

大渡河谷黄山药组培育苗技术及展望

谢学强, 郑巧萍, 潘石琼, 季磊, 周雨青 (四川民族学院环境与生命科学系, 四川康定 626001)

摘要 四川省甘孜州大渡河流域的康定、丹巴、泸定、九龙等市具有野生药用植物黄山药分布, 为满足其黄山药市场需求并有效保护其野生资源, 需进行组织培养育苗。以黄山药新生幼嫩带芽茎段作外植体, 从诱导培养、增殖培养和生根培养方面对黄山药的组培育苗技术进行分析, 以便形成完整的离体快繁技术体系。

关键词 黄山药; 组织培养; 育苗技术; 大渡河谷

中图分类号 S632.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)19-0116-03

Tissue Culture Seedling Technique of *Dioscorea Panthaica* in Dadu River Valley

XIE Xue-qiang, ZHENG Qiao-ping, PAN Shi-qiong et al (Department of Environment and Life Science, Sichuan Minzu College, Kangding, Sichuan 626001)

Abstract There was *Dioscorea Panthaica* at Kangding, Danba, Luding and Jiulong along Dadu River in Ganzi Prefecture of Sichuan Province. Its tissue culture seedling must be conducted for meeting its market demand and effectively protecting its wild resources. Using tender stem with buds of *Dioscorea Panthaica* as explants, its tissue culture seeding technique was analyzed from the aspects of induction culture, proliferation culture and rooting culture in order to form a complete system of rapid propagation technology.

Key words *Dioscorea Panthaica*; Tissue culture; Seedling technique; Dadu river valley

黄山药 (*Dioscorea panthaica* Prain et Burk.), 别名姜黄草、黄姜、老虎姜等, 是多年生草质缠绕藤本, 为我国特有的薯蓣科薯蓣属植物, 其根状茎具有解毒、消肿、止痛等功效, 用于治疗胃气痛、吐泻腹痛、跌打劳伤、疮疡肿毒、毒蛇咬伤、淋巴结核等^[1]; 其根状茎含薯蓣皂苷元, 是生产治疗心血管疾病药物和合成甾体激素类药物的重要药源^[2-3], 因此, 黄山药是一种开发潜力大、经济效益高的药用植物。近年来黄山药市场需求量大增, 导致其野生资源迅速减少。为满足市场需求和避免资源枯竭, 亟需进行黄山药人工栽培生产, 但其常规繁殖方法却消耗大量根状茎, 且繁殖速度慢, 育苗质量不稳定。利用植物组织培养技术进行离体快繁能解决常规繁殖的缺点, 已在多种果树、花卉、蔬菜、药用植物上广泛利用^[4], 黄山药组培育苗也具有同样优势。黄山药人工栽培时, 传统育苗方法不仅浪费药用器官(根茎和零余子), 而且繁殖率低, 难以满足生产需要。为满足黄山药市场需求并有效保护其野生资源, 需进行组织培养育苗。笔者从诱导培养、增殖培养和生根培养方面对黄山药的组培育苗技术进行分析, 以便形成完整的离体快繁技术体系, 可借以解决人工栽培黄山药时种苗短缺问题。

1 黄山药的形态特征、生长习性 & 分布

1.1 形态特征 黄山药为缠绕草质藤本, 茎左旋, 光滑无毛, 草黄色, 有时带紫色; 根状茎横生, 圆柱形, 不规则分枝, 表面着生稀疏须根; 单叶互生, 叶片三角状心形, 先端渐尖, 基部深心形或宽心形, 全缘或边缘呈微波状, 干燥后表面栗褐色或黑色, 背面灰白色, 两面近无毛; 花单性, 雌雄异株。雄花无梗, 新鲜时黄绿色, 单生或 2~3 朵簇生于叶腋组成穗状花序; 苞片舟形; 花被碟形, 内有黄褐色斑点, 先端 6 裂, 裂

