

铁棍山药茎尖组培及茎段侧芽成苗研究

平阿敏,侯雷平,邢国明,李梅兰

(山西农业大学 园艺学院,山西 太谷 030801)

摘要:山药富含淀粉、多糖、黏液蛋白、矿物质及其它营养物质,但营养繁殖导致山药病害积累、产量下降、品质退化,通过组织培养获得脱毒种药是解决这一问题的有效途径。以铁棍山药为材料,研究山药的茎尖脱毒及茎段侧芽成苗。结果表明:最适宜的茎尖诱导成苗培养基为 $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$,成苗茎尖率达到 77.8%;茎段侧芽成苗培养基以 $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 为最好,成苗时间短;1/2 $MS+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 为最适宜的生根培养基,这对无毒种苗的繁殖及防治山药品种退化、提高品种质量具有重要的指导意义。

关键词:山药;组织培养;脱毒

中图分类号:S632.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)09-0006-05 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0006

山药(*Dioscorea opposita*)是薯蓣科薯蓣属植物,既是食用的滋补保健佳品,又是常用的药材,广泛分布于我国华北、西北及长江流域各省区^[1]。人工种植的山药,肉色洁白,味甘粉足,个大质坚,多供食用。在民间,山药是人所共知的滋

补佳品^[2]。山药不仅含有蛋白质、糖类、维生素、脂肪、胆碱和淀粉酶等成分,还含有碘、钙、铁和磷等人体不可缺少的无机盐和微量元素^[3],营养价值高,又容易被人体吸收利用,所以山药作为药菜兼用的重要农产品,深受群众青睐,在国内外市场十分畅销。

近年来山药病毒病的发现和逐渐蔓延,已经开始威胁到山药的普遍种植和产品的深入开发。由于种性退化,山药品质下降,抗逆能力变弱,单产低而不稳。因此,如何遏制病毒蔓延,减缓威胁,保证产品质量,稳定经济效益,已成为摆在人们面前的一个重大课题。

收稿日期:2016-07-8
基金项目:山西省农业科技攻关资助项目(20140311011-4, 20150311010-2);山西省煤基重点科技攻关资助项目(FT 201402-06)
第一作者简介:平阿敏(1991-),女,山西省晋城市人,在读硕士,从事蔬菜育种及生物技术应用研究。E-mail:839103413@qq.com。
通讯作者:李梅兰(1964-),女,山西省怀仁县人,博士,教授,博士生导师,从事蔬菜育种及生物技术应用研究。E-mail:15935485975@163.com。

Study on Tissue Culture of *Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka

WANG Hong-mei¹, LI Yuan-li¹, LI Hong-guang², DONG Xiao-hui², SUN Yan-yan¹

(1. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, College of Landscape Architecture, Jurong, Jiangsu 212400; 2. Jiahan Urban Ecology Seedlings (Soochow) Limited Company, Suzhou, Jiangsu 215028)

Abstract: In order to establish more efficient tissue culture system, using the stems of *Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka as the explants, the effects of different sterilize time, starting culture, proliferation culture and rooting culture were studied. The results showed that the procedures of surface sterilization was 75% ethanol soak for 30 s, 0.1% $HgCl_2$ immerse for 10 min, the sterile water rinse 5 times, the survival rate of 66.7%. The suitable inducing medium was: 1/2 $MS+6-BA\ 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA\ 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the differentiation rate reached 68.3%, the proliferation medium was $MS+6-BA\ 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA\ 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+GA_3\ 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the proliferation coefficient was 7.0, the average height was 2.9 cm, the root inducing medium was 1/2 $MS+NAA\ 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+IBA\ 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose and the rooting rate could reach 93%.

