维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:1001-4721(2007)01-0027-04

应用种子进行穿龙薯蓣组织培养的研究

蒋玉宝[1],张素梅[1],张数鑫[1],于元杰[1*],庞淑萍[2]

(1.山东农业大学农学院,山东 泰安 271018; 2.淄博市临淄区农业局,山东 淄博 255400)

摘要:以穿龙薯蓣种子为外植体诱导出了愈伤组织,最佳培养基为MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 2.0mg/L,最高出愈率为18.9%;诱导不定芽的最佳培养基为MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 2.0mg/L, 最高诱导率可达75.5%; 最佳壮苗培养基为1/2MS+6-BA 1.0mg/L+KT 1.0mg/L;根诱导的最佳培养基为1/2MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.5mg/L,诱导率最高达86.2%;最佳的炼苗基质为腐质土∶蛭石∶河沙=1∶1∶1,成活率最高达84.8%。

关键词:穿龙薯蓣;种子;组织培养;愈伤组织

中图分类号:S567.23; Q943.1 **文献标识码**:A

Using Seeds as Explant on *Dioscorea nipponica* Makino. Tissue Culture

JIANG Yu-bao[1], ZHANG Su-mei[1], ZHANG Su-xin[1], YU Yuan-jie[1*], PANG Shu-ping[2]

(1.College of Agronomy,Shandong Agricultural University. Tai'an 271018, China;
2.Agricultural Bureau of Linzi City. Zibo Shandong 255400, China)

Abstract: Callus was induced using seeds as explant on *Dioscorea nipponica* Makino, the best culture media is MS+6-BA3.0 mg/L+NAA2.0 mg/L and the highest frequency is 18.9%. The gemma can be induced when the callus was transferred into the culture medium with MS+6-BA2.0mg/L+NAA2.0mg/L and the highest inducement frequency can be reach 75.5%. The buds grow strongly on the culture medium with 1/2MS+6-BA1.0mg/L+KT1.0mg/L and radicate easily on the culture medium with 1/2MS +6-BA 0.5mg/L +NAA 0.5mg/L. Radication frequency can be reach 86.2%.The transplanting medium in rotten quality soil, vermiculite and river sand by 1 to 1 to 1, is useful,84.8% seedlings can survive if the technique is fine.

Key words: *Dioscorea nipponica* Makino.; Seed; Tissue culture; Callus

穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino.)为薯蓣科薯蓣属多年生缠绕草本植物, 广泛分布于北亚热带及中亚热带地区。在我国,东北长白山区是其重要分布区和资源供应地之一。其根茎穿山龙的提取物穿山龙总皂苷主要含薯蓣皂苷 (Dioscin)、尿囊素(Allantoin)等成分,是提取甾体皂苷元合成多种避孕药和甾体激素的重要原料[1,2]。近代研究表明,穿山龙有调节免疫、改善心血管功能、镇咳、祛痰、平喘等多种药理作用,治疗类风湿性关节炎、冠心病心绞痛、慢性气管炎、慢性布鲁菌病、脂肪瘤等疗效较好。近年来,由于生存环境的破坏和人类大量采挖,穿龙薯蓣野生资源已接近濒危状态, 现已被列为国家二级保护植物。

利用组织培养技术产生组培苗具有重要意义,一方面可以在较短的时间内获得大量的种苗用于生产,同时也为大规模工厂化生产提供科学依据;另一

收稿日期:2006-07-06

作者简介:蒋玉宝(1981-),男,山东曲阜人,在读硕士研究生,主要从事生物技术在植物育种上的应用研究。

*通讯作者:于元杰(1953-),男,山东莱州人,硕士生导师,教授,主要从事生物技术改良作物的理论和应用研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