片卵圆形, 开放时平展; 雄蕊 6 枚, 着生于花被管的基部, 背着式花药。雌花序与雄花序基本相似, 花被 6 裂, 具 6 枚退化雄蕊, 花药不全或仅花丝存在。蒴果三棱形, 先端截形或微凹, 基部狭圆, 表面棕黄色或栗褐色, 有光泽, 密生紫褐色斑点, 成熟时果反曲下垂; 种子每室通常 2 枚, 着生于中轴中部。在大渡河谷, 黄山药花期 5—7 月, 果期 7—9 月。

1.2 生长习性 黄山药以根状茎越冬。在大渡河谷, 每年 3 月下旬—4 月上旬黄山药根状茎陆续出苗; 6 月中旬枝叶增多, 植株进入营养生长旺期; 6 月底开始孕蕾、开花, 新根状茎开始膨大生长; 8—9 月新根状茎生长进入盛期; 9 月下旬植株生长放缓, 进入末花期, 根状茎体积达到一年中最大; 10 月上旬叶片开始变黄, 枯萎脱落, 生长停止; 11 月下旬—12 月中旬, 地上部分全部枯死; 12 月—次年 3 月根状茎处于休眠状态。

1.3 分布 黄山药主要分布在 23°21'~31°01' N, 99°24'~113°25' E, 分布区域有四川西部甘孜州大渡河沿岸的康定、丹巴、泸定、九龙等市县, 大渡河沿岸的石棉、汉源县, 凉山州、攀枝花市各县, 四川的马边、筠连等县, 以及贵州西部、湖南西北部、湖北恩施和云南、广东等地区^[5]。在大渡河沿岸, 黄山药主要生长于海拔 1 000~3 500 m 的灌木林下、密林林缘或草地上。

2 黄山药组培育苗技术

2.1 诱导培养

2.1.1 接种材料采集及处理。 4 月中旬, 于大渡河干旱河谷海拔 1 400~1 900 m 的灌丛、林缘和草地上, 连根状茎带土采集野生黄山药, 种植于日光温室中。5 月上旬剪取黄山药新生幼嫩藤蔓, 去叶后放入盆中加洗洁精清洗干净, 再放入烧杯中盖好纱布, 置于自来水龙头下用细流水冲洗 4 h 以上备用。

2.1.2 诱导培养基制备。

2.1.2.1 诱导培养基配方。 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 11 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖 + pH 6.0~6.1。

基金项目 四川民族学院四川省省级大学生创新创业训练项目 (201511661014)。

作者简介 谢学强 (1964—), 男, 四川大竹人, 教授, 硕士, 从事植物资源研究。

收稿日期 2017-05-05

2.1.2.2 母液制备。先按 MS 基本培养基配方^[6] 配制大量元素母液(浓缩 10 倍)、微量元素母液(浓缩 100 倍)、铁盐母液(浓缩 100 倍)和有机成分母液(浓缩 100 倍),并配制 0.5 mg/mL 的 6-苄基腺嘌呤(6-BA)母液和萘乙酸(NAA)母液。各种母液置于冰箱 2~4 ℃ 下保存备用。

2.1.2.3 固体诱导培养基制备。再按诱导培养基配方配制 MS 固体诱导培养基。如果配制 500 mL,则用药物天平称取 5.5 g 琼脂条,剪碎放入有 500 mL 刻度的搪瓷量杯中,加蒸馏水 200 mL,置于电炉上加热溶解,不断搅拌,防止糊锅和溢出,直到琼脂完全溶解;再依次移取 50 mL 大量元素母液、5 mL 微量元素母液、5 mL 铁盐母液、5 mL 有机成分母液、4 mL 6-BA 母液、0.1 mL NAA 母液加入搪瓷量杯中;再称量 15 g 蔗糖加入搪瓷量杯中,待蔗糖溶化后加蒸馏水定容至 500 mL;最后用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠调节 pH 至 6.0~6.1,搅拌均匀后趁热分装到培养容器(平底试管装入 10 mL,或每个 250 mL 锥形瓶装入 25 mL)中。培养容器用耐高温高压聚乙烯塑料封口膜封口,并用棉线扎紧封口膜。将培养基置于高压蒸汽灭菌锅中,在 0.1 MPa、121 ℃ 条件下灭菌 10 min。灭菌结束后自然冷却,取出培养基置于接种室超净台中备用。

