

山葵试管苗快繁体系优化初探

崔 翠 何凤发* 周清元 王季春 黄远新

(西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716)

摘要: 通过最优回归设计, 利用 6-BA、NAA 和维生素 C 不同浓度配比对山葵试管苗增殖系数进行调查, 结果表明: 当 6-BA、NAA、维生素 C 的浓度分别为 1.2504、0 和 1.9668 mg/L 时, 增殖系数可达到 6.8380。壮苗比较适宜的生根培养基为 1/2MS + NAA 0.01 mg/L 或者 1/2MS, 生根率达 90% 以上。未生根的壮苗试管苗可直接移栽驯化, 且生根率可达 80% 以上, 能进一步降低种苗的生产成本。

关键词: 山葵; 组织培养; 最优回归设计

中图分类号: S 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0876-03

Studies on Optimizing Production of Wasabi Plantlet

Cui Cui, He Fengfa*, Zhou Qingyuan, Wang Jichun, and Huang Yuanxin

(College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The study showed that the concentration of 6-BA, NAA and Vitamin C affected plantlet propagation coefficients of Wasabi through optimization regression analysis. As a result, the suitable combination was selected, the proliferation coefficient might increase to 6.8380 when treated by MS medium with 6-BA 1.2504 mg/L and Vitamin C 1.9668 mg/L. In rooting culture, 1/2MS medium or 1/2MS with 0.01 mg/L NAA were suitable for root development and growth, and rooting frequency reached above 90%. In acclimatization, the results showed that strong plantlets without rooting were fit for culture out of door with around 80% rooting frequency, therefore, production cost of wasabi seedlings decreased greatly without rooting phases.

Key words: Wasabi; Tissue culture; Regression design

1 目的、材料与方 法

山葵种苗生产通常是利用分株繁殖, 繁殖速度慢, 且连续无性繁殖会导致种性退化。通常认为退化的主要原因是由于病毒感染所致, 解决这一问题的有效途径是通过组织培养方法脱病毒。山葵的组织培养存在着繁殖系数较低, 生长速度慢等问题。细木高志等在对‘岛根 3 号’、‘真妻’等的增殖培养中, 选用 MS 基本培养基附加 6-BA 0.1~0.2 mg/L, 获得了增殖系数 4.0 和 3.9 的结果^[1]。我国部分学者对山葵组织培养研究也取得了一定的进展^[1~5], 发现最佳增殖培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L 或 KT 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L, 增殖系数达 5.1^[4]。由于山葵本身含有多酚氧化酶, 培养基的细胞分裂素物质 (如 6-BA) 有提高多酚氧化酶活性的作用, 从而在培养基内产生并积累了酚、酮类深褐色色素物质。这类物质常产生毒害, 严重时组织完全褐化而死亡。因此有人提出适当添加维生素 C 或者 PVP, 以克服或者减轻褐化现象^[2]。

本研究采用最优回归设计, 以试验因子 6-BA (X_1)、NAA (X_2) 与维生素 C (X_3) 的质量浓度为自变量, 以增殖系数 (Y) 为目标函数。为了使回归关系标准化, 消除量纲和自变量取值的影响, 对试验因子 (自变量) 的设计水平进行无量纲线性编码代换, 以便把因变量 Y 对自变量的回归关系转化为 Y 因子对空间坐标轴 X 上编码值的关系, 其编码代换见表 1。

收稿日期: 2005-08-22; 修回日期: 2005-11-14

基金项目: 国家星火计划项目 (2002EA812002); 重庆市科委应用基础项目 (2003023)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: Hefengfa@swau.cq.cn)

2004 年, 将保存的山葵‘岛根 3 号’组培试管苗接入 11 种培养基(表 1)。基本培养基为 MS, 3% 蔗糖, 卡拉胶 0.45% ~ 0.50%, pH 5.8。每瓶内接种 4 株外植体, 每个外植体带有 2 个芽, 质量 0.16 g 左右。每个处理接种 10 ~ 15 瓶不等, 培养温度 17 ~ 19℃, 每天光照 12 h。培养 35 d 后, 对试管苗进行统计增殖后的总芽数, 并计算平均增殖系数(平均增殖系数 = 总芽数/接种幼芽数)。试验数据采用 DPS v3.01 数据处理系统估算回归方程和最优配比。

将增殖所得部分无菌苗转接到 1/2MS 或者 MS 培养基中壮苗 30 d, 然后切成单芽分别接种到 8 种生根培养基中(表 2)进行生根培养, 35 d 后统计生根率。2 次不同时间接种构成 2 次重复, 每次重复每个处理接种 3 ~ 5 瓶。

