

文章编号: 1674-7054(2012)03-0271-05

参薯组织培养快繁技术

夏 赞, 谭文丽, 陈银华, 黄小龙, 谢 俊, 黄东益

(海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 以参薯的带节茎段为外植体、MS 为基本培养基, 研究了参薯的组织培养快速繁殖技术。结果表明, 不含任何激素的 MS 培养基能诱导外植体的腋芽萌发, 萌芽率达 100%; 萌发的茎段在 MS + AD 80 mg · L⁻¹ 的培养基上增殖效果较好, 50 d 可增殖 4 倍; 继代培养得到的带节茎段在 MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + AD 80 mg · L⁻¹ 的培养基上能诱导出不定芽, 将其芽点转接到 MS + 80 mg · L⁻¹ AD 培养基上, 不定芽能抽生, 且芽体健壮; 不定芽在 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 的培养基上能形成完整植株, 生根率达 100%; $V_{\pm} : V_{\text{沙}} : V_{\text{草木灰}} = 2 : 2 : 1$ 的混合基质移栽参薯组培苗的效果更佳, 移栽存活率可达 88.3%。

关键词: 参薯; 组织培养; 带节茎段; 不定芽; 移栽

中图分类号: S 632

文献标志码: A

参薯 (*Dioscorea alata* L.), 又名大薯, 系薯蓣属薯蓣科藤本植物, 在我国主要分布于广东、广西、贵州、云南及海南等地, 其块茎发达, 产量可达 2.8 万 kg · hm⁻² [1], 富含碳水化合物, 淀粉含量高达 $w = 75.6\% \sim 84.3\%$ [2], 粗蛋白含量为 $w = 7.4\%$, 色泽鲜艳, 口味俱佳, 是人们喜爱的一种食品, 还可用作饲料、中药等 [3]。目前, 参薯主要用块茎进行繁殖, 常规繁殖方法种量大、成本高, 多代繁殖会造成品种退化, 产量降低, 严重时植株矮化, 生长缓慢, 甚至死亡。利用组织培养技术建立离体高效快繁体系是提高参薯产量, 保证参薯品质的最佳途径。虽然在参薯微型薯块、茎段离体再生苗等方面取得了相应的进展 [4-6], 但参薯的组织培养技术仍未成熟。因此, 笔者以带节茎段作为外植体, 探索参薯的组培快繁技术, 旨在为加快参薯优良品种快繁进程提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的参薯材料由海南大学农学院薯蓣种质资源圃提供。

1.2 方法

1.2.1 初代培养 从地里选择无病虫害的健壮植株, 剪取其茎段, 去除叶片, 在自来水下冲洗 30 min 后, 在超净工作台上用 $\varphi = 75\%$ 的酒精浸泡 15 s, 然后用杀菌剂灭菌, 再用无菌水洗 3~5 次。将消毒好的带节茎段, 接种到 MS + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 凝胶 3 g · L⁻¹ 的培养基上, 观察记录腋芽萌发情况。培养条件: 温度为 (27 ± 1) °C, 光照强度为 1 500 ~ 2 000 lx, 光照时间为 14 h · d。

1.2.2 继代培养 将由初代培养得到的茎段切成单节, 接种到如下培养基: 1) MS; 2) MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹; 3) MS + AD 40 mg · L⁻¹; 4) MS + AD 80 mg · L⁻¹; 5) MS + AD 160 mg · L⁻¹, 所有培养基上均附加蔗糖 30 g · L⁻¹, 凝胶 3 g · L⁻¹, pH 5.8。每瓶接种 4 个茎节, 培养条件同 1.2.1, 观察记录腋芽萌发生长情况。

1.2.3 不定芽的诱导 当继代培养的组培苗具 3~4 个茎节时, 将茎节切成单节, 接种到诱导不定芽的培养基上进行培养, 培养条件同 1.2.1。诱导不定芽的培养基为: 1) MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹;

收稿日期: 2012-05-15

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20114601110001); 农业部热带作物种质资源保护项目 (11RZ, ZY-26)

作者简介: 夏赞 (1986-), 女, 湖北武汉人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 黄东益, 海南大学教授, 博士, 博士生导师。E-mail: hdongyi@126.com

2) MS + 6-BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 3) MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 4) MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AD $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 5) MS + 6-BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AD $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 6) MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AD $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 所有培养基上均附加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 凝胶 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8。

1.2.4 生根培养 切取大约 2.5 cm 长的不定芽, 转接到 MS + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 凝胶 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上进行生根培养, 培养条件同 1.2.1。

