

李明军 著 张嘉宝 审

Tissue Culture and Application of
Dioscorea opposita Thunb.

怀山药

组织培养及其应用



科学出版社

www.sciencep.com

怀山药组织培养及其应用

Tissue Culture and Application of
Dioscorea opposita Thunb.

李明军 著

张嘉宝 审

河南师范大学学术专著出版基金资助项目

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是国内首部系统研究怀山药组织培养及其应用的学术专著。内容包括怀山药及其研究概况,怀山药组织培养的基本原理、设备和操作技术,怀山药愈伤组织的诱导形成、分化与植株再生,脱分化与再分化过程中生理生化变化规律及机理研究,怀山药试管苗的离体快速繁殖、壮苗生根及移栽技术的研究,怀山药微型块茎的诱导形成和种质资源的离体保存,怀山药的脱毒、快繁、基地建设及产业化技术研究、问题与展望等。全书既有基础理论,又有实践应用,技术含量高,实用性强。书中还附有植物组织培养中常用的资料和数据。

本书对从事植物组织培养的科技人员具有重要的参考价值,同时也可作为高等院校生物学、农学、中草药及植物生物技术专业的研究生、本科生和教师的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

怀山药组织培养及其应用/李明军著. —北京:科学出版社,2004.7
ISBN 7-03-013901-1

I. 怀... II. 李... III. 山药-组织培养 IV. S567.035.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 070075 号

责任编辑:李海玲 / 责任校对:连秉亮

责任印制:刘 学 / 封面设计:一 明



科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

南京理工排版校对有限公司照排

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2004 年 8 月第一次印刷 印张:12 1/2 插页 2

印数:1—1 500

字数:270 000

定价:32.00 元

序

李明军先生在学生时期勤奋好学、刻苦钻研,具有较强的独立科研工作能力,大学毕业后一直从事植物生理学和植物组织培养方面的教学与科研工作,主持河南省自然科学基金等多项科研项目,在怀山药组织培养工作中作出了显著成绩,发表了 40 多篇论文,曾获多项科学奖励。

怀山药是我国著名的“四大怀药”之一,药食兼用,因其具有独特的药用价值,被誉为“怀参”,并远销东南亚,畅销国内外。但在长期的营养繁殖中,怀山药体内积累了大量的病毒,导致产量下降,品质退化。李明军先生主持下的研究小组,通过植物组织培养、茎尖脱毒复壮很快提高了怀山药的产量和质量,解决了生产上存在的难题,是植物组织培养应用于生产实践的又一典范。

本书是他多年来研究我国道地中药材“怀山药”的结晶,是国内首部系统研究怀山药组织培养及其应用的学术专著。书中图文并茂,既有基础理论又有实践应用,技术含量高,实用性强,对山药科技工作者具有指导作用,对组织培养科技工作者及高校教学工作者具有参考价值。希望本书的出版有助于推动植物组织培养研究工作的进一步发展,为促进植物组织培养在理论与实践应用上作出更大贡献。

中国科学院植物研究所

郭仲琛

2004. 5. 28

前 言

在 Haberlandt(1902)提出的植物细胞全能性理论的指导下诞生的植物组织培养技术,自 20 世纪 60 年代以来,得到了迅猛的发展,并已渗透到生物科学的各个领域,成为生物科学中重要的研究和技术手段之一,广泛应用于农业、林业、工业和医药业,产生了巨大的经济效益和社会效益,已成为当代生物科学中最有生命力的一门学科之一。怀山药是我国著名的“四大怀药”之一,药食兼用,因其具有独特的药用价值,被人们誉为“怀参”,畅销国内外。但在长期的营养繁殖中,其体内积累大量的病毒,导致产量下降,品质退化,且通过营养繁殖的速度极慢,严重影响优良品种或无毒苗的迅速推广应用,致使某些优良品种(如铁棍山药)处于濒临灭绝的境地,如何尽快解决这些问题,已成为怀山药生产中亟待解决的重大课题。植物组织培养技术的应用,为解决怀山药生产中存在的实际问题提供了有效途径,它不仅可以怀山药为材料研究生命科学中的重大理论问题——脱分化与再分化及其机理,而且也可解决怀山药的脱毒快繁以及种质资源的离体保存等诸多实际问题。

12 年前,作者在导师张嘉宝教授和郭仲琛研究员的指导和关怀下,经过多方调查选择了我国特有资源“四大怀药”作为研究对象,对怀山药、怀地黄的组织细胞培养及应用进行了系统的研究。目前,“四大怀药”的组织培养及快繁技术体系均已建立,并在怀区建立了繁殖推广应用基地。

