

·文献综述·

盾叶薯蓣组织与细胞培养研究进展

彭菲,肖艳,刘军

(湖南中医药大学药学院,湖南长沙 410004)

[关键词] 盾叶薯蓣;组织培养;细胞培养;研究进展

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-5633(2006)04-0058-02

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright) 俗称黄姜,系薯蓣科薯蓣属多年生草质藤本,其野生资源根茎内薯蓣皂苷元(俗称皂素)含量在同属植物中较高,一般为1%~2%,据报道单株含量最高有16.5%^[1]。

解放后,因生态环境不断遭到破坏,加上人们对盾叶薯蓣掠夺性采挖,造成盾叶薯蓣野生资源日益减少。据统计我国现有的盾叶薯蓣野生资源蕴藏量为200万千克左右,而目前市场年需求量却高达2亿千克以上^[2]。虽然我国某些地区对盾叶薯蓣进行了人工栽培,但因品种退化导致体内皂素含量低,无法满足市场需要。而对盾叶薯蓣进行组织培养,建立一个成熟的快繁体系或者对盾叶薯蓣的细胞进行发酵培养,可以很大程度地提高皂素的来源,缓解目前皂素供需失衡。现对国内近年来盾叶薯蓣组织与细胞培养的实验研究进展综述如下。

1 盾叶薯蓣组织培养的研究

1.1 盾叶薯蓣组织培养条件的选择

1.1.1 盾叶薯蓣组织培养中外植体的选择 刘艳丽等^[3]以盾叶薯蓣的微块茎、幼芽、叶片、胚为外植体,发现微块茎和胚较易诱导愈伤组织,而叶片较难诱导愈伤组织。实验中,发现从田间取材的盾叶薯蓣外植体,带菌现象较严重,以5~6月份取材相对较好,而7月份取材带菌量则明显增多。

1.1.2 基本培养基对盾叶薯蓣组织培养的影响^[4-9] 研究表明:氮和高浓度的磷常可促进愈伤组织生长而抑制次生代谢物的产生,高浓度的蔗糖则可提高次生产物的含量。谢碧霞等^[4]以茎尖为材料,在LS、W、M9、B5、MS和改良的MS 6种培养基上培养,以改良的MS培养基的诱导率最高,其诱导产生的愈伤组织不易老化,并能较好地产生皂素。

1.1.3 激素对盾叶薯蓣愈伤组织的影响 不同外植体对激素的要求不一样。陈永勤等^[10]发现用盾叶薯蓣成熟叶片为材料诱导愈伤组织比茎段所需的NAA浓度要高,这可能与

外植体本身所含的激素有关。分化程度低的外植体其体内所含的激素高,脱分化只需添加低浓度的激素即可;分化程度高的外植体脱分化则需添加高浓度的生长素与细胞分裂素。此外不同品种的盾叶薯蓣对激素的反应也不一样。

1.2 盾叶薯蓣快速繁殖的成功途径

1.2.1 直接诱导不定芽途径 王慧等^[11]以顶芽和具节的幼茎为外植体,培养在芽分化培养基MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L上,32 d后新芽长成4~5 cm的芽苗。将芽苗从原茎段切成带腋芽的茎段,转接到芽繁殖培养基MS+BA 1~2 mg/L+IBA 0.2~0.8 mg/L上,20 d后叶腋处出现丛生芽,继续培养,丛生芽长成无根苗。将无根苗分成单株,接种到生根培养基1/2MS+NAA 0.5 mg/L上培养20 d,生根率达到90%以上。

1.2.2 愈伤组织分化不定芽途径 陈永勤等^[10]以盾叶薯蓣成熟叶片为外植体,以大量元素减半、蔗糖浓度为20.0 g/L的MS为基本培养基,激素浓度取BA 5.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L,将诱导出的愈伤组织切块,转移到不定芽诱导培养基(BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L)上35 d后,开始形成不定芽。小苗在IBA 2.0 mg/L的生根培养基上,15 d内生根率达到100%。唐君海等^[12]以盾叶薯蓣的嫩茎为材料,接种在MS+2,4-D 3.0 mg/L培养基上,25 d后,愈伤组织诱导率达100%。将愈伤组织切块转接到分化培养基BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L上培养30 d,分化率高达85.71%。将分化的丛生芽分开,转接到MS+NAA 0.2 mg/L+BA 2.0 mg/L培养基中进行壮苗培养。20 d后,将健壮丛生芽切成单株的无根苗转接到1/2MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 1.0 mg/L上进行生根培养。培养20 d,生根率可达100%。李涵等^[13]以盾叶薯蓣的茎段为外植体,接种在MS+2,4-D 2.0 mg/L+BA 0.5 mg/L培养基中,暗培养30 d后,愈伤组织诱导率为80%。将愈伤组织小块接种到MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的分化培养基上,20 d之后开始出现丛生芽。当丛生芽开始出现退化现象时,将它转移到MS+

