

植物生长调节剂对黄独试管苗微型块茎诱导形成的影响

洪森荣, 尹明华*, 夏瑾华

上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001

摘要: 目的 探讨植物生长调节剂(NAA、2,4-D、6-BA、KT、PP₃₃₃)对黄独微型块茎诱导形成的影响,以期找到适宜的微型块茎诱导形成的植物生长调节剂浓度和组合。**方法** 采用植物组织培养技术、单因素试验和正交试验的方法,以黄独试管苗的带芽茎段为外植体,开展植物生长调节剂对黄独微型块茎诱导形成的影响等方面的研究。**结果** 生长素单独使用有利于黄独微型块茎的诱导形成,NAA和2,4-D诱导微型块茎形成的适宜浓度均为0.5 mg/L,两者的诱导效果无显著性差异。细胞分裂素单独使用不利于黄独微型块茎的形成,KT和6-BA诱导微型块茎形成的适宜浓度均为2 mg/L,但KT的诱导效果好于6-BA。生长素、细胞分裂素和PP₃₃₃组合可以显著促进黄独微型块茎的诱导形成,其中较佳的组合为MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L。**结论** 筛选出了诱导黄独微型块茎形成的植物生长调节剂单独使用和组合使用的适宜浓度,为黄独微型块茎的离体诱导形成及工业化生产奠定了技术基础。

关键词: 植物生长调节剂; 黄独; 试管苗; 微型块茎; 离体诱导

中图分类号: 282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)13-1928-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.023

Effects of plant growth regulators on induction formation for plantlet microtuber of *Dioscorea bulbifera*

HONG Sen-rong, YIN Ming-hua, XIA Jin-hua

College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

Abstract: Objective In order to find the suitable concentration and combination of plant growth regulators, the effects of plant growth regulators (NAA, 2, 4-D, 6-BA, KT, and PP₃₃₃) on *in vitro* induction formation for the plantlet microtuber of *Dioscorea bulbifera* was studied. **Methods** Through plant tissue culture technique, single factor test, and orthogonal test, taking the stems with a bud of *D. bulbifera* plantlets as explants, the effects of plant growth regulators on the *in vitro* induction formation for the microtubers of *D. bulbifera* were investigated. **Results** Auxin using alone was conducive to the induction formation for the microtuber of *D. bulbifera*. The suitable concentration of both NAA and 2, 4-D inducing the microtuber formation was 0.5 mg/L, but the inducing effects of NAA and 2, 4-D had no significant difference. Cytokinin using alone was not conducive to the induction formation for the microtuber of *D. bulbifera*. The suitable concentration of both KT and 6-BA inducing microtuber formation was 2 mg/L, but the inducing effect of KT is better than that of 6-BA. The combination of auxin, cytokinin, and PP₃₃₃ could significantly promote the *in vitro* induction formation for the microtuber of *D. bulbifera*, the better combination was MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L. **Conclusion** Based on these experimental results, the paper selects the suitable concentration of plant growth regulators conducive to the *in vitro* induction formation for the microtuber of *D. bulbifera*, which has laid the technical foundation for their *in vitro* induction formation of microtuber and factory production.

Key words: plant growth regulators; *Dioscorea bulbifera* L.; plantlet; microtuber; *in vitro* induction

黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 为薯蓣科 (Sect. *Opsophyton* Uline) 植物, 广泛分布于世界各地 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 *Dioscorea* L. 基生翅组 地^[1-2]。在中国主要分布于河南南部、安徽南部、江

收稿日期: 2013-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360072); 江西省教育厅 2014 年度科学技术研究一般项目 (GJJ14713)

作者简介: 洪森荣 (1974—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为植物生物技术。E-mail: hongsenrong@163.com

*通信作者 尹明华, 硕士, 副教授, 研究方向为生物技术。E-mail: yinminghua04@163.com

苏南部、浙江、江西、福建、台湾、香港、广东、广西、湖北、湖南、陕西西部、甘肃南部、四川、贵州及云南等地^[3-4]。黄独一般药用其块茎，俗称黄药子、黄药脂等，主要用于治疗各种甲状腺疾病和多种癌症，对食道癌、胃癌、直肠癌的近期疗效确切，对乳腺癌、宫颈癌、膀胱癌、肺癌及肉瘤也有一定疗效^[5]。生长于试管苗腋芽处的微型块茎也被云南一些地区的人民用于药膳^[6]。微型块茎除可直接利用外，还由于其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，因此，可取代试管苗用作黄独大田种植的繁殖材料，可以提高繁殖系数，因此研究微型块茎的诱导形成在农业生产上具有重大的实际意义。

