

王碧琴,周 华,朱 祺,等. 紫山药组织培养快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):48-50.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.013

紫山药组织培养快繁技术研究

王碧琴,周 华,朱 祺,刘腾云,余发新

(江西省科学院生物资源研究所,江西南昌 330029)

摘要:以紫山药的茎尖、茎段为材料,对茎尖、茎段诱导分化不定芽进行初步研究,结果表明,茎尖、茎段不定芽的分化率随 6-BA 浓度的增加而提高,芽苗增殖率先由低到高,再降低;MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基对不定芽有较高的分化率和增殖率;茎尖、茎段培养 20 d 为 1 个继代周期,茎段在第 2 次继代期、茎尖在第 3 次继代周期培养时,不定芽的增殖率最高;不定芽苗 2.0~3.0 cm 时从苗基部或分枝处剪下;进行生根诱导,生根率在 95% 以上。

关键词:紫山药;茎尖;茎段;组织培养;不定芽

中图分类号:S632.104+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0048-03

紫山药俗称薯蕷、脚板薯、长芋,为薯蕷科薯蕷属 (*Dioscorea*) 的一个地方品种,为多年生蔓性植物,块根呈块状或圆柱状,表皮和肉质因呈紫红色而得名。紫山药肥大的肉质块根细腻滑爽、口感极佳,富含黏性蛋白、紫色花青素、维生素、胆碱和薯蕷皂(天然的 DHEA)等,内含各种荷尔蒙基本物质,有促进内分泌荷尔蒙的合成等多种独特食疗价值,也称“紫人参”。据《本草纲目》记载,经常食用紫山药,不仅可以增加人体的抵抗力,降低血压、血糖,抗衰益寿等,而且还具有固肾、润肺益精、软化血管等药用滋补功能,故又享有“蔬菜之王”的美誉。病毒病是造成山药产量下降、品质退化的重要因素。紫山药由于长期使用块茎繁殖,出现病毒积累,种性退化,已危及到产品品质和产量,不但满足不了市场需求,还

严重影响和制约地方产业的发展和种植的积极性。山药感染的主要病毒有坏死花叶病毒、绿色斑驳病毒、马铃薯 Y 病毒和马铃薯卷叶病毒^[1],目前尚无有效药物可控制这些病毒病的发生或蔓延。采用现代生物技术,选取优良无病株种苗进行离体脱毒培养,以组培苗更替传统的营养繁殖可以从根本上解决病毒病的问题。有关盾叶薯蕷、惠楼山药、怀山药等组织培养与快繁的研究^[2-5]已见报道,紫山药组织培养快繁技术研究还未见报道。为此,本试验开展紫山药组织培养快繁技术研究,以期对紫山药组培苗工厂化生产和应用提供参考。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

紫山药,由江西万载辉明有机农业科技开发有限公司提供。选择个大无病虫、表面根毛少、肉紫色的块茎,经表面消毒,在室(棚)温 15~25℃ 于盆中沙藏催芽 30 d 左右,待嫩芽生长到 20~30 cm 即可作为外植体取材。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 初始培养基:MS;诱导分化培养基:MS+6-BA 0.1~2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;生根培养基:1/2MS+NAA 0.1~0.5 mg/L+Ac 0.2 g/L。所用培养基均

收稿日期:2014-01-03

基金项目:江西省科技支撑计划(编号:2010CX06300)。

作者简介:王碧琴(1957—),女,浙江义乌人,研究员,主要从事植物遗传育种及生物技术研究工作。E-mail:wangbiqin2005@126.com。

通信作者:余发新,博士,研究员,主要从事植物遗传育种研究工作。E-mail:fxu2000@126.com。

Dang Ngah 的再生体系,为遗传转化奠定了基础。

参考文献:

[1]郭晓丽. 水稻愈伤组织培养研究[J]. 衡水学院学报,2009,11(1):48-49,70.

[2]Nishi T, Yamada Y, Takahishi E. The role of auxins in differentiation of rice tissue culture *in vitro* [J]. Botanical Magazine, 1973, 86: 183-188.

