

植物细胞工程技术在盾叶薯蓣研究中的应用

杨懋勋, 黄永芳*

(华南农业大学林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 盾叶薯蓣是一种极其重要的药用作物, 是合成甾体激素类药物的重要原料。由于野生的盾叶薯蓣资源日渐枯竭等原因, 盾叶薯蓣的生产面临严重的挑战, 而植物细胞工程技术的发展, 对解决盾叶薯蓣资源问题和促进盾叶薯蓣的研究和利用创造了很好的条件, 植物细胞工程技术在盾叶薯蓣中的应用不断深入。文中对组织培养、细胞培养等细胞工程技术在盾叶薯蓣中的研究及应用的概况作了综述, 并展望了植物细胞工程技术在盾叶薯蓣茎尖脱毒培养、物质代谢研究等方面的应用前景。

关键词: 盾叶薯蓣; 植物细胞工程; 组织培养; 细胞培养

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)07-0015-04

植物细胞工程是指在细胞的水平上, 对植物进行遗传操作的新技术^[1]。在植物体细胞杂交、单倍体育种、种质资源保存、植物快速无性繁殖和脱毒、人工种子制造、次生代谢物生产等方面已得到了广泛的应用。

盾叶薯蓣(*Dioscorea Zingiberensis* C.H Wright)是薯蓣科薯蓣属的一种重要的药用植物, 是我国特有种。其薯蓣皂元甙(皂素)含量最高可达16.15%, 比世界上王牌墨西哥的小穗花薯蓣还高, 因此, 是一种最理想的提取甾体激素的药源植物。

由于盾叶薯蓣价值高, 需求量大, 且缺乏科学指导的盲目采挖, 使野生的盾叶薯蓣资源日渐枯竭, 加上病虫害的危害, 盾叶薯蓣的生产面临严重的挑战。植物细胞工程技术的发展, 对解决这些问题和促进盾叶薯蓣的研究和利用创造了很好的条件。植物细胞工程技术在盾叶薯蓣上的研究和应用主要集中在组织培养和细胞培养方面, 现对植物细胞工程技术在盾叶薯蓣的应用概况作一综述。

1 国内外的研究历史

国外学者较早开始对薯蓣属植物的组织培养条件的研究^[2-3]。对薯蓣属植物细胞工程方面的研究国外主要集中在三角叶薯蓣^[4], 而盾叶薯蓣是我国的特有种, 国外罕见报道。

对盾叶薯蓣的组织培养技术的研究始于20世纪70年代末期。1978年, 四川省生物研究所一室体细胞组对盾叶薯蓣的组织培养作了初步的试验, 结果表明, 用植株的不同部位作外植体诱导愈伤组织的频率不一样, 若以幼茎、幼叶为材料, 诱导频率较高, 分别为57.97%和83.14%; 而以根茎为材料时其频率只有1.78%; 并首次用比色法测定了由幼茎、幼叶所形成的愈伤组织的皂素含量分别为0.46%和0.23%^[5]。不久后, 宋为民等试验了不同外植体、不同培养条件对盾叶薯蓣组织培养的影响, 并首次报道了盾叶薯蓣植株分化的试验情况。根的分化率较芽的分化率高, 愈伤组织有的先分化出根, 有的先分化出芽^[6]。

此后, 植物细胞工程技术在盾叶薯蓣中的应用迅速发展, 特别是近年来, 对盾叶薯蓣细胞工程的研究不断深入。

2 组织培养技术在盾叶薯蓣研究中的应用

植物组织培养技术, 经过了几十年的发展, 其实际应用价值日趋明显, 它已广泛应用于植物的快速繁殖、脱毒培养、品种改良、药用成分生产等方面。盾叶薯蓣的组织培养技术应用概况如下。

2.1 外植体选取及消毒

盾叶薯蓣组织培养常用的外植体主要有3类:

收稿日期: 2006-02-11

基金项目: 广东省教育厅自然科学研究项目(Z02008)

作者简介: 杨懋勋(1981-), 男, 广东廉江人, 在读硕士研究生, 主要从事经济植物培育、植物生物技术的研究工作。

通讯作者: 黄永芳(1963-), 女, 广西博白人, 副教授, 硕士, 主要从事经济林的科研和教学工作。

①多年生根状茎,特别是其顶端部分。②地上部分,主要是幼嫩的茎叶,也有用叶柄等。③无菌幼苗的胚轴、幼叶和幼根等。这些材料作为外植体一般都能成功诱导出愈伤组织,而愈伤组织的诱导率和诱导质量由于不同的取材和操作方法上的差异而有所不同。若以实生苗组织作为材料,以茎、叶为外植体的诱导频率比以根茎为材料高^[7],唐君海等以盾叶薯蓣的藤蔓嫩茎为外植体,愈伤组织的诱导率达 100%^[8];而以叶柄为外植体时的诱导频率说法不一,有部分试验结果表明,叶柄几乎不能诱导出愈伤组织或出愈率低^[9],而另一些试验结果表明,以叶柄为外植体出愈率高^[10-11],这可能与不同的材料及不同的处理方法有关。以试管苗为外植体较实生苗更利于诱导愈伤组织^[12],试管苗中以胚轴为培养材料效果好。

