

文章编号: 1000-3142(2000)02-0156-05


不同因子对山药愈伤组织诱导的影响

S567.239

李明军, 薛建平[✓], 陈明霞, 郭闽英, 邱卫花, 张嘉宝 S336

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002)

摘要: 研究了基因型、外植体、植物激素和光暗等因子对山药愈伤组织诱导的影响。结果表明: (1) 不同基因型山药均能诱导形成愈伤组织, 但出愈率不同, 其排列顺序是: “47号”山药>铁棍山药>太谷山药。(2) 不同外植体在同一种培养基上的诱导率存在差异。同一外植体在不同植物激素浓度配比中, 诱导率也不同。叶片、茎段、零余子的最佳激素配比均为 6-BA 2 (mg/L, 以下单位同)+NAA 2, 诱导率分别为 53.3%、65.6%、100%, 茎尖的最佳激素配比为 6-BA 2+NAA 0.2, 诱导率为 93.3%。(3) 植物激素在愈伤组织诱导过程中起关键的作用。细胞分裂素与生长素组合使用优于单一激素。二者的浓度配比不同, 出愈率也不同。(4) 光暗条件对不同外植体愈伤组织诱导的影响不同。暗培养有利于零余子的诱导, 而光培养则有利于叶片的诱导。

关键词: 山药; 基因型; 外植体; 植物激素; 光培养和暗培养; 愈伤组织, 组织培养  中药

中图分类号: Q949.71+8.270.31 **文献标识码:** A

The influence of different factors on callus induction of *Dioscorea opposita*

LI Ming-jun, XUE Jian-ping, CHEN Ming-xia, GUO Min-ying, QIU Wei-hua, ZHANG Jia-bao

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The effects of genotypes, explants, phytohormones, light and dark etc. upon callus induction of *Dioscorea opposita* were studied. Results showed: (1) Different genotypes of *D. opposita* could all induce and form calli, but percentages of calli were different, which were in turn: *D. opposita* “No. 47” > *D. opposita* “Tiegun” > *D. opposita* “Taigu”. (2) Different explants had obvious diversity on the same medium. The percentages of calli of the same explant were different on the media supplied with different phytohormones concentration. The combination 6-BA 2 (mg/L) + NAA 2 was best to callus induction from leaf, stem, bulbil, whose ratios were respectively 53.3%, 65.6%, 100%. The combination 6-BA 2+NAA 0.2 was to shoot-tip, whose ratio was 93.3%. (3) It was crucial for phyto-

收稿日期: 1999-07-19

作者简介: 李明军 (1962-), 男, 硕士, 副教授, 从事植物生理学和植物组织培养的教学和科研工作。薛建平, 现在新乡医学院基础部工作。

基金项目: 河南省科委和教委自然科学基金资助项目 (编号分别为: 984010200、97180013)

hormones to induce callus of *D. opposita*. Cytokinin and auxin combinations had better effect than single phytohormone, and their concentrations were different, ratio was different, too. (4) The effects of light and dark upon callus induction from different explants were different. The dark culture was more advantageous to induction from bulbil. The light culture was beneficial to leaf.

Key words: *Dioscorea opposita*; genotype; explant; phytohormone; light culture and dark culture; callus

山药 (*Dioscorea opposita*), 又名薯蕷, 是薯蕷科薯蕷属的一种肉质块茎植物, 以山土为宜, 故名山药^[1]。主产于河南温县、武陟等地 (旧称怀庆府) 的山药, 产量大, 质量好, 药用价值高, 故称怀山药。它是山药中的一个优良品种, 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^[2], 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^[3-4]。但由于长期进行营养繁殖 (珠芽繁殖和芦头繁殖)^[5], 致使品质退化, 产量降低。因此, 提高其产量, 改善其品质, 使怀山药优良品种迅速推广种植, 已成为科学工作者的一个重要课题。

为了解决生产中存在的问题, 近几年来, 我们开展了怀山药的组织培养, 在愈伤组织的诱导、器官发生、植株再生、微型块茎的离体诱导以及试管苗的壮苗、生根和移栽等快速繁殖方面进行了一系列的研究^[6-7]。目的是为了利用现代生物技术来改良山药的品质, 并提高其产量。本文报道基因型、外植体、植物激素和光暗条件对山药愈伤组织诱导的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为零余子、叶片、茎段、茎尖。