关于薯蓣属植物微型块茎诱导形成的研究国外已有报道^[7-9]。在国内，怀山药 *Dioscorea opposita* Thunb.^[10-15]、淮山薯 *Dioscorea fordii* Prain et Burkill.^[16]、水山药 *Dioscorea opposita* Thunb.^[17]、大薯 *Dioscorea alata* L.^[18]、脚板薯 *Dioscorea batatas* Decne.^[19]、盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright^[20]和山薯 *Dioscorea fordii* Prain et Burk.^[21]微型块茎的诱导形成相继被研究和报道。而关于黄独微型块茎，目前国内仅有龙雯虹等^[6]对黄独大田植株茎蔓上的微型块茎进行研究，研究内容包括生长期内源激素及糖类物质质量的变化、休眠期内源激素量的变化^[22]、休眠过程中糖类和可溶性蛋白质的量及淀粉酶活性的变化^[23]以及微型块茎育苗中糖类量变化与茎叶生长的关系^[24]等。但关于黄独微型块茎离体诱导的研究报道较少。近年来，本课题组对黄独微型块茎在 UV-B 辐射下的萌发进行了研究^[25]。本实验通过植物生长调节剂对黄独试管苗微型块茎诱导形成的影响研究，旨在探讨不同植物生长调节剂对黄独试管苗微型块茎诱导形成的调控，为生产中提高黄独微型块茎质量和产量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄独无菌试管苗由上饶师范学院生命科学学院植物组织培养室提供。

1.2 方法

1.2.1 植物生长调节剂单独使用对黄独微型块茎诱导形成的影响 在无菌条件切取黄独试管苗生理状态均一（成熟度基本一致），1~1.5 cm 的带芽茎段。然后将带芽茎段接入微型块茎诱导培养基上。根据

预试验结果，本实验中使用的培养基均采用 MS 培养基，并附加 0、0.1、0.5、1 和 2 mg/L 的生长素 [萘乙酸 (NAA) 或 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D)]，或附加 0、0.5、1、2 和 4 mg/L 的细胞分裂素 [6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA) 或 6-糖基氨基嘌呤 (KT)]。所有培养基蔗糖浓度和琼脂质量浓度均为 60 和 7 g/L。pH 值为 5.8~6.0。接种完后，将黄独带芽茎段置于光照培养内培养。培养条件设置为温度 (25±1) °C，湿度 70%~80%，光照时间 14 h/d，光照强度 1 500~2 000 lx。90 d 后观察和记录不同处理培养基上微型块茎的数量和直径，并统计单株微型块茎数、单株微型块茎直径和微型块茎的诱导率。

单株平均微型块茎数 = 总的微型块茎诱导数 / 总的带芽茎段接种数

单株平均微型块茎直径 = 总的微型块茎直径 / 总的带芽茎段接种数

微型块茎的诱导率 = 诱导出微型块茎的带芽茎段数 / 总的带芽茎段接种数

1.2.2 植物生长调节剂组合使用对黄独微型块茎诱导形成的影响 在无菌条件切取黄独试管苗生理状态均一（成熟度基本一致），1~1.5 cm 的带芽茎段。然后将带芽茎段接入微型块茎诱导培养基。诱导培养基以 MS 为基本培养基，附加不同浓度的 3 种激素组合，分别为 [NAA、6-BA 和多效唑 (PP₃₃₃)]、(NAA、KT 和 PP₃₃₃)、(2, 4-D、6-BA 和 PP₃₃₃) 和 (2, 4-D、KT 和 PP₃₃₃)。这些激素分别按照正交试验表 L₉(3⁴)设计成 9 种不同的试验处理。所用培养基中蔗糖量均为 60 g/L，冷凝脂量均为 7 g/L，pH 值 5.8~6.0。培养条件如上，90 d 后观察和记录不同处理培养基上微型块茎的数量和直径，并统计单株微型块茎数、单株微型块茎直径和微型块茎的诱导率。

1.3 数据处理

以上实验均重复 3 次，本实验所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ，并用 SPSS 19.0 软件进行多因素方差分析，再进行 LSD 法检验。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂单独使用对黄独微型块茎诱导形成的影响

2.1.1 NAA 和 2, 4-D 对黄独微型块茎诱导形成的影响 本实验比较了 NAA 和 2, 4-D 单独使用对黄独微型块茎离体诱导形成的影响，实验结果见表 1。添加 NAA 和 2, 4-D 均可促进黄独微型块茎的离体诱导。

表1 NAA和2,4-D对黄独微型块茎诱导形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of NAA and 2,4-D on *in vitro* induction information for microtuber of *D. bulbifera* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

