维普资讯 http://www.cqvip.com

ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA 华北农学报·2007,22(增刊):189-192

穿龙薯蓣根的诱导和快繁及薯蓣皂苷元含量的测定

蒋玉宝,张素梅,于元杰

(山东农业大学 农学院,山东 泰安 271018)

摘要:以穿龙薯蓣的丛生芽为材料,对根的诱导及快速繁殖进行了研究,并利用反相高效液相色谱技术对根中薯蓣皂苷元含量进行了测定,结果如下:不添加任何激素的1/2MS培养基是诱导生根的最佳培养基,生根率最高达76.7%;MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+0.2~0.5 mg/L PP333为根增殖的最佳培养基,60 d时增殖倍数超过93;快繁过程中根的生长形态发生变化,不同类型的根中薯蓣皂苷元含量差异不显著,平均为0.21%

关键词:穿龙薯蓣;根;组织培养;薯蓣皂苷元

中图分类号:Q945 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-7091(2007)增刊-0189-04

Induction and Rapid Propagation of *Dioscorea nipponica* Makino' Root and Mensuration of Diosgenin' Content

JIANG Yu-bao, ZHANG Su-mei, YU Yuan-jie

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Induction and rapid propagation of *Dioscorea nipponica*, *China* root were studied using clustered shoots as material, meanwhile, contents of diosgenin in roots were determined by RP-HPLC, the results as follows: 1/2 MS medium with no hormones was furthest suitable for roots induction with induction rate of 76.7%; the best medium for root' propagation is MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA+0.2-0.5 mg/L PP333, and the proliferation time was more than 93 after 60 days; root' growth form changed during the course of rapid propagation, difference of diosgenin' content in different roots wasn't notability, and the average is 0.21%.

Key words: *Dioscorea nipponica* Makino; Root; Tissue culture; Diosgenin

穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino)为薯蓣科薯蓣属多年生缠绕草本植物,广泛分布于北亚热带及中亚热带地区。在我国,东北长白山区是其重要分布区和资源供应地之一。其根茎穿山龙的提取物穿山龙总皂苷主要含薯蓣皂苷(Dioscin)、尿囊素(Allantoin)等成分,是提取甾体皂苷元合成多种避孕药和甾体激素的重要原料[1,2]。近代研究,穿山龙有调节免疫、改善心血管功能、镇咳、祛痰、平喘等多种药理作用,治疗类风湿性关节炎、冠心病、心绞痛、慢性气管炎、慢性布鲁菌病、脂肪瘤等疗效较好。

穿山龙传统繁殖方式为种子繁殖和块茎繁殖。种子繁殖因种子饱满度差、空秕率高而难以解决大规模生产需要。块茎繁殖不仅要消耗大量的块茎,而且增殖速度和数量有限,也难以大规模推广。为了满足大规模生产育苗的需要,以及加快优良品种的推广,组织培养方法成为快速生产种苗的有力手段。诱导生根是建立再生体系的必要环节,也是生产种苗的关键步骤,只有诱导出健壮的根系才能保证组培苗顺利应用于生产。另外,根是穿龙薯蓣药用成分最丰富的部位,根的快速繁殖对于大规模生产薯蓣皂苷元有着重要的意义。

在穿龙薯蓣上,陈凤清等[3]利用微块茎建立了再生体系,罗凤霞[4]和李际红[5]利用不定芽进行了再生植株的研究,但关于穿龙薯蓣根的诱导和快繁的系统研究还未见报道。本试验探索了诱导及快速繁殖穿龙薯蓣根的最佳条件,并利用反相高效液相色谱对快繁后的根进行了薯蓣皂苷元含量的测定。

1 材料和方法

1.1 材料

继代3次的穿龙薯蓣丛生芽,取自本实验室;薯蓣皂苷元标准品(95%),购于美国Sigma公司,甲醇为色谱纯,其他均为分析纯。

收稿日期:2006-12-20

作者简介:蒋玉宝(1981-),男,山东曲阜人,在读硕士,主要从事生物技术在植物育种上的应用方面的研究

通讯作者:于元杰(1953-),男,山东莱州人,硕士生导师,教授,主要从事生物技术改良作物的理论和应用研究工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 方法