本书是首部系统介绍我国道地的中药材——怀山药组织培养的学术专著,是课题组全体人员十余年来辛勤劳动的结晶。在撰写时,作者力求做到理论与实践相结合,既具有较高的理论性和技术性,又具有较强的实用性和可操作性。全书共十章,第一章介绍怀山药的生物学特性、药用价值及研究概况;第二章介绍怀山药组织培养的基本理论、设备和技术;第三章到第九章介绍了愈伤组织的诱导、分化和植株再生、脱分化和再分化的机理、试管苗的快繁、壮苗生根和移栽技术、微型块茎的诱导形成、试管苗的离体保存、脱毒快繁、基地建设以及产业化技术;第十章介绍存在的问题与展望。文中附有植物组织培养中常用的数据和资料。因此,本书不仅可作为山药(或薯蓣属植物)组织培养工作者的指导书,而且也可作为其他植物组织培养工作者的参考书及工具书,同时还可作为高等院校生物学、农学、中药材和生物技术专业师生的教学参考书。

本课题在研究过程中得到了河南省科技厅和教育厅的项目资助。焦祯、刘颖、陈明霞、郭君丽、张峰、洪森荣、郝保山、张宝华、王天亮等在基础理论研究和基地建设等方面做了大量的工作,郭闽英、陈明霞、于相丽、张晓丽、徐鑫、刘志刚等在书稿录入、排版和校对方面做了大量的工作。本书完稿后由张嘉宝教授主审,我国著名的植物组织培养专家、中国科学院植物研究所郭仲琛研究员在百忙中为本书作序,姬长忠、刘萍等同志对本书也提出了一些宝贵的建议。在出版过程中,得到了河南师范大学学术专著出版基金的资助,科学出版社上海办事处的李海玲编辑给予了大力的支持和帮助。在此一同表示衷心的感谢!

限于作者的水平和经验,书中难免会有缺点和错误,诚请读者批评指正。

作者
2004 年 2 月
于河南师范大学

目 录

序

前言

第一章 怀山药及其研究概况	1
一、怀山药简介	1
二、怀山药的研究概况	3
第二章 怀山药组织培养的基本原理及操作技术	5
一、怀山药组织培养的概念	5
二、怀山药组织培养的理论依据	5
1. 植物细胞全能性的概念	5
2. 植物细胞全能性的实现	5
三、怀山药组织培养的优点	6
四、怀山药组织培养的意义	7
1. 理论意义	7
2. 实践意义	7
五、怀山药组织培养的基本设备	8
1. 实验室	8
2. 常用仪器设备	11
3. 必要的玻璃器皿	15
六、怀山药组织培养的基本操作技术	16
1. 玻璃器皿的洗涤	16
2. 培养基及其配制方法	18
3. 培养材料的选择及表面消毒	24
4. 无菌操作(接种)	26
5. 无菌培养	28
6. 污染和褐变的原因及其预防措施	29
7. 生理生化指标的测定方法	31
8. 电泳方法	37
9. 组织细胞学研究方法	39
10. 试管苗气孔变化规律的研究方法	39
11. 微型块茎超微结构的观察法	40
第三章 怀山药愈伤组织的诱导形成	41
一、茎段愈伤组织的诱导形成	41
1. 光下茎段愈伤组织的诱导形成	41
2. 暗处茎段愈伤组织的诱导形成	43
3. 温度对茎段愈伤组织诱导的影响	43
二、叶片愈伤组织的诱导形成	44
1. 光下叶片愈伤组织的诱导形成	44

2. 暗处叶片愈伤组织的诱导形成	45
3. 叶龄对愈伤组织诱导的影响	46
4. 温度对铁棍山药叶片愈伤组织诱导的影响	47
三、微型块茎愈伤组织的诱导	47
1. 光下植物生长物质组合对微型块茎愈伤组织的诱导	47
2. 暗培养下不同植物生长物质对比对愈伤组织的诱导	48
3. 光质对铁棍山药微型块茎愈伤组织诱导的影响	50
四、怀山药脱分化过程中生理生化变化规律的研究	53
1. 叶片和茎段脱分化过程中生理生化变化	53
2. 微型块茎脱分化过程中生理生化变化	54
五、怀山药脱分化过程中组织细胞学观察	59
1. 脱分化过程中组织细胞学变化	59
2. 脱分化过程中细胞分裂方式	60
六、愈伤组织生长过程中染色体数目的稳定性	61
七、讨论	61
1. 外植体对怀山药脱分化的影响	61
2. 光对怀山药脱分化的影响	62
3. 怀山药脱分化时愈伤组织的起源	64
4. 怀山药脱分化过程中细胞的分裂方式	65
5. 怀山药愈伤组织形成过程的分期	65
第四章 怀山药愈伤组织的分化与植株再生	67
一、茎段愈伤组织的分化与植株再生	67
1. 47 号山药芽的分化	67
2. 铁棍山药芽的分化	68
二、微型块茎愈伤组织的分化与植株再生	69
1. 不定芽的诱导发生过程	69
2. 植物生长物质对不定芽诱导的影响	70
3. 带芽体愈伤组织的继代培养	71
4. 光质对愈伤组织分化的影响	71
三、怀山药微型块茎再分化过程中生理生化变化规律的研究	72
1. 再分化过程中可溶性蛋白含量的变化	72
2. 再分化过程中 POD 活性的变化	72
3. 再分化过程中总蛋白变化的电泳图谱	73
4. 再分化过程中 POD 同工酶谱的变化	73
5. 再分化过程中蛋白水解酶谱的变化	73
四、怀山药脱分化与再分化机理探讨	74
1. 光照对怀山药再分化的影响	74
2. 植物生长物质在怀山药脱分化和再分化中的作用	75
3. POD 与怀山药微型块茎脱分化和再分化的关系	75

