

山药 (*Dioscorea opposita*) 组织培养的初步研究

段延碧, 郭华春*

(云南农业大学薯类作物研究所, 云南 昆明 650201)

摘要: 以山药带芽茎段为外植体进行组织培养, 试验结果表明: (1) 用 75% 酒精消毒 15 s, 再用 2% NaOCl 浸泡 15~25 min 为最佳的外植体消毒方法; (2) MS+6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为诱导多芽体较好的培养基配方; (3) MS+NAA 0.5~1.0 mg/L 对诱导生根较为适宜; (4) 离体条件下获得的零余子在 MS+6-BA 0.2 mg/L + NAA 1.0 mg/L 的培养基上平均出芽数能达 4.0, 且芽的长势较好。

关键词: 山药; 多芽体; 零余子; 组织培养

Preliminary study on the tissue culture of *Dioscorea opposita*

DUAN Yan-bi, GUO Hua-chun*

(Root and Tuber Crops Research Institute, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China)

Abstract: The explants tissue culture of cauline tip with bud of *Dioscorea opposita* was studied. The results showed that: The best sterilization method was to sterilized with 2% NaOCl for 15~20 min after being treated with 75% C₂H₅OH for 15 s; The optimum medium for the induction of the multiple buds was the MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L; Root could be induced in the medium of MS + NAA 0.5~1.0 mg/L; The average number of shoot produced by bulbil from the in vitro culture was 4.0 by culturing in the medium of MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 1.0 mg/L, and the buds grew well.

Key words: *Dioscorea opposita*; multiple buds; bulbil; tissue culture

山药 (*Dioscorea opposita*) 是薯蓣科薯蓣属的攀缘性草本肉质根状块茎植物。以其块茎和零余子入药, 有“主治伤中, 补虚羸, 除寒热邪气, 补中益气力, 长肌肉。久服耳聪目明, 轻身不饥延年”等功能^[1]; 除药用外, 还可食用, 是营养丰富的蔬菜, 为食药双跨品种^[2]。随着医药卫生事业的发展, 用药量不断增加, 全国年需求量为 1 000 万 kg^[3], 且其产品畅销国内外, 尤其是东南亚一带。现在山药的生产越来越受重视, 但由于山药长期营养繁殖, 造成品种退化, 产量降低, 某些优良品种几乎濒临灭绝^[4]。因此, 改善品质, 提高产量,

并使其优良品种迅速推广种植, 已成为山药生产中亟待解决的一个重要问题。而通过植物组织培养技术中的茎节培养既可达到快繁目的, 又能使优良品种的优良种性得以保持, 这在薯蓣属的一些种中已有报道^[5-7]。因此, 本试验利用山药茎段组织培养, 就多芽体和再生植株的形成, 零余子诱导芽的形成等方面进行研究, 以期建立山药组织培养快繁体系, 提高组织培养繁殖系数, 为生产上提供大量优良种苗; 同时为今后山药茎尖脱毒, 克服种性退化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为禄丰县勤丰镇地方山药品种。

1.2 方法

(1) 从盆栽植株上取其幼嫩节间茎段为外植体, 先将外植体用自来水反复冲洗后, 剪成 1 cm

收稿日期: 2006-05-15

项目来源: 本研究受云南省科技厅资助。

作者简介: 段延碧 (1976-), 女, 云南红河人, 云南农业大学 2005 级硕士研究生, 主要从事山药栽培生理研究。

*为通讯作者。

左右的带芽茎段,用不同消毒方法处理后,用无菌水漂洗 3~5 次,接种在 MS 培养基上,形成无菌培养体系^[8,9],并对无菌苗进行继代培养。

(2) 将无菌苗分割成 0.7cm 左右的带芽茎段,接种在含有不同浓度 6-BA、NAA 的 MS 培养基上,观察多芽体的形成并统计结果。

(3) 将无菌苗接种在含不同浓度 6-BA、NAA 的 MS 培养基上,观察根的形成并统计结果。

(4) 将离体培养获得的零余子接种在含不同浓度 6-BA、NAA 的 MS 培养基上,观察芽的形成并统计结果。

以上培养条件为温度 (22±1)℃,光强 2 000 lx,光照时间 15 h/d。

2 结果与分析

2.1 无菌体系的建立

经不同消毒处理后的外植体,接种后 1~2 d 即可发现污染,2 周左右结果基本稳定,除 17, 18, 26, 27 号处理外,其余均有感菌,见表 1。

从表 1 可知,处理 17, 18, 26, 27 号消毒较完全。但处理 26, 27 消毒过重,多数芽枯死,后期不能正常生长,而处理 17, 18 生长正常。因此,建立无菌体系的最好消毒方法是先用 75%酒精消毒 15 s,再用 2%NaOCl 浸泡 15~25 min。