将已经生根和只经壮苗的无菌试管苗, 揭开封口膜, 在室温下(20℃左右)炼苗 3 ~ 4 d, 用自来水洗净琼脂, 并用 0.1 mg/L 生根粉处理未进行生根的无菌试管苗 2 ~ 3 h, 然后同生根试管苗一起移栽在营养钵中, 1/2MS 大量元素营养液浇灌。在人工气候室(18℃、光照强度 10'000 lx、光照时间 12 h)驯化生长, 每日适当浇水, 30 d 后统计存活率和生根率。以不同时间进行处理为 3 次重复, 每个处理每次驯化移栽苗 25 株左右。

2 结果分析与讨论

2.1 山葵种苗增殖体系的优化

接种 35 d 后, 对试管苗叶色、丛生芽长势、苗基本褐化情况、叶片大小、增殖系数等方面进行调查, 10 号培养基(MS + 1.0 mg/L 6-BA + 2.5 mg/L 维生素 C + 3.0% 蔗糖 + 0.7% 琼脂)山葵试管苗叶色浓绿, 丛生芽紧凑、整齐, 长势旺盛, 基部无褐化、无愈伤, 叶缘黑斑最少, 叶片大小均匀(图 1, 表 1), 获得较高的增殖系数。

由表 1 数据建立了山葵增殖系数 y 与各自变

量因子 6-BA (x_1)、NAA (x_2)、维生素 C (x_3) 的多项式回归方程为: $\hat{y} =$

$$3.6298 + 0.1657x_1 - 0.5740x_2 -$$

$$0.3181x_3 - 0.4283x_1^2 + 0.3391x_2^2 -$$

$$0.4274x_3^2 - 0.0988x_1x_2 - 0.0543x_1x_3 +$$

$$0.3460x_2x_3。利用该方程得到理论增殖$$

系数与实际增殖系数相符, 其回归方程

的相关指数为 $R = 0.9833$, 表明方程各

因子与试验结果的拟合效果非常好。对

该多项式回归方程进行极值求解, 当

6-BA、NAA、维生素 C 的水平编码值

分别为 0.5009、-2.000、-1.2133

时, 即它们浓度分别为 1.2504、0、

1.9668 mg/L 时, 增殖系数可达

6.8380。根据筛选出的最佳组合配制增

殖培养基 MS + 6-BA 1.2504 mg/L + 维

生素 C 1.9668 mg/L, 将试管苗分割成只有双芽的外植体接入增殖培养基 15 瓶, 35 d 后统计快繁系

数, 结果表明, 增殖系数介于 6.82 ~ 7.13 之间, 平均为 6.930, 与理论增殖系数差异不明显。

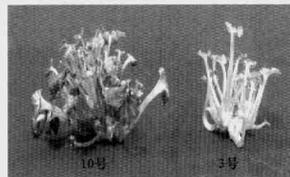


图 1 10 号培养基和 3 号培养基上山葵试管苗形态比较

Fig. 1 Plantlets of wasabi on the 10 th and 3 th medium

表 1 6-BA, NAA, 维生素 C 组合调查结果

Table 1 The combination of 6-BA, NAA, Vitami C and the survey result of treatment

处理号 No.	6-BA	NAA	维生素 C Vitamin C	平均增殖系数 Average coefficient	
				实际值 Practical	理论值 Theoretical
1	0(1)	0(0.5)	2(10)	1.708	1.280
2	0(1)	0(0.5)	-2(0)	2.125	2.553
3	-1.414(0.293)	-1.414(0.1465)	1(7.5)	2.458	2.672
4	1.414(1.707)	-1.414(0.1465)	1(7.5)	3.167	3.381
5	-1.414(0.293)	1.414(0.8535)	1(7.5)	2.208	2.422
6	1.414(1.707)	1.414(0.8535)	1(7.5)	2.125	2.339
7	2(2)	0(0.5)	-1(2.5)	2.458	2.249
8	-2(0)	0(0.5)	-1(2.5)	1.583	1.369
9	0(1)	2(1)	-1(2.5)	3.250	3.036
10	0(1)	-2(0)	-1(2.5)	6.925	6.711
11	0(1)	0(0.5)	0(5)	3.625	3.625

注: 括号内为各因子不同水平编码相对应的浓度(mg/L)。

Note: Number in bracket is concentration.