NAA / (mg·L ⁻¹)	2,4-D / (mg·L ⁻¹)	单株微型块茎数 / 个	单株微型块茎直径 / mm	微型块茎诱导率 / %
0 (CK)	0	3.2±0.4 b	4.3±0.6 b	61.6±6.0 e
0.1	0	4.4±0.5 a	5.5±0.8 a	89.2±3.2 bc
0.5	0	4.8±0.2 a	5.9±0.4 a	100.0±0.0 a
1	0	4.5±0.4 a	5.2±0.5 a	92.4±1.9 b
2	0	3.4±0.6 b	4.0±0.8 b	82.5±5.2 c
0	0 (CK)	3.1±0.5 b	4.5±0.3 b	59.4±5.9 e
0	0.1	4.4±0.6 a	5.0±0.3 a	72.8±8.4 d
0	0.5	4.6±0.8 a	5.2±0.7 a	100.0±0 a
0	1	2.9±0.2 b	4.2±0.4 b	85.6±6.5 c
0	2	3.1±0.6 b	3.8±0.6 b	50.4±4.9 f

同一列中不同字母分别表示在 0.05 水平上的差异性, 下同

Lowercase letters in same colum stand for signifacat difference on 0.05 level, same as below

但当 NAA 和 2,4-D 浓度超过 0.5 mg/L 时, 黄独单株微型块茎数、单株微型块茎直径和微型块茎诱导率开始呈下降趋势。因此, 黄独微型块茎离体诱导的适宜 NAA 和 2,4-D 质量浓度均为 0.5 mg/L。

2.1.2 6-BA 和 KT 对黄独微型块茎诱导形成的影响 本实验还比较了 6-BA 和 KT 单独使用对黄独微型

块茎离体诱导形成的影响, 结果见表 2。添加 6-BA 和 KT 均可促进黄独微型块茎的离体诱导。但当 NAA 和 2,4-D 质量浓度超过 2 mg/L 时, 黄独单株微型块茎数、单株微型块茎直径和微型块茎诱导率开始显著下降。因此, 黄独微型块茎离体诱导的适宜 6-BA 和 KT 质量浓度均为 2 mg/L。

表2 6-BA和KT对黄独微型块茎诱导形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of 6-BA and KT on *in vitro* induction information for microtuber of *D. bulbifera* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

KT / (mg·L ⁻¹)	6-BA / (mg·L ⁻¹)	单株微型块茎数 / 个	单株微型块茎直径 / mm	微型块茎诱导率 / %
0 (CK)	0	2.9±0.5 a	5.2±0.4 a	48.9±6.2 e
0.5	0	3.4±0.3 a	4.4±0.5 b	56.8±5.1 cd
1	0	3.3±0.6 a	5.3±0.2 a	71.4±8.4 b
2	0	3.5±0.5 a	5.8±0.5 a	85.4±6.6 a
4	0	2.4±0.8 b	4.1±0.6 b	38.5±5.2 fg
0	0 (CK)	3.3±0.3 a	4.8±0.4 a	51.9±4.9 de
0	0.5	3.4±0.6 a	5.3±0.6 a	60.4±8.2 c
0	1	2.5±0.3 b	3.8±0.3 b	54.6±9.2 cd
0	2	3.6±0.4 a	5.5±0.3 a	72.3±6.9 b
0	4	2.7±0.2 b	4.1±0.5 b	32.9±3.7 g

2.2 植物生长调节剂组合使用对黄独微型块茎诱导形成的影响

2.2.1 NAA、6-BA 和 PP₃₃₃ 对黄独微型块茎诱导形成的影响 本实验比较了 NAA (因素 A)、6-BA (因素 B) 和 PP₃₃₃ (因素 C) 组合对黄独微型块茎离体诱导形成的影响, 结果见表 3 和表 4。通过对表 3

数据的直观分析可以得出各因素内各水平之间的极差 (R)。极差的大小反映了该因素的影响程度, 极差大的因素对实验结果的影响也大, 从 R 的大小可知, 对黄独微型块茎诱导影响因素的主次依次为: NAA>PP₃₃₃>6-BA。从表 3 还可得出黄独微型块茎诱导各因素的最优水平组合为 A₂B₃C₃, 即 NAA

表3 NAA、6-BA 和 PP₃₃₃ 组合对黄独微型块茎诱导形成的正交试验结果和直观分析

Table 3 Result of orthogonal test and visual analysis of NAA, 6-BA, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

实验序号	因素 A / (mg·L ⁻¹)	因素 B / (mg·L ⁻¹)	因素 C / (mg·L ⁻¹)	诱导率/ %
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	46.5
2	0 (1)	1 (2)	0.1 (2)	66.8
3	0 (1)	2 (3)	0.5 (3)	75.2
4	0.5 (2)	0 (1)	0.5 (3)	100.0
5	0.5 (2)	1 (2)	0 (1)	86.4
6	0.5 (2)	2 (3)	0.1 (2)	100.0
7	1 (3)	0 (1)	0.1 (2)	100.0
8	1 (3)	1 (2)	0.5 (3)	100.0
9	1 (3)	2 (3)	0 (1)	78.4
T ₁	188.5	246.5	211.3	T=753.3
T ₂	286.4	243.2	266.8	
T ₃	278.4	253.6	275.2	
X ₁	62.833	82.167	70.433	
X ₂	95.467	84.400	88.933	
X ₃	92.800	84.533	91.733	
R	32.634	2.3660	21.300	

