

张振霞,叶静鹏,郑莉,等. 广山药组织培养技术的研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):76-80.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.021

广山药组织培养技术的研究

张振霞,叶静鹏,郑莉,陈贵豪,郑玉忠

(韩山师范学院生物学系,广东潮州 521041)

摘要:以广山药块茎为外植体进行组织培养,研究了消毒剂、消毒浓度、消毒时间对外植体消毒的影响,在此基础上研究了不同激素配比、培养条件对外植体愈伤组织诱导、分化及生根的影响。试验结果表明,用0.1% HgCl₂ 12 min的消毒条件处理山药地下块茎的效果较好;8 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA和5 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L 6-BA,诱导广山药块茎愈伤组织的效果较好;采用1/2 MS+1 mg/L NAA+1 mg/L IBA的培养基对于广山药再生苗的生根效果最好,主根明显,出现更多的不定根和毛状根;添加1 g/L活性炭对于广山药块茎褐化的防治效果明显;黑暗培养能更好地诱导愈伤组织。

关键词:广山药;组织培养;愈伤组织;激素;消毒

中图分类号: S632.104+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0076-05

山药是薯蓣(*Dioscorea opposita* Thunb.)的块茎,早在宋代广山药就是中药山药的一个品种,在中医上属于补益类中药,具有健脾止泻、补肺益肾等功能;同时也是南方各地的传统保健菜肴,营养丰富^[1-2]。山药通常利用块茎育苗或零余子播种等方式进行繁殖。这种传统的繁殖方式有着一定的弊病,主要是因为多数薯蓣科种类的细胞核内染色体数目较多,容易发生变异,出现性状分离,引起品种品质的退化^[3]。另外,薯蓣科植物自身为了生存下来,会尽量多保留对外界环境适应能力强的性状,例如零余子的增多,块茎变小,品质变差,须根增多等^[4]。此外,长期的无性繁殖会不断积累病毒,使其生产力明显下降^[5-6]。目前对于山药的培养研究多为怀山药,而对广山药的组织培养少见报道。本研究利用植物生物技术中组织培养的方法对广山药进行快速无性繁殖,不仅可以保持其优良性状,在短期内生产出大量整齐、均匀的健壮种苗,解决繁殖系数低、块茎带病毒等问题,从而满足市场的大量要求。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

材料是购自广东省汕头市潮阳区的广山药块茎,并种植于花盆中待其长出植株,选取其幼嫩叶片和块茎作为试验材料。

以MS、NB为基本培养基,附加30 g/L蔗糖,7 g/L琼脂,pH值5.8,不同浓度2,4-D、NAA、6-BA、KT、IBA等激素。所有培养基均在121℃条件下高压灭菌15 min。

培养室温度(25±1)℃,空气相对湿度50%~60%,光照时间每天12 h,光照度1 000~1 500 lx。

收稿日期:2015-03-20

基金项目:韩山师范学院博士科研启动项目(编号:QD20120626)。

作者简介:张振霞(1975—),女,博士,副教授,从事植物生物技术研究。E-mail:zhangzhenxia2006@gmail.com。

通信作者:郑玉忠,博士,副研究员,从事中药学工作。E-mail:zhengyuzhong@gmail.com。

1.2 方法与步骤

1.2.1 广山药块茎外植体的消毒 选取新鲜广山药块茎,用自来水清洗干净后,放在蒸馏水中浸泡30 min,用蒸馏水清洗干净,70%乙醇消毒10 s,再按不同的方式进行消毒处理(表1),加入消毒剂之后再加入2滴吐温,恒温摇床100 r/min振荡灭菌,最后用无菌水清洗5次。用无菌滤纸吸干水分后将块茎切成1 cm大小、厚度0.3 cm的块状接种到MS培养基中,观察其生长状态并记录。

表1 广山药块茎的消毒方式

试验组	消毒剂种类	消毒剂浓度(%)	消毒时间(min)
1	HgCl ₂	0.05	8
2	HgCl ₂	0.05	10
3	HgCl ₂	0.05	12
4	HgCl ₂	0.05	15
5	HgCl ₂	0.1	8
6	HgCl ₂	0.1	10
7	HgCl ₂	0.1	12
8	HgCl ₂	0.1	15
9	次氯酸钠	20	8
10	次氯酸钠	20	10
11	次氯酸钠	20	12
12	次氯酸钠	20	15
13	次氯酸钠	30	8
14	次氯酸钠	30	10
15	次氯酸钠	30	12
16	次氯酸钠	30	15

