

盾叶薯蓣组织培养技术研究*

梁艳丽, 李兰玉, 谢世清**

(云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 主要进行了盾叶薯蓣芽的诱导培养和带愈伤组织幼苗的生根培养。结果表明, 芽诱导培养的17种培养基配方中, 以MS+4 mg/L BA+1 mg/L KT为最好, 其芽的诱导率达到68.72%; 生根培养的4个培养基配方中, 以MS+0.5 mg/L NAA为最好, 其生根率达到92.09%, 且根粗、须根多。

关键词: 盾叶薯蓣; 组织培养; 芽诱导率

中图分类号: S 632.1.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)02-0164-05

Research on Tissue Culture Technology of *Dioscorea zingiberensis*

LIANG Yan-li, LI Lan-yu, XIE Shi-qing

(College of Agronomy and Biotechnology, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: Induction the differentiation of buds and roots of *Dioscorea zingiberensis* was studied in present paper. Results showed that MS medium with 4 mg/L BA and 1 mg/L KT was the best for the differentiation of buds. The bud induction rate was up to 68.72% and the buds were doing well. MS medium enriched with 0.5 mg/L NAA appeared to be the optimum medium for the differentiation of roots. The root induction rate was 92.09%. Furthermore, the roots induced in the medium were thicker and more fibrous roots than in other 3 kinds of medium.

Key words: *Dioscorea zingiberensis*; tissue culture; bud induction rate

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)是薯蓣科薯蓣属的一种多年生缠绕性草本植物, 又名黄姜、苦良姜等, 是我国特有的野生药用植物资源, 也是世界上迄今为止所发现的薯蓣皂甙元(简称皂素)含量最高的植物药源种之一, 其薯蓣皂甙元含量最高可达16.5%。薯蓣皂甙元是合成甾体激素类药及避孕药的主要原料, 而水溶性甾体皂甙成分对心肌缺血、胸痹、高血脂症等有明显的治疗作用, 生药具有清肺止咳、利湿通淋、通络止痛、解毒消肿的功能。因此, 盾叶薯蓣市场需求量大, 具有较高的经济价值。但盾叶薯蓣已开发利用多年, 野生资源由于过度采挖已面临枯竭, 而人工分根繁殖栽培, 繁殖系数低, 生根困难, 质量不稳定, 成本高, 难以推广种植。利用组织培养技术繁殖盾叶薯

蓣, 既可保存种质资源, 又能快速繁殖优良品种。为此, 开展盾叶薯蓣的组织培养研究, 对解决生产中种苗缺乏的突出矛盾, 提高盾叶薯蓣的产量和品质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

盾叶薯蓣优良品系盾薯38, 由云南农业大学魔芋研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 材料处理与培养条件

剪取健壮植株地上茎段, 用自来水浸泡并洗净后, 剪成单节茎段, 再用0.1%氯化汞浸泡(10~20 min), 无菌水冲洗3~5次; 培养基(pH 5.8)于

收稿日期: 2005-06-02

* 基金项目: 云南省应用基础研究资助项目(20030039M);

** 通讯作者

作者简介: 梁艳丽(1975-), 女, 黑龙江人, 硕士, 讲师, 主要从事植物组织培养及植物生理学研究。

121℃灭菌 22 min,培养温度为(25±1)℃,光照下(2×40 W/m² 节能荧光灯管)进行培养,光照时间为 13~15 h/d。

1.2.2 芽的诱导培养

以无菌盾叶薯蓣单节茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的激素:6-苄基腺嘌呤(BA)、激动素(KT)、萘乙酸(NAA)于培养基中,每种处理重复 3 次,培养 40 d。根据芽的诱导率、株高和苗的生长情况筛选出适宜的培养基组合。

1.2.3 生根培养

取无菌带愈伤组织的盾叶薯蓣幼苗为外植体,以

1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的激素:萘乙酸(NAA)、赤霉素(GA₃)于培养基中,每种处理重复 3 次,培养 30 d,根据生根率、发根时间及根的生长状况筛选出适宜培养基组合。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合与激素浓度对盾叶薯蓣芽诱导及株高的影响

2.1.1 不同激素组合对盾叶薯蓣芽诱导及株高的影响

表 1 不同激素组合与浓度对盾叶薯蓣芽诱导率及株高的影响
Tab.1 Effects of plant hormone combination and concentration on the bud induction rate and the height of plant of *Dioscorea zingiberensis*