质量浓度为 0.5mg/L, 6-BA 质量浓度为 2 mg/L, PP₃₃₃ 质量浓度为 0.5 mg/L, 这些组合对黄独微型块茎的诱导率可达 100%。进一步对实验结果进行方差分析, 表 4 结果表明, NAA 对实验结果的影响达显著水平 ($P < 0.05$), 而 6-BA 和 PP₃₃₃ 对实验结果的影响未有显著性差异 ($P > 0.05$)。说明在黄独微型块茎的诱导过程中, NAA 对其影响占主导作用。方差分析与直观分析结果一致。综合以上分析, 黄独微型块茎诱导的最佳培养基应该为: MS+NAA

0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L。

2.2.2 NAA、KT 和 PP₃₃₃ 对黄独微型块茎诱导形成的影响 本实验比较了 NAA (因素 D)、KT (因素 E) 和 PP₃₃₃ (因素 F) 组合对黄独微型块茎离体诱导形成的影响, 实验结果见表 5 和 6。通过对表 5 数据的直观分析可以得出, 对黄独微型块茎诱导影响因素的主次依次为 PP₃₃₃>NAA>KT。从表 5 还可得出黄独微型块茎诱导各因素的最优水平组合为结果进行方差分析, 表 6 结果表明, NAA 和 PP₃₃₃

表4 NAA、6-BA 和 PP₃₃₃ 组合对黄独微型块茎诱导形成的方差分析

Table 4 Analysis of variance to NAA, 6-BA, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	2 784.433 ^a	6	464.072	16.751	0.057
截距	63 051.210	1	6 3051.210	2 275.943	0.000
NAA	1 970.047	2	985.023	35.556*	0.027
6-BA	10.607	2	5.303	0.191	0.839
PP ₃₃₃	803.780	2	401.890	14.507	0.064
误差	55.407	2	27.703		
总计	65 891.050	9			
校正的总计	2 839.840	8			

^aR²=0.980 (调整 R²=0.922), *和**表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著, 下同

^aR²=0.980 (regulation of R²=0.922); * and ** stand for significant difference on 0.05 and 0.01 levels, same as below

表 5 NAA、KT 和 PP₃₃₃ 组合对黄独微型块茎诱导形成的正交试验结果和直观分析

Table 5 Result of orthogonal test and visual analysis of NAA, KT, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

实验序号	因素 D / (mg·L ⁻¹)	因素 E / (mg·L ⁻¹)	因素 F / (mg·L ⁻¹)	诱导率 / %
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	48.8
2	0 (1)	1 (2)	0.1 (2)	61.3
3	0 (1)	2 (3)	0.5 (3)	75.6
4	0.5 (2)	0 (1)	0.5 (3)	100.0
5	0.5 (2)	1 (2)	0 (1)	62.5
6	0.5 (2)	2 (3)	0.1 (2)	82.4
7	1.0 (3)	0 (1)	0.1 (2)	89.6
8	1.0 (3)	1 (2)	0.5 (3)	100.0
9	1.0 (3)	2 (3)	0 (1)	68.9
T ₁	185.7	238.4	180.2	
T ₂	244.9	223.8	233.3	T=689.1
T ₃	258.5	226.9	275.6	
X ₁	61.900	79.467	60.067	
X ₂	81.633	74.600	77.767	
X ₃	86.167	75.633	91.867	
R	24.267	4.867 0	31.800	

表 6 NAA、KT 和 PP₃₃₃ 对黄独微型块茎诱导形成的方差分析

Table 6 Analysis of variance to NAA, KT, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	2 561.613 ^a	6	426.936	394.094	0.003
截距	52 762.090	1	52 762.090	48 703.468	0.000
NAA	998.827	2	499.413	460.997**	0.002
KT	39.447	2	19.723	18.206	0.052
PP ₃₃₃	1 523.340	2	761.670	703.080**	0.001
误差	2.167	2	1.083		
总计	55 325.870	9			
校正的总计	2 563.780	8			

^aR²=0.999 (调整 R²=0.997)

^aR²=0.999 (regulation of R²=0.997)

对实验结果的影响达显著水平 ($P < 0.01$), 而 KT 对实验结果的影响未有显著性差异 ($P > 0.05$)。说明在黄独微型块茎的诱导过程中, NAA 和 PP₃₃₃ 对其影响占主导作用。方差分析与直观分析结果一致。综合以上分析, 黄独微型块茎诱导的最佳培养基应该为 MS+NAA 1.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L。

2.2.3 2, 4-D、6-BA 和 PP₃₃₃ 对黄独微型块茎诱导形成的影响 本实验比较了 2, 4-D (因素 G)、6-BA (因素 H) 和 PP₃₃₃ (因素 I) 组合对黄独微型块茎离体诱导形成的影响, 实验结果见表 7 和 8。对黄独