1.2.2 广山药块茎愈伤组织诱导培养基 不同基本培养基对愈伤组织的诱导有着不同的影响,本试验设置MS、1/2MS、NB母液培养基对广山药块茎愈伤组织的诱导。以消毒后的广山药块茎作为试验外植体,均切1 cm大小、厚度0.3 cm的块状,接种至含5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA的MS、1/2MS、NB的培养基上,观察并记录基本培养基成分对广山药愈伤组织诱导的差异。

取消毒后的广山药块茎接种到 MS 基本培养基上,其中不同的生长激素分别为 1 mg/L NAA + 1 mg/L 6-BA、1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA、1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA、1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IBA,观察记录广山药愈伤组织的生长状况,比较哪种激素条件更适合诱导广山药块茎愈伤组织的诱导。

将广山药的无菌块茎接种在 MS + 0.5 mg/L 6-BA,设置 2,4-D 浓度分别为 1、2、4、8、10 mg/L 等 5 个不同浓度。通过观察记录,分析不同的 2,4-D 浓度对广山药块茎愈伤组织生长的影响。

广山药块茎均切小块,接种在 MS + 5 mg/L 2,4-D,其中 6-BA 浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mg/L 等 5 个不同处理。观察记录,分析不同的 6-BA 浓度对广山药块茎愈伤组织生长的影响。

1.2.3 广山药块茎愈伤组织诱导的光照条件 设置 24 h、12 h 光照和黑暗培养 3 种光照条件,将广山药块茎接种在 MS + 5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的培养基上,分别在上述的光照条件下培养。1 个月后,观察比较不同光照条件下广山药愈伤组织生长的差异。

1.2.4 广山药愈伤组织防褐变处理 取广山药的无菌块茎接种到 MS + 5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA,采用不同防褐化添加物:1 g/L PVP、2 g/L PVP、1 g/L 活性炭、2 g/L 活性炭,设置对照,观察记录 5 组试验结果,并进行比较分析。

1.2.5 诱导生根培养 从试验所得的广山药再生苗接种到不同培养基中(表 2),观察记录再生苗生根的生长状况,并统计生根率。

表 2 广山药再生植株的生根培养方式

激素条件	MS	1/2MS	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)
①	+	-	-	-
②	-	+	-	-
③	-	+	1	-
④	-	+	1	1

注: + 代表有添加, - 代表没有添加。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方式对广山药块茎外植体培养的影响

本试验设置了不同种消毒方式,1 周后比较染菌率及存活状态,筛选适合广山药块茎外植体的消毒方法。研究发现,不同的消毒条件,无论是哪种消毒剂、消毒浓度,消毒时间越长,污染率越低,坏死亡率越高(表 3)。通过比较 HgCl₂ 的 2 个浓度 0.05% 和 0.1%,以及次氯酸钠的 2 个浓度 20% 和 30% 的消毒效果,选择 0.1% HgCl₂ 消毒 12 min 作为广山药块茎的消毒条件,在此条件下外植体污染率为 8%,坏死亡率为 34%,诱导率为 58%。

表 3 不同消毒方式对广山药块茎生长的影响

消毒剂	浓度 (%)	消毒时间 (min)	个数 (个)	坏死数 (个)	坏死亡率 (%)	长菌数 (个)	污染率 (%)	愈伤数 (个)	诱导率 (%)
HgCl ₂	0.05	8	50	4	8	28	56	18	36
	0.05	10	50	7	14	22	44	21	42
	0.05	12	50	15	30	16	32	19	38
	0.05	15	50	21	42	9	18	20	40
	0.1	8	50	7	14	24	48	19	38
	0.1	10	50	13	26	16	32	21	42
	0.1	12	50	17	34	4	8	29	58
	0.1	15	50	23	46	0	0	27	54
次氯酸钠	20	8	50	0	0	44	88	6	12
	20	10	50	9	18	34	68	7	14
	20	12	50	13	26	14	28	23	46
	20	15	50	15	30	8	16	22	44
	30	8	50	8	16	22	44	20	40
	30	10	50	16	32	16	32	18	36
	30	12	50	17	34	12	24	17	34
	30	15	50	26	52	5	10	15	30

