

生长素和细胞分裂素 对怀山药微型块茎诱导形成的影响

李明军, 邓丽, 刘欣英, 赵喜亭, 张晓丽, 刘文英

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453002)

摘要: 以 B 号山药试管苗为材料, 研究了生长素 NAA, 2, 4-D 和细胞分裂素 KT, 6-BA 单独使用对怀山药微型块茎诱导形成的影响。结果表明, 与对照相比, 生长素有利于微型块茎的有效数量、总重量、单株平均微型块茎数及块茎指数的显著提高, NAA 和 2, 4-D 诱导微型块茎形成的适宜浓度分别为 0.5 mg/L 和 0.1 mg/L, 且以 2, 4-D 0.1 mg/L 的诱导效果最好; 细胞分裂素对微型块茎的形成不利, 其中 6-BA 效果更差, 微型块茎各项指标均无显著提高, 且浓度大于 2 mg/L 时无微型块茎形成。

关键词: 怀山药; NAA; 2, 4-D; KT; 6-BA; 微型块茎

中图分类号: S632.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)11-0102-05

Effects of Auxin and Cytokinin on the Induction of Microtuber of *Disocorea opposita* Thunb.

LI Ming-jun, DENG Li, LIU Xin-ying, ZHAO Xi-ting, ZHANG Xiao-li, LIU Wen-ying

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

Abstract: The individual effects of NAA, 2, 4-D, KT and 6-BA on the microtuberization of *Disocorea opposita* Thunb. cv. B were investigated. The results showed, compared with control, the auxin alone was advantageous to increase the valid number of microtubers, total weight, average number of microtubers per plantlet and microtuber index remarkably. NAA, 2, 4-D at 0.5 mg/L and 0.1 mg/L respectively showed positive effects on microtuber induction, and 2, 4-D at 0.1 mg/L has the best effects on induction of microtuber. The cytokinin was disadvantageous to the formation of microtubers. 6-BA treatment had the less effects on every microtuber indexes, furthermore, when the concentration was higher than 2 mg/L, the microtuber indexes didn't increase remarkably and there are no microtuber forming at the high contraction.

Key words: *Disocorea opposita* Thunb.; NAA; 2, 4-D; KT; 6-BA; Microtuber

怀山药(*Disocorea opposita* Thunb.)为薯蓣科薯蓣属多年生缠绕草质藤本植物, 产于河南温县、武陟、沁阳、博爱一带, 药食兼宜, 有较高的营养和保健功效。但在生产中, 长期的营养繁殖使病毒感染严重, 导致种质退化、产量下降。针对这一问题, 进行了怀山药的脱毒快繁及产业化技术研究^[1], 但在实

践中发现, 将试管苗直接供应给农户, 费用高且移栽成活率低。微型块茎是试管苗在培养基中或腋芽处形成的变态块茎, 它对光、温的变化抗性更强, 能长时间保持活力, 便于运输和种质交换, 栽种易成活, 费用较低, 故可取代试管苗用作种栽供给农户。关于薯蓣属植物微型块茎诱导形成的研究国内外已有

收稿日期: 2008-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(30670208); 河南省重点科技攻关项目(0623030700); 河南师范大学青年科学基金(2006036)资助

作者简介: 李明军(1962-), 男, 河南温县人, 教授, 主要从事药用植物生物技术研究。

报道^[2~9],但关于怀山药微型块茎诱导形成的研究却较少。近年来,我们对怀山药微型块茎的诱导形成进行了研究^[10],本试验研究了生长素和细胞分裂素对其形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

河南师范大学“四大怀药”研究室继代培养的B号山药(*Disocorea opposita* Thunb. cv. B)试管苗。

1.2 方法

在超净工作台上,将试管苗切成长2cm的单节带叶茎段,接种到盛有50mL液体繁殖培养基(MS+KT 2mg/L+NAA 0.02mg/L+3%蔗糖)的500mL培养瓶中,培养30d时获得长势一致的植株(株高5cm左右,6~7片叶),将其转接到诱导微型块茎的培养基中进行培养。诱导培养基以MS为基本培养基,分别附加不同浓度的生长素(NAA, 2,4-D)和细胞分裂素(KT, 6-BA),蔗糖浓度均为60g/L,以不加任何生长素和细胞分裂素为对照(CK)。每瓶接3株,每个处理接种3瓶共9株试管苗。培养60d后,统计微型块茎形成的数量、有效数量(直径3mm以上)、总重量和单个平均重量;测量微型块茎的平均直径和平均长度;计算单株微型

