

一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法及应用

5 技术领域

本发明涉及植物组织培养技术领域，具体涉及一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法及应用。

背景技术

10 生姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 又称黄姜，是姜科姜属多年生草本植物，在世界各地主要作为香辛调味品和中药材广泛种植，我国还作一年生蔬菜栽培。它是一种普遍使用的调味品，其根茎可以作为一种蔬菜单独食用，全身皆可入药，用于治疗风湿感冒、胃寒胃痛、呕吐腹泻等病症。生姜提取物具有降血压血脂、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、增强免疫力、防治阿尔茨海默症等功效。生姜生产市场广阔、经济效益好、已经成为某些地区的重要支柱产业。

种质资源的繁育和保存限制了生姜产业的进一步发展。通常通过贮存地下根茎进行繁育，繁殖系数较低，病虫害严重，且由于是无性繁殖，往往致使优良品种在种植过程中受病毒侵害，品质下降、性状衰退。另一种繁育方法
20 是利用组织培养技术进行离体繁殖，脱毒姜苗长势旺、产量好。但是脱毒种苗不便储存，需要多次转瓶维护，费时费力；脱毒得到的生产种有效期也只有3年，3年以后需要更换。组织培养诱导的微姜块在体外也可以诱导产生无毒苗，可能替代生姜脱毒种苗，成为一种新的种质资源。但是当前报道的微姜块生长周期较长、体积仍然比较小，遗传稳定性差；其次是缺乏免疫力，抗逆性差，在下田后，容易被病菌感染，并不能完全满足生姜种质保存
25

的要求。

发明内容

有鉴于此，本发明针对现有技术存在的问题，提供了一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法和应用。本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明提供一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法，包括：

步骤一，基础苗的培育：选取姜种，将其室外翻晒 1~2 天后黑暗催芽，待姜芽长至 2~3 cm，将姜芽取下流水冲洗，然后进行钝化病毒处理，处理完后消毒，剥取带 1~2 个叶原基的茎尖依次进行初代、继代培养，获得基础

苗；

步骤二，接种：将基础苗剔除根部培养基和继代培养时接种的茎段，分成单株，切去叶、长根，保留基部 1~2 cm 长的茎段，以形态学朝上接种到诱导培养基；

步骤三，诱导：将接种好的诱导培养基进行光照培养，获得微姜块。

优选地，所述步骤一中选取姜种为选取芽眼多、色泽鲜亮、健壮肥硕、无病虫害的小黄姜。

进一步地，所述步骤一中钝化病毒处理的条件控制为：温度 50~60℃，时间 10~12 min。

进一步地，所述步骤一中消毒采用的是 75%酒精浸泡 30~60 s 后，再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 8~15 min。

进一步地，所述步骤一中继代培养的过程包括：将初代培养的丛生苗分成单株，切去叶、长根，保留 2 cm 长的茎干接种到继代培养基，置于 25℃ 培养箱内培育培养 30~40 d，光照周期为 14 h/d，光照强度为 3000 lx。

进一步地，所述继代培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组

分的终浓度为：6-苄氨基腺嘌呤 2~3 mg/L，萘乙酸 0.1~0.5 mg/L，琼脂 6.5 g/L，蔗糖 30 g/L。

进一步地，所述步骤二中诱导培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：琼脂 6.5 g/L，蔗糖 60~80 g/L，多效唑 2.5~3.5 mg/L。

- 5 进一步地，所述步骤三中光照培养的条件控制为：每天光照 12~16 h，光强 3000~4000 lx，白天温度为 25±2℃；晚上温度 18±2℃，培养 50~60 d。

第二个方面，本发明提供一种生姜种质资源，是采用上述诱导方法获得。

第三个方面，本发明提供上述生姜种质资源及其诱导方法在生姜优质品种繁育和保存中的应用。

- 10 与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：本发明可以获得繁殖系数高、块茎大、效果好的微型根状茎，该微型根状茎可以作为一种生姜种质资源对生姜优质品种进行繁育和保存。

