

山药愈伤组织研究进展

郭晓博¹, 张晓丽^{1,2}, 李俊华^{1,2}, 李书杰¹, 王运英¹, 李明军^{1,2}

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453002; 2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要: 山药是药食兼优植物, 其愈伤组织是建立高频率植株再生体系的基础。现从外植体的选择、植物生长调节剂的使用、光质的选择和褐化控制等方面综述了山药愈伤组织的研究进展。

关键词: 山药; 愈伤组织; 外植体; 植物生长调节剂; 光质; 褐化

中图分类号: S 632.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)24-0183-04

山药(*Dioscorea opposita* Thunb.) 属薯蓣科薯蓣属攀援性草本肉质根状块茎植物^[1]。我国栽培山药历史悠久, 自夏、商起就开始种植, 明清以来逐渐形成道地药材^[2]。怀山药是我国著名的四大怀药之一, 主产于河南焦作的温县、武陟、沁阳、博爱等地(古怀庆府所辖), 药食兼优。大量研究表明, 山药块茎中主要含有淀粉、蛋白质、游离氨基酸等营养成分以及粘性多糖(包括粘液质及糖蛋白)、尿囊素、淀粉酶、胆碱、胆甾醇、麦角甾醇、多酚氧化酶等多种活性成分, 还有铁、铜、锌、锰、钙等多种微量元素, 这些成分是山药营养价值和活性作用的物质基础^[2-6]。山药以根状茎入药, 具有健脾、固精、补肺和益肾等功效^[4]。

随着我国中医药事业的发展, 对山药的需求量日益增大, 因此山药的生产也越来越受到重视。山药传统繁殖方法不仅耗用大量药用部位, 并且由于长期进行营养繁殖, 造成品种退化, 产量降低, 某些优良品种濒于灭绝^[7]。因此, 改善品质, 提高产量, 并使其优良品种迅速推广种植, 已成为山药生产中亟待解决的重要问题。而采用组织培养快繁技术, 不仅能保持品种的优良特性, 还可不受外界条件的影响, 周年繁殖, 可在较短的时间内繁育出大批种苗^[7-9]。因此, 组织培养技术对山药繁殖具有很高的经济价值和广阔的市场前景^[10-11]。

愈伤组织具有高度再分化能力, 经过长期继代保存而不丧失其胚性并且具有旺盛的自我增殖能力, 可用于建立大规模的愈伤组织无性系, 通过愈伤组织的再分化

建立高频率植株再生体系, 进而为通过遗传转化改良品种奠定基础。该研究从外植体、植物生长物质、光质和褐化控制等方面对山药愈伤组织研究进展进行了综述。

1 外植体的选择

外植体是从植物组织或器官上切割下来并用于组织培养的原始体小块。不同种类的植物以及同种植物不同器官, 对诱导条件的反应不同, 因此外植体的选择是山药愈伤组织培养中必须考虑的一个重要因素。

胡选萍^[12]以汉中产山药为材料, 研究不同外植体对诱导愈伤组织的影响, 研究发现零余子和叶片均可作为外植体来诱导愈伤组织, 诱导率分别为 95.45% 和 96.67%, 而茎段愈伤组织诱导率总体上处于较低水平, 最高仅为 61.54%, 得出同一基因型不同外植体对愈伤组织的诱导效果不同, 诱导情况也存在着较大差异。金密^[13]研究圆山药叶片、茎段、带腋芽的茎段和块根等外植体诱导愈伤组织, 发现带腋芽茎段为最适外植体, 诱导率可达 85.70%, 块根褐化严重且不能诱导形成愈伤组织。张玲等^[14]研究黄山药的愈伤组织诱导与分化中发现, 叶片为最佳外植体, 诱导率高达 85.70%, 茎段的诱导率较低, 平均诱导率仅 10% 左右。刘金英等^[15]研究 3 种不同外植体诱导佛手山药发现, 以块茎为外植体在暗处诱导愈伤组织效果最好, 诱导率最高达 51.70%, 其次是叶片, 茎段诱导效果最差。课题组以怀山药为材料研究不同因子对愈伤组织诱导的影响认为, 零余子和茎尖为最佳外植体, 诱导率分别达到 100% 和 93.30%, 但这 2 种外植体诱导愈伤组织的最佳植物生长调节剂配比不同^[16]。梁方刚等^[17]研究怀山药叶片、茎段和零余子 3 种外植体对愈伤组织形成和植株再生的影响时, 发现这 3 种外植体均能诱导产生愈伤组织, 但零余子愈伤诱导率最高(达 100%), 而且叶片诱导出的愈伤组织不能分化出苗, 仅能分化出根, 茎段诱导的愈伤组织分化成苗率远远低于零余子, 成苗速度也不及零余子快。

