

## 盾叶薯蓣的快速繁殖研究

杨琳 苏鸿雁

(大理学院, 云南 大理 671000)

**摘要:**以成熟叶片、块茎为外植体, 建立一套盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 的快速繁殖技术, 筛选出适合盾叶薯蓣组培各阶段的适宜激素浓度和配比, 分别为: 盾叶薯蓣块茎、叶片适宜的愈伤组织诱导培养基宜采用 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 1.0mg/L; 不定芽诱导培养基为 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.2mg/L; 增殖培养基为 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.1mg/L; 生根培养基为 1/2MS + IBA 2.0 mg/L。在适宜遮荫的沙土苗盘中, 试管苗移栽成活率很高。在相同的激素配比下盾叶薯蓣块茎愈伤组织的诱导率比成熟叶片的愈伤组织诱导低。

**关键词:**盾叶薯蓣; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:** Q943.1 **文章标识码:** A **文章编号:** 1671 - 7406 (2006) 09 - 0059 - 06

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 又名苦良姜、穿山龙、火头根、火藤根等, 系薯蓣科多年生草质藤本作物, 生于山坡林内、灌木丛或沟边, 以块茎入药。为我国特有种, 是迄今为止所发现的皂素含量最高的植物药源种之一。苦良姜的地下根状茎 (块茎) 内含有薯蓣皂甙等多种甾体皂甙, 是生产激素药品的主要原料, 常用于抗癌、抗衰老、避孕和治疗多种疾病的常用药, 而且以发展到畜牧业和日用化妆品中应用。其中的皂素是合成可的松、强的松、泼的松、黄体酮、性激素的重要原料, 可加工生产激素类药物 5 大系列 180 多种, 是一种用途广泛的医药化工原料, 素有“药用黄金”之称。

目前, 我州在漾濞、弥渡、南涧等县推广苦良姜的种植及深加工, 取得了一定的成效。同时还存在着一些的问题: 第一, 目前生产所用苦良姜种块茎所含皂甙量较低; 第二, 优良苦良姜块茎供不应求; 第三, 优良块茎需从省外购进, 导致成本过高; 第四, 苦良姜若长期采用营养繁殖, 使病虫害、病毒日益严重而影响苦良姜的品质。针对以上问题, 我们于 2003 年开始研究盾叶薯蓣的组培快速繁殖方法, 植物组织培养技术是快速繁殖植物的有效方法, 一些有重要经济价值的薯蓣属植物的组织培养已有报道, 人们不仅可以通过茎段、叶片培养方法快速繁殖这些薯蓣的优良单株, 并且可以通过分生组织培养获得无病毒植株, 有些薯蓣还可以在离体条件下形成微型块茎, 但盾叶薯蓣块茎组织培养技术的报道甚少。组织培养技术在优质苦良姜上的应用将会大大提高优质品种的繁殖速度, 并可获得无毒苗,

**收稿日期:** 2006 - 03 - 12

**作者简介:** 杨琳 (1974—), 女, 大理学院生命科学与化学学院讲师, 从事植物生理与植物学教学与研究。

缓解优良苦良姜种的供求矛盾, 产生巨大的社会及经济效益。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大理地区种植的优良品种盾叶薯蓣植株。

### 1.2 外植体消毒和培养

块茎、叶用自来水冲洗 60 min, 切去外围组织, 移至超净工作台将外植体切成小块, 在无菌条件下用 70% 乙醇灭菌 30s, 后用 0.1% 的升汞浸泡 8—10min, 用无菌水冲洗 5—6 遍, 切成 0.5cm<sup>3</sup>左右的小块分别接种于不同的愈伤组织培养基上。50d 后将愈伤组织切成约 0.5cm × 1.0cm 的小块, 随机转接到不定芽诱导培养基上; 60d 后将高 1.0cm 以上的不定芽转到不定芽诱导培养基上以便形成更多的不定芽。