Keywords: *Cerasus subhirtella* Miq. var. *pendula* Tanaka; culture medium; surface sterilization; proliferation; rootage

脱毒及离体快繁技术,是目前植物组织培养中应用最多、最广泛和最有成效的一个方法。实践证明,通过茎尖培养可以去除多种植物病毒获得脱毒试管苗,尤其是通过营养繁殖的根茎类作物,脱毒植株的产量明显高于感病植株。通过试管苗的快繁技术,可以保持优良品种或脱毒种苗的优良种性并使其在短期内大量繁殖,其繁殖速度比常规方法快数万倍到数百万倍^[4]。但到目前为止,山药带病植株脱毒的研究相对较少,而且茎尖分化及快繁培养基参差不齐,脱毒率低。因此,本试验以比较成熟的植物脱毒技术为依托,结合山药组培快繁的研究现状,完善并优化山药离体脱毒快繁体系,为山药的脱毒苗生产提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验将铁棍山药的零余子作为试验材料,浅埋在育苗基质中催芽,长出幼苗时待用。

试验主要仪器:双人超净工作台;高压灭菌锅;电子天平;微波炉。

药剂:琼脂(A111)、MS(M519)均购自 Phyto Technology Laboratories 公司;6-BA、NAA 和 ZT 均购自上海生物工程有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 茎尖诱导成苗 待零余子长出幼苗,剪取其顶端 2 cm 左右,自来水冲 30 min,在超净工作台用 70%酒精消毒 30 s,蒸馏水洗 3 次,再用 0.1%的升汞消毒 1 min,无菌水漂洗 5 次,最后剥取 1 mm 大小左右的茎尖,分别接种于 12 个茎尖诱导成苗培养基,每种培养基接种 9 个茎尖,所用培养基为附加不同浓度 6-BA、KT 和 NAA 的 MS+30 g·L⁻¹蔗糖 + 6 g·L⁻¹琼脂的培养基,激素组合见表 1。成苗茎尖率为成苗茎尖数占接种茎尖数的百分比;增殖率为成苗数占接种茎尖数的百分比。

1.2.2 茎段侧芽成苗 零余子长出幼苗后,剪取茎段,无菌水冲洗 30 min,用 70%酒精消毒 30 s,蒸馏水洗 3 次,再用 0.1%的升汞消毒 4 min,无菌水漂洗 5 次,切取单节茎段(去掉叶片),接种在茎段侧芽成苗培养基 MS+30 g·L⁻¹蔗糖 + 6 g·L⁻¹琼脂+(不同浓度的 6-BA+NAA),每种培养基接种 12 个茎段,30 d 后记录成苗数,各培养基激素组合见表 2。

1.2.3 生根 将茎尖诱导出的幼苗从愈伤上切下来,接种在不同的生根培养基上,观察生根情况,培养基激素组合见表 3。

表 1 不同激素组合对山药茎尖诱导成苗的影响

Table 1 The effects of different hormone combinations on inducing seedlings from shoot tips

培养基编号 Medium No.	激素组合/(mg·L ⁻¹) Hormone combination	出愈数/个 Callus induction number	出愈率/% Callus induction rate	成苗茎尖数/个 Number of shoot tips induced to seedlings	成苗茎尖率/% Seedling rate of shoot tips	成苗数/个 Number of seedlings	增殖率/% Proliferation rate
1	6-BA 0.5+NAA 0.2	6	66.7	3	33.3	5	55.6
2	6-BA1.0+NAA 0.2	6	66.7	5	55.6	9	100.0
3	6-BA2.0+NAA 0.2	4	44.4	6	66.7	8	88.9
4	6-BA0.5+NAA 0.5	4	44.4	7	77.8	10	111.1
5	6-BA1.0+NAA 0.5	4	44.4	6	66.7	9	100.0
6	6-BA2.0+NAA 0.5	6	66.7	5	55.6	10	111.1
7	6-BA0.5+NAA 1.0	4	44.4	4	44.4	4	44.4
8	6-BA1.0+NAA 1.0	5	55.6	3	33.3	5	55.6
9	6-BA2.0+NAA 1.0	5	55.6	0	0	0	0
10	KT2.0+NAA 0.02	0	0	8	88.9	8	88.9
11	KT2.0+NAA 0.2	0	0	2	22.2	2	22.2
12	KT2.0+NAA 2.0	1	11.1	1	11.1	1	11.1

