

李丽红, 华树妹, 陈芝华, 等. 清流雪薯组培复壮技术[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(19): 151–155.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.033

# 清流雪薯组培复壮技术

李丽红, 华树妹, 陈芝华, 李 清, 张杨文, 邓才生

(三明市农业科学研究院, 福建三明 365051)

**摘要:**以清流雪薯有节茎段为外植体, 通过对诱导、增殖、生根及移栽影响因子的研究, 初步建立清流雪薯的组培复壮技术体系。结果表明, 初代培养中, 上部茎段用 70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞 5 min, 中下部茎段用 70% 乙醇 30 s + 0.1% 氯化汞 9 min 消毒效果最佳; 有节茎段的诱导培养以 MS + 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA + 30.0 g/L 蔗糖 + 4.5 g/L 琼脂 + 0.3 g/L 活性炭效果最佳, 萌芽率达 88.0%; 增殖最适培养基为 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L AD + 30.0 g/L 蔗糖 + 4.5 g/L 琼脂, 增殖系数为 3.03; 最适生根培养基为 1/2MS + 0.3 mg/L NAA + 0.2 mg/L IAA + 20.0 g/L 蔗糖 + 4.5 g/L 琼脂 + 0.5 g/L 活性炭, 生根率达 97%; 炼苗后, 移入进口泥炭: 珍珠岩 = 2:1 的基质中, 成活率达 100%。

**关键词:**山药; 组培; 复壮; 清流雪薯

**中图分类号:** S632.104+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)19-0151-05

山药学名薯蓣, 为薯蓣科薯蓣属一年生或多年生草质藤本植物, 是我国传统的药食同源植物, 主要食用部位为地下部肥大的肉质块茎, 具有健脾、补肺、固肾、除湿、益精补气的功效<sup>[1]</sup>。山药为无性繁殖植物, 长期无性繁殖加上人们对留种种薯选择或贮藏不当等原因, 导致山药出现病害加重、产量降低、品质下降、种性退化等现象。李明军等研究认为, 病毒病是造成怀山药种性退化、产量降低的重要原因, 并围绕怀山药脱毒快繁开展了许多研究工作<sup>[2]</sup>。福建地区山药病毒病较少, 品种退化主要表现为产量降低, 山药薯皮黑斑逐年增多, 尤其在当地山药主产区问题尤为突出, 严重的病害黑斑可深入薯肉 0.5~1.0 cm, 能极大地影响山药的商品性, 农民只能将山药削皮出售, 这不仅增加了劳动成本, 降低了收益, 同时也限制了山药的对外销售, 对当地山药产业发展造成严重影响。

清流雪薯是福建省清流县首个获农业农村部评审认证的国家级地理标志产品, 该山药品种具有个体较粗大、浑圆、均匀, 薯体坚实, 切口少黏液, 不易褐变, 耐贮藏等优点, 而且薯质粉性足、细腻、雪白、味鲜, 深受人们的喜爱, 但近年来该品种退化现象严重, 亟需解决。目前, 山药生产上主要采用零余子繁殖的方式进行品种复壮, 清流雪薯为褐苞薯蓣类型, 在福建地区并不结实零余子, 无法通过零余子进行复壮。

本试验通过组织培养技术复壮该品种, 使其优良品种种性得以保存延续。褐苞薯蓣类型山药, 组培快繁较其他类型的山药品种更难, 笔者所在课题组从 2011 年开始一直致力于褐苞薯蓣类型山药的组培复壮技术研究, 现已在组培、移栽等多方面取得较大进展, 并在生产上取得一定的应用成效, 现就清流雪薯的组培复壮技术进行报道, 为该品种的复壮及组培苗工厂化生产提供理论依据与技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料由福建省三明市农业科学院提供,

收稿日期: 2019-12-11

基金项目: 福建省引导性项目(编号: 2017N0051, 2018N02020275)。

作者简介: 李丽红(1980—), 女, 河南焦作人, 硕士, 助理研究员, 主要从事山药种质资源遗传育种研究。E-mail: red7603@163.com。

[12] Barr J, White W S, Chen L, et al. The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit[J]. Plant Cell and Environment, 2004, 27(7): 840–852.