2.2 不同基本培养基对广山药块茎愈伤组织诱导的影响

本试验设置了 MS、1/2MS、NB 的 3 种基本培养基,激素条件均为 5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA,来选择诱导愈伤组织的最佳基本培养基。结果发现,不同基本培养基成分对广山药愈伤组织的诱导效果不相同。广山药块茎外植体在 MS 基本培养基中的出愈率最高,为 78%;而 1/2MS 培养基中的出愈率仅有 34%,且愈伤组织疏松,形状不规则;NB 与 1/2MS 相比,其愈伤的外部形状相似,出愈率相对高一些(表 4)。由此可见,无机盐含量高的 MS 基本成分更适合用于广山药愈伤组织的诱导培养生长,诱导的愈伤组织出愈率高,质

地好,不会疏松,而且出根率、出芽率相对较低。

2.3 不同生长激素配比对广山药块茎愈伤组织诱导的影响

植物生长激素和细胞分裂素的配比决定植物组织培养过程中外植体的发育方向^[6],2,4-D、NAA、6-BA、IBA 等都是使用广范的植物激素。本试验设置了 4 种不同组合来探究广山药块茎诱导愈伤组织的情况,结果发现 4 种不同组合的生长激素对广山药块茎愈伤组织的诱导都表现出较高的出愈率,分别能达到 75%、73.75%、63.75%、58.75%,4 种培养基的生根率、出芽率以及愈伤的生长状况都不同(表 5)。从高出愈率、低出根率、低出芽率的角度,选择 2,4-D 与 6-BA

表4 不同母液对广山药愈伤组织诱导的影响

母液种类	接种数 (个)	出愈伤数 (个)	出愈率 (%)	出芽数 (个)	出芽率 (%)	生根数 (个)	生根率 (%)	愈伤组织形态
MS	50	39	78	20	40	25	50	淡红色,表面有颗粒状突出
1/2MS	50	17	34	9	18	46	92	淡红色,疏松,形状不规则
NB	50	33	66	27	54	23	46	淡红色,松软,形状不规则

表5 不同生长激素种类对广山药块茎愈伤组织诱导的影响

激素种类 (mg/L)	接种数 (个)	出愈伤数 (个)	出愈率 (%)	出芽数 (个)	出芽率 (%)	生根数 (个)	生根率 (%)	愈伤组织形态
NAA + 6 - BA	80	60	75.00	37	46.25	43	53.75	淡紫红色,松软,表面有明显颗粒状
2,4 - D + 6 - BA	80	59	73.75	33	41.25	43	53.75	紫红色,颗粒状
NAA + IBA	80	51	63.75	21	26.25	27	33.75	淡紫红色,疏松,
2,4 - D + IBA	80	47	58.75	25	31.25	20	25.00	淡紫红色,球形不规则,疏松

注:激素浓度均为1 mg/L。

的组合来诱导广山药块茎愈伤组织。

2.4 不同2,4-D浓度对广山药块茎愈伤组织生长的影响

设置了5个不同的2,4-D浓度与0.5 mg/L 6-BA搭配来探究最适宜广山药块茎诱导愈伤组织的2,4-D浓度,结果发现2,4-D浓度从1 mg/L到8 mg/L,随着浓度的逐渐增大广山药外植体的出愈率也不断升高,其中8 mg/L时出愈率高达100%,且愈伤颗粒状、紫红色。但当浓度增加到10 mg/L时,出愈率反而比8 mg/L的出愈率下降了10个百分点,同时外植体的愈伤生长速度变慢,愈伤质地更硬(图1至图5,表6)。根据以上分析可得出,在MS基本培养基上,8 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA时更适合于诱导广山药块茎愈伤组织。