### 1.3 培养基和培养条件

#### 1.3.1 培养基

以 MS 培养基为基本培养基, 愈伤组织诱导培养基中添加 1.0—5.0 mg/L 6-BA 和 0.0—2.0 mg/L NAA (见表 1、表 2); 不定芽诱导培养基中添加不同浓度的 2.0—5.0 mg/L 和 0.2—0.5 mg/L NAA (见表 3); 芽增殖培养基中添加 1.0—2.0mg/L BA 和 0.0—0.2mg/L NAA (见表 4); 生根培养基中添加 0.0、1.0 和 2.0mg/L IBA。

块茎、叶片愈伤组织诱导培养基、不定芽诱导培养基、芽增殖培养基含糖量均为 30 g/L, 生根培养基中含糖量为 20 g/L; 所有培养基的琼脂浓度为 8.0g/L, 培养基 pH 值为 5.8—6.0。培养基在 121℃ 消毒 20min。

#### 1.3.2 培养条件

培养室温度为 25—28℃, 空气相对湿度为 40%—60%, 光照强度为 1500 lx, 辅助光照时间为 12—14h d<sup>-1</sup>。

### 1.4 组培苗的移栽

已生好根的试管苗移栽时, 先将瓶盖去掉, 在散射光下炼苗 5d, 然后小心取出试管苗, 洗去根上附着的培养基。用镊子夹住苗小心插到分别装有黄沙、腐殖土苗盘上, 一穴一苗, 遮荫盖膜保湿, 保持相对湿度在 80%—85%, 温度在 25℃ 左右, 每天喷水 2—3 次, 每隔 5—7d 喷 1 次 1/4MS 无机盐营养液。30d 后调查成活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 BA 和 NAA 对块茎、叶片存活和形成愈伤组织的影响

NAA 对于块茎的存活和愈伤组织的形成是必需的, 在无 NAA 的培养基上, 绝大部分块茎、叶片在培养过程中变褐、死亡, 不能形成愈伤组织, 提高培养基中 NAA 的浓度有利于块茎、叶片的存活和愈伤组织的形成; 当 NAA 浓度达到 1.0—2.0mg/L 时 80% 以上的叶块可以存活, 并形成愈伤组织, 在 2 个月的培养过程中, 有少数叶片分化出不定芽 (表 2); 但在相同的激素浓度下, 块茎的存活率和愈伤组织的形成率远远低于叶片, 并且不会分化出不定芽 (表 1)。

杨琳 苏鸿雁: 盾叶薯蓣的快速繁殖研究

表1 6-BA 和 NAA 对块茎存活和形成愈伤组织的影响

编号	激素组合 (mg/L)		外植体数目 (个)	外植体存活率 (%)	愈伤组织 形成率 (%)	不定芽形成率 (%)
	6-BA	NAA				
1	1.0	0	27	0	0	0
2	2.0	0	24	7.4	0	0
3	5.0	0	30	6.6	0	0
4	1.0	0.5	32	15.6	15.6	0
5	2.0	0.5	29	17.2	17.2	0
6	5.0	0.5	33	18.2	18.2	0
7	1.0	1.0	29	27.6	24.1	0
8	2.0	1.0	31	29.0	29.0	0
9	5.0	1.0	30	26.7	26.7	0
10	1.0	2.0	31	25.8	25.8	0
11	2.0	2.0	29	27.6	27.6	0
12	5.0	2.0	28	28.6	28.6	0

表2 6-BA 和 NAA 对叶片存活和形成愈伤组织的影响

编号	激素组合 (mg/L)		外植体数目 (个)	外植体存活率 (%)	愈伤组织 形成率 (%)	不定芽形成率 (%)
	6-BA	NAA				
1	1.0	0	27	7.4	0	0
2	2.0	0	30	10.0	0	0
3	5.0	0	29	6.9	0	0
4	1.0	0.5	29	65.5	65.5	0
5	2.0	0.5	27	66.7	66.7	7
6	5.0	0.5	29	72.4	72.4	10
7	1.0	1.0	29	82.8	79.3	0
8	2.0	1.0	30	86.7	86.7	0
9	5.0	1.0	28	85.7	85.7	0
10	1.0	2.0	30	83.3	83.3	0
11	2.0	2.0	30	86.7	86.7	0
12	5.0	2.0	29	89.7	89.7	0