方面，组培苗高产系的筛选及组培中出现的变异苗为选育穿龙薯蓣优良品种提供了丰富的种质资源，对于解决野生穿龙薯蓣薯蓣皂素含量低有重要的意义。因此，建立有效的穿龙薯蓣再生体系便成为亟待解决的问题。陈凤清[3]等利用穿龙薯蓣微块茎建立了再生体系，罗凤霞[4]和李际红[5]利用不定芽进行了再生植株的研究，而利用愈伤组织建立穿龙薯蓣再生体系还未见报道。从以前的研究看[6]，由于穿龙薯蓣木质化程度较高，愈伤组织的产生比较困难，以营养器官（幼根、茎段、叶片）为外植体产生愈伤时褐化情况严重，出愈率不高，有些器官根本不产生愈伤。本研究以种子为外植体成功诱导出了愈伤组织，进而建立了穿龙薯蓣的再生体系。

1 材料和方法

1.1 材料

穿龙薯蓣种子，2005年10月购于吉林省柳河北方特产研究所，收获于当年秋季。

1.2 方法

1.2.1 *愈伤组织的诱导* 将种子在清水中浸泡5d后再转入200mg/kg的赤霉素（GA）溶液中浸泡1d，用镊子去掉边缘的种翅，再用清水冲洗数次，直至没有杂质，倒入70%的酒精消毒1min，再用0.1%的升汞消毒15min，然后将种子接种在不同激素组合的MS培养基中，25℃暗培养。激素对种子诱生愈伤组织的影响试验采用正交设计[7]。

1.2.2 *不定芽的诱导* 不定芽的诱导采用激素6-BA、NAA，各设3个水平。6-BA设置水平为1.0mg/L、2.0mg/L、3.0mg/L；NAA设置水平为1.0mg/L、2.0mg/L、3.0mg/L。试验采用双因素完全随机设计。

1.2.3 *壮苗培养* 壮苗培养基以1/2MS为基本培养基，对6-BA、KT两种细胞分裂素做2水平的完全随机试验。

1.2.4 *试管苗生根培养* 生根试验采用MS、6-BA、NAA三因素，分别取3个水平进行$L_9(3^4)$正交设计，每处理每次接种20株。

1.2.5 *炼苗移栽* 基质：沙，田园土，腐质土、蛭石、河沙=1∶1∶1。基质处理：用0.1%高锰酸钾溶液对各种基质消毒。将生了根的穿龙薯蓣苗，先在室温内除去扣膜锻炼3d，然后取出单苗，洗净根上的培养基，把根部浸入1 000倍的多菌灵溶液消毒3min，晾干后栽入基质中，统计成活率。

以上试验每处理重复3次，结果采用DPS2000数据统计软件处理（对于百分数取其反正弦平方根）。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

将种子接种在含不同激素组合的MS培养基上，20d后开始有胚轴出现，以后1号培养基上（即只含6-BA）芽和根同时生长（见图1），而在其余培养基上无根生成，只长出芽，同时在芽的基部逐渐有愈伤组织形成（见图2）。35d后调查出芽率和出愈率，结果见表1。

表1 激素对种子生愈伤的影响

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)
1	1(2.0)	1(0)	1(0)	60	0.0	0.0
2	1	2(1.0)	2(3.0)	60	3.0	5.0
3	1	3(2.0)	3(4.0)	60	7.3	12.2
4	2(3.0)	1	2	60	1.7	2.8
5	2	2	3	60	3.3	5.6
6	2	3	1	60	11.3	18.9
7	3(4.0)	1	3	60	1.0	1.7
8	3	2	1	60	0.7	1.1
9	3	3	2	60	0.7	1.1

注：出愈率=出愈数/接种数×100%

由表1可以看出：不同的激素组合对种子产生愈伤组织的影响不同。6号培养基的出愈率最高，为18.9%；其次是3号培养基，为12.2%；1号培养基最低，没有愈伤组织形成；其余培养基的出愈率为1.1%~5.6%。对出愈率进行方差分析，结果见表2。

