

不同激素对怀山药不同外植体分化的影响

邓丽娟, 兰利琼, 傅华龙* (四川大学生命科学学院, 四川成都610064)

摘要 研究了6-BA、NAA和IBA对怀山药不同外植体分化和植株再生的影响。结果表明:以节为外植体,改良的MS+100 g/L香蕉+0.5 ng/L 6-BA+1.00 ng/L NAA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖培养基为最优组合,其分化率达100%;最适根块分化培养基是,改良的MS+100 g/L香蕉+0.5 ng/L 6-BA+0.25 ng/L NAA+0.4 ng/L IBA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖;最适无菌茎段分化培养基是,改良的MS+100 g/L香蕉+0.5 ng/L 6-BA+0.50 ng/L NAA+0.8 ng/L IBA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖;最适无菌叶柄分化培养基是,改良MS+100 g/L香蕉+1.5 ng/L 6-BA+0.25 ng/L NAA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖。

关键词 6-BA;NAA;IBA;怀山药;组培;分化

中图分类号 S632.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05406-02

Effects of Different Hormones on the Direct Differentiation of the Different Explants of *Tigun Dioscorea thund*

DENG Li-juan et al (College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract In this paper the influence of three primary external hormone (6-BA, NAA, IBA) on direct differentiation and plant regeneration through different explant (buds, aseptic shoots, petioles and root tubers) of the *Tigun Dioscorea Thund* was discussed. The result showed: with buds as explant, modified MS medium + banana 100 g/L + 0.5 ng/L 6-BA + 1.00 ng/L NAA + 0.5% agar + 0.5% active carbon + 3% sucrose was optimal medium culture, the differentiation rate was completely 100% though the experiment of orthogonal experiment $L_9(3^4)$. Modified MS + banana 100 g/L + 0.5 ng/L 6-BA + 0.25 ng/L NAA + 0.4 ng/L IBA + 0.5% agar + 0.5% active carbon + 3% sucrose was the most suitable culture medium for germfree root tuber differentiation, modified MS + banana 100 g/L + 0.5 ng/L 6-BA + 0.50 ng/L NAA + 0.8 ng/L IBA + 0.5% agar + 0.5% active carbon + 3% sucrose was used for germfree shoot differentiation, and the most suitable medium culture for germfree petiole differentiation was modified MS + banana 100 g/L + 1.5 ng/L 6-BA + 0.25 ng/L NAA + 0.5% agar + 0.5% active carbon + 3% sucrose.

Key words 6-BA;NAA;IBA; *Tigun Dioscorea thund*; Plant tissue culture; Direct differentiation

山药(*Dioscorea opposita*),又名薯蓣,是薯蓣科薯蓣属的一种肉质块茎药用植物,以山土为宜,故名山药,亦称怀山药。其块茎和零余子入药,具有补脾益肾,健胃化痰之功效,被广泛采用。它与怀地黄、怀牛膝、怀菊花合称“四大怀药”,驰名中外,其产品畅销国内外,尤其是东南亚一带。但因长期进行营养繁殖,母株感染病毒致使其品质退化,产量降低^[1]。在河北、河南两省的大面积种植地年年减产,研究近20年也未得到有效地解决,至今仍是一个紧迫且重大的课题。目前,虽然已有利用组织培养的手段达到保持优良种性的相关报道^[2-3],但是至今尚未应用于实际生产中,特别是未见报道以6-BA、NAA和IBA 3种外源激素的不同组合作用于怀山药不同外植体,通过诱导分化点,直接分化成苗的相关研究。笔者研究了6-BA、NAA和IBA不同组合对怀山药不同外植体的直接分化和植株再生的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 怀山药原种(块茎)由川大三康公司提供,经室外栽培获得健壮植株。茎节材料均来自室外栽培的健壮植株。

1.1.2 带叶的叶柄、根块和嫩茎,来自培养的无菌试管苗。

1.1.3 培养基与培养条件。基础培养基:所用培养基均以改良的MS为基本培养基,添加蔗糖3%,琼脂0.5%,活性炭0.5%,香蕉^[4]100 g/L。激素用量根据试验设计,pH值调至5.8~6.0,在121℃、1.1 kg/cm²下灭菌20 min;重复培养基:改良的MS+100 g/L香蕉+0.5 ng/L 6-BA+1.00 ng/L NAA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖;壮苗培养基:改良的MS+100 g/L香蕉+0.50 ng/L NAA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖。在培养室中进行光照培养,光暗比12 h/12 h,