[13] 高 静, 梁银丽, 贺丽娜, 等. 水肥交互作用对黄土高原南瓜光合特性及其产量的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5):

250–255.

[14] 蔡焕杰, 邵光成, 张振华. 荒漠气候区膜下滴灌棉花需水量和灌溉制度的试验研究[J]. 水利学报, 2002, 33(11): 119–123.

[15] 虞 娜, 张玉龙, 黄 毅, 等. 温室滴灌施肥条件下水肥耦合对番茄产量影响的研究[J]. 土壤通报, 2003, 34(3): 179–183.

2018 年 3 月中下旬,种植健康无病虫危害的清流雪薯,切段种植于三明市农业科学院大棚内,待到山药藤蔓生长旺盛期,剪取上部约 30 cm 藤蔓作为外植体材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒与诱导培养基筛选 将藤蔓用剪刀去掉叶片,将其分为上部(顶端 5~8 cm)和中下部 2 个部分,并剪成长度为 1.5 cm 左右带节间的茎段,分别放在不同的容器中,置于超净工作台上。首先对茎段进行表面杀菌,分别倒入 70% 乙醇轻轻晃动 15、30 s,用无菌水冲洗 2~3 次,然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒剂进行深层灭菌,两者设置不同的时间处理(3、5、6、7 min 和 7、8、10、12 min),期间不断摇动,最后用无菌水冲洗 5~6 次。将消毒处理后的有节茎段接种于 MS + KT (激动素, 0.5、1.0、1.5 mg/L) + 0.1 mg/L NAA(萘乙酸)和 MS + 6-BA (细胞分裂素,0.5、1.0、1.5 mg/L) + 0.1 mg/L NAA 诱导培养基上。每瓶接种 1 个茎段,每个处理接种 20 瓶,重复 2 次,之后每周统计 1 次污染率。一般 10 d 后,在茎段叶腋处出现萌芽,30 d 统计萌芽率。

1.2.2 培养基配方 诱导和增殖培养均以 MS 为基本培养基,添加蔗糖 30 g/L、琼脂粉 4.5 g/L 以及不同类型和浓度的激素组合(表 2、表 3),诱导培养基添加 0.3 g/L 活性炭,pH 值调至 6.0,增殖培养基不添加活性炭。生根培养基则以 1/2MS 为基本培养基,添加蔗糖 20 g/L、琼脂粉 4.5 g/L、活性炭 0.5 g/L 以及不同浓度的生长素(表 4),pH 值调至 5.8。配制分装后于 121 ℃ 条件下灭菌 20 min。

1.2.3 培养条件 培养温度为(25±2)℃,光照度 1 500 lx,每日光照 14 h。

1.3 数据处理

采用 Excel 2010 和 DPS 软件中的 LSD 方法进行数据处理和方差分析,各指标计算公式:污染率=污染苗数/接种苗数×100%;腋芽诱导率=腋芽萌发数/接种外植体总数×100%;增殖系数=切出有效芽总数/接种芽数×100%;生根率=生根苗数/接种苗数×100%。

2 结果与分析

2.1 消毒时间对外植体消毒效果的影响

由表 1 中数据可以看出,随着氯化汞消毒时间的延长,无论上部还是中下部的茎段污染率均呈下降趋势。上部茎段在 70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞

5 min 与 70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞 4 min 2 个处理间污染率差异达极显著水平,70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞 5 min 与 70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞 6 min、70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞 7 min 处理之间污染率差异未达到显著水平,但消毒处理 70% 乙醇 15S + 0.1% 氯化汞 5 min 萌芽率最高,与其他几个处理之间差异显著,尤其当上部茎段消毒处理时间为 7 min 时,茎段褐化加重,萌芽率与处理时间为 5、6 min 相比极显著降低,故上部茎段最适宜的消毒时间为 70% 乙醇 15 s + 0.1% 氯化汞 5 min。中下部茎段不同消毒时间处理之间污染率差异均达到显著水平,说明随着消毒时间的延长,污染率呈显著下降趋势,但萌芽率以 70% 乙醇 30 s + 0.1% 氯化汞 9 min 消毒处理时最高,并与其他几个处理差异达显著水平,故中下部茎段最佳消毒时间为 70% 乙醇 30 s + 0.1% 氯化汞 9 min。总体看,上部茎段较中下部茎段更容易消毒,污染率低,但萌芽率也低;中下部茎段污染率高于上部茎段,但萌芽率高,这可能是中下部茎段较粗壮,芽体发育更成熟的原因。