表2 出愈率方差分析

变异来源	自由度	平方和	方差	F值	临界值 F
6-BA	2	586.27	293.13	11.36**	$F_{0.05(2,18)}$=3.55
NAA	2	652.25	326.12	12.63**	$F_{0.01(2,18)}$=6.01
2,4-D	2	96.76	48.38	1.87	
误差	18	464.65	25.81		

由表2可见，出愈率在2,4-D各水平之间差异不显著，而在6-BA和NAA各水平之间差异极显著，进一步进行多重比较结果见表3。

表3 不同浓度的6-BA和NAA对出愈率的LSR检验

6-BA (mg/L)	平均数 (反正弦值)	LSR检验 $F_{0.05}$	LSR检验 $F_{0.01}$	NAA (mg/L)	平均数 (反正弦值)	LSR检验 $F_{0.05}$	LSR检验 $F_{0.01}$
2(3.0)	16.2	a	A	3(2.0)	17.1	a	A
1(2.0)	11.1	b	AB	2(1.0)	9.9	b	B
3(4.0)	4.8	c	B	1(0.0)	5.1	b	B

由表3可以看出：6-BA浓度为3.0mg/L时出愈率

维普资讯 http://www.cqvip.com

最高,为9.1%(反正弦值为16.2%),与2.0mg/L水平差异显著,与4.0mg/L水平差异极显著;NAA浓度为2.0mg/L时出愈率最高,为10.7%(反正弦值为17.1%),与1.0mg/L及不加NAA的出愈率差异极显著。因此,以种子为外植体形成愈伤组织时,最佳培养基为MS+6-BA3.0mg/L+NAA 2.0mg/L。

2.2 不定芽的诱导

将生长快的愈伤组织转接到各种不定芽诱导培养基中,经过约1周的培养,淡黄绿色的愈伤组织逐渐变绿,并形成很多突起,进而形成多芽体(见图3)。激素对不定芽诱导率的影响见表4。

表4 不同浓度的6-BA和NAA对不定芽诱导的影响

处理	激素浓度(mg/L)		诱导率(%)	LSR检验	
	6-BA	NAA		$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
1	1(1.0)	1(1.0)	50.9	h	H
2	1	2(2.0)	53.4	g	G
3	1	3(3.0)	57.2	f	F
4	2(2.0)	1	65.6	c	C
5	2	2	75.5	a	A
6	2	3	68.8	b	B
7	3(3.0)	1	65.2	c	C
8	3	2	62.5	d	D
9	3	3	59.9	e	E

由表4可以看出,不同的激素组合对不定芽的诱导率影响显著,5号培养基(6-BA和NAA浓度都为2.0mg/L)的诱导率最高,达75.5%,经方差分析,与其它处理差异达到了极显著水平;当6-BA和NAA浓度都为1.0mg/L时诱导率最低,为50.9%。由表中数据还可以看出,6-BA和NAA浓度适中时诱导率较高,浓度过高或过低都会导致诱导率下降。因此,MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 2.0mg/L为最佳不定芽诱导培养基。

2.3 壮苗培养

继代培养所获得的幼苗矮小纤弱,需要进行壮苗培养,以提高生根率。用两种细胞分裂素浓度较低的培养基对继代的有效芽进行壮苗培养,30d的芽平均生长量见表5。由表5可见,1号培养基芽的生长量最大,达3.2cm,与其它3种培养基间差异极显著,其它培养基之间差异不显著。因此,最佳的壮苗培养基为1/2MS+6-BA 1.0mg/L+KT 1.0mg/L。

表5 4种壮苗培养基培养结果

处理号	细胞分裂素浓度(mg/L)		30d芽平均生长量(cm)
	6-BA	KT	
1	1.0	1.0	3.20A
2	1.0	2.0	2.65B
3	2.0	1.0	2.65B
4	2.0	2.0	2.62B