外植体的消毒方法如下:将采回的外植体用肥皂液洗净,再用蒸馏水冲洗干净后,在浓度 70% 酒精中漂洗 30 s,再用浓度为 0.1%~0.2% 升汞加吐温—40 消毒 10~20 min,无菌水冲洗 4~6 次^[13-14]。

2.2 愈伤组织的诱导与培养

2.2.1 诱导培养基 在薯蓣植物组织培养中,常用的诱导培养基是 MS 或改良 MS、RT、Nitsch、B5、White 等,其中改良 MS 培养基对盾叶薯蓣的愈伤组织诱导率最高^[15,16]。培养基的组成直接影响愈伤组织生长及代谢的产生,其中以氮源的影响较为明显,氮源的加入常可以促进生长而抑制次生代谢物的产生,特别是 NH_4^+ 不利于次生物质的产生,调整 C/N 比例,对愈伤组织的生长及提高代谢产物的含量非常关键;低磷酸盐浓度有利于皂甙元的产生;在蔗糖浓度低于 3% 时,愈伤组织生长急剧下降。

2.2.2 激素的影响 盾叶薯蓣愈伤组织诱导应用较多的激素是 2,4-D。2,4-D 浓度对愈伤组织生长速度和皂甙元产生影响大,其浓度一般以 2~4 mg/L 为最好。生长素(2,4-D 或 NAA)和细胞分裂素(6-BA)的适当组合可以显著提高愈伤组织诱导率^[17,18]。不同生长素对盾叶薯蓣愈伤组织细胞生长量的影响差异是 $\text{NAA} > \text{IAA} > 2,4\text{-D}$,而对薯蓣皂甙元合成的影响是 $2,4\text{-D} > \text{IAA} > \text{NAA}$ ^[19]。

2.2.3 继代培养 附加 6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基,增殖率可高达 670%,效果最好,且经多次继代,该培养基都能保证旺盛增殖^[20]。

2.3 愈伤组织的分化

盾叶薯蓣组织培养过程中,淡黄色、表面粗糙的愈伤组织在分化培养基上转变为致密、淡绿色的愈伤组织,不久即开始分化,有的先分化出根,有的则先分化出芽。

诱导愈伤组织的分化用添加 6-BA 2 mg/L 与 NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基比较理想。

盾叶薯蓣愈伤组织根的分化率高而苗的分化率低,原因可能是在继代培养过程中愈伤组织内源生长素水平提高,直接抑制了苗的分化;也可能是多次继代后细胞自身退化,导致分化能力下降。

盾叶薯蓣外植体上诱导愈伤组织与其他植物相比脱分化时间长,组织易褐变、死亡,愈伤组织得率低,且愈伤组织分化的苗容易出现变异株;以腋芽增殖的方式进行快繁生根难,主要原因是盾叶薯蓣茎结构中有两圈维管束,且在韧皮部周围有许多纤维和木化薄壁细胞,造成在茎切段或无菌短枝上生根困难。

2.4 高产系、新品种的筛选

谢碧霞等利用正交优化培养条件,通过对不同培养基和培养条件的选择,根据愈伤组织个体间生长速度和皂素含量的差异,进行了高产系的筛选,筛选出的优良高产盾叶薯蓣愈伤组织无性系,其鲜质量增加速度为 33.10 mg/d,生长率高达 1.11 mg/(L·d),皂素含量达 3.7%,比原植株含量超出 28.3% 以上。

王志安等在繁育优质高产薯蓣新品种的试验中,共获得源于高皂素含量种质的试管苗 8 136 株,田间成苗 6 830 株,皂素含量达 2.48%,说明运用组织培养技术选育优质高产薯蓣新品种是可行的。

3 盾叶薯蓣的细胞培养技术的研究

由于对薯蓣皂素的需求日益增加,国内外都在探索利用植物细胞工程技术生产薯蓣皂素的方法。我国对盾叶薯蓣进行细胞培养方面的研究起步较晚。

3.1 固体培养和细胞悬浮培养

任建伟等采用盾叶薯蓣脱分化愈伤组织进行固体培养和细胞悬浮培养,对悬浮培养的盾叶薯蓣细胞的生长及薯蓣皂素产生的动态变化进行了研究,并比较了不同培养基及激素浓度对愈伤组织生长及薯蓣皂素含量的影响。结果表明,皂素含量增高的达峰时间迟于细胞生长达峰时间,即有用物产量与细胞生长的关系属延迟型。并通过对不同培养基与

