

盾叶薯蓣试管株芽的诱导

彭晓英, 周朴华*, 张良波, 蒋道松, 刘衍芳

(湖南农业大学理学院, 长沙 410128)

摘要:以盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*) 试管植株为材料, 选取带芽茎段为外植体, 转接到株芽诱导培养基上 15 d 后, 原茎段基部开始产生株芽突起, 30 d 后每一茎段可产生 3-5 个已生根的株芽, 株芽诱导率为 100%, 株芽诱导数为 180 个/40 株, 其移栽成活率可达 90% 以上。株芽形成的适宜培养条件: 温度为 $26\pm 2^\circ\text{C}$, 光照时间 14 h d^{-1} , 光照强度为 1 500-2 000 lx; 适宜培养基组成为: MS + 6-BA 4.0 mg L^{-1} + IBA 1.0 mg L^{-1} + 蔗糖 6%-9% + 活性炭 0.5% + 琼脂 7%。离体诱导的盾叶薯蓣试管株芽能直接发育为新植株, 为盾叶薯蓣的快繁提供了一种新的方法。

关键词: 盾叶薯蓣; 药用植物; 株芽诱导; 组织培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0319-05

The Induction of Bulbils of *Dioscorea zingiberensis*

PENG Xiao-ying, ZHOU Pu-hua*, ZHANG Liang-bo, JIANG Dao-song, LIU Yan-fang

(College of Natural Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: An *in vitro* protocol for rapid propagation of medicinal plant *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright was optimized. Nodal segments with buds cultured obtained from vessels were used as explants which were then cultured on bulbil induction medium. The explants started to appear emergence from basal segments after 15 days. Three to five bulbils with roots developed from each segment were obtained after another 15 days. The optimal culture conditions for bulbil formation were $26\pm 2^\circ\text{C}$ at 1 500-2 000 lx illuminated for 14 hours per day on MS medium supplemented with 4.0 mg L^{-1} BA and 1.0 mg L^{-1} IBA in addition of 6%-9% sucrose, 0.5% active charcoal, and 7% agar. The bulbil induction rate was 100%, and the plantlet survival rate being above 90%.

Key words: *Dioscorea zingiberensis*; Medicinal plant; Bulbil induction; Tissue culture

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*) 俗称黄姜, 为我国特有的薯蓣科薯蓣属多年生草质藤本植物, 因其根状茎中含有较高含量的薯蓣皂苷而成为重要的药源植物。近年来, 盾叶薯蓣的人工驯化引种和离体培养快速繁殖^[1,2]的研究取得了较大的进展, 但仍存在驯化引种繁殖系数低且品质退化、试管苗的移栽成活率偏低等问题。诱导试管球茎^[3,4]和试管种薯^[5]的技术可能是一种好的解决方法。本实验室在建立盾叶薯蓣试管苗快速繁殖体系的基础上, 进行了试管株芽的诱导^[6,7], 同时就光照、温度等环境因素对盾叶薯蓣试管株芽诱导的影响进行初步研究, 以期对盾叶薯蓣试管株芽快繁体系进行优化。

1 材料和方法

材料及处理 湖南农业大学理学院细胞工程室培养的盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*) 试管植株。切取长度为 2.5-3.0 cm 的带芽茎段作为外植体, 分别以水平放置、茎尖朝上倾斜和垂直插入 3 种方式转接到株芽诱导培养基中。

试管株芽的诱导培养 将经过增殖培养获得的试管苗分别在不同的培养基中培养, 30 d 后统计诱导出试管株芽的茎段数及试管株芽数。每个处理接种 50 株试管苗, 分别设 3 个重复。各培养基中均加琼脂 7 g L^{-1} , pH5.8-6.0, 121°C 下高温灭菌 15 min。

收稿日期: 2004-11-15 接受日期: 2005-03-09

基金项目: 湖南省重点科技攻关项目 (BK0272)

* 通讯作者 Corresponding author

采用 50 或 100 ml 的三角瓶作为培养容器, 光照强度为 1 500–2 000 lx。1) 以 MS 培养基为基本培养基添加不同浓度的生长物质: 6-BA 的浓度设为 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mg L⁻¹, IBA 的浓度设为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg L⁻¹。2) 在最适激素搭配的培养基中添加蔗糖和白糖, 浓度分别设为 0, 3%, 6%, 9% 和 12%, 筛选最适合的糖浓度。3) 培养基中加入浓度为 0, 0.3%, 0.5%, 1%, 2%, 3% 的活性炭, 比较活性炭的添加对试管株芽诱导的影响。4) 培养温度和光照时间: 将试管苗放入培养箱中, 培养温度分别设为 16, 20, 24, 28 和 30℃, 光照时间分别设为 4, 8, 12, 14, 16 和 20 h d⁻¹。

