

黄山药愈伤组织的诱导与分化

马林, 杨国涛, 李军

(西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010)

摘要: 以黄山药的叶片、茎段和叶柄作外植体, 以 MS 为基本培养基, 试验了不同激素组合对愈伤组织诱导的影响, 采用正交试验法研究了愈伤组织的分化效果。结果表明, 以 MS+2,4-D 1~2 mg/L+6-BA 2 mg/L 培养基对叶片的愈伤组织诱导效果最好, 接种 12 d 后初见愈伤组织, 20 d 后可形成大量的愈伤组织, 而茎段和叶柄的诱导效果较差。分化试验结果表明, 生根率最高可达 85.3%, 而出芽率最高仅达 29.6%。

关键词: 黄山药; 薯蓣; 愈伤组织; 诱导; 分化

中图分类号: Q945.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0097-04

Induction and differentiation of callus in *Dioscorea panthaica*

MA Lin, YANG Guo-tao, LI Jun

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science & Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: The leaf, stem segment and leaf stalk of the *Dioscorea panthaica* were used as explants to induce callus in different culture media. The results suggested that the better medium for inducing leave callus was MS+2,4-D 1~2 mg/L+BA 2 mg/L, the callus formation was initially found after inoculating 12 days and there were much more in 20th day. They could keep vigorous growth constantly in subculture. The callus induction in stem segment and leaf stalk were inferior to that in leaf. In differentiation experiments, the highest rooting rate could reach 85.3%, but only 29.6% to bud production.

Key words: *Dioscorea panthaica*; *Dioscorea*; callus; induction; differentiation

黄山药 (*Dioscorea panthaica* Prain et Burkill), 属薯蓣科薯蓣属, 生长于海拔 1 650~3 100 m 的灌丛、林缘、松栎林或杂木林内, 主要分布在云南、贵州、四川、湖南、湖北等地。根茎含薯蓣皂苷元 1.7%~2.3%, 为合成甾体激素类药物的原料之一 (中国科学院昆明植物研究所, 1983)。

随着医药工业对皂素的大量需求, 黄山药的需求量日渐增长, 但作为种源的野生黄山药十分有限, 利用组织和细胞培养技术快速繁殖优质种苗和生产黄山药有效成分薯蓣皂苷元是一个有益的尝试。

有关薯蓣属植物的组织和细胞培养已有一定的

报道, 如孟玲等 (2000)、晏婴才等 (2002) 对盾叶薯蓣组织培养技术和条件进行了研究, 何惠英等 (2000) 进行了菊叶薯蓣微繁殖研究, 张宗勤等 (1998) 对叉蕊薯蓣的微繁殖及微型薯蓣的离体诱导作了报道, 李明军等 (2000) 研究了不同因子对山药愈伤组织诱导的影响, 国外的研究报道主要集中于三角叶薯蓣的细胞培养方面 (Drapeau, 1986; Robertson, 1989; Kandarakov, 2000)。黄山药除了马林等 (2003, 2004) 报道了芽诱导快速繁殖的结果外, 尚未见其它研究报道。本文报道黄山药愈伤组织诱导条件、继代培养及诱导分化方面的研究结果, 为黄山药的快繁育

收稿日期: 2004-08-16 修回日期: 2005-08-19

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (2003A122); 西南科技大学引进人才科研启动基金 (ZK033079) [Supported by Key Program of Sichuan Provincial Education Department (2003A122); Scientific Research Fund for Introducing the Talented Person of Southwest University of Science and Technology (ZK033079)].