块茎平均块茎数和块茎指数(块茎指数=单瓶块茎个数×块茎直径×块茎平均重量)。培养条件为20~25℃,每天光照14h,光强为2000lx。

1.3 数据统计

利用SPSS软件对数据进行统计分析,采用LSD法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 生长素对B号山药微型块茎诱导的影响

2.1.1 生长素对B号山药微型块茎形成的影响

由图1可知,培养10d时,对照中已有微型块茎形成;NAA处理后,微型块茎形成的时间均在10~20d;2,4-D处理后,微型块茎形成的时间随处理浓度不同而有差异,0.1,0.5mg/L处理的在10~20d,1,2mg/L处理的在20~30d。

从整个诱导过程来看,在2,4-D 0.1mg/L处理中,微型块茎数量的大量增长期出现较早(20~30d),2,4-D 0.5mg/L处理中出现较晚(30~40d),对照及不同浓度NAA处理中出现最晚(对照及NAA 0.5mg/L时在40~50d出现,其他浓度NAA处理在50~60d)。较高浓度的2,4-D($>1\text{mg/L}$)处理的微型块茎数量自出现至诱导结束无较大增长。诱导结束时,只有NAA 0.5mg/L和2,4-D 0.1mg/L处理的微型块茎的数量高于对照。

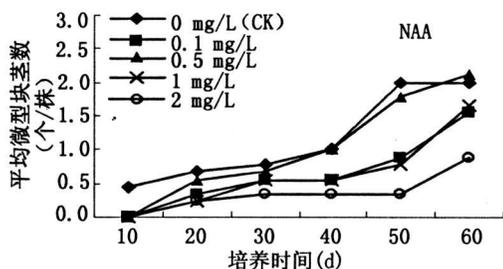
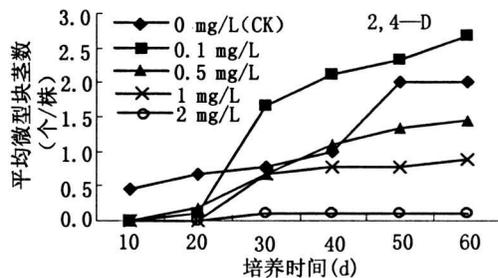


图1 生长素处理中微型块茎形成数量与培养时间的相互关系



2.1.2 生长素对B号山药微型块茎数量和有效数量的影响 由表1可知,2,4-D 0.1mg/L处理形成的微型块茎的数量和有效数量最多。从数量和有效数量上来看,2,4-D 0.1mg/L处理与对照、NAA 0.5mg/L处理在数量上无显著差异,有效数量上存在显著差异,对照与NAA 0.5mg/L处理间无显著差异,随着NAA浓度的升高,两者均呈现降一升一降的趋势。随着2,4-D浓度的升高,两者均呈现先升高后下降的趋势。

2.1.3 生长素对B号山药微型块茎平均直径和平均长度的影响 由表1可知,各处理对平均直径无

显著影响。随着NAA浓度的升高,平均直径先下降后升高,随着2,4-D浓度的升高,平均直径先升高后下降。2,4-D 0.1mg/L处理的微型块茎的平均长度最长,达1.88cm,与对照及2,4-D 0.5mg/L处理间无显著差异,与其他处理均存在显著差异,随着NAA浓度的升高,微型块茎的长度呈现降一升一降的趋势,随着2,4-D浓度的升高,微型块茎的长度先上升后下降。

