维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:1004-1729(2007)02-0163-06

墨西哥菊叶薯蓣离体快繁技术研究

潘学峰,王小精
(海南大学 生命科学与农学院,海南 海口 570228)

摘　要:报道了墨西哥菊叶薯蓣组培快繁的研究结果,试验表明:菊叶薯蓣组织培养较适宜的基本培养基是MS培养基;MS+6-BA0.5 mg·L^{-1}能够诱导菊叶薯蓣嫩茎段萌发出新芽;增殖阶段以6-BA3.0 mg·L^{-1}+NAA0.1 mg·L^{-1}的增殖效果为好,在此基础上附加φ=10%的椰子水效果更好,增殖倍数可达3.9倍;生根阶段以1/2MS+IBA2.0 mg·L^{-1}的生根效果为好,生根率可达90.6%,且植株生长健壮;试管苗在河沙与表土($V_{河沙}$:$V_{表土}$=1:1)的混合基质中成活率较高,若管理得当成活率可达84.0%.

关键词:菊叶薯蓣;离体快繁;带节茎段
中图分类号:S 53.043　　**文献标识码**:A

自20世纪50年代甾体激素类药物问世以来,甾体激素药就像抗生素、维生素、磺胺类药物一样发展迅速,该类药物的重要地位可以与抗生素类药物相提并论[1].世界上的大部分国家都进行从植物中寻找甾体皂苷配基原料的研究,通过对上万种植物的筛选,发现从薯蓣科植物中提取薯蓣皂素是最理想的[2-4].墨西哥菊叶薯蓣(*Dioscorea composita* Hemsl.)原产于墨西哥,是多年生缠绕性藤状草本植物,具有薯块产量和薯蓣皂素含量都高的优点[5],种植2~3年的菊叶薯蓣,其干块茎皂苷元含量一般可达3%~6%,而国内最好的栽培品种(盾叶薯蓣)的块茎皂苷元含量只有2%左右[6],因此,发展菊叶薯蓣的种植具有良好的前景.传统上,菊叶薯蓣的繁殖为种子繁殖和块茎繁殖[7],难以满足大规模生产的需要,而利用组织培养对菊叶薯蓣进行工厂化育苗,不但可以在较短的时间内获得大批量的遗传性状一致的且品质优良的种苗,而且还可以满足种植业的需要,因此,近年来,国内外的许多研究者对薯蓣植物的组织培养进行了研究[8],例如Viana A M等人(1989)[9]对菊叶薯蓣的胚进行了离体培养,以诱导愈伤组织产生植株;何惠英等人(2000)[10]以带芽茎段为材料,对菊叶薯蓣的组培快繁进行了初步研究;此后,唐德英等人(2003)[11]、李国林等人(2004)[12]都进行过这方面的研究,但还处于实验研究阶段,尚未大规模地应用于生产.鉴此,笔者亦对菊叶薯蓣组培快繁技术进行了比较详细的研究,现将结果报道如下.

1　材料和方法

1.1　材　料　墨西哥菊叶薯蓣的幼嫩茎段.

1.2　方　法

1.2.1　无菌外植体的制备　选取生长健壮的无病植株,除去叶子,切取新抽发的幼嫩茎段,先用洗洁剂溶液洗去表面的污物,然后用清水冲洗干净,放入烧杯中并置于超净工作台上,于无菌条件下把幼嫩茎段切成约3.0 cm的带节茎段,再用φ=75%的酒精消毒20~30 s,倒去酒精,接着用ρ=1 g·L^{-1}的升汞溶液浸泡10~12 min,无菌水冲洗5次后,用手术刀将幼嫩茎段切成约1.0 cm的带节茎段,最后用镊子将外植体基部向下插入初始培养基中进行培养.

1.2.2　培养条件　培养室温度为(25±2)℃,以日光灯为光源,光照强度为2 000~2 500 lx,每天光照10~12 h.

1.2.3　培养基制备方法　按组织培养的常规方法进行配制[13],所有的培养基均含有ρ=8 g·L^{-1}的卡

收稿日期:2006-10-09
作者简介:潘学峰(1963-),男,海南文昌人,海南大学生命科学与农学院高级实验师.

