

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.

ZHOU Z-L, TANG J, CAO Q-H, et al. Tissue Culture and Micro-tuber Induction of *Dioscorea opposita*, Jiu Jin Huang [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (2): 144-148.

水山药“九斤黄”组织培养及微型块茎诱导

周志林, 唐君, 曹清河, 赵冬兰, 史新敏, 杨峰

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 江苏 徐州 221121)

摘要: 利用山药珠芽进行种茎繁殖, 对山药品种具有更新复壮作用; 为降低山药种植成本, 促进山药品种更新复壮, 探索适宜水山药品种“九斤黄”微型块茎诱导的培养条件。通过不同浓度 NAA/6-BA 激素组合对茎尖诱导的作用, 以及不同浓度 NAA/KT 激素组合、不同活性炭浓度、不同蔗糖浓度处理, 筛选适宜微型块茎诱导的配方条件。结果表明: MS 培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 为水山药“九斤黄”茎尖诱导最佳浓度, 植株再生率达到了 91.7%; “九斤黄”微型块茎诱导最适宜培养基配方为: MS 基本培养基 + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ AC + $50.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉。再生微型块茎的种植仍然保持原品种种性, 但外观商品性获得提高。

关键词: 水山药; 微型块茎诱导; 组织培养

中图分类号: S 644.1

文献标识码: A

Tissue Culture and Micro-tuber Induction of *Dioscorea opposita*, Jiu Jin Huang

ZHOU Zhi-lin, TANG Jun, CAO Qing-he, ZHAO Dong-lan, SHI Xin-min, YANG Feng

(Xuzhou Institute of Agricultural and Sciences of the Xuhuai District, Xuzhou, Jiangsu 221121, China)

Abstract: Using yam bulbils for tuber propagation not only benefits the rejuvenation of *Dioscorea opposita* but also reduces the planting cost. Thus, conditions of the micro-tuber induction for the yams were studied. The shoot tips were cultured in MS medium with additions of varying concentrations of NAA/6-BA. Different treatments using NAA/KT, active carbon and sucrose were applied for the experimentation. The results indicated the optimal medium composition for the shoot tip induction to be: MS + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ AC + $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar. The resultant plant regeneration rate was 91.7%. The optimal medium formula for the micro-tuber induction was: MS + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ AC + $50.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar. The regenerated plants from the micro-tubers not only maintained the characteristics of the parent species but also improved its commercial appealing.

Key words: *Dioscorea opposita*; micro-tuber induction; tissue culture

水山药又名菜山药、花籽山药, 是从怀山药的变异株中选育而来的, 是江苏省北部的地方品种, 具有产量高、品质好, 块茎含水量高, 富含黏液(一种多糖), 是优良的菜用品种, 但易感叶斑病、炭疽病等, 不结珠芽, 繁殖系数较低^[1]。“九斤黄”是水山药抗病新品种, 具有高产、抗病、优质等特点, 是目前苏北地区(丰沛县等)及山东单县等地的主栽品种。由于不结珠芽, 提高了种植成本, 并且长期进行无性繁殖以及病毒侵染等造成品种退

化。为降低生产成本及恢复种性, 提高优良品种在生产上的服务年限, 许多学者积极开展了山药组织培养及应用研究^[2-8], 主要研究了适宜微型块茎形成的碳源和氮源^[9]、生长素种类及浓度^[10]、细胞分裂素种类及浓度^[11]等, 极大提高了微型块茎的诱导率。但是, 对于水山药抗病新品种“九斤黄”组织培养方面的研究尚未见相关报道, 本文在前人研究的基础上, 通过探讨不同浓度生长素 NAA 和细胞分裂素 KT 组合、不同蔗糖浓度、不同浓度活

收稿日期: 2011-08-03 初稿; 2011-09-15 修改稿

作者简介: 周志林 (1979-), 男, 助理研究员, 研究方向: 甘薯及山药资源分子生物学

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201003002); 徐州市根茎类作物新技术研究重点实验室建设项目(XF10C010)