2.1.4 生长素对B号山药微型块茎产量的影响

由表1可知,NAA 0.5mg/L处理微型块茎的总重量最大,与2,4-D 0.1mg/L的处理间无显著差异,

与对照及其他处理间存在显著或极显著差异; 2, 4-D 0.1 mg/L 的处理与对照间无显著差异。随着 NAA 浓度的升高, 微型块茎的总重量呈现降一升一降的趋势; 随着 2, 4-D 浓度的升高, 总重量先升高后下降。各处理间在对微型块茎平均重量的影响上无显著差异。不同生长素处理中, 随着浓度的升高, 平均重量均呈现降一升一降的趋势。处理 2, 4-D 0.1 mg/L 中块茎指数最高, 与 NAA 0.5 mg/L 处理无显著差异, 与对照存在显著差异, 与其他处理间均存在极显著差异。NAA 0.5 mg/L 处理与对照处理

间无显著差异。随着 NAA 浓度的升高, 块茎指数呈现降一升一降的趋势; 随着 2, 4-D 浓度的升高, 块茎指数先升高又下降。

综上所述, NAA, 2, 4-D 对微型块茎各项指标的影响不同, 随着 NAA 浓度的升高, 各指标多呈降一升一降的趋势; 随着 2, 4-D 浓度的升高, 各形态指标多呈先上升后下降的趋势。其中, 生长素有利于微型块茎的有效数量、总重量、单株结数及块茎指数的显著提高, 综合考察又以 2, 4-D 0.1 mg/L 时效果较好。

表 1 生长素对 B 号山药微型块茎各项指标的影响

NAA (mg/L)	2, 4-D (mg/L)	数量 (个)	有效数量 (个)	平均直径 (mm)	平均长度 (cm)	总重量 (g)	平均重量 (g)	块茎指数
0(CK)	0(CK)	18 abAB	15 bAB	5.5	1.60 ab AB	5.5388 bA	0.3796	10.31 bAB
0.1	0	14 bcB	6 cBC	5.0	0.99 cB	1.2175 dC	0.1840	2.06 dC
0.5	0	19 abAB	14 bAB	5.1	1.46 bAB	6.5837 aA	0.4700	11.42 abAB
1	0	15 bB	9 cBC	6.6	1.24 bcB	3.4883 cB	0.4028	7.90 bcB
2	0	8 cBC	8 cBC	6.7	1.07 cB	3.4358 cB	0.3876	7.63 bcB
0	0.1	24 aA	22 aA	6.8	1.88 aA	5.7815 abA	0.2753	14.18 aA
0	0.5	13 bcB	11 bB	5.8	1.57 ab AB	3.9542 cB	0.3342	7.19 cB
0	1	8 cBC	7 cBC	5.5	1.45 bAB	3.2498 cB	0.3295	4.84 cdBC
0	2	1 dC	1 dC	3.5	1.19 bcB	0.1583 cC	0.1583	0.36 dC

注: 表中的统计数为 9 株的平均数, 同一列大、小写字母相同表示经 LSD 法检验在 0.01, 0.05 水平上差异不显著。下同

2.2 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎诱导的影响

2.2.1 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎形成的影响

由图 2 可知, 培养 10d 时, 对照中已有微型块茎形成; KT 处理中, 浓度越高, 微型块茎最早形成时间越晚。KT 0.5 mg/L 处理在 10~20d; 1, 2 mg/L 处理在 20~30d; 5, 8 mg/L 处理在 30~40d。6-BA 浓度为 0.5, 1 mg/L 时, 微型块茎在 30~40d 最早

形成, 但 6-BA 浓度过高时 (> 2 mg/L), 微型块茎不能形成。

从整个诱导过程来看, 在 KT 0.5 mg/L 处理中, 微型块茎数量的大量增长期出现较早 (30~40d), 其他处理中均出现较晚 (40~50d)。诱导结束时, 只有 KT 2 mg/L 处理的微型块茎的数量高于对照。

