

墨西哥菊叶薯蓣茎段再生繁殖技术

黄 健¹, 陈新荣², 吴万兴¹, 张忠良¹

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西双版纳生茂科技公司, 云南 景洪 666100)

【摘 要】 【目的】建立高效稳定的菊叶薯蓣组织培养快繁体系, 以保持品种的遗传稳定性。【方法】分别以室内和田间培育的墨西哥菊叶薯蓣藤茎段为外植体起始材料, 比较依次用 0.55% 次氯酸钠、体积分数 70% 酒精和 1.0 g/L HgCl₂ 消毒不同时间对外植体的消毒效果, 并通过不同植物生长调节剂及其浓度组合筛选适合菊叶薯蓣组培快繁的茎段不顶芽诱导培养基、继代培养基和生根培养基。【结果】以室内培养的墨西哥菊叶薯蓣藤茎为起始材料, 依次用 0.55% 次氯酸钠消毒 5 min, 体积分数 70% 酒精消毒 1 min, 1.0 g/L HgCl₂ 消毒 8 min, 最后用无菌水清洗 3 次, 获得材料的污染率可控制在 5%; 筛选出茎段不定芽诱导培养基为 MS+3.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA, 不定芽诱导数可达 4.3 个, 诱导率达 95%, 且不定芽质量较好; 将分化的不定芽转至 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IBA 继代培养基, 单茎芽增殖率可达到 3.5; 茎芽在 1/2 MS+1.0 mg/L IBA 生根培养基上可以诱导出良好的根系。【结论】按上述方法培育的菊叶薯蓣生根试管苗炼苗后, 移栽至珍珠岩+粗沙+田园土按体积比 2:1:1 配置的介质中, 移栽成活率可以达到 85% 以上, 表明所建立的墨西哥菊叶薯蓣组培快繁体系是可行的。

【关键词】 菊叶薯蓣; 组织培养; 茎段

【中图分类号】 S632.104⁺.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)06-0126-05

Adventitious shoot regeneration from nodal segments of *Dioscorea composite*

HUANG Jian¹, CHEN Xin-rong², WU Wan-xing¹, ZHANG Zhong-liang¹

(1 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Company of Shengmao-Tech Xishuangbanna, Jinhong, Yunnan 666100, China)

Abstract: 【Objective】 A rapid micropropagation method of *Dioscorea composite* was constructed through tissue culture to keep the stability of heredity. 【Method】 Room-cultured and field-cultured tender vines were selected as start materials. Different time and concentration's combinations among 0.55% sodium hypochlorite (V/V), 70% ethanol, 1.0 g/L HgCl₂ were carried out. The different type and concentration of plant growth regulators was also tried, then the regeneration medium, elongation medium, propagation medium were determined. 【Result】 The tender vines from the plants cultivated in room was suitable for explants establishment, the percentage of contamination was under 5% using the sterile method (0.55% sodium hypochlorite (V/V) 5 min, volume fraction of 70% ethanol 1 min, 1.0 g/L HgCl₂ 8 min, three steps were carried out in consequence). The best induction medium was the MS basal medium supplemented with 3.0 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA, the highest shoot induction rate reached 4.3 shoots per explant, the shoot induced by BA was of good quality in height and status. The adventitious shoots can be propagated on the MS basal medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.2 mg/L IBA, then roots can be induced

【收稿日期】 2007-06-15

【基金项目】 国家林业局“948”引进项目(2002-30)

【作者简介】 黄 健(1978—), 男, 安徽肥东人, 助理研究员, 硕士, 主要从事林木生物技术研究。

【通讯作者】 吴万兴(1956—), 男, 陕西旬阳人, 高级工程师, 主要从事经济林与经济植物研究。E-mail: wuwanxing@126.com

on the 1/2MS basal medium, containing 1.0 mg/L IBA. All of these above presented showed that the protocol can be used as a good method for *Dioscorea composite* rapid multiplication in large scale. 【Conclusion】 Using the above method, rooted plantlets were transferred to plastic pots containing medium composed of autoclaved pearlite-coarse sand-soil (2/1/1), the survival rate was over 85%. The research showed that the protocol developed for *in vitro* regeneration of nodal segments of *Dioscorea composite* was feasible.