2.4 生根培养

将高达3cm的小植株接种到生根培养基中进行生根培养。接种15d后小苗开始生根,45d后小苗生根趋于稳定(见图4),统计各处理的生根率,结果见表6。由表6可见,3号处理的生根率最高,达86.2%。对各处理的生根率进行方差分析,结果见表7。

表6 不同培养基及其不同浓度6-BA和NAA对生根率的影响

处理	培养基	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	生根率(%)
1	1(MS)	1(0.0)	1(0.0)	61.0
2	1	2(0.5)	2(0.5)	72.4
3	1	3(1.0)	3(1.0)	86.2
4	2(1/2MS)	1	2	46.1
5	2	2	3	61.2
6	2	3	1	70.0
7	3(1/3MS)	1	3	42.9
8	3	2	1	46.3
9	3	3	2	57.0

表7 生根率方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F
培养基	2719.33	2	1359.67	2427.98**
6-BA	95.52	2	47.76	85.29**
NAA	1817.01	2	908.50	1622.32**
误差	10.10	18	0.56	

表7表明,生根率在培养基6-BA与NAA之间均达到了极显著水平,说明各因子各水平变化对生根率有极显著的影响。进一步对各因素各水平进行多重比较,结果见表8。

表8 不同培养基和不同浓度的6-BA、NAA对生根率的LSR检验

培养基	生根率 $\bar{x}$(%)	LSR检验		6-BA (mg/L)	生根率 $\bar{x}$(%)	LSR检验		NAA (mg/L)	生根率 $\bar{x}$(%)	LSR检验	
		$F_{0.05}$	$F_{0.01}$			$F_{0.05}$	$F_{0.01}$			$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
2(1/2MS)	73.20	a	A	2(0.5)	62.89	a	A	2(0.5)	71.06	a	A
1(MS)	59.10	b	B	3(1.0)	59.71	b	B	3(1.0)	58.82	b	B
3(1/4MS)	48.71	c	C	1(0.0)	58.41	c	C	1(0.0)	51.13	c	C

由表8可见,培养基为1/2MS时生根率最高,且与其它水平间差异极显著;6-BA的浓度为0.5mg/L时生根率最高,极显著高于其它水平;NAA浓度为0.5mg/L时对生根最有利,与其它水平间差异极显著。因此,1/2MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.5mg/L是诱导生根的最佳组合。

2.5 炼苗移栽

将生根苗在不同基质中炼苗,其成活率见表9。从表9可以看出,3种基质处理间差异显著,尤以腐质土:蛭石:河沙=1:1:1、pH 6.5的混合物效果最好。分析其原因可能为:沙土的通透性好,但保水能力差;田园土的保水保肥能力强,但通透性差;而

维普资讯 http://www.cqvip.com

腐质土、蛭石和河沙的混合物，由于它们是矿物质，经过灭菌，保水性与通透性居于中间，是较为理想的基质。

表9 炼苗统计结果

基 质	成活率(%)
沙	35.2
田园土	49.6
腐质土：蛭石：河沙=1：1：1	84.8

3 结论与讨论

本研究以种子为外植体，成功地诱导出了愈伤组织，进而建立了穿龙薯蓣的再生体系。

应用种子诱导愈伤组织的研究在禾本科[8-10]和百合科[11]植物中均有报道，但在薯蓣植物中尚无报道。本研究用穿龙薯蓣的种子诱生了愈伤，以这种途径产生的愈伤生长速度快，而且有效地控制了褐化现象。2,4-D和NAA均为生长素，主要作用为促进细胞生长和分裂，诱导受伤的组织表面细胞恢复分裂能力。通常在愈伤诱导过程中2,4-D为关键因子，NAA则在诱导芽分化中应用普遍；但在穿龙薯蓣种子产生愈伤组织的试验中，添加2,4-D的处理却比不添加的处理出愈率低，这可能是因为愈伤产生在胚轴上，而2,4-D有抑制胚轴形成的副作用。在一定的6-BA浓度范围内，出愈率随着NAA浓度的增大而增大，这可能是由于NAA的添加而使细胞内生长素活性增加的缘故。对于6-BA，在较低的浓度范围内出愈率随着浓度的增加而增加，但在高浓度下出愈率反而降低，这可能是因为高浓度的6-BA可能促进一些抑制愈伤组织形成的物质产生的缘故。虽然以种子产生愈伤有很多优点，但从总体上看这种方法产生愈伤的百分率较低，这可能一方面因为穿龙薯蓣种子本身出芽率比较低，另一方面可能是由于在接种过程中种子受到消毒试剂的刺激，从而降低了出芽率和出愈率。