第一作者简介: 郭晓博(1988-), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术。

责任作者: 李明军(1962-), 男, 河南焦作人, 博士, 教授, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: limingjun2002@263.net。

基金项目: 河南省科技创新杰出人才计划资助项目(114200510013); 国家自然科学基金资助项目(81274019)。

收稿日期: 2014-09-15

由此可见,山药不同基因型诱导愈伤组织的最适外植体不同,同一品种不同外植体的愈伤组织诱导率也存在很大差异,因此应根据不同基因型选择合适的外植体。其中,怀山药脱分化与再分化能力以零余子最强,茎段次之,叶片最弱。因此,零余子是研究怀山药脱分化与再分化的最佳外植体。

2 植物生长调节剂的使用

植物生长调节剂的种类、浓度和组合是影响外植体分化的重要因素。植物生长调节剂是由人工合成的类似于植物激素的可以调节植物生长发育的化学物质。植物生长调节剂的添加会引起内源激素的配比及水平发生变化,从而进一步调控培养物的分化及生长^[18]。因此,植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导和分化过程具有重要作用,同一种植物生长调节剂的不同浓度及不同植物生长调节剂间的配比对植物愈伤组织的诱导与分化将产生重要影响。

张玲等^[14]认为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 2.5 mg/L 诱导黄山药叶片出愈率最高,愈伤组织再分化形成芽、根的最佳生长调节剂组合分别为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 和 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。刘金英等^[15]认为,不同植物生长调节剂及其组合对佛手山药不同外植体诱导愈伤组织有很大影响,MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为块茎诱导最佳植物生长调节剂及浓度组合,MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 为叶片诱导最佳组合,此外,带节茎段和无节茎段的最佳组合也不同。胡选萍^[19]认为,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 组合适宜于诱导零余子愈伤组织,出愈率高达 95.45%;MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 和 KT 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 均适用于叶片愈伤组织的诱导,愈伤诱导率分别为 96.67%和 93.75%;而茎段愈伤诱导率总体上处于较低水平,在茎段最适诱导培养基(MS+KT 2.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L),最高诱导率仅 61.54%。课题组在山药愈伤组织研究过程中发现,没有或单独使用一种植物生长调节剂,均不利于愈伤组织的诱导形成^[20],而且不同基因型,对植物生长调节剂的偏好也不同,光培养下诱导铁棍山药微型块茎形成愈伤组织,6-BA 优于 KT,47 号山药则相反^[21]。

综上所述,不同外植体对不同植物生长调节剂有不同的反应,外植体对植物生长调节剂的不同反应很可能与材料本身的生理状态,植物受体的多样性以及与内源激素的合成和代谢上的差异有密切的关系。因此,植物生长调节剂按一定比例进行组合是诱导愈伤组织形成的关键因子。

3 光质的选择

光是大多数植物生长发育的一个重要条件,包括光

质、光强、光周期。目前光质作为一种物理因子已广泛用于植物组织培养中光形态建成及其各种反应机理的研究。光质对植物的生长、物质代谢和基因表达均具有调控作用^[22]。不同的光质对不同植物愈伤组织的生长有不同的效应,甚至同一植株的不同部位,同一部位不同的发育时期效应均不同。