Key words: *Dioscorea composite*; tissue culture; nodal segment

菊叶薯蓣(*Dioscorea composite* Hemsl)为薯蓣科(*Dioscoreaceae*)薯蓣属植物,原产墨西哥,是用于生产薯蓣皂素(*diosgenin*)的重要植物原料。菊叶薯蓣相对于目前国内主栽的盾叶薯蓣(*Dioscorea Zingibervensis*)、穿龙薯蓣(*D. nipponica*)和小花薯蓣(*Dioscorea parviflora*)而言,具有产量高、栽培性状好等优点,最重要的是块茎中薯蓣皂素含量高,单株含量最高可达 13%^[1-3]。随着对薯蓣皂素及其相关产品需求的日益增长,传统的栽培品种和繁殖模式已经难以满足加工产业快速发展的需要。为此,本课题组将墨西哥菊叶薯蓣引种至陕南地区,并进行了组织培养快速繁殖技术研究,以加快菊叶薯蓣的栽植推广。

传统的种子繁殖方式易造成薯蓣科植物单株之间块茎皂素含量变异程度加大,难以将品系的优点稳定保持,而组培快繁技术可以从一定程度上克服此类问题^[4]。对薯蓣科其他种组织培养方法的研究开展相对较早^[5],近几年来,有关菊叶薯蓣组织培养方面的研究国内外也有相继报道,如 Viana 等^[6]采用体细胞胚再生方式来快速克隆繁殖, Sedigh 等^[7]利用菊叶薯蓣藤茎茎断离体诱导微块茎发生的方式来繁殖,何惠英等^[8]、陈丽华等^[9]通过诱导幼嫩藤茎愈伤组织的途径建立再生体系,李国林等^[10]、唐德英等^[11]、林贵美等^[12]、黄凤翔等^[13]通过茎断腋芽增殖的方式建立菊叶薯蓣快繁体系,但诱导再生苗时间较长和增殖效率不高仍是目前研究中存在的主要问题。本研究拟采用菊叶薯蓣的藤茎茎段作为外植体材料,建立高频再生体系,探索菊叶薯蓣高效组培快繁技术,以期为菊叶薯蓣外源基因遗传改良研究和细胞工程技术的开展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所用墨西哥菊叶薯蓣种球均引自墨西哥,分别以室内盆栽和田间栽培的菊叶薯蓣幼嫩藤茎为试材。室内菊叶薯蓣盆栽苗的培养方法为:将 2 年生菊叶薯蓣块茎冲洗干净后置于营养钵中,在光照

培养间内培养,待藤茎抽生至 30 cm 以上时,取幼嫩藤茎为试材。田间材料取自西北农林科技大学林学院安康试验站当年抽生的 3 月龄墨西哥菊叶薯蓣幼苗,挖取生长健壮、无病虫害的植株带回实验室,剪取藤蔓顶端约 15 cm 的嫩茎备用。

1.2 外植体消毒

取室内和田间菊叶薯蓣新生藤茎,剪去叶片,置于流水下冲洗 1 h。将冲洗好的材料置于超净台上,依次用 0.55% 次氯酸钠、体积分数 70% 酒精和 1.0 g/L HgCl_2 消毒不同时间,最后用灭菌水冲洗 3 次。以 MS 培养基为基本培养基,每个处理接种 10 瓶,每瓶接种 1 个,重复 3 次,2 周后观察灭菌效果。

1.3 菊叶薯蓣茎段再生不定芽的诱导

将灭菌好的茎段(不含腋芽)切成 0.5 cm 长,置于不定芽诱导培养基上培养。以 MS 培养基为基本培养基,将不同浓度 NAA 分别与不同浓度的 BA 和 TDZ 组合后,加入基本培养基中进行不定芽诱导,每个组合接种 6 瓶,每瓶接种 5 个,重复 3 次。3 周后观察记录不定芽的诱导情况。