4. 蛋白水解酶与怀山药微型块茎脱分化和再分化的关系	76
5. 愈伤组织继代培养中分化能力及染色体的稳定性	77
6. 高频率愈伤组织再生体系为怀山药遗传转化提供了良好的受体系统	77
第五章 怀山药试管苗的快速繁殖	79
一、怀山药快繁的过程	79
1. 无菌培养体系的建立	79
2. 诱导外植体生长与分化	80
3. 中间繁殖体的增殖	80
4. 壮苗与生根	81
5. 试管苗驯化、移栽	81
二、怀山药试管苗繁殖的类型及影响因素	81
1. 腋生枝型	81
2. 器官发生型	88
3. 多芽体发生型	88
4. 微型块茎诱导发生型	89
三、怀山药试管苗繁殖速率的计算方法	89
1. 理论计算	89
2. 实际计算	90
四、怀山药试管苗快繁工作的计划安排	90
五、提高试管苗繁殖速度的方法	92
1. 改进培养基	93
2. 改善培养条件	94
六、光质对试管苗生长和繁殖过程中生理生化变化的影响	94
1. 光质对试管苗叶绿素含量的影响	94
2. 光质对试管苗 NR 活性的影响	95
3. 光质对试管苗 IAA 氧化酶活性的影响	95
4. 光质对试管苗可溶性蛋白含量变化的影响	96
5. 光质对试管苗可溶性总糖含量变化的影响	96
七、怀山药试管苗的继代培养	96
1. 试管苗的继代方法	97
2. 影响试管苗继代培养的因素	97
八、讨论	97
1. 怀山药试管苗快繁的途径	97
2. 怀山药试管苗快繁的影响因素	98
3. 光质对试管苗生长发育的影响	99
4. 光质对试管苗生理生化变化的影响	100
第六章 怀山药试管苗的壮苗生根与移栽	102
一、怀山药试管苗的壮苗生根	102
1. 根的发生过程	102

2. 影响壮苗生根的因素	102
3. PP ₃₃₃ 对试管苗壮苗生根机理的研究	109
二、试管苗的移栽	111
1. 试管苗移栽成活率低的原因	111
2. 试管苗移栽前后气孔变化规律	112
3. 提高试管苗移栽成活率的措施	112
三、讨论	114
1. 怀山药试管苗壮苗生根的机理	114
2. 影响怀山药试管苗移栽的因素	115
3. 气孔行为对试管苗移栽成活率的影响	115
4. 试管苗的质量对移栽成活率的影响	116
5. 移栽基质对试管苗移栽成活率的影响	116
第七章 怀山药微型块茎的诱导形成	117
一、微型块茎的概念	117
二、微型块茎的用途	117
1. 种栽微型化	117
2. 病毒检测	117
3. 种质保存与交换	117
三、微型块茎的特点	117
四、微型块茎的形成过程	118
五、微型块茎的试管生产技术	119
六、微型块茎诱导形成的影响因素	119
1. 植物生长物质对微型块茎诱导形成的影响	119
2. 碳源对微型块茎诱导形成的影响	122
3. 氮源对微型块茎诱导形成的影响	123
4. 光照时间对微型块茎诱导形成的影响	123
5. 光质对微型块茎诱导形成的影响	123
七、微型块茎形成过程中生理生化变化	124
1. 光质对铁棍山药试管苗微型块茎中可溶性糖含量的影响	124
2. POD活性的变化	125
3. 可溶性蛋白含量的变化	126
4. 叶绿素含量的变化	127
八、微型块茎结构的电镜观察	127
九、微型块茎的贮藏及贮藏过程中的生理生化变化	127
1. POD活性的变化	128
2. 可溶性蛋白含量的变化	129
十、微型块茎的萌发	129
十一、讨论	130
1. 生长物质对微型块茎诱导形成的影响	130

