) 30 d 的生根率	
		Rooting rate after 15 days	Rooting rate after 30 days(%)
①MS	NAA 0.2	33.8	79.3
②MS	IBA 0.5	71.2	93.4
③1/2MS	NAA 0.2	39.4	81.1
④1/2MS	IBA 0.5	67.9	97.7

2.4 试管苗的移栽

当试管苗的根长至 4.0 cm 左右时, 将高约 6.0 cm 以上、植株生长健壮、根系发达的试管苗的培养瓶盖打开, 在实验室通风和散射光下炼苗 6 d, 然后用镊子轻轻从培养瓶中夹出试管苗, 洗去基部残留的培养基, 移栽到用 600 倍百菌清消毒过的珍珠岩: 泥炭(1:1)的混合基质中, 移栽完毕后浇足水, 然后用薄膜覆盖以保湿保温, 保持湿度 90% 左右, 温度控制在 25~27 °C, 基质以湿润、不积水为宜, 1 周后揭膜, 并注意适当遮荫和通风换气, 每周喷一次稀释 10 倍的 MS 大量元素的营养液, 移栽 15 d 后叶片明显伸展, 根系伸长, 1 个月后的统计结果表

明: 再生苗的成活率达到 96.4%。

3 讨论

对于姜科一类球根花卉的组织培养, 外植体的消毒是比较困难的环节, 所以外植体的选择非常关键, 已有关于以姜科植物的茎尖、幼茎、花序轴和苞片等为外植体进行组织培养的报道(曾宋君等, 1999; 胡玉姬等, 1990; 姜蕴兰等, 1989), 但消毒效果都不是理想, 本实验第一次以该科植物的种子胚作外植体, 收到了良好的效果, 既降低了外植体的污染率(仅为 5.1%), 同时又减少了消毒剂对外植体的毒害, 接种成活率很高。许多研究表明(Raghuvan, 2003), 从种子中分离出成熟胚进行培养, 可以完全解除种皮的抑制作用, 使胚胎立即萌发。我们在本实验中也发现, 圆瓣姜花的种子胚这一特点尤为明显, 在春季, 我们用圆瓣姜花的种子播在土中一般需要 2 个月左右才能萌发, 而将其成熟的胚分离出来培养时只需 8~11 d 就能萌发, 这就表明圆瓣姜花的种皮对胚胎萌发有抑制作用, 需要经过一段

休眠期,待这种抑制作用消除后,种子才能萌发。种胚的离体培养不仅可以打破种子的休眠和缩短育种周期,而且还可以解决远缘杂种胚不能正常发育的难题,所以本实验结果也为将来圆瓣姜花的新品种培育奠定了一定的基础。

通常认为细胞分裂素与生长素的比例决定外植体的分化再生的方向,较高的细胞分裂素与生长素的比例将诱导外植体分化芽(Skoog等,1957)。在本试验中,细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA 的比例较高时确实可以大大提高丛生芽的增殖系数,但它们的比例也不宜过高,如果这种比例过高,反而会抑制丛生芽的增殖,以 6-BA 4.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ 效果最佳;在试管苗诱导生根方面已有文献报道,1/2MS 培养基对试管植物的长根具有促进作用(谭文澄等,1991),在本实验中采用 1/2MS 培养基附加 0.5 mg · L⁻¹ IBA 在诱导生根时也取得了很好的效果,生根率达 97.7%;圆瓣姜花试管苗的移栽基质适应性比较广,但以疏松透气,有机质含量高的基质为佳,移栽 1 个月后观察,植株叶色浓绿,生长健壮,长势良好。

参考文献:

- 朱至清. 2003. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 39.
- 李浚明. 1992. 组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 40-43.
- 吴德邻. 1981. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 16(2): 30-31.
- 谭文澄, 戴策刚. 1991. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 99-199.
- Chen W(陈薇), He JM(和江明), Cun SX(寸守统). 2002. Tissue culture of stem apexes of *Hedychium forrestii*(圆瓣姜花茎尖组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 38(2): 146.
- Endress Peter K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers[M]. Cambridge University Press, 358-365.
- Hu YJ(胡玉姬), Chen SZ(陈升振), Xian YL(羡蕴兰). 1990. Tissue culture of *Alpinia zerumbet* cv. *Variegata*(花叶艳山姜的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), (4): 50-51.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Raghavan V. 2003. One hundred years of zygotic embryo culture investigations[J]. *In vitro cellular and developmental biology-plant*, 39(5): 437-442.
- Skoog F, Miller CO. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro* [J]. *Symp Soc Exp Biol*, 11: 118-131.
- Xian YL(羡蕴兰), Hu YJ(胡玉姬), Chen SZ(陈升振), et al. 1989. Tissue culture and plantlet regeneration of *Hedychium coccineum*(红姜花的组织培养和植株再生)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), (1): 43-44.
- Zeng SJ(曾宋君), Liu N(刘念), Peng XM(彭小明). 1999. Tissue culture and rapid propagation of *Curcuma kwangsiensis*(官粉郁金的组织培养和快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 35(1): 37-38.
- Zhao Q(赵庆), Hao XJ(郝小江), Chen YZ(陈耀祖), et al. 1995. Studies on diterpenoid constituents of *Hedychium forrestii* and their cytotoxic activity(圆瓣姜花的二萜化合物及其细胞毒性研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 30(2): 119-122.
- tosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells[J]. *Plant Cell*, 9(2): 249-259.
- Yang JC, Gynheung AN. 1999. Structural Organization of Rice Calmodulin Genes[M]. *Rice Genetics Newsletters*; 41.
- Yang TB, Segal G, Abbo S, et al. 1996. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects[J]. *Mol Gen Genet*, 252(4): 684-694.
- Yang J(杨军), Zhao J(赵洁), Liang SP(梁世平). 2002. Changes of calmodulin distribution in the embryo sac of *Oryza sativa* before and after fertilization: an immunogold electron microspore study(水稻受精前后胚囊内钙调素分布的变化: 免疫金电镜观察)[J]. *Act Bot Sin*(植物学报), 43(3): 264-272.
- Yang T, et al. 1998. Developmentally regulated organ, tissue, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat[J]. *Plant Mol Biol*, 37(1): 109-120.
- Yusuke S, Natssuko K, Keiki I, et al. 2001. A Ca²⁺-dependent protein kinase that endows rice plants with cold-and salt-stress tolerance function in vascular bundles[J]. *Plant Cell Physiol*, 42(11): 1 228-1 233.
- Zhao J(赵洁), Zhou C(周嫦), Yang HY(杨弘远). 1998. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin in isolated zygotes and young embryos of *Triticum aestivum*(小麦分离合子与幼胚中膜钙和钙调素的分布)[J]. *Act Bot Sin*(植物学报), 48(1): 28-32.
- Zimmer WE, Schloss JA, Silflow CD, et al. 1988. Structural organization, DNA sequence, and expression of the calmodulin gene[J]. *J Biol Chem*, 263(36): 19 370-19 383.