微型块茎诱导影响因素的主次依次为 PP₃₃₃ > 2, 4-D > 6-BA。从表 7 还可得出黄独微型块茎诱导各因素的最优水平组合为 G₃H₁I₂, 即 2, 4-D 质量浓度为 1.0 mg/L, 6-BA 浓度为 0 mg/L, PP₃₃₃ 浓度为 0.1 mg/L, 该 3 个组合对黄独微型块茎的诱导率可达 100%。进一步对实验结果进行方差分析, 表 8 结果表明, 2, 4-D 和 PP₃₃₃ 对实验结果的影响达显著水平 ($P < 0.05$), 而 6-BA 对实验结果的影响未有显著性差异 ($P < 0.05$)。说明在黄独微型块茎的诱导过程中, 2, 4-D、6-BA 和 PP₃₃₃ 对其影响占主导作用。方差分

表 7 2, 4-D、6-BA 和 PP₃₃₃ 组合对黄独微型块茎诱导形成的正交试验结果和直观分析

Table 7 Result of orthogonal test and visual analysis of 2, 4-D, 6-BA, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

实验序号	因素 G / (mg·L ⁻¹)	因素 H / (mg·L ⁻¹)	因素 I / (mg·L ⁻¹)	诱导率 / %
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	52.5
2	0 (1)	1 (2)	0.1 (2)	75.6
3	0 (1)	2 (3)	0.5 (3)	56.4
4	0.5 (2)	0 (1)	0.5 (3)	100.0
5	0.5 (2)	1 (2)	0 (1)	68.9
6	0.5 (2)	2 (3)	0.1 (2)	82.1
7	1.0 (3)	0 (1)	0.1 (2)	100.0
8	1.0 (3)	1 (2)	0.5 (3)	100.0
9	1.0 (3)	2 (3)	0 (1)	56.2
T ₁	184.5	252.5	177.6	T=691.7
T ₂	251.0	244.5	257.7	
T ₃	256.2	194.7	256.4	
X ₁	61.500	84.167	59.200	
X ₂	83.667	81.500	85.900	
X ₃	85.400	64.900	85.467	
R	23.900	19.267	26.700	

表 8 2, 4-D、6-BA 和 PP₃₃₃ 组合对黄独微型块茎诱导形成的方差分析

Table 8 Analysis of variance to 2, 4-D, 6-BA, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	3 122.467 ^a	6	520.411	68.585	0.014
截距	53 160.988	1	53 160.988	7 006.134	0.000
2, 4-D	1 065.576	2	532.788	70.217*	0.014
6-BA	653.876	2	326.938	43.087	0.023
PP ₃₃₃	1 403.016	2	701.508	92.452*	0.011
误差	15.176	2	7.588		
总计	56 298.630	9			
校正的总计	3 137.642	8			

^aR²=0.995 (调整 R²=0.981)

^aR²=0.995 (regulation of R²=0.981)

析与直观分析结果一致。综合以上分析，黄独微型块茎诱导的最佳培养基应该为：MS+2, 4-D 1.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.1 mg/L。

2.2.4 2, 4-D、KT 和 PP₃₃₃ 对黄独微型块茎诱导形成的影响 本实验比较了 2, 4-D (因素 J)、KT (因素 K) 和 PP₃₃₃ (因素 L) 组合对黄独微型块茎离体诱导形成的影响，实验结果见表 9 和 10。通过对表 9 数据的直观分析可以得出对黄独微型块茎

诱导影响因素的主次依次为 2, 4-D>PP₃₃₃>KT。从表 9 还可得出黄独微型块茎诱导各因素的最优水平组合为 J₃K₃L₃，即 2, 4-D 质量浓度为 1.0 mg/L，KT 质量浓度为 2.0 mg/L，PP₃₃₃ 质量浓度为 0.5 mg/L，该 3 个组合对黄独微型块茎的诱导率可达 100%。进一步对实验结果进行方差分析，表 10 结果表明，2, 4-D 和 PP₃₃₃ 对实验结果的影响达显著水平 (P<0.05)，而 KT 对实验结果的影响未有显著性差异

表 9 2, 4-D、KT 和 PP₃₃₃ 组合对黄独微型块茎诱导形成的正交试验结果和直观分析

Table 9 Result of orthogonal test and visual analysis of 2, 4-D, KT, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