2.2 壮苗与生根

将增殖试管苗切分成3~4芽转接到壮苗培养基1/2MS或MS中,培养30d左右,获得长势较强的无菌苗(图2, A)。在壮苗培养过程中较少有试管苗生根,可能是由于植株体内较高的6-BA浓度所致。

将经过壮苗培养的试管苗切成单芽转接到生根培养基中,30d后统计平均生根率,并进行显著性检验(表2)。结果显示:1/2MS培养基中平均生根率远远高于MS培养基的,差异达极显著水平。说明适当降低MS培养基中大量元素的浓度有利于山葵根的生长。从NAA对生根的影响中可以看到,随着NAA浓度的增加,山葵生根率逐渐降低,该研究结果和前人研究结果^[1]相符;在1/2MS培养基中不添加NAA或者添加少量的NAA(0.01 mg/L)获得了较高的生根率,二者差异不显著,但是添加少量的NAA(0.01 mg/L)所产生的单株生根数目比不添加NAA所产生的单株须根数目多,因此在生根培养中添加低浓度的NAA对生根是有利的。

将已经生根培养和未生根培养的无菌试管苗同时各取80株左右炼苗3~4d,移栽在营养钵中,驯化30d后统计存活率和生根率。结果显示:进行过生根培养的无菌试管苗存活率达到92.6%,没有进行过生根培养的无菌试管苗生根率和存活率均达到84.6%(图2, B),二者差异不显著。由于生根培养的时间较长,在种苗生产中浪费人力、物力和财力,如果选取壮苗培养后的山葵无菌试管苗,用0.1 mg/L生根粉浸泡后也能获得较好的生根效果。那么不通过生根培养阶段而直接移栽驯化,将极大地节约成本。

参考文献:

- 王广东. 珍贵稀有香辛植物山葵(*Eutrema wasabi*)的组培增殖及其根状茎发育生理研究; [博士论文]. 南京: 南京农业大学, 1999. 6~29
Wang G D. Study on tissue culture of rare and pungent wasabi and developing physiology of rhizoma; [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 1999. 6~29 (in Chinese)
- 刘 琴. 山葵(*Wasabi japonica* Matsum)组培快繁的关键技术研究; [硕士论文]. 南京: 南京农业大学, 2002. 15~16
Liu Q. Studies on the micropropagation of wasabi (*Wasabi japonica* Matsum); [M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2002. 15~16 (in Chinese)
- 王 俐. 龙春林. 山葵试管繁殖技术. 中国蔬菜, 2002 (2): 15~16
Wang L, Long C L. Tissue culture and in vitro propagation of *Eutrema wasabia*. China Vegetables, 2002 (2): 15~16 (in Chinese)
- 吴 震, 王广东, 刘 琴. 不同激素种类和浓度对山葵(*Eutrema wasabi*)组培增殖效果的研究. 西南农业学报, 2002, 15 (3): 66~69
Wu Z, Wang G D, Liu Q. Effect of different hormones with various concentrations on apical buds proliferation of wasabi (*Wasabi japonica* Matsum). Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2002, 15 (3): 66~69 (in Chinese)
- 吴 震, 王广东, 翁忙玲, 李武军. 山葵(*Wasabi japonica*)种子发芽特性的研究. 园艺学报, 2003, 30 (3): 287~290
Wu Z, Wang G D, Weng M L, Li S J. Studies on germination character of wasabi (*Wasabi japonica*) seeds. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30 (3): 287~290 (in Chinese)

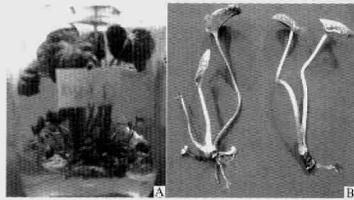


图2 山葵试管苗的壮苗与生根

A: 壮苗培养基中的山葵试管苗; B: 无根试管苗直接移栽后生根。

Fig. 2 Strong and rooted of wasabi seedlings

A: Strong seedling; B: Rooted seedling.

表2 不同培养基对山葵生根的影响

Table 2 The effect of different medium on taking roots

培养基 Medium	NAA (mg/L)	植株数 Plantlets		生根率 Ratio of taking roots (%)	
		接种 Primary	生根 Rooted	生根 taking roots	Ratio of (%)
1/2MS	0	30	29	96.67 A	
1/2MS	0.01	29	27	93.00 A	
MS	0	27	10	36.65 B	
1/2MS	0.05	27	9	32.50 B	
1/2MS	0.10	30	7	23.33 BC	
MS	0.01	27	3	10.83 CD	
MS	0.05	30	2	6.67 D	
MS	0.10	30	1	3.33 D	

注:表中不同大写字母表示1%水平下差异显著性。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at level of 1%.