零余子来自铁棍山药、“47号”山药 (铁棍山药、华县山药) 和太谷山药, 三者均来源于温县农科所; 叶片、茎段和茎尖均来自本研究室长期培养的“铁棍山药”的无菌试管苗。

1.2 方法

将铁棍山药、“47号”山药和太谷山药的零余子分别用自来水冲洗干净, 去皮, 在超净工作台上, 用 70% 乙醇浸泡 30 s, 然后, 用 0.1% 的 HgCl₂ 浸泡 10 min, 并用无菌蒸馏水冲洗 7~10 次, 将零余子切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm (长、宽、厚) 的小块; 将铁棍山药试管苗的茎切成长约 0.5 cm 的切段; 叶分成 0.5 cm × 0.5 cm 的小片; 在双筒解剖镜下, 切取大小约 0.1 cm 左右的茎尖。将材料分别接种到含有不同种类和浓度植物激素的培养基 (表 1、2、3、4) 上。所用培养基均以 MS 为基本培养基, 蔗糖为 3%, 琼脂为 0.8%, pH 调至 5.8~6.2, 在 121 °C, 1.1 kg/cm² 的高温高压下灭菌 20 min。光培养是在培养室中进行, 光照时间为 16 h/d, 光强为 2 000 lx, 温度为 25 ± 2 °C, 暗培养在 25 °C 的恒温箱中进行。

2 结果和分析

2.1 基因型对山药愈伤组织诱导的影响

将不同基因型山药的零余子切块置于 2 种不同的脱分化培养基 (表 1) 中, 在光下培养。6 d 时, ②号培养基上的“47号”山药切块的边缘部位开始出现零星的白色或淡绿色的愈伤组织。7 d 时, 除①号培养基中太谷山药外, 其它切块边缘处均开始形成白色愈伤组织, 质地疏

松。10 d 时,①号培养基中的太谷山药的切块开始膨大,而后,形成少量的愈伤组织。20 d 时,大多数切块出现明显的愈伤组织,少数已布满整个切块表面。30 d 时愈伤组织的形成情况见表 1。

从表 1 可知:在①号和②号培养基上,3 种基因型山药的零余子均能诱导形成愈伤组织,但不同基因型诱导愈伤组织的出愈率不同。其变化幅度在 52%~100% 之间。在②号培养基上,铁棍山药、“17 号”山药出愈率均为 100%。而在①号培养基上,仅“47 号”山药的诱导率达 100%。太谷山药在这两种培养基上表现都差,出愈率仅在 53% 左右。

2.2 外植体对山药愈伤组织诱导的影响

将铁棍山药的叶片、茎段、茎尖、零余子分别接种到表 2 的 3 种培养基上,在光下培养。1 周后,③号培养基上的叶柄基部和叶片边缘长出灰白色点状愈伤组织,渐增多且湿润,15 d 后,①、②号培养基上也开始有少量愈伤组织出现,1 个月后,都呈无色半透明的愈伤组织。茎段培养 7 d 后,③号培养基上的茎段的两端有膨大现象,15 d 后,首先在茎段切口处,有愈伤组织形成,20 d 后,其它的培养基上也渐次出现愈伤组织,呈浅绿色。茎尖培养 3 d 后首先膨大,7 d 后,③号首先诱导茎尖脱分化形成愈伤组织。在③号上的零余子 7 d 后长出无色半

透明愈伤组织,10 d 后,其它组合也渐次形成愈伤组织,11 d 后,愈伤组织逐渐形成团块状,呈浅绿色。培养 30 d 时统计结果见表 2。

从表 2 可知:同一外植体在不同植物激素浓度配比中,诱导率不同,不同外植体在同一种培养基上的诱导率也存在差异。当 6-BA 浓度一定时,叶片、茎段、零余子的出愈率随 NAA 浓度增大而升高,在 NAA 浓度为 2 时,零余子、茎段、叶片的出愈率最高,分别为 100%、

表 1 不同基因型山药零余子愈伤组织的形成
Table 1 Formation of callus from bulbil explants of different genotypes of *D. opposita*

培养基序号 No. of medium	植物激素浓度 Phytohormones concentration (mg/L)	基因型 Genotype	接种切块数 No. of explants inoculation	出愈数 No. of callus	出愈率(%) Percentage of callus
①	6-BA 2+NAA 0.2	铁棍(Tiegun)	21	18	85.71
		“47 号”(No. 47)	24	24	100.00
		太谷(Taigu)	25	13	52.00
②	6-BA 2+NAA 2	铁棍(Tiegun)	21	21	100.00
		“47 号”(No. 47)	23	23	100.00
		太谷(Taigu)	22	12	54.54