[3]Kyojuka J, Otoo E, Shimamoto K. Plant regeneration from protoplast of indica rice: genotype differences in culture response [J]. Theoretical Applied Genetics, 1988, 76: 887-890.

[4]Raman R, Chahal G S, Dhaliwal H S. Screening of genotype for callus induction and plant regeneration in rice [J]. Crop Improvement, 1994, 21: 1-2.

[5]Hiei Y, Komari T. Agrobacterium-mediated transformation of rice

using immature embryos or calli induced from mature seed [J]. Nature Protocols, 2008, 3(5): 824-834.

[6]阎丽娜,李霞,吴丹. 不同类型水稻材料成熟胚组织培养力的比较[J]. 中国农业科学,2010,43(6):1127-1135.

[7]张东向,张崇浩,李杰芬. 玉米叶片胚性愈伤组织诱导及其与内源 IAA 和 ABA 关系的初步研究[J]. 作物学报,2000,26(2):195-199.

[8]Zuraida A R, Suri R, Wan Z. Regeneration of Malaysian indica rice (*Oryza sativa*) variety MR232 via optimized somatic embryogenesis system [J]. Journal of Phytology, 2010, 2(3): 30-38.

[9]田文忠. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报, 1994, 21(3): 215-221, 254.

[10]Syaiful B P, Siti N A, Maheeran A A, et al. Somatic embryogenesis from scutellar embryo of *Oryza sativa* L. var. MR 219 [J]. Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science, 2009, 32(2): 185-194.

含45 g/L食用糖和琼脂6 g/L, pH值为5.8。培养基在121℃、131 kPa条件下灭菌25 min, 备用。

1.2.2 外植体消毒 去掉展开的叶片, 分别剪成带叶柄的茎段、茎尖; 用洗液清洗干净, 在无菌操作台上用70%乙醇消毒30 s, 无菌水冲洗数次; 分别用0.1% HgCl₂ 浸泡消毒, 茎尖5 min、茎段10 min, 用无菌水冲洗数次。

1.2.3 茎尖和茎段的初始培养 茎段带节剪成0.8~1.0 cm的小段, 共72段, 茎尖修剪0.5~0.8 cm, 共30个; 分别接种于初始培养基上, 培养30 d后统计枯死率和成活率。

1.2.4 激素浓度对茎尖、茎段的诱导分化 初始培养的茎段腋芽抽长2.0 cm时, 将新抽枝从基部剪下, 每茎段0.5 cm左右, 带叶柄接种在不同激素浓度的诱导分化培养基上, 每处理接种30茎段; 初始培养的茎尖修剪基部褐化的部分, 取茎尖0.3 cm左右, 接种在不同激素浓度的诱导分化培养基上, 每处理接种12茎尖。茎尖、茎段培养20 d, 新鲜培养基继代1次, 40 d后观察不定芽变化, 并统计诱导分化率、不定芽数和增殖率。

1.2.5 培养周期对茎尖、茎段的诱导分化 再生茎尖、茎段(含不同株系紫山药1[#]、2[#])各30个, 接种在MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L的诱导分化培养基上, 每培养20 d为1个继代周期, 共继代4次, 统计不定芽数和增殖率。

1.2.6 生根培养 剪取不定芽苗2.0~3.0 cm, 接种于生根培养基诱导生根, 20 d后统计生根数。

1.3 培养条件

接种后的试材, 均在温度(25±2)℃、光照度1200 lx、光照时间10 h/d条件下培养。

2 结果与分析

2.1 茎尖、茎段的初始培养

外植体接种在初始培养基上培养2~3 d, 基部开始变褐, 培养基出现褐化, 褐色物渗入培养基呈圆形; 培养10~15 d, 外植体基部褐化加重, 部分茎尖变褐、枯死, 茎段基部1/3处枯死; 培养20 d, 茎尖枯死率为17%, 茎段枯死率为7%, 外植体基部的茎节处肿大, 并有淡红色圆形芽点, 茎段叶柄张开, 腋芽开始萌动; 培养30 d左右, 茎段叶腋抽生1~2个不定芽, 长0.5~2.5 cm, 稍嫩的茎段叶腋形成0.1~0.2 cm小瘤状物, 茎尖、茎段成活率分别为43%和91%。