1.4 菊叶薯蓣的继代培养

当茎段分化的不定芽长至 3 cm 以上时,将其切下置于继代培养基上培养。选择 MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度的 IBA 和 BA,设计 3 个激素组合,每个组合接种 30 瓶,每瓶接种 3 个,以确定最佳的继代培养基。

1.5 菊叶薯蓣的生根培养

当在增殖培养基上的茎芽生长高度达到 4 cm 时,将其转接到生根培养基上培养。在 MS 和 1/2 MS 培养基上分别添加 0.6、0.8 和 1.0 mg/L IBA 诱导生根,4 周后观察记录根的长度、数量及颜色。

1.6 菊叶薯蓣的组织培养条件

光照培养间温度设定为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度 2 500 lx,光照时间为 16 h/d。

1.7 试验数据的统计与分析

试验中的污染率、坏死率和不定芽诱导率分别按下式计算:

$$\text{污染率}/\% = (\text{污染茎段数}/\text{接种外植体数}) \times 100\%;$$

坏死率/%=(坏死茎段数/接种外植体数)×100%；
不定芽诱导率/%=(分化不定芽的外植体数/ 接种外植体数)×100%。

不定芽数是指单个茎断分化的不定芽数量平均值,繁殖系数指 1 个不定芽在继代培养基上增殖的不定芽数量。茎断诱导分化的不定芽数量和百分率的多重比较分析用 SPSS10.0 软件处理。

2 结果与分析

2.1 菊叶薯蓣外植体的建立

从表 1 可以看出,室内培养的菊叶薯蓣苗藤茎,由于内生菌和体外菌较少,可以获得低污染、坏死率低的外植体,污染率不超过 10%;而来自田间的材

料携带细菌量多,不易获得高比例的无菌材料,即使适当延长灭菌时间,仍不能获得理想的灭菌效果,污染率在 25%以上。另外,不同灭菌剂的处理时间不宜过长,当次氯酸钠的处理时间延长至 8 min 时,材料两端的切口被严重漂白;而且 HgCl₂ 的氧化毒害作用也很强,处理时间达到 10 min,即会造成材料表面的严重褐化,不利于诱导培养。所以建立外植体的最佳方法,是采用室内培养苗的藤茎为起始材料,依次用 0.55% 次氯酸钠消毒 5 min,体积分数 70%酒精消毒 1 min,1.0 g/L HgCl₂ 消毒 8 min 的处理效果较好。

表 1 不同灭菌方法对不同来源菊叶薯蓣藤茎的处理效果

Table 1 Effect of different methods of sterilization on different tenders of *Dioscorea composita*

序号 No	材料 Explant	消毒时间/min Sterilizing time			污染率/% Percentage of contamination	坏死率/% Percentage of death
		0.55% 次氯酸钠 0.55% sodium hypochlorite	70% 酒精 70% ethanol	1.0 g/L HgCl ₂		
1	室内培养苗藤茎	3	0.5	5	10	0
2	Tender vines collected from	5	1.0	8	5	9
3	young plant cultivated in room	8	1.5	8	3	16
4	田间苗藤茎	5	1.0	8	55	13
5	Tender vines collected from the	8	1.5	10	33	55
6	young plant cultivated in field	10	2.0	10	25	70

2.2 不同植物生长调节剂组合对菊叶薯蓣茎段不定芽诱导再生的影响

植物生长调节剂的质量浓度和类型是影响外植体不定芽再生的主要因素。由表 2 可以看出,采用 NAA 分别与 BA 和 TDZ 组合,均可以高效诱导菊叶薯蓣茎段不定芽的分化,但与 TDZ 配合使用的平均诱导率较高。在 NAA 与 BA 配合使用的 6 种培

养基中,随着 BA 质量浓度的增加,不定芽诱导率也逐渐增加,其中在 3.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 组合的 3 号培养基上获得了 95%的再生率。在 0.2 mg/L NAA 与不同质量浓度 TDZ 配合使用的培养基上,不定芽诱导率均高于 80%,最高可以达到 99%。