表 2 铁棍山药不同外植体愈伤组织的诱导
Table 2 Induction of callus from different explants of *D. opposita* “Tiegun”

培养基序号 No. of medium	植物激素浓度 Phytohormones concentration (mg/L)	外植体 Explants	接种数 No. of explants inoculation	出愈数 No. of callus	出愈率(%) Percentage of callus
①	6-BA 2+NAA 0.02	叶片(Leaf)	15	5	33.33
		茎段(Stem)	26	13	50.00
		茎尖(Shoot-tip)	32	17	53.13
		零余子(Bulbil)	-	-	-
②	6-BA 2+NAA 0.2	叶片(Leaf)	24	10	41.67
		茎段(Stem)	24	13	54.17
		茎尖(Shoot-tip)	15	14	93.33
		零余子(Bulbil)	21	18	85.71
③	6-BA 2+NAA 2	叶片(Leaf)	60	32	53.33
		茎段(Stem)	32	21	65.63
		茎尖(Shoot-tip)	21	15	71.43
		零余子(Bulbil)	30	30	100.00

65.6%、53.3%；在NAA浓度为0.2时，茎尖的出愈率最高，达93.3%。这表明：不同外植体在愈伤组织诱导过程中，有其最适的植物激素浓度配比。

2.3 植物激素和光暗条件对山药愈伤组织诱导的影响

2.3.1 植物激素和光暗条件对太谷山药零余子愈伤组织诱导的影响 将零余子接种在不同植物激素组合的培养基(表3)上，在光暗两种条件下培养。7 d后，暗处的①号培养基上的切块边缘部位开始出现淡绿色和白色的点状愈伤组织。10 d后，光下和暗处的②、③号以及光下的④号培养基上的切块均开始出现颗粒状愈伤组织。20 d后，②、③、④号上的愈伤组织渐多增大，且质地致密，但无根、芽的分化。总体来说，光下褐化现象比较严重，暗处则不明显。25 d时统计数据见表3。

从表3可知：(1)无论是在光下还是在暗处，无植物激素时，都不能形成愈伤组织。(2)当KT浓度一定时，光照条件下，零余子出愈率随NAA浓度增大而升高。(3)除③号培养基外，暗处培养出愈率都明显高于光培养。(4)无论是在光下还是在暗处，都以NAA 10+KT 2为最佳激素浓度配比。

2.3.2 植物激素和光、暗条件对铁棍山药叶片愈伤组织诱导的影响 叶片接种在不同植物激素组合的培养基(表4)上，在光、暗两种条件下培养。7 d后，在光下，有的叶边缘开始褐

变，有的叶片开始伸展且叶面有光泽，①号培养基中的叶片完全脱绿透明而无色。而在暗处，①号培养基中的叶片无明显变化。14 d后，在光下的(5)号培养基上叶柄基部和叶缘切口处形成黄绿色疏松愈伤组织。16 d后，光下的③、④以及暗处的③、④、⑤号培养基上的叶片基部和切口处均开始形成黄绿色或白色的愈伤组织。继续培养后，愈伤组织渐多长大，形成团块状。30 d时统计结果见表4。

从表4可知：(1)无论是在光下还是在暗处，无植物激素或使用单一植物激素，都不能诱导形成愈伤组织。(2)在6-BA一定时，光暗条件下叶片出愈率都随NAA浓度增大而升高。(3)在各培养基上，光下出愈率都高于暗处。(4)无论是在光下还是在暗处，都以6-BA 2+NAA 2为最佳激素浓度配比。

表3 植物激素和光暗条件对太谷山药零余子愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of phytohormones, light and dark on induction of callus from bulbil explants of *D. opposita* "Taigu"

培养基序号 No. of medium	植物激素浓度 Phytohormones concentration (mg/L)	接种切块数 No. of explants inoculation		出愈数 No. of callus		出愈率(%) Percentage of callus	
		光 Light	暗 Dark	光 Light	暗 Dark	光 Light	暗 Dark
①	0	9	10	0	0	0	0
②	NAA 2+KT 2	20	10	10	7	50.00	70.00
③	NAA 5+KT 2	19	7	10	3	52.63	42.85
④	NAA 10+KT 2	20	7	15	7	75.00	100.00

表4 植物激素和光暗条件对铁棍山药叶片愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of phytohormones, light and dark on induction of callus from leaves of *D. opposita* "Tiegun"