激素组合 hormone combination	培养基号 NO. of media	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) hormone concentration			平均芽诱导率/% average bud induction rate	平均株高/dm average plant height
		BA	KT	NAA		
BA	1	2	0	0	59.26 ^{abc}	0.88 ^{ABC}
	2	3	0	0	55.97 ^{abc}	0.82 ^{ABCDE}
	3	4	0	0	58.33 ^{abc}	0.99 ^{ABCDE}
	4	5	0	0	46.53 ^{abcd}	0.82 ^{ABCDE}
BA + KT	5	2	1	0	66.67 ^{ab}	1.37 ^{AB}
	6	3	1	0	51.67 ^{abcd}	0.71 ^{ABCDE}
	7	4	1	0	68.72 ^a	1.50 ^A
	8	5	1	0	35.00 ^{cd}	0.47 ^{DE}
BA + NAA	9	2	0	0.2	65.98 ^{ab}	1.32 ^{AB}
	10	3	0	0.2	51.67 ^{abcd}	1.27 ^{ABCDE}
	11	4	0	0.2	58.33 ^{abc}	1.18 ^{ABCD}
	12	5	0	0.2	60.00 ^{abc}	0.88 ^{ABC}
BA + NAA	13	3	0	0.05	40.00 ^{bcd}	0.74 ^{CDE}
	14	3	0	0.1	43.33 ^{abcd}	0.59 ^{BCDE}
	15	3	0	0.5	45.00 ^{abcd}	0.32 ^{ABCDE}
	16	3	0	1.0	27.55 ^d	0.15 ^E
	17	3	0	2.0	33.73 ^{cd}	0.16 ^E

*注:以 MS 为基本培养基;a 代表在 5% 下的差异显著性,A 代表在 1% 下的差异显著性。
Note:Ms is the basic media, a stand for the difference according to the level of 5%; A stand for the difference according to the level of 1%.

从表 1 可看出,17 种培养基配方均能成功诱导盾叶薯蓣芽的形成,芽的平均诱导率在 27.55%~68.72% 之间。但不同激素组合对盾叶薯蓣芽的诱导率和株高有显著影响。比较前 3 种激素组合发现,当培养基中只添加 BA 时,其芽的诱导率和株高最高仅为 59.26% 和 0.99 dm,而在 BA 浓度相同的情况下,向培养基中分别添加 1 mg/L KT 和 0.2 mg/L NAA,均能明显促进芽的诱导及植株长高。在 BA + KT 组合中,芽的诱导率和株高可高达

68.72% 和 1.5 dm;在 BA + NAA 组合中,芽的诱导率和株高可达到 65.98% 和 1.32 dm。而在 BA + KT 和 BA + NAA 2 种激素组合的比较中,BA + KT 较好。

2.1.2 不同激素浓度对盾叶薯蓣芽诱导及株高的影响

从图 1 和图 2 可看出,高浓度的 BA(5 mg/L)抑制盾叶薯蓣芽的诱导和植株的长高。当 BA 浓度为 2 mg/L 时,BA,BA + KT 和 BA + NAA 3 种激

素组合芽的平均诱导率为 63.97%，平均株高为 1.19 dm，而当 BA 浓度为 5 mg/L 时，3 种激素组合的芽平均诱导率降至 47.18%，平均株高降为 0.72 dm。