表 1 不同消毒时间对外植体消毒效果的影响

消毒部位	消毒时间(min)		污染率 (%)	萌芽率 (%)
	70% 乙醇	0.1% 氯化汞		
上部茎段	0.25	4	35.0aA	53.3bAB
	0.25	5	11.7bB	73.3aA
	0.25	6	6.7bB	55.0bA
	0.25	7	3.3bB	33.3cB
中下部茎段	0.50	7	50.0aA	48.3bB
	0.50	8	43.3bA	51.7bB
	0.50	9	16.7cB	81.6aA
	0.50	10	8.3dB	41.7bB

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下表同。

2.2 不同浓度 KT、6-BA 和 NAA 组合对山药芽诱导的影响

将有节茎段插入不同浓度生长调节剂的初代培养基上,节基部靠近培养基,基部以上露于培养基外。一般 10 d 左右会在叶腋处萌出小芽,1 个月 后,生长好的可达 3 cm,具有 2~3 个节,差的仅萌发出 1 个芽点,这种芽点有的会慢慢长大,有的则会逐渐褐化,慢慢死亡。从表 2 可以看出,4 号、5 号、6 号培养基萌芽率极显著高于 1 号、2 号和 3 号培养基,也就是说 KT 不同水平处理极显著优于 6-BA 处理。KT 处理中又以 5 号培养基萌芽率最高,达

88.0%,与 4 号培养基和 6 号培养基差异极显著,且萌芽多为对生芽(图 1-A)。6-BA 处理中 1 号和 2 号培养基萌芽率差异未达到显著水平,分别为 52.3%和 51.3%。2 号与 3 号培养基萌芽率差异达极显著水平,说明 3 号培养基作为诱导培养基时效果最差。从茎段不同部位萌芽率来看,以茎蔓中下部的节段萌芽率高,茎蔓上部的茎段萌芽率低。不同培养基除萌芽率不同外,萌芽质量也存在较大差异,KT 诱导萌芽早,芽较健壮,萌芽成活率高,6-BA 诱导萌芽较晚,芽的质量较差,多为芽点,萌发后不再生长,成活率较低。因此,无论从萌芽率还是芽的长势看,均 1.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 处理最优。

表 2 不同植物生长调节剂组合对外植体腋芽诱导的影响

培养基 编号	激素种类及浓度(mg/L)		萌芽率 (%)
	细胞分裂素,浓度	生长素	
1	6-BA,0.5	NAA,0.1	52.3dD
2	6-BA,1.0	NAA,0.1	51.3dD
3	6-BA,1.5	NAA,0.1	33.4eE
4	KT,0.5	NAA,0.1	76.3bB
5	KT,1.0	NAA,0.1	88.0aA
6	KT,1.5	NAA,0.1	66.3cC

## 2.3 不同植物生长调节剂对山药增殖效果的影响

从表 3 可以看出,1 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 虽然诱导效果好,但用于增殖效果较差,主要表现为多数生根、植株生长健壮,叶色浓绿,但不增殖。将 KT 的浓度增加到 3 mg/L,仍不增殖,而在 1.0 mg/L KT 中在加入少量的 6-BA 即开始增殖,

说明山药继代培养时对 KT 不敏感,而对 6-BA 比较敏感。综合分析,增殖培养基最佳组合是 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2 mg/L AD(肾上腺髓质的主要激素),芽多,叶色浓绿,生长健壮,成苗率高(图 1-B)。

表 3 不同植物生长调节剂对山药组培苗增殖效果的影响

培养基 编号	激素种类(mg/L)				增殖系数	组培苗生长情况
	KT	6-BA	NAA	AD		
1	1	0	0.1	0	1.17eE	苗生长健壮、多数生根
2	3	0	0.1	0	1.20dD	苗高、节间长、叶片大
3	0	0.1	0.1	0	1.53dD	苗节间长、较细弱
4	0	0.5	0.1	2	3.03aA	芽多、健壮、生长较快
5	1	0.3	0.1	0	2.17cC	芽较少、生长较慢
6	0	0.3	0.1	1	2.47bB	芽较少、生长正常