附图说明

- 15 图 1 为本发明实施例 2 获得的生姜微型根状茎的实物图。

具体实施方式

- 在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。
- 20

下面结合具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

本实施例提供一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法，包括：

步骤一，基础苗的培育：选取芽眼多、色泽鲜亮、健壮肥硕、无病虫害的四川本地小黄姜，室外翻晒 1~2 天后黑暗催芽。待姜芽长至 2~3 cm，取下姜芽流水冲洗 30 min，55℃热处理 10 min 钝化病毒。转至超净工作台用 75% 酒精浸泡 30 s 和 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min 进行消毒，在显微镜下剥取带 1~2 5 个叶原基的茎尖，植入初代培养基进行初代培养，初代培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：6-糠氨基嘌呤 2 mg/L，琼脂 6.5 g/L，萘乙酸 1 mg/L，蔗糖 30 g/L。初代培养结束后，将长出的脱毒苗切去茎、长根，保留 2 cm 长的茎干接种到继代培养基，继代培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：6-苄氨基腺嘌呤 2.5 mg/L，10 萘乙酸 0.3 mg/L，琼脂 6.5 g/L，蔗糖 30 g/L；置于 25℃培养箱内培育培养 35 d，光照周期为 14 h/d，光照强度为 3000 lx，获得健壮姜苗。

步骤二，接种：将基础苗剔除根部培养基和继代培养时接种的茎段，分成单株，切去叶、长根，保留基部 1~2 cm 长的茎段。将处理好的茎段，形态学朝上，接种诱导培养基，诱导培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，15 其中各组分的终浓度为：琼脂 6.5 g/L，蔗糖 80 g/L，多效唑 2.5 mg/L，每瓶 3 株。

步骤三，培养：将接种好茎段的诱导培养基置于光照培养箱培养，每天光照 14 h，光强 3000 lx，白天温度为 25±2℃；晚上温度 18±2℃，培养 55 d，获得繁殖系数 5.8、块茎大的微姜块。

20 实施例 2

本实施例提供一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法，包括：

步骤一，基础苗的培育：选取芽眼多、色泽鲜亮、健壮肥硕、无病虫害的四川本地小黄姜，室外翻晒 1~2 天后黑暗催芽。待姜芽长至 2~3 cm，取25 下姜芽流水冲洗 30 min，55℃热处理 10 min 钝化病毒。转至超净工作台用

75%酒精浸泡 40 s 和 0.1% HgCl_2 浸泡 15 min 消毒，在显微镜下剥取带 1~2 个叶原基的茎尖，植入初代培养基进行初代培养，初代培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：6-糠氨基嘌呤 2 mg/L，琼脂 6.5 g/L，萘乙酸 1 mg/L，蔗糖 30 g/L。初代培养结束后，将长出的脱毒苗切去茎、长根，保留 2 cm 长的茎干接种到继代培养基，继代培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：6-苜氨基腺嘌呤 2.5 mg/L，萘乙酸 0.3 mg/L，琼脂 6.5 g/L，蔗糖 30 g/L；置于 25℃ 培养箱内培育培养 35 d，光照周期为 14 h/d，光照强度为 3000 lx，获得基础苗。

步骤二，接种：将基础苗剔除根部培养基和继代培养时接种的茎段，将丛生苗分成单株，切去叶、长根，保留基部 1~2 cm 长的茎段。将处理好的茎段，形态学朝上，接种诱导培养基，诱导培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：琼脂 6.5 g/L，蔗糖 80 g/L，多效唑 3 mg/L，每瓶 3 株。

步骤三，培养：将接种好茎段的诱导培养基置于光照培养箱培养，每天光照 14 h，光强 3000 lx，白天温度为 $25\pm 2^\circ\text{C}$ ；晚上温度 $18\pm 2^\circ\text{C}$ ，培养 60 d，获得块茎大的微姜块，如图 1 所示。