试管株芽的移栽 将试管株芽根部的培养基洗净, 置于 MS 无激素培养基中或含蛭石、沙土等的混合培养基中, 在光照培养箱中培养诱导顶芽萌发, 比较不同培养基对顶芽诱导效果的影响。

2 结果和分析

2.1 试管株芽的诱导

带芽茎段竖插在诱导培养基上 15 d 后, 原有的茎段和叶片均枯黄、凋萎, 茎基部膨大成单个或多个各自独立的小株芽突起, 平均为 3–5 个, 小株芽由银白色鳞片状芽苞所包被, 基部陆续长出不定根。茎段在添加活性炭的最适培养基上培养 30 d 后, 株芽诱导率可达到 100%, 株芽诱导数为 180 个/40 株。

2.1.1 外植体的选取及接种方式的影响

竖插在培养基上的带顶芽茎段株芽诱导率高于斜插和横放的。斜插和横放的茎段只在各接触培养基的茎节处产生少量浅黄色愈伤组织; 以木质化

带芽茎段作为外植体诱导的株芽较幼嫩带芽茎段的多, 前者的株芽诱导速度快且长势较好, 后者诱导的多为愈伤组织或半愈伤化的株芽。这种差异可能与其植株内部营养物质的运输与分配和内源激素对株芽分化的调控有关。

2.1.2 激素组成对试管株芽形成和生根的影响

采用蔗糖浓度为 8% 的 MS 基本培养基, BA 的浓度设为 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mg L⁻¹, IBA 的浓度设为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg L⁻¹。从表 1 可见, BA 对试管株芽的形成有较大的促进作用, 且株芽的诱导数随 BA 浓度的增大而增加, 以 4.0–6.0 mg L⁻¹ 的 BA 诱导的试管株芽为最多, 当其浓度增加到 8.0 mg L⁻¹ 时, 试管株芽的诱导受到抑制。尽管 BA 为 6.0 mg L⁻¹ 时诱导的株芽数日最多, 最高可达到 210 个/40 株, 但其株芽诱导率稍低于 BA 浓度为 4.0 mg L⁻¹ 的, 且株芽体积较小、质量不高, 不适于移栽。IBA 的浓度为 1.0 mg L⁻¹ 时, 试管株芽的生根率可达到最高, 且生根速度最快。

2.1.3 糖浓度对试管株芽形成的影响

由图 1 可知, 糖浓度为 0 时, 茎基部不产生株芽突起, 只形成许多致密愈伤组织, 这表明蔗糖是试管株芽形成的必需物质。株芽的诱导数随糖浓度的增大而增多, 以 6%–9% 时为最佳浓度, 超过 9% 株芽诱导数开始呈下降趋势。本试验将食用白糖与分析纯蔗糖的诱导效果进行了比较, 结果表明, 二者对试管株芽的诱导效果相差不大(图 1)。从而提示我们在工厂化生产中, 可以直接用食用白糖替代蔗糖, 既不影响试管株芽的诱导, 又可降低生产成本。

表 1 激素组成对试管株芽形成的影响

Table 1 Effect of BA and IBA on bulbil formation

培养基代号 Medium No.	BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	诱导出株芽的试管苗数 No. of plantlets for bulbil induction	诱导的株芽个数 No. of bulbils induced	株芽诱导率% Bulbil induction rate	增殖倍数 Multiplication
1	2	0.5	32	90	80	2.81
2	4	0.5	38	152	95	4
3	6	0.5	38	185	95	4.87
4	8	0.5	35	140	87.5	4
5	2	1	30	80	75	2.67
6	4	1	40	176	100	4.4
7	6	1	39	210	97.5	5.38
8	8	1	35	160	87.5	4.57
9	2	1.5	29	73	72.5	2.52
10	4	1.5	39	150	97.5	5
11	6	1.5	39	167	87.5	4.28
12	8	1.5	30	152	75	5.07
13	2	2	20	50	50	2.5
14	4	2	38	155	95	4.08
15	6	2	39	189	97.5	4.85
16	8	2	30	150	75	4.33