表 2 不同激素组合对菊叶薯蓣茎段不定芽的诱导效果

Table 2 Effect of different basal media and combinations of regulators on the adventitious shoot induction from nodal segments of *Dioscorea composita*

序号 No.	NAA/ (mg · L ⁻¹)	BA/ (mg · L ⁻¹)	TDZ/ (mg · L ⁻¹)	诱导率/% Percentage of bud induction	抽生不定芽数 Number of bud
1	0.2	1.0		26 d	2.5 ef
2	0.2	2.0		83 c	2.9 e
3	0.2	3.0		95 a	4.3 d
4	0.4	1.0		32 d	1.2 f
5	0.4	2.0		82 c	2.3 ef
6	0.4	3.0		91 ab	3.8 de
7	0.2		0.005	80 c	5.3 c
8	0.2		0.010	98 a	8.8 a
9	0.2		0.050	99 a	7.0 b

注:同列数据后标不同小写字母者差异显著(P<0.05)。

Note: Within a column followed by the same letter are not significantly different, as indicated by Duncan's multiple range test (P=0.05).

从诱导的不定芽数量上看,NAA 与 TDZ 配合使用诱导的不定芽主要呈丛状,茎稍短,不定芽数量

多,10 d 左右即可发现分化出的不定芽。在 NAA 与 BA 配合使用的培养基中,3 号培养基上可以诱导最多的不定芽数量,培养 2 周后茎段两端发生膨胀,5 周后平均可以获得 4.3 个不定芽,其主要发生在两端切口,有少数从茎段表面诱导出来;在培养过程中有少量愈伤发生;不定芽生长势良好,叶色绿,5 周后可达到 3 cm。因此,从不定芽的质量方面来考虑,以添加 0.2 mg/L NAA+ 3.0 mg/L BA 的培养基作为不定芽诱导培养基效果较佳。

2.3 菊叶薯蓣不定芽在不同激素组合继代培养基上的继代与增殖效果

由于不定芽诱导培养基上细胞分裂素的浓度较高,持续培养会造成茎段不定芽的畸形,因此转到细胞分裂素浓度相对较低的培养基上进行继代培养很有必要。在诱导培养 45 d 后,初代茎芽长至 2~3 节,将无菌芽从原茎段剪下接种到 3 种继代培养基上进行培养。由表 3 可知,不定芽在添加 0.2 mg/L IBA+(1.0~1.5) mg/L BA 的培养基上长势较好,以腋芽和不定芽增殖方式扩繁,可以诱导出 3 个以上的茎芽。

表 4 MS 和 1/2MS 培养基与不同质量浓度 IBA 组合对菊叶薯蓣不定芽诱导生根的效果

Table 4 Effect of combinations of regulators and basal media on root induction of *Dioscorea composita*

序号 No.	基本培养基 Basal medium	IBA/ (mg · L ⁻¹)	生根率/% Percentage of root induction	生根数量 Number of roots	生根状态 Status of rooting
1	MS	0.6	100	3.4	根基部无愈伤,侧根多,长约 4 cm No callus developed on the base of roots (about 4 cm long), many lateral roots developed
2		0.8	100	4.5	根基部无愈伤,侧根多,长约 4 cm No callus developed on the base of roots (about 4 cm long), many lateral roots developed
3		1.0	99	4.2	根基部有愈伤,侧根多,长约 4 cm Callus developed on the base of roots (about 4 cm long), many lateral roots developed
4	1/2MS	0.6	100	3.3	根基部无愈伤,侧根多,长约 5 cm No callus developed on the base of roots (about 5 cm long), many lateral roots developed
5		0.8	100	3.5	根基部无愈伤,侧根多,长约 6 cm No callus developed on the base of roots (about 6 cm long), many lateral roots developed
6		1.0	100	4.0	根基部无愈伤,侧根多,长约 6 cm No callus developed on the base of roots (about 6 cm long), many lateral roots developed