实验序号	因素 J / (mg·L ⁻¹)	因素 K / (mg·L ⁻¹)	因素 L / (mg·L ⁻¹)	诱导率 / %
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	55.4
2	0 (1)	1 (2)	0.1 (2)	88.4
3	0 (1)	2 (3)	0.5 (3)	83.5
4	0.5 (2)	0 (1)	0.5 (3)	100.0
5	0.5 (2)	1 (2)	0 (1)	77.1
6	0.5 (2)	2 (3)	0.1 (2)	95.2
7	1.0 (3)	0 (1)	0.1 (2)	100.0
8	1.0 (3)	1 (2)	0.5 (3)	100.0
9	1.0 (3)	2 (3)	0 (1)	82.4
T ₁	227.3	255.4	214.9	T=782
T ₂	272.3	247.9	283.6	
T ₃	282.4	278.7	283.5	
X ₁	69.100	85.133	71.633	
X ₂	90.767	81.833	87.867	
X ₃	94.133	87.033	94.500	
R	25.033	5.200 0	22.867	

表 10 2, 4-D、KT 和 PP₃₃₃ 组分对黄独微型块茎诱导形成的方差分析

Table 10 Analysis of variance to 2, 4-D, KT, and PP₃₃₃ on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	1 979.393 a	6	329.899	30.284	0.032
截距	64 516.000	1	64 516.000	5 922.521	0.000
2, 4-D	1 107.447	2	553.723	50.831*	0.019
KT	41.540	2	20.770	1.907	0.344
PP ₃₃₃	830.407	2	415.203	38.115*	0.026
误差	21.787	2	10.893		
总计	66 517.180	9			
校正的总计	2 001.180	8			

^aR²=0.989 (调整 R²=0.956)

^aR²=0.989 (regulation of R²=0.956)

($P > 0.05$)。说明在黄独微型块茎的诱导过程中, 2, 4-D 和 PP₃₃₃ 对其影响占主导作用。方差分析与直观分析结果一致。综合以上分析, 黄独微型块茎诱导的最佳培养基应该为 MS+2, 4-D 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L。

2.2.5 植物生长调节剂组合使用对黄独微型块茎诱导形成的效果比较 本实验比较了“2.2.1”、“2.2.2”、“2.2.3”和“2.2.4”项中筛选出来的培养基对黄独微

型块茎离体诱导形成的效果, 实验结果见表 11。从表 11 可知, 在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L 培养基上, 虽然黄独微型块茎的诱导率与其他 3 种培养基 (MS+NAA 1.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L、MS+2, 4-D 1.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.1 mg/L 和 MS+2, 4-D 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L) 相比无显著性差异, 但在此培养基上, 黄独微型块茎诱导形成的时间最早, 单株微型块茎数最多, 单株

表 11 植物生长调节剂组合使用对黄独微型块茎诱导形成的效果比较

Table 11 Comparison on effects of plant growth regulator combination on *in vitro* induction formation for microtuber of *D. bulbifera*

植物生长调节剂组合	微型块茎最早出现时间 / d	单株微型块茎数 / 个	单株微型块茎直径 / mm	微型块茎诱导率 / %
MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP ₃₃₃ 0.5 mg/L	25±2 a	5.2±0.4 a	5.8±0.3 a	100±0 a
MS+NAA 1.0 mg/L+PP ₃₃₃ 0.5 mg/L	31±1 c	4.5±0.2 b	5.4±0.5 b	100±0 a
MS+2, 4-D 1.0 mg/L+PP ₃₃₃ 0.1 mg/L	32±2 c	4.3±0.4 b	5.2±0.3 b	100±0 a
MS+2, 4-D 1.0 mg/L+KT 2.0 mg/L+PP ₃₃₃ 0.5 mg/L	28±2 b	4.6±0.5 b	5.3±0.6 b	100±0 a

微型块茎直径最大, 与其他两种培养基相比具有显著性差异。因此, 诱导黄独微型块茎形成的最佳植物生长调节剂组合为 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L。

3 讨论

近年来, 薯蓣属植物的组织培养取得了较大的进展, 但仍存在试管苗移栽成活率偏低等问题。薯蓣属试管苗叶腋处诱导的微型块茎能直接发育成新植株, 减少了试管苗移栽过程中感染细菌的机会, 为薯蓣属的有效快繁提供了一条新的途径^[20]。NAA、2, 4-D、6-BA、KT 和 PP₃₃₃ 等是人工合成的植物生长调节剂, 它们不仅能调节植物的营养生长, 而且还能调节其储藏器官的生长, 因此, 可通过向培养基中加入这类物质来诱导薯蓣属试管苗产生更多更大的微型块茎^[15]。