接种在 MS 培养基上的茎段,4~5 周即可形成茎粗 2 mm 左右,茎高 4~7 cm,具有 4~6 片叶的组培苗,并在部分腋芽处形成零余子。

2.2 不同激素配比诱导多芽体形成

带芽茎段接种 1 周后,大部分开始膨大、生长。2 周后,有的茎段开始形成多芽体,4~5 周,除对照外,茎段上均有 2 个及其以上的芽形成。

由表 2 可知,在 MS 培养基上加入不同浓度的激素 6-BA 或 6-BA 与 NAA 的组合均使产生的芽数明显增多,说明激素 6-BA 和 NAA 对诱导多芽体影响显著。表中处理 2, 4, 5 对芽数增加的影响达极显著,但处理 2, 5 长势较弱,而处理 4 长势较好。所以,诱导多芽体的最佳激素组合为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

2.3 不同激素对比对根形成的影响

形成的多芽体在 40 d 左右一般无根产生^[10],需进行诱导生根。芽接种在诱导生根的培养基上(见表 3),1~2 周后均可长出白色幼根,5~6 周后基本成苗。

由表 3 可看出,单独使用 NAA 均较 6-BA 与 NAA

配合使用时出根数较多。处理 1, 2 的平均根数与处理 3, 4, CK 的差异较明显,长势也比 CK 和处理 3, 4 的好。试验结果表明, NAA 浓度为 0.5~1.0 mg/L 的培养基对诱导生根是较为适宜的。

2.4 离体培养条件下零余子诱导发芽

山药茎段在不加任何激素的 MS 培养基上培养 5 周左右即可在腋芽处形成零余子,但零余子上基本不发芽;把零余子接种在含有不同浓度 NAA、6-BA 的培养基上,2 周左右即有芽产生。

由表 4 得出,使用激素 6-BA 和 NAA 后,零余子发芽率大大提高。其中处理 3 的效果最为明显,且长势较好。所以,6-BA 0.2 mg/L+NAA 1.0 mg/L 是诱导零余子发芽较理想的激素组合。

表 1 外植体不同消毒处理

Table 1 The difference sterilization methods of the explants

培养 基序 号	75%酒精 处理 时间 (s)	NaOCl 浓度 (%)	NaOCl 处理时间 (min)	茎段 总数 (个)	感菌数 (个)	感菌率 (%)
1	5	0.5	5	20	18	90
2	5	0.5	15	20	14	70
3	5	0.5	25	20	7	35
4	5	1	5	20	15	75
5	5	1	15	20	11	55
6	5	1	25	20	6	30
7	5	2	5	20	12	60
8	5	2	15	20	9	45
9	5	2	25	20	4	20
10	15	0.5	5	20	12	60
11	15	0.5	15	20	8	40
12	15	0.5	25	20	4	20
13	15	1	5	20	10	50
14	15	1	15	20	8	40
15	15	1	25	20	4	20
16	15	2	5	20	4	20
17	15	2	15	20	0	0
18	15	2	25	20	0	0
19	30	0.5	5	20	9	45
20	30	0.5	15	20	8	40
21	30	0.5	25	20	4	20
22	30	1	5	20	8	40
23	30	1	15	20	7	35
24	30	1	25	20	4	20
25	30	2	5	20	2	10
26	30	2	15	20	0	0
27	30	2	25	20	0	0

表2 不同激素配比对带芽茎段形成多芽体的影响

Table2 Effect of the difference hormone proportion on forming multiple buds of cauline tip with bud

培养基序号	激素浓度 (mg/L)	茎段总数 (个)	总芽数 (个)	平均芽数 (个/段)	长势
CK	0	10	13	1.3	+ + +
1	6-BA 0.5 + NAA 0	10	23	2.3*	+ + + +
2	6-BA 1.0 + NAA 0	10	27	2.7**	+ +
3	6-BA 2.0 + NAA 0	9	19	2.1*	+
4	6-BA 1.0 + NAA 0.2	14	46	3.3**	+ + + +
5	6-BA 2.0 + NAA 0.2	11	29	2.6**	+ +

注: “+”表示长势很弱, 芽很小, 颜色浅黄; “++”表示长势较弱, 芽小, 颜色淡绿; “+++”表示长势一般, 颜色绿色; “++++”表示长势较好, 颜色绿色。*表示 $\alpha=0.05$ 水平上显著, **表示 $\alpha=0.01$ 水平上显著。

表3 不同激素配比对诱导生根的影响

Table3 Effect of the difference hormone proportion on inducing root

培养基序号	激素浓度 (mg/L)	茎段总数 (个)	总根数 (条)	平均根数 (条/段)	根的形态
CK	0	10	21	2.1	+ +
1	6-BA 0 + NAA 1.0	10	51	5.1	+ + +
2	6-BA 0 + NAA 0.5	10	48	4.8	+ + +
3	6-BA 0.2 + NAA 1.0	9	27	3.0	+
4	6-BA 0.2 + NAA 0.5	12	39	3.25	+