郭君丽等^[20]在怀山药愈伤组织培养研究中发现,同一光质条件下的不同植物生长调节剂浓度对怀山药愈伤组织的诱导表现出差异性,而同一生长调节剂一定浓度下的不同光质对愈伤组织出现的早晚和诱导率大小也不同。因此,光质和植物生长调节剂的效应并不是简单地叠加,而是存在着交互作用。如研究中发现,在最佳诱导培养基基础上,诱导率在白光、红光、黄光、蓝光、绿光及黑暗各条件下均能达到 100%,但在白光和红光下愈伤组织出现的比较早。在愈伤组织再分化培养基上,在相同条件下蓝光分化率最高,达 100%;红光和白光次之,分别为 95.0%和 91.7%;绿光和黄光较低,分别为 84.40%和 75.0%;黑暗最低为 22.6%。在同一光质条件下,适当的 NAA 浓度和 2,4-D 浓度有利于诱导率的提高,最高可达 100%;研究光质与生长调节剂组合,以红光与 6-BA 2.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 组合最佳。在研究光质和植物生长调节剂对 47 号怀山药愈伤组织形成的影响中发现,同一光质下,随着生长调节剂浓度的增加,出愈率均出现“先增后减”的趋势。当 NAA 浓度为 2 mg/L 或 4 mg/L 时,最有利于怀山药叶片出愈率的提高,而不同光质下要求 NAA 浓度不同,当 NAA 浓度为 2 mg/L 时,愈伤组织形成的时间最早^[23]。在红光下,2,4-D 浓度为 2 mg/L 时,叶片出愈量最大,出愈率最高^[24]。蓝光有利于愈伤组织中可溶性蛋白质的形成,黄光有利于过氧化物酶活性的提高^[23-24]。

光、暗条件对不同外植体的愈伤组织诱导情况是不同的。刘金英等^[15]认为外植体在暗处诱导率高于光照条件,褐化也较轻,因此宜在暗处进行佛手山药块茎和叶片愈伤组织的培养。李明军等^[16]认为在暗处有利于零余子的诱导,在光下,则有利于叶片的诱导。对零余子和叶片来说,光下褐化严重,而在暗处褐化较轻或无褐化。

综上所述,愈伤组织诱导和分化受许多环境因素的影响,可以将光和植物生长调节剂结合起来研究。目前光影响植物的很多生理生化机理尚不十分清楚,只有从分子水平进行研究才能更好地对光质加以利用。

4 褐化控制

褐化是指在诱导外植体脱分化和再分化过程中,自身组织从表面向培养基释放褐色物质,以致培养基逐渐变成褐色,外植体也随之进一步褐化死亡的现象。褐化现象在植物组织培养过程中经常出现,对诱导外植体脱

分化与再分化影响非常大,甚至是某些植物组织培养成功与否的关键^[25]。

在山药的组织培养中,常出现褐化现象。影响外植体褐化的因素很多,外植体的基因型和生理状态,培养基成分,培养条件等。一般来说外植体的老化程度越高,越容易褐化;外植体的大小也影响褐化程度,相对大的材料褐化程度较轻;外植体的切口越大,酚类物质的被氧化面越大,褐化程度越严重^[26-27]。因此选择外植体时,选择处于生长旺盛期的外植体,如芽、茎尖、幼嫩的茎段等,具有较强的分生能力,褐变程度低;切割外植体时尽量减小切口面积和暴露在空气中的时间。细胞分裂素 6-BA 和 KT 不仅能促进酚类物质的合成,且能激活多酚氧化酶的活性,增强酚类物质的氧化能力,从而加剧褐化的发生^[25];无机盐浓度过高也会引起某些植物外植体中酚类物质氧化^[28-29],因此要筛选出合适生长调节剂、无机盐和浓度组合的培养基。还可以在培养基中添加抗氧化剂和吸附剂以减轻褐化^[30-31],如抗坏血酸、活性炭、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。此外还可以通过降低培养温度和光照强度、适时切除培养物的褐化部分、适时转接、缩短继代周期等减轻褐化程度。蔡建荣^[32]对山药品种寸金薯组织培养褐化反应研究中发现,不同外植体(叶片、茎段和零余子)褐化程度不同,茎段褐化程度最轻,零余子褐化最严重;MS 附加 150 mg/L 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)能有效抑制外植体褐化;液体培养基能显著降低褐化程度。在山药愈伤组织培养过程中,影响褐变因素有很多,要从根本上解决这种问题,需对褐化发生的原因、生理生化、遗传因素等多个方面进行更深入的研究。