维普资讯 http://www.cqvip.com

拉胶和ρ =30 g·L^{-1}的蔗糖,pH值为5.8,培养基在装瓶后,于高温高压(121 ℃,0.14 MPa)下灭菌20 min,冷却备用.

1.2.4 培养基配方

1.2.4.1 初始培养基 本实验所采用的初始培养基为MS+6-BA0.5 mg·L^{-1},在新芽被诱导萌发后,才转至增殖培养基进行增殖培养.

1.2.4.2 不同基本培养基对菊叶薯蓣节段增殖的影响 本实验选取无机盐浓度不同的4种基本培养基(MS,B_5,N_6和H)进行比较,以便从中选出较适宜于菊叶薯蓣组培快繁的基本培养基,实验设置4个处理组合,每个处理接5瓶,重复3次,每瓶接5~7个芽.每种基本培养基都添加6-BA2.0 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}的激素配比,40 d后观察各基本培养基中芽的增殖情况,统计芽的增殖数目,记录芽的生长情况,并进行方差分析.

1.2.4.3 不同的细胞分裂素对丛芽诱导分化的影响 以MS为基本培养基,附加NAA0.1 mg·L^{-1},选取BA,ZT,KT 3种细胞分裂素进行比较试验,质量浓度均为2.0 mg·L^{-1},共3个处理组合,3次重复,每个处理接种30~40个芽,30 d后观察在添加不同细胞分裂素情况下的芽增殖情况.

1.2.4.4 不同激素配比对丛生芽增殖的影响 在选出最适基本培养基的基础上,以ρ =0.05 mg·L^{-1}的NAA和质量浓度分别为0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 mg·L^{-1}的6-BA,设计10个处理组合,外植体以单芽接入,每处理接种30~40个芽,3次重复,40 d后观察芽的增殖情况,并统计芽的增殖数目和观察芽体的生长状况.

1.2.4.5 不同天然附加物对培养效果的影响 在基本培养基和激素配比相同的条件下,选取椰子水、香蕉匀浆、马铃薯汁3种不同附加物[椰子水(φ =10%);香蕉(ρ =0.1 mg·L^{-1}),用搅拌机将其打成匀浆加入培养基;马铃薯(ρ =0.1 mg·L^{-1}),将其去皮切成小块,加水煮沸20 min,过滤取汁,然后加入培养基]进行比较试验,同时,设置对照(即没有附加物的培养基),共4个处理组合,3次重复,每处理接种30~40个芽,30 d后观察芽的增殖情况.

1.2.4.6 生根培养基 以1/2MS为基本培养基,并添加质量浓度分别为0,0.5,1.0,2.0 mg·L^{-1}的IBA,共4个处理组合,每处理接种30~40株芽苗(选健壮无根苗接种),30 d后统计生根率与发根数,并观察根的生长情况.

1.2.5 试管苗的移栽 试管苗移栽时,先将培养瓶移出培养室,于室温下放置2~3 d,再将瓶盖去掉,在室温下继续炼苗2~3 d,然后小心取出试管苗,洗净根上附着的培养基,移栽到河沙与表土($V_{河沙}$:$V_{表土}$ = 1:1)的混合基质中,25 d后调查成活率.

2 结果与分析

2.1 无菌材料的获得及芽的诱导 将菊叶薯蓣幼嫩茎段在初始培养基上进行诱导培养,14 d后开始萌发出小芽,3个星期后大多数芽抽出,30 d后生长好的外植体已萌发出3~4个新芽(见图版1),而差的仅萌发出一个芽点,萌发出新芽的即可转入增殖培养基进行增殖培养.

2.2 带节茎段的增殖

2.2.1 不同基本培养基对节段增殖的影响 将在初始培养基中诱导出新芽的带节茎段分别接种到MS,N_6,B_5,H 4种培养基上进行增殖,40 d后观察芽的增殖情况,结果见表1.