1.2.1 根的诱导和快速繁殖 根的诱导采用3因素3水平的正交设计[6],3个因素分别为NAA,IBA,活性炭(AC),其中NAA设0,0.2,0.5 mg/L 3个水平,IBA设0,0.5,1.0 mg/L 3个水平,AC设0,0.2%,0.4%3个水平。基本培养基采用1/2 MS培养基,30 d后调查组培根的诱导率及生长情况。

于超净工作台上取2~3条生长良好的根,准确称重后进行快繁试验,采用4因素3水平的正交设计,4个因素分别为基本培养基,NAA,IBA和PP333,基本培养基设1/4MS,1/2MS和MS,NAA设0,0.2 ,0.5 mg/L 3个水平,IBA设0,0.5,1.0 mg/L 3个水平,PP333设0.2,0.5,1.0 mg/L 3个水平。快繁60 d后将根取出,用水冲洗干净,凉干后称其鲜重。

以上所有培养基均加蔗糖30 mg/L,琼脂8.0 mg/L;培养条件:pH值为5.8,培养温度为25℃,光照强度为2 000 lx,光照时间为14 h/d。试验均重复3次,结果采用DPS2000件进行方差分析,并进行多重比较(对于百分数先进行反正弦处理)。

1.2.2 薯蓣皂苷元的提取及含量测定薯蓣皂苷元的提取[7,8] 将穿龙薯蓣鲜根洗净,烘干,用研钵将其磨碎,然后称取粉末约0.1 g,精密称取,置圆底烧瓶内,加入适量水解液(2 mol/L H_2SO_4),沸水浴回流提取8 h,冷却,用1%的NaOH中和至中性,抽滤后残渣在80℃下充分干燥。将干燥的残渣置索氏提取器的滤纸筒中,在提取器的底部加入适量石油醚(60~90℃),85℃水浴加热回流6 h左右,将提取液浓缩,待浓缩至剩余少量(约10 mL)时转至25 mL具塞试管中,将圆底烧瓶用新鲜石油醚冲洗后将洗涤液倒至试管中,继续浓缩至干。

薯蓣皂苷元的含量测定[9]:采用RP-HPLC法。色谱柱:Kromasil C-18柱(250×4.6 mm);柱温:室温;紫外检测波长:206 nm;流速:1.2 mL/min;流动相(V/V):甲醇:水=94:6。

2 结果与分析

2.1 根的诱导

将继代3次的丛生芽转接在诱导生根培养基上,10 d左右在多芽体上逐渐有白色的根出现,随后根的数目不断增加,有的根深入培养基向下生长,有的则平铺在培养基表面上生长,根变长加粗的同时,颜色也随着由白色变成褐色。继代30 d时调查各培养基上根的诱导率,诱导率(%)=生根芽数(个)/接入芽数(个)×100%,结果见表1。

表1 根的诱导试验结果

Tab.1 Results of experiment on induction of root

处理 Treatment	NAA/(mg/L)	IBA/(mg/L)	AC/%	接入芽数/个 Numbers of inducted-shoots	生根芽数/个 Numbers of rooted-shoots	诱导率/% Induction ratio
1	1(0)	1(0)	1(0)	20	15.3	76.7
2	1	2(0.5)	2(0.2)	20	2.7	13.3
3	1	3(1.0)	3(0.4)	20	4.3	21.7
4	2(0.2)	1	2	20	7.0	35.0
5	2	2	3	20	6.7	33.3
6	2	3	1	20	6.7	33.3
7	3(0.5)	1	3	20	4.7	23.3
8	3	2	1	20	8.7	43.3
9	3	3	2	20	4.3	21.7

表2 诱导率方差分析表

Tab.2 Variance analysis on ratio of induction

变异来源 Variance origion	自由度 Freedom	平方和 Sum of squares	方差 Mean quares	F值 F value	临界值 Critical value
NAA	2	83.30	41.65	5.35*	$F_{0.05}(2,18)$
IBA	2	714.45	357.22	45.90**	=3.55
AC	2	1622.09	811.04	104.22**	$F_{0.01}(2,18)$
误差 Error	18	140.08	7.78		=6.01