表 2 不同激素组合对山药茎段侧芽成苗的影响

Table 2 The effects of different hormone combinations on stem segment lateral bud inducing

培养基编号 Medium No.	激素组合/(mg·L ⁻¹) Hormone combination	30 天后成苗数/个 Number of seedlings in 30 days	30 天后成苗率/% Seedling rate in 30 days	40 天后成苗数/个 Number of seedlings in 40 days	40 天后成苗率/% Seedling rate in 40 days
1	6-BA 0.5+NAA 0.1	11	91.7	12	100
2	6-BA 1.0+NAA 0.1	10	83.3	12	100
3	6-BA 1.5+NAA 0.1	3	25.0	12	100
4	6-BA 0.5+NAA 0.2	6	50.0	12	100
5	6-BA 1.0+NAA 0.2	9	75.0	12	100
6	6-BA 1.5+NAA 0.2	6	50.0	12	100
7	6-BA 0.5+NAA 0.5	6	50.0	12	100
8	6-BA 1.0+NAA 0.5	9	75.0	12	100
9	6-BA 1.5+NAA 0.5	7	58.3	12	100

2 结果与分析

2.1 不同激素配比培养基对山药茎尖诱导成苗的影响

试验发现,6-BA+NAA 组合的培养基茎尖接种 20 d 后开始长愈伤,44 d 后出现芽点或丛生芽,100 d 后长成 1 cm 大小的脱毒苗,并且成苗茎尖数随着 NAA 浓度的升高而升高,但是 NAA 达到 1.0 mg·L⁻¹ 时反而降低(见表 1,图 1)。比较几个培养基,4 号培养基成苗茎尖数最多,达到 77.8%;6 号培养基有 5 个茎尖成苗,成苗数多达 10 个,增殖率最高,平均每个茎尖分化 2 个脱毒苗。KT+NAA 组合的培养基几乎不形成愈伤而直接成苗(见图 1),随着 NAA 浓度的升高成苗率下降并且开始有愈伤出现,80 d 后 10 号培养基成苗率达到 88.9%,11 和 12 号培养基成苗率很低。整体来看,虽然 10 号培养基成苗时间要比 4 和 6 号培养基短,但成苗发黄、质量不佳,而 4 号培养基成苗率最高并且成苗长势良好,因此,诱导茎尖成苗最适宜的培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA。

2.2 不同激素配比培养基对山药茎段侧芽成苗的影响

零余子长出幼苗后,将其切成 1 cm 左右的带侧芽的茎段,切掉叶片后接种在茎段侧芽成苗培养基上,5 d 后叶腋处可见萌发芽点,30 d 后成苗率以 1 号培养基成苗率最高,为 91.7%,3 号培养基最低,为 25.0%,但 40 d 后成苗率均能达到 100%,只是成苗时间略有不同,综合成苗时间和

成苗质量来看,1 号培养基为最适宜的茎段侧芽成苗培养基(见表 2)。

2.3 不同激素配比培养基对山药茎尖成苗生根的影响

将茎尖成苗转至生根培养基上,统计生根时间,可以看出(见表 3,图 2),1/2MS 培养基整体要比 MS 培养基生根快而好,而且 1/2MS 培养基中,随着 NAA 浓度的升高,生根时间缩短,NAA 浓度为 0.05 mg·L⁻¹ 时生根时间最短,0.1 mg·L⁻¹ 时生根时间变长,其中以 6 号培养基 1/2 MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA 生根时间最短、效果最好。

表 3 不同激素配比培养基对山药茎尖成苗生根的影响

Table 3 The effects of different hormone combinations on rooting of seedlings induced from shoot tips