图1 广山药愈伤组织(培养1周)
1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA

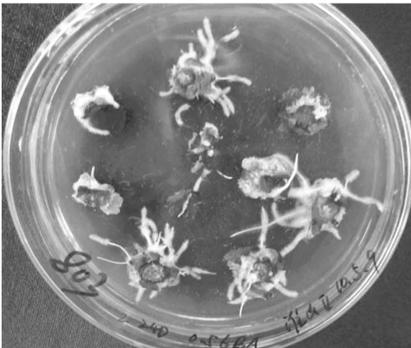


图2 广山药愈伤组织(培养1周)
2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA

2.5 不同6-BA浓度对广山药愈伤组织生长的影响

本试验也同时选择确定适合诱导愈伤组织的6-BA浓

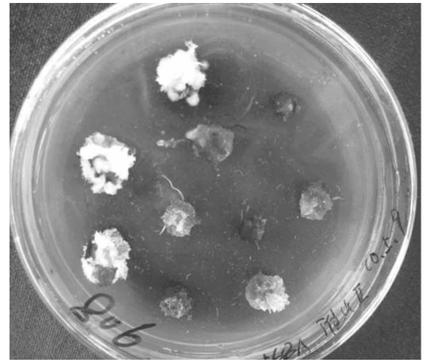


图3 广山药愈伤组织(培养1周)
4 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA



图4 广山药愈伤组织(培养1周)
8 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA

度。在2,4-D为5 mg/L的基础上,设置5个6-BA的不同浓度梯度进行试验。结果发现,6-BA的浓度从0.1 mg/L到0.8 mg/L,随着浓度的逐渐增加愈伤的生出率也不断升高,浓度为0.4 mg/L和0.8 mg/L时的出愈率均达到最高(95%),但当6-BA的浓度增加到1 mg/L时其出愈率反而下降了(表7)。由此可见,5 mg/L的2,4-D + 0.4 mg/L 6-BA组合诱导广山药愈伤组织比较理想。

2.6 不同光照条件对广山药愈伤组织诱导的影响

光照条件也是植物组织培养中的影响因子,对愈伤组织诱导、培养组织的增殖以及器官的分化都有明显的影响^[6]。本试验设置了24 h光照培养、12 h光照培养、黑暗培养3种

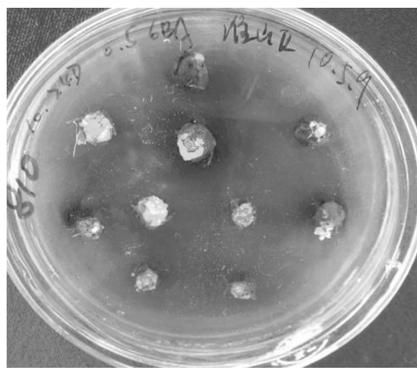


图5 广山药愈伤组织(培养1周)
10 mg/L 2,4-D +0.5 mg/L 6-BA

培养。研究发现,3种光照条件对于广山药愈伤组织的诱导效果都不错,其出愈率都达到85%以上,其中在黑暗培养的出愈率最高,为92%,愈伤的质量也是黑暗培养最好(表8)。由此可见,黑暗培养更适合诱导广山药块茎愈伤组织的诱导生长。

2.7 不同抗氧化措施对广山药块茎褐变抑制的影响

广山药块茎切块培养过程中会出现褐化现象,影响了组织培养的成活率。本试验采用PVP和活性炭来防止、减轻广山药块茎褐变现象的发生。研究发现,添加各种防褐化材料对于广山药外植体诱导愈伤组织影响明显,出愈率都达到90%以上;对比5组试验的褐化率可以得出,活性炭的防褐化效果远远好于PVP,从外植体及愈伤组织的褐化变化过程中也可以得到同样的结果(表9)。同时注意到活性炭的防褐化效果比较好,但浓度较高又会影响到外植体的存活率。

条件,来研究哪一种光照条件更适合广山药块茎愈伤组织的

表6 不同2,4-D浓度对广山药块茎愈伤组织生长的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	出芽数 (个)	出芽率 (%)	生根数 (个)	生根率 (%)	愈伤组织形态
1	40	22	55	32	80	34	85	淡红色,疏松,形状不规则
2	40	38	95	20	50	32	80	淡红色,疏松,表面颗粒状
4	40	38	95	8	20	12	30	紫红色,质密,表面有颗粒状
8	40	40	100	0	0	0	0	紫红色,质密,颗粒状
10	40	36	90	0	0	0	0	紫红色,质密、硬,颗粒状

