

正交试验在怀山药组织培养中的应用

薛建平^{1*}, 赵小全², 张爱民¹, 黄月琴¹

(1. 淮北煤炭师范学院 生命科学学院 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000;

2. 焦作师范高等专科学校 理化生系, 河南 焦作 454100)

【摘要】 目的:研究植物生长物质种类和浓度、蔗糖含量对怀山药茎段形成不定芽和诱导小块茎的影响。**方法:**选用怀山药的茎段为材料,采用正交设计研究蔗糖、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)对丛生芽和小块茎诱导的影响,对所得实验数据进行极差分析、方差分析。**结果与结论:**茎段诱导丛生芽最适宜的培养基为MS+6-BA 1 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+蔗糖3%,各因素影响程度依次为蔗糖>6-BA>NAA;诱导小块茎最适宜培养基为MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 1.5 mg·L⁻¹+蔗糖5%,各因素影响程度依次为蔗糖>6-BA>NAA。

【关键词】 怀山药;组织培养;多芽体;小块茎;正交试验**【中图分类号】** S 567 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-5302(2008)16-1952-04

怀山药 *Dioscorea opposita* 为薯蓣科薯蓣属草本植物,是我国著名的“四大怀药”之一^[1]。主产于河南温县、武陟、博爱等地,以块茎和珠芽(中药称之为零余子,俗称山药蛋)入药,具有健脾、固精、补肺、益肾的功能,主治肺虚咳嗽、脾虚、腹泻、糖尿病、遗精尿频、赤白带下等症,因其药用价值高、品质好,故其产品畅销国内外^[2-3]。但由于长期进行营养繁殖(珠芽繁殖和芦头繁殖),植株感染病毒严重,代代相传,致使品质退化、产量下降,甚至某些优良品种已被放弃种植^[4]。因此,脱毒复壮、改善品质、提高产量,并使其优良品种迅速推广种植,已成为怀山药生产中亟待解决的一个重要问题。

为了解决怀山药生产中存在的问题,近年来,国内外许多学者开展了怀山药的组织培养研究工作,对其茎尖、叶片、块茎、珠芽和茎段等不同外植体的培养条件进行了广泛的研究^[5-9]。但纵观前人的研究成果多是以单因素水平来设计的,无法准确了解多因素的相互作用。因此本研究设计了多因素正交试验,研究不同因素对怀山药茎段诱导芽和小块茎的影响,从中筛选适宜的培养基,为怀山药的快速繁殖提供理论和技术上的帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 怀山药脱毒幼苗,经薛建平教授鉴定为薯蓣科植物怀山药 *D. opposita* 的植株,由淮北煤炭师范学院药用植物生物技术实验室提供无菌苗。

1.2 培养基及培养条件 选用MS基本培养基,以蔗糖(含量1%,3%,5%)为碳源,用0.8%琼脂固化,pH 5.8~6.0,附加不同的植物生长物质及其他成分,分装于100~150 mL三角烧瓶中,在121℃湿热灭菌15~20 min。材料接种后放在培养室内培养,温度(25±1)℃,光照强度2 000~3 000 lx,光照时间12 h·d⁻¹。选用L₉(3⁴)正交表研究6-BA, NAA和蔗糖对怀山药外植体诱导形成芽和小块茎的影响(表1)。

表1 正交试验设计L₉(3⁴)

培养基	A	B	C
	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	蔗糖/%
1	1	1	1
2	1	1.5	3
3	1	2	5
4	1.5	1	3
5	1.5	1.5	5
6	1.5	2	1
7	2	1	5
8	2	1.5	1
9	2	2	3

1.3 多芽体和小块茎的获得 切取带腋芽的茎段接种到添加不同浓度植物生长物质和蔗糖的MS培养基中,每瓶接3~4个外植体,每个处理接种20个,实验重复3次,定期观察记录。

【收稿日期】 2007-08-29**【基金项目】** 河南省科技攻关重点项目(0624050021)**【通讯作者】** *薛建平, Tel: (0561) 3802025, E-mail: xuejp2000