注: “+”表示根长势弱, 细短, 无须根; “++”表示长势一般, 细长, 有须根; “+++”表示根长势较好, 粗壮, 有须根。

表4 不同激素配比对诱导零余子发芽的影响

Table4 Effect of the difference hormone proportion on germination of bulbil

培养基序号	激素浓度 (mg/L)	接种零余子数 (个)	芽总数 (个)	出芽率 (个/个)	长势
CK	0	10	1	0.1	+ +
1	6-BA 0 + NAA 1.0	9	9	1.0	+
2	6-BA 0 + NAA 0.5	8	10	1.25	+
3	6-BA 0.2 + NAA 1.0	9	36	4.0	+ + +
4	6-BA 0.2 + NAA 0.5	11	21	1.9	+ + +

注: “+”表示芽长势弱, 颜色浅绿; “++”表示芽长势一般, 颜色绿色; “+++”表示芽长势较好, 芽粗壮, 颜色绿色。

NAA与6-BA在诱导零余子发芽中具有一定的交互效应, 当BA为0 mg/L时, NAA由0.5 mg/L增加到1.0 mg/L时, 出芽数有所降低; 当BA为0.2 mg/L时, NAA由0.5 mg/L增加到1.0 mg/L, 出芽数显著增加。

2.5 试管苗的移栽

将生好根的组培苗取出组培室, 炼苗1周左右后, 打开瓶盖1~2 d^[9], 取出苗 (不要伤根), 洗净琼脂后移栽到育苗基质中, 移栽前先浇透水, 移栽后浇定根水, 栽好后罩上塑料薄膜, 第1周, 每天用小喷雾器喷1/2 MS培养液一次, 1周后, 揭去塑料薄膜。山药试管苗适应外界环境能力较强

^[10], 15 d后成活率可达90%以上。

3 讨论

山药是一种利用根茎和零余子进行营养繁殖的作物, 利用传统育种方法培育高产优质山药时间较长且难以奏效^[13]。且近年来, 由于山药的价值已逐步被人们所认识, 山药的需要量增大, 种植面积逐年扩大。因此, 运用山药组织培养技术, 不仅在保持和恢复其优质种性方面提供了一种新思路^[10], 而且繁殖系数高, 短时间内能大量生产试管苗, 可及时解决由于山药需求量的不断增大而产生的供种不足等问题, 在山药的生产上具有广阔的应用前景。

植物生长调节物质对植物组织培养具有重要作用, 6-BA和NAA两种激素共用可促进组织培养中根和芽的分化^[14]。通过试验得出: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基较适宜山药茎段多芽体的诱导, 形成的芽数多且长势好; 诱导生根的较好培养基为MS+NAA 0.5~1.0 mg/L, 长出的根健壮, 适宜大田移栽; MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 1.0 mg/L是诱导零余子发芽较理想的组合, 其平均发芽数(4.0)大于多芽体试验的平均出芽数(3.3), 且能在零余子上长出较多根, 可提高繁殖系数。本试验只对山药组织培养进行了初步研究, 但可为以后的进一步试验, 如茎尖脱毒、优良种苗快繁、细胞培养和次生代谢产物的提取、植物种质资源的离体保存及应用等奠定基础^[15]; 也为进一步利用细胞工程和基因转化系统进行品种改良或新品种的选育提供了可能的途径。

参考文献:

- [1] 聂桂华, 周可范, 董秀华, 等. 山药的研究情况[J]. 中草药, 1993, 24(3): 158.
- [2] 宋德勋. 药用植物栽培学[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2000, 151.
- [3] 徐良. 中国名贵药材规范化栽培与产业化开发新技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001, 339.
- [4] 邱仲华. 山药零余子技术简报[J]. 中国蔬菜, 1984 (2): 8~9.
- [5] 张宗勤. 叉蕊薯蓣的繁殖及微型薯蓣的离体诱导[J]. 生物技术, 1998(1): 18~306.
- [6] Lauzer D., Laubin G., Vincent G., et al. In Vitro propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch and *D. managenotiana* Miège [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992(28): 215~223.
- [7] Hiroyuki kohmura, Hajime Araki, Masashi Imoto. Micropropagation of 'Yamatoimo' Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves[J]. Plant cell, Tissue and organ culture, 1992(40): 271~276.
- [8] 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.
- [9] 崔德才, 徐培文, 李红双, 等. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 100~101.
- [10] 李明军, 刘萍. 怀山药微型块茎的离体诱导[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 41~42.
- [11] 李云. 林果花菜组培快速育苗技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001, 149~151.
- [12] 李明军. 怀山药的离体繁殖[J]. 作物学报, 1997, 23(6): 759.
- [13] 李明军, 张嘉宝, 张海波. 怀山药零余子愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 772~777.
- [14] 白宝璋, 杨建平, 厉秀茹, 等. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003, 138~153.
- [15] 李明军. 怀山药组织培养及其运用[M]. 北京: 科学出版社, 2004, 149~152.