表1 不同基本培养基对芽增殖的影响

培养基	重复			平均增殖倍数/倍	差异显著性		芽的生长状况
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ		0.05	0.01	
MS	2.3	2.3	2.1	2.2	a	A	长势良好,芽体健壮
B_5	1.8	1.7	1.6	1.7	b	B	长势一般,芽体健壮
N_6	1.5	1.6	1.7	1.6	b	BC	长势稍弱,芽体纤细
H	1.3	1.4	1.3	1.3	c	C	长势弱,芽体较细

注:激素配比均为:6-BA2.0 mg·L^{-1}+NAA0.1 mg·L^{-1};处理间F =41.62 > $F_{0.01}$ =5.29,相同小写字母为差异不显著,不同小写字母为差异显著;相同大写字母为差异不显著,不同大写字母为差异极显著,以下与此相同.

维普资讯 http://www.cqvip.com

从表1可以看出,不同的基本培养基对芽的增殖效果影响不同,以MS为基本培养基的增殖效果最好,平均增殖倍数最高,可达2.2倍,芽的长势也最好;其次是B_5和N_6,平均增殖倍数分别为1.7倍和1.6倍;增殖效果较差的是H培养基,平均增殖倍数仅为1.3倍.对所得数据进行方差分析,结果表明:MS与B_5,N_6,H的差异都达到极显著水平;B_5与N_6的差异不显著,B_5,N_6与H的差异显著,但达不到极显著水平.由此可见,MS基本培养基较有利于菊叶薯蓣带节茎段的增殖.

2.2.2 不同细胞分裂素对丛芽诱导的影响 为了选出较适宜于菊叶薯蓣组培苗诱导增殖的细胞分裂素,本实验以MS为基本培养基,NAA的质量浓度为0.1 mg·L^{-1},对ZT, BA, KT 3种细胞分裂素(质量浓度均为2.0 mg·L^{-1})进行比较试验,40 d后的观察结果见表2.

表2 不同细胞分裂素对诱导丛芽的影响

细胞分裂素	重复 Ⅰ	重复 Ⅱ	重复 Ⅲ	平均增殖倍数/倍	差异显著性 0.05	差异显著性 0.01	丛芽的生长状况
ZT	2.4	2.5	2.5	2.5	a	A	长势良好,芽体健壮
BA	2.3	2.3	2.1	2.2	a	A	长势良好,芽体健壮
KT	1.7	1.7	1.6	1.7	b	B	长势一般,芽体细

注:处理间 $F = 76.17 > F_{0.01} = 6.93$

从表2可以看出,3种细胞分裂素均能诱导出丛芽,ZT的增殖效果最好,平均增殖倍数达2.5倍,丛芽长势好,芽体健壮;其次为BA,平均增殖倍数为2.2倍;KT的增殖效果较差,平均增殖倍数仅为1.7倍.对所得的数据经统计后进行方差分析,结果表明:ZT和BA与KT的差异均达极显著水平,但ZT与BA的差异却不显著.因此,综合考虑,尽管ZT的增殖效果最好(ZT的增殖效果比BA略好),但是其成本却比BA高得多,从商业生产的角度来考虑,它不适合于在大规模的商业生产中使用,相比之下,BA则更适合于在大规模的商业生产中使用.

2.2.3 不同激素配比对丛芽增殖的影响 为了筛选出较适宜于菊叶薯蓣丛芽增殖的激素配比,笔者以MS为基本培养基,同时添加ρ =0.1 mg·L^{-1}的NAA,并以10个质量浓度分别为0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 mg·L^{-1}的6-BA进行比较实验,40 d后观察芽的增殖情况,并对所得数据进行统计分析,结果见表3.

表3 不同激素配比对增殖率的影响

6-BA的质量浓度/(mg·L^{-1})	平均增殖倍数/倍	差异显著性 0.05	差异显著性 0.01	芽苗状况
0.5	1.4	j	H	芽色淡绿,芽体纤细
1.0	1.7	h	G	芽色淡绿,芽体较细
1.5	1.7	h	G	芽色淡绿,芽体较细
2.0	2.2	f	E	芽色浓绿,芽体健壮
2.5	2.5	d	D	芽色浓绿,芽体健壮
3.0	3.3	a	A	芽色鲜绿,芽体健壮
3.5	3.1	b	B	芽色浓绿,芽体健壮
4.0	2.7	c	C	芽色浓绿,芽体短壮
4.5	2.4	e	D	芽色浓绿,芽体短粗
5.0	2.0	g	F	芽色浓绿,芽体短粗

注:以MS为基本培养基,每个处理均添加ρ =0.1 mg·L^{-1}的NAA,处理间 $F = 325.17 > F_{0.01} = 3.46$.

