

吴凡,陈闽,刘佳,等.甜薯脱毒苗快速繁殖技术[J].江苏农业科学,2020,48(12):36-39.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.008

# 甜薯脱毒苗快速繁殖技术

吴凡,陈闽,刘佳,张艳梅,孙小芹

(江苏省中国科学院植物研究所/南京中山植物园,江苏南京 210014)

**摘要:**以甜薯的茎尖和单节茎段为试验材料,研究不同浓度激素组合对甜薯不定芽及再生植株的影响,从而建立一套甜薯快速繁殖体系。结果表明,茎尖诱导出芽最佳培养基为 MS + NAA 0.1 mg/L + KT 2.0 mg/L,单节茎段诱导的最佳培养基为 MS + AD 0.8 mg/L,增殖最佳培养基为 MS + NAA 0.5 mg/L + KT 2.0 mg/L,生根最佳培养基为 MS + IBA 2.0 mg/L。该方法能够提高甜薯繁殖系数,提高甜薯品质与产量,为甜薯产业化生产提供了理论依据和实践指导。

**关键词:**甜薯;脱毒苗;茎尖;单节茎段;快速繁殖技术

**中图分类号:** S531.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0036-03

甜薯 [*Dioscorea esculenta* (Lour) Brukill], 别称甘薯、毛薯、蒂薯,与山药同为薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 藤本植物<sup>[1]</sup>, 海南、广东、广西等南方沿海地区广泛分布,浙江、江苏则有少量分布。其茎块颜色为白色,肉质细嫩,既含丰富的多糖、淀粉、蛋白质等成分<sup>[2]</sup>,又具有健脾止泻、益肺滋肾、解毒敛疮等功效<sup>[3]</sup>。除了丰富的营养成分和良好的药用价值,甜薯还具有耐储藏、抗旱性好、病虫害少、单株结薯多且集中等特性<sup>[4]</sup>,便于生产管理,是值得研究和开发利用的特色薯类作物。

甜薯的种植方式与传统的山药种植方法类似,即在收获季节选健壮、无病虫害的块茎贮藏,次年种植季节取出切断种植,但这种传统的“春种、秋收、冬藏”方式存在种块严重浪费、扩殖速度慢、人力物力消耗大等问题。而且,长期的无性繁殖导致病毒和病害的积累与传播,致使品质退化、产量下降<sup>[5]</sup>。

前人研究表明,通过组织培养脱除病毒的方法不仅可以极大地提高薯蓣属植物繁殖系数,而且还可以解决因长期营养繁殖造成的病毒病和品质退化等问题<sup>[6-8]</sup>。目前,在山药不同种或品种如铁棍山药 (*D. opposita* Thunb. cv. Tiegun)、淮山药 (*D.*

*opposita*)、叉蕊薯蓣 (*D. colletii* HK. f.)、参薯 (*D. alata* L.) 等中已有成功报道<sup>[6,9-11]</sup>,但甜薯中尚未见相关研究。本研究以甜薯为研究对象,通过不同外植体、不同激素种类与浓度处理等试验设计,筛选最佳试验条件,建立甜薯组织培养的最佳试验体系,以期为甜薯脱毒苗的产业化生产提供理论依据和实践指导,也为甜薯后续的开发与利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验中的外植体材料取自南京中山植物园,采集时间为6月中旬,选取生长健壮、无病虫害的植株,将枝蔓上部3~5 cm的嫩茎或约1 cm的茎尖取下,先用自来水冲洗,然后泡在无菌水中备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体的制备 在超净工作台上,先将外植体用75%乙醇消毒10~15 s,然后用0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液浸泡3~5 min,最后用无菌水冲洗3~5次。将消毒后的茎尖、单节茎段分别切成0.5、1 cm左右的长度,以备后续使用。

1.2.2 诱导培养 茎尖芽诱导:以MS基本培养基[蔗糖30 g/L、琼脂10 g/L、pH值5.8、0.1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)]附加不同浓度NAA(萘乙酸)、6-BA(6-苄氨基嘌呤)和KT(激动素),共设5个处理,每个处理3个重复(表1),每个处理10瓶,每瓶接种3个。30 d后统计结果。

丛生芽繁殖系数 = 诱导芽总数/茎尖萌发数。

收稿日期:2019-07-12

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20160602, BK20180316)。

作者简介:吴凡(1994—),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事植物学研究。E-mail:245089200@qq.com。

表 1 不同激素处理对茎尖多芽体诱导的影响				
处理	激素浓度 (mg/L)			繁殖系数
	6-BA	NAA	KT	
1	0.0	0.1	1.0	1.5
2	0.0	0.1	2.0	5.0
3	0.0	0.5	2.0	1.2
4	0.5	0.0	0.5	3.2
5	1.0	0.0	0.5	1.4