实施例 3

本实施例提供一种基于生姜试管苗的微姜块诱导方法，包括：

步骤一，基础苗的培育：选取芽眼多、色泽鲜亮、健壮肥硕、无病虫害的四川本地小黄姜，室外翻晒 1~2 天后黑暗催芽。待姜芽长至 2~3 cm，取下姜芽流水冲洗 30 min，55℃ 热处理 10 min 钝化病毒。转至超净工作台用 75%酒精浸泡 30 s 和 0.1% HgCl_2 浸泡 10 min 进行消毒，在显微镜下剥取带 1~2 个叶原基的茎尖，植入初代培养基进行初代培养，初代培养基的组成为：以 MS 为基础培养基，其中各组分的终浓度为：6-糠氨基嘌呤 2 mg/L，琼脂

6.5 g/L, 萘乙酸 1 mg/L, 蔗糖 30 g/L。初代培养结束后, 将长出的脱毒苗切去茎、长根, 保留 2 cm 长的茎干接种到继代培养基, 继代培养基的组成为: 以 MS 为基础培养基, 其中各组分的终浓度为: 6-苄氨基腺嘌呤 2.5 mg/L, 萘乙酸 0.3 mg/L, 琼脂 6.5 g/L, 蔗糖 30 g/L; 置于 25℃培养箱内培育培养 40 d, 光照周期为 14 h/d, 光照强度为 3000 lx, 获得基础苗。

步骤二, 接种: 将基础苗剔除根部培养基和继代培养时接种的茎段, 将丛生苗分成单株, 切去叶、长根, 保留基部 1~2 cm 长的茎段。将处理好的茎段, 形态学朝上, 接种到诱导培养基, 诱导培养基的组成为: 以 MS 为基础培养基, 其中各组分的终浓度为: 琼脂 6.5 g/L, 蔗糖 80 g/L, 多效唑 3.0 mg/L, 每瓶 3 株。

步骤三, 培养: 将接种好茎段的诱导培养基置于光照培养箱培养, 每天光照 14 h, 光强 3000 lx, 白天温度为 25±2℃; 晚上温度 18±2℃, 培养 50 d, 获得块茎大的微姜块。

将本实施例获得的生姜微型根状茎从培养室取出进行室内驯化, 在 25±2℃、遮阳 70%的大棚中松盖培养 5~7 d, 后开盖培养 1~2 d。使之适应从弱光到强光, 从无菌到有菌的环境。室内驯化结束后, 从瓶内取出组培苗, 洗去根部粘连的培养基, 将丛生苗分成单株, 按合适的密度移植到大田。移植后立刻喷淋浇水, 并搭建拱棚, 覆膜保湿, 长出两片新叶就可以撤去。遮阳 60~40%, 培养温度不能超过 30℃。存活率达到 100%。

结果表明, 带有微姜块的姜苗种入大田能够存活, 且存活率为 100%。说明采用微姜块进行繁育的方法可行。和常规的组织培养技术相比, 省去了生根壮苗和炼苗驯化环节, 缩短了生姜组培周期, 省时省力且有效节约生姜繁育成本。

对比例 1

本对比例进行 5 组对比试验，该 5 组对比试验和实施例 1 的区别在于步骤二中诱导培养基的成分组成，其他同实施例 1，具体诱导培养基的配方和实验结果如表 1 所示。

表 1 5 组对比试验结果

5

诱导培养基配方	繁殖系数	微姜块大小
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 30 g/L	4.7	—
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 60 g/L	5.2	+
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L	5.8	++
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 100 g/L	3.3	++
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 120 g/L	/	/

注：“/”代表植株死亡，“—”表示没有微姜块诱导出来，“+”表示 60~80 mg，“++”表示 81~100 mg，“+++”表示 101~120 mg，“++++”表示 121~140 mg，“+++++”表示 141~mg。（下表同）

