

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<sup>[1]</sup>。“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<sup>[2-8]</sup>, 主要研究了适宜微型块茎形成的碳源和氮源<sup>[9]</sup>、生长素种类及浓度<sup>[10]</sup>、细胞分裂素种类及浓度<sup>[11]</sup>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% $HgCl_2$ 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<sup>-1</sup> NAA+1~3 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 g·L<sup>-1</sup>活性炭(以下简称“AC”)+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+8 g·L<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup>。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<sup>-1</sup> NAA+0.1~1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+1.0 mg·L<sup>-1</sup> AC+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+8 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉;MS基本培养基+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.2~4.0 g·L<sup>-1</sup> AC+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+8 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉;MS基本培养基+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+2.0 g·L<sup>-1</sup> AC+20~90 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+8 g·L<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup> NAA和2 mg·L<sup>-1</sup> 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/<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | 6-BA/<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | 芽分化率/<br>% | 植株再生率/<br>% |
|-------------------------------|--------------------------------|------------|-------------|
| 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<sup>-1</sup> NAA、0.1~1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT对微型块茎的形成均有促进作用。当KT浓度为1 mg·L<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup>,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<sup>-1</sup>、KT为1 mg·L<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup>+KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>为基本培养基,在其中添加0.2~4.0 g·L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>，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<sup>-1</sup> 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/<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | KT/<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | 微型块茎诱导率/<br>% | 微型块茎数/<br>(个·株 <sup>-1</sup> ) | 微型块茎长度≥1 cm | ≥1 cm 块茎/<br>% |
|-------------------------------|------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|----------------|
| 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/<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | 植株长势 | 微型块茎诱导率/<br>% | 微型块茎数/<br>(个·株 <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------|------|---------------|--------------------------------|
| 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<sup>-1</sup> NAA + 1.0 g·L<sup>-1</sup> KT + 2.0 g·L<sup>-1</sup> AC 的培养基中，添加 20.0~90.0 g·L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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/<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | 植株长势 | 微型块茎诱导率/<br>% | 微型块茎数/<br>(个·株 <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------|------|---------------|--------------------------------|
| 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  |

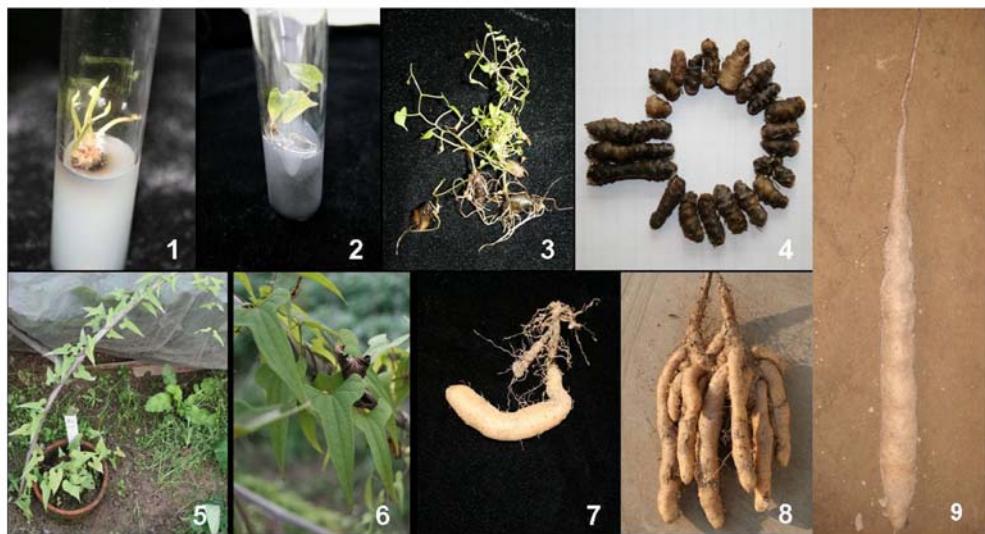


图1 水山药组织培养及植株再生  
Fig. 1 Tissue culture and plant regeneration of yam

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<sup>[7,12]</sup>; 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”,  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA /  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  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<sup>[13-14]</sup>。

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<sup>[15]</sup>; 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<sup>[11]</sup>; 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<sup>[16]</sup>; 蔗糖较白糖诱导形成的微型块茎大且多<sup>[10]</sup>; 本研究结果表明: MS 基本培养基中添加  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  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  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  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  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  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子研究 [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)