2. PP ₃₃₃ 对微型块茎诱导形成的影响	131
3. AC对微型块茎诱导形成的影响	131
4. 糖类对微型块茎诱导形成的影响	131
5. 氮源对微型块茎诱导形成的影响	132
6. 光照和黑暗对微型块茎萌发成苗的影响	132
7. 微型块茎是怀山药离体繁殖和保存的有效途径	132
第八章 怀山药种质资源的离体保存	133
一、离体保存的概念	134
二、离体保存的优点	134
三、离体保存的形式	134
1. 常温保存法	134
2. 常低温和低温保存法	134
3. 超低温保存法	135
四、怀山药离体保存的主要步骤	135
1. 种质资源的收集	135
2. 离体培养	135
3. 离体培养物的保存	135
五、讨论	139
第九章 怀山药脱毒快繁及产业化技术研究	142
一、研究背景、目的及意义	142
1. 研究背景	142
2. 研究目的	143
3. 研究意义	143
4. 国内外同类研究现状	143
二、研究内容及技术路线	144
1. 研究内容	144
2. 技术路线	144
三、怀山药感染病毒的症状及种类	144
1. 植物病毒的种类、症状、危害及其传播途径	144
2. 怀山药感染病毒后的症状	146
3. 怀山药感染病毒的种类鉴定	146
四、怀山药无毒苗的获得	148
1. 茎尖培养脱毒的理论依据	148
2. 茎尖培养脱毒的方法	149
3. 茎尖成苗率和脱毒率的影响因素	150
五、怀山药无毒苗的鉴定	152
1. 直接测定法(目测症状法)	152
2. 指示植物法	153
3. 血清学检测法	153

4. 电子显微镜法	153
5. PCR 检测法	153
六、无毒苗的保存	154
1. 无毒苗的隔离保存	154
2. 无毒苗的离体保存	154
七、无毒苗的快繁	154
八、无毒苗的壮苗生根	155
九、无毒苗的移栽	155
1. 开瓶炼苗移栽法	155
2. 直接移栽法	155
十、无毒苗田间生长及产量比较	156
1. 无毒苗进入大田后生长情况	156
2. 无毒苗种栽种后生长情况	156
3. 示范试验及增产情况	157
十一、怀山药病毒病及其脱除方法的探讨	157
十二、怀山药无毒苗繁殖基地的建设	158
十三、怀山药脱毒试管苗的生产工艺流程	159
1. 生产工艺流程	159
2. 快繁技术要点	160
十四、怀山药无毒苗生产效益分析	160
1. 经济效益分析	160
2. 社会效益分析	160
3. 环境效益分析	160
第十章 问题与展望	162
1. 存在问题	162
2. 研究展望	162
附录	165
附表 1 蒸汽压力与蒸汽温度的关系	165
附表 2 常用植物生长物质的 mg/L(ppm)和 $\mu\text{mol/L}$ 换算表	165
附表 3 常用植物生长物质的 $\mu\text{mol/L}$ 和 mg/L(ppm)换算表	165
附表 4 植物组织培养中常用的无机物和有机物的化学式及分子量	166
附表 5 常用的植物生长物质理化性质和生理作用	166
附表 6 常用的维生素及其主要性质	167
附表 7 植物组织培养中培养物的不良表现及改进措施	168
附表 8 植物组织和细胞培养常用培养基成分(单位:mg/L)	169
附表 9 植物组织和细胞培养常用培养基附加成分(单位:mg/L)	170
参考文献	171
图版	183

第一章 怀山药及其研究概况

一、怀山药简介

山药,又名薯蓣,为薯蓣科薯蓣属的一种多年生缠绕草质藤本植物。据《本草纲目》记述,在唐朝代宗年间,因薯蓣的“蓣”字与代宗皇帝李豫的“豫”字读音相同,须避讳,故将薯蓣改为薯药;到了宋朝,“薯”字又与宋赵曙的“曙”字音相同,加之原生太行山中遂又改薯药为山药,一直沿袭至今(叶璐君等,2001)。山药在全国大部分地区(如河南、河北、山西、山东、广东、广西等地)均有种植,但以产于河南温县、武陟、沁阳、博爱一带的品质为最佳,因此地古时归怀庆府所辖(也称怀川平原),故名怀山药。

怀山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)与怀地黄、怀牛膝、怀菊花合称为我国著名的“四大怀药”。它的根茎呈棍棒状,肉质肥厚,直径2~7 cm,外皮黑褐色,生有稀须根(铁棍山药)(《中国药典》1990年版);茎有细线,棱无毛,右旋缠绕;叶在茎下部互生,中部以上为对生,稀为3叶轮生;叶腋常生珠芽,俗称“山药蛋”,医药上称为“零余子”;花单性,异株,成细长穗状花序,雄花序直立,雌花序下垂,花序轴呈明显“之”字形曲折;雄花黄绿色,雌花乳白色;蒴果三棱状扁圆形,果翅长、宽近相等,种子扁卵圆形,四周有膜质翅;花期6~9月,果期7~11月。