@ yahoo. com. cn

1.4 再生植株的壮苗、生根和移栽 将高2~3cm的苗移入生根培养基中,培养基组合MS+KT 2 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹和MS+KT 2 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹+PP₃₃₃ 0.1 mg·L⁻¹[8]。选择生长健壮、根系发达的试管苗移入装有细砂的营养钵中,每天用自来水或营养液进行叶面喷雾,保持湿度,并定时定量浇营养液。30 d后将成活的试管苗移入大田,移栽在自然条件下进行。

2 结果与分析

2.1 多芽体的形成 将带芽茎段接种在9种培养基中,20~25 d后多芽体形成。4号培养基中形成的多芽体最多(表2)。极差分析表明,6-BA, NAA, 蔗糖3种因素对多芽体形成的影响依次为蔗糖>6-BA>NAA,即蔗糖的影响最大。正交设计是一种均匀性设计,不可能含有所有处理组合,所以A₁B₁C₂在实验中没有显示出来。通过实验验证此培养基对继代培养诱导多芽体最好,其出芽率为100%。因此,对多芽体形成的适宜培养基组合为MS+6-BA 1 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+蔗糖3%。

表2 培养基对怀山药茎多芽体形成的影响

培养基	接种数/个	丛芽数/个
1	20	70
2	20	93
3	20	96
4	20	98
5	20	95
6	20	60
7	20	86
8	20	50
9	20	60

为进一步探讨处理间及各因子水平之间的差异,故进行方差分析(表3)。蔗糖在3%水平上对多芽体形成影响差异显著($P < 0.05$),不同浓度的6-BA和NAA对怀山药多芽体形成影响无显著差异。由此可见,3种因素中蔗糖是影响多芽体形成的主要因素,此结果与极差分析的结果相吻合。

表3 怀山药茎段形成丛芽数的方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方比	F临界值
6-BA	134.000	2	1.511	19.000
NAA	50.667	2	0.571	
蔗糖	2368.667	2	26.263*	
误差	88.67	2		
总和	2642.004	8		

2.2 带芽茎段诱导形成小块茎 将MS+6-BA 1 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+蔗糖3%中形成的茎

段接种到表1的9种培养基中,60 d后统计分析结果。结果表明,20 d时4号、5号和9号培养基中茎段的节点上形成小块茎和白色不定根,且各有特点。4号培养基中诱导出一些小块茎,同时外植体形成多芽体,多芽体的每个芽都生长健壮;而5号培养基中大部分形成小块茎,60 d时形成小块茎的茎段的芽体逐渐枯萎;8号培养基茎段下部膨大形成颗粒状愈伤组织;9号培养基中诱导的小块茎小而且没有4号培养基中诱导的多。

极差分析结果表明,对诱导形成小块茎最适宜的培养基的组合为MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 1.5 mg·L⁻¹+蔗糖5%,即5号培养基,在实验过程中也验证此培养基对小块茎诱导最适宜,每个茎段能诱导形成1~2个小块茎(表4)。

表4 培养基对怀山药茎段诱导形成小块茎的影响

培养基	接种数/个	小块茎数/个
1	20	6
2	20	25
3	20	39
4	20	40
5	20	54
6	20	12
7	20	42
8	20	18
9	20	39

为了准确地判断出各因素对怀山药小块茎诱导的影响,对试验所得数据进行方差分析。蔗糖各水平对多芽体形成小块茎诱导影响差异显著($P < 0.05$),不同浓度的6-BA和NAA对怀山药小块茎诱导影响无显著差异(表5)。由此可见,3种因素中蔗糖是影响块茎形成的主要因素,而且此结果与极差分析的结果相吻合。

表5 怀山药茎段诱导形成小块茎数的方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方比	F临界值
6-BA	238.222	2	3.125	19.000
NAA	16.222	2	0.213	
蔗糖	1701.556	2	22.324*	
误差	76.22	2		
总和	2032.22	8		

2.3 再生植株的壮苗、生根和移栽 从茎段上将高2~3cm的苗切离,移入生根培养基中,12 d左右再生苗从茎节的膨大处和叶腋部开始产生新芽,并有根的生长。这2种培养基均能诱导生根,但效果不同,其中诱导生根最适宜培养基为MS+KT 2 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹+PP₃₃₃ 0.1 mg·L⁻¹。这

种培养基能使根早生快发,根粗而多,根系发达,地上部分生长健壮,叶色浓绿,生长整齐一致。40 d后将根系发达的试管苗移入营养钵,没发生萎焉现象,移入大田后,生长健壮,叶色浓绿,生长良好,并对环境具有较强的适应能力。