NAA 和 2, 4-D 是人工合成的生长素类物质, 不仅能调节植物的营养生长, 而且还能调节其贮藏器官的生长^[13]。在水山药(九斤黄)微型块茎诱导中, 添加 0.02~1.0 mg/L NAA 对微型块茎的形成也有促进作用, 当 KT 为 1 mg/L 时, 随着 NAA 浓度的增加, 微型块茎诱导率、微型块茎诱导数均呈增加趋势^[17]。在脚板薯^[19]微型块茎诱导中, 低质量浓度的 NAA (≤ 0.5 mg/L) 可以促进微型块茎质量的增加, 但对单株微型块茎个数影响较小, 而在参薯^[17]微型块茎诱导中, 低浓度的 NAA (≤ 2.7 $\mu\text{mol/L}$) 可以促进单株微型块茎个数的增加。在怀山药微型块茎中, NAA 和 2, 4-D 等生长素类物质能诱导出数量更多的微型块茎^[15], 两者诱导微型块茎形成的合适质量浓度均为 0.5 mg/L^[11]。对于怀山药另外一个品种——B 号山药, 生长素同样有利于微型块茎的诱导, 但 NAA 和 2, 4-D 的适宜质量浓度分别为 0.5 和 0.1 mg/L, 且以 0.1 mg/L

2, 4-D 的诱导效果最好^[13]。但本实验结果与此结果稍有差异, 本实验结果表明, 生长素(NAA 和 2, 4-D)单独使用虽然均有利于黄独微型块茎的诱导形成, 且两者的适宜质量浓度均为 0.5 mg/L, 但两者的诱导效果无显著性差异。这表明, 生长素对薯蓣属微型块茎的诱导效果及适宜浓度因植物种类而异, 且生长素质量浓度不宜超过 0.5 mg/L。

研究表明, 去除生长点可以刺激块茎形成, 细胞分裂素类由于可抑制生长, 故可增加块茎形成^[26]。究其原因, 一是细胞分裂素类解除了植物内源激素对叶腋的抑制, 从而改变了植物体的生理代谢活动, 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位运输; 二是细胞分裂素类可促进腋芽的细胞分裂和扩展, 增大库容, 促进微型块茎的膨大发育。在山薯^[21]、参薯^[17]和大薯^[18]微型块茎的诱导中, 微型块茎指数与 KT 或 6-BA 的浓度呈正相关, KT 和 BA 对微型块茎的形成表现为增效作用。但 KT 或 6-BA 的浓度也并非越大越好。在脚板薯^[19]微型块茎诱导中, 2.0 mg/L 的 6-BA 诱导效果最佳。盾叶薯蓣微型块茎的诱导实验进一步支持了上述观点, 在盾叶薯蓣微型块茎诱导中, 6-BA 也对微型块茎的诱导有较大的促进作用, 且微型块茎的诱导数随 6-BA 质量浓度的增大而增加, 以 4.0 mg/L 的 6-BA 诱导效果最好, 但 6-BA 质量浓度达到或超过 8 mg/L 时, 则影响了微型块茎的质量, 抑制了微型块茎的诱导^[20]。在水山药的微型块茎诱导中, KT 对微型块茎的形成不利, 当 NAA 质量浓度为 1 mg/L, 随着 KT 浓度的增大, 微型块茎的诱导率呈下降趋势, 当 NAA 为 0.1 mg/L、KT 为 1 mg/L 时, 微型块茎诱导率及微型块茎数达到了最高, 分别为 83.3%和 10.0 个^[17]。在怀山药微型

块茎的诱导形成中,也发现了这种现象,细胞分裂素(KT或6-BA)不利于怀山药微型块茎的形成,其中6-BA效果更差,且质量浓度大于2 mg/L时无微型块茎形成^[13]。本实验结果也表明,细胞分裂素KT或6-BA单独使用均不利于黄独微型块茎的形成,KT和6-BA诱导微型块茎形成的适宜质量浓度为2 mg/L,但KT的诱导效果好于6-BA。这与李明军等^[13]在怀山药上的研究结果一致。

PP₃₃₃是一种三唑类高效低毒植物生长调节剂和广谱杀菌剂,具有可抑制赤霉素的生物合成、提高植物抗逆性、延缓植物衰老、改善品质及提高经济效益等多种效应^[27]。近年来研究表明,PP₃₃₃对薯蓣属微型块茎的离体诱导及生长调控有一定作用。在怀山药微型块茎的诱导中,添加PP₃₃₃能显著促进微型块茎的形成,当0.1 mg/L PP₃₃₃与0.5 mg/L NAA组合使用时,所诱导的微型块茎较多且较大,微型块茎形成率高达100%^[11,15]。在淮山薯微型块茎的诱导中,2.0 mg/L PP₃₃₃与12.0 mg/L ABA和1.0 mg/L KT组合使用能显著促进淮山薯微型块茎的诱导,微型块茎诱导率84.46%,平均微型块茎数4.45个^[16]。在山薯微型块茎的诱导,0.5 mg/L PP₃₃₃与2.0 mg/L IBA、1.0 mg/L NAA和0.1 mg/L KT组合使用时,试管苗的微型块茎指数最高^[21]。本实验结果也表明,生长素、细胞分裂素和PP₃₃₃组合可以显著促进黄独微型块茎的诱导形成,其中较佳的组合为MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L。究其原因,可能是PP₃₃₃阻止了从内-贝壳杉烯到内-贝壳杉烯酸的转化而抑制了GA的生物合成,这样就有利于抑制试管苗上部生长而促进下部生长,从而促进微型块茎的诱导形成^[28]。