## 2.4 不同植物生长调节剂对山药生根效果的影响

由表 4 可知,0.5 mg/L NAA+0.5 g/L 活性炭与 0.3 mg/L IBA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L 活性炭 2 个处理的生根率分别为 94%和 97%,两者之间差异达显著水平,未达到极显著水平。而 1.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 与其他 2 个处理之间差异达到极显著水平,生根率仅为 89%,说明除 1.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 处理外,其他 2 个处理均可作为生根培养基使用,但 0.3 mg/L IBA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L 活性炭的培养基生根条数及侧根更多、苗生长更健壮(图 1-C)。一般山药生根培养 10 d 左右根系开始生长,同时植株长高,叶片长大,35 d 左右即可根据根系及植株生长情况进行移栽种植。

表 4 不同植物生长调节剂对山药生根效果的影响

培养基编号	激素种类(mg/L)			生根率 (%)	根系生长情况
	IBA	NAA	KT		
1	0.3	0.2	0	97aA	根 3~5 条、侧根多、苗生长健壮
2	0	0.5	0	94bA	根 2~3 条、细长、侧根少、苗生长健壮
3	0	0.1	1.0	89cB	根 1~3 条、侧根少、生根时间长

注:IBA 为乙炔乙酸。

## 2.5 不同栽培基质对组培苗移栽成活率的影响

移栽前 2 周,将瓶苗搬至温室大棚内,放置 1 周,使其适应外界环境,如遇到气温较高时,需覆盖遮阳网,避免组培苗被灼伤。1 周后,打开瓶盖炼苗 1~2 d,再用镊子小心把苗夹取出来,用自来水将基部的培养基冲洗干净,并用多菌灵 800 倍液浸泡 5 min,然后移至穴盘种植。从表 5 可以看出,3 种基质中普通草炭土:细沙=2:1 时成活率略低,为

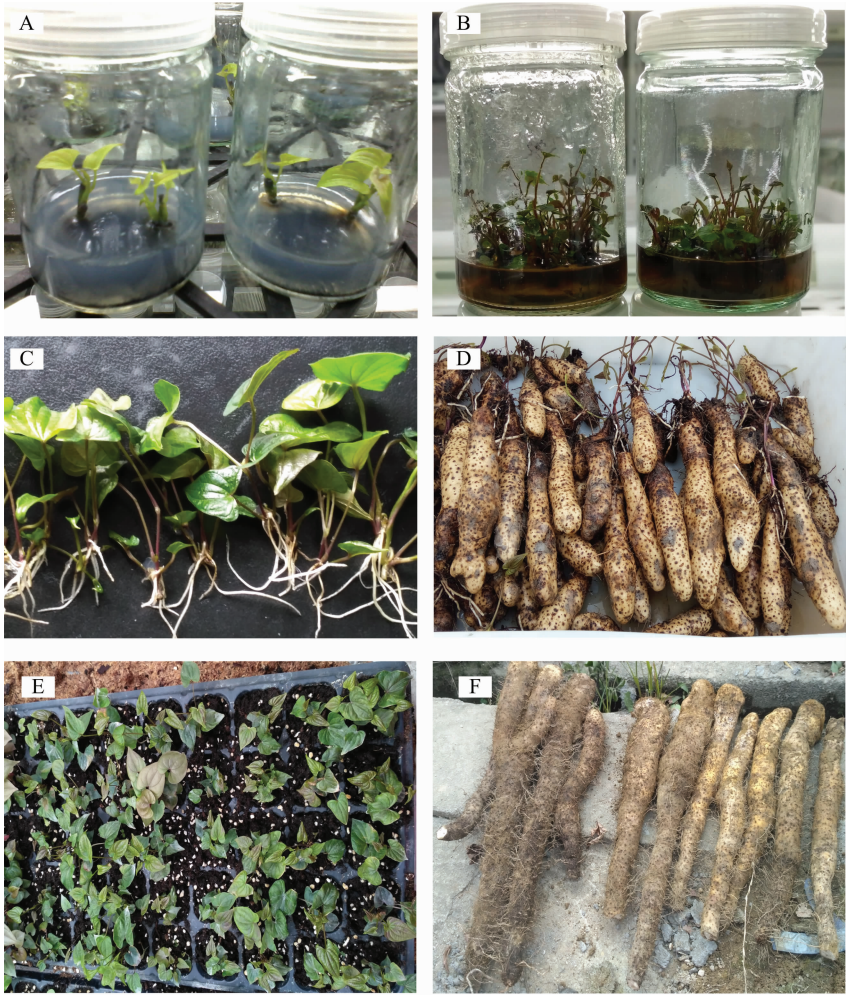
95%。进口泥炭土与珍珠岩(2:1)和进口泥炭土与细沙(2:1)配比成活率均为 100%,但由于珍珠岩透气性更好,进口泥炭土与珍珠岩(2:1)配比根系须根多,效果更好(图 1-E)。