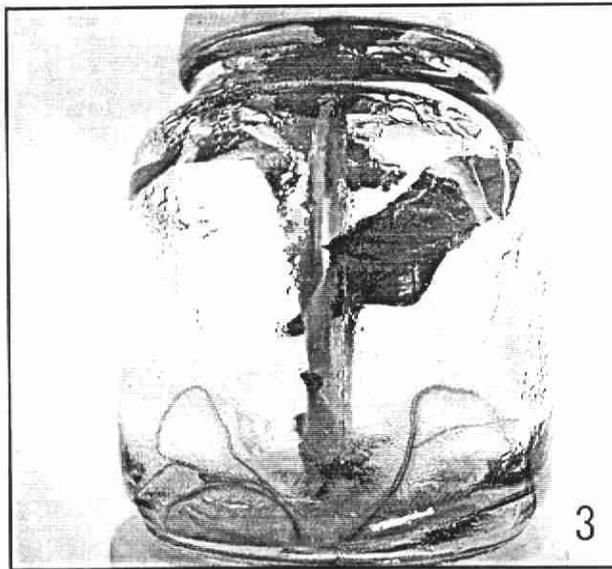
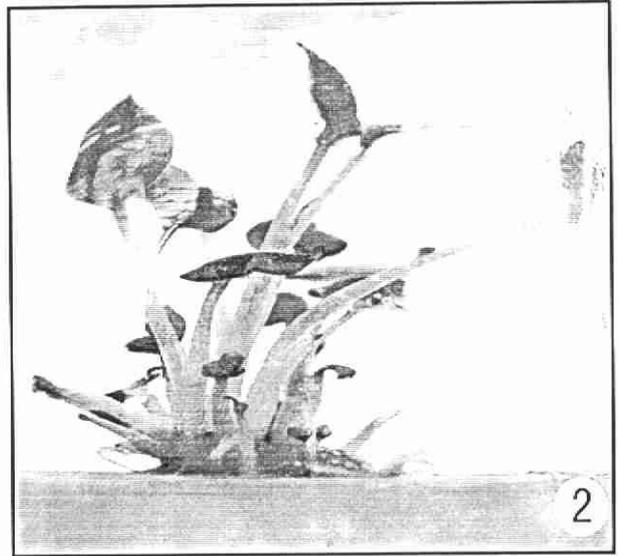
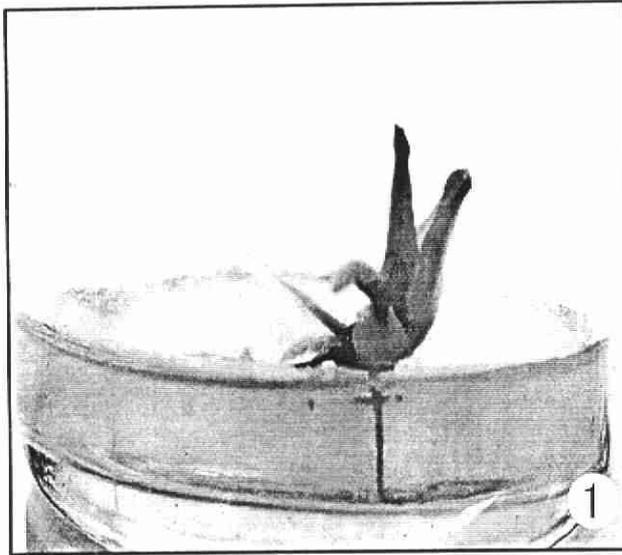
(上接第 273 页 Continue from page 273)

熊友华, 等: 圆瓣姜花种子胚的组织培养与快速繁殖

XIONG You-hua, *et al.*: Tissue culture and rapid propagation of zygotic embryo
of *Hedychium forrestii*

图版 I

Plate I



1. 诱导种子胚萌发; 2. 丛生芽的诱导; 3. 生根的诱导; 4. 再生苗的移栽。

1. Germination of zygotic embryo; 2. Propagation of multiple-shoot;

3. Rooting and regeneration; 4. Transplanting.