怀山药含有皂甙、黏液质、胆碱、尿囊素、多巴胺、山药碱、淀粉、糖蛋白、氨基酸、淀粉酶、多酚氧化酶、维生素C(Vc)、甘露聚糖、植酸、钙、磷、铁、锰等几十种营养成分。现已证明,温县产的山药总氨基酸含量、必需氨基酸含量与可溶性总糖含量均高于其他地区所产的山药,进一步证实了怀山药的优质性(马汴梁,2003)。

怀山药药用价值很高,历代医学家曾称为“理虚之要药”,“滋补药中的上品”,民间还将其称为“大棒人参”。据考证,早在二千多年前,东汉名医张仲景就用山药入药。明朝龚延贤所著《寿世保元》载“山药以河南怀庆者良”;《神农本草经》将山药列为“主伤中,补虚,除寒热邪气,补中益气,长肌肉,久服聪耳明目”的上品;《日华子本草》说山药“助五脏,强筋骨,长志安神,主泄精健忘”;《本草纲目》认为,山药能“益肾气,健脾胃,止泄痢,化痰涎,润皮毛”;《新修本草》说:“薯蓣日干捣细,食之大美,久服轻身,不饥延年。”清代医学家李修园说:“山药能补肾填精,精足则阴强、目明、耳聪。”《药性本草》则认为,山药能“补五劳七伤,去冷风,镇心神,安魂魄,补心气不足,开达心孔,多记事”。

近年来,我国科学家从怀山药中提取出“怀山总甙”,它经过裂解可以形成脱氢表雄酮(Dehydroepiandrosterone,简称DHEA),医学家们研究后认为DHEA与人体分泌的这种物质结构相同(叶璐君等,2001)。人体肾上腺分泌的激素有150多种,其中在血液中含有最高的就是DHEA。大量的研究证实,DHEA是合成人体雌激素、雄激素以及其他一些人体激素的最基本物质,是体内50余种激素所需要的“前体物质”,常被科学家们称为“激素之母”。在人体的整个生理过程中,DHEA含量呈抛物线形变化:胎儿时期合成的

DHEA 一般只会维持到出生后的几个月;半岁的含量变化开始至青春期初期,人体只分泌少量的 DHEA;青春期之后,DHEA 的分泌量才会持续提升;30 岁之后分泌量逐渐衰减下来,50 岁左右体内的 DHEA 浓度只剩下最高值的一半,70 岁时只有峰值的 25%,90 岁时只剩下峰值的 10%。西方一些医学专家通过大量临床实验证明:主动补充 DHEA,可以提高机能,延缓衰老,并能预防和治疗多种中老年人常见的疾病。DHEA 的生理抛物线与中国《黄帝内经素问》对人类生理阶段的划分非常相似,故有的中医师认为 DHEA 很可能就是中医所说的“肾水”、“天癸”之类的物质,与人类生老病死密切相关。研究表明,人在 20~30 岁之间精力最充沛,这是因为 DHEA 在这一时期含量最高;人在年过四十时,身体就会不如从前,经常出现腰酸背痛、睡眠不好、白天打瞌睡、力不从心、上楼梯气喘吁吁,去医院检查又没有明显的症状出现,医生认为这是处于“第三态”,也就是亚健康状态,而最让人苦恼的是没有对症的药物可以服用。人体第三态主要是机体衰老的结果,机体衰老是从细胞衰老开始的。DHEA 能延缓细胞衰老,是改善人体第三状态最好的生命活性物质。科学家认为,DHEA 减少或缺乏是第三态形成的内在因素,补充 DHEA 就可以帮助人们走出第三态,使睡眠改善,心情愉快,充满活力,显得年轻,起到健身强体、延缓衰老的效果。怀山药中的“怀山总甙”,进入人体后经过裂解形成 DHEA,使体内的 DHEA 达到年轻时的浓度,从而起到延缓衰老、保持靓丽肌肤的效果。因此,DHEA 又被一些专家称为“青春因子”或“青春素”,并被誉为“生命之源”或“青春之泉”。

怀山药能供给人体大量的黏液蛋白,它是一种多糖蛋白的混合物,对人体有特殊的保健作用,能预防心血管系统的脂肪沉积,保持血管的弹性,防止动脉粥样硬化过早发生,减少皮下脂肪沉积,避免出现过度肥胖。