性炭（简称 AC）对微型块茎诱导的影响，以期为新品种的提纯复壮提供技术储备。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为水山药抗病新品种“九斤黄”，于4月中下旬，选取“九斤黄”健康嘴子，机械开沟后，按照株距25 cm，行距80~90 cm进行栽插，均定植于徐州市农业科学研究所试验田。

1.2 植株再生培养

从田间取“九斤黄”茎尖，用自来水冲洗1~2 min，在超净工作台上用70%酒精浸洗30 s，再经0.1% HgCl₂消毒10 min，无菌水冲洗3~4次，在显微镜下剥取带1~2个叶原基的茎尖分生组织，接种于诱导培养基，茎尖及植株再生诱导培养基为：MS基本培养基+0~0.2 mg·L⁻¹ NAA+1~3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 g·L⁻¹ 活性炭（以下简称“AC”）+30 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂粉（表1），灭菌前将pH调至5.8，培养室温度为（28±2）℃，光强为2 000 Lx，光照时间16 h·d⁻¹。接种40~60 d统计芽分化率及植株再生率。

1.3 不同处理对微型块茎形成的影响

切取“九斤黄”组培再生苗双节段，分别接种于MS基本培养基+0.02~1.0 mg·L⁻¹ NAA+0.1~1.0 mg·L⁻¹ KT+1.0 mg·L⁻¹ AC+30 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂粉；MS基本培养基+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ KT+0.2~4.0 g·L⁻¹ AC+30 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂粉；MS基本培养基+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ KT+2.0 g·L⁻¹ AC+20~90 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂粉，灭菌前将pH调至5.8，培养条件同上；研究NAA/KT、AC及蔗糖浓度对微型块茎形成的影响。接种90 d后统计微型块茎诱导率及微型块茎数等。

1.4 微型块茎种植

取试管诱导的微型块茎，播种于花盆中（泥炭土：土=1：1），调查再生植株的主要农艺性状及品种特性：叶形、叶色、茎形状、珠芽、块茎皮色、块茎肉色、块茎形状。

1.5 数据分析

数据采用Duncan's新复极差法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 NAA/6-BA对植株再生的作用

将茎尖分生组织接种在4种不同的培养基上诱

导培养（表1），结果表明：在这4种培养基中，茎尖分生组织均可发生芽分化和植株再生，以MS基本培养基中添加0.1 mg·L⁻¹ NAA和2 mg·L⁻¹ 6-BA，芽分化率和植株再生率最高为91.7%，与其他处理差异极显著（ $P<0.01$ ）。

表1 不同浓度NAA/6-BA对芽分化率和植株再生率的影响
Table 1 Effect of combination of NAA and 6-BA on rates of bud differentiation and plant regeneration of yam

NAA/ (mg·L ⁻¹)	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	芽分化率/ %	植株再生率/ %
0.2	1	50.0D	45.8D
0.1	2	91.7A	91.7A
0.1	3	83.3B	75.0B
0	2	70.8C	70.8C

注：同一列数据后不同大写字母表示差异极显著（ $P<0.01$ ），下同。

2.2 不同浓度NAA/KT组合对微型块茎形成的影响

将山药再生植株双节段接种在添加不同浓度NAA/KT的培养基中，研究不同组合NAA/KT对微型块茎形成的影响，具体结果如下：添加0.02~1.0 mg·L⁻¹ NAA、0.1~1.0 mg·L⁻¹ KT对微型块茎的形成均有促进作用。当KT浓度为1 mg·L⁻¹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；当NAA浓度为1 mg·L⁻¹，随着KT浓度的降低，微型块茎的诱导率呈升高趋势；当NAA为0.1 mg·L⁻¹、KT为1 mg·L⁻¹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；在培养基中形成的微型块茎为椭圆形，而在培养基上方植株上形成的块茎为圆球形；形成的块茎颜色由幼嫩时的黄绿色逐渐转变为褐色或黄褐色。由此可以看出，生长素浓度增加，细胞分裂素浓度降低，有利于微型块茎的诱导；在生长素浓度不变的情况下，培养基中细胞分裂素浓度的提高利于微型块茎的生长及膨大，形成较大微型块茎。