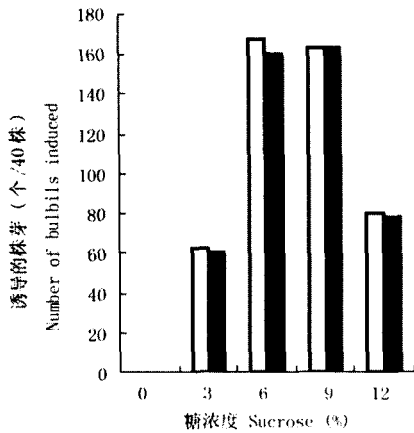


图 1 糖浓度对试管株芽诱导的影响

Fig. 1 Effect of sucrose on the induction of bulbils

□ 蔗糖 Pure sugar ■ 白糖 Common sugar

的诱导数不再增加,而略有下降。可见,试管株芽的诱导温度与其植株生长的最适温度一致,为 26±2℃。由图 4 可见,光照时间为 16 h·d⁻¹ 时诱导的株芽数最多,但株芽个体较小,不利于后期培养,而 14 h·d⁻¹ 光照培养诱导的株芽数为 162 个/40 株,且株芽个体发育较为饱满,故认为最适光照时间为 14 h·d⁻¹。

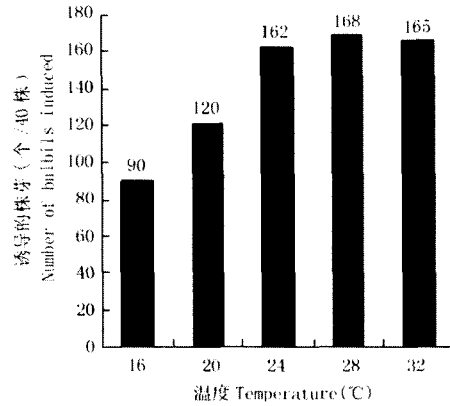


图 3 温度对试管株芽诱导的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the induction of bulbils

2.1.4 活性炭对试管株芽形成和生根的影响

图 2 结果显示活性炭浓度在 0.5% 以下时,试管株芽的诱导率随其浓度的增大而增大,0.5% 活性炭的培养基中,试管株芽的诱导率为 100%,与未添加活性炭的一样,但株芽个数多,40 株试管苗的株芽诱导数达到了 180 个。培养过程中发现,添加活性炭的培养基中诱导的株芽与无活性炭培养基的相比,诱导时间较短,约为 10 d,且株芽形状很规则,色泽明亮,不定根的发生时间更早,根系活力较大。所以,活性炭的加入有利于试管株芽的形成。但活性炭的浓度不能过高,否则将不利于株芽的诱导及生根。

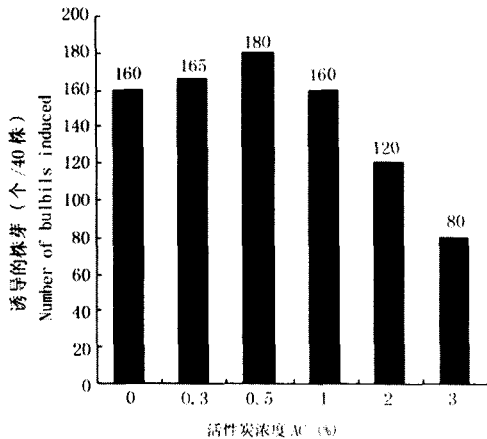


图 2 活性炭对试管株芽诱导的影响

Fig. 2 Effect of active charcoal (AC) on the induction of bulbils

2.1.5 温度和光照对试管株芽形成的影响

由图 3 可见,随温度的升高,试管株芽诱导数增多,24-28℃ 时达到最高,超过 28℃ 时,试管株芽

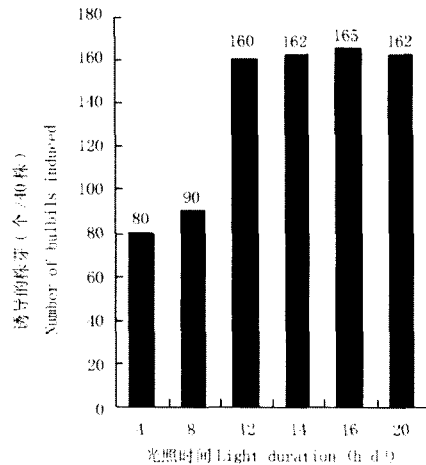


图 4 光照对试管株芽诱导的影响

Fig. 4 Effect of light duration on the induction of bulbils

2.2 试管株芽顶芽萌发和移栽

将试管株芽根部的培养基洗净,置于 MS 无激素培养基或含蛭石、沙土等的混合培养基质中,在光照培养箱中诱导顶芽萌发,约 2 周顶芽开始抽生新叶。由图 5 可知:试管株芽在 MS 培养基中经顶芽诱导后,移栽成活率可达到 100%;供试的四种基质中,以蛭石的培养效果最佳,移栽成活率可达到 97.5%。故利用蛭石来作基质,能较好地诱导顶芽萌发,移栽成活率较高。将带根株芽分离并转入营养