5 结语

山药愈伤组织诱导与分化是建立高频率植株再生体系的基础。目前,很多山药品种无性繁殖系已建立,但是植物生长调节剂、光、温度等对外植体脱分化与再分化的作用并不是简单地加和而是相互影响,同时还要考虑褐化问题,因此研究过程中可以设计多因素试验,筛选出最适培养条件,建立高频率植株再生体系,通过与基因工程、细胞工程相结合,可以进一步培育高产、优质、抗病的新品种,为山药的产业化奠定基础。

参考文献

- [1] 聂桂华,周可范,董秀华,等. 山药的研究情况[J]. 中草药,1993,24(3):158.
- [2] 何海玲,单承莺,张卫明,等. 山药研究进展[J]. 中国野生植物资源,2006,25(6):1-6.
- [3] 周玥,郭华,周洁. 铁棍怀山药中主要营养成分的研究[J]. 中国食物与营养,2011,17(3):69-71.
- [4] 薛建平,祝红蕾,尧俊英,等. 铁棍山药及其零余子营养成分的比较研究[J]. 食品工业科技,2008(8):268-269.
- [5] 张重义,谢彩霞. 怀山药无机元素的特征分析[J]. 特产研究,2003(1):41-44.
- [6] 周成河,吴云,张友明,等. 山药加工与开发利用[J]. 中国食物与营养,2004(8):65-67.
- [7] 邱仲华. 山药零余子技术简报[J]. 中国蔬菜,1984(2):8-9.
- [8] 张宗勤,撒文清,刘建才. 叉蕊薯蓣的繁殖及微型薯蓣的离体诱导[J]. 生物技术,1998(1):18-30.
- [9] 李明军. 怀山药组织培养及其应用[M]. 北京:科学出版社,2004:5-7.
- [10] 曹夜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002.
- [11] Chen Y Q, Fan J Y. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 73: 75-80.
- [12] 胡选萍. 山药不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 江苏农业科学, 2009(4): 75-76.
- [13] 金密. 圆山药离体培养及嫩茎再生芽细胞组织学观察[D]. 长沙:湖南农业大学,2012:18.
- [14] 张玲,马林,杨国涛. 黄山药愈伤组织诱导与分化[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 70-73.
- [15] 刘金英,徐有明,李双来,等. 佛手山药组织培养的研究[J]. 植物研究, 2006, 26(3): 323-328.
- [16] 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.
- [17] 梁方刚,马克莉,李明军,等. 怀山药不同外植体对愈伤组织形成和植株再生的影响[J]. 河南职技师院学报, 2001(1): 24-27.
- [18] 肖关丽,杨清辉. 植物组织培养过程中内源激素研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2001, 16(2): 136-138.
- [19] 胡选萍. 山药零余子诱导愈伤组织研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 13975-13976.
- [20] 郭君丽,陈明霞,李明军,等. 光质和生长物质组合对怀山药零余子脱分化和再分化的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 99-102.
- [21] 于倩,李明军. 怀山药微型块茎愈伤组织的诱导形成及高频率再生[J]. 生态学报, 2004, 24(5): 1022-1026.
- [22] 褚四敏,陈敏洁,贾文妹,等. 光质对植物组织培养的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 665-666.
- [23] 郭君丽,李明军,张嘉宝. 光质和 NAA 组合对怀山药叶片脱分化的效应[J]. 浙江万里学院学报, 2002, 15(1): 58-61.
- [24] 郭君丽,王俊甫,蒋福稳,等. 光质和 2,4-D 对 47 号怀山药叶片愈伤组织诱导形成的影响[J]. 北方园艺, 2012(15): 174-176.
- [25] 李新凤,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(1): 66-67.
- [26] 谷延泽,高颜瑞. 植物组织培养中的褐化现象及防治措施[J]. 河北农业科学, 2008, 12(6): 56-58.
- [27] 潘娟,李先源,李名扬. 植物组织培养过程中常见问题及解决方法[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2392-2394.
- [28] 陈菲,李黎,宫伟. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺, 2005(2): 69.
- [29] 郭艳,杨海玲. 植物组织培养中的褐化现象及解决途径[J]. 山西农业科学, 2009, 37(7): 14-16.
- [30] 叶添谋. 植物组织培养过程中的常见技术难题研究进展[J]. 韶关学院学报(自然科学版), 2010, 31(3): 84-90.