激素浓度对愈伤组织和皂素含量影响的研究, 选择出了适宜的愈伤组织生长和皂素生产的培养基。为细胞连续培养及培养条件的选择提供了科学的依据^[21]。

3.2 细胞固定化培养

植物细胞固定化培养是国外 20 世纪 80 年代兴起的一门新技术。与悬浮培养相比, 固定化培养具有提高次生物质的合成、积累, 能长时间保持细胞活力, 可反复使用, 抗剪切能力强, 耐受有毒前体的浓度高, 遗传性状较稳定, 后处理难度小等特点^[22]。用 3% 海藻酸钠固定盾叶薯蓣悬浮细胞, 进行细胞固定化培养的试验表明, 游离的盾叶薯蓣细胞不分泌皂素到培养液中, 而经固定化培养较长时间后, 有分泌但不能持续^[23]。

3.3 细胞克隆培养技术

采用细胞克隆培养技术获得的克隆系是同源细胞系, 具有筛选效率高、筛选出的优良细胞系稳定性高、筛选量大、操作简便等优点^[24]。

因此, 选用高含量薯蓣皂素植株, 进行克隆细胞悬浮培养, 就能不依赖野生资源, 通过筛选优良细胞株大量培养, 实现工业化生产皂素。

毕世荣等对盾叶薯蓣克隆细胞进行大量培养, 获得了具淡黄色、质地较疏松、生长速度快的 31 个薯蓣优良克隆细胞株, 并筛选出 18 株高含量薯蓣皂素的克隆细胞系(皂甙元含量高达 1.49%), 为快速有效地筛选具有稳定高产的次生代谢细胞系, 建立了良好的选择程序, 从而用于细胞生长和产物累积最佳化试验, 控制皂素合成途径及确定悬浮培养产皂素能力稳定性试验, 为进行工业化生产皂素奠定必要条件^[25]。

3.4 细胞生长特性的研究

李文谦等研究了盾叶薯蓣细胞在不同接种量和 NAA、6-BA 浓度配比条件下的生长特征, 应用 Logistic 方程对薯蓣细胞生长进行模拟能够较好地描述细胞的生长过程, 细胞生长曲线呈“S”形, 生长过程可分为延迟期、指数生长期和减速期。为发酵培养盾叶薯蓣细胞和研究其次生代谢产物提供了理论依据^[26]。

4 展望

有关盾叶薯蓣植物细胞工程方面的研究工作虽然进行了很多, 取得了很大的成就, 但是, 作为一个具有重大经济价值、社会价值、环保效益的植物种, 距离植物细胞工程技术在盾叶薯蓣上的充分应

用, 利用植物细胞工程技术进行薯蓣皂素的工业化生产等目标还有很长的距离。植物细胞工程技术在盾叶薯蓣上的应用还具有无穷的潜力。

4.1 茎尖脱毒培养技术的应用

盾叶薯蓣在栽培过程中有多种病害, 且由于重茬、种子带病传染等原因, 加剧了病害的发生, 使产量和质量严重下降。常规病害防治方法收效不明显, 如植株感染了某些未知的病毒时, 常规的病害防治方法更是显得束手无策。自 1960 年 Morel 第 1 个用茎尖培养方法得到无病毒兰花后, 植物细胞工程技术就成为脱除植物病毒的理想方法。这一方法已在多种经济植物中得到应用并获得成功。通过茎尖脱毒组织培养技术, 可建立盾叶薯蓣脱毒快繁体系, 对严重退化的盾叶薯蓣优良种质进行提纯复壮, 恢复其优良种性, 并生产出大量优质脱毒种苗及脱毒种薯。

4.2 开展薯蓣皂素物质代谢的研究

利用植物细胞工程技术是开展药物代谢研究的有效方法, 具有培养细胞组成均一, 无菌性, 材料易得; 不受季节地区等的影响, 对标记化合物的吸收比用植株要多得多等优点^[27]。在国外, 用培养细胞来研究药物代谢, 已有很大的发展^[28]。有关盾叶薯蓣的薯蓣皂素的结构、成分的研究已见报道^[29], 而薯蓣皂素物质代谢过程仍需进一步研究, 相信植物细胞工程技术在开展薯蓣皂素物质代谢的研究中将发挥很大的作用。