1.2.5 炼苗和移栽 选具有 2~4 个茎节的组培苗进行炼苗、移栽。具体做法是: 先将瓶口半开 3 d, 再将瓶口全开 5~7 d, 开瓶驯化结束后, 取出试管苗, 用自来水将根部残余的培养基轻轻洗净, 然后将组培苗分别移栽到如下基质: 1) 土; 2) 土和沙混合物 ($V_{\text{土}} : V_{\text{沙}} = 1 : 1$); 3) $V_{\text{土}} : V_{\text{沙}} : V_{\text{草木灰}} = 2 : 2 : 1$, 3 种基质均经灭菌处理, 各移栽 20 株。

2 结果与分析

2.1 初代培养 从表 1 可以看出, 不同的消毒剂 and 消毒时间对外植体成活的影响不同, 同一消毒剂, 随着消毒时间的增加, 污染率越低, 但对外植体的损伤越大。总的来说, $w = 0.1\%$ 的 HgCl_2 的消毒效果比 $w = 1\%$ 的 NaClO 的消毒效果要好, 其中, $w = 0.1\%$ 的 HgCl_2 消毒 8 min 的效果最好, 外植体的存活率为 98.3%。

表 1 不同消毒剂和消毒时间对外植体成活率的影响

消毒剂	消毒时间/min	接种数/个	存活率/%
$w = 0.1\% \text{ HgCl}_2$	6	40	37.5 ± 5.0
	8	40	98.3 ± 2.9
	10	40	75.8 ± 7.6
	12	40	46.7 ± 8.0
$w = 1\% \text{ NaClO}$	10	40	22.5 ± 5.0
	13	40	27.5 ± 4.3
	15	40	50.8 ± 6.3
	17	40	28.3 ± 8.0

消毒过的参薯茎段在初代培养基上培养 10 d 左右, 腋芽开始萌发, 同时, 茎节处分化出根, 而且根的生长较快。30 d 后, 萌发的新芽能长出 1 个茎节。

2.2 继代培养 待抽生的新芽具 2~3 个茎节时, 将其切成单节接种到继代培养基上, 50 d 后腋芽萌发, 生长情况见表 2 和图 1。从表 2 可以看出, 在 MS 和 MS + AD $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上, 带节茎段的腋芽全都萌发, 茎节处分化出 3~5 条根, 未见形成愈伤组织, 新生芽具 1~2 个茎节; 在 MS + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上, 89.4% 的茎节萌发出芽, 茎节处分化出 5~10 条根, 新生芽具 2~3 个茎节, 10.6% 的茎节处长出愈伤组织, 长出愈伤组织的茎节没有萌发出芽; 在 MS + AD $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上, 92.7% 的茎节萌发出芽, 15.6% 的茎节形成愈伤组织, 85.0% 的茎节分化出 3~6 条根, 新生芽多具 4 个茎节; 在 MS + AD $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上, 60.0% 的茎节萌发出芽, 38.3% 的茎节形成愈伤组织, 出愈的茎节未见根的形成, 新生芽未抽出茎节。综上所述, MS + AD $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基继代效果最好, 能获得 4 倍的增殖率。

表 2 参薯在不同培养基上腋芽萌发生长的情况

培养基/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生长情况	萌芽率/%	出愈率/%
MS	1~2 个茎节, 3~5 条根	100.0 ± 0.0	0
MS + NAA 0.1	2~3 个茎节, 5~10 条根, 少数出现愈伤组织	89.4 ± 6.7	10.6 ± 6.7
MS + AD 40	1~2 个茎节, 3~5 条根	89.4 ± 9.2	0
MS + AD 80	4 个茎节, 3~6 条根, 少数出现愈伤组织	92.7 ± 7.5	15.6 ± 5.9
MS + AD 160	较多的茎节长出愈伤组织, 茎节生长缓慢	60.0 ± 16.9	38.3 ± 13.3



图 1 参薯茎节在不同培养基上继代培养 50 d 的生长情况
培养基从左至右依次为: MS; MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹; MS + AD 80 mg · L⁻¹