2.3 活性炭对微型块茎形成的影响

选择上述适宜微型块茎诱导的MS基本培养基+NAA 0.1 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹为基本培养基，在其中添加0.2~4.0 g·L⁻¹ AC，分析AC对微型块茎形成的影响结果（表3）表明：当培养基中添加0.2~0.4 g·L⁻¹ AC时，由于外植体分泌的酚类等有毒物质，外植体周围培养基褐化严重，植株长势比较弱，微型块茎诱导率最高

为 41.7%，微型块茎数为 4.7 个；培养基中添加 0.8~4.0 g·L⁻¹ 活性炭时，褐化减轻，植株长势增强，并于培养基中添加 2 g·L⁻¹ AC 时，微型块茎诱导率及微型块茎数达到了最大，分别为 87.5%、11.0 个；添加 AC 超过 2 g·L⁻¹，由于

AC 的吸附作用，导致外植体营养吸收困难，植株长势减弱，微型块茎诱导率及微型块茎形成数也相应降低。由此可见：培养基添加 2 g·L⁻¹ AC 为最适浓度。

表 2 不同浓度 NAA/KT 组合对微型块茎形成的影响
Table 2 Effect of combination of NAA and KT on miniature tube formation of yam

NAA/ (mg·L ⁻¹)	KT/ (mg·L ⁻¹)	微型块茎诱导率/ %	微型块茎数/ (个·株 ⁻¹)	微型块茎长度≥1 cm	≥1 cm 块茎/ %
0.02	1	20.8F	4.3b	0.7cd	16.3
0.05	1	37.5DEF	5.3ab	0.3d	0.6
0.1	1	83.3A	10.0a	5.3a	53.0
1	1	33.3EF	4.7ab	3.0abcd	63.8
1	0.5	45.8CDEF	7.0ab	4.3ab	61.4
1	0.1	58.3BCDE	5.0ab	1.3bcd	26.0

注：同一列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，下同。

表 3 活性炭浓度微型块茎形成的影响
Table 3 Effect of active carbon concentration on miniature tube formation of yam

活性炭浓度/ (g·L ⁻¹)	植株长势	微型块茎诱导率/ %	微型块茎数/ (个·株 ⁻¹)
0.2	+	29.2E	3.7FG
0.4	++	41.7CDE	4.7EFG
0.8	+++	54.2B	5.7CDEFG
1	++++	83.3A	6.3BCDEF
2	++++	87.5A	11.0A
3	++++	54.2B	5.0DEFG
4	++	37.5DE	2.3G

2.4 不同蔗糖浓度的添加对微型块茎形成的影响

在 MS 基本培养基+ 0.1 g·L⁻¹ NAA+1.0 g·L⁻¹ KT+2.0 g·L⁻¹ AC 的培养基中，添加 20.0~90.0 g·L⁻¹ 蔗糖，研究蔗糖对微型块茎形成的影响。培养基中添加 20.0 g·L⁻¹ 蔗糖时，植株营养生长旺盛，微型块茎的诱导率仅为 12.5%；随着培养基中蔗糖浓度的升高，微型块茎的诱导率及诱导数均得到提高，并于培养基中添加 50.0 g·L⁻¹ 蔗糖时，微型块茎诱导率和微型块茎诱导数达到最大，分别为 89.5%和 10.6 个，但是当培养基中添加蔗糖>50.0 g·L⁻¹时，植株营养生长整体减弱，微型块茎诱导率及诱导数均显著降低。由此可见，蔗糖浓度的升高，利于微型块茎的诱

导；但是过高的浓度会抑制植株的生长，进而影响微型块茎的形成。

表 4 蔗糖浓度对微型块茎形成的影响
Table 4 Effect of sucrose concentration on miniature tube formation of yam