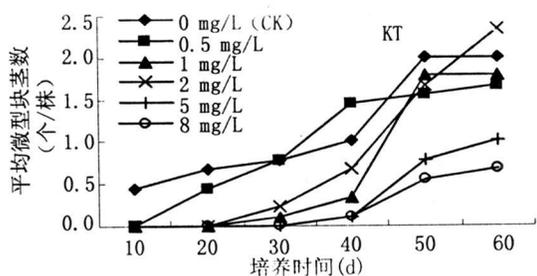


图 2 细胞分裂素处理中微型块茎形成数量与培养时间的相互关系

2.2.2 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎数量和有效数量的影响

由表 2 可知, KT 2 mg/L 处理形成的微型块茎的数量最多, 但与对照无显著差异。随着 KT 浓度的升高, 微型块茎的数量呈现降一升一降的趋势。6-BA 各处理诱导效果均不及对照, 且浓度高于 1 mg/L 时, 无微型块茎形成。无论是 KT 还是 6-BA, 微型块茎的有效数量均随浓度的升高

逐渐降低。对照微型块茎的有效数量最多, 与 KT 0.5, 1, 2 mg/L 处理无显著差异, 与其他处理均存在极显著差异。

2.2.3 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎平均直径和平均长度的影响

由表 2 可知, KT 为 0.5, 5 mg/L 时, 微型块茎的平均直径较大, 两者无显著差异, 与 6-BA 1 mg/L 处理无显著差异, 与对照存在显著

差异。随着 KT, 6-BA 浓度的升高, 平均直径分别呈升—降—升—降和降—升—降的趋势。KT 为 0.5 mg/L 时, 微型块茎的平均长度较大, 与对照处理的长度无显著差异。随着 KT, 6-BA 浓度的升高, 平均长度分别呈升—降—升—降和降—升—降的趋势。

2.2.4 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎产量的影响 由表 2 可知, 对照微型块茎的总重量最高, 与 KT 0.5 mg/L 处理存在显著差异, 与其他处理存在极显著差异。随着 KT, 6-BA 浓度的升高, 微型块

茎的总重量分别呈现降—升—降和逐渐降低的趋势。

KT 为 0.5 mg/L 时微型块茎的平均重量和块茎指数最高, 但与对照间无显著差异。且随着 KT, 6-BA 浓度的升高, 微型块茎的平均重量和块茎指数均分别呈现升—降—升—降和逐渐降低的趋势。

综上所述, 适宜浓度的 KT 虽然可以使微型块茎的数量和平均直径显著提高, 但整体而言, 细胞分裂素不利于微型块茎的形成和发育, 6-BA 较 KT 效果更差。

表 2 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎各项指标的影响

KT (mg/L)	6-BA (mg/L)	数量(个)	有效数量(个)	平均直径(mm)	平均长度(cm)	总重量(g)	平均重量(g)	块茎指数
0(CK)	0(CK)	18 abAB	15 aA	5.5 bA	1.60 aA	5.5388 aA	0.3796 aAB	10.31 aA
0.5	0	13 bcB	11 abAB	6.5 aA	1.64 aA	4.8046 bA	0.4420 aA	10.41 aA
1	0	17 bAB	11 abAB	5.3 bA	0.90 cB	1.2631 dC	0.1150 cC	2.26 cCD
2	0	22 aA	11 abAB	5.4 bA	0.92 bcB	1.3821 dBC	0.1204 cC	2.51 cC
5	0	9 cBC	5 bcB	6.5 aA	0.93 bcB	0.9547 dC	0.1909 bcBC	2.06 cCD
8	0	6 cdBC	2 bcB	3.8 cB	0.50 dB	0.0799 eD	0.0310 cdC	0.10 dD
0	0.5	9 cBC	7 bB	5.3 bA	1.25 bAB	2.1666 cB	0.3611 abAB	4.78 bB
0	1	3 dC	3 bcB	6.0 abA	1.35 abAB	0.9678 dC	0.2729 bB	1.93 cCD
0	2	0 dC	0 cB	0 dC	0 eC	0 eD	0 dC	0 dD
0	5	0 dC	0 cB	0 dC	0 eC	0 eD	0 dC	0 dD
0	8	0 dC	0 cB	0 dC	0 eC	0 eD	0 dC	0 dD