在不定芽的诱导过程中发现，NAA浓度相同时，高浓度(大于3.0mg/L)的6-BA可提高多芽体的平均芽数，但抑制芽的生长，形成的芽矮小，叶色暗绿；低浓度(小于1.0mg/L)的6-BA诱导出的多芽体少，叶色淡；中浓度(1.5~2.5mg/L)的6-BA既可以保持较高的多芽体芽数，芽又健壮。而在6-BA浓度均为2.0mg/L时，多芽体的个数随NAA浓度的上升变化不大，但多芽体的长势以附加NAA 2.0mg/L时为最好。

在继代培养基中获得的有效芽，趋于芽分化增殖状态，较高浓度的细胞分裂素对芽的生长已经产生抑制作用，采用含低水平细胞分裂素的培养基有助于恢复芽的生长，适当大的芽有利于进一步的生根培养。

图1 在只含6-BA的MS培养基上生长的幼苗

图2 愈伤组织

图3 不定芽

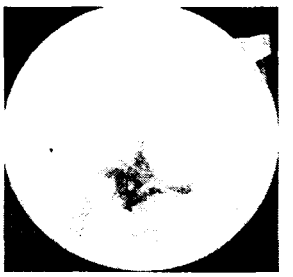

图4 试管苗生根

参考文献

[1] Liu C.L, Chen Y.Y., Ge S.B., 1983, Studies on the constituent from Dioscorea plants: Ⅱ.Isolation and identification of steroidal saponins from Dioscorea collettii Hook.f, [J].Acta Pharm Sin(药学学报), 18(8): 597-606.

[2] 刘铁城. 穿龙薯蓣野生资源调查与人工栽培[A], 药用植物引种驯化研究[C].北京：中国科学技术出版社, 2000：219-221.

[3] 陈凤清,付 杨,孙冬雪,等. 穿龙薯蓣的微块茎离体诱导及再生植株的建立[J]. 东北师大学报自然科学版,2005,37(4):90-93.

[4] 罗凤霞,祝朋芳,周广柱等. 穿龙薯蓣的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(3):329.

[5] 李际红,谢会成,许建农,等. 穿龙薯蓣不定芽的诱导与植株再生[J].山东农业大学学报, 2005,36(1):82-85.

[6] 张数鑫,周录英,于元杰,等. 穿山龙愈伤组织培养研究[J]. 中国农学通报,2005,21(7):77-78.

[7] 冷寿慈. 生物统计与田间实验设计[M]. 北京:中国广播电视出版社,1992：156.

[8] 余泽高, 黄喜梅. 大穗黑麦草成熟种子愈伤组织诱导及分化的研究[J]. 河南农业科学,2004,(12):7-10.

[9] 张振霞,褚成才,席嘉宾. 多年生黑麦草种子愈伤组织诱导和植株再生[J]. 草地学报,2004,12(4):289-293.

[10] 余泽高,杨芳. 小麦新品种鄂恩4号种子愈伤组织的诱导[J]. 湖北农业科学,2005,(1):14-16.

[11] 张玉喜,穆春华,于元杰. 应用种子进行大葱组织培养的研究[J].华北农学报,2003,18(2):105-109.