

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 mg/L 6-BA+1.00 mg/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%; 最適根块分化培养基是, 改良的 MS+100 g/L 香蕉+0.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+0.4 mg/L IBA+0.5% 琼脂+0.5% 活性炭+3% 蔗糖; 最適无茎段分化培养基是, 改良的 MS+100 g/L 香蕉+0.5 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA+0.8 mg/L IBA+0.5% 琼脂+0.5% 活性炭+3% 蔗糖; 最適无茎叶柄分化培养基是, 改良 MS+100 g/L 香蕉+1.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/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 *Tiegun 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 (burls, aseptic shoots, petioles and root tubers) of the *Tiegun Dioscorea Thund* was discussed. The result showed: ① with burls as explant, modified MS medium + banana 100 g/L + 0.5 mg/L 6-BA + 1.00 mg/L NAA + 0.5% agaragar + 0.5% active carbon + 3% sucrose was optimal medium culture, the differentiation rate was completely 100% though the experiment of orthogonal experiment $L_9(3^4)$. ② Modified MS + banana 100 g/L + 0.5 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA + 0.4 mg IBA + 0.5% agaragar + 0.5% active carbon + 3% sucrose was the most suitable culture medium for germfree boot tuber differentiation, modified MS + banana 100 g/L + 0.5 mg/L 6-BA + 0.50 mg/L NAA + 0.8 mg/L IBA + 0.5% agaragar + 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 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA + 0.5% agaragar + 0.5% active carbon + 3% sucrose.

Key words 6-BA; NAA; IBA; *Tiegun Dioscorea thund*; Plant tissue cultuer; 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 材料与方法

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 °C、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 mg/L 6-BA+1.00 mg/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 mg/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 2 500 lx, 培养温度(25±2)°C。

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 mg/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。

| 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。 ① 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; ② 把嫩茎切成 0.5~1.0 cm 的小段为无菌茎段; ③ 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); ④ 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: fhualong8@yahoo.com.cn。

收稿日期 2007-03-16

析,结果见表2。

| 处理 | 激素 | | | 接种总数 块 | 分化数 块 | 分化率 % |
|----|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
| | 6-BA mg/L | NAA mg/L | IBA mg/L | | | |
| ① | 2.0 | 1.00 | 0.8 | 27 | 21 | 77.8 |
| ② | 2.0 | 0.50 | 0.4 | 27 | 18 | 66.7 |
| ③ | 2.0 | 0.25 | 0 | 27 | 19 | 70.4 |
| ④ | 1.5 | 1.00 | 0.4 | 27 | 22 | 81.5 |
| ⑤ | 1.5 | 0.50 | 0 | 27 | 23 | 85.2 |
| ⑥ | 1.5 | 0.25 | 0.8 | 27 | 17 | 63.0 |
| ⑦ | 0.5 | 1.00 | 0 | 27 | 27 | 100 |
| ⑧ | 0.5 | 0.50 | 0.8 | 27 | 24 | 88.9 |
| 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 + 100 g/L 香蕉 + 0.5 mg/L 6-BA + 1.00 mg/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,30 d成苗(表3)。