2.1.3 无菌接种。

2.1.3.1 超净台灭菌及器械准备。用 75% 乙醇棉球擦拭超净工作台内部,再放入诱导培养基、手术刀、镊子、医用剪刀、酒精灯、打火机、废液缸、培养皿、无菌滤纸、75% 乙醇、75% 乙醇棉球、95% 乙醇、0.1% 升汞、无菌水等,打开鼓风机(中等风速)和紫光灯,20 min 后关闭紫光灯,再 10 min 后打开白炽灯开始接种黄山药外植体。

2.1.3.2 黄山药外植体无菌接种。将处理好备用的黄山药幼嫩茎蔓移入经表面消毒的 500 mL 烧杯中,置于超净台里;用 75% 乙醇棉球擦拭双手;接着用乙醇棉球按一个方向擦拭超净台面;点燃酒精灯,将镊子和手术刀在火焰上从近手握处向镊头或刀头过火灭菌,灭菌彻底后插入装有 95% 乙醇的容器中;向盛装茎蔓的烧杯中倒入 75% 乙醇,刚淹没为度,摇动 20 s 后将乙醇倒入废液缸,用无菌水冲洗茎蔓 2 次,洗液倒入废液缸;再向盛装茎蔓的烧杯中倒入 0.1% 升汞溶液,刚淹没为度,不时摇动和搅拌,3 min 后将升汞液倒入废液缸,用无菌水冲洗茎蔓 5 次;于酒精灯火焰旁打开铺有无菌滤纸的无菌培养皿,平放在酒精灯前台面上;用冷却的过火灭菌镊子夹取茎蔓放到培养皿滤纸上,用过火灭菌手术刀切除茎蔓为若干茎段,段长 1.5 cm 左右,至少带 1 个节,节处于茎段中部为宜,此茎段即为外植体;于酒精灯火焰旁揭开培养容器封口膜,用冷却的过火灭菌镊子夹取外植体,按其形态学上端朝上的方向平插入培养基中,插入约 0.5 cm 深;培养容器过火数秒后迅速套膜捆扎封口。

2.1.4 无菌培养。

2.1.4.1 培养室消毒。接种 3 d 前,测量培养室容积,按高锰酸钾 3 g/m³、福尔马林 3 mL/m³ 称量好这 2 种药物,关闭好门窗,在培养室中心放置一个大玻璃缸,依次向其中倒入

福尔马林、高锰酸钾,并迅速离开,以此进行培养室熏蒸消毒。

2.1.4.2 培养条件控制。将接种好的黄山药外植体摆放在于培养室的培养架上,调节光照强度为 1 500 lx,光照时间为 12 h/d,培养温度为(25±1) ℃,对黄山药外植体进行诱导培养。培养过程中注意撤出污染、褐化和外植体死亡的容器。

2.1.4.3 培养结果。按“2.1.4.2”方法,培养 14 d 后,外植体腋芽开始萌动长大,萌芽率为 100%;40 d 左右多数外植体抽生长 3~4 cm 的无菌短枝,也有 15% 的外植体诱导出丛生芽。

2.2 增殖培养

2.2.1 增殖培养基制备。增殖培养基的配方、母液制备方法和固体培养基制备方法与“2.1.2”的相同。

2.2.2 无菌接种。用 75% 乙醇棉球擦拭诱导培养容器表面,将其放入已消毒灭菌(方法同“2.1.3.1”)的超净台中;于酒精灯火焰旁用冷却的过火灭菌镊子夹出诱导培养产生的无菌短枝或丛生芽,放在铺有无菌滤纸的无菌培养皿中,用冷却的过火灭菌手术刀切割成若干个带 1 个叶和 1 个腋芽的外植体,转接到制备好的增殖培养基上,形态学上端朝上,插入培养基约 0.5 cm 深。

2.2.3 无菌培养。培养条件与“2.1.4.1”和“2.1.4.2”的相同。如此培养 8 d 后,外植体出现缓慢生长,25 d 后多数单芽形成多芽体,增殖系数为 4.6。如此反复继代增殖 7、8 代后形成大量无根苗,再接入生根培养基中生根。

