

盾叶薯蓣组培诱导分化试验研究

王 军, 张金莲, 李少峰, 董新玉, 孔宁忠

(大理州经济作物科学研究所, 云南 宾川 671600)

盾叶薯蓣也叫黄姜、黄根、火头根, 为薯蓣科(Dioscoreaceae)薯蓣属多年生藤本植物, 是生产甾体激素类药物的主要原料。生长在海拔500~1 870 m的河谷两岸或山坡石灰岩地带的稀疏灌木丛中, 分布范围小, 资源藏量少, 盾叶薯蓣薯蓣皂素含量高, 适应性强, 栽培性状好, 是栽培发展的优良种。大理州经作所从生物资源保护和开发利用的实际出发, 利用组织培养于2002年6月开展了薯蓣属植物的组织培养快繁技术研究, 经过3年来的试验研究, 已成功组培出了盾叶薯蓣植物, 并加大了示范推广力度, 为大理州及周边地区盾叶薯蓣的推广奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 外植体的选取

先采挖野生盾叶薯蓣块茎栽于温室大棚内, 待长出新茎蔓时开始取材, 材料要求不带病菌。

1.2 无菌培养的建立

用解剖剪去除茎蔓叶片, 剪成长2~4 cm的带节茎段(含茎尖)。在制备间用稀洗衣粉水洗涤, 放自来水下冲洗约半小时, 倒去自来水, 换上去离子水漂洗2~3次备用。在接种间进行外植体表面消毒处理, 预试3种消毒方法: (1) 用75%酒精溶液浸4秒, 再用无菌水冲洗3~4次后接种于培养基上; (2) 用75%酒精溶液浸30秒, 续用0.1%HgCl₂溶液浸8分钟, 再用无菌水冲洗3~4次后接种于培养基上; (3) 用0.1%HgCl₂溶液浸12分钟, 再用无菌水冲洗3~4次后接种于培养基上。

1.3 诱导分化培养基的设计

培养基为MS+激素组合+琼脂7 g/L+蔗糖30 g/L, pH=5.8。其中激素组合见表1, 共设A₁B₁~A₃B₃ 9个培养基配方组合。

1.4 培养条件及方式

把建立起来的愈伤组织(含不定芽)转接于培养

基MS+6-BA 1mg/L+NAA 0.1mg/L+蔗糖30 g/L (pH=5.8) 和MS+6-BA 1mg/L+NAA 0.1 mg/L+琼脂7 g/L+蔗糖30 g/L (pH=5.8) 中, 在2个光照培养箱(光强1 000~1 500 lux、温度24℃、光照9~10小时/天和光强2 000~2 500 lux、温度28℃、光照11~12小时/天)中培养3周后观察统计5瓶诱愈数的成功率。

表1 2种激素3种浓度试验组合

6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)		
	0.05(B ₁)	0.1(B ₂)	0.5(B ₃)
1(A ₁)	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃
3(A ₂)	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃
5(A ₃)	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃

2 结果与分析

2.1 外植体的选取及无菌培养的建立

将取回实验室的外植体洗净后, 在接种间超净工作台上用消毒剂处理, 接种于基本培养基上, 放培养间1周后观察, 结果消毒方法(2)的成活率高达60%, 方法(3)次之为46.7%, 方法(1)最少为33.3%。且3种消毒方法中, 发现新取外植体中部茎段和尖部茎段污染少, 但尖部茎段成活数少。由试验结果可知, 消毒材料要根据外植体幼嫩程度, 适当增减灭菌时间, 才能达到理想效果。

2.2 培养条件及方式

组培盾叶薯蓣茎节段成活与否受培养条件的影响。从试验结果可知, 液体静止培养由于气体交换更加受到限制, 茎节段成活率仅有25%, 而固体培养茎节段成活率55%, 可有效的进行愈伤组织诱导分化生长。当然, 为克服液体静止培养的限制, 可改用封口透气膜, 或减少液体浸没茎节段的深度等, 有待进一步研究。

培养方式(光强、温度、光照)对盾叶薯蓣诱愈(含不定芽)分化的影响不是很明显。试验证明,在培养间常规培养(光强1 000~2 000 lux、温度25±2℃,光照9~11小时/天)下,盾叶薯蓣诱愈(含不定芽)分化生长较好,与试验设定的2个光照培养箱培养分化差异不大。若光强过强(3 000 lux以上),温度过高(30℃以上),光照过长(12小时/天以上),愈伤组织

(含不定芽)颜色由浅绿色变成了淡黄色,会使诱愈生长逐渐停止分化。

2.3 诱导培养基的筛选

统计5瓶诱愈数(含不定芽)的平均值,见表2。

从试验结果可知,6-BA的3个水平浓度变化对盾叶薯蓣诱愈的影响比NAA 3个水平浓度变化影响效果明显。随着6-BA浓度的增加,诱愈数也随着增加;而

表2 试验结果统计分析

处理组合		诱芽数(个/瓶)			T _{AB}	X	差异显著性	
		I	II	III			5%	1%
A ₁	B ₁	5.4	6.2	5.8	17.4	5.8	cd	BC
	B ₂	5.4	5.2	5.9	16.5	5.5	d	BC
	B ₃	5.2	4.4	5.0	14.6	4.9	d	D
A ₂	B ₁	6.2	6.8	7.3	20.3	6.8	bc	ABC
	B ₂	5.3	6.2	5.0	16.5	5.5	d	BC
	B ₃	4.7	5.6	5.3	15.6	5.2	d	C
A ₃	B ₁	6.8	9.3	8.7	24.8	8.3	a	A
	B ₂	8.3	6.6	6.3	21.2	7.1	ab	AB
	B ₃	6.4	6.6	7.3	20.3	6.8	bc	ABC
T _r		53.7	56.9	56.6		T = 167.2		

注: $C=T^2/rab=1\ 035.401\ 481$

表3 试验中6-BA与NAA二因素试验的方差分析
(区组随机型、处理固定型)

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
区组间	2	0.69	0.35	0.69	3.63	6.23
处理间	8	28.75	3.40	6.67**	2.59	3.89
A	2	19.45	9.73	19.08**	3.63	6.23
B	2	8.39	4.20	8.24**	3.63	6.23
A × B	4	0.91	0.23	0.45	3.01	4.77
误差	16	8.22	0.51			
总变异	26	37.66				

随着NAA浓度的增加诱愈数减少。通过方差分析和进一步的SSR测验,6-BA和NAA二因素均达到显著差异,二因素互作差异不明显。A₃B₁处理诱愈数最多,平均值为8.3个/瓶,且诱导出的芽丛长势正常,无畸

形,便于继代增殖。在1%水平上,A₃B₁处理达极显著差异。

3 讨论

通过对盾叶薯蓣组培诱导分化试验研究,结果表明,用盾叶薯蓣蔓茎中部段为外植体,75%酒精45秒加0.1%HgCl₂8分钟作表面消毒剂处理,培养在光强1 000~2 000 lux、温度25±2℃、光照9~11小时/天的诱导分化培养基MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.05 mg/L+琼脂7 g/L+蔗糖30 g/L, pH=5.8中效果最佳。

参考文献:

- [1] 周瑾,李伯刚.药用薯蓣栽培[M].成都:四川科学技术出版社,2003.
- [2] 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.