作者简介: 马林 (1964-), 男, 四川绵竹人, 理学硕士, 副教授, 主要从事植物组织和细胞培养工作。

苗和进一步进行细胞培养提供一定的技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

黄山药野生材料由四川省甘孜州农业学校提供,采自二郎山林场。

1.2 外植体灭菌处理

将黄山药的枝条剪成 10 cm 长的小段,洗衣粉溶液浸泡约 10 min 左右,在流水下冲洗数小时。将叶片与茎段、叶柄分开,用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液浸泡消毒,叶片处理 6 min,茎段和叶柄处理 8 min,无菌水冲洗 5~6 次。茎段和叶柄切成 0.5~0.8 cm 的切段,叶片切为 0.5 cm×0.5 cm 左右的小方块,无菌操作下接种到培养基上。

1.3 培养基及培养条件

以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的外源激素(6-BA、NAA、2,4-D 和 KT),加入 0.8% 琼脂和

3% 的蔗糖,调 pH 值为 5.8~6.0。将培养基分装到 50 mL 三角瓶中,20 mL/瓶,在 121 °C 下高温灭菌 20 min。

培养温度 25±2 °C,光照强度 1 000~1 500 lx,每天光照时间 10 h。

1.4 愈伤组织继代培养

将诱导出的愈伤组织分为小块,接种于诱导愈伤组织效果较好的培养基中,观察愈伤组织继代培养的效果。根据第一次继代培养的结果,以后每 30 d 继代一次,不同颜色的愈伤组织分别接种。

表 1 愈伤组织诱导分化正交试验设计
Table 1 Orthogonal experiment design of differentiation of callus

试验因素 Factor	试验水平 Level		
	1	2	3
6-BA(mg/L)	0.5	1.0	2.0
NAA(mg/L)	0.1	0.2	0.5
蔗糖 Sugar(g/L)	20	30	40
pH 值 pH value	5.8	6.2	6.6

表 2 不同激素组合对外植体愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effects of hormone combinations on induction of callus in different explants

编号 No.	激素浓度(mg/L) Hormone concentration			叶片 Leaf		茎段 Stem		叶柄 Leaf stalk	
	6-BA	2,4-D	KT	接种数	诱导率(%)	接种数	诱导率(%)	接种数	诱导率(%)
				No. of inoculation	Induced rate	No. of inoculation	Induced rate	No. of inoculation	Induced rate
1	1	1	0	24	58.3	20	5.0	24	15.8
2	1	2	0	24	54.2	25	60.0	25	28.0
3	2	1	0	36	94.4	23	15.4	21	23.8
4	2	2	0	24	91.7	21	38.1	24	45.8
5	1	1	0.2	27	33.3	24	4.2	19	21.1
6	1	2	0.2	27	11.1	21	19.0	27	33.3
7	2	1	0.2	28	64.3	23	8.7	24	20.8
8	2	2	0.2	21	28.6	24	29.2	21	9.5

1.5 愈伤组织诱导分化

设计 4 因素 3 水平的正交试验,研究 6-BA、NAA、蔗糖和 pH 值的不同组合对愈伤组织诱导分化的影响(试验设计见表 1)。将继代 3 次以上生长一致的愈伤组织接种到不同的分化培养基,接种后每隔 5 d 统计一次分化率,对 30 d 后的试验结果作极差分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对外植体愈伤组织诱导的影响

设 BA、2,4-D 和 KT 不同浓度组合共 8 个配方处理(编号 1~8),分别接入叶片、茎段和叶柄,培养

30 d 后,愈伤组织的诱导结果见表 2。

由表 2 可见,培养基不同浓度激素组合对 3 种外植体都有诱导反应,总的看来以叶片的诱导效果较好,叶柄和茎段仅在个别培养基的诱导效果较好。在叶片以 3 号和 4 号培养基的诱导效果最好,诱导率达到 90% 以上,1、2 和 7 号培养基的诱导效果也较好,均达到 50% 以上;茎段仅在 2 号培养基的诱导效果较好,诱导率达到 60%;叶柄在 4 号培养基的诱导率最高,为 45.8%,其余均在 35% 以下;加入 KT 的培养基除叶片在 7 号培养基有较高的诱导率外,其余的培养基诱导效果均较低。