由表1可以看出,各培养基均能成功诱导出根,但不同处理间根诱导率有着较大差异,其中1号培养基的诱导率最高,达76.7%,其次为8号培养基,诱导率为43.3%,2号培养基的诱导率最低,只有13.3%。对诱导率进行方差分析,结果见表2。

由表2可见,NAA对诱导率的影响差异显著,IBA,AC对诱导率的影响差异极显著。进一步进行多重比较,结果见表3。由表3可见:对于NAA,浓度为0~0.2 mg/L诱导率差异不显著,但与0.5 mg/L之间差异显著,由此可见高浓度的NAA抑制根的生成;对IBA而言,浓度为0与0.5 mg/L及1.0 mg/L之间诱导率差异极显著,后两者之间差异不显著,可见添加IBA同样对生根不利;对AC来说,浓度0与0.4%及0.2%之间诱导率差异极显著,后两

维普资讯 http://www.cqvip.com

者之间差异不显著，可见 AC 的加入也会导致诱导率的下降。因此，经过正交试验我们得出对于继代多次的丛生芽，NAA，IBA 及 AC 对其生根不但没有促进作用，反而抑制了根的生成。另外，通过对不同培养基上根和苗的生长状况进行调查后发现，在 1 号培养基上长出的根生长速度快，根较粗壮，苗也生长旺盛，而在其他培养基上根较细，生长也较慢，苗比较弱且呈现出不同程度的黄叶。因此 1 号培养基(1/2MS)为最理想的生根培养基。

表 3 不同浓度的 NAA，IBA 和 AC 对诱导率的 LSR 检验

Tab.3 The LSR test of ratio of rooting with different concentration of NAA，IBA and AC

NAA/(mg/L)	平均数 Average	IBA/(mg/L)	平均数 Average	AC/%	平均数 Average
1(0)	36.76 a A	1(0)	42.10 a A	1(0)	45.85 a A
2(0.2)	35.55 a AB	2(0.5)	32.58 b B	3(0.4)	30.61 b B
3(0.5)	32.58 b B	3(1.0)	30.20 b B	2(0.2)	28.43 b B

注：小写字母代表 0.05 水平，大写字母代表 0.01 水平 Note：Lowercase means 0.05 level，majuscule means 0.05 level

2.2 根的快速繁殖及形态分化

2.2.1 根的快速繁殖 将根继代在含不同激素组合的快繁培养基上，大多数在 15 d 后开始有新根出现，随后新长出的根快速生长，60 d 时统计各处理的增殖倍数增殖倍数 =（快繁后根鲜重 - 快繁前根鲜重）/快繁前根鲜重(表 4)。

表 4 根的快繁试验结果

Tab.4 Results of experiment on rapid propagation of root

处理 Treatmeut	培养基 Media	NAA/(mg/L)	IBA /(mg/L)	PP333/(mg/L)	增殖倍数 Proliferation times
1	1(1/4MS)	1(0)	1(0)	1(0.2)	3.43
2	1	2(0.2)	2(0.5)	2(0.5)	93.12
3	1	3(0.5)	3(1.0)	3(1.0)	39.20
4	2(1/2MS)	1	2	3	13.53
5	2	2	3	1	45.05
6	2	3	1	2	22.24
7	3(MS)	1	3	2	14.44
8	3	2	1	3	58.60
9	3	3	2	1	79.00

由表 4 可以看出，不同培养基上根的增殖倍数差别较大，其中 2 号培养基上的增殖倍数最高，达 93.12，1 号培养基上的增殖倍数最低，仅 3.43，9 个处理的平均增殖倍数为 40.67。为了找到根快繁的最佳培养基，对增殖倍数进行方差分析和多重比较，结果见表 5 和表 6。