编号 Number	激素组合/(mg·L ⁻¹) Hormone combination	开始生根时间/d Rooting time
1	MS	22
2	1/2 MS	18
3	MS+0.020 NAA	20
4	1/2 MS+0.02 NAA	12
5	MS+0.05 NAA	18
6	1/2 MS+0.05 NAA	10
7	MS+0.10 NAA	26
8	1/2 MS+ 0.10 NAA	18

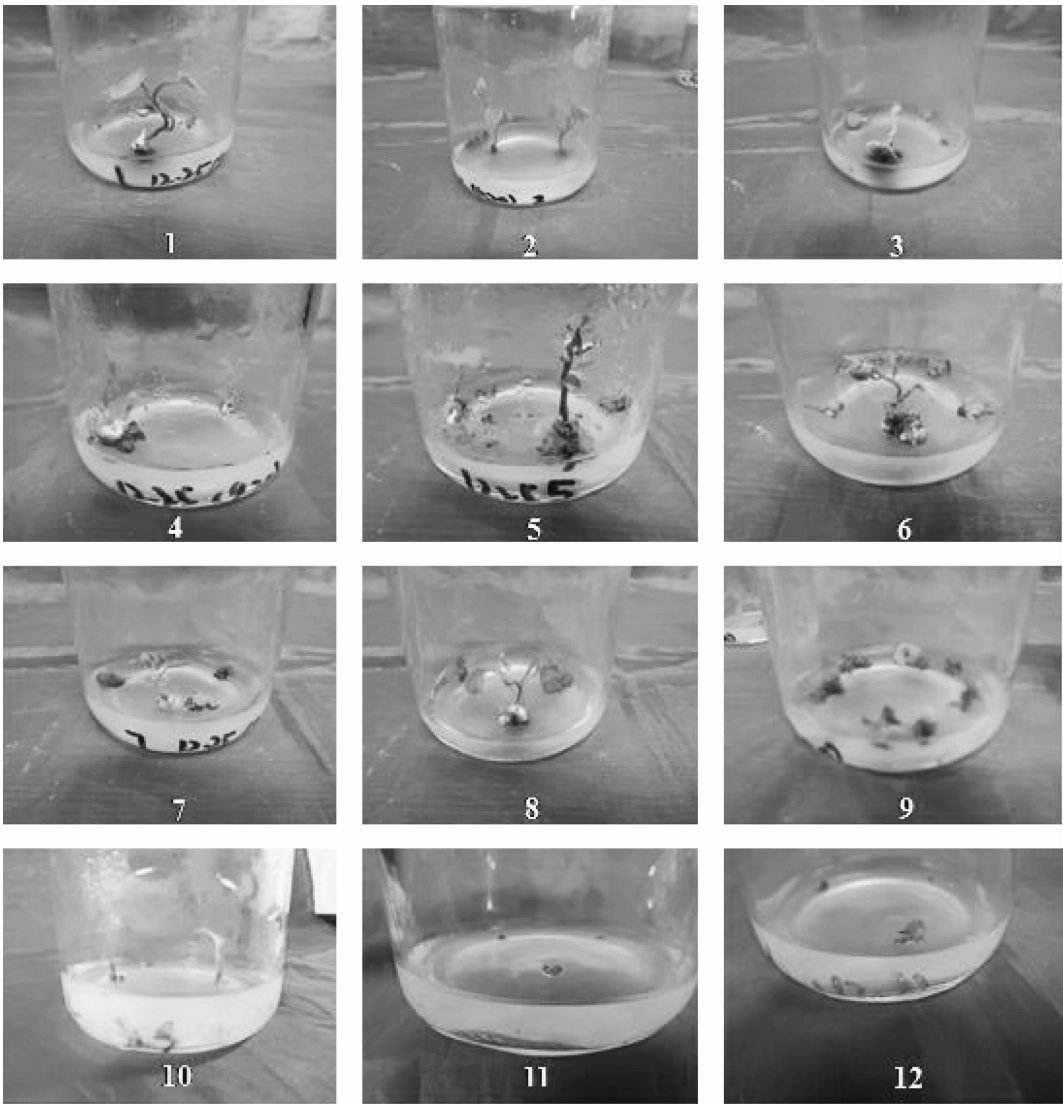


图 1 不同激素组合对茎尖诱导成苗的影响

Fig. 1 The effects of different hormone combinations on inducing seedlings from shoot tips