叶片接入培养基 12 d 后初见愈伤组织,20 d 后形成大量的愈伤组织,愈伤组织在叶片边缘呈黄绿

色,叶面长出的愈伤组织呈白色、疏松、长势旺盛。但加 KT 的培养基在接种 15 d 后才在叶片边缘初见少量黄色愈伤组织。接种 20 d 后,有少量叶片出现褐化现象,以后逐渐死亡。

叶柄和茎段的愈伤组织诱导速度较慢,接种 7 d 后始见有端部膨大现象,15 d 后才见从膨大部分的边缘出现颗粒状愈伤组织,愈伤组织呈黄绿色。培养 30 d 后,一部分膨大体仍然保持绿色但没有愈伤组织出现。

2.2 愈伤组织继代培养

3、4 号培养基诱导愈伤组织效果相对较好,故将所有诱导出的愈伤组织分别转接到这两种培养基

中作继代培养。观察发现,转接 15 d 后,从原愈伤组织表面又长出新的白色或黄色颗粒状愈伤组织,30 d 后愈伤组织生长达到高峰,体积可达接种量的 2~3 倍,此后生长减慢,40 d 后发现有一部分愈伤组织颜色开始变褐,有的颜色变为乳白色呈水浸状。因此,继代培养以 30 d 为一个周期。

2.3 激素、蔗糖和 pH 不同组合对愈伤组织分化的影响

接种 30 d 后各处理愈伤组织分化生根和出芽的结果见表 3。对诱导生根最好的培养基为 2 号和 4 号培养基,其次为 1 号和 3 号培养基,诱导率均达到 80% 以上,在其余培养基有不同程度的诱导且存在较大差异。对诱导出芽最好的培养基为 6 号,但

表 3 黄山药愈伤组织分化培养正交实验结果

Table 3 Results of callus differentiation in *Dioscorea panthaica*

编号 No.	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	蔗糖 Sugar(g/L)	pH	接种数 No. of inoculation	生根率(%) Rooting rate	出芽率(%) Budding rate
1	0.5	0.1	20	5.8	24	83.3	4.2
2	0.5	0.2	30	6.2	34	85.3	5.9
3	0.5	0.5	40	6.6	40	80.0	10.0
4	1.0	0.1	30	6.6	34	85.3	5.9
5	1.0	0.2	40	5.8	35	51.4	8.6
6	1.0	0.5	20	6.2	27	29.6	29.6
7	2.0	0.1	40	6.2	32	34.4	21.9
8	2.0	0.2	20	6.6	30	53.3	13.3
9	2.0	0.5	30	5.8	32	12.5	0
kr1	82.9	67.7	55.4	49.1			
kr2	55.4	63.3	61.0	49.8			
kr3	33.4	40.7	55.3	72.9			
Rr	49.5	27.0	5.7	23.8			
kb1	6.7	10.7	15.7	4.3			
kb2	14.7	9.3	3.9	19.1			
kb3	11.7	13.2	13.5	9.7			
Rb	8.0	3.9	11.8	14.8			

诱导率仅为 29.6%,其次为 7 号培养基,其余培养基的出芽诱导率均较低甚至没有诱导。总的看来,在所试验的 9 个处理中,生根均比出芽明显。

从极差分析的结果可见,4 个试验因素中,对诱导生根影响程度最大的是 6-BA,其次是 NAA,然后是 pH 值,蔗糖的影响最小,最佳培养基为 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 mg/L (pH6.6)。与直观分析相比较,这与 2 号和 4 号培养基的结果基本一致,可以认为培养基中 6-BA 浓度为 0.5~1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.1~0.2 mg/L、蔗糖浓度为 30 mg/L、pH 值为 6.6 时对诱导生根有较好的效果。同样的处理中,对诱导出芽的影响从大到小依次为 pH 值、蔗糖、6-BA 和 NAA,最佳培养基为 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖 20 mg/L (pH6.2),这与直观分析所得结果完全一致。