怀山药的重要成分之一——多巴胺,具有扩张血管、改善血液循环的功能,该成分在循环衰竭的救治中占有重要位置。

怀山药含有丰富的胆碱和卵磷脂,具有增强神经细胞活性,提高人的记忆力等功能。故前人称怀山药能补心气、安心神、开心窍、治健忘,充分肯定了它的养心益智作用。

怀山药富含对人体有益的微量元素,如锰、锌等。有人认为,怀山药的抗衰老作用与其含锰有关,世界卫生组织认为锰是对老年人心血管有益的必需元素,具有抗老延年的作用(马汴梁,2003)。

糖尿病是一种常见新陈代谢疾病,类似中医的“消渴症”,是危害人类健康的四大疾病之一。研究认为,怀山药中富含锌,锌在体内对延缓生物膜的老化,维持正常的物质代谢有一定的意义。糖尿病患者锌含量低,山药治疗糖尿病与其含锌量较高有关(马汴梁,2003)。中医认为,其病理主要是阴虚燥热所致,表现为本虚标实,而以阴虚为本燥热为标,两者互为因果,燥热甚则阴愈虚,阴愈虚则燥热愈甚。怀山药性味平和,不寒不燥,可充五脏,为治虚要药,它既能补气,又能养阴,补而不滞,养而不腻,补脾气而益胃阴,适用于糖尿病患者长期食用,对于轻型糖尿病有显著疗效。

现代药理研究证明,怀山药具有营养滋补、诱生干扰素、增强机体免疫力、调节内分泌、补气通脉、镇咳祛痰、平喘等作用,能改善冠状动脉及微循环血流,可治疗慢性气管炎、冠心病、心绞痛等。怀山药具有补气润肺的功效,既可切片煎汁当茶饮,又可切细煮粥喝,对虚性咳及肺癆发热患者都有很好的治疗效果。秋季气候较干燥,易伤肺津,导致阴虚,

出现口干、咽干、唇焦、干咳等症状,此时进补山药最为适宜,因山药是平和之品,为滋阴养肺之上品。

怀山药以其独特的药性,素为医道所推崇,在国家药品标准 1 218 种制剂中含有山药的中成药制剂 289 种,为“六味地黄丸”、“金匱肾气丸”、“杞菊地黄丸”、“薯蓣丸”等多种名药的主要成分,尤以治疗消渴症(糖尿病)、脾虚症见长,故在中国几大药典如《药典》、《本草纲目》、《药鉴》、《医学衷中参西录》等中占有重要的地位,其功能在各药典中均有大量记述。

总之,怀山药药食皆宜,如作食用,则营养丰富,是消费者非常喜爱的滋补品;如作药用,则味甘性平,入脾、肺、肾三经,既补气养阴,又益肺止咳、固肾涩精、降糖降脂,调节人体免疫系统,增强人体免疫力,抗衰老,有益于人体健康。长期以来,怀山药一直是我国道地的中药材和传统的出口商品,远销马来西亚、新加坡、印度尼西亚、日本等国,倍受赞赏,并被誉为“怀参”或“大棒人参”。

二、怀山药的研究概况

怀山药由于其独特的药用和食用价值,引起了国内外学者的广泛关注,并从各个角度对其进行了深入研究。

在国外,Yakuwa 等(1981)对中国山药品种(*D. opposita* Thunb. cv. Nagaimo)的花、果和种子进行了研究;Tatsuki(1982, 1983)对中国山药中黏液质的特性进行了研究;Hashimoto 等(1980)研究了山药碱的结构特征;Araki 等(1983)研究了由日本山药和中国山药杂交后获得的杂交种子的特性;Nagasawa 等(1989)对中国山药胚性细胞悬浮培养和植株再生进行了研究;Yoshida 等(1998, 2002)研究了光周期和温度对中国山药的变种的发育以及块茎形成的影响;Asano 等(1999)从两种不同的中国山药变种中获得了杂交种;Mitsuro 等(1999)运用免疫 PCR 和聚合酶链反应及限制性片段长度多态性(RFLP)方法从中国山药变种中检测到了日本薯蓣花叶病毒;Okamoto(1999, 2000)研究了种植密度等因素对中国山药高产的影响,同时还研究了该品种的种子繁育方法,获得了高产株系;Kanazawa(2002)研究了中国山药的根茎形成和随后的生长发育规律。

在国内,张重义等(1991)研究了施肥对怀山药的影响,结果认为,施麦饭石和阳起石不仅可提高怀山药的产量,而且还可提高怀山药中蛋白质和淀粉的含量,尤其可以提高中性多糖和酸性多糖,以及铜、锰、锌的含量;贾士奇等(1991)对铁棍山药、太谷山药、山薯、褐苞薯和珍薯五个品种进行了质量比较,结果证明:铁棍山药中的蛋白质、钙、锰、锌、磷和多糖等含量均居首位;赵海珍等(1992)研究了怀山药系列保健食品的加工,提出了低糖山药脯、糖水山药罐头、山药果仁软糖和山药羹等的制作和加工方法;刘荷芬等(1995)对怀山药的生长发育规律进行了研究,认为主蔓 6 月中旬生长最快,9 月下旬叶片转黄,5 月底为地下块茎形成期,6 月底为地下块茎迅速生长期;苗明三(1996)研究发现怀山药中多糖含量较多,并且活性较高,可以明显提高正常小鼠的免疫功能,认为多糖可能是怀山药补益作用的主要活性成分;赵玉生等(2001)和尹郑红(2000)分别研究了怀山药和怀山药汁的加工工艺,提出了各自的加工工艺流程,对怀山药的深加工进行了有益的探索;徐树峰(2001)以怀山药为原料,通过合适的工艺流程,制成了怀山药酸奶;刘红彦等(2001)研究

