

两种生态型玛咖叶片的丛生芽诱导

杜丽思¹, 章成君², 张靖¹, 彭晟¹, 杨静¹, 刘林¹, 李成云¹, 杜云龙^{1*}

(1. 云南农业大学农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201)

摘要: 植物激素在植物生长发育过程中起到重要作用。通过组织培养的方法, 分别诱导 2 种块根为紫色与黑色的玛咖以获得丛生芽。玛咖叶片培养于含有细胞分裂素 6-BA 及生长素 NAA 的 Murashige and Skoog (MS) 培养基, 在含有 6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基中, 2 种生态型玛咖的叶片都可以快速分化出丛生芽, 出芽率为 14.3%。而且, 在含有 NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中, 则可以诱导新生的丛生芽的根系形成。在生长素及细胞分裂素的组合下, 可诱导玛咖产生丛生芽及生根, 这对玛咖的快速育种及种质保存起到了重要作用。

关键词: 玛咖; 丛生芽; 组织培养; 植物激素

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walpers), 是一种重要的药食两用植物^[1-3]。玛咖原产于秘鲁安第斯山脉的低温高海拔地区, 中国目前已在云南丽江等地引种成功。玛咖种子在 15~25 °C 条件下萌发率较高^[4], 受生长环境限制, 现有玛咖产量已无法满足日益增长的市场需求。玛咖按块根的颜色, 可以分为不同的生态型。研究表明, 不同生态型玛咖的作用及活性成分如总多糖含量等具有一定程度的差异^[5-7], 从而导致不同生态型玛咖具有不同的经济价值, 其中, 块根为黑色及紫色的玛咖具有很高的市场价格。因此, 如何增加玛咖的产量并获得大量经济价值高的玛咖种苗, 是玛咖生产中面临的一个重要问题。

植物组织培养技术在玛咖育种中起到了重要作用。目前, 一些研究结果显示由玛咖种子获得无菌小苗后, 可选用无菌苗叶片、胚轴、子叶、根、茎为外植体, 经过诱导愈伤组织再分化成苗^[8-14]。在许多研究报告中, 由于需要先从种子形成无菌苗, 并进一步

诱导愈伤组织才可形成玛咖苗, 从而增加了玛咖出苗的时间、人力与资金成本。另外, 诱导不同生态型玛咖成苗的差异还未见相关报道。因此, 开展对不同生态型玛咖的快速诱导出苗研究, 对于获得大量具有重要经济价值的玛咖原料具有重要作用。

本研究选取种植于大田中的块根分别为紫色和黑色的 2 种生态型玛咖, 利用其叶片作为外植体诱导丛生芽。玛咖快速成苗组培体系的建立可为玛咖的种质保存及新品种育种建立基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源及处理

块根为黑色及紫色的玛咖苗来自于中科院昆明植物研究所。幼嫩的玛咖叶片用自来水冲洗干净后, 在超净工作台中用 70% 乙醇表面消毒 90 s, 并用 15% 的次氯酸钠溶液浸泡 10 min 后, 用无菌水漂洗 3 遍, 叶片剪成小块, 放入相应的培养基中培养。

1.2 试剂

所用 MS 培养基购买自 Sigma 公司 (M5519-10L), 细胞分裂素 6-BA 及生长素 NAA 购买自昆明云科生物技术有限公司。

1.3 培养基及培养条件

玛咖的组织培养以 MS 培养基为基础, 添加蔗糖 30 mg/L、琼脂 7 g/L, 调 pH 值为 5.8。培养基灭菌后, 在诱导丛生芽形成的培养基中加入不同浓

收稿日期: 2015-01-21

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31460453)。

作者简介: 杜丽思 (1994-), 女, 云南保山人, 研究方向为植物保护, E-mail: dulisikm@163.com。

* 为通讯作者: 杜云龙 (1976-), 男, 云南蒙自人, 教授, 主要从事植物保护研究工作, 研究方向为植物激素与植物发育, E-mail: yunlongdu@aliyun.com。

度组合的细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA (表 1), 诱导生根的培养基加入 NAA 0.1 mg/L 或 0.2 mg/L。表面消毒完成的玛咖叶片放入配制好的培养基中, 在培养室中进行 24 h 连续光照培养, 温度设定为 23 ℃。

2 结果与分析

2.1 玛咖丛生芽的诱导

首先选择了块根为紫色的玛咖叶片在分化培养基中经过 30 d 培养后, 大部分配方中的玛咖叶片出现褐化、枯萎, 没有明显的愈伤组织形成。但是, 在含有 6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 或 6-BA 2 mg/L+NAA 0.25 mg/L 的培养基中, 均可诱导出玛咖丛生芽, 出芽率达到 14.3%, 2 种培养基的诱导效率没有明显区别, 但含有 NAA 0.2 mg/L 的培养基中丛生芽长势更快

