

# 怀山药茎尖脱毒培养与茎段增殖研究

苗利娟<sup>1</sup>, 韩锁义<sup>1</sup>, 张新友<sup>1\*</sup>, 黄冰艳<sup>1</sup>, 汤丰收<sup>1</sup>, 董文召<sup>1</sup>, 王素霞<sup>2</sup>

(1. 河南省农业科学院 经济作物研究所, 河南 郑州 450002; 2. 温县农业局, 河南 温县 454850)

**摘要:** 以怀山药的茎尖、茎段为外植体, 研究不同激素对比对山药茎尖分化及茎段快繁的影响, 筛选适合于怀山药生长的培养基。结果表明: MS+BA 1 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 0. 2 mg/L 是怀山药茎尖分化较理想的培养基, 成苗率较高(30%); MS+BA 1 mg/L +NAA 0. 5 mg/L 是怀山药茎段快繁最佳培养基, 不定芽诱导率较高, 成苗率最高, 达到 109. 5%。添加 0. 01% 聚乙烯吡咯酮(PVP)后茎段褐化现象得到了很大的改善。

**关键词:** 怀山药; 茎尖; 茎段; 培养基; 分化; 脱毒; 快繁

**中图分类号:** S632. 1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)11-0123-03

## The Establishment of the System for Detoxified Huai Yam by Stem Tip Culture and Stem Cut Rapid Propagation

MIAO Li-juan<sup>1</sup>, HAN Suo-yi<sup>1</sup>, ZHANG Xin-you<sup>1\*</sup>, HUANG Bing-yan<sup>1</sup>, TANG Feng-shou<sup>1</sup>,  
DONG Wen-zhao<sup>1</sup>, WANG Su-xia<sup>2</sup>

( 1. Industrail Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Agricultural Bureau of Wen County, Wen County 454850, China)

**Abstract:** The effects of different hormone combinations on yam shoot tip differentiation and propagation were studied using shoot tip and stem cut as explants, to select the medium suited for Huai yam culture. The result showed that MS+BA 1 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 0. 2 mg/L was an ideal medium for Huai yam tip differentiation with its high rate of seedling production (30%). MS+BA 1 mg/L+NAA 0. 5 mg/L was the best medium for rapid propagation by Huai yam stem cuts with its relatively high induction rate of adventitious buds and highest rate of seedling production (109. 5%). Addition of 0. 01% PVP inhibited browning remarkably.

**Key words:** Huai yam; Stem tip; Stem cut; Medium; Differentiation; Detoxification; Rapid propagation

怀山药为薯蓣科多年生草本植物, 在全国大部分地方均有种植, 其肉质根状茎可菜药兼用, 由于其药用价值高、品质好, “主治伤中、补虚羸、除寒热邪气, 补中益气力”等, 故其产品畅销到东南亚和日本等国, 具有重要的经济价值<sup>[1-4]</sup>。在生产中, 怀山药由于长期采用营养繁殖, 病毒感染严重, 造成产量下降、品质退化<sup>[5]</sup>, 另外, 目前怀山药繁种主要用山药的食用部分, 繁种速度慢、成本高。因此, 开展健康种苗研究, 采用生物技术的方法脱除病毒, 提高产

量, 改善品质已成为山药生产中亟待解决的问题。受病毒侵染的山药终身带毒, 目前尚无有效药物可以治愈, 而对感病山药进行离体脱毒, 培养脱毒苗, 是解决山药病毒病的根本方法之一<sup>[6-8]</sup>。有关山药茎尖脱毒培养及快繁应用研究的报道较少, 主要以龙岩新罗怀山药和惠楼山药为材料<sup>[9-10]</sup>, 以铁棍山药为材料的研究主要是围绕不同外植体的愈伤诱导和植株再生<sup>[11-12]</sup>。本研究对适宜铁棍山药茎尖脱毒培养及增殖培养基进行筛选, 现总结如下。

收稿日期: 2011-05-10

基金项目: 国家公益性行业科研专项(200903022)

作者简介: 苗利娟(1981-), 女, 河南滑县人, 研究实习员, 本科, 主要从事植物组织培养研究。E-mail: miao8139@163.com

\* 通讯作者: 张新友(1963-), 男, 河南太康人, 研究员, 博士, 主要从事遗传育种研究。E-mail: haasz@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为怀山药优良品种铁棍山药,将茎段浅埋在细沙中催芽,长出幼苗待用。研究中使用的植物激素有 BA、NAA、KT、TDZ 以及其他常用化学试剂,均为国产分析纯试剂。基本培养基为 MS 培养基。