## 2.2 不同激素浓度对不定芽诱导的影响

由于大部分块茎、叶块在愈伤组织诱导培养基上不能直接分化不定芽,有些诱导成功的愈伤组织还变褐、死亡(尤其是从块茎诱导出的愈伤组织)。因此将愈伤组织切成小块,转移到不定芽诱导培养基上。在不定芽诱导培养基上,叶片来源的愈伤组织生长良好,60%以上的愈伤组织在培养4周之后开始形成不定芽,形成不定芽的愈伤组织数随着培养时间

的延长而增加,但在 4 种培养基之间没有明显差异;块茎来源的愈伤组织生长状态较差,仅有 30% 左右的愈伤组织在培养 4 周后开始形成不定芽,并且生长较缓慢,在 4 种培养基之间亦没有明显差异。

表 3 不同激素浓度组合对不定芽诱导的影响

编 号	激素组合 (mg/L)		愈伤组织 形成率 (%)	不定芽形成率 (%)
	6-BA	NAA		
1	2.0	0.2	块茎	32.5
2	2.0	0.2	叶片	69.2
3	5.0	0.2	块茎	30.0
4	5.0	0.2	叶片	62.5
5	2.0	0.5	块茎	27.5
6	2.0	0.5	叶片	60.0
7	5.0	0.5	块茎	30.0
8	5.0	0.5	叶片	65.0

注:培养 40 天以后,40 块愈伤组织的统计结果。

### 2.3 不定芽的增殖

将株高为 1.0cm 以上的不定芽从愈伤组织上切割下来,接种至增殖培养基中,接种芽 5d 左右基部开始出现小芽,以后小芽迅速伸长生长,芽数量逐渐增多,30d 后统计有效芽数量。表 4 表明附加 BA2.0mg/L 与 NAA 0.1 mg/L 的培养基,月增殖达到了 670%,扩繁效果最好。实际应用经多次继代,该培养基都能保证旺盛增殖。

表 4 不同激素对继代培养芽增殖效果

编 号	激素组合 (mg/L)		接种芽数 (个)	培养后芽数 (个)	分化率 (%)
	6-BA	NAA			
1	1	0	20	58	290
2	1	0.1	20	106	530
3	1	0.2	20	73	365
4	2	0.1	20	134	670
5	2	0.2	20	89	445

### 2.4 不同激素诱导生根的效果

盾叶薯蓣的不定芽生根比较容易,在不附加任何激素的情况下,在 15 天内不定芽可以形成不定根,但生根缓慢且量少。待增殖培养基上的苗高 3—4cm 时转入生根培养基,1/2MS 附加 1.0mg/L—2.0mg/LIBA 对生根有明显的促进作用的情况下,接种 10d 后显露根原基,30d 后统计生根率为 100%,平均根数达到 5.3 条,根白净、粗壮,效果好于其他培养基。(见表 5)

杨琳 苏鸿雁：盾叶薯蓣的快速繁殖研究

表5 不同激素对生根培养的影响

编号	IBA (mg/L)	接种数 (株)	生根数 (株)	生根率 (%)	发根总数 (条)	平均发根数 (条/株)	生根状况	苗基部状况
1	无	36	6	16.7	9	0.25	极细长, 侧根少	少愈伤
2	1.0	36	36	100	149	4.1	较细长, 侧根多	少愈伤
3	2.0	36	36	100	192	5.3	较粗长, 侧根少	少愈伤

### 2.5 种移栽基质的比较

以沙土为基质的试管苗移栽 18d 左右, 开始陆续发生新根, 移栽 30d 后检查成活率达到 94.4%, 新根多且粗白, 地上部分茎叶也开始旺盛生长, 组培苗外观性状与母株一致。以腐殖土作基质, 试管苗移栽 30d 后成活率分别为 73.6%。说明黄沙效果最好, 实际生产中沙土也最经济。