表 5 增殖倍数方差分析

Tab.5 Variance analysis on proliferation times

变异来源 Variance origion	自由度 Freedom	平方和 Sum of squares	方差 Mean quares	F 值 F value	临界值 Critical value
培养基 Media	2	2784.60	1392.30	990.22 * *	$F_{0.05}(2,18)=3.55$
NAA	2	14135.71	7067.86	5026.75 * *	
IBA	2	6017.06	3008.53	2139.70 * *	$F_{0.01}(2,18)=6.01$
PP333	2	202.59	101.29	72.04 * *	
误差 Error	18	25.31	1.41		

表 6 不同培养基及不同浓度的激素对增殖倍数的 LSR 检验

Tab.6 The LSR test of proliferation times with different culture medium and different concentration of hormones

基本培养基 Basic media	平均数 Average	NAA/ mg/L	平均数 Average	IBA/ (mg/L)	平均数 Average	PP333/ (mg/L)	平均数 Average
3(MS)	50.68aA	2(0.2)	65.59aA	2(0.5)	61.89aA	2(0.5)	43.27aA
1(1/4MS)	45.25bB	3(0.5)	46.81bB	3(1.0)	32.90bB	1(0.2)	42.50aA
2(1/2MS)	26.94cC	1(0)	10.47cC	1(0)	28.09cC	3(1.0)	37.11bB

由表 5 可以看出，基本培养基，NAA，IBA，PP333 对增殖倍数的影响均达到极显著水平。表 6 的多重比较表明：对于基本培养基，选用 MS 增殖倍数最高，其次为 1/4 MS，1/2 MS 最差，它们之间的差异达到极显著水平；对于 NAA，浓度为 0.2 mg/L 的增殖倍数极显著高于 0.5 mg/L，不添加 NAA 增殖倍数最低，可见 NAA 浓度过高或过低都会降低增殖倍数，所以在利用 NAA 时浓度要适中；IBA 对增殖倍数的影响和 NAA 相似，浓度适中(0.5 mg/L)对根的增殖最有利；对于 PP333，浓度为 0.5 mg/L 和 0.2 mg/L 对增殖倍数的影响差异不显著，但过高浓度(1.0 mg/L)会使增殖倍数极显著降低。由以上分析可以得出，根增殖的最佳培养基为 MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + 0.2 ~ 0.5 mg/L PP333。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.2 根的形态分化 在不同组合的培养基上根的形态特征也产生了较大差异。通过调查可以将在上述9种培养基上生长的根分为三类:第一类根包括1,4,7三种培养基上的根,这类根的特点是细长、柔软,颜色呈褐色或黑色,无根毛,生长具有向下性,增殖倍数低(平均增殖倍数仅10.47);第二类根括2,3,8,9四种培养基上的根,此类根的特点是粗壮、较硬,颜色呈淡黄色,根毛较多,平铺在培养基表面上生长,不具有向下性,增殖倍数高(平均增殖倍数为67.48),是第一类根的6.4倍;第三类根包括5,6两种培养基上的根,此类根为前两类根的中间型。结合各培养基的成分组合可以看出,第一类根所在培养基的特点是不含NAA,第二、三类根所在的培养基都含有NAA,由此可以得出NAA是影响根的生长特征的关键因子。

2.3 根中薯蓣皂苷元含量的测定

对扩繁后产生的三类根进行薯蓣皂苷元含量的测定,结果见表7。

表7 不同类型的根中薯蓣皂苷元的含量

Tab.7 Content of diosgenin in different roots

不同类型的根 Different type roots	根的重量/g Roots' weight	薯蓣皂苷元含量/% Diosgenin 'content
第一类根 First type root	0.103	0.21 a A
第二类根 Truice type root	0.103	0.22 a A
第三类根 Third type root	0.102	0.20 a A

由表7可以看出三类根中所含的薯蓣皂苷元含量差异不显著,平均为0.21%。因此,不同的激素组合只是对根的形态有影响,而对薯蓣皂苷元的含量没有影响。标准品(图1-A)和根中(图1-B)薯蓣皂苷元的色谱图见图2。