3 讨论

宋东光等^[10]指出高浓度蔗糖可诱导马铃薯颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)基因的表达,该酶是块茎膨大过程中重要的酶。韩德俊等研究发现蔗糖不仅为小块茎的形成提供碳源,而且可能对块茎发育过程中一些重要酶的基因表达及部分储藏蛋白积累都具有重要影响^[11]。而怀山药的小块茎中也含有大量的淀粉,所以这一观点在蔗糖对怀山药茎段诱导小块茎的影响中同样适用。

植物组织或细胞在离体培养条件下,通常需要添加外源生长素和细胞分裂素,来调节内源激素平衡和代谢,促进器官的形态建成。本实验结果表明,6-BA质量浓度为 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导芽最佳,而适当提高6-BA浓度有利于怀山药小块茎的形成和进一步膨大,当6-BA质量浓度为 $1.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导效果最佳。腋芽的形成是怀山药小块茎形成的前提,外源6-BA的加入,一方面解除了植株内源激素对腋芽的抑制,从而改变植物体内的生理代谢活动,使植物内部同化物质分配发生改变,光合产物更易于向腋芽部运输;另一方面可促进腋芽的细胞分裂和扩展,增大库容,促进小块茎的膨大发育。在脚板薯试管块茎诱导研究中,NAA促进珠芽质量的增加,对单株珠芽个数影响较小^[12],这与本实验结果相同。

怀山药脱毒苗的繁殖系数小、成活率低、育苗周期长、运输极不便利,从而限制了其在农业生产上的推广^[7]。近年来,随着植物生物技术的发展,人们先后在试管中诱导出了试管半夏^[13]、试管马铃薯^[14]等,其中半夏试管块茎的培养技术日趋成熟,

完全可以替代试管苗作为商品供应^[15]。本研究出怀山药试管小块茎作为一种休眠和繁殖的器官,是否能成为脱毒苗应用于生产的对接技术,从根本上降低脱毒苗生产成本,将是以后研究的重点。

[参考文献]

- [1] 李明军. 怀山药组织培养及其应用[M]. 北京:科学出版社, 2004:1.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社, 1997:167.
- [3] 姚宗凡. 常用中药种植技术[M]. 北京:金盾出版社, 1993: 70.
- [4] 杨德忠. 怀山药的栽培[J]. 中草药, 1981, 12(8):37.
- [5] Hiroyuki Rohmura, Hajime Araki, Massshi Imoto. Micropropagation of 'Yamatoima' Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1995, (40):271.
- [6] Lauzer D, Laubin A, Vincent A, et al. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch and *D. mangelotiana* Miede[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1992(28):215.
- [7] 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, 33(4):275.
- [8] 李明军, 张嘉宝, 张海波. 怀山药零余子愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5):772.
- [9] 李明军. 怀山药愈伤组织的诱导和多芽体的形成[J]. 华北农学报, 2000, 15(2):85.
- [10] 宋东光, 孙国枫, 单海燕, 等. 马铃薯 GBSS 基因 5' 侧翼区调控作用的研究[J]. 植物学报, 1998, 40(9):796.
- [11] 韩德俊, 陈耀锋, 王亚娟, 等. 水杨酸和不同糖浓度对马铃薯试管微薯形成与生长的影响研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6):92.
- [12] 杨薇. 脚板薯脱毒试管苗培育及其试管珠芽诱导[D]. 南昌:南昌大学, 2006.
- [13] 张爱民, 杨生玉, 薛建平, 等. 多种因素对半夏外植体直接诱导形成试管小块茎的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 576.
- [14] 柳俊, 谢从华. 马铃薯种属退化与试管薯应用技术[J]. 长江蔬菜, 1998, 8:14.
- [15] 薛建平, 张爱民, 葛红林, 等. 半夏的人工种子技术[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5):402.