蔗糖/ (g·L ⁻¹)	植株长势	微型块茎诱导率/ %	微型块茎数/ (个·株 ⁻¹)
20	+++	12.5C	2.3D
30	+++	87.5A	9.7A
50	+++	89.5A	10.6A
70	++	66.7A	6.3B
90	+	33.3BC	3.7CD

2.5 微型块茎再生植株的农艺性状调查

通过对田间种植材料和微型块茎再生材料的调查分析，发现“九斤黄”经组织培养后，主要农艺性状稳定，仍保持原品种种性，再生植株仍然不结珠芽（表 5）；将第 1 年收获的块茎，第 2 年进行切段种植，没有发现任何变异，保持原品种种性，块茎数量显著增加（图 1），外观品质得到改善，皮色主要为黄白色，但是田间连续种植的“九斤黄”皮色为黄褐色，皮色褐化严重。因此，一般组培诱导的微型块茎在第 3 年或第 4 年可以应用于大田生产，提高块茎的外观商品性。

表 5 主要农艺性状调查结果
Table 5 Important agronomic characteristics studied

	叶形	叶色	茎形状	块茎皮色	块茎肉色	珠芽	块茎形状
田间对照“九斤黄”	深裂三角形	黄绿色	圆柱形	黄褐色	白色	无	长柱形
微型块茎再生的“九斤黄”	深裂三角形	黄绿色	圆柱形	黄白色	白色	无	长柱形

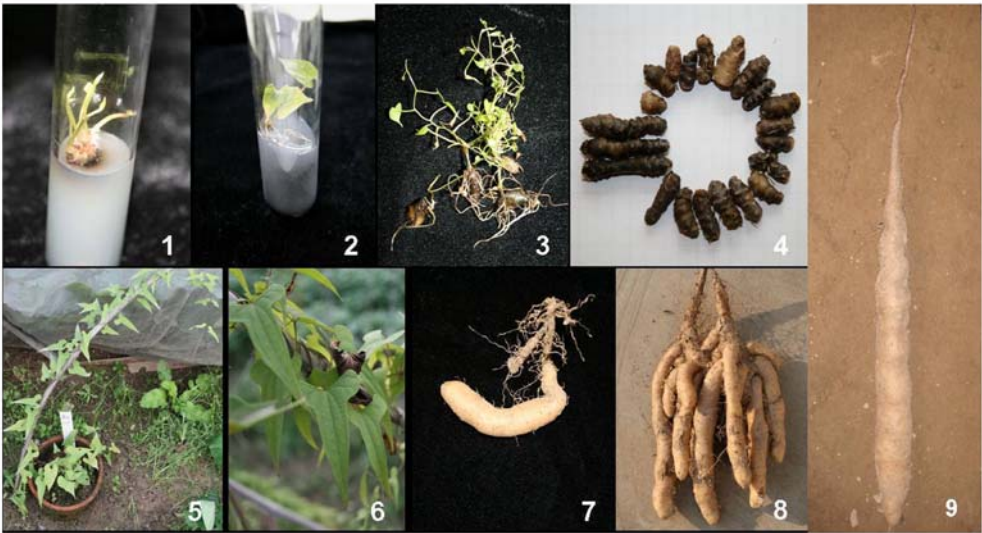


图 1 水山药组织培养及植株再生

Fig. 1 Tissue culture and plant regeneration of yam

注：1-茎尖诱导；2-植株再生；3-微型块茎诱导；4-微型块茎；5-微型块茎再生植株；6-田间对照；7-第 1 年收获的块茎；8-第 2 年收获的块茎；9-田间对照收获的块茎。

3 讨论与结论

NAA/6-BA 被认为是适宜山药茎尖诱导的激素组合，但因不同品种而异^[7,12]；本研究也选用 NAA/6-BA 激素组合，结果表明：对于水山药“九斤黄”，0.1 mg · L⁻¹ NAA / 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 最有利于芽分化及植株再生，分化率均达到 90% 以上，可见 NAA/ 6-BA 对于水山药茎尖培养是适宜的。