单节茎段芽诱导:以 MS 基本培养基[蔗糖 30 g/L、琼脂 10 g/L,pH 值 5.8、0.1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)]附加不同浓度 AD(腺嘌呤)、NAA(萘乙酸)、KT(激动素),共设 7 个处理,每个处理 3 个重复(表 2),每个重复 10 瓶,每瓶接种 3 个。30 d 后统计结果。

单节茎段诱导率 = 形成不定芽数/接种的外植体总数 × 100%。

表 2 不同激素浓度对单节茎段芽诱导的影响				
处理	激素浓度 (mg/L)			诱导率 (%)
	AD	NAA	KT	
1	0.0	1.0	2.0	20.00
2	0.0	0.1	2.0	30.00
3	0.0	0.1	1.0	56.67
4	0.0	0.5	2.0	40.00
5	0.5	0.0	0.0	46.67
6	0.8	0.0	0.0	80.00
7	1.0	0.0	0.0	70.00

1.2.3 继代增殖培养 选取生长健壮、无玻璃化的再生苗的茎尖和带腋芽茎段进行继代增殖。继代增殖培养基在诱导培养基的基础上适当调整,附加不同浓度 NAA 和 KT,共设 3 个处理,每个处理 3 个重复(表 3)。

增殖倍数 = 发芽外植体数/接种外植体总数。

1.2.4 生根培养 芽苗长到 2~3 cm 时,选取生长健壮的无根苗接种于生根培养基中诱导生根,30 d 后统计组培苗生根率。

生根培养基采用 1/2 MS 培养基,附加不同浓度的 NAA(0.5、1.0、0.2 mg/L)或 IBA(0.5、1.0、2.0 mg/L),共设 4 个处理,每个处理 3 个重复。

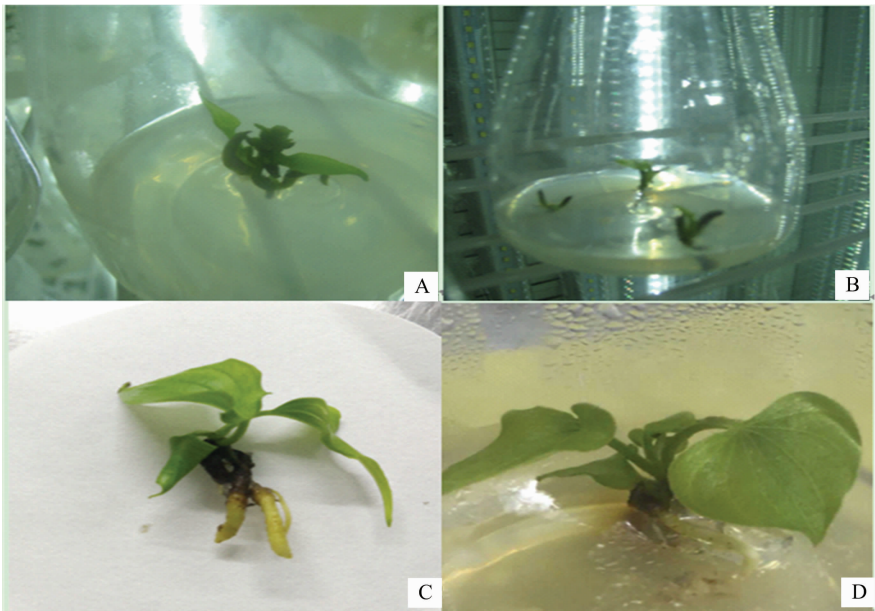
生根率 = 生根苗总数/接种的无根苗总数 × 100%。

1.2.5 培养条件 以上试验均在温度(25 ± 2)℃、光照 16 h、光照度 2 000 lx 的条件下进行。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理茎尖芽诱导情况

在添加不同浓度 NAA、6-BA 和 KT 的培养基上进行甜薯茎尖组培苗试验,结果见表 1。结果表明,激素的 6 种浓度组合处理均可诱导出芽(图 1-A),但从生芽的繁殖系数在不同处理间差异很大,其中处理 2 繁殖系数最高,为 5.0。观察发现,处理 2 开始出芽的时间也较其他处理短,约为 3 周。因此,NAA 0.1 mg/L + KT 2.0 mg/L 的激素配比是茎尖诱导出芽的最适条件。



A—茎尖出芽;B—茎段出芽;C、D—组培苗生根  
图1 甜薯试管苗初代培养及其根诱导过程中外植体形态的变化情况

2.2 不同激素处理单节茎段芽诱导

在添加不同浓度 AD、NAA 和 KT 的培养基上进行甜薯单节茎段组培苗培养,结果见表 2。结果表明,激素的 6 种浓度组合处理均可诱导出芽(图 1-B),其中处理 6 的诱导率最高,且在诱导过程中发现,当芽苗长出后会继续长叶生根,这可能是由于培养基中激素被消耗后浓度降低,适合生根需求。因此,单节茎段诱导出芽的最适激素浓度是 AD 0.8 mg/L。