2.2 6-BA浓度对茎尖、茎段诱导分化的影响

茎尖0.3 cm、茎段0.5 cm分别接种在不同6-BA浓度的诱导分化培养基上, 培养3~5 d, 茎段切口处分泌褐色物, 在培养基中扩散由浅褐至深褐; 培养10~15 d, 茎段基部增粗, 叶柄张开, 腋芽萌发单个或多个不定芽小点, 单个不定芽伸长, 生长较快, 不定根长2~4 cm, 不定芽长2.0 cm, 随激素浓度的加大, 茎段形成的丛生芽体数增多, 最多可达5~7个, 茎尖由于个体小, 分化的芽点也小, 分化率虽高, 但能形成正常的小芽少, 随培养时间的延长, 部分小芽可生长成正常芽, 但芽体较弱、矮小或畸形; 培养20 d左右, 不定芽基部生长1~3条淡红色不定根, 不定根生长快, 可直接伸入培养基分泌酚类化合物, 受多酚氧化酶激活产生醌类物质, 加重培养基褐化程度。由表1可见, 6-BA浓度为0.1 mg/L时, 茎尖、茎段诱导分化率和增殖率均最低, 分别为90%、0%和93%、123%; 6-BA浓度为1.0 mg/L时, 茎尖、茎段诱导增殖率均为最高, 分别为50%和250%; 茎尖和茎段在MS+6-BA

表1 6-BA浓度对紫山药茎尖、茎段诱导分化的影响

培养基	接种(个)		分化(个)		分化率(%)		不定芽(个)		增殖率(%)	
	茎尖	茎段	茎尖	茎段	茎尖	茎段	茎尖	茎段	茎尖	茎段
MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L	12	30	9	28	90	93	0	37	0	123
MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	12	30	9	30	90	100	3	61	25	203
MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	12	30	10	30	100	100	6	75	50	250
MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	30	10	30	10	100	100	6	60	50	200
MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	12	30	10	30	100	100	4	56	34	187

1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基中培养, 既能保持一定的分化率又有较好的不定芽增殖率。

2.3 培养周期对茎尖、茎段诱导分化的影响

试验结果表明, 茎段培养15~20 d, 不定芽由茎段基部叶腋、隐芽分化, 或由腋芽直接分化形成不定芽, 茎尖仅在叶腋处膨大, 露出小小的芽点; 培养40 d(2次继代), 茎段不定芽长0.5~1.0 cm, 不定芽增殖数达到高峰, 增殖数达到42个, 后不定芽增殖系数逐步下降; 随着培养时间延长, 不定芽增多, 形成多个多芽体(图1), 茎节处有少量不定根; 培养60 d(第3次继代), 茎段苗高2.0~4.0 cm, 基部1~2节处有多条不定根, 并有多芽体丛生现象, 基部不定芽分化基本停止, 茎秆节腋处产生重叠多芽体, 芽体茎秆细小, 不利于作次代增殖材料, 茎尖叶腋形成多个不定芽, 增殖数随培养时间延长不定芽增多, 增殖数由少到高并回落, 茎尖培养60 d时不定芽增殖数为最高, 增殖数达到40个(表2); 随着培养继代次数的增加, 不定芽增殖数增加, 出现枝上生芽的多芽体现象。



图1 不定芽及多芽体

表2 培养不同周期分化不定的芽增殖情况

外植体	接种数(个)	不定芽数(个)				组培苗农艺性状
		20 d	40 d	60 d	80 d	
茎尖	30	0	27	67	101	不定芽小, 有退化现象
茎段	30	23	65	80	91	不定芽稍大

