

# 盾叶薯蓣的快速繁殖\*

孟 玲 朱宏涛 刘锡葵 杨崇仁\*

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

**摘 要** 对盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* Wright)的外植体进行组织培养,筛选到诱导芽和诱导根的优化培养基和培养条件,建立了无性快速繁殖培养系,获得完整的培养植株并移栽成功。并用分光光度法初步分析了该诱导植株生长根的薯蓣皂素含量。

**关键词** 盾叶薯蓣, 组织培养, 快速繁殖

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* Wright)是我国用于生产薯蓣皂素(diosgenin)的主要植物原料,分布在湖南、湖北、陕西南部、甘肃东南部、四川东部和南部、贵州以及云南省。横断山区的金沙江、澜沧江、怒江流域的干暖河谷、山坡疏林地带为其主产地(周雪林等,1982)。随着甾体药物工业的迅速发展,对甾体皂素原料的需求日趋增加,作为薯蓣皂素的原料盾叶薯蓣已开发利用多年,由于过度采挖使野生资源面临枯竭,生态环境遭到破坏。因对其分根繁殖栽培,繁殖系数低,生根困难,质量不稳定,成本高,难以推广种植(徐成基等,1983)。通过生物技术手段,建立快速繁殖培养系,选育优良品系,用于大面积集约生产是解决薯蓣皂素原料工业需求的科学途径,对于生物多样性的保护与合理利用,生态环境的保护以及山区脱贫致富均有重要的现实意义。盾叶薯蓣具有发达的根状茎,培养诱导根系困难;最近报道只见其愈伤组织诱导培养(任建伟等,1993)及细胞克隆系的建立与培养(任建伟等,1994;毕世荣等,1997),但推广应用仍有相当的距离。本文报道用盾叶薯蓣外植体诱导出完整植株,建立无性快速繁殖培养系,并获得移栽成功。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

云南省丘北县采集的野生盾叶薯蓣(*D. zingiberensis* Wright)根状茎,种植发芽后,待地上部分生长到50 cm左右时,取其幼嫩部位作外植体。

### 1.2 外植体消毒和接种

将采回的外植体用皂液洗去表面污物,蒸馏水冲洗干净,于70%乙醇中浸泡30 sec,取出,用无菌蒸馏水冲洗2次,并用0.2%升汞加吐温-40消毒10~20 min后,无菌蒸馏水洗4~6次,用无菌滤纸吸去表面水分,将叶片剪成1 cm<sup>2</sup>大小,茎剪成长1 cm的小段,腋芽或顶芽剪成长0.5~1 cm大小,接种于培养基上。

### 1.3 外植体的培养及诱导

以Ms和Bs培养基为基本培养基,添加不同浓度的激素:赤霉素(GA)、吲哚乙酸(IAA)、

收稿日期:1999-11-03 修回日期:2000-01-13

+ 云南省科委省院合作资助项目(YK98002)

+ Project Supported by Yunnan committee of science and technology(YK98002)

\* 通信联系人(Corresponding author)

吲哚丁酸( IBA)、萘乙酸( NAA)、6-苄基氨基嘌呤( 6-BA) 和激动素( KT) 以及活性炭、谷胱甘肽、硝酸银等于培养基中。将消毒处理好的外植体接种在培养基上, 置于温度为21℃, 相对湿度60% 的黑暗中进行诱导培养, 诱导后转移至每平方米设25 W 日光灯一盏, 光照10 h/d, 温度21℃, 相对湿度60% 的条件下培养。

1. 4 薯蓣皂素的含量测定

薯蓣皂素分子中无共轭双键, 在紫外区无吸收, 采用高氯酸氧化, 测定其吸收度和波长的曲线。在480 nm 处薯蓣皂素浓度与吸收度成线性相关, 采用722型分光光度计, 波长480 nm, 对盾叶薯蓣培养诱导后植株的生长根进行薯蓣皂素含量测定。