参考文献

- [1] 郑玉红,夏冰,杭悦宇,等.黄独遗传多样性研究[J].西北植物学报,2006,26(10):2011-2017.
- [2] Hong S R, Yin M H, Shao X H, et al. Cryopreservation of embryogenic callus of *Dioscorea bulbifera* by vitrification [J]. *Cryo Lett*, 2009, 30(1): 64-75.
- [3] 王筱璐,杭悦宇,周义峰,等.与黄独(*Dioscorea bulbifera*)性别相关的RAPD-SCAR标记研究[J].植物资源与环境学报,2007,16(2):1-5.
- [4] Yin M H, Hong S R. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification [J]. *Plant Cell, Tissue Org Cult*, 2010, 101(3): 349-358.
- [5] 赵继森,程树杰,李鹏凯.黄独乙素抑制人胃癌SGC-7901细胞增殖作用[J].医学研究与教育,2013,30(3):13-15.
- [6] 龙雯虹,王琼,肖关丽,等.黄独珠芽生长期内源激素及糖类物质含量的变化[J].云南农业大学学报,2013,28(2):283-286.
- [7] Martine J, Mario C. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch [J]. *Plant Cell, Tissue Org Cult*, 1991, 26(3): 147-152.
- [8] Martine J, Mario C. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. [J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11(1): 34-38.
- [9] Romain B, Ruddy W, Marie B, et al. Effect of jasmonic acid on developmental morphology during *in vitro* tuberization of *Dioscorea alata* L. [J]. *Plant Growth Regulat*, 2003, 40: 229-237.
- [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] 李明军,陈明霞,郭君丽,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):69-72.
- [12] 郭君丽,王俊甫,李明军,等.光质对怀山药微型块茎诱导形成的影响[J].浙江万里学院学报,2006,19(2):91-93.
- [13] 李明军,邓丽,刘欣英,等.生长素和细胞分裂素对怀山药微型块茎诱导形成的影响[J].河南农业科学,2008(11):102-106.
- [14] 李明军,刘欣英,李萍,等.山药微型块茎诱导形成的影响因子研究[J].中草药,2008,39(6):905-910.
- [15] 张丽霞,卢全伟.植物生长物质对诱导怀山药微型块茎形成的影响[J].湖北农业科学,2012,51(22):5191-5192.
- [16] 蔡国红,杨泉,李洪波,等.蔗糖、多效唑、ABA、KT对淮山薯试管珠芽诱导的影响[J].热带作物学报,2010,31(9):1458-1463.
- [17] 周志林,唐君,曹清河,等.水山药“九斤黄”组织培养及微型块茎诱导[J].福建农业学报,2012,27(2):144-148.
- [18] 林红,黄小龙,周双清,等.大薯微型块茎的离体诱导[J].中国农学通报,2011,27(12):112-116.

- [19] 杨 微. 脚板薯 (*Dioscorea batatas* Decne.) 脱毒试管苗培育及其试管珠芽诱导 [D]. 南昌: 南昌大学, 2004.
- [20] 彭晓英, 周朴华, 张良波, 等. 盾叶薯蓣试管株芽的诱导 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(4): 319-323.
- [21] 丰 锋, 叶春海, 李映志, 等. 生长调节物质、碳源和光周期对山薯试管薯形成和生长发育的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(6): 1045-1049.
- [22] 龙雯虹, 肖关丽, 王 琼, 等. 黄独珠芽浸提液对大白菜种子发芽的影响及休眠期内源激素含量的变化 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(8): 51-54.
- [23] 龙雯虹, 郭华春, 高 星, 等. 3 种薯蓣植物珠芽休眠过程中糖类和可溶性蛋白质含量及淀粉酶活性的变化规律 [J]. 西部林业科学, 2009, 38(3): 22-27.
- [24] 龙雯虹, 郭华春, 高 星, 等. 3 种薯蓣属植物珠芽糖类含量变化与茎叶生长的关系 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1187-1192.
- [25] 洪森荣, 何 乔, 何 欣, 等. UV-B 辐射对黄独微型块茎萌发与试管苗生长发育的影响 [J]. 贵州农业科学, 2013, 41(10): 44-46.
- [26] Leopold A C, Kriedemann P E. *Plant growth and development* [M]. New York: McGraw-Hill, 1975.
- [27] 王军民, 李创珍, 胡碧奎, 等. 氯吡脞和多效唑配施对山药块茎淀粉合成相关酶活性的影响 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(22): 5085-5089.
- [28] 张 志, 李会珍, 姚宏亮, 等. 多效唑对马铃薯试管苗生长和块茎形成的影响 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2004, 30(3): 318-322.