4.3 与其他生物技术相结合

盾叶薯蓣的细胞工程技术可与其他生物技术方法相结合, 如与基因工程技术相结合, 将抗性基因转入到盾叶薯蓣中, 提高品种的抗病抗逆性; 也可与微生物工程技术相结合, 进行薯蓣皂素的工厂化生产等。

此外, 单倍体育种、胚胎培养、原生质体培养和细胞融合, 建立植物细胞遗传转化体系等植物细胞工程的方法与技术, 在盾叶薯蓣上的应用都有巨大的潜力。

参考文献:

- [1] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 1—2, 36, 62—63.
- [2] Chaturedi H C. Propagation of *dioscorea floribunda* in vitro culture of single node segments[J]. Curr Sci, 1975, 44: 839—840.
- [3] Mantell S H. Apical meristem-tip culture for eradication of flexuous rod viruses in yam (*Dioscorea alata*) [J]. Tropical

Pest Management, 1980, 26: 170—179.

[4] Fowler M W. Trends in Biotechnology[J]. Biosci, 1987 (2): 35—37.

[5] 四川生物研究所一室体细胞组. 盾叶薯蓣组织培养研究初报[J]. 植物学报, 1978, 20(3): 279—280.

[6] 宋为民, 陈为民. 盾叶薯蓣试管植株的诱导[J]. 植物生理学报, 1981(5): 31—32.

[7] 晏婴才, 林宏辉, 代其林, 等. 盾叶薯蓣组织培养与快速繁殖研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2002, 39(1): 136—140.

[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(3): 7—9.

[9] 莫英, 兰利琼, 卿人韦, 等. 盾叶薯蓣种子萌发条件及诱导外植体愈伤的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(4): 837—841.

[10] 王志安, 王日照. 运用组织培养技术筛选盾叶薯蓣新品种[J]. 中草药, 2002, 33(4): 361—363.

[11] 李涵, 吴福川, 郑思乡. 盾叶薯蓣组织培养及四倍体诱导技术的初步研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(3): 33—35.

[12] 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]. 湖南农业大学报, 2000, 26(4): 282—285.

[13] 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.

[14] 董静洲, 志成, 易自力, 等. 四倍体盾叶薯蓣快速繁殖的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(6): 1205—1207.

[15] 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.

[16] 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]. 中南林学院学报, 1999, 19(4): 17—21.

[17] 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.

[18] 刘贵周, 谢世清. 盾叶薯蓣良种离体快繁关键技术研究[J]. 中国种业, 2005(6): 36—37.

[19] 李明芳, 刘选明, 刘斌, 等. 激素对盾叶薯蓣愈伤组织细胞生长和薯蓣皂甙元合成的调控[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(3): 71—84.

[20] 黄昌武, 刘丰国, 王光俊, 等. 黄姜组织培养快速繁殖技术研究[J]. 湖北农业科学, 2002(2): 70—71.

[21] 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[J]. 中草药, 1994, 25(2): 93—94; 112.

[22] 王素芳. 植物细胞的固定化培养[J]. 浙江万里学院学报, 2004, 17(2): 96—98.

[23] 任建伟, 白云, 郭秋月. 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(4): 529—530; 573.

[24] Caboche M. Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium[J]. Planta, 1980, 148: 7.

[25] 毕世荣, 张忠福, 苏成端. 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, 9(4): 1—6.

[26] 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, 24(5): 12—16.

[27] 罗士韦, 许智宏. 经济植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 116—126.

[28] Overton K H, Picken D J. Studies in secondary metabolism with plant tissue cultures[J]. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, 1978, 249—299.

[29] 李军超, 李向民, 郭晓思, 等. 盾叶薯蓣研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(10): 1842—1848.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准, 本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位, 为便于读者阅读, 现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km= 公里、千米, m= 米, cm= 厘米, mm= 毫米; 换算: 1 km= 1 000 m, 1 m= 100 cm= 3 尺, 1 cm= 10 mm
- 2 重量单位: t= 吨或 1 000 kg, kg= 公斤、千克, g= 克, mg= 毫克; 换算: 1 t= 1 000 kg, 1 kg= 1 000 g, 1 g= 1 000 mg, 500 g= 1 市斤, 50 g= 1 两
- 3 面积单位: m²= 平方米, hm²= 公顷, cm²= 平方厘米; 换算: 1 hm²= 10 000 m²= 15 亩, 1 亩= 667 m²
- 4 浓度单位: 1 mg/ kg, mg/ L 或 mg·kg⁻¹, mg·L⁻¹, μL·L⁻¹= 1×10⁻⁶= 1 ppm, 即百万分之一, 不用 ppm 和 1×10⁻⁶表示
- 5 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d、h、min、s”表示

(本刊编辑部)