样品的制备和分析操作过程如下: 取培养植株的生长根2 g, 在80℃下干燥至恒重, 用3 ml 盐酸在80℃水浴中水解2 h 后过滤, 将滤纸及滤渣在80℃下烘干, 用石油醚( 150 ml) 回流1. 5 h, 浓缩蒸干, 用氯仿溶出, 并定容至10 ml。取1 ml 氯仿溶液, 将溶剂挥干, 加70% 高氯酸5 ml 在80℃水浴中加热10 min, 在480 nm 可见光下进行比色, 测定吸收度A 值, 根据吸收直线 $y=0.316x+0.21$ 计算薯蓣皂素含量。

2 结果与讨论

2. 1 不同基本培养基组合对盾叶薯蓣外植体芽诱导的影响

实验结果表明, 在添加相同植物激素的条件下, 基本培养基组合对盾叶薯蓣外植体芽的诱导有显著的影响。表1列举5种不同的基本培养基组合, 均添加相同的植物激素( 6-BA、NAA)。其中, D 和 E 组添加AgNO<sub>3</sub>的基本培养基组合, 对芽的诱导有显著的促进作用, AgNO<sub>3</sub>的添加量为10 mg/L。

表1 基本培养基组合对盾叶薯蓣外植体芽诱导的影响

Table 1 Effects of the basic media combination to induce the formation of the buds from the explant of *D. zingiberensis*

基本培养基 Basic media	接种量( 块) Inoculated amount ( piece)	诱导成功量( 块) Bud formation ( piece)	诱导率( %) Induced rate( %)
A: M <sub>s</sub> 培养基 M <sub>s</sub> media	100	0	0
B: B <sub>5</sub> 培养基 B <sub>5</sub> media	100	20	20
C: B <sub>5</sub> 与 M <sub>s</sub> 混合培养基 mix media of B <sub>5</sub> and M <sub>s</sub>	100	30	30
D: B <sub>5</sub> 与 M <sub>s</sub> 混合培养基加水解酪蛋白 AgNO <sub>3</sub> . In a mix media of B <sub>5</sub> and M <sub>s</sub> , silver nitrate and casein hydrolysate	100	50	50
E: B <sub>5</sub> 与 M <sub>s</sub> 混合培养基加 AgNO <sub>3</sub> In a mix media of B <sub>5</sub> and M <sub>s</sub> , silver nitrate	100	50	50

2. 2 基本培养基对盾叶薯蓣苗根诱导的影响

实验结果表明, 在相同的激素组合: 6-BA( 0. 1 mg/L)、NAA( 0. 5 mg/L) 的情况下以1/2 M<sub>s</sub> 为基本培养基, 诱导状况较好, 在 B<sub>5</sub>培养基中添加活性炭不能诱导根的产生( 表2) 。

表2 基本培养基对盾叶薯蓣苗根诱导的影响

Table 2 Effects of different basic media to induce the root formation of *D. zingiberensis*

基本培养基 Basic media	接种量(块) Inoculated amount (individual plant)	诱导成功量(株) Root formation (individual plant)	诱导率(%) Induced rate(%)
B <sub>5</sub> 培养基 B <sub>5</sub> media	100	0	0
1/2 B <sub>5</sub> 培养基 1/2 B <sub>5</sub> media	100	0	0
B <sub>5</sub> 培养基, 活性炭 B <sub>5</sub> media, charcoal activated	100	0	0
M <sub>s</sub> 培养基 M <sub>s</sub> media	100	20	20
1/2 M <sub>s</sub> 培养基 1/2 M <sub>s</sub> media	100	50	50

2.3 植物激素的组合对盾叶薯蓣外植体芽诱导的影响

植物激素的添加对于诱导外植体芽的形成起着关键的作用。在M<sub>s</sub>与B<sub>5</sub>混合的基本培养基中添加不同植物激素的实验结果表明,单独添加6-BA不能诱导盾叶薯蓣外植体的芽分化;GA对外植体芽的诱导无促进作用,而NAA对促进芽的分化作用比IAA强,添加KT更有利于芽的诱导(表3)。