2.3 继代培养诱导出不定芽

将诱导出的不定芽分别接种到含有不同浓度 NAA 和 KT 的 1~3 号培养基中,结果(表 3)表明,在 3 号培养基中的芽苗既有增殖生长又有伸长生长,增殖倍数高,培养 30 d 可达 4.8,且芽苗长势旺盛。在 1 号培养基中芽苗伸长生长明显,芽体粗壮,但增殖倍数较低。在 2 号培养基中长势较好,芽苗增殖倍数较高,但新芽细小。因此,NAA 0.5 mg/L +

KT 2.0 mg/L 是最适合甜薯组培苗增殖培养的激素浓度组合。

表 3 不同浓度 NAA 与 KT 组合对甜薯继代增殖的影响

培养基 编号	激素浓度(mg/L)		增殖倍数	生长状况
	NAA	KT		
1	0.1	1.0	2.1	芽较少,节间短,芽苗粗壮
2	0.1	2.0	3.2	芽较少,但细小,芽苗长势较好
3	0.5	2.0	4.8	芽较多,节间短,芽苗长势较好

2.4 不同激素处理组培苗生根的影响

在不同浓度 AD 培养基上进行甜薯组培苗的生根培养,结果(表 4)表明,3 个培养基都可以诱导根产生(图 1-C、图 1-D),其中 2 号培养基的生根率最高,为 95%,且生根所需时间最短,仅需 2 周。此外,综合评价生根数量及质量,2 号培养基均优于其他 2 个培养基。因此,IBA 2.0 mg/L 是最适合甜薯组培苗生根培养的激素浓度。

表 4 组培苗诱导生根试验结果

培养基编号	激素浓度(mg/L)		主根数 (条)	生根率 (%)	根的状态
	NAA	IBA			
1	0.0	1.0	1	50.0	生长慢,主根细弱且短,侧根少
2	0.0	2.0	2	95.0	生长快,主根多且粗壮,侧根多
3	0.5	0.5	1	80.0	生长慢,主根短且细,侧根少

3 讨论与结论

要想建成甜薯组织培养的最佳试验体系,取材是构建甜薯组织培养最佳试验体系的关键环节,对组培苗培养成败有很大影响<sup>[8]</sup>。本试验以茎尖和单节茎段为外植体,均能诱导出芽,因外植体来源不同,各外植体诱导率与芽的状态有明显区别,而通过节段发生途径可以直接诱导出芽,最初为绿色芽点,很快就伸展并长出小叶片,可以继代增殖,而且所需时间比茎尖诱导出芽短,由此判定甜薯组织培养的最佳外植体是节段。此外,同一器官的不同部位以及不同取材时间也是影响组织培养效果的重要因素<sup>[12]</sup>。幼嫩的外植体容易出芽,而越老的外植体越容易褐化,并且越难出芽生长。众多研究报道,外植体直接诱导出芽是组培快繁技术的重要选择之一<sup>[13-14]</sup>,而且通过愈伤长期的继代分化,可能会使细胞染色体结构发生变异,细胞的形态发生能力下降甚至丧失。通过茎尖和单节茎段出芽,其芽和分生组织培养不像愈伤组织和悬浮细胞培养那样容易发生变异,这种方法产生的克隆植株表现出

高度的一致性,且遗传性状稳定,开辟了加速优良品种大量繁殖的途径<sup>[15]</sup>。

组培苗生根对于生产十分重要,但由于甜薯生根率并不高,在笔者筛选出的培养条件下的生根率很高,有利于高效地生产繁殖。虽然没有经过诱导愈伤途径诱导甜薯植株再生,但笔者已经摸索出其最佳的快速繁殖体系,将有助于甜薯脱毒苗的产业化生产。

参考文献:

[1] Ding Z C, Michael G G. Dioscoreaceae[M]. Beijing: Science Press, 2000: 276-296.  
[2] 黎 丹, 吴文婧, 黄东益, 等. 毛薯的营养成分分析和聚类分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(3): 167-172.  
[3] 王弗能, 王天云, 汪飞杰. 海南岛大薯、毛薯等资源考察初报[J]. 作物品种资源, 1991(2): 8-9.  
[4] 余文慧, 张富仙, 邵晓伟. 浙西地区特色旱粮毛薯的生长动态[J]. 浙江农业科学, 2015(6): 826.  
[5] 崔茂坤. 毛薯(山药)的高产栽培[J]. 云南农业科技, 1986(3): 37-38.  
[6] 韩晓勇, 闫瑞霞, 殷剑美, 等. 铁棍山药组织培养快繁及试管珠芽离体再生体系研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 2120-