1.2 方法

1.2.1 茎尖诱导 取长势较好的茎段,剪取茎顶部 3 cm 芽段,去除较大的叶片,用洗洁净水浸泡 20 min 左右,期间放到摇床上慢慢摇动,之后用自来水冲洗干净,将材料移入超净工作台,放入无菌三角瓶,用 70% 的酒精浸泡 30 s,然后用 0.1% 的升汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液灭菌 8 min,再用无菌水冲洗 5 遍,在超净工作台上利用解剖镜剥离茎尖,所剥茎尖约 0.1 mm 左右,不带叶原基,接种到茎尖诱导候选培养基上。在温度 25℃、光照 16 h/d、光照度 2000 lx 的条件下培养。茎尖诱导的培养基设 5 个处理,分别为:①MS+KT 2 mg/L+NAA 0.05 mg/L;②MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L;③MS+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L;④MS+KT 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L;⑤MS+BA 1 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

1.2.2 茎段增殖 将消毒好的茎段切成单节茎段,接种到增殖培养基上,培养观察成苗数、分枝数,计算成苗率。茎段增殖的培养基设 9 个处理,分别为:①MS+BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L;②MS+BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L;③MS+BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L+TDZ 0.3 mg/L;④MS+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L;⑤MS+BA 2 mg/L+NAA 1 mg/L;⑥MS+BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L;⑦MS+BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L;⑧MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;⑨MS+BA 0.05 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

1.2.3 褐化抑制 设置 2 个处理,在茎段快繁培养基 MS+BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 中,添加 0.01% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP);以不添加 PVP 为对照。观察 PVP 对褐化的影响。

2 结果与分析

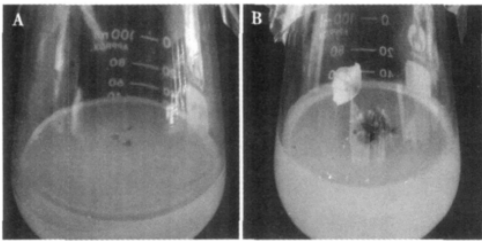
2.1 不同诱导培养基对怀山药茎尖成苗的影响

共剥取山药茎尖 50 个,茎尖接种后 3 d,有一半呈现绿色,但是生长缓慢,生长情况不理想,成苗率普遍较低(表 1),在 1—4 号培养基中都没有愈伤组织出现,直接形成小芽,茎尖苗长势较差(图 1A),而

在 MS+BA 1 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上成苗率稍高一些,达到 30%,有愈伤组织出现(图 1B),成苗时间达 90 d,时间较长。

表 1 不同诱导培养基对怀山药茎尖成苗的影响

处理 编号	培养基配方	接种 数/个	成活 数/个	成苗 率/%	成苗 时间/d
1	MS+KT 2 mg/L+NAA 0.05 mg/L	10	1	10	98
2	MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L	10	2	20	90
3	MS+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L	10	1	10	93
4	MS+KT 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L	10	0	0	—
5	MS+BA 1 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L	10	3	30	90



A. 无愈伤组织;B. 有愈伤组织

图 1 不同诱导培养基条件下山药茎尖形成的苗

2.2 不同培养基对怀山药茎段增殖的影响

从表 2 可以看出,BA 质量浓度在 2.0~3.0 mg/L 时,分枝数高但成苗率相对较低,虽然能分化出芽,但较多为畸形苗,不能生长成正常植株。

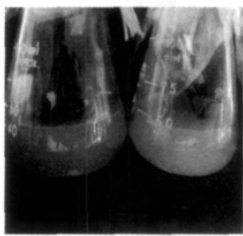
表 2 不同激素对比对怀山药茎段增殖的影响

处理 编号	培养基配方	接种 数/个	分枝 数/个	成苗 数/个	成苗 率/%
1	MS+BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L	22	28	12	54.5
2	MS+BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L	24	23	8	33.3
3	MS+BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L+TDZ 0.3 mg/L	24	21	12	50.0
4	MS+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L	26	16	14	53.8
5	MS+BA 2 mg/L+NAA 1 mg/L	21	15	10	47.6
6	MS+BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L	21	23	23	109.5
7	MS+BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L	24	20	20	83.3
8	MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	28	23	23	82.1
9	MS+BA 0.05 mg/L+NAA 0.1 mg/L	32	25	25	78.1

BA 为 1 mg/L 时,分枝数多且都能成苗,成苗率最高达到 109.5%;而随着 BA 质量浓度的降低,成苗率呈下降趋势。培养基 MS+BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的成苗率最高,是最理想的快繁培养基。处理 3 在处理 2 的基础上添加了低质量浓度的 TDZ(0.3 mg/L),成苗率提高不明显,且 TDZ 诱导愈伤较多,成苗慢,效果不好。

### 2.3 添加 PVP 对怀山药茎段褐化的影响

褐化现象在植物组织培养过程中普遍存在,怀山药的组织培养褐化非常严重,影响组培苗的生长发育,甚至导致死亡。试验结果显示(图 2),添加 0.01%PVP 后茎段褐化现象得到了很大的改善。