2.5 菊叶薯蓣组培苗的移栽

生根试管苗经过约 40 d 的生长,揭开封口膜,在培养间内缓苗适应 2 周时间,然后取出幼苗,小心洗去琼脂,再栽植到介质中进行炼苗。介质为珍珠岩+粗沙+田园土(体积比为 2:1:1),介质要求疏松、透气、保水、保肥。炼苗 1 周后可适当施 1/2 MS 液体培养基,并用 0.1% 多菌灵喷施保苗。待幼苗生长健旺后移栽到炼苗床或育苗盘上进行遮阴缓苗,保持相对湿度在 85% 以上,并注意保持通风和温度。50 d 后统计移栽成活率,结果可以达到 85%

表 3 菊叶薯蓣不定芽在不同激素组合继代培养基上的培养效果

Table 3 Effect of combinations of regulators on the adventitious shoot elongation of *Dioscorea composita*

序号 No.	IBA/ (mg · L ⁻¹)	BA/ (mg · L ⁻¹)	繁殖系数 Propagation coefficients
1	0.2	0.5	1.4
2	0.2	1.0	3.5
3	0.2	1.5	3.3

2.4 不同基本培养基与不同质量浓度 IBA 组合对菊叶薯蓣茎芽生根的诱导效果

当增殖到有相当数量的无根幼苗时,筛选掉一部分过于细弱、老化的幼苗,然后进行生根诱导培养。从表 4 可以看出,以 MS 培养基为基本培养基,添加 0.6~1.0 mg/L IBA,幼苗生根率可以达到 99%~100%;于是又设计了在大量元素和蔗糖浓度减半的 MS 培养基上,添加质量浓度仍为 0.6~1.0 mg/L 的 IBA,结果在 1/2MS 培养基上根的生长速度也较快,而在生根率方面,2 种基本培养基无显著差别,均可较理想地诱导生根。总体而言,以 MS+0.8 mg/L IBA 和 1/2MS+1.0 mg/L IBA 的处理效果较好。

以上。

3 讨 论

3.1 不同激素类型对菊叶薯蓣藤茎茎段不定芽诱导效果的影响

在薯蓣科植物组织培养研究中,主要采用 BA 和 KT 作为细胞分裂素与植物生长素配合使用,用以诱导愈伤形成或腋芽增殖^[4-13]。本研究主要比较了 BA 和 TDZ 两类植物生长调节剂的不定芽诱导效果。TDZ 是一种苯基脲衍生物,具腺嘌呤类细胞

分裂素的生物活性,能够显著促进器官再生难度较大植物的再生诱导^[14]。从诱导频率和不定芽数量方面考虑,低浓度 TDZ 的诱导效果显著优于较高浓度的 BA;但从不定芽的质量方面考虑,BA 诱导的不定芽相对叶色绿、茎芽长且较壮。TDZ 作为细胞分裂素活性较高,在高频诱导不定芽分化的同时也容易导致不定芽畸形,不利于继代扩繁。