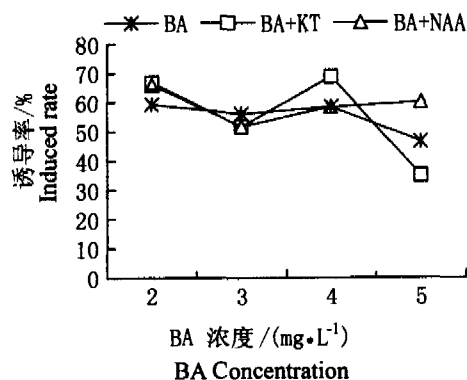


图 1 BA 浓度对芽诱导率的影响

Fig. 1 Effects of BA concentration on bud induction rate

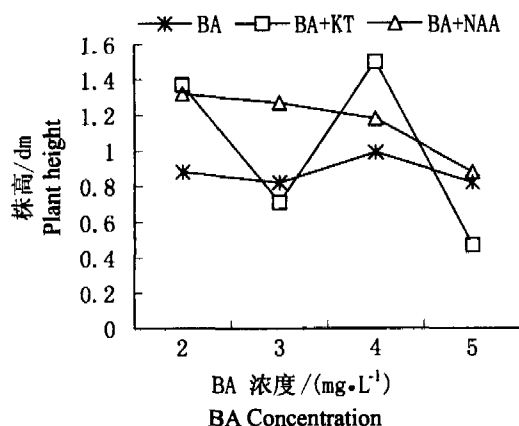


图 2 BA 浓度对株高的影响

Fig. 2 Effects of BA concentration on height of plant

从图 3 和图 4 中可知，不同浓度的 NAA 对盾叶薯蓣芽的诱导和株高均有影响。在 BA 浓度为 3 mg/L 的情况下，芽诱导率先随 NAA 浓度升高而升高，当 NAA 浓度达到 0.5 mg/L 时，芽诱导率达最大值。此后，随 NAA 浓度上升芽诱导率有下降趋势。而随着 NAA 浓度升高，株高呈现明显的下降趋势。说明适宜 NAA 浓度促进盾叶薯蓣芽的诱导，浓度过高或过低均会降低芽的诱导率。而高浓度 NAA 则抑制植株长高。

从表 2 可知，每种培养基的重复间差异不大 ($P \geq 0.05$)，而各培养基之间芽的诱导率和试验误差有显著差异 ($P \leq 0.05$)。培养基之间的差异主要是由激素组合及浓度不同所造成的。说明在盾叶薯蓣组织培养中，培养基的激素组合及浓度对芽

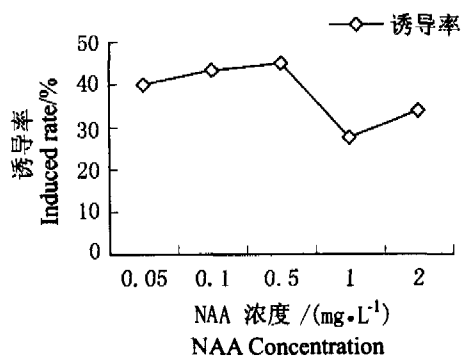


图 3 NAA 浓度对芽诱导率的影响

Fig. 3 Effects of NAA concentration on bud induction rate

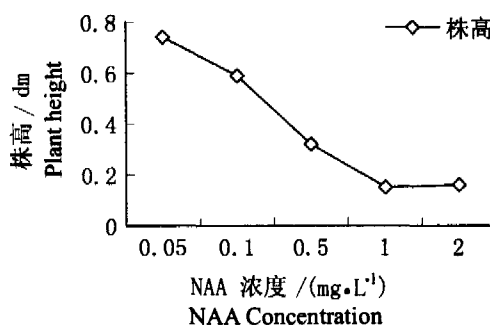


图 4 NAA 浓度对株高的影响

Fig. 4 Effects of NAA concentration on height of plant

的诱导及株高均有较大影响。在这 17 种芽诱导培养基中以 7 号培养基的诱导效果最好，其芽诱导率达 68.72%，株高为 1.5 dm，均达到最高值。因此，在这 17 种培养基配方中，MS + 4 mg/L BA + 1 mg/L KT 为盾叶薯蓣芽诱导的最佳培养基组合。

2.2 不同激素组合及浓度对诱导生根及长势的影响

将带愈伤组织的培养苗接种在 1~4 号生根培养基上培养，一段时间后均有根系的发生，但在不同的培养基组培苗诱导生根的时间早迟、生根率、根数以及根的长度等差异较大。从表 3 的试验结果可以看出，随 NAA 浓度的增加，盾叶薯蓣的生根率有增加趋势，但当 NAA 浓度太高，达到 1.0 mg/L 时，生根率反而下降，这是因为高浓度的 NAA 抑制生根，NAA 为适宜浓度时最易诱导生根。在 3 号 (含 NAA 0.5 mg/L) 培养基上，盾叶薯蓣幼苗发根早，根粗壮，须根多，生长较快，植株生长好，平均生根率达 92.09%；而当在 0.1 mg/L NAA 的基础上加 0.5 mg/L GA_3 时，生根率反而降低，只有 60.71%。

通过表 4 可知，不同激素组合及浓度对盾叶薯蓣生根有显著影响。在各重复间差异不显著 ($F \leq$

$F_{0.05}$),而在各培养基之间存在显著差异($F \geq F_{0.05}$)。其中,以3号培养基诱导生根效果最好。综合上述因素可筛选出盾叶薯蓣生根培养的最适培养基是1/2MS+0.5 mg/L NAA。