从表3可以看出,在ρ_{6-BA} =0.5 ~3.0 mg·L^{-1}的范围内,随着6-BA质量浓度的增大,增殖的倍数不断提高;而当6-BA的质量浓度在3.5~5.0 mg·L^{-1}的范围时,随着质量浓度的增高,新增的芽数不断减少,增殖倍数不断降低.可见,6-BA为3.0 mg·L^{-1}时的增殖倍数最大,且与其他质量浓度的差异均达极显著水平,而且芽苗健壮(见图版2);但过高的6-BA质量浓度(大于3.0 mg·L^{-1})会抑制菊叶薯蓣芽的发生,并使芽苗出现不同程度的粗矮、节短等不良的生长现象,造成这种现象的原因可能是:细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

分裂素浓度过高会抑制芽的发生,使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小,致使已形成的芽不能萌发生长,节间极度缩短[14];此外,过高的BA浓度会刺激多酚氧化活性提高[15],增强酚类物质氧化成醌类物质的能力,而醌类物质对培养物有毒害作用,可造成培养基褐化,从而影响增殖效果. 唐德英等人(2003)[11]和李国林等人(2004)[12]都认为6-BA的质量浓度为2.0 mg·L^{-1}时的丛芽增殖效果最好,但笔者的实验却表明:在ρ_{NAA}=0.1 mg·L^{-1}时,较适宜于菊叶薯蓣丛芽增殖的6-BA的质量浓度为3.0 mg·L^{-1};实验结果之所以有差异,这可能与他们所设计的6-BA的质量浓度梯度不够有关,也可能是与不同的研究者所选择的供试菊叶薯蓣存在着品系差异有关.

2.2.4 不同天然附加物对培养效果的影响 将萌发出新芽的茎段切成带一个芽的小段,分别接入添加椰子水、马铃薯汁、香蕉匀浆的培养基中进行增殖培养,40 d后观察芽的增殖情况,结果见表4.

表4 不同附加物对培养效果的影响

附加物	重复			平均增殖倍数/倍	差异显著性		芽苗状况
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ		0.05	0.01	
椰子水	3.8	3.9	3.9	3.9	a	A	芽体健壮,色鲜绿
马铃薯汁	3.5	3.6	3.5	3.6	b	B	芽体健壮,色鲜绿
香蕉匀浆	3.4	3.5	3.5	3.5	b	B	芽体健壮,色鲜绿
对照	3.1	3.2	3.2	3.2	c	C	芽体细,色淡绿

注:以MS为基本培养基,激素配比均为6-BA3.0 mg·L^{-1}+NAA0.1 mg·L^{-1},处理间$F=74.25>F_{0.01}=7.59$.

从表4可以看出,不同天然附加物对菊叶薯蓣带节茎段的增殖效果的影响不同,椰子水是一种天然有机物,它含有丰富的氨基酸、矿物质、维生素和碳水化合物,这些物质具有促进培养物生长的作用,在添加椰子水的培养基中,其增殖效果最好,芽苗生长健壮,芽色鲜绿,褐化现象少,增殖倍数最高,达3.9倍,它与其他处理的差异均达极显著水平,唐德英等人[11]亦报道:没有添加椰子水的培养基,其增殖系数只有2~3倍;马铃薯汁和香蕉匀浆的增殖效果相当,差异不显著,芽的长势一般,芽色浓绿;对照处理的增殖芽数明显比添加了附加物的培养基的增殖芽数少,其增殖倍数较低,且芽体较细,芽色淡绿.