3.2 不同组培繁殖途径的比较

传统的组培繁殖方法是通过诱导茎段产生小块茎的方式来进行繁殖^[7,15-16],小块茎繁殖方式的优点是能够稳定保持品系的优良品质,同时小块茎运输方便且栽植成活率高;但这种繁殖方式诱导培养时间长,成本较高,至少需要 4 个月才能获得较理想的小块茎。通过诱导嫩茎产生愈伤组织的途径来诱导不定芽再生的方式,需要时间也相对较长,如在林贵美等^[12]的研究中,需要经过 40 d 才能分化出不定芽;同时经过愈伤组织分化的不定芽发育的植株,株系间变异程度较大。腋芽增殖方式则未经过器官再生的过程,能够较好地保持品种的遗传一致性,但转化率较低。在 Viana 等^[6]报道的体细胞胚诱导发生途径研究中,虽然能较容易地从藤茎茎段诱导体胚发生,但是完整植株转化率仍较低。本研究茎段可以在接种后 10 d 诱导分化不定芽,增殖速度快,直接诱导再生的植株之间变异小,能够较好地保持品种的遗传一致性,且诱导率高,经济成本相对较低。该结果为菊叶薯蓣外源基因遗传转化的研究和细胞工程技术的开展奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Caturvedi H C. Tissue culture of economic plants [M]//Khoshoo T N, Nair P K K. Progress in plant research: Applied morphology and allied subjects. Karolbagh, New Delhi: Today and Tomorrow's Printers and Publishers, 1979: 265-288.
- [2] 杨清, 郑惠兰, 罗明贤, 等. 菊叶薯蓣的发展前景 [J]. 云南热作科技, 1995, 18(1): 32-34.
Yang Q, Zheng H L, Luo M X, et al. Prospects for the development of *Dioscorea composita* [J]. Yunan Tropical Crop Sci-Tech, 1995, 18(1): 32-34. (in Chinese)
- [3] 阮运昌. 激素药源植物-菊叶薯蓣中薯蓣皂甙元的质量考察 [J]. 华西药理学杂志, 1994, 9(3): 205-206.
Ruan Y C. Hormone plants-investigation on the quality of diosgenin of *Dioscorea composita* [J]. Journal of Western China pharmacy, 1994, 9(3): 205-206. (in Chinese)
- [4] Preston W H, Haun J R. Factors involved in the vegetative propagation of *Dioscorea spiculiflora* Hemsl. from vines [J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1962, 80: 417-429.
- [5] 蒋玉宝, 于元杰. 薯蓣植物组织培养的研究进展 [J]. 生物技术, 2006(16): 93-96.
- [6] Jiang Y B, Yu Y J. Advance of studies on plant tissue culture of yams [J]. Biotechnology, 2006(16): 93-96. (in Chinese)
- [7] Viana A M, Mantell S H. Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl and *D. cayenensis* Lam [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1989, 16: 113-122.
- [8] Sedigeh A, Sinclair H, Mantell, et al. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1998, 53: 107-112.
- [9] 何惠英, 兰芹英, 张艳军. 菊叶薯蓣的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 337.
He H Y, Lan Q Y, Zhang Y J. Tissue Culture of *Dioscorea camposita* [J]. Plant physiology communication, 2000, 36(4): 337. (in Chinese)
- [10] 陈丽华, 李云海, 赵德柱. 墨西哥薯蓣组培快繁研究 [J]. 云南农业科技, 2005(6): 16-17.
Chen L H, Li Y H, Zhao D Z. Study on the rapid micropropagation of *Dicorea Composita* [J]. Yunan Tropical Crop Sci-Tech, 2005(6): 16-17. (in Chinese)
- [11] 李国林, 杜晓英, 付艳华, 等. 菊叶薯蓣的快速繁殖研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(4): 20-22.
Li G L, Du X Y, Fu Y H, et al. Rapid propagation of *Dioscorea composite* [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2004, 26(4): 20-22. (in Chinese)
- [12] 唐德英, 王云强, 李学兰, 等. 菊叶薯蓣组织培养及快速繁殖 [J]. 热带农业科技, 2003, 26(1): 16-18.
Tang D Y, Wang Y Q, Li X L. Rapid micropropagation of *Dicorea composita* [J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2003, 26(1): 16-18. (in Chinese)
- [13] 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.
Lin G M, Mou H F, Li B, et al. Studies on tissue culture of stem segment of *Dicorea composite* [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2006, 37(6): 710-712. (in Chinese)
- [14] 黄凤翔, 管艳, 梁国平, 等. 不同植物激素用量对菊叶薯蓣组织培养的影响 [J]. 热带农业科技, 2007, 30(2): 21-23.
Huang F X, Guan Y, Liang G P, et al. Effect of phytohormone on tissue culture of *Dioscorea composite* [J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2007, 30(2): 21-23. (in Chinese)
- [15] Huettelman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture [J]. Plant cell Tiss Organ Cult, 1993, 33: 105-119.
- [16] Mantell S H, Haque S Q, Whitehall A P. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L and *Dioscorea rotundata* Poir yams by tissue culture [J]. J Hort Sci, 1978, 53: 95-98.
- [17] Mantell S H, Hugo S A. Effects of photoperiod, mineral strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L and *D. bulbifera* L yams [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1989, 16: 23-37.