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

| 处理 | 激素 | | | 接入总块数 块 | 成苗 数 | 分化率 % |
|----|--------------|-------------|-------------|------------|---------|----------|
| | 6-BA mg/L | NAA mg/L | IBA mg/L | | | |
| ① | 1.5 | 1.00 | 0.8 | 15 | 0 | 0 |
| ② | 1.5 | 0.50 | 0.4 | 15 | 5 | 33.3 |
| ③ | 1.5 | 0.25 | 0 | 15 | 10 | 66.7 |
| ④ | 1.0 | 1.00 | 0.4 | 12 | 3 | 25.0 |
| ⑤ | 1.0 | 0.50 | 0 | 12 | 3 | 25.0 |
| ⑥ | 1.0 | 0.25 | 0.8 | 12 | 6 | 50.0 |
| ⑦ | 0.5 | 1.00 | 0 | 12 | 3 | 25.0 |
| ⑧ | 0.5 | 0.50 | 0.8 | 12 | 0 | 0 |
| ⑨ | 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16 d时,处理②和⑧培养基上的分化率最高,达100%。但是,处理⑧培养基以多芽体(2~4)为主,处理②培养基以单芽为主,故以茎段为外植体时,处理⑧培养基即:改良MS + 100 g/L 香蕉 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.50 mg/L NAA + 0.8 mg/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⑧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16 d,故以16 d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 | | | 接入总块数 块 | 成苗数 个 | 分化率 % |
|----|--------------|-------------|-------------|------------|----------|----------|
| | 6-BA mg/L | NAA mg/L | IBA mg/L | | | |
| ① | 1.5 | 1.00 | 0.8 | 15 | 12 | 50.0 |
| ② | 1.5 | 0.50 | 0.4 | 15 | 5 | 100 |
| ③ | 1.5 | 0.25 | 0 | 15 | 5 | 33.3 |
| ④ | 1.0 | 1.00 | 0.4 | 15 | 12 | 80.0 |
| ⑤ | 1.0 | 0.50 | 0 | 9 | 3 | 42.3 |
| ⑥ | 1.0 | 0.25 | 0.8 | 10 | 8 | 50.0 |
| ⑦ | 0.5 | 1.00 | 0 | 10 | 10 | 52.9 |
| ⑧ | 0.5 | 0.50 | 0.8 | 10 | 10 | 100 |
| ⑨ | 0.5 | 0.25 | 0.4 | 10 | 10 | 87.5 |

表5显示,在16 d时处理⑦、⑧、⑨培养基分化率最高,均达100%;但是处理⑨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⑨为根块最好的分化培养基,其配比是改良MS + 100 g/L 香蕉 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA + 0.4 mg/L IBA + 0.5%琼脂 + 0.5%活性炭 + 3%蔗糖。

根据表5的结果,对处理⑨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 | | | 接入总块数 块 | 成苗数 个 | 分化率 % |
|----|--------------|-------------|-------------|------------|----------|----------|
| | 6-BA mg/L | NAA mg/L | IBA mg/L | | | |
| ① | 1.5 | 1.00 | 0.8 | 15 | 6 | 80.0 |
| ② | 1.5 | 0.50 | 0.4 | 15 | 15 | 33.3 |
| ③ | 1.5 | 0.25 | 0 | 15 | 5 | 33.3 |
| ④ | 1.0 | 1.00 | 0.4 | 15 | 12 | 80.0 |
| ⑤ | 1.0 | 0.50 | 0 | 14 | 6 | 33.3 |
| ⑥ | 1.0 | 0.25 | 0.8 | 12 | 6 | 80.0 |
| ⑦ | 0.5 | 1.00 | 0 | 17 | 9 | 100 |
| ⑧ | 0.5 | 0.50 | 0.8 | 10 | 10 | 100 |
| ⑨ | 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10 d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1.76 cm。

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.激素配比对比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.

(3~4 年开花结果),产量高(单株产量达 120 个左右、比高种椰子提高 3~4 倍),多抗(抗风、抗寒),椰干质量好等特点,适宜在海南推广种植;文椰 78F₁ 与世界第一个优良杂交种马哇(Mawa)相比,其果大、抗风抗寒力强,因而认为是我国目前可供推广的一个优良新品种。该品种通过农业部鉴定,认为是生产潜力较大的新种质,已被列为海南百项农业新技术之一。

2.3.2 马哇(Mawa)。马哇是马来西亚矮种×西非高种杂交育出来的一个高产良种^[3]。特性是结果早、产量高(120~200 个/株)。我国曾在 20 世纪 80 年代从马来西亚引种,在海南有较大面积的种植,前期表现出早产、高产的优点,但经过近 20 年的观察,发现其抗寒、抗风性状不好,果型一般,空果较多,所以,经济效益并不好,如今已大部分被淘汰。

3 育种方法

育种方法包括传统育种和分子育种,转基因技术也是可以应用的种质改良手段,但是在椰子上的应用技术还不成熟,有待我们继续努力。目前在椰子育种方面主要还是采用传统育种,介绍如下:

3.1 引种驯化 为丰富我国椰子种质资源,加快椰子产业的迅速发展,从外地或国外引入本地区没有的椰子新品种具有所需时间短、投入的人力物力少、见效快等优点。但引种首先必须考虑该品种是否具有可引进的可能性,引进地是否适合该品种的生长发育等条件的要求。我国在 20 世纪 80 年代后期引进了马来黄矮、马来红矮、绿矮、泰国香水椰子等品种,适合在我国种植,已开花结果获得初步较好的经济效益,开发前景看好。