基于主要来源地替代弹性视角的进口苹果对国产苹果的替代效应分析

孙佳佳¹, 霍学喜²

(1. 西安工业大学 经济管理学院, 陕西 西安 710000; 2. 西北农林科技大学 西部农村发展研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要:在分析中国苹果进口贸易趋势基础上,运用 Panel Data 回归模型,测度中国具有代表性的 4 个主要苹果进口国的 Armington 弹性。结果表明:4 个国家进口苹果对国产苹果的整体替代弹性估计值为 1.57,其中智利和美国苹果对国产苹果的替代弹性值为负,分别为-9.09 和-2.51;新西兰和日本苹果对国产苹果的替代弹性值为正,分别为 0.93 和 1.84。国产苹果与源自智利和美国苹果的进口苹果之间存在较强互补性关系,与源自新西兰和日本的进口苹果之间存在替代性关系。

关键词:苹果;进口;替代效应;Armington 弹性;主要来源地

中图分类号:S 661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0186-05

特有的生态资源优势、气候条件和丰富的劳动力资源支撑中国成为世界主要的苹果适宜产区和出口地。据国家现代苹果产业技术体系监测数据显示,2012 年中国苹果产量和出口量分别占世界苹果产量和出口量的 51.23% 和 24.95%。与出口状况相比,中国苹果进口贸易量在世界苹果进口贸易中占得比重很小,但中国苹果

呈现长期快速增长的趋势。联合国贸易统计数据显示,1992—2012 年中国苹果进口规模由 0.07 万 t 增长到 6.15 万 t,进口金额由 70.95 万美元增长到 9 234.20 万美元,年均增长率分别为 25.08% 和 27.56%(图 1)。

长期以来,中国苹果市场形成“早熟奇缺、中熟不足、晚熟过剩”的产品结构,晚熟苹果占中国苹果供给量的 70%,随着居民消费水平提高,这种单一的晚熟品种结构越来越不适应国内苹果市场需求多样化趋势。此外,消费者对苹果外观、口味、用途和食品安全的偏好呈现多样性特点,消费偏好已从传统的注重果品味道和口感转向注重果品外形、颜色和食品安全,购买苹果目的也由家庭食用逐渐转向私人送礼和单位福利发放,而出于后者目的考虑时,消费者多选择具有外观和品牌优势

第一作者简介:孙佳佳(1985-),女,河南焦作人,博士,讲师,研究方向为农产品国际贸易与政策。E-mail:sunjia2196@163.com.

责任作者:霍学喜(1960-),男,陕西绥德人,博士,教授,博士生导师,研究方向为农业经济和农业区域经济与农产品国际贸易。E-mail:327070064@qq.com.

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-28)。

收稿日期:2014-09-11

[31] 王桂荣.植物组织培养中的常见问题与对策[J].宿州学院学报,2010,25(11):54-57.

[32] 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.

Research Advances on Callus Production in *Dioscorea opposita*

GUO Xiao-bo¹, ZHANG Xiao-li^{1,2}, LI Jun-hua^{1,2}, LI Shu-jie¹, WANG Yun-ying¹, LI Ming-jun^{1,2}

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453002; 2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract: *Dioscorea opposita* Thunb. (Chinese yam) is an important tuberous food owing to its dual edible and medicinal functions. Callus is required for the establishment of a high-efficiency regenerating system. Recent progresses about callus studies in the selection of explant, the using of plant regulators, the selection of light quality and the control of browning of callus were reviewed in this paper.

Keywords: *Dioscorea opposita*; callus; explants; plant regulators; light quality; browning