[收稿日期] 2005-12-30

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(02JJY2033)。

[作者简介] 彭菲(1963-),女,湖南长沙人,教授,主要从事药用植物生物技术研究。

BA1.0 mg/L+NAA0.2 mg/L的继代培养基上继续培养。之后,再将继代材料转接到生根培养基 MS+NAA1.0 mg/L上,35 d后诱导出根。

1.2.3 微块茎繁殖途径 孟玲等^[10]用野生盾叶薯蓣发芽后的幼嫩部位为外植体,接种在培养基:B₅大量元素,MS微量元素,Fe盐,有机添加物,AgNO₃ 10 mg/L,BA 1mg/L,NAA 0.2 mg/L,KT 0.5 mg/L上。避光培养7 d后,周围膨大部位产生较硬的异形突起,再将其转移到光照培养条件下,10 d后突起的先端变绿,体积增加,继续培养长成新的无根苗。将无根苗移入1/2 MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L培养基上,约10 d后长出嫩根。徐向丽等^[11]将盾叶薯蓣无菌短枝接种在BA 4.0~8.0 mg/L+KT1.0~2.0 mg/L的培养基中,30 d后诱导出微块茎。继续培养,微块茎长出丛生芽。再将带有微块茎的无菌短枝扦插到MS+BA 0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L的培养基上,生根率达100%。笔者曾以盾叶薯蓣为材料进行快繁体系的研究:将盾叶薯蓣带节茎段接种于BM(B₅大量元素+MS微量元素、铁盐、有机物)+BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 10.0 mg/L的培养基中,12 d后,腋芽萌发长到2 cm长。将其切段接种于MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L上,愈伤组织诱导率可达60%。将愈伤组织转入MS+BA1.5 mg/L中继续培养,4周后,不定芽分化率可达90%以上。再将无根苗转接到1/2MS+NAA 1.0 mg/L中,30 d后,生根率可达100%。

2 盾叶薯蓣细胞培养的研究

李文谦等^[12]发现盾叶薯蓣细胞在培养基为MS+NAA0.2 mg/L+BA 0.5 mg/L,接种量为每瓶0.8~1.2 g的条件下,生长较好,并且测出盾叶薯蓣细胞生长曲线呈“S”型,得出继代时间为28 d较为合适的结论。毕世荣等^[13]发现柠檬酸能促进克隆细胞的生长,在培养基中添加2,4-D 1.0~2.0 mg/L和KT0.5~1.0 mg/L,对细胞生长和分裂都有较好的影响。在细胞悬浮培养中补充偶合低聚糖比补加葡萄糖对细胞生长分裂有更好的作用。薯蓣培养细胞容易褐变,在细胞连续培养中,及时补入新鲜的培养基是有效降低细胞褐变的途径。任建伟等^[14-16]发现MS(添加2,4-D1.0 mg/L,BA0.1 mg/L)或6,7-V(添加2,4-D1.0 mg/L,KT 0.1 mg/L和NAA1.0 mg/L)有利于薯蓣悬浮细胞皂素的生成,培养35 d后测得皂素产率为13.94 μg/L。对悬浮培养细胞固定化的初步研究表明,用3%海藻酸钠固定盾叶薯蓣悬浮细胞在MS+2,4-D 1.0 mg/L+BA 0.1 mg/L培养液中常温振荡培养较长时间后,固定化培养的细胞在培养约120 d后开始向培养液分泌皂素,测得其皂素浓度达到0.12 mg/100 mL,但维持时间短,且不能连续分泌。

3 小结

盾叶薯蓣为我国特有物种。目前,国内科研工作者已对盾叶薯蓣组织培养进行了大量的研究工作,且建立了较成熟的快繁体系。利用植物组织培养技术,结合现代分子生物学手段,对盾叶薯蓣品种进行改良,培育出高产的盾叶薯蓣新品种,并对其进行大面积的人工种植,能有效地改善目前皂素资源紧缺的现状。但对盾叶薯蓣细胞培养方面的研究,国内目前还处于初级阶段,人们还不能很清楚地了解盾叶薯蓣体内产生皂素的一些生理生化反应。因此要通过对盾叶薯蓣进行大规模细胞培养来产生皂素,还有大量的研究工作有待完成。

参考文献:

- [1] Ding Z Z, Tang S R, Qin H Z, et al. Resource plants of Steroid Hormone[M]. Beijing: Science Press, 1983.
- [2] 秦松云,丁季春,舒抒,等.中国盾叶薯蓣资源现状及保护对策[J].资源开发与市场,2004,20(4):263-265.
- [3] 刘艳丽,姚家玲,张友德.盾叶薯蓣愈伤组织诱导研究[J].华中农业大学学报,2004,23(4):389-392.
- [4] 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].中南林业学院学报,1999,19(4):17-21.
- [5] 易志军.盾叶薯蓣愈伤组织培养研究[J].经济林研究,2001,19(3):21-22.
- [6] 陈永勤,樊晋宇,易飞,等.盾叶薯蓣成熟叶片植株再生的研究[J].中国中药杂志,2004,29(2):129-132.
- [7] 王慧,唐雪松,叶琴.盾叶薯蓣的组织培养(摘编)[J].植物生理学通讯,2004,40(1):74.
- [8] 唐君海,蓝庆江,陆祖正,等.盾叶薯蓣的组织培养研究初报[J].广西热带农业,2004,92(3):7-9.
- [9] 李涵,吴福川,郑恩乡.盾叶薯蓣组织培养及四倍体诱导技术的初步研究[J].中国农业通报,2004,20(3):33-35.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 李文谦,袁丽红,顾永明,等.盾叶薯蓣细胞生长特征的研究[J].南京工业大学学报,2004,26(5):12-16.
- [13] 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,(4):1-6.
- [14] 任建伟,白云,郭秋月,等.盾叶薯蓣悬浮培养细胞固定化的初步研究[J].中国中药杂志,1994,19(9):529-531.
- [15] 任建伟,白云,郭秋月,等.盾叶薯蓣愈伤组织的诱导及培养[J].中国药理学杂志,1993,28(9):532-534.
- [16] 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.