2.3 生根培养 当试管苗长出1~2片叶时,将带叶芽苗剪下,转入生根培养基中,10 d左右便开始陆续有根长出,25 d后观察其生根情况,结果见表5.

表5 不同IBA质量浓度对试管苗生根的影响

IBA质量浓度/(mg·L^{-1})	调查株数/株	生根株数/株	生根率/%	备注
0	35	10	28.6	根少,大多1条
0.5	28	23	82.1	根细,大多1条
1.0	25	22	88.0	根健壮,2~3条
2.0	32	29	90.6	根粗壮,2~3条

注:基本培养基均为1/2MS

从表5可以看出,各个质量浓度的IBA都能诱导薯蓣无根苗生根(见图版3),在所试的质量浓度范围内,随着IBA质量浓度的不断增高,菊叶薯蓣试管苗的生根率也不断提高,当IBA质量浓度为2.0 mg·L^{-1}时,生根率最高,可达90.6%,根数也多,比李国林等人(2004)[12]利用NAA诱导试管苗生根的效果好(生根率为71%);在没有添加IBA的情况下,虽然也能诱导生根,但生根的效果较差,生根率低,仅为28.6%;至于IBA的质量浓度高于2.0 mg·L^{-1}时是否能更好地促进菊叶薯蓣试管苗生根,这还有待于研究. 然而,本实验表明:菊叶薯蓣较适宜的生根培养基是1/2MS+IBA2.0 mg·L^{-1}.

2.4 试管苗的出瓶移栽 当试管苗长出2~3条根时即可出瓶移栽,为了提高成活率,移栽前应进行炼苗. 首先应将试管苗从培养室移到明亮通风的常温炼苗室中,起初以密封的状态炼苗2 d,接着再打开瓶盖炼苗2~3 d,然后从瓶中取出试管苗,用清水洗净粘附在其根系上的琼脂,以免琼脂发霉而引起根部腐烂,接着置于1 000倍的高锰酸钾溶液中浸泡10 min,清水洗净,最后移栽到消过毒的河沙与表土($V_{河沙}:V_{表土}=1:1$)的混合基质上,浇足定根水,置于荫蔽度为80%的荫棚中. 菊叶薯蓣原产于墨西哥

维普资讯 http://www.cqvip.com

热带地区,喜温暖湿润,最适的生长温度为25~30 ℃[16]. 因此移栽后应置于阴凉通风处,并保持环境温度在25~30 ℃,移栽初期还应防止阳光直射,每天应喷清水2~3次,环境湿度不宜过大,但也不能太干,一般保持在70%左右为宜. 菊叶薯蓣适宜在疏松、通透性良好、保水性能良好的土壤栽培,所以,应选择通透性好的河沙与肥沃的、保水保肥性好的表土的混合土作为移栽基质. 若精心管理,25 d后成活率可达84.0%,并能长出1~2片新叶. 试管苗移栽成活后(见图版4),每7 d喷1次1/2MS无机盐类营养液,可加速其生长.

1. 瓶中增殖的丛生芽; 2. 丛生芽; 3. 瓶中生根的试管苗; 4. 移栽成活的试管苗

图版说明

3 结　论

3.1　试验表明,较适宜于菊叶薯蓣组培快繁的基本培养基为MS培养基,在MS,B_5,N_6,H 4种基本培养基的比较试验中,MS对菊叶薯蓣丛芽的诱导和增殖效果最好.

3.2　带节茎段在MS + BA0.5 mg · L^{-1} + NAA0.1 mg · L^{-1}的培养基上,可诱导腋芽萌发.

3.3　增殖阶段以6 - BA3.0 mg · L^{-1} + NAA0.1 mg · L^{-1}的效果为好,在此基础上添加φ = 10%的椰子水效果更好,增殖倍数可达3.9倍,且芽苗生长健壮,芽色鲜绿.

3.4　在生根培养阶段中,质量浓度为2.0 mg · L^{-1}的IBA不仅能提高生根率(可达90.6%),而且根系生长良好,根长而壮,根数多,植株长势好,有利于后期的炼苗移栽.