了怀山药的规范化栽培管理技术,对整地、播种等各个生长时期都提出了具体的管理方法和实施措施;蒋艳玲(2002)研究了怀山药中多糖对衰老小鼠免疫器官组织的影响,认为怀山药多糖可以明显减轻衰老模型小鼠免疫器官组织的萎缩;王元梁等(2002)对怀山药的常用伪品参薯和脚板苕从性状、显微结构、理化性质等角度进行了分析和讨论,认为怀山药最佳,其他不能替代;赵玉琴(2002)研究了怀山药的规范化种植,提出了规范化种植的措施和意义;杨好伟等(2002)研究了怀山药的不同栽培方式对产量和经济效益的影响,认为打孔、管道和打眼管道栽培怀山药与常规栽培方法相比,分别增产 88%、40%和 60%,商品块茎分别增加 103%、75%和 100%,收获时劳力投入量分别减少 100%、500%和 500%,是怀山药高产规范化种植的一条有效途径。

综合国内外研究可以看出,国外对中国山药的研究较多,组织培养开展得较早,而国内的研究则多集中在怀山药的大田栽培、管理、育种、加工、药理等方面,有关怀山药的组织培养及应用研究极少,几乎是空白。现在怀山药的生产越来越受到重视,但在生产中却存在着如下问题:一是繁殖速度慢,即传统的怀山药生产是在收获季节选健壮、无病虫害的根茎或芦头贮藏,次年种植季节取出切断种植,这种传统的“春种、秋收、冬藏”(即通过年年栽种保存)方式繁殖速度很慢;二是由于长期的营养繁殖,导致病毒和病菌的积累与传播,致使其品质退化、产量下降,尤其是病毒病一直是怀山药生产中难以解决的问题;三是在怀山药的长期种植过程中,由于自觉不自觉的选择及长期的生态适应,形成了一些地方品种、杂交品种、外引品种等,这样在怀山药的主产区就有很多山药品种,它们虽然都有相同的生态环境,但是它们的化学成分和药效却差别很大,产量也不同。由于受经济利益的驱使,一些药农和药商用没有药用价值而产量却很高的普通山药冒充怀山药,给整个中药材市场造成了混乱,给临床用药及消费者造成了严重的危害,这种鱼目混珠、以假乱真的做法,致使产量较低的道地的怀山药(如铁棍山药)被一些产量较高的其他品种所取代而濒临灭绝,其结果将会导致道地怀山药品种资源的流失。因此,如何尽快提高怀山药的产量和品质,开展怀山药种质资源的保存和利用,并使其优良品种迅速推广种植,已成为怀山药生产中亟待解决的一个重要问题。

针对怀山药生产中存在的实际问题,我们研究室(即河南师范大学生命科学学院“四大怀药”组织培养研究室)从 20 世纪 90 年代开始对怀山药的组织培养进行了系统的研究,从植物生长物质、光质、外植体等对怀山药离体快繁、多芽体形成、微型块茎的诱导形成、微型块茎的脱分化与再分化等方面进行了深入研究(李明军等,1997a,1999,2000a,2000b,2000c,2000d;陈明霞等,2003a,2003b;郭君丽等,2003)。在此基础上,近年来又对怀山药病毒病(李明军等,2003)、茎尖培养与植株再生、脱毒苗的快繁、壮苗生根、移栽和工厂化生产等进行了系统研究,为怀山药优良品种或脱毒苗的产业化生产奠定了基础。

第二章 怀山药组织培养的基本原理及操作技术

一、怀山药组织培养的概念

怀山药组织培养(*D. opposita* Thunb. tissue culture)是指在无菌条件下,将怀山药的任何器官、组织、细胞或原生质体,在人工配置的培养基上培养,并给予适当的培养条件使其生长、分化形成完整再生植株的过程。由于培养的是脱离母体的培养物,在试管内进行,所以也称为离体培养(*culture in vitro*)或试管培养(*in test-tube culture*)。