2.3 不定芽的诱导 在继代培养中新抽出的茎段经切割后,接种到诱导不定芽培养基上,30 d 后调查其生长情况。从表 3 可以看出,带节茎段在诱导不定芽培养基上培养30 d后,在 MS + 6 - BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹的培养基上能萌发出 3 ~ 4 个新芽,萌发出的新芽具 1 ~ 2 个茎节。在MS + 6 - BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + AD 80 mg · L⁻¹的培养基上能萌发出 7 个以上的芽点,但萌发出的芽点在该培养基上不能伸长,继续培养 2 个月,仍不见芽点抽生茎节,如将其芽点转接到 MS + AD 80 mg · L⁻¹上培养,15 d 后可见芽点伸长,约 50 d 有 71.7% 的不定芽具 2 ~ 3 个茎节,且芽体健壮(见图 2)。



图 2 在 MS + AD 80 mg · L⁻¹ 上
培养 50 d 的不定芽

表 3 茎节诱导不定芽的结果

培养基/(mg · L ⁻¹)	接种数/个	生长情况	出芽率/%
MS + 6 - BA 1.0 + NAA 0.1	60	3 ~ 4 个芽,1 ~ 2 个茎节	86.7 ± 4.4
MS + 6 - BA 0.1 + NAA 1.0	60	1 个芽,1 ~ 2 个茎节	78.9 ± 6.3
MS + 6 - BA 1.0 + NAA 1.0	60	腋芽处形成球状突起	0
MS + 6 - BA 1.0 + NAA 0.1 + AD 80	60	7 ~ 19 个芽,未见茎节增殖	86.1 ± 5.1
MS + 6 - BA 0.1 + NAA 1.0 + AD 80	60	1 个芽,1 ~ 2 个茎节	69.4 ± 5.1
MS + 6 - BA 1.0 + NAA 1.0 + AD 80	60	腋芽处形成球状突起	0

2.4 生根培养 参薯试管苗容易生根,将高约 2.5 cm 的芽苗,接到 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹的培养基上,7 d 后开始分化出根,20 d 后生根率达 100%,约 30 d 能长出 5 ~ 10 条根,平均根长 7 ~ 8 cm,且根系发达(见图 3 和图 4)。



图3 生根的参薯试管苗



图4 发达的参薯试管苗根系

2.5 炼苗与移栽 从表4可以看出,不同移栽基质的成活率不同,最好的移栽基质是 $V_{\text{土}} : V_{\text{沙}} : V_{\text{草木灰}} = 2 : 2 : 1$ 。组培苗植株的大小、叶片数量对移栽的成活率也有较大的影响。在土-沙-草木灰混合基质($V_{\text{土}} : V_{\text{沙}} : V_{\text{草木灰}} = 2 : 2 : 1$)上,株高为5~7 cm(2~3个茎节)的组培苗移栽成活率最高,成活率达88.3%;株高为3~4 cm(1~2个茎节)的组培苗在移栽后,易腐烂,成活率达45.0%;株高 ≥ 9 cm(4个茎节以上)的组培苗,存活率最低,成活率仅为40.0%。叶片过多和叶片较大的植株移栽后,植株蒸腾作用强烈,叶片易失水萎蔫,不易存活。移栽60 d的参薯试管苗见图5所示。

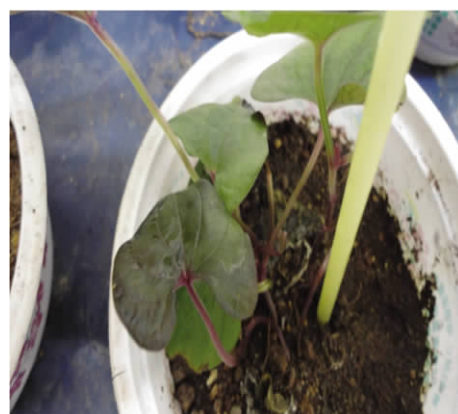


图5 移栽60 d的参薯试管苗

表4 株高和基质对组培苗移栽存活率的影响

移栽基质	成活率/%		
	株高3~4 cm	株高5~7 cm	株高 ≥ 9 cm
土	21.7 $\pm$ 7.6	53.3 $\pm$ 5.8	15.0 $\pm$ 10.0
$V_{\text{土}} : V_{\text{沙}} = 1 : 1$	35.0 $\pm$ 10.0	71.7 $\pm$ 15.3	40.0 $\pm$ 18.0
$V_{\text{土}} : V_{\text{沙}} : V_{\text{草木灰}} = 2 : 2 : 1$	45.0 $\pm$ 10.0	88.3 $\pm$ 7.6	40.0 $\pm$ 13.2