光强2500 lx,培养温度(25±2)℃。

1.2 方法

1.2.1 正交试验^[5-6]。

(1)选取6-BA、NAA、IBA 3种激素进行试验,每种激素取3个水平(浓度ng/L),选用 $L_9(3^4)$ 正交表,考察上述3种激素对节段的分化影响。因子水平设计见表1^[3,7-9],每试验组设计9瓶重复,每瓶接种3块外植体。

表1	$L_9(3^4)$ 因子水平			ng/L
水平	6-BA	NAA	IBA	
1	2.0	1.00	0.8	
2	1.5	0.50	0.4	
3	0.5	0.25	0	

(2)重复试验。每瓶接种3块外植体,重复5瓶,接种于由上述正交试验筛选出的最优培养基上,进行重复试验。

1.2.2 无菌节段的获得。将植株上取下的节段用自来水冲洗30~40 min,在洁净工作台上用0.1%的HgCl₂浸泡12 min,并用无菌蒸馏水冲洗4~7次,将节切成0.5~1.0 cm的节段,接种于表2所示的培养基上。

1.2.3 以无菌苗为外植体。将试管苗的叶柄带1片叶片在尽量贴近茎生长的部位切下为无菌叶柄;把嫩茎切成0.5~1.0 cm的小段为无菌茎段;将无菌苗着生的分化块与其根一起切成试验所需的外植体块,称为无菌根块,根块的大小为0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm(长×宽×厚);将材料分别接种到含不同激素组合的培养基上^[3,5,8]。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对节段的分化影响

2.1.1 分化过程。接入7 d,节的叶腋部位开始膨大,随后膨大部位颜色变浅,逐渐出现白色分化点并增大为块状;15 d左右分化出根,再分化出芽,常以单芽体和双芽体出现;30 d形成完整的再生植株。因此试验以30 d进行统计和数据分

作者简介 邓丽娟(1981-),女,重庆人,硕士研究生,研究方向:植物生理。* 通讯作者,教授,E-mail: fhuadong8@yahoo.com.cn。

收稿日期 2007-03-16

析,结果见表2。

处理	激素浓度			接种总数 块	分化数 块	分化率 %
	6-BA ng/L	NAA ng/L	IBA ng/L			
	2.0	1.00	0.8	27	21	77.8
	2.0	0.50	0.4	27	18	66.7
	2.0	0.25	0	27	19	70.4
	1.5	1.00	0.4	27	22	81.5
	1.5	0.50	0	27	23	85.2
	1.5	0.25	0.8	27	17	63.0
	0.5	1.00	0	27	27	100
	0.5	0.50	0.8	27	24	88.9
	0.5	0.25	0.4	27	12	44.6

统计结果表明:上述3种激素3个水平9个浓度的不同组合对怀山药节段的分化影响差异较大。极差分析显示3种激素对节分化影响由大到小依次是:NAA>IBA>6-BA。均值表明,以节作为外植体分化形成新生植株的最优培养基为:改良的MS+100g/L香蕉+0.5ng/L 6-BA+1.00ng/L NAA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖。

2.1.2 重复试验结果。接种于上述的最优培养基上,进行重复试验,分化成苗率达90.2%。

2.2 不同激素组合对不同无菌外植体分化的影响

2.2.1 以叶柄为外植体。叶柄分化过程均是先形成白色小点,由点增大为块,继而分化出根和芽,30d成苗(表3)。

表2显示,较好的分化培养基为处理 ,即:改良的MS+100g/L香蕉+1.5ng/L 6-BA+0.25ng/L NAA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖。

处理	激素浓度			接入总块数 块	成苗数	分化率 %
	6-BA ng/L	NAA ng/L	IBA ng/L			
	1.5	1.00	0.8	15	0	0
	1.5	0.50	0.4	15	5	33.3
	1.5	0.25	0	15	10	66.7
	1.0	1.00	0.4	12	3	25.0
	1.0	0.50	0	12	3	25.0
	1.0	0.25	0.8	12	6	50.0
	0.5	1.00	0	12	3	25.0
	0.5	0.50	0.8	12	0	0
	0.5	0.25	0.4	12	0	0

2.2.2 以茎段为外植体。茎段的分化过程与叶柄类似,是先形成白色分化点,再由点增大为块,继而分化出根和芽,但是其新生苗较由叶柄分化而来的更为健壮。

表4显示,在16d时,处理和 培养基上的分化率最高,达100%。但是,处理 培养基以多芽体(2~4)为主,处理 培养基以单芽为主,故以茎段为外植体时,处理 培养基即:改良MS+100g/L香蕉+0.5ng/L 6-BA+0.50ng/L NAA+0.8ng/L IBA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖为最优分化培养基。