土中进行培养。带根小株芽的移栽成活率可达到 90% 以上。株芽在土中继续发育, 与种子发芽形成的原球茎相似。茎尖向上的生长形成幼嫩植株; 也有的茎尖向下转化为根芽并延伸形成根状茎, 从根状茎上亦形成新的株芽出土成苗。

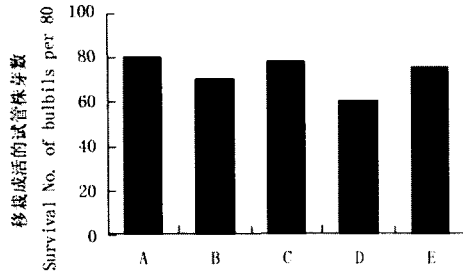


图 5 培养基质对试管株芽诱导的影响

Fig. 5 Effect of culture medium on the induction of bulbils

培养基质 Culture medium: A-MS; B-沙 Sand; C-蛭石 Vermiculite; D-土 Soil; E-沙:蛭石:土 Sand:vermiculite:soil (1:1:1)

3 讨论

由于盾叶薯蓣试管苗的保存时间短, 保存条件苛刻, 且试管苗在移栽后需经过一个株芽形成的阶段, 约需 15–20 d, 只有株芽破土形成的新植株才能稳定成活。而在此过程中移栽的试管苗易受到感染导致茎基部与地下部腐烂, 故移栽成活率不高。离体诱导的盾叶薯蓣试管株芽能直接发育为新植株, 减少了感染机会, 为解决上述难题提供了新思路, 并为盾叶薯蓣的快繁开辟了一条有效途径。

盾叶薯蓣试管株芽的形成受到光照、温度、植物生长物质、营养条件等诸多因素的影响。我们认为最佳培养条件为温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照时间为 14 h d^{-1} , 最佳培养基组成为: MS + 6-BA 4.0 mg L^{-1} + IBA 1.0 mg L^{-1} + 蔗糖 6%–9% + 活性炭 0.5% + 琼脂 7%。本

实验方法快速有效, 对薯蓣科植物快繁体系的建立具有一定的参考价值, 并为加速我国盾叶薯蓣实验室组培快繁与工业化大田生产的一体化步伐奠定基础。

参考文献

- [1] Xu X L(徐向丽), Liu X M(刘选明), Zhou P H(周朴华), et al. *In vitro* tissue culture and tuberization in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *J. Hunan Agri Univ* (湖南农业大学学报), 2000, 26(4):282–285. (in Chinese)
- [2] Chen Y Q(陈永勤), Fan J Y(樊晋宇), Yi F(易飞), et al. Studies on plantlet regeneration from the mature leaves of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2004, 29(2):131–132. (in Chinese)
- [3] Cui J(崔瑾), Li S J(李式军), Yang X D(杨旭东). Simple and effective induction of cormel in *Colocasia esculenta* [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2002, 38(1):44. (in Chinese)
- [4] Cao P S(曹磊生), Cai H(蔡汉), Li L J(李良俊), et al. Induction of corms *in vitro* in Chinese water chestnut [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1999, 26(5):335–336. (in Chinese)
- [5] 郝文胜, 赵永秀, 张铁峰, 等. 我国马铃薯微型薯诱导研究进展 [J]. *内蒙古农业科技*, 2002, (6):4–7.
- [6] 徐成基. 中国薯蓣资源 - 甾体激素药源植物的研究与开发 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2000. 232.
- [7] 彭晓英, 周朴华, 张良波, 等. 盾叶薯蓣试管株芽的诱导 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(4):473.

图版说明

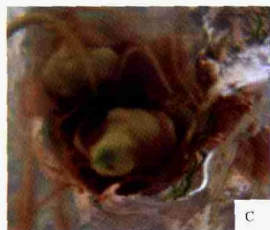
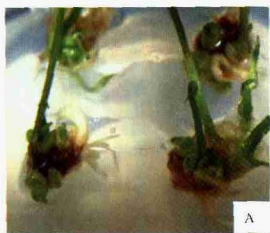
图版 I

A. 试管苗茎段基部萌发多个株芽; B. 株芽在培养基里的萌发; C. 株芽在培养基里延伸形成根芽, 并产生新的株芽; D. 移栽后成活的小植株。

Explanation of plate

Plate I

A. Some bulbils generated from basal segment of plantlets; B. The development of bulbils on the medium; C. Bulbils with roots forming new bulbils; D. Survival plantlets from bulbils.



彭晓英等: 图版 1

PENG Xiao-ying et al.: Plate 1