3 讨论

3.1 生长素对 B 号山药微型块茎形成的影响

生长素不仅能调节植物的营养生长, 还能调节其贮藏器官的形成。赵彦杰^[11]指出, NAA 0.3 mg/L 时, 郁金香种球数及鲜重均为最高, 高浓度(12 mg/L) 时则抑制种球形成。梁艳等^[12]在大蒜鳞茎的研究中指出, IBA 与 NAA 混合使用比单独使用 IBA 的效果好, 且 IBA 的效果优于 IAA。但在大量的研究中, 也有生长素抑制贮藏器官形成的报道, 李艳等^[13]在郁金香叶片诱导鳞茎的研究中指出, 2, 4-D 为 0.5 ~ 2 mg/L 时, 均无鳞茎诱导形成。刘高琼等^[14]报道称, 2, 4-D 抑制了不同品种大蒜试管鳞茎的形成。在薯蓣属植物的研究中, Sedigeh Alizadeh 等^[7]指出, 不同浓度 NAA, IAA, IBA, 2, 4-D 的效果比较中, NAA, IBA 5.0 μmol/L 时对 *Dioscorea composite* Hemsl 微型块茎的形成有显著促进作用, 而 2, 4-D 在 2.5, 5.0 μmol/L 时, 无微型块茎形成。我们在对铁棍山药的研究中认为, 单独使用 NAA 和 2, 4-D 进行微型块茎诱导的最适浓

度均为 0.5 mg/L^[10]。本试验的结果表明 2, 4-D 为 0.1 mg/L 时有利于微型块茎的形成和发育, 与前者结论的不一致可能是由于材料不同及培养方式不同造成的。

3.2 细胞分裂素对 B 号山药微型块茎形成的影响

细胞分裂素对贮藏器官离体诱导效果的报道也不一致。在马蹄莲的研究中, 彭峰等^[15]、张天琪等^[16]认为, 细胞分裂素对试管种球的诱导有显著的促进作用。而王爱勤等^[17]指出, 6-BA 的存在并不利于试管块茎的形成, 且 6-BA 浓度越大, 块茎形成和增粗受到的抑制越大。赵彦杰^[11]也指出, KT 对郁金香种球诱导效果并不明显, 且浓度过高时抑制种球形成。在薯蓣属植物的研究中, Sedigeh Alizadeh 等^[7]指出, 不同浓度的 KT, 6-BA 和 2-ip(异戊烯基腺嘌呤)对 *Dioscorea composite* Hemsl 微型块茎的诱导效果不同。其中, 2-ip 效果最好, 6-BA 效果最差, 其浓度在 1.25 μmol/L 时, 无微型块茎形成。张宗勤等^[3]指出, 在叉蕊薯蓣微型薯蓣的诱导中, 以 6-BA 8 mg/L 的效果最好。徐向丽等^[3]指出, 高浓度的 6-BA 和低浓度的 KT 配合使用较利于盾叶薯

蕨微型块茎的形成。彭晓英等^[4]的报道, 6-BA 在 4.0~6.0 mg/L 的浓度范围内, 诱导的盾叶薯蕨试管株芽最多, 当浓度增加到 8.0 mg/L 时, 试管株芽的诱导受到抑制。本试验结果表明: 添加 KT 的处理中, KT 为 0.5 mg/L 时诱导效果较好; 6-BA 在 0.5~8 mg/L 的范围内诱导微型块茎形成的作用不明显, 浓度高于 2 mg/L 时, 无微型块茎的形成, 整体而言, 细胞分裂素不利于微型块茎的形成和发育, 引起结果差异的原因除基因型间的差异外, 可能与植株的生长状况和不同的培养条件有关。