(表 1, 图 1)。丛生芽在同样的分化培养基中继续培养一段时间后, 分化出更多的丛生芽。

表 1 玛咖分化培养基诱导结果

处理	激素(mg/L)	生长情况	丛生芽形成率(%)
1	6-BA 0.3+NAA 0.3	部分叶片切口长出愈伤	0
2	6-BA 0.5+NAA 0.5	部分叶片切口上长出绿色愈伤	0
3	6-BA 1+NAA 0.1	部分叶片切口长出愈伤	0
4	6-BA 1+NAA 0.2	部分叶片切口长出绿色愈伤	0
5	6-BA 1+NAA 0.5	部分叶片长出绿色愈伤	0
6	6-BA 2+NAA 0.1	部分叶片切口长出绿色愈伤	0
7	6-BA 2+NAA 0.2	部分叶片切口长出愈伤, 少数愈伤分化成苗	14.3
8	6-BA 2+NAA 0.25	部分叶片切口长出愈伤, 少数愈伤分化成苗	14.3

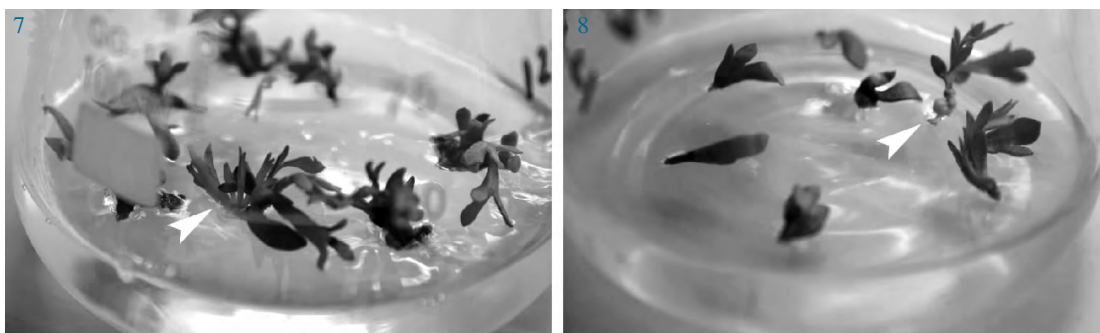


图 1 紫色玛咖叶片诱导分化出丛生芽

注: 箭头所指为玛咖叶片在表 1 中处理 7、处理 8 培养基中分化出丛生芽

为进一步检测上述培养基诱导丛生芽的能力, 块根为黑色的玛咖叶片培养于含有 6-BA 2mg/L+NAA 0.25mg/L 的 MS 培养基, 结果显示在此培养基中, 块根为黑色的玛咖叶片也可被直接诱导产生丛生芽 (图 2)。



图 2 黑色玛咖叶片诱导分化出丛生芽

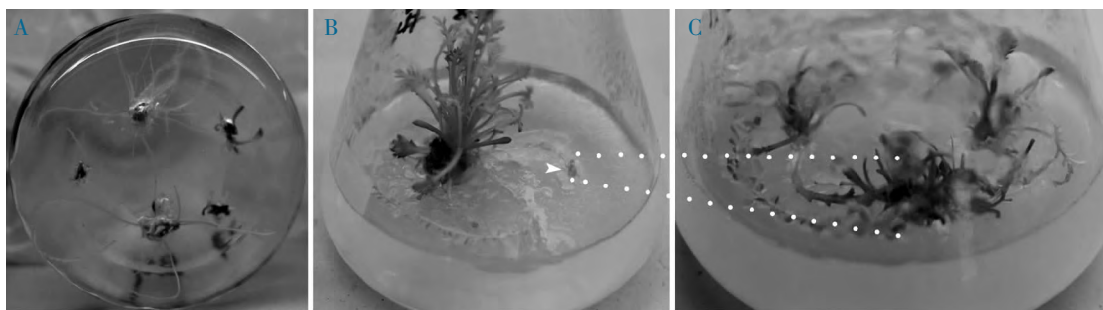
由以上可知, 在含有 6-BA 2 mg/L 及生长素 NAA 低至 0.2 mg/L 培养基中, 玛咖叶片可以经过不明显的愈伤组织阶段而能直接分化出丛生芽。

2.2 玛咖丛生芽生根诱导

玛咖丛生芽在分化培养基上继续生长 30 d 后, 把它从外植体上分离下来, 诱导丛生芽生根。玛咖丛生芽转入含生长素 (NAA 0.1 mg/L) 的培养基中, 经 1 个月的培养后, 在类似块根的组织上开始长出茂密的根系 (图 3A), 并出现新生的芽点。把这些已生根的类似块根的组织转入含有 6-BA 2 mg/L +NAA 0.25 mg/L 的 MS 培养基中, 可快速长出根系并出现许多新的丛生芽 (图 3B), 其中, 在类似块根组织的根系上有丛生芽形成 (图 3C)。