表7 不同6-BA浓度对广山药块茎愈伤组织生长的影响

6-BA (mg/L)	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	出芽数 (个)	出芽率 (%)	生根数 (个)	生根率 (%)	愈伤组织形态
0.1	40	26	65	0	0	0	0	紫红色,质密,颗粒状
0.2	40	32	80	0	0	0	0	紫红色,质密,颗粒状
0.4	40	38	95	4	10	16	40	紫红色,质密,表面有颗粒状
0.8	40	38	95	18	45	24	60	淡红色,疏松,表面有颗粒状
1.0	40	22	55	28	70	34	85	淡红色,疏松,形状不规则

表8 不同培养条件对广山药愈伤组织诱导的影响

光照时间 (h)	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	出芽数 (个)	出芽率 (%)	生根数 (个)	生根率 (%)	愈伤组织形态
24	50	43	86	30	60	30	60	淡红色,疏松,表面有颗粒状突出
12	50	45	90	19	38	35	70	淡红色,疏松,颗粒状
0	50	46	92	15	30	22	44	淡红色,质密,颗粒状

表9 不同防褐化措施对广山药愈伤组织诱导的影响

添加物	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	褐化数 (个)	褐化率 (%)	死亡数 (个)	死亡率 (%)	愈伤组织形态
—	50	50	100	50	100	19	38	淡红色,培养基第2天就开始变黄,第5天黄化严重,导致愈伤组织变黑死亡
1 g/L PVP	50	48	96	50	100	15	31.25	淡红色,培养基第3天开始变黄,第7天后黄化严重,导致部分愈伤死亡
2 g/L PVP	50	50	100	50	100	23	46	淡红色,培养基第5天开始变黄,第10天后黄化严重,愈伤死亡率增高
1 g/L 活性炭	50	49	98	32	64	11	22.45	淡红色,培养基稍微变黄,褐化现象明显减弱,死亡率同样明显降低
2 g/L 活性炭	50	46	92	23	26	19	41.30	淡红色,只有部分愈伤发生褐化,但死亡率明显升高,间接提高愈伤的死亡率

注:死亡数是已诱导的愈伤的死亡个数;死亡率=死亡数/出愈数×100%。

2.8 诱导生根培养

在MS、1/2MS、1/2MS + 1 mg/L IBA、1/2MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA 培养条件下,广山药再生植株的诱导生

根培养的效率均达到100%,只是诱导出来的根之间有一定的差别。MS培养基上生长的再生苗的根数量较少、纤细,毛状根较少;1/2MS培养基上的根数量比前者多且粗壮;在1/2

MS的基础上添加1 mg/L IBA后,再生苗长出明显的主根,并且又壮又长,还有少数的不定根;在1/2MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA培养基上,长出来的根主根明显,还有比较多的

不定根,毛状根也比较多,幼苗生长快(表10)。综上所述,1/2MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA培养基诱导再生苗生根比较理想(图6)。

表10 诱导广山药生根培养

激素种类	接种数(个)	生根率(%)	愈伤组织形态
MS	10	100	根纤细,2~5 cm,叶片较小
1/2MS	10	100	根较大且长,3~6 cm,叶片较大
1/2MS + 1 mg/L IBA	10	100	主根明显,粗壮且长,长达3~7 cm,甚至超过10 cm,少数不定根,叶片较大
1/2MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA	10	100	主根明显且长,不定根较多,生长快,叶片茂密且大



图6 广山药无茵苗

3 结论与讨论

3.1 消毒剂的选择以及消毒时间、消毒浓度的确定

选择正确的消毒剂、消毒时间以及消毒浓度是建立组织培养体系的前提^[6-7]。在试验中选择的消毒剂有 HgCl₂ 和次氯酸钠,升汞的浓度分别为 0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、次氯酸钠的浓度分别为 20%、30%,消毒时间分别为 5、8、12、15 min。不同的外植体设置有不同的消毒时间和消毒浓度。从消毒的结果可以发现,在一定范围内,消毒剂浓度越低,消毒时间越短外植体污染率越高;消毒剂浓度越高,消毒时间越长,外植体的污染率越低,但是外植体的死亡率越高,这是因为有的外植体在消毒过程中死亡。在用乙醇处理过程中也要注意消毒时间,时间太长会造成外植体脱水死亡。此外,消毒过程中滴加适量的吐温作为表面活性剂,并不断振荡摇晃,可以改善消毒效果。