却志群,黄贵忠,沈春修. 东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS3.3* 候选基因 *LOC\_Os03g54970* 冷胁迫下荧光定量表达分析及克隆[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):39-44.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.009

# 东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS3.3* 候选基因 *LOC\_Os03g54970* 冷胁迫下荧光定量表达分析及克隆

却志群,黄贵忠,沈春修

(宜春学院生命科学与资源环境学院/江西省作物生长发育调控重点实验室,江西宜春 336000)

**摘要:**为了验证东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS3.3* 的功能,结合笔者所在课题组前期完成的转录组分析数据,将落在 *qCTS3.3* QTL 2 个最近侧翼分子标记 MK149624 和 MK137032 之间区域的差异表达基因 *LOC\_Os03g54970-DX* 作为 *qCTS3.3* 的候选基因,并通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)对不同低温处理时间长度该基因在东乡野生稻叶片中的表达水平进行了相对定量分析,结果表明,该基因在低温胁迫处理前后表达量呈现出低—高一低—高的变化趋势,随后,参照测序水稻品种日本晴对应的该基因位点的序列信息设计引物,通过 RT-PCR 技术从东乡野生稻中成功扩增到了 *LOC\_Os03g54970-DX* 基因的全长 cDNA,构建了该基因位点的过表达载体。测序分析结果表明,东乡野生稻中的 *LOC\_Os03g54970-DX* 基因序列与日本晴中的对应位点序列完全一致,进一步利用农杆菌介导法,将东乡野生稻中的 *LOC\_Os03g54970-DX* 的过表达载体转入水稻受体品种 TP309,最终获得了 48 株转基因植株,研究结果为下一步研究东乡野生稻 *LOC\_Os03g54970-DX* 基因位点在冷胁迫作用条件下的功能机制奠定了材料基础。

**关键词:**东乡野生稻;RT-PCR;荧光定量;QTL

**中图分类号:**S511.901 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)12-0039-06

冷害(倒春寒和寒露风)是水稻生产遇到的一个普遍问题,我国每年因低温冷害损失稻谷 30 ~ 50 亿 kg<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着我国土地流转政策的实施、城镇化进程的加快以及农村劳动力的转移,在

农业机械化和轻简栽培技术背景下,直播技术以及免耕加直播技术逐渐被推广,对水稻品种的耐寒性提出了更高的要求,迫切需要强抗寒的水稻品种。如何提高水稻抗寒性已成为全国水稻科研工作者普遍关注的问题,而提高水稻抗寒能力最有效的方法就是挖掘和利用水稻自身耐冷基因<sup>[3]</sup>。

东乡野生稻(*Dongxiang Oryza rufipogon* Griff.)属于普通野生稻的一种,原生地位于江西省抚州市东乡县(28°14'N,116°36'E),是目前为止发现的起源地分布位置最靠北的野生稻。东乡野生稻的地

收稿日期:2019-06-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660379);江西省教育厅科学技术研究项目(编号:GJJ180845);江西省作物生长发育调控重点实验室开放课题项目(编号:KFJJ201804);江西省作物生长发育调控重点实验室开放课题项目(编号:KFJJ201802)。

作者简介:却志群(1980—),女,湖北仙桃人,硕士,讲师,主要从事水稻抗逆性研究。E-mail:zhiquanque@163.com。

2125.

[7]Barz W, Reinhar E, Zenk. Plant tissue culture and its bio-technological application [M]. Berlin: Sprinser - Verlag Berlin Heidelberg,1977:277-343.

[8]Chaudhury A, Qu R D. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass; effect of 6-benzyladenine in callus induction medium[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2000,60(2):113-120.

[9]李明军,杨建伟,张嘉宝,等. 怀山药的茎段培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):275-276.

[10]夏 赞,谭文丽,陈银华,等. 参薯组织培养快繁技术[J]. 热带

生物学报,2012,3(3):271-275.

[11]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,1998,8(1):18-26.

[12]李明军. 怀山药茎段愈伤组织的诱导与多芽体的形成[J]. 华北农学报,2000,15(2):85-87.

[13]陈艳莉,刘艳萌,张学英. 薯蓣茎段组织培养的研究[J]. 长江蔬菜,2008(10):32-34.

[14]林贵美,牟海飞,李 邦,等. 菊叶薯蓣茎段组织培养研究[J]. 广西农业科学,2006,37(6):710-712.

[15]郑晓琴,梁国鲁. 薯蓣的快速繁殖及零余子的离体诱导[J]. 西南园艺,2003(2):20-21.