表6 不同基质对试管苗成活的影响

基质	移栽 (株)	成活数 (株)	成活率 (%)	生长情况
黄沙	72	68	94.4	新根粗白, 茎叶生长旺盛
腐殖土	72	53	73.6	新根粗白, 茎叶生长一般

### 3 结论与讨论

本研究中, 我们采用盾叶薯蓣的块茎、成熟叶片也可以通过愈伤组织、不定芽途径高频率地形成植株, 具体过程总结如下: 优良单株选育→块茎、成熟叶片接种→愈伤组织诱导→芽诱导→继代培养→生根培养→炼苗→移栽。

盾叶薯蓣块茎、叶片适宜的愈伤组织诱导培养基宜采用 MS + 6 - BA 2.0mg/L + NAA1.0mg/L; 不定芽诱导培养基为 MS + 6 - BA 2.0mg/L + NAA0.2mg/L; 增殖培养基为 MS + 6 - BA2.0mg/L + NAA0.1mg/L; 生根培养基为 1/2MS + IBA2.0 mg/L; 在适宜遮荫的沙土苗盘中, 试管苗移栽成活率很高。

研究表明, 盾叶薯蓣块茎愈伤组织的诱导比成熟叶片的愈伤组织诱导困难得多, 诱导率较低; 而且诱导形成的愈伤组织生长缓慢, 诱导分化成苗困难; 这可能与外植体中所含的内源激素、化学成分及细胞分化程度有关; 通过实验我们可以得出进行盾叶薯蓣组培快繁最优良和经济的外植体为茎段和成熟叶片。

同茎段培养相比, 诱导盾叶薯蓣块茎、成熟叶片形成愈伤组织时, 需要较高浓度的 NAA, 但形成的愈伤组织在分化不定芽和不定芽生根等方面与茎段形成的愈伤组织差别不大。

盾叶薯蓣的离体快速繁殖体系的建立, 将会大大提高优质品种的繁殖速度, 并可获得无毒苗, 缓解优良苦苣姜种的供求矛盾, 产生巨大的社会及经济效益, 对大理州经济的发展有重要的意义。

**参考文献:**

- [1] 任建伟, 白云, 郭秋月. 盾叶薯蓣培养细胞的生长及薯蓣皂甙元产生的变化规律 [J]. 中草药, 1994, 25 (2): 93—94.
- [2] 谢碧霞, 何业华, 易志军. 盾叶薯蓣愈伤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.
- [3] 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.
- [4] 易志军. 盾叶薯蓣愈伤组织培养研究 [J]. 经济林研究, 2001, 9 (3): 21—22.
- [5] 徐向丽, 朱至清. 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.
- [6] 毕世荣, 张忠福, 苏成端. 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.
- [7] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 608—610.
- [8] 蒋琳, 陆仕华, 周正来. 不同激素配比对石刁柏愈伤组织诱导生长和多糖含量的影响 [J]. 上海农业学报, 1994, 10 (4): 89—92.
- [9] 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, 8 (4): 337—338.

(责任编辑 徐成东)

**Rapid Propagation of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright****Yang Lin, Su Hong - yan***(Department of Life Science and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)*

**Abstract:** To establish a protocol of rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright using mature leaves and stems tubers as explants. The concentration and the fill a prescription of the hormone were selected by the tissue culture. The result shows that the callus induction culture medium makes of MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA1. 0mg/L; the adventitious bud induction culture medium makes of MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA0. 2mg/L; the multiplication culture medium makes of MS + 6 - BA2.0 mg/L + NAA0. 1mg/L; the rooting culture medium makes of 1/2MS + IBA2. 0 mg/L. The regenerated plantlets grew vigorously after they were transplanted and the survival rate was up to 80% .

**Key words:** *Dioscorea zingiberensi* C. H. Wright; tissue culture; rapid clonal propagation