综上所述, 在 B 号山药微型块茎的诱导中, 生长素的诱导效果优于细胞分裂素, 但二者的互作效应尚需进一步研究。

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: 142-160.
- [2] 张宗勤, 撒文清, 刘建才. 叉蕊薯蕨的微繁殖及微型薯蕨的离体诱导[J]. 生物技术, 1998, 8(1): 18-20.
- [3] 徐向丽, 刘选明, 周朴华, 等. 盾叶薯蕨组织培养及微型块茎的离体诱导[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(4): 282-285.
- [4] 彭晓英, 周朴华, 张良波, 等. 盾叶薯蕨试管株芽的诱导[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(4): 319-323.
- [5] Romain Bazabakana, Ruddy Wattiez, Marie Baucher, et al. Effect of jasmonic acid on developmental morphology during *in vitro* tuberization of *Dioscorea alata* (L.) [J]. Plant Growth Regulation, 2003, 40: 229-237.
- [6] Manuel Cabrera Jova, Rafael Gómez Kosky, Milagros

Basail Pérez, et al. Production of yam microtubers using a temporary immersion system[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 83: 103-107.

- [7] Sedigeh Alizadeh, Sinclair H Mantell, Ana Maria Viana. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composite* Hemsl [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 53: 107-112.
- [8] 李明军, 陈明霞, 郭丽君, 等. 生长调节物质和糖对怀山药微型块茎诱导形成的影响[J]. 华北农学报, 2004, 19(3): 73-76.
- [9] 李明军. 怀山药茎段愈伤组织的诱导与多芽体的形成[J]. 华北农学报, 2000, 15(2): 86-89.
- [10] 李明军, 刘萍, 张嘉宝. 怀山药微型块茎的离体诱导[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 41-42.
- [11] 赵彦杰. 郁金香试管种球诱导的研究[J]. 种子, 2005, 24(11): 65-66.
- [12] 梁艳, 陈典, 黄晓梅, 等. 大蒜试管微鳞茎形成的激素筛选研究[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(5): 589-592.
- [13] 李艳, 方宏筠. 郁金香叶片直接诱导试管人工种球的快速繁殖的研究[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 1998, 21(2): 144-147.
- [14] 刘高琼, 李式军, 张学平. 大蒜试管微鳞茎微繁殖技术研究[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 31-36.
- [15] 彭峰, 陈嫣嫣, 郝日明, 等. 彩色马蹄莲试管块茎诱导研究[J]. 江苏农业科学, 2006(3): 94-96.
- [16] 张天琪, 李荣旗, 王玉忠, 等. 细胞分裂素诱导彩色马蹄莲试管微型种球[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(3): 108-111.
- [17] 王爱勤, 何龙飞, 王彦红, 等. 马蹄莲块茎试管培养研究[J]. 广西农业科学, 1998(2): 92-94.

(上接第 86 页)

参考文献:

- [1] 李丽梅, 纪明山, 王新一, 等. 植物病原真菌拮抗放线菌的筛选[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(4): 711-774.
- [2] 方羽生, 杨卫华, 张洪玲, 等. 放线菌对四种病原真菌的拮抗作用初探[J]. 广东农业科学, 2001(5): 39-41.
- [3] 李晓华. 稀有放线菌小单孢菌噬菌体ΦHAU8 溶源菌的分离与验证[J]. 河南农业科学, 2007(7): 61-62.
- [4] 功能. 生物农药发展的机遇与挑战[J]. 中国生物防治, 2001, 17(4): 184-185.
- [5] 刑小黑. 放线菌次生代谢的分子调控研究进展[J]. 生物技术, 1999, 9(5): 47-48.
- [6] 张一宾. 由植物中放线菌产生的植物生理活性物质[J]. 世界农药, 2003, 25(1): 9-12.
- [7] Anderson A S. The taxonomy of streptomyces and re-

lated genera[J]. Int J Syst Evol Microb, 2001, 51: 798-814.

- [8] Hopwood D A. Streptomyces genes: from waksman to sanger[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 468-471.
- [9] 贾菊生, 马得英, 姜松, 等. 放线菌 R1 号菌株防治农作物病害的研究初报[J]. 新疆农业大学学报, 2001, 24(1): 55-59.
- [10] 王振跃, 刘延红, 高书锋, 等. 黄瓜叶围放线菌的分离及其对灰霉菌抑菌效果测定[J]. 河南农业科学, 2007(11): 78-80.
- [11] 潘争艳, 刘伟成, 裘季艳, 等. 放线菌 III-6 和 A-21 对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 92-97.