“九斤黄”为水山药抗病新品种，具有抗病、优质、高产等特点，但由于不结珠芽，间接提高了种植成本，并且在一定程度上滞缓了水山药的更新复壮。山药零余子繁殖系数高，对山药品种具有提纯复壮作用^[13-14]。

本研究主要探讨微型块茎的诱导及微型块茎再生植株种性的稳定性。NAA/KT 激素组合被认为诱导微型块茎形成率最高、形成的数量也最多^[15]；单独使用生长素 NAA 和 2.4-D 都对微型块茎的诱导效果较好^[11]；在培养基中添加适量 AC，有利于杂质、酚等有害物质的吸附，减弱或防止褐化，

AC 与植物生长调节物质的相互作用等，利于细胞的生长^[16]；蔗糖较白糖诱导形成的微型块茎大且多^[10]；本研究结果表明：MS 基本培养基中添加 0.1 mg · L⁻¹ NAA 和 1.0 mg · L⁻¹ KT 最有利于微型块茎的诱导，并且在 KT 浓度不变的情况下，随着 NAA 浓度的增加，微型块茎越大且比率较高；培养基中添加 2.0 g · L⁻¹ AC，显著减轻了褐化，一定程度上促进了微型块茎的形成；培养基中添加 50 g · L⁻¹ 蔗糖有利于微型块茎的诱导，尤其是大微型块茎的诱导。培养基中微型块茎的形成主要分为两部分，一部分形成于培养基中，形状为椭圆形，为褐色或浅褐色；另一部分形成于结节处，幼嫩时呈黄绿色，逐渐转变为褐色，呈圆球形。

微型块茎再次种植后，再生植株仍然保持原有品种种性，不结珠芽，且块茎表皮色泽鲜亮，外观品质得到提高；微型块茎用于种茎繁殖，将有助于品种“九斤黄”的提纯复壮和快速推广。

参考文献：

[1] 黄文华. 山药无公害标准化栽培 [M]. 北京，中国农业出版

- 社出版, 2005: 50—51.
- [2] 蔡建荣. 山药茎节间部组织培养及移栽技术研究 [J]. 江西农业学报, 2006, 18 (4): 108—109.
- [3] 段延碧, 郭华春. 山药 (*Dioscorea opposita*) 组织培养的初步研究 [J]. 西南农业学报, 2006, 19 (S): 59—62.
- [4] 马林, 张玲, 李卫锋. 黄山药丛生芽诱导与植株快速繁殖 [J]. 生物技术, 2004, 14 (2): 53—54.
- [5] 于倩, 李明军. 怀山药微型块茎愈伤组织的诱导形成及高频再生 [J]. 生态学报, 2004, 24 (5): 1022—1026.
- [6] 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.
- [7] 南怀林, 刘建平, 王耀琴. 山药茎尖繁殖技术的研究 [J]. 作物杂志, 2005, (6): 34—36.
- [8] 唐君, 周志林, 张允刚, 等. 怀山药离体繁殖的研究 [J]. 江西农业学报, 2008, 20 (9): 49—50.
- [9] 李明军, 刘欣英, 李萍, 等. 山药微型块茎诱导形成的影响因素研究 [J]. 中草药, 2008, 39 (6): 905—910.
- [10] 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): 69—72.
- [11] 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.
- [12] 汪国莲, 陈明, 孙玉东, 等. 淮山药的茎尖培养与快速繁殖 [J]. 江苏农业科学, 2003, 3: 77—78.
- [13] 张志勇, 刘文榕, 陈炳全, 等. 山药零余子组培快繁研究 [J]. 广西农业科学, 2002, 5: 244.
- [14] 周锁奎. 山药“优种大株零余子”快速繁殖法研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (3): 533.
- [15] 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.
- [16] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30 (3): 214—217.

(责任编辑: 柯文辉)