2.4 植物激素的组合与浓度对盾叶薯蓣苗根诱导的影响

在1/2 M<sub>s</sub>的基本培养基中调节植物激素的组合和浓度,对诱导盾叶薯蓣苗的根分化有显著影响。实验结果表明:6-BA(0.1 mg/L),NAA(0.5 mg/L),KT(0.2 mg/L)为优化的诱导根分化的植物激素组合。NAA的浓度增高对根的诱导有抑制作用,适宜浓度的NAA对根的诱导优于IAA(表4)。

2.5 快速繁殖培养系的建立及其薯蓣皂素含量的测定

以上的实验结果表明,B<sub>5</sub>大量元素母液(50 ml/L)、M<sub>s</sub>微量元素母液(1 ml/L)、Fe母液(5 mg/L)、有机添加物母液(2 mg/L)、AgNO<sub>3</sub>(10 mg/L)、6-BA(1 mg/L)、NAA(0.2 mg/L)以及KT(0.5 mg/L),为外植体芽诱导的优化培养基组合。接种在该芽诱导培养基组合上的外植体在避光培养条件下先是周围稍膨大,7 d后,膨大部位产生较硬的异形突起,为丛生芽。将其移入光照条件下培养,10 d后此突起的先端变绿,体积增加,继续培养即长成新的无根苗。将已诱导出的无根苗移至培养基组合为1/2 M<sub>s</sub>基本培养基、6-BA(0.1 mg/L)、NAA(0.5 mg/L)、

表3 植物激素对盾叶薯蓣外植体芽诱导的影响

Table 3 Effects of plant hormones to induce the bud formation from the explant of *D. zingiberensis*

激素组合 Hormone combination	接种量(块) Inoculated amount (piece)	诱导成功量(块) Bud information (piece)	诱导率(%) Induced rate(%)
6-BA	100	0	0
6-BA, GA	100	0	0
6-BA, NAA	100	50	50
6-BA, IAA	100	20	20
6-BA, IAA, KT	100	67	67
6-BA, NAA, KT	100	84	84

6-BA: 6-Benzyl amino purine; GA: Gibberellin  
NAA: 1-Naphthylacetic acid; IAA: 3-Indolylacetic acid  
KT: 6-Furfuryl aminopurine

KT (0.5 mg/L) 上, 约10 d 后于苗的下端即可直接长出嫩根。随培养时间的增长, 嫩根逐渐变粗增多 (图1 ~ 图3)。移栽15 d 后植株生长健壮。

表4 植物激素对盾叶薯蓣诱导苗根诱导的影响

Table 4 Effects of plant hormones to induce the root formation of *D. zingiberensis*

植物激素组合及浓度 Plant hormone combination and concentration	接种量(株) Inoculated amount ( individual plant)	诱导成功量(株) Root formation ( individual plant )	诱导率( % ) Induced rate( % )
NAA (1 g/L)	100	0	0
IAA (0.5 mg/L)	100	0	0
NAA (0.5 mg/L)	100	20	20
IAA (0.5 mg/L), 6-BA (0.1 mg/L)	100	20	20
NAA (0.5 mg/L), 6-BA (0.1 mg/L)	100	50	50
IAA (0.5 mg/L), 6-BA (0.1 mg/L), KT (0.2 mg/L)	100	50	50
NAA (0.5 mg/L), 6-BA (0.1 mg/L), KT (0.2 mg/L)	100	76	76

NAA: 1-Naphthylacetic acid; IAA: 3-Indolylacetic acid;  
6-BA: 6-Benzyl amino purine; KT: 6-Furfuryl aminopurine.