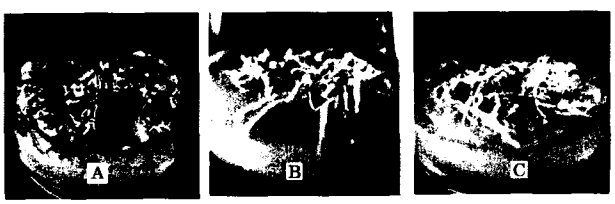

图1 三种不同类型的根

Fig.1 Three different types root

3 结论与讨论

在诱导生根的培养基中多采用NAA或IBA等激素来促进生根,本试验发现在穿龙薯蓣诱导生根的过程中,不添加任何激素反而效果更好,这可能是因为继代多次后的丛生芽自身已含有足够的内源激素来生根,添加外源激素反而使激素含量过高,从而抑制了根的生成。活性炭可以为生根创造暗环境,所以在其他植物的生根过程中多采用一定浓度的AC,但在穿龙薯蓣上发现不添加AC反而比添加AC的生根效果要好,一方面可能因为穿龙薯蓣的生根需要一定的光照才能完成,另一方面可能是因为AC的添加加大了培养基的硬度而导致生根受阻。

在药用植物上多通过利用发根农杆菌转化获得毛状根来实现药用成分的大规模生产,但由于穿龙薯蓣是单子叶植物,目前还没有转化成功的例子。本试验直接利用穿龙薯蓣的再生根实现了根的快速大量繁殖,虽然薯蓣皂苷元含量不高,但由于其较大的增殖倍数,理论年产量仍十分乐观,这为薯蓣皂苷元大规模生产提供了重要途径。

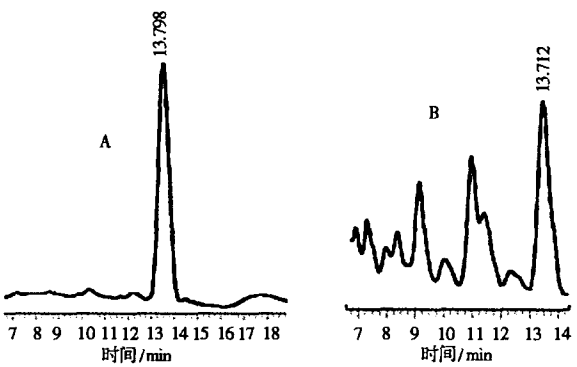

图2 薯蓣皂苷元色谱图

Fig.2 Chromatogram of diosgenin

穿龙薯蓣根在快繁过程中会产生形态上的差异,这与NAA的添加有重要的关系,究其原因,可能是因为NAA先使根愈伤化,改变了根原有的生长特征,愈伤化的根再大量增殖,从而表现出与原有的根形态上存在较大差异。

参考文献:

[1] Liu C L, Chen Y Y, Ge S B. Studies on the constituent from Dioscorea plants: Ⅱ. Isolation and identification of steroidal saponins from *Dioscorea collettii* Hook.f, [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1983, 18(8): 597-606.

[2] 刘铁城.穿龙薯蓣野生资源调查与人工栽培,药用植物引种驯化研究[M].北京:中国科学技术出版社,2000: 219-221.

[3] 陈凤清,付 杨,孙冬雪,等.穿龙薯蓣的微块茎离体诱导及再生植株的建立[J].东北师大学报(自然科学版),2005,37(4):90-93.

[4] 罗凤霞,祝朋芳,周广柱,等.穿龙薯蓣的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(3):329.

[5] 李际红,谢会成,许建农,等.穿山薯蓣不定芽的诱导与植株再生[J].山东农业大学学报,2005,36(1):82-85.

[6] 冷寿慈.生物统计与田间实验设计[M].北京:中国广播电视出版社,1992:156.

[7] 陈战国,耿 征,刘谦光,等.薯蓣皂苷元的分光光度法测定[J].分析化学,1996,24(2):227-229.

[8] 赵景婵,郭治安,成小飞,等.穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的高效液相色谱法测定[J].药物分析杂志,2000,20:(1) 27-29.

[9] 顾永明,袁丽红,李文谦,等.RP-HPLC法测定盾叶薯蓣细胞中薯蓣皂苷元的含量[J].天然产物研究与开发,2004,16(4):331-333.