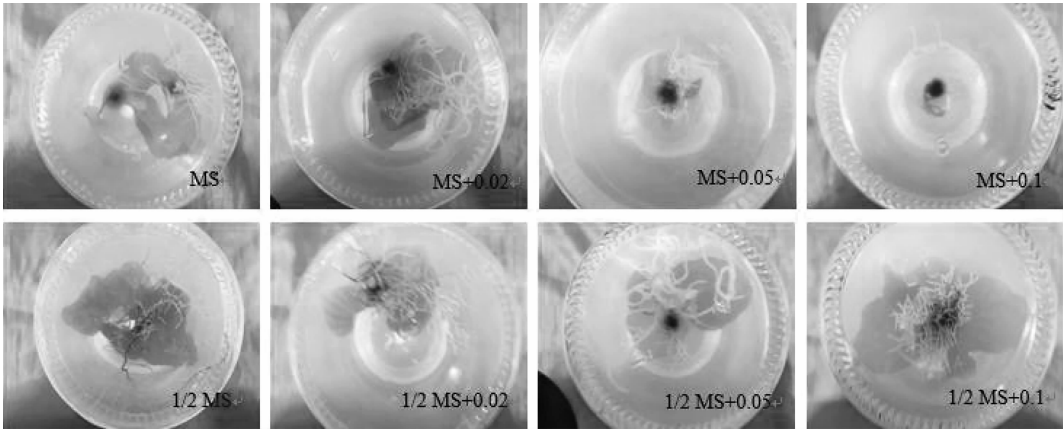


图 2 不同激素配比培养基对山药茎尖成苗生根的影响

Fig. 2 The effects of different hormone combinations on rooting of seedling induced from shoot tips

3 结论与讨论

茎尖成苗的限制因素很多,茎尖大小对于茎尖的成活影响很大,幼嫩的茎尖分生组织,病毒难以入侵,且茎尖中含有高水平的内源激素,可抑制病毒增殖。一般来说,离体茎尖越大,越容易成活,但病毒越难去除^[5],因此不应离开脱毒率单独看待茎尖的存活率,茎尖应小到足以能根除病毒,大到足以能发育成一个完整的植株,试验证明切取茎尖时,尽可能切取只带1~2个叶原基的分生组织,约0.2~0.4 mm的茎尖较为适宜^[6]。但本试验中是用零余子成苗的茎尖作为外植体,因其本身比山药发出的苗小,因此茎尖也要小很多,所以剥离茎尖时存在一定难度,综合各种因素,本试验剥取0.5~1.0 mm的茎尖。

采用茎尖离体培养是植物组织或器官脱毒过程中的一项常规技术,而其关键的环节在于选择合适的培养基,尤其是培养基中激素的种类与配比^[7-9],考虑到茎尖诱导培养基种类多并且剥取速度也会影响茎尖的活性,本试验每种培养基剥取茎尖较少,但6-BA和NAA的组合成苗茎尖数最多达到77.8%,并且长势良好,KT和NAA的组合虽然成苗快,但长势不好,说明6-BA和NAA的组合更适合于山药茎尖诱导成苗的培养,这与解晓红^[6]等的研究结果一致。本试验还发现,随着NAA浓度的升高成苗茎尖数升高,NAA升高到一定程度时成苗茎尖数反而下降,说明高浓度的NAA会抑制茎尖成苗。