3.5　唐德英等人[11]发现:菊叶薯蓣继代繁殖超过10代时,其节段萌发率及增殖率都明显降低,苗表现出肥胖、粗矮、节少的现象,有的甚至会出现2~3个丛芽,这些丛芽因茎尖卷缩而很难生长. 本实验也发现

维普资讯 http://www.cqvip.com

类似的现象,为了减少菊叶薯蓣组培苗的变异,保证组培苗的质量,笔者建议:菊叶薯蓣节段继代到8~9代时,即可出瓶移栽.

3.6 菊叶薯蓣原产于热带地区,它喜好温暖湿润的气候,因此试管苗的移栽基质应以疏松透气、水分保持和养分供应良好的材料为佳,唐德英等人采用土壤与珍珠岩($V_{土壤}:V_{珍珠岩}=1:3$)的混合土作为移栽基质,成活率可达60%~80%[11],而笔者所采用的来源方便的河沙与肥沃、疏松的表土($V_{河沙}:V_{表土}=1:1$)的混合土作为移栽基质,在精心管理下成活率也可达84.0%.

参考文献:

[1] 韩应许.天然甾体原料概况[J].东药科技,1983,5:1-3.

[2] 宋发军.甾体药物源植物薯蓣植物中薯蓣皂苷元的研究及生产状况[J].中草药,2003,33(3):89-93.

[3] 聂凌鸿,林淑英,宁正祥.薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究进展[J].中国生化药物杂志,2004,20(5):318-320.

[4] 何娟,何文辉,王明霞,等.薯蓣皂苷的药理作用[J].河北医药,2004,20(1):3-5.

[5] 丁志遵.中国薯蓣科新分类群[J].植物分类学报,1982,20(2):205-209.

[6] 谭林彩.菊叶薯蓣推广种植的市场预测[J].中国农技推广,2004,19(2):50.

[7] 李鹄鸣,张晓蓉,王菊凤.我国薯蓣属植物基础研究进展[J].经济林研究,1999,17(2):43-45.

[8] 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.

[9] VIANA A M, MANTELL S H. Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl and *D. cayenensis* Lam [J]. Plant Cell Tiss. Ory. Cut. ,1989,16:113-122.

[10] 何惠英,兰芹英,张艳军.菊叶薯蓣的组织培养[J].植物生理学通讯,2000,36(4):337-338.

[11] 唐德英,王云强,李学兰,等.菊叶薯蓣组织培养及快速繁殖[J].热带农业科技,2003,26(1):16-18.

[12] 李国林,杜晓英,付艳华.菊叶薯蓣的快速繁殖研究[J].氨基酸和微生物资源,2004,26(4):20-22.

[13] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996: 34-37.

[14] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:34-35.

[15] 潭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991:60-65.

[16] 谭林彩,赵彦华.菊叶薯蓣栽培技术[J].中国农技推广,2004,19(6):40.

A Study on Fast Propagation of *Dicorea Composite* Hemsl.

PAN Xue-feng, WANG Xiao-xing

(College of Life Science and Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: This paper reported the experimental results of the fast propagation of *Dicorea composita* Hemsl. (DCH). The experimental results were found as the followings: 1). The suitable basic medium for the tissue culture of DCH was MS medium; 2). The young shoots could be introduced from the young stem segments of DCH cultured on the MS medium supplemented with 0.5 mg · L^{-1} 6-BA; 3). A fairly good proliferation results were obtained on the MS medium supplemented with 3.0 mg · L^{-1} 6-BA and 0.1mg · L^{-1} NAA. On the base of this proliferation medium, a better proliferation effect were obtained in the medium supplemented with 10% coconut water (CW), on which the propagation coefficient amounted to 3.9 times as before ; 4). A good rooting effect was found in the 1/2 MS medium supplemented with 2.0 mg · L^{-1}, on which the rooting rate amounted 90.6%, and the plantlets grew vigorously; 5). A fairly high survive percentage of the plantlets were found in a transplanting substrate mixed river sand with surface soil. With the suitable management measures, the survive percentage of the plantlets could amounted to 84.0%.

Key words: *Dicorea composita* Hemsl. ; fast propagation; stem segment with node