左:对照;右:添加 PVP

图 2 添加 PVP 对怀山药茎段褐化的影响

## 3 结论与讨论

### 3.1 怀山药茎尖成苗的限制因素

茎尖成苗的限制因素很多,培养基中不同激素配比是影响茎尖成苗的因素之一,本试验剥取茎尖较少,但剥取的茎尖在诱导培养基上有 50% 以上能够膨大变绿。总体上茎尖长势不强,3 个月左右只有个别成苗,还有部分茎尖颜色鲜绿有活力,但最终未生长成苗,激素配比有待进一步优化。但本研究初步表明,以 BA、KT、NAA 三者配合使用效果优于 KT 与 NAA 配合使用。本试验还发现,茎尖剥取也是非常关键的步骤之一,山药茎尖较细嫩且黏液较多,操作困难,剥取茎尖过小或茎尖损伤会影响后期生长,本试验剥取不带叶原基的茎尖,约 40% 的茎尖未能成活。有研究报道<sup>[13]</sup>,剥取较大茎尖如 3 mm 左右,带 2 个叶原基,这样可减轻操作难度,但可能会影响脱毒效果,因此成苗率与脱毒效果兼顾有待进一步的研究。

### 3.2 不同激素比对怀山药茎段快繁的影响

衡量组培苗快繁的效果不仅考虑增殖系数,还要考虑苗的质量,因为快繁的组培苗最终要移栽大田,用于生产。培养基中 BA 质量浓度较高时可使增殖系数有所提高,但芽的伸长会受到抑制,易出现畸形苗,且成苗慢;低质量浓度的 BA 增殖系数虽然较低,但有利于成苗。本研究结果初步表明,MS+BA

1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 是怀山药快繁最佳的培养基,分枝数较多,成苗率高,且成苗快。

### 3.3 怀山药组培中的褐化问题

怀山药在组织培养过程中的褐化现象非常严重,影响组培苗的生长。影响褐化的因素很多,如外植体的生理状态、培养基成分、基因型等。本研究在培养基中添加了 0.01% 的 PVP,褐化有所减轻,但不能完全控制;添加 PVP 茎段苗的长势有所好转,苗的生长速度也有所加快,PVP 抑制褐化的作用与于倩等<sup>[14]</sup>的报道一致;此外,适时转接、提高转接次数也可以减轻褐化,最适转苗周期有待进一步的优化。

#### 参考文献:

- [1] 尧俊英,刘苏萌,冯昕,等. 山药组织培养研究进展[J]. 河北农业科学,2009,13(9):51-53.
- [2] 邓丽娟. 怀山药的组织培养及相关研究[D]. 成都:四川大学,2007.
- [3] 徐艳霞,魏占彬,王天亮,等. 铁棍山药胚乳愈伤组织的诱导及三倍体植株再生[J]. 安徽农学通报,2009,15(22):15.
- [4] 原正军,任立宏,张红卫. 四大怀药“滋补”焦作[J]. 中国医药指南,2006(8):108-111.
- [5] 李明军,张峰,陈明霞,等. 怀山药病毒病的研究[J]. 中草药,2003(11):3-5.
- [6] 胡选萍,张晓娟. 山药茎尖脱毒技术探讨[J]. 安徽农业科学,2008,36(34):14896-14897.
- [7] Chen Yongqin, Fan Jinyu. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 73:75-80.
- [8] Sang-Kuk Kim, Sang-Chul Lee, Dong-Hyun Shin, et al. Quantification of endogenous gibberellins in leaves and tubers of Chinese yam, *Dioscorea opposita* Thumb. cv. Tsukune during tuber enlargement[J]. Plant Growth Regulation, 2003, 39:125-130.
- [9] 张志勇,梁金平,黄萍萍. 山药茎尖组培及快繁的研究[J]. 上海农业科技,2008(4):82.
- [10] 刘广卿,周玉玲,姜曙光,等. 惠楼山药的脱毒与应用技术[J]. 江苏农业科学,2009(3):47.
- [11] 王红娟,王天亮,白自伟,等. 激素比对怀山药不同外植体诱导不定芽的影响[J]. 河南农业科学,2006(12):73-74.
- [12] 梁方刚,马克莉,李明军,等. 怀山药不同外植体对愈伤组织形成和植株再生的影响[J]. 河南职技师院学报, 2001,29(1):24-27.
- [13] 胡选萍,张晓娟,朱彦涛,等. 山药茎尖脱毒试管苗分化培养基的筛选[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7191-7192.
- [14] 于倩,李明军. 怀山药微型块茎愈伤组织的诱导形成及高频再生[J]. 生态学报,2004,24(5):1022-1026.