3.2 无性系育种 无性系育种指的是通过选择和无性系测定选育出优良无性系,并以无性繁殖方式推广利用的育种技术。目前中国热科院椰子研究所椰子组织培养技术已日趋成熟,椰子胚培养已获得完整植株现正小批量地进行移栽种植。而无性系组织培养现正在试验阶段,有望不久可有新的突破,该项技术的成熟对于获得整齐一致的优质种苗,获得抗性植株,增进国际间种质资源交换等具有深远意义。

3.3 有性杂交育种 有性杂交育种是传统的经典培育新品种的主要方法和有效途径,通过杂交可将来自亲本的有利基因重新组合到杂种后代,获得超越双亲的新品种。中国热带农业科学院椰子研究所培育的文椰 78F₁ 就是通过有性杂交育种获得的新品种。椰子的杂交制种技术程序如下:选择佛焰苞即将开放的花苞,将所有的雄性花去除并套袋隔离。当雌花成熟时,有接受力的柱头释放出胶质的渗出液,用制备好的花粉重复授粉 2~3 d,授粉至雌花柱头变褐,7 d 后移走

隔离袋,于花梗上扎上标签以鉴别亲本,1 年后采果,选择健康、成熟、饱满的椰果进行催芽育苗,根据苗期的叶片特征选出杂交种植株。

4 讨论与建议

4.1 改变单一品种的种植格局 目前,我国椰子栽培品种单一,海南本地高种植面积约占椰子总面积的 95%,其非生产期长,产量偏低,经济效益不高,这种品种分布格局不符合长期发展的需要。而矮种椰子具有色彩鲜艳、椰水甜美、单株产量高,市场卖相好,经济价值高的特点,基于海南迅速发展的旅游产业,适当的发展矮种椰子(旅游型嫩果鲜饮品)以顺应旅游产业的发展,对于椰子业有较为重要的意义,另外,栽培品种的多元化可丰富椰子产业的内涵,对于椰子抵御病虫害也有好处,是椰子种植业可持续发展的需要。

4.2 改变椰农种椰子的观念问题 农民对种植椰子知识较缺乏,未进行科学规范地种植,使很多椰子产量不高,因而经济收入较低打击了农民的积极性。应向广大椰农传授椰子丰产栽培技术,推广种植高产优质新品种,提高椰子的产量和种植椰子的经济效益,从而提高农民种植椰子的积极性,对我国椰子产业发展以及解决三农问题有很好的促进作用。

4.3 椰子产业与椰子虫害 椰心叶甲是椰子的主要害虫,是椰子种植业的巨大威胁。一些科研院校的科学家正在研究其防治方法,但目前效果不是很理想,且防治费用很高。对于该问题的长远解决方法应是培育抗虫新品种。可通过选择育种的方法,从严重的疫情区对生长状况良好的植株进行种果收集及无性系繁育,亦可通过杂交制种获得抗虫新品种。该技术的不断完善为培育其他抗性品种作好基础工作。

4.4 种质资源的收集保存与育种

我国椰子栽培已有 2 000 多年的历史,经长期的生态环境的变化和人工选择,我国的椰子已有多种生态型。收集和保存不同类型的椰子种质资源以供直接繁育种苗或杂交育种;充分地利用现有的资源培育出高抗、特殊香味、外观好的水果型椰子杂交种。培育出的抗风、抗寒新品种可推广种植到椰子可适区(如广东、广西、云南等地)以扩大我国椰子种植业。

参考文献

- [1] 潘衍庆. 中国热带作物栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,1998:325.
- [2] 华南热带作物科学研究院. 海南岛作物(植物)种质资源考察文集[M]. 北京:中国农业出版社,1992:48.
- [3] 毛祖舜,邱维美. 椰子种质资源[M]. 北京:中国农业出版社,2006:5-17.
- [4] 毛祖舜,邱维美. 椰子丰产栽培技术[M]. 海南:海南出版社,2003:33-34.
- [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, LI'RIO LUIZ DAL VESCO, MIGUEL PEDRO GUERRA. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through module 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.

(上接第 5407 页)