通过表 1 的数据，可以看出蔗糖对微姜块的形成具有显著影响，添加 80 g/L 和 100 g/L 的蔗糖都可以诱导明显的微姜块，添加 10%蔗糖会影响姜苗生长，分化率低，叶片稀少。添加 120 g/L 的蔗糖姜苗则会全部死亡。

对比例 2

本对比例考察了诱导培养基中添加多效唑、比久、茉莉酸的对比试验结果，其他同实施例 1，具体诱导培养基的配方和实验结果如表 2 所示。

表 2 不同诱导培养基配方的对比试验结果

	繁殖系数	微姜块大小	植株状态
蔗糖与多效唑配比系数筛选			

MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+多效唑 3 mg/L	5.9	+++++	叶片偏黄，茎干粗壮
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+多效唑 3.5mg/L	5.6	+++++	叶片偏黄，茎干粗壮
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+多效唑 4 mg/L	5.2	++++	叶片枯黄
蔗糖与比久配比系数筛选			
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+比久 1 mg/L	5.5	—	姜叶嫩绿
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+比久 2 mg/L	6.2	+++	姜叶嫩绿
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+比久 4 mg/L	4.8	++++	苗稀疏，植株矮小
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+比久 8 mg/L	4.7	++++	苗稀疏，植株矮小
蔗糖与茉莉酸配比系数筛选			
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+茉莉酸 0.2 mg/L	5.6	+	叶片多、分化时间较短
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+茉莉酸 0.4 mg/L	6.3	+++	叶片多，分化时间较短
MS+6.5 g/L 琼脂+蔗糖 80 g/L+茉莉酸 0.8 mg/L	6.3	+++	叶片多，分化时间较短
MS+0.6%琼脂+蔗糖 80 g/L+茉莉酸 1.2 mg/L	6.4	+++	叶片多，分化时间较短

通过表 2 的数据，可以看出多效唑和 80 g/L 蔗糖组合诱导的微姜块最大，其次是比较久，最小的是茉莉酸。多效唑组的姜苗茎干粗壮，但是叶片偏黄；比较久组姜苗更绿，植株偏矮小；茉莉酸组繁殖率高，分化时间较短。综合考虑，多效唑配合 80 g/L 蔗糖诱导微姜块效果做最佳。

5 综上，本发明采用一种微姜块的体外诱导方法，可以获得繁殖系数高、块茎大、效果好的微姜块，比现有文献所报道的微姜块块茎更大，单株诱导出来的微姜块数量更多，母株的生长状态更好。该微姜块可以脱离母株保存并直接播种生产原原种，带微姜块的姜苗也可以直接植入大田，成活率 100%。采用微姜块对生姜优质品种进行繁育和保存与常规的利用组织培进行离体
10 繁育的方法相比，省去了生根壮苗和炼苗驯化环节，缩短了生姜生产周期，有效节约成本，提高了生姜繁育的经济效益。

该微型根状茎可以作为一种生姜种质资源对生姜优质品种进行繁育和保存。

如在说明书及权利要求当中使用了某些词汇来指称特定成分或方法。本
15 领域技术人员应可理解，不同地区可能会用不同名词来称呼同一个成分。本说明书及权利要求并不以名称的差异来作为区分成分的方式。如在通篇说明书及权利要求当中所提及的“包含”为一开放式用语，故应解释成“包含但不限于”。“大致”是指在可接收的误差范围内，本领域技术人员能够在一定误差范围内解决所述技术问题，基本达到所述技术效果。说明书后续描
20 述为实施本申请的较佳实施方式，然所述描述乃以说明本申请的一般原则为目的，并非用以限定本申请的范围。本申请的保护范围当视所附权利要求所界定者为准。

还需要说明的是，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的商品或者系统不仅包括那些
25 要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种商品或者

系统所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括所述要素的商品或者系统中还存在另外的相同要素。

上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解

- 5 发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。