表2 芽诱导率及株高的方差分析表

Tab.2 Variance analysis of the bud induction rate and the height of plant

变异来源 source of variation		DF(自由度)	SS(平方和)	MS(均方和)	F	P
芽的诱导率 bud induction rate	重复 repetition	2	1 019.40	509.70	2.59	0.090 9
	培养基 culture media	16	7 220.12	451.26	2.29	0.022 5
	误差 error	32	6 303.75	457.75	2.32	0.018 2
	总变异 total	50	14 543.26	196.99		
株高 plant height	重复 repetition	2	0.10	0.05	0.51	0.605 4
	培养基 culture media	16	8.12	0.51	5.25	0.000 1
	误差 error	32	3.10	0.46	4.72	0.000 1
	总变异 total	50	11.32	0.10		

表3 不同激素组合及浓度的对盾叶薯蓣生根率及长势的影响

Tab.3 Effects of plant hormone combination and concentration on the root induction rate and the growth of *Dioscorea zingiberensis*

培养基 culture media	发根时间/d days of root formation	所取株数 NO. of total plants	生根株数 NO. of plants formed root	生根率/% root induced rate	平均生根率/% average root induced rate	总生根条数 NO. of total roots	根长 root length	生长状况 growth of plant
NAA _{0.1}	12	13	12	92.31	85.35 ^a	133	2.87	根细,无须根, 叶较大,长势好
		13	12	92.31				
		14	10	71.43				
NAA _{0.1} + GA ₃ (0.5)	12	12	7	58.33	60.71 ^b	91	2.97	根细,须根少, 叶小,长势差
		12	8	66.67				
		14	8	57.14				
NAA _{0.5}	10	12	11	91.67	92.09 ^a	129	3.83	根粗,须根较多, 叶大,长势好
		13	11	84.62				
		14	14	100.00				
NAA _{1.0}	11	13	8	61.54	64.77 ^b	66	2.83	根粗,须根少, 叶大,长势一般
		11	7	63.64				
		13	9	69.23				

*注:以1/2 MS为基本培养基,a代表生根率在5%下的显著性;0.1代表0.1 mg/L。

Note:1/2 Ms is the basic media, a stand for the difference of root induced rate according to the level of 5%, 0.1 stand for 0.1 mg/L.

表4 生根率的方差分析表

Tab.4 Variance analysis of the root induction rate

变异来源 source of variation	DF (自由度)	SS (平方和)	MS (均方和)	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
重 复 repetition	2	19.32	9.66	0.11	5.14	10.92
培养基 culture media	3	1 860.48	620.16	7.04	4.76	9.78
误 差 error	6	528.89	88.15			
总变异 total	11	2 408.69				

3 讨论

随着甾体激素类药物的广泛应用,国内外市场对薯蓣皂素的需求量不断增加,盾叶薯蓣市场供需矛盾十分突出。利用组织培养技术对盾叶薯蓣进行快速繁殖,是解决生产中种苗缺乏的有效途径。

在进行盾叶薯蓣组织培养时,培养基的正确选择是获取成功的基础条件。除了基本的营养物质外,为了促进培养组织和器官的生长,常常还需要在培养基中加入1种或1种以上的植物激素,如生长素、细胞分裂素及赤霉素等。如果激素的浓度配

比合适则对盾叶薯蓣芽的诱导与生根有促进作用。本试验结果表明,在 17 种盾叶薯蓣芽诱导培养基中,以 7 号培养基 MS + 4 mg/L BA + 1 mg/L KT 对芽的诱导效果最好,而且植株较高,长势好。对带愈伤组织幼苗的生根培养,以 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA 培养基诱导效果最好,且根粗、须根多、叶大,长势较好。

开展对盾叶薯蓣组织培养技术的研究,不仅可用于种苗的快速繁殖,而且还可借鉴马铃薯脱毒种薯的生产经验,对盾叶薯蓣优良品种进行茎尖脱毒培养,以达到良种复壮,提高盾叶薯蓣产量和品质的目的。

[参考文献]