3.2 生长激素的选择

在植物组织培养中配以适宜的植物激素是非常关键的,适当的生长调节剂对愈伤组织的诱导以及生根培养是极其重要的^[7]。生长素与细胞分裂素的比例决定着发育的方向,比例高时,有利于根的形成和愈伤组织的形成;比例适中时,有利于根芽的分化;比例低时,有利于芽的形成^[8]。丰锋等^[9]的报道也指出高浓度细胞分裂素有利于芽诱导增殖。本试验中,广山药块茎为外植体时选用高浓度的 2,4-D 和低浓度的 6-BA 有利于愈伤组织的生成,低浓度的 2,4-D 和高浓度的 6-BA 有利于根的生成。在生根培养中用了生长素 NAA 和 IBA,对生根有很好的效果,其生根率都能达到 100%,且主根明显、粗壮。

3.3 光照条件的选择

光照条件对于植物生长是必不可少的条件,对于植物愈伤组织的诱导也是重要的条件之一^[6]。试管苗或无菌苗的

培养需要选用一定的光暗周期来进行组织培养,愈伤组织的诱导也需要一定的光暗周期,也有一些植物的愈伤组织在全黑暗的诱导下会长得更好。在试验中设置有全日照培养、半日照培养和黑暗培养 3 种光照条件。研究发现,不管从出愈率还是愈伤组织的生长状况来看,黑暗培养更加适合广山药块茎愈伤组织的生长。

3.4 褐化的防止

褐化是植物组织培养中一种常见的不利现象,对于外植体的脱分化和再分化过程的影响非常大,甚至是影响某些植物组织培养成功与否的关键^[10]。影响外植体褐化的因素多种多样,不同植物品种、同种植物的不同类型因为外植体材料的基因型不同,在组织培养中褐化发生的频率和程度都存在着较大的差异^[11]。防褐化的途径也多种多样,适宜的培养基、良好的培养条件、适宜的外植体或者增加抗褐化剂或吸附剂都可以有效地防止褐化现象。本试验通过在培养基中增加抗褐化剂和吸附剂活性炭和 PVP 来防止外植体的褐化。蔡建荣采用聚乙烯吡咯烷酮 PVP 来抑制淮山茎段和叶片外植体的褐化^[12]。本研究结果显示对于广山药块茎,活性炭可以明显吸附培养物分泌的酚、醌等有害物质,能有效降低褐变。

参考文献:

- [1] 吴仁修. 潮汕生物资源志略[M]. 广州:中山大学出版社,1997.
- [2] 梁宗锁,高致明. 药用植物学[M]. 北京:中国林业出版社,2007.
- [3] 王志安,许炫玉. 运用组织培养技术筛选盾叶薯蓣新品种[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(1):13-14.
- [4] 李明军,薛建平,陈明霞,等. 不同因子对山药愈伤组织诱导的影响[J]. 广西植物,2000,20(2):156-160.
- [5] 朱德慰. 植物组织培养与脱毒快繁技术[M]. 北京:中国科学技术出版社,2001.
- [6] 潘瑞焱. 植物细胞工程[M]. 广州:广东高等教育出版社,2006.
- [7] 蔡建荣,曾军,张志勇,等. 怀山药茎段组织培养及增殖的研究[J]. 福建农业科技,2002(2):14-15.
- [8] 李代丽,康向阳. 植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望[J]. 生物技术通讯,2007,18(3):546-548.
- [9] 丰锋,叶春海,王耀辉,等. 淮山的组织培养与快速繁殖[J]. 仲恺农业技术学院学报,2007,20(1):24-28,32.
- [10] 李新风,赵滢,田玉龙. 植物组织培养褐化问题的研究进展[J]. 吉林农业,2010(2):66-67.
- [11] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯,1999,35(6):501-506.
- [12] 蔡建荣. 山药组织培养褐化反应的研究[J]. 中国农学通报,2008,24(8):118-120.