Application of orthogonal design in tissue culture of *Dioscorea opposita*

XUE Jian-ping¹, ZHAO Xiao-quan², ZHANG Ai-min¹, Huang Yue-qin¹

(1. Department of Biology, Huaibei Coal Industry Teachers' College, Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei 235000, China;

2. Department of Physics Chemistry and Biology, Jiaozuo Teachers' College, Jiaozuo 454100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of different factors on buds and microtuber. These factors included plant growth substances and sucrose. **Method:** stems were selected as explants. The effects of three kinds of factors were studied by orthogonal design method including sucrose, 6-BA, NAA on the buds and microtuber induction. The data were analyzed with range analysis and variance analysis. **Result and conclusion:** The optimal media to induce many buds from stems were MS + 6-BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose 3%, the effect of the three factors was in sequence of sucrose > 6-BA > NAA. The optimal media to induce microtuber from stems were MS + 6-BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose 5%, the effect of the three factors was in sequence of sucrose > 6-BA > NAA.

[Key words] *Dioscorea opposita*; buds; microtuber; tissue culture; orthogonal design

[责任编辑] 吕冬梅

怀牛膝氮磷钾吸收、分配及积累特点的初步研究

左晓燕¹, 刘 辉², 薛世跃³, 韩燕来¹, 张艳丽¹, 王 磊¹,
张重义^{1*}, 谭金芳^{1*}

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 南京金陵药业股份有限公司, 江苏 南京 210009;
3. 温县农业科学研究所, 河南 焦作 454881)

[摘要] **目的:** 研究怀牛膝氮、磷、钾吸收、分配和积累特点。**方法:** 采用过氧化氢-硫酸消化法、钒钼黄比色法、火焰光度法测其氮、磷、钾的含量。**结果:** 植株中氮、磷、钾的含量随生育期的推移而下降, 其含量顺序为钾 > 氮 > 磷; 植株对氮、磷、钾的吸收速率呈双峰曲线变化, 吸收的最大速率期均处于 10 月中旬; 每生产 100 kg 怀牛膝根需要氮、磷、钾分别为 8.59, 1.36, 7.40 kg。**结论:** 在 9 月中旬和 10 月中旬是养分吸收的关键时期, 应保证养分的充足供应, 注重氮肥和钾肥。

[关键词] 怀牛膝; 氮; 磷; 钾; 吸收; 分配; 运转

[中图分类号] S 567 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2008)16-1955-05

怀牛膝原植物为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl., 以干燥根入药, 其茎叶亦可供药用, 主产于河南武陟县、温县、孟州市等地(古“怀庆府”一带)称为怀牛膝, 是我国著名的道地药材“四大怀药”之一。具有补肝肾, 强筋骨, 逐瘀通经, 引血下行功能。用于腰膝酸痛, 筋骨无力, 经闭症瘕, 肝阳眩晕^[1]。现代药理学研究表明, 怀牛膝具有较强蛋白质合成促进作用, 不仅可促进微粒体也可促进核及线粒体的蛋白质合成的活性; 对心血管也有一定的作用, 通过扩张血管, 可增加衰竭心脏张力等。在抗血栓, 抗高血压, 治疗心脑血管疾病, 治疗及预防衰老等方面前景广阔^[2-6]。

氮、磷、钾是植物生长发育必须的营养元素, 在

姜黄、麦冬、菰蓝等少数药用植物营养中有报道^[7-9]。怀牛膝生长在土壤中的植物体内营养状况研究甚少, 本试验在怀牛膝的主产地温县, 选择当地高产优质田块, 在优化施肥条件下对其氮、磷、钾的吸收、分配及积累规律进行初步探讨, 旨在为怀牛膝规范化种植提供科学依据。

1 材料和方法

试验于 2006 年在河南温县金陵怀药有限公司怀牛膝规范化种植示范园区进行, 供试土壤为粘质潮土。其 0~20, 20~40 cm 土层的土壤农化性状见表 1。供试种子怀牛膝 2 号(风筝棵)秋子, 由河南温县农业科学研究所提供, 经张重义教授鉴定为 *A. bidentata*。播种前随耕地施入干鸡粪 $4\ 500 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 尿素 $300 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 过磷酸钙 $600 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 硫酸钾 $300 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。于 2006 年 7 月 25 日播种, 7 月 30 日出苗, 行距 20 cm, 株距 15 cm。9 月 2 日追施尿素 $225 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 并适时酌情灌水。在生长发

[收稿日期] 2007-10-18

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI09B03)

[通讯作者] * 张重义, E-mail: hazyzy@163.com; * 谭金芳, E-mail: tanjf@henau.edu.cn