- [1] 赵庆云,寸湘琴,杨燕,等. 云南高原几个盾叶薯蓣种质特征特性及栽培要点[J]. 种子,2003,(12):41-42.
- [2] 刘贵周,谢庆华,赵庆云,等. 盾叶薯蓣组织培养技术进展[J]. 中国种业,2003,(12):22-23.
- [3] 曹玉芳,王太霞,胡正海. 盾叶薯蓣根状茎不同部位和不同生长期薯蓣皂苷元含量的差异性研究[J]. 中草药,2004,35(5):563.
- [4] 徐向丽,刘选明,周朴华,等. 盾叶薯蓣组织培养及微块茎的离体诱导[J]. 湖南农业大学学报,2000,26(4):282-285.
- [5] 梁艳丽,赵庆云,杨燕,等. 盾叶薯蓣细胞工程技术研究进展[J]. 中国农学通报,2004,20(4):30-32.
- [6] 孟玲,朱宏涛,刘锡葵,等. 盾叶薯蓣的快速繁殖[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(6):17-21.
- [7] 谢碧霞,何业华,易志军. 盾叶薯蓣组织培养及其高产系的筛选[J]. 中南林学院学报,1999,19(4):17-21.
- [8] 任建伟,白云,张榕村,等. 盾叶薯蓣愈伤组织的诱导及培养[J]. 中药及天然产物,1993,28(9):532-534.
- [9] 任建伟,白云,郭秋月. 盾叶薯蓣培养细胞的生长及薯蓣皂苷元产生的变化规律[J]. 中草药,1994,25(2):93-94.
- [10] 王巧兰,黄利民,高庆军,等. 药源植物盾叶薯蓣基础研究及其产业化开发利用[J]. 军事经济学院学报,2002,9(3):92-95.
- [11] 毕世荣,张忠福,苏成端,等. 高含量薯蓣皂素植株的细胞克隆[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(4):1-6.
- [12] 徐成基,周谨,豆永泽,等. 激素药源植物——薯蓣的栽培研究[J]. 中药通报,1983,8(4):3-5.
- [13] 周雪林,王意成. 野生盾叶薯蓣的资源调查及引种[J]. 中药通报,1982,7(1):3-5.
- [14] 徐向丽. 薯蓣植物组织培养研究进展[J]. 湖南林业科技,2000,27(1):5-9.
- [15] 四川生物研究所一室体细胞组. 盾叶薯蓣组织培养研究初报[J]. 植物学报,1978,20(3):279-280.

(上接第 159 页)

3.3 不育系为母本的远缘野栽交基因转育

由于基因组间的远缘基因转育因染色体组间无同源性,早期世代的杂交和杂种后代获得十分艰难,不仅杂交或回交结实率和种子发芽成苗率极低,而且由于颖花抽穗前严重退化甚至根本不能回交,使得这种基因组间的基因转育极度困难。余文金^[5,8]等以不育系为母本不经幼胚组培挽救的技术环节比较容易地直接获得了药用野生稻与栽培稻的杂种和杂种后代,为克服远缘野栽交基因转育开辟了一条比较简便的途径,本研究正是利用了这种简便技术比较容易地获得了早晨开花遗传材料,为进一步获得可直接用于育种的早晨开花系奠定了关键的种质和技术基础。

[参考文献]

- [1] 卢宝荣,宋志平,陈家宽. 转基因稻是否会通过基因逃逸导致生态风险[J]. 自然科学进展,2003,(1):30-35.
- [2] 谭玉娟,张扬,黄炳超,等. 阔叶野生稻对四种主要虫的抗性评价[J]. 作物品种资源,1995,(1):30-31.
- [3] JENA K K, GURDEV S. KHUSH: Monosomic. alien addition lines of rice: production, morphology, cytology, and breeding behavior[J]. Genome,1989,32:449-455.
- [4] 颜辉煌,熊振民,闵绍楷,等. 紫穗野生稻的褐飞虱抗性导入栽培稻的研究[J]. 遗传学报,1997,24(5):424-431.
- [5] 余文金,罗科,郭学兴. 以水雄性不育系为母本不经幼胚培养获得 *Oryza sativa* × *O. officinalis* 杂种的研究[J]. 遗传学报,1993,20(4):348-353.
- [6] 李子先,刘刚,韩思怀,等. 栽培稻 × 大颖野生稻 F_2 多倍现象的细胞遗传学研究[J]. 遗传,1996,18(5):11-15.
- [7] 钟代彬,罗利军,应存山. 稻属种间杂交转移药用野生稻抗褐飞虱基因研究[J]. 种子,1997,(5):1-4.
- [8] 黄巧云,范芝兰,梁能,等. 以水稻不育株为受体将药用野生稻的褐飞虱抗性导入栽培稻研究初报[J]. 广东农业科学,1994,(3):1-3.