2.4 对不同株系茎段诱导分化的影响

紫山药不同株系从试管苗外观上进行区别, 1[#]茎秆粗壮、

淡绿色,叶片绿色,2[#]茎秆稍细、紫色,叶深紫色(图 2、图 3)。在培养过程中,紫山药 1[#]茎段愈伤组织较松软,诱导不定芽时间短,需 7~10 d,产生不定芽 2~3 个,且生长伸长快,容易形成多芽体现象;紫山药 2[#]愈伤茎段组织质地较硬,诱导不定芽时间长,需 15~20 d,不定芽为单个生长,伸长慢,芽体小,增殖系数也少(表 3)。紫山药 1[#]芽体每继代周期的增殖系数是紫山药 2[#]的 1.54 倍,有利于建立快繁体系。这种不同的诱导分化效果,与材料本身的生理遗传基因-植物受体多样性及与内源激素的合成和代谢差异有密切关系^[6-9]。



图2 紫山药1[#]苗



图3 紫山药 2[#]苗

表 3 不同株系茎段分化不定芽的增殖情况

株系	茎段 (个)	不定芽 (个)	增殖率 (%)	组培苗农艺性状
紫山药 1 [#]	30	59	197	苗茎秆粗,叶淡绿色
紫山药 2 [#]	30	13	43	苗茎秆稍细,叶深紫色

2.5 不定芽的生根诱导培养

由图 4 可见,在生根培养基培养 7~10 d,小苗基部开始生 1~3 条白或水红色细长的根,15 d 后根在培养基底部部长达 10 cm;小苗叶片大,色质光绿,叶柄长,小苗主侧枝伸长,茎节上不断有不定根形成。20 d 后生根率在 95% 以上,此时,可移出培养室,在自然光下炼苗 3~5 d,用水洗净琼脂,移栽至营养钵。

3 小结

紫山药外植体接种后由自养变为异养,细胞代谢发生变化,产生了一些酚类化合物,这些酚类物质受多酚氧化酶激



图4 生根苗

活,被氧化后产生呈棕褐色的醌类物质,随着外植体的伤口或愈伤组织逐步从组织扩散到培养基中,影响外植体器官的分化,严重时会使组织死亡。茎尖组织比较幼嫩,抗醌类物质毒害较弱,在培养过程中容易褐化死亡。因此,外植体在接种后需采用 7~10 d 继代(更换)1 次培养基。

培养基中高浓度激素是加剧外植体褐变的因素。在次生茎段分化增殖培养中,当 6-BA 浓度为 1.0~2.0 mg/L 时褐化较重,每 15 d 左右就需继代 1 次培养基;当 6-BA 0.5 mg/L 时褐化较轻,一般 20~25 d 更换 1 次培养基有利于细胞的正常分化。在一定范围内,激素浓度与次生茎段诱导分化率成正比,激素浓度越高,分化的不定芽越多。培养继代的次数越多,产生不定芽多芽体也多,尤其在不定芽 2 次继代后比较明显,这与晏婴才等的研究结论^[2]基本相似。

从不定芽增殖量上看,外植体茎尖诱导分化的不定芽数量多于茎段。从生物遗传角度及农艺性状上分析,茎尖诱导分化的不定芽变异性强,对改良品种、选育新品种比较适合,茎段快繁能保持品种的品性,有利于提高品种的优良品质。因此,在利用组织培养技术时,应根据需求目的,选择适合的培养方式来建立无性快繁体系。

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):14896-14897.
 [2]晏婴才,林宏辉,代其林,等. 盾叶薯蓣组织培养与快速繁殖研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2002,39(1):136-140.
 [3]徐向丽,刘选明,周朴华,等. 盾叶薯蓣组织培养及微体茎的离体诱导[J]. 华南农业大学学报:自然科学版,2000,26(4):282-285.
 [4]周玉玲,余慧琳,孙凤岭,等. 惠楼山药的组织培养与快繁技术研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(20):9407-9408.
 [5]李明军,李金亭,朱命炜,等. 怀山药的离体繁殖[J]. 中草药, 1999,30(4):296-298.
 [6]姜灵敏,徐有明,张冬梅,等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J]. 江苏农业学报,2012,28(4):914-916.
 [7]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.
 [8]李一婧,王廷璞,马伟超,等. 红茂草种子萌发及组织培养最佳条件初探[J]. 江苏农业科学,2012,40(1):52-54.
 [9]周杰,曹清河,周志林,等. 菜用型甘薯不同品种组织培养差异研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(1):60,62.