2.4 正交试验不同处理分化率的动态变化

9 个处理的生根率随时间的变化情况见图 1,出芽率随时间的变化情况见图 2。

由图 1 可见,生根率较好的 4 个处理基本表现出一致的变化,即生根主要发生在接种后 5~15 d 内,接种后 15~20 d 生根率达到最大,以后的变化不明显。其它处理也有相同的变化趋势。出芽率的变化除个别处理外,基本在接种后 10~15 d 即达最大,出芽最好的 6 号处理在接种后 10 d 即达最大出芽率,以后不再增加。

3 讨论

采用 6-BA 与 2,4-D 配合诱导愈伤组织,在 3 种外植体均有一定的诱导效果,其中以叶片的诱导

效果最好,但在相同培养基中添加KT反而降低了诱导效果,这与李明军等(1997)的报道结果有较大的差异,他们用怀山药无菌试管苗茎段作为外植体,以MS+KT2+NAA 0.02~2作为培养基,可诱导出大量愈伤组织。分析原因,这可能与激素种类组合不同以及薯蓣种类不同具有不同的效应有关,但KT在较低浓度下(0.2 mg/L)出现抑制效应,原因有待进一步研究。

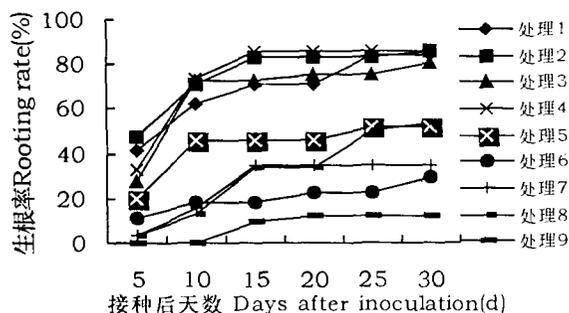


图1 正交试验不同处理生根率的动态变化

Fig. 1 Trends of rooting rate in orthogonal experiment

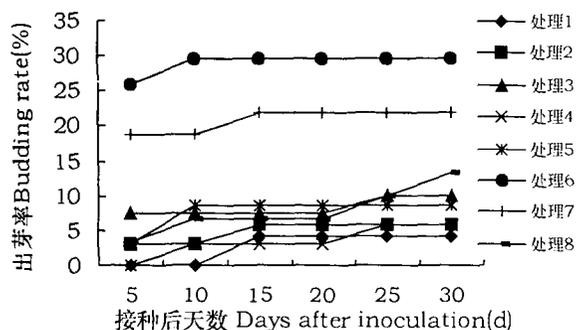


图2 正交试验不同处理出芽率的动态变化

Fig. 2 Trends of budding rate in orthogonal experiment

晏婴才等(2002)对盾叶薯蓣进行愈伤组织诱导,发现茎段在MS+6-BA 0.5+2,4-D 2.0中的愈伤组织诱导效果最好,在接种10 d后,茎段出现膨大,15 d后从膨大处长出少量黄色颗粒愈伤组织,叶片在一周后开始卷曲膨大,一月后部分叶片边缘形成少量白色或褐色愈伤组织。易志军(2001)以修改的MS培养基试验了不同激素组合对盾叶薯蓣幼茎、幼叶和茎尖愈伤组织诱导的影响,发现3种外植体的诱导率分别为57.97%、83.14%和75.89%。本研究表明,以黄山药茎段作为外植体,虽然也出现

了膨大现象,但随后愈伤组织的出现并不多,而以黄山药的叶片作为外植体,能在12 d后诱导出白色和黄绿色颗粒状的愈伤组织,随后出现大量的愈伤组织,这与他人的报道不尽相同。薯蓣科植物多达600余种,地理种系相对更多(中国科学院《中国植物志》编辑委员会,1985),引起上述结果差异可能与薯蓣种类、生境及材料采取时间等有关,也与实验所采用的培养基条件有关,还需作进一步的研究。