根据表4的结果,对处理 培养基进行验证,其分化成苗率为93.3%。

2.2.3 以根块为外植体。以根块为外植体,其成苗与茎段相似,都在16d,故以16d进行数据统计,并且发现由根块分化再生的植株最强壮。

表4 不同激素组合对茎段分化的影响(16 d)

处理	激素浓度			接入总块数 块	成苗数 个	分化率 %
	6-BA ng/L	NAA ng/L	IBA ng/L			
	1.5	1.00	0.8	15	12	50.0
	1.5	0.50	0.4	15	5	100
	1.5	0.25	0	15	5	33.3
	1.0	1.00	0.4	15	12	80.0
	1.0	0.50	0	9	3	42.3
	1.0	0.25	0.8	10	8	50.0
	0.5	1.00	0	10	10	52.9
	0.5	0.50	0.8	10	10	100
	0.5	0.25	0.4	10	10	87.5

表5显示,在16d时处理 、 、 培养基分化率最高,均达100%;但是处理 培养基分化产生的再生植株的芽体最多(3~4芽),根系发达,分化苗健壮。据此处理 为根块最好的分化培养基,其配比是改良MS+100g/L香蕉+0.5ng/L 6-BA+0.25ng/L NAA+0.4ng/L IBA+0.5%琼脂+0.5%活性炭+3%蔗糖。

根据表5的结果,对处理 培养基进行验证,其分化成苗率达100%。

表5 不同激素组合对无菌根块分化的影响(16 d)

处理	激素浓度			接入总块数 块	成苗数 个	分化率 %
	6-BA ng/L	NAA ng/L	IBA ng/L			
	1.5	1.00	0.8	15	6	80.0
	1.5	0.50	0.4	15	15	33.3
	1.5	0.25	0	15	5	33.3
	1.0	1.00	0.4	15	12	80.0
	1.0	0.50	0	14	6	33.3
	1.0	0.25	0.8	12	6	80.0
	0.5	1.00	0	17	9	100
	0.5	0.50	0.8	10	10	100
	0.5	0.25	0.4	16	14	100

2.3 壮苗 将所有再生植株转入壮苗培养基,培养10d左右,再生植株的根增粗,其上出现须根,主根数目增加,数目4;植株茎变壮,平均增高1.76cm。

3 讨论

(1) 从无菌根块诱导分化过程中发现,如果根块自身带有芽体的外植体,其分化产生的多芽体的数目要优于不带芽体的,这可能与外植体自身内源激素的作用有关。

(2) 由无菌的根块诱导分化的苗,其多芽体的数目,成苗的健壮程度都明显优于另外两种植株。而且在试验中发现,外植体接入2周左右,植株分化、生长开始变缓甚至出现停滞,此时更换新鲜培养基,植株能够很快恢复其生活力,这说明山药在其分化过程中对某些营养的消耗较快,其原因有待进一步研究。

参考文献

- [1] 聂桂花,周克范,董秀华,等. 山药的研究概况[J]. 中草药,1993,24(3): 158-160.
- [2] 王红娟,王天亮,白自伟,等. 激素配比对怀山药不同外植体诱导不定芽的影响[J]. 河南农业科学,2006(12): 73-74.
- [3] 郭君丽,陈明霞,李明军,等. 光质和生长物质组合对怀山药零余子脱分化和再分化的影响[J]. 河南师范大学学报,2003,31(2): 99-102.
- [4] 刘宾,蒋继志,廖祥儒,等. 香蕉汁对花生组织培养及抗氧化酶活性的影响[J]. 河北大学学报,2006,26(6): 630-635.

(上接第5407 页)

- [5] 李光, 龚宁, 周伟香, 等. 应用正交设计优选花叶开唇兰初代培养基 [J]. 种子, 2006, 25(11): 69-71.
- [6] 邓成军, 张少华, 巴音克西克, 等. 正交试验在红枣组培快繁中的应用 [J]. 新疆农业, 2003(5): 35-36.
- [7] GLAISE MARA ALVES, II RIO LUZ DAL VESCO, MIGUEL PEDRO GUERRA. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through

node clusters culture [J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 110: 204-207.

- [8] 孟玲, 朱宏涛, 刘锡葵, 等. 盾叶薯蓣的快速繁殖 [J]. 天然产物的研究与开发, 2000, 12(6): 16-21.
- [9] 石岭. 山药节间部培养及其增殖的研究 [J]. 内蒙古农牧学院学报, 1991, 12(2): 65-69.
- [10] JAIME A, TEIXEIRA DA SILVA. *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology [J]. *Biotechnology Advances*, 2003, 21: 715-766.