3 讨论

玛咖作为一种药食两用植物, 通过组织培养加快繁育效率, 是解决玛咖市场需求的的一个重要方式。在



注：在 MS 培养基中，加入生长素 NAA 0.1 mg/L (A) 后，黑色生态型玛咖丛生芽上类似块根的组织可以长出根系，把类似块根的组织转入含细胞分裂素 6-BA 2 mg/L 及生长素 NAA 0.25 mg/L 的 MS 培养基中，玛咖丛生芽形成 (B)，并可在根系上长出丛生芽 (箭头所示) (C)。

图 3 玛咖丛生芽的生根诱导

研究结果中，块根为紫色与黑色的 2 种生态型玛咖叶片在细胞分裂素 6-BA 2 mg/L 及生长素 NAA 0.2 mg/L 的诱导下，可以经过一个不明显的愈伤阶段直接分化形成丛生芽，并能在生长素 NAA 0.1 mg/L 的诱导下生根。因此，不同生态型玛咖都可被细胞分裂素与生长素直接诱导成苗，这显示控制玛咖颜色形成的机制与控制玛咖细胞分化的机制是不同的途径。

目前，已有许多关于玛咖组织培养的研究报道，但是，在所有这些报道中，玛咖丛生芽的形成都需要经过对不同外植体进行愈伤组织诱导的过程，其中细胞分裂素与生长素的浓度组合起到了重要作用^[8, 12-13]。在这项研究中，玛咖叶片经 6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 处理后，即可有效诱导叶片形成丛生芽。由于笔者所用外植体及植物激素的种类及浓度与已发表的文章不完全一致，并得到不同的诱导效果，因而，诱导玛咖丛生芽直接形成的机制可能与所用的外植体密切相关，并暗示出玛咖的不同组织对细胞分裂素及生长素的需求不相同。

玛咖的有效成分如氨基酸主要集中于地下的根茎^[15]。有研究发现在诱导愈伤组织分化成苗的过程中，不同的光质可以影响玛咖糖代谢中的关键酶活性^[10]。在该项研究中，结果显示细胞分裂素与生长素的共同作用对于玛咖丛生芽的形成及根系的生长非常重要 (图 2、图 3)，因此，在玛咖生产中，可利用不同激素促进玛咖发育。但是，在诱导丛生芽形成的过程中，所用的细胞分裂素及生长素是否影响玛咖活性成分还需进一步研究。利用植物激素生长素与细胞分裂素建立玛咖快速成苗的组织培养体系，为快速获得大量玛咖种苗、防止种质资源退化奠定了基础。

参考文献：

[1] 王义强, 陈章靖, 王启业, 等. 玛咖药用价值与引种培育研究

进展[J]. 经济林研究, 2014, 32(2): 167-172.

- [2] 余龙江, 金文闻, 吴元喜, 等. 玛咖的植物学及其药理作用研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 71-74.
- [3] 余龙江, 金文闻. 玛咖(*Lepidium meyenii*)干粉的营养成分及抗疲劳作用研究[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 164-166.
- [4] 尚瑞广, 王兵益, 徐珑峰. 温度、水分和光照对玛咖种子萌发的影响[J]. 西南农业学报, 2014, 27(6): 2564-2568.
- [5] 高大方, 张泽生. 不同生态型云南引种玛咖的多糖含量及多糖纯化工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (36): 17756-17757.
- [6] Clement C, Diaz Grados D A, Avula B et al. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of maca (*Lepidium meyenii* Walpers)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 861-869.
- [7] 许敏, 徐丽, 宋晖, 等. 玛咖的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2775-2782.
- [8] 孙友平. 玛咖(Maca)引种栽培基础研究[D]. 湖北: 华中科技大学, 2004.
- [9] 王亚丽, 王晓东, 赵兵, 等. 马卡丛生芽培养条件优化及玻璃化控制研究[J]. 河南农业科学, 2007(6): 54-57.
- [10] 王亚丽, 王晓东, 赵兵, 等. 光质对玛咖愈伤组织生长、分化的影响[J]. 过程工程学报, 2007, 7(4): 782-785.
- [11] Cheng H, Yu L, Hu Q, et al. Micro-propagation of *Lepidium meyenii* Walp.(Maca) by shoot culture [J]. Agricultural Science & Technology, 2004, 5(4): 18-22.
- [12] 胡雪梅. 玛咖和新疆雪莲再生体系的建立及新疆雪莲转昆虫抗冻蛋白基因的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2007.
- [13] 朱军, 李晓瑾, 孙丽, 等. 药用植物玛咖离体快繁技术研究 [J]. 北方园艺, 2013(22): 101-103.
- [14] 程华, 余龙江, 孙友平, 等. 玛咖的愈伤组织诱导及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 709.
- [15] 张维, 张铁, 王伟伟, 等. 云南种植玛咖不同部分化学成分和抗氧化活性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26: 813-818, 823.