有报道表明,薯蓣零余子作为外植体的诱导效果较好,李明军等(2000)发现以零余子作外植体对愈伤组织形成和分化都较易诱导,而且再生植株移栽后生长健壮,对环境具有较好的适应性。在黄山药组织培养研究中,也可尝试将零余子作为外植体之一进行愈伤组织诱导试验。

参考文献:

- 中国科学院昆明植物研究所. 1983. 云南植物志(第三卷)[M]. 北京: 科学出版社, 717-718.
- 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 1985. 中国植物志(第16卷第1分册)[M]. 北京: 科学出版社, 54.
- Drapeau D, Blanch HW, Wilke CR. 1986. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(10): 1555-1563.
- He HY(何惠英), Lan QY(兰芹英), Zhang YJ(张艳军). 2000. Tissue culture of *Dioscorea camposita*(菊叶薯蓣的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 36(4): 337-338.
- Kandarakov O, Titel C, Volkova L, et al. 2000. Additional phosphate stabilises uninterrupted growth of a *Dioscorea deltoidea* cell culture[J]. *Plant Sci*, 157(2): 209-216.
- Li MJ(李明军), Xue JP(薛建平), Chen MX(陈明霞), et al. 2000. The influence of different factors on callus induction of *Dioscorea opposita*(不同因子对山药愈伤组织诱导的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 20(2): 156-160.
- Li MJ(李明军), Yang JW(杨建伟), Zhang JB(张嘉宝). 1997. Stem culture and rapid propagation of *Dioscorea opposita*(怀山药的茎段培养和快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 33(4): 275-276.
- Li MJ(李明军), Zhang JB(张嘉宝), Zhang HB(张海波). 2000. Study on the callus induction and plantlet regeneration from the bulbil of *Dioscorea opposita*(怀山药零余子愈伤组织诱导及植株再生的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 20(5): 772-777.
- Ma L(马林), Zhang L(张玲), Li WF(李卫锋). 2003. Tissue culture and rapid propagation of *Dioscorea panthaica*(黄山药的组织培养与快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 39(5): 476.
- Ma L(马林), Zhang L(张玲), Li WF(李卫锋). 2004. Induction of fasciculated buds and rapid propagation of *Dioscorea* (下转第91页 Continue on page 91)

化酶活性差异很大,某些居群的抗氧化酶活性相当高,如金荞、贵州云台山大野荞,可以作为栽培荞麦改良的原始材料或直接开发成食品、保健品及药物。

植物在长期进化中形成的一套内源抗氧化保护酶系统极其复杂,其中 SOD 处于清除活性氧自由基的第一道防线,它催化体内超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化,形成氧分子和过氧化氢(余叔文等,1999)。而 H_2O_2 的过量积累也会对植物产生严重伤害。Asada(1992)指出: H_2O_2 的清除是细胞彻底清除活性氧伤害的关键。CAT、POD 和 ASP 是植物体内清除 H_2O_2 的重要酶类。本研究表明,不同的荞麦在这些酶活性上表现很不相同,有的 POD 活性高,有的则是 ASP 活性高。也许不同的荞麦可通过不同的途径清除体内 H_2O_2 。

野生荞麦中,理县大野荞(M2)的几种抗氧化酶活性均较低,但我们发现它并不易染病虫,生长状况良好,这是否表明它具有其它的清除活性氧的途径?或者具有很强的应急能力,在胁迫条件下能迅速增强其抗氧化酶活性? 这些问题有待进一步探讨。

参考文献:

- 西北农业大学植物生理生化教研组. 1987. 植物生理实验指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,36—38.
- 沈文彪,黄丽琴,徐朗莱. 1997. 植物抗坏血酸过氧化物酶[J]. 生命的化学,17(5):24—26.
- 余叔文,汤章城. 1999. 植物生理与分子生物学[M](第二版). 北京:科学出版社,366—389.
- 张以忠,陈庆富. 2004. 荞麦研究的现状与展望[J]. 种子,23(3):39—42.
- 张志良. 1990. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,88—91.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plant[J]. *Physiol Plant*, 85(2):235—241.
- Cao WH(曹宛红). 1994. Ascorbate peroxidase as a key enzyme of H_2O_2 scavenging system in chloroplasts(作为叶绿体 H_2O_2 分解系统关键酶的抗坏血酸过氧化物酶)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 30(6):452—458.
- Chen QF(陈庆富). 2001. Karyotype analysis of five *Fagopyrum* species native to China(五个中国荞麦种的核型分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 21(2):107—110.
- Dalton DA, Hanus FJ, Russell SA, et al. 1987. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules[J]. *Plant Physiol*, 83:789—794.
- Hodge M, Andrew CJ, Johnson DA, et al. 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines[J]. *Physiol Plant*, 98(4):685—692.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo P R, Arrese-Igor C, et al. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat[J]. *Physiol Plant*, 116:173—181.
- Kalir A. 1981. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione pertulacoides* L. Aelle exposed to high sodium chloride concentrations[J]. *Ann Bot*, 47(1):78—85.
- Ma XJ(马旭俊), Zhu DH(朱大海). 2003. Functional roles of the plant superoxide dismutase(植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展)[J]. *Heredities*(遗传), 25(2):225—231.
- Stewart RG, Bewleg JD. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. *Plant Physiol*, 65:245—248.
- Wang AG(王爱国), Lou GH(罗广华), Shao CB(邵从本), et al. 1983. A study on the superoxide dismutase of soybean seeds(大豆种子超氧歧化酶的研究)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 9(1):77—84.
- Zhang Z(张 政), Wang ZH(王转花), Lin RF(林汝法), et al. 1999. Effect of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} on antioxidant enzyme activities in buckwheat seed(Cu^{2+} , Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 对荞麦种子中抗氧化酶活性的影响)[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学学报), 15(5):848—851.
2002. Studys on tissue culture and rapid propagation of *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣组织培养与快速繁殖研究)[J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Edition)*(四川大学学报(自然科学版)), 39(1):137—140.
- Yi ZJ(易志军). 2001. Callus tissue culture in *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣愈伤组织培养研究)[J]. *Economic Forest Researches*(经济林研究), 9(3):21—22.
- Zhang ZQ(张宗勤), Sha WQ(撒文清), Liu JC(刘建才). 1998. Micropropagation and microtuberization of *Dioscorea collettii* Hook. F.(叉蕊薯蓣的微繁殖及微型薯蓣的离体诱导)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 8(1):18—20.
2002. Studys on tissue culture and rapid propagation of *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣组织培养与快速繁殖研究)[J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Edition)*(四川大学学报(自然科学版)), 39(1):137—140.
- Yi ZJ(易志军). 2001. Callus tissue culture in *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣愈伤组织培养研究)[J]. *Economic Forest Researches*(经济林研究), 9(3):21—22.
- Zhang ZQ(张宗勤), Sha WQ(撒文清), Liu JC(刘建才). 1998. Micropropagation and microtuberization of *Dioscorea collettii* Hook. F.(叉蕊薯蓣的微繁殖及微型薯蓣的离体诱导)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 8(1):18—20.

(上接第 100 页 Continue from page 100)

- panthaica* Prain et Burkill(黄山药丛生芽诱导与植株快速繁殖)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 14(2):53—54.
- Meng L(孟 玲), Zhu HT(朱宏涛), Liu XK(刘锡葵), et al. 2000. Micro propagation of *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣的快速繁殖)[J]. *Nat Product Res Development*(天然产物研究与开发), 12(6):17—21.
- Robertson GH, Doyle LR, Sheng P, et al. 1989. Diosgenin formation by freely suspended and entrapped plant cell cultures of *Dioscorea deltoidea*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(8):1114—1125.
- Yan YC(晏婴才), Lin HH(林宏辉), Dai QL(代其林), et al.