3 讨论

经消毒处理后,茎尖和紧挨茎尖的幼嫩茎节存活率较低,如果减少消毒时间和降低升汞的质量浓度,则茎尖易污染,故笔者未用其部位作为快繁的外植体。

周双清等^[4]发现,参薯茎段在含有不同质量浓度的6-BA和NAA的培养基上培养,会出现严重的褐化,腋芽处分化出根。故笔者采用不含任何激素的MS培养基作为初代培养基,结果获得成功,在MS培养基上,外植体约10 d开始萌发腋芽,约30 d增殖1个茎节,腋芽萌发率达100%。虽然在MS培养基上茎节处的腋芽容易萌发,但茎段生长缓慢,50 d才增殖1~2个茎节,达不到快速繁殖的目的。添加适当的外源激素能缩短参薯茎段快繁周期。本实验结果表明,AD对参薯的茎段增殖有效,其中80 mg $\cdot$ L⁻¹的AD增殖效果最好,50 d增殖4倍。Marilyn等^[5]将腋芽接种到MS+AD 80 mg $\cdot$ L⁻¹+6-BA 1.0 mg $\cdot$ L⁻¹+NAA 0.1 mg $\cdot$ L⁻¹的培养基上,诱导出不定芽,与本实验的结果相符。笔者发现,参薯腋芽在该培养基上虽能萌发出多个不定芽,但不定芽生在该培养基上不能伸长,这与Marilyn等的结果不同。如将在该培养基上诱导出的不定芽转接到MS+AD 80 mg $\cdot$ L⁻¹培养基上,则不定芽就能有效抽生茎节。这种差异可能与实验材料的基因型有关,具体原因有待进一步研究。

试管苗的高度和移栽基质对移栽成活率都有影响。株高 ≥ 9 cm(叶片偏大,数量过多)移栽不易成活,刚出瓶移栽时,根系的功能尚未恢复,叶片大而多就会给根吸收水分和营养造成大的压力,从而造成植株死亡。太小的组培苗(株高3~4 cm)移栽后,顶端和叶片太靠近基质,易感病发生腐烂,故成活率也低。笔者发现,5~7 cm高的试管苗移栽最易成活。移栽基质以 $V_{\text{土}}:V_{\text{沙}}:V_{\text{草木灰}}=2:2:1$ 为佳,这种混合物基质比土疏松,有利于根的生长,添加的草木灰能为参薯苗提供营养,因为参薯是喜钾作物。

参考文献:

- [1] 吴志刚,魏余煌,陶正明,等. 紫肉参薯高产综合栽培技术研究[J]. 浙江农业学报,2010,22(1):36-39.
- [2] WANASUNDERA J P D, RAVINDRAN G. Nutrition assessment of yam tuber[J]. Plant Foods for Human Nutrition,1994,46:33-39.
- [3] 梁小娟,杜伟锋,张云,等. 参薯研究进展[J]. 中华中医药学刊,2011,29(5):1085-1087.
- [4] 周双清,胡新文,黄东益,等. 参薯组织培养的初步研究[J]. 中国热带农业,2011,42(5):85-87.
- [5] BELARMINO M M, GONZALES J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in purple food yam(*Dioscorea alata*) [J]. Annals of Tropical Research,2008,30(2):22-33.
- [6] TWYFORD C T, MANTELL S H. Production of somatic and plantlets from root cells of the greater yam [J]. Plant Cell,Tissue and Culture,1996,46:17-26.

Rapid Propagation of *Dioscorea alata* L.

XIA Yun, TAN Wen-li, CHEN Yin-hua, HUANG Xiao-long, XIE Jun, HUANG Dong-yi

(College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Dioscorea alata* L. were mass propagated through tissue culture on different MS media with the nodal stem segments as explants. The explants were induced to form axillary buds at an initiation rate of 100% when cultured on the MS medium without any auxins. The initiated nodal shoots were rapidly multiplied in the subculture basic medium supplemented with $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AD (adenine sulfate) and 4 times of nodal shoots could be produced at day 50 of subculture. Adventitious buds were induced from the nodal segments subcultured in the basic medium supplemented with $6-\text{BA}$ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AD, and produced robust shoots when cultured on the medium supplemented with $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AD. The adventitious shoots were rooted on the MS medium containing NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to form complete plants, and the rooting rate was 100%. The rooted plantlets were transplanted onto a mixed substrate of garden soil, sand and plant ash($V:V:V=2:2:1$) and resulted in 88.3% survival.

Key words: *Dioscorea alata*; nodal stem; adventitious bud; transplanting