图1 形成的丛生芽  
Fig. 1 The formation of clustered buds



图2 形成的无根苗  
Fig. 2 The formation of young plant without roots



图3 形成的完整植株  
Fig. 3 The formation of complete individual plant

采用分光光度法测定该诱导植株生长根的薯蓣皂素含量为1.85%。

参考文献

1 毕世荣, 张忠福, 苏成端等. 高含量薯蓣皂素植株的细胞克隆. 天然产物研究与开发, 1997, 9(4): 1~6  
2 徐成基, 周 谨, 豆永泽等. 激素药源植物—薯蓣的栽培研究. 中药通报, 1983, 8(4): 3~5  
3 秦铁英, 李晓雄. 比色法用于薯蓣皂素提取的终点控制. 中草药, 1993, 24(11): 613

- 4 任建伟, 白云, 郭秋月. 盾叶薯蓣培养细胞的生长及薯蓣皂甙元产生的变化规律. 中草药, 1994, 25(2): 93~94
- 5 任建伟, 白云, 张榕树等. 盾叶薯蓣愈伤组织的诱导及培养. 中国药学杂志, 1993, 28(9): 532~534
- 6 周雪林, 王意成. 野生盾叶薯蓣的资源调查及引种. 中药通报, 1982, 7(1): 3~5

## MICRO PROPAGATION OF *DIOSCOREA ZINGIBERENSIS*

Men Ling, Zhu Hongtao, Lui Xikui, Yang Chongren\*

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

**Abstract** The complete individual plants of *D. zingiberensis* were induced from the explants of young stems of this species by a tissue culture technology. The optimized medium components were selected for induce the differentiation of roots and buds. The diosgenin content of young root of induced plants were determined by the spectrometric method.

**Key words** *Dioscorea zingiberensis*, tissue culture, rapid propagation

## 天然药物信息(医学期刊扫描: 文摘和评论)

### Natural Medicine Information(Medical Journal Watch: Abstract and Comments)

#### Green Algae Eases

##### Fibromyalgia Symptoms

Merchant RE, Carmack CA, Wise CM. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for patients with fibromyalgia syndrome: A pilot study. *Phytother Res* 114: 167~173, 2000.

Twenty patients with the chronic musculoskeletal disorder fibromyalgia(FM) were given green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) supplements for two months. Patients benefited from an average 22% decrease in pain intensity without any significant changes in blood chemistries.

**NP Notes:** *It is not really clear why supplementing with green algae can benefit people with FM. However, it is likely that the algae contain some of the nutrients that FM sufferers lack.*

#### Vitamin C Reduces Withdrawal Symptoms in Drug Addicts

Evangelou A, Kalfakakou V, et al. Ascorbic acid (vitamin C) effects on withdrawal syndrome of heroin abusers. *In Vivo* 14: 363~366, 2000.

Heroin addicts who took daily high-dose vitamin C supplements (approximately 20 g daily for a minimum of 4 weeks) had decreased withdrawal symptoms compared with control subjects. This may be partially due to the ability of antioxidants such as vitamin C to increase endorphin levels at high concen-

trations. Further studies should elucidate the mechanisms of vitamin C's benefits for recovering heroin addicts.

**NP Notes:** *Only a fool would argue that a drug addict requires only the recommended dietary allowance(RDA) of 60 mg of vitamin C daily, especially in light of this study.*

#### High-Dose Vitamin C Limits Damage in Severely Burned Patients

Tanaka H, Matsuda T, et al. Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration. A randomized, prospective study. *Arch Surg* 135(3): 326~331, 2000.

Very large dosages of vitamin C, specifically 66 mg/kg of body weight per hour, were administered intravenously to burn victims participating in this study. This treatment reduced body-weight gain, wound edema, severity of respiratory dysfunction, and requirements for resuscitation fluids.

**NP Notes:** *Vitamin C is needed for collagen tissue and skin synthesis. Therefore, it stands to reason that the post-burn healing process demands large amounts of this nutrient. This study shows how a simple nutritional therapy can enhance a conventional treatment.*