## 3 结论与讨论

外植体消毒是诱导栽培的关键步骤,消毒时间的长短不但影响污染率,还直接关系外植体的褐化

表 5 不同栽培基质对山药组培苗移栽成活率的影响

栽培基质	移栽株数 (株)	成活株数 (株)	成活率 (%)	生长情况
普通草炭土:细沙=2:1	80	76	95	根系较细,生长势差
进口泥炭土:细沙=2:1	80	80	100	根系较粗,长势较好
进口泥炭土:珍珠岩=2:1	80	80	100	根系须根多,长势好



A—诱导萌发的新芽; B—继代增殖; C—生根培养; D—第 2 年春季收获的组培苗 1 代种薯; E—移栽成活组培苗; F—清流雪薯复壮前后对比照

图1 清流雪薯组培

率及萌芽率。本研究中,随着氯化汞消毒时间的延长,污染率减少,但褐化程度加重,从而影响萌芽率。中下部茎段发芽率明显高于上部茎段,因此,清流雪薯组培最适宜选用植株中下部茎段,70%乙醇 30 s + 0.1% 氯化汞 9 min 或者根据材料不同部位做适当调整,同时考虑取材时期,这样更有利于提高萌芽率。但也有研究认为,山药顶端 10 cm 幼嫩茎段表面光滑、易消毒,更适合作外植体使用<sup>[3]</sup>。

本试验中 KT 诱导整体好于用 6-BA 诱导,清流雪薯用 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA 的激素组

合最适宜山药芽体的诱导,不仅芽体诱导形成的时间短,且形成的芽体饱满有活性,可直接长成健康植株。但 KT 用于增殖效果不好,表现为叶片生长,生根,植株较大,但几乎不长新芽,增殖系数很低。本试验中清流雪薯适宜芽体增殖的最佳培养基激素组合为 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L AD,这与前人研究结果<sup>[4-8]</sup>不同,这可能与山药不同类型及品种有关,因此,在进行山药组培苗生产时,应针对不同品种筛选出适宜的激素类型和浓度。本研究还发现,添加 AD 有利于山药组

培苗的生长,具体原因还有待进一步研究。

褐化是山药组培过程中存在的普遍现象,也是限制一些山药品种开展组培研究工作的重要因素。黄玉吉等研究表明,添加 2.0 mg/L 活性炭及 100 mg/L 抗坏血酸,山药茎段基本不褐变,出芽率高<sup>[9]</sup>。刘金英等研究表明,添加 AC、VC 和 PVP 等抗氧化剂,仅有 AC 能有效地抑制褐变,但 AC 对试管苗生长有较大的影响<sup>[4]</sup>。本试验研究发现,在诱导阶段添加 AC 有助于减轻褐化,促进萌芽和生长,但在增殖阶段添加 AC 的组培苗则以生根和茎叶生长为主,影响增殖率,研究结果和刘金英等的报道结果有相似之处。

组培苗的移栽成活率是关系组培苗能否在生产中推广应用的关键<sup>[10]</sup>,山药组培苗移栽成活率的高低除与品种、移栽基质有关外,移栽种植的大棚环境也至关重要。本试验初期在简易大棚中种植,加上南方春季气温变化无常,移栽成活率受天气影响较大,成活率较低。温度低,组培苗生根慢、易霉烂;温度高,组培苗叶片易萎蔫枯死,不但移栽成活率低,且成活的苗因受损严重,质量较差,后期需要较长时间缓苗,收获的一级种薯产量低。通过对比试验发现,采用进口泥炭与珍珠岩混合基质(比例为 2:1)在可温控的大棚内移栽,组培苗的成活率可以大大提高,加上适宜的管理,基本可以达到 95% 以上。此外,组培苗收获的一级种薯大小差异较大,大的块茎可达 200 g,和普通薯块种植的大小差不多,小的仅有 20 g 左右,这种差异与组培苗质