2.3 生根培养

2.3.1 生根培养基制备。

2.3.1.1 培养基配方。1/2 MS + NAA 0.6 mg/L + 活性炭 0.5% + 11 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖 + pH 6.0~6.1。

2.3.1.2 培养基制备。先配制各种母液,方法同“2.1.2.2”。再按生根培养基配方配制 MS 固体生根培养基。如果配制 1 000 mL,则用药物天平称取 11 g 琼脂条,剪碎放入有 1 000 mL 刻度的搪瓷量杯中,加蒸馏水 400 mL,置于电炉上加热溶解,不断搅拌,防止糊锅和溢出,直到琼脂完全溶解;再依次移取 50 mL 大量元素母液、5 mL 微量元素母液、5 mL 铁盐母液、5 mL 有机成分母液、1.2 mL NAA 母液,加入量杯中;再用药物天平称取 30 g 蔗糖和 5 g 活性炭加入量杯,搅拌使其溶化均匀后定容至 1 000 mL;用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠调节培养基 pH 至 6.0~6.1,搅拌均匀趁热分装到培养容器。培养基分装量、培养容器封口及灭菌方法同“2.1.3.1”。灭菌结束后自然冷却,取出培养基置于接种室超净台中备用。

2.3.2 无菌接种。增殖培养产生的无根苗长到 3 cm 以上,或具有 3、4 片幼叶时,用 75% 乙醇棉球擦拭增殖培养容器表面,将其放入已消毒灭菌(方法同“2.1.2.3”)的超净台中;于酒精灯火焰旁用冷却的过火灭菌镊子夹出无根苗,放在铺有无菌滤纸的无菌培养皿中,用冷却的过火灭菌手术刀切除无根苗基部少许老化或肿胀部分,形成新伤口,再转接到制备好的生根培养基上,伤口朝下,插入培养基约 0.5 cm 深。

2.3.3 无菌培养。培养条件与“2.1.4.1”和“2.1.4.2”的相同。如此培养15 d时伤口附近出现根点,25 d后长出3条以上的不定根,生根率达80%。

3 展望

黄山药人工栽培时,传统育苗方式是利用根茎和零余子为播种材料,其缺点是播种材料来源少、对药用部位浪费大、育苗成本高,不是未来黄山药人工栽培的合适育苗方法。利用大渡河流域野生黄山药嫩茎进行组培快繁育苗,不仅繁殖迅速、繁殖率高,能够满足黄山药人工栽培用种量,而且能节省大量根茎用作药材。但在生产实践中,一定要想办法解决好组培育苗时的污染问题,并控制好培养条件。此外,用黄山药嫩叶作为外植体,经愈伤组织途径诱导丛生芽,进行离体快繁育苗,也有待加强研究。采用组培快繁培育黄山药种

(上接第98页)

3 分品种等级质量把控的措施及取得成效

3.1 把控措施

3.1.1 依据各品种外观质量进行分级指导。一是掌握各品种的外观质量特征,与国标^[8]中各项质量品质因素进行对接。要求质量体系管理相关人员掌握各品种外观质量品质因素的区别。二是依据掌握的品种外观质量进行各级培训,培训人员包括烟农或烟农雇佣人员、分级专业队或现场二次挑选分级工、评级员等,使其掌握收购各等级的质量标准。

3.1.2 分品种进行收购、成包、仓储与调运。依据各品种收购量制订收购计划,做到具体日期收购的哪个品种。当日收购当日成包,分品种类别存放便于调运,进一步提升等级纯度与工业可用性。

3.1.3 强化专分散收现场管理。加强现场收购质量、收购数量的2个控制。依据专分散收费用标准,建立以激励为主的奖惩机制,制订考核表单,实现对烟农初分或专业化分级或现场二次挑选、预检管理、现场评级等分级和收购环节质量控制。