根据培养对象的不同,怀山药组织培养可分为器官培养、组织培养、细胞培养和原生体培养等。

根据培养过程,将从怀山药上分离下来的部分进行第一次培养,称为初代培养(primary culture),以后将培养物转移到新的培养基上继续培养,则统称为继代培养(subculture)。

根据培养基物理状态的不同,将加入琼脂使培养基呈半固体状态的培养,称为固体培养(solid culture);将不加入琼脂培养基呈流体状态的培养,称为液体培养(liquid culture)。

二、怀山药组织培养的理论依据

怀山药组织培养的理论依据是植物细胞的全能性。

1. 植物细胞全能性的概念

植物细胞全能性(cell totipotency)是指植物体的任何一个细胞都携带有该植物的全套遗传基因,具有发育成完整植株的潜在能力。在离体培养的情况下,这些基因可以表达并形成完整的再生植株。

Haberlandt(1902)最早提出植物细胞全能性的理论并进行了细胞培养的实验研究,虽然限于当时的条件和技术水平,培养没有得到成功,但在他所提出的理论指引下,许多科学工作者一直在植物组织培养领域进行不懈的探索,直到1958年Steward通过培养使胡萝卜根的悬浮培养细胞诱导分化产生了植株,才使植物细胞全能性的理论得到了证实。因此,Haberlandt被后人誉为“植物组织培养之父”。

2. 植物细胞全能性的实现

1) 受精卵细胞全能性的实现

在植物的生长发育中,从一个受精卵开始经过细胞分裂和分化,引起极性的形成,最后发育成种子。一粒成熟的种子含有一个小小的胚,构成胚的细胞几乎都保持着未分化的状态和旺盛的细胞分裂能力,其细胞质浓稠、细胞核较大、细胞与细胞之间有很大差异,这些细胞都可以叫做胚性细胞或分生细胞或未分化细胞。在适宜的条件下,种子开始萌

发,构成胚的所有细胞通过分裂而增加细胞的数目,但随着时间的推移,细胞的形态和功能发生了变化,有的仍保持旺盛的分裂能力,有的则逐渐失去分裂能力,形成了根、茎和叶的细胞,细胞的这种在形态结构和功能上发生永久性(不可逆性)变化的过程叫做分化(differentiation)。

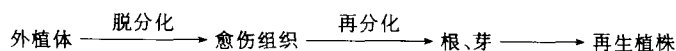
分化主要由细胞内的基因决定,也就是说分化是基因在时间和空间两个方面差次表达的结果。分化的结果导致细胞分裂能力的丧失,伴随的是细胞的成熟和组织器官的形成,即植物的根、茎、叶、花、果实和种子的形成,使一个成熟植物体出现。种子萌发后,形成根、芽、叶、开花、结实,最后形成完整植株的过程就是该受精卵细胞全能性的表现,也即是该物种全部遗传信息的表现。在正常的自然状态下,这些已经分化的细胞不会再恢复分裂能力而重新开始细胞的分裂,直到植物体死亡为止。

2) 体细胞全能性的实现

植物的体细胞(由合子的有丝分裂产生)也具有全能性。在一个完整的植株上某部分的体细胞只表现一定的形态和功能,这是由于他们受到了具体器官或组织所在环境的束缚,但其遗传潜力并没有丧失。一旦这些细胞脱离原来所在的器官或组织,成为离体状态时,在一定的营养、植物生长物质和外界条件的作用下,就可表现出全能性而生长发育成完整的植株。

当细胞、组织或器官置于培养基上进行离体培养时,这些被培养部分(称为外植体,explant)就会进行细胞分裂,形成一种液泡化的呈无定形的薄壁细胞团,称为愈伤组织(callus)。由高度分化的、失去分裂能力的细胞回复到分生状态并进行分裂形成愈伤组织的过程称为脱分化(dedifferentiation)。经过脱分化的细胞如果条件合适,就可以长久保持旺盛的分裂状态而不发生分化。由无分化的愈伤组织细胞再转变成具有一定结构、执行一定生理功能的细胞团和组织,构成一个完整的植物体或植物器官的过程,叫做再分化(redifferentiation)。一个已分化细胞要表达其全能性,就要经过脱分化和再分化的过程,这就是植物组织和细胞培养所要达到的目的。在有些情况下,再分化也可不经过愈伤组织而直接发生于脱分化的细胞。

体细胞全能性的实现可用下式表示:



三、怀山药组织培养的优点

(1) 取材少,培养材料经济

由于植物细胞具有全能性,故单个或小块组织细胞培养即可再生植株,以茎尖、根、茎、叶等作材料进行培养时,只需几毫米甚至不到 1 mm 大小的材料。由于取材少,培养效果好,对于新品种的推广和优良品种的复壮更新,都有重大的实践意义。

(2) 人为控制培养条件,不受自然条件影响

外植体完全是在人为提供的培养基及人工控制的小气候环境条件下进行生长,摆脱