培养基序号 No. of medium	植物激素浓度 Phytohormones concentration (mg/L)	接种切块数 No. of explants inoculation		出愈数 No. of callus		出愈率(%) Percentage of callus	
		光 Light	暗 Dark	光 Light	暗 Dark	光 Light	暗 Dark
①	0	34	25	0	0	0	0
②	6-BA 2	37	20	0	0	0	0
③	6-BA 2+NAA 0.02	20	21	2	1	10.00	4.76
④	6-BA 2+NAA 0.2	21	30	12	10	57.14	33.33
⑤	6-BA 2+NAA 2	6	19	26	15	100.00	78.90

3 讨论

3.1 基因型不同, 对愈伤组织诱导的效果不同

不同基因型山药的零余子对愈伤组织的诱导存在着明显的差异。在表1的①、②号培养基上,“47号”山药的诱导率都为100%,铁棍山药仅在表1的②号培养基上为100%,而太谷山药则在两种培养基上表现都差,这与周洪生^[8]报道的4种类型甜玉米在两种培养基上诱导愈伤组织的结果是一致的。

3.2 同一基因型外植体不同, 对愈伤组织诱导的效果也不同

外植体对激素的不同反应很可能与材料本身的生理状态、植物受体的多样性^[9],以及与内源激素的合成和代谢上的差异有密切关系^[9~11]。本实验表明,不同外植体的出愈情况存在较大的差异。在表2的②、③号培养基上,零余子的出愈优于茎段、叶片,而在表2的①号培养基上,茎尖优于零余子,造成这种差异的原因可能是由于不同外植体中所含的内源细胞分裂素与生长素的绝对含量和相对比值不同所致^[12]。因而,在愈伤组织形成的过程中,选择合适的外植体,是非常重要的。

3.3 植物激素对山药愈伤组织诱导的影响

本研究表明:在愈伤组织诱导过程中,在没有或单独使用一种植物激素的培养基上,无论是在光下还是在暗处都不能诱导愈伤组织的形成。而细胞分裂素和生长素二者配合使用则可诱导形成愈伤组织。植物激素种类、浓度和配比不同,出愈率也不同。这说明植物激素按一定比例进行组合是诱导愈伤组织形成的关键因子。

3.4 光暗条件对山药愈伤组织诱导的影响

不同外植体在光、暗条件下愈伤组织的诱导情况是不同的。在暗处有利于零余子的诱导,而在光下,则有利于叶片的诱导。对零余子和叶片来说,光下褐化严重,而在暗处则褐化较轻或无褐化。因而,不同培养方式对愈伤组织诱导也有明显的影响。

参考文献:

- [1] 杨悦宇. 山药的本草考证 [J]. 中草药, 1989, 20 (5): 36~38
- [2] 杨德忠. 怀山药的栽培 [J]. 中草药, 1981, 12 (8): 37~38
- [3] 江苏新医学院编. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1993. 166~168
- [4] 聂桂华, 周可范, 董秀华等. 山药的研究概况 [J]. 中草药, 1993, 24 (3): 158~160
- [5] 李明军, 杨建伟, 张嘉宝. 怀山药的茎段培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 41 (1): 275~276
- [6] 李明军, 李金亨, 朱命炜等. 怀山药的离体繁殖 [J]. 中草药, 1999, 30 (4): 296~298
- [7] 李明军, 张嘉宝. BA、KT、NAA 和 PP333 对怀山药茎尖培养的影响 [C]. 中国植物学会编, 中国植物学会 65 周年年会学术报告及论文摘要汇编. 北京: 中国林业出版社, 1988: 423
- [8] 周洪生. 甜玉米愈伤组织的诱导、继代、植株再生的研究 [J]. 作物学报, 1993, 19 (1): 55~62
- [9] 倪德祥, 邓志先. 植物激素对基因表达的调控 [J]. 植物生理通讯, 1992, 28 (2): 462
- [10] 宋仁美. 体细胞胚胎发生的生化和遗传学研究 [J]. 国外遗传育种, 1985, (1): 31
- [11] 彭艳华, 刘成运. 脱落酸与胚胎发育的关系及作用方式的研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 1991, 9 (3): 289
- [12] 李明军, 张嘉宝, 杨建伟. 青饲玉米幼胚组织培养及其再生植株的开花结实 [J]. 河南师范大学学报, 1995, 23 (5): 59~62