3.2 取得成效

3.2.1 等级合格率比较分析。从实施前后品种等级合格率可以看出(表4),通过依据各品种外观质量进行分级指导;分品种进行收购、成包、仓储与调运;强化专分散收现场管理等措施,收购烟叶等级合格率有明显提升。

表4 实施品种把控前后等级合格率分析

Table 4 Acceptability analysis of tobacco leaf grade before and after variety management control

抽样等级 Sampling grade	抽样数 Sampling number 把	实施前合格率 Acceptability before imple- mentation//%	实施后合格率 Acceptability after implementation//%	
			云烟 87 Yunyan 87	辽烟 19 Liaoyan 19
X2F	200	76	79	77
C3F	200	78	80	79
B2F	200	77	82	81

3.2.2 上等烟比例及效益比较分析。从实施前后上等烟比

苗用于人工生产,是成本低、效益高的理想途径,不仅能满足市场对黄山药的需求,还能有效保护野生黄山药资源及其生长地的生态环境。

参考文献

- [1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志:第3卷[M]. 北京:科学出版社,1983:717.
- [2] 马海英,周秋丽,王继彦,等. 大鼠肠内菌对黄山药总皂苷代谢及代谢产物鉴定[J]. 中国中药杂志,2002,27(9):680-683.
- [3] 宋发军. 甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究及生产状况[J]. 中成药,2003,25(3):232-234.
- [4] 王蒂,陈劲枫. 植物组织培养[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,2013:233-342.
- [5] 中国科学院成都生物研究所,成都地奥制药集团有限公司. 中国药用薯蓣资源植物研究与产业化开发[M]. 北京:科学出版社,2006:48-49.
- [6] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 2版. 北京:化学工业出版社,2016.

例及效益可以看出(表5),辽烟19上等烟比例提升4%,经济效益增加4 500元/hm²。说明混收时由于品种间质量差异带来等级结构及效益差别明显,对质量稍差品种不利。

表5 实施品种把控上等烟比例及效益分析

Table 5 Analysis of high class leaf proportion and benefits before and after variety management control

品种 Varieties	实施前 Before implementation		实施后 After implementation	
	上等烟比例 Proportion of high class tobacco leaf//%	收入 Income 元/hm ²	上等烟比例 Proportion of high class tobacco leaf//%	收入 Income 元/hm ²
辽烟 19 Liaoyan 19	32	15 000 ~ 22 500	36	19 500 ~ 27 000
云烟 87 Yunyan 87	40	27 000 ~ 33 000	40	27 000 ~ 33 000

4 结语

烟叶等级质量是综合因素影响的结果。在实践中,要根据品种在种植区域气候、土壤、栽培习惯分析品种的区域外观特征表现,掌握品种间外观质量因素特征差异,严格按照国标把控品种内相邻等级界限;要根据收购具体情况加强分级技术指导和相关人员培训,执行严格的考核管理制度,才能解决实际中等级质量存在的根本问题,进而提升等级纯度,满足客户需求。

参考文献

- [1] 《烟叶分级工(一至二级)专业知识》编写组. 烟叶分级工(一至二级)专业知识(试用)[M]. 北京:中国烟叶公司,2014.
- [2] 罗永露,赵杰宏,苏贤坤,等. 中间香型烟叶不同生态区烤烟 K326 的烟叶质量分析[J]. 广东农业科学,2014,41(19):13-17.
- [3] 王亚平. 烟叶分级存在问题及改进措施[J]. 宁夏农林科技,2013,54(1):112-113.
- [4] 杨祝军. 烤烟分级中容易混淆等级的区分方法[J]. 甘肃农业,2013(13):4-5.
- [5] 李兵. 烟农在烟叶分级中存在的主要问题及对策[J]. 重庆与世界,2015(12):31-32.
- [6] 周世民,李帆. 影响烟叶收购等级质量的因素和对策探讨[J]. 现代农业科技,2009(24):87-88.
- [7] 常爱霞,瞿永生,计玉,等. 福建产区不同香型烤烟质量特征分析[J]. 中国烟草科学,2011,32(4):1-5.
- [8] 中国烟草总公司. 烤烟:GB2635-1992[S]. 北京:中国标准出版社,1992.