量、组培苗成活率及后期田间管理有直接关系,同时也可以看出组培苗一级种薯的产量还有很大的提升空间。经组培复壮后的种薯田间长势优于未组培的种薯,表现为植株地上部生长势强、分枝较多、枝叶繁茂、抗病能力增强。一级种薯第 2 年种植产量与对照相比,产量可提高 20% 左右,薯皮颜色鲜黄(图 1-F),薯肉质地更紧实。

#### 参考文献:

- [1] 贡树铭. 药食同源的枸杞和山药[J]. 医古文知识, 2000(3): 16-17.
- [2] 李明军, 张峰, 陈明霞, 等. 怀山药病毒病的研究[J]. 中草药, 2003, 34(11): 3-5.
- [3] 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.
- [4] 刘金英, 徐有明, 李双来, 等. 佛手山药组织培养的研究[J]. 植物研究, 2006, 26(3): 323-328.
- [5] 张晓丽, 王医鹏, 刘雯, 等. 铁棍山药试管苗快繁培养基的优化[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2013, 41(2): 123-126.
- [6] 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): 85-88.
- [7] 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.
- [8] 严华兵, 龚明霞, 董伟清, 等. 山薯组培苗继代培养基配方筛选[J]. 广西农业科学, 2010, 41(8): 758-761.
- [9] 黄玉吉, 陈菁瑛, 万学锋, 等. 山药组织培养研究[C]//全国第 8 届天然药物资源学术研讨会, 2008: 224-227.
- [10] 杜尚广. 脚板薯的组织培养与快速繁殖研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(6): 39-42.

(上接第 144 页)

方便存储,没有食品安全隐患<sup>[12]</sup>,本试验表明其对梨花粉萌发和花粉管生长有明显的促进作用,是替换硝酸钙的优化选择。

#### 参考文献:

- [1] 王兆龙, 王义菊, 姜福东, 等. 梨不同授粉措施的研究进展[J]. 烟台果树, 2019, 146(2): 3-4.
- [2] 齐开杰, 陶书田, 吴巨友, 等. 梨树省力化液体授粉技术[J]. 中国南方果树, 2017, 46(3): 168-169.
- [3] 魏树伟, 冉昆, 王宏伟, 等. 液体授粉技术对梨坐果和果实品质的影响[J]. 落叶果树, 2017, 49(5): 16-17.
- [4] 盛仙永, 胡正海.  $\text{Ca}^{2+}$ 、pH 在花粉及萌发花粉管生长中的作用研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(1): 194-199.
- [5] 柴梦颖, 李秀根, 张绍铃. 梨授粉受精影响因素研究进展[J]. 中国果树, 2005(5): 51-53.
- [6] Blevins D G, Lukaszewski K M. Boron in plant structure and function[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49: 481-500.
- [7] 张绍铃, 陈迪新, 康琅, 等. 培养基组分及 pH 值对梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 225-230.
- [8] 王鹏, 曹鹏, 齐开杰, 等. 水质对梨树液体授粉的花粉萌发率的影响[J]. 中国南方果树, 2018, 47(2): 145-147.
- [9] Messerli M, Smith P J, Lewis R C, et al. Chloride fluxes in lily pollen tubes: a critical reevaluation[J]. The Plant Journal, 2004, 40(5): 799-812.
- [10] Breygina M A, Matveeva N P, Ermakov I P. The role of  $\text{Cl}^-$  in pollen germination and tube growth[J]. Russian Journal of Developmental Biology, 2009, 40(3): 157-164.
- [11] Hirsche J, García Fernández J M, Stabentheiner E, et al. Differential effects of carbohydrates on arabidopsis pollen germination[J]. Plant & Cell Physiology, 2017, 58(4): 691-701.
- [12] 食品添加剂 葡萄糖酸钙: GB 15571—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.