自1999年,研究者开始对山药的脱毒快繁技术进行研究,获得外植体的方法大概有两种:山药浅埋细沙中催芽^[10]、直接剪取大田植株顶^[11-12],很少有人用山药的零余子作为材料进行山药的组培研究,张志勇于2002年将山药零余子浅埋细沙中催芽,成苗后切取带叶芽的茎段进行无菌苗的培养^[13]。山药零余子是秋季在叶腋形成的气生块茎,繁殖系数高,并可防止种性退化,而且零余

子相比山药成本低,材料充足,对于山药的组织培养来说是一个很好的研究材料,但零余子作为脱毒材料的脱毒效果还有待进一步研究。

本试验以铁棍山药为材料,进行了山药的脱毒及茎段侧芽成苗研究,研究结果表明,最适宜的茎尖诱导成苗培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA,成苗茎尖数达到77.8%,茎段侧芽成苗培养基以MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA为最好,成苗时间短,而1/2 MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA为最适宜的生根培养基,生根时间短、生根效果好,这对无毒种苗的繁殖及防治山药品种退化、提高品种质量具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 胡选萍,张晓娟. 山药离体脱毒技术探讨[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 14896-1489.
- [2] 黄桂东,钟先锋,易军鹏. 山药的研究概况[J]. 农产品加工学报, 2006(7): 55-57.
- [3] 楼之岑,秦波. 常用中药材品种整理和质量研究[M]. 北京: 北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社, 1995.
- [4] 张丽霞,郭利平. 影响花籽山药脱毒试管苗快繁的因素[J]. 北方园艺, 2014(8): 80-82.
- [5] 韩艳婷,石雪晖,杨国顺,等. 红地球葡萄 GLRaV-3 的茎尖培养脱毒及 RT-PCR 检测[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 198-202.
- [6] 解晓红,陈丽,王凌云,等. 日本薯蓣脱毒快繁限制因子的研究[J]. 陕西农业科学, 2012(4): 3-6.
- [7] 苗丽娟,韩锁义,张新友,等. 怀山药茎尖脱毒培养与茎段增殖研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(11): 123-125.
- [8] 谢玲玲,赵青华,降巧龙. 魔芋茎尖脱毒试管苗培养基的筛选[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 14891.
- [9] 尹明华,洪森荣,徐卫红,等. 应用正交设计法优选黄独脱毒苗快繁培养基[J]. 亚热带植物科学, 2009, 38(3): 24-26.
- [10] 张志勇,梁金平,黄萍萍. 山药茎尖组培及快繁研究[J]. 上海农业科技, 2008(4): 82-82.
- [11] 刘广卿,周玉玲,姜曙光,等. 惠楼山药的脱毒与应用技术[J]. 江苏农业科学, 2009(3): 47-47.
- [12] 向发云,曾祥国,韩永超,等. ‘蕲山药’离体再生及试管微块茎的形成[J]. 中国农学通报, 2014, 30(10): 111-117.
- [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.

Study on Tissue Culture from Shoot Tip and Stem Segment of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun

PING A-min, HOU Lei-ping, XING Guo-ming, LI Mei-lan

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: *Dioscorea opposita* is rich in starch, polysaccharide, mucus protein, minerals and other nutrients, but the vegetative propagation caused the accumulation of diseases, the decline of yield and degradation of quality. It is an effective way to solve this problem by means of tissue culture. Using the *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun as materials, the detoxication by shoot tips and stem segment lateral bud inducing was examined. The results showed that MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA was the ideal medium for shoot tip differentiation, and the induction rate reached 77.8%. MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA was the best medium for lateral bud inducing of *Dioscorea opposita* and the time taken was shorter. The most suitable rooting medium was 1/2 MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA. These results has important guiding significance to the propagation of virus-free seedling, the prevention of yam varieties degradation and the improvement of variety quality.

Keywords: *Dioscorea opposita*; tissue culture; detoxication