

淮山组织培养研究进展

黄枝英, 许朝辉, 周婷, 凌永胜, 郑雅超 (泉州市农业科学研究所, 福建泉州 362212)

摘要 介绍淮山组织培养的国内外研究现状, 包括不同外植体的茎尖培养、愈伤组织诱导、原生质体培养等方法, 总结淮山组织培养的条件和目前存在的问题, 并提出今后的展望。

关键词 淮山; 组织培养; 研究进展

中图分类号 S632.1; Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)28-0029-03

Research Progress on Tissue Culture of *Dioscorea opposita* Thunb

HUANG Zhi-ying, XU Chao-hui, ZHOU Ting et al (Quanzhou Institute of Agricultural Science, Quanzhou, Fujian 362212)

Abstract The advance of *Dioscorea opposita* Thunb tissue culture was introduced at home and abroad, including stem tip culture, callus culture and protoplast culture in the different explants. Culture conditions and main problems in *Dioscorea opposita* Thunb tissue culture were summarized and the development direction in the future was proposed.

Key words *Dioscorea opposita* Thunb; Tissue culture; Research progress

淮山 (*Dioscorea opposita* Thunb) 属薯蓣科薯蓣属一年生或多年生草质藤本植物, 其地下肉质根状茎和地上枝的叶腋着生的零余子皆为产品, 是药食兼用的高效经济作物。我国淮山栽培历史悠久, 自夏、商起就开始种植, 据现代医学研究表明, 淮山含多糖、淀粉、蛋白质、游离氨基酸和微量元素等多种成分, 具有免疫调节、抗氧化、降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗突变、调节脾胃功能等功效^[1-2], 是中国著名的补益中药, 也是传统的保健菜肴。但由于长期营养繁殖, 致使品质退化, 产量降低, 某些优良品种 (如铁棍山药) 已被广大药农放弃种植, 几乎处于濒临灭绝的境地^[3], 因此, 改善品质、提高产量、推广种植优良品种已成为淮山生产中亟待解决的重要问题。植物组织培养技术不仅能保持原有优良性状不变, 同时还可加快品种提纯复壮及繁殖速度, 是目前淮山优良品种迅速推广种植的一条较为实用的途径。

国内外对淮山组培快繁技术的研究早已有之。20世纪70年代中期, 随着植物组培快繁技术开始在薯蓣属植物中得到应用, 不少科研机构和对淮山茎尖、叶片、茎段、零余子等不同外植体的培养进行广泛的研究^[4-8]。笔者对近年来国内外淮山组织培养方面的研究成果, 包括不同外植体的茎尖培养、愈伤组织诱导、原生质体培养, 以及培养基的选择、植物生长调节剂的使用和培养条件等方面进行总结, 提出存在的问题以及今后的展望, 以期为该领域今后的研究提供参考。

1 淮山外植体组织培养

植物组织培养中作为离体培养材料的器官或组织的片段称为外植体, 包括茎尖、茎段、皮层、表皮、块茎、花瓣、根、叶、子叶、鳞茎、胚珠和花药等; 外植体的选取是否恰当对植物组织离体快繁起着至关重要的作用。目前, 淮山组织培养技术使用的外植体主要包括茎段 (带顶芽和腋芽)、叶片、零余子、块茎、珠芽和原生质体等。根据使用的外植体和培养

途径, 淮山组织培养技术可归类为茎尖培养、愈伤组织诱导、体细胞胚胎培养、原生质体培养等。

1.1 茎尖培养 由于植物细胞具有全能性, 因此任何组织或器官在条件适应的情况下均可再生完整植株。但不同种类的植物以及同一植物的不同器官对外界诱导的条件反应敏感程度是不同的。因此, 外植体取材时应选择再生能力强、遗传稳定性好、来源丰富、容易灭菌的器官, 对于大多数植物来说, 茎尖是最佳的外植体材料, 其形态已基本建成, 生长速度快, 遗传性稳定, 是获得无病毒苗的重要途径。

淮山茎尖培养多以零余子或块茎上萌发的幼苗茎段 (顶芽和腋芽) 作为外植体进行培养。南怀林等^[9]以山药茎尖为外植体诱导形成试管苗, 结果表明, 用长 0.3~2.0 mm 的茎尖培养时, 成苗率与茎尖长度呈正相关; 不同来源的茎尖, 成苗率没太大区别, 但以大田茎尖形成的试管苗质量最好。张志勇等^[10]通过对具有闽西地方特色的山药优良品种 (龙岩市新罗怀山药) 进行茎尖组培试验, 发现最适宜新罗怀山药茎尖诱导成苗的培养基配方为 MS+2.0 mol/L KT+0.2 mol/L NAA, 其诱导的成苗率高达 60%, 成苗较快, 同时指出细胞分裂素 KT 比 6-BA 更有利于新罗怀山药的茎尖诱导成苗。李明军^[11]研究怀山药带节茎段, 指出带节茎段在 Ms+1~2 mol/L 6-BA+0.1~1.0 mol/L NAA 培养基上培养, 均能直接形成多芽体, 均芽数为 3~5 个, 将多芽体转入 MS 或 MS+2 mol/L KT+0.02 mol/L NAA+0.1 mol/L PP₃₃₃ 的培养基上均能诱导生根, 形成再生植株。许多研究表明利用淮山茎段为外植体, 生长势较旺盛, 带菌较少, 可直接分化出多芽体, 不容易变异, 是淮山茎尖组织培养的优良材料。

1.2 愈伤组织培养 植物的根、茎、叶、花、果实和种子等器官及其组织, 均可培养产生愈伤组织, 并能不断继代培养, 用以研究植物的生长与发育, 脱分化与再分化, 遗传变异与育种。因此, 愈伤组织是植物离体培养与生物工程的良好试验体系。

李明军等^[12]认为不同基因型山药 (铁棍山药、“47号”山药和太谷山药) 均能诱导形成愈伤组织, 但出愈率不同; 同一基因型外植体 (零余子、叶片、茎段、茎尖) 不同, 对愈伤组

基金项目 泉州市科技计划重点项目 (2014N22); 泉州市推进淮山产业发展的实施方案 (泉农[2014]115号)。

作者简介 黄枝英 (1980—), 女, 福建漳州人, 助理研究员, 硕士, 从事植物生物技术研究。

收稿日期 2018-05-24

织诱导的效果也不同,即茎尖优于零余子;而零余子的出愈率优于茎段、叶片,这与梁方刚等^[13]的研究结论是一致的。同时指出细胞分裂素和生长素二者配合使用可诱导形成愈伤组织,植物激素种类、浓度和配比不同,出愈率也不同,说明植物激素按一定比例进行组合是诱导愈伤组织形成的关键因子。

1.3 原生质体培养 植物原生质体在适宜的条件下具有再生成与其亲本相近个体的全能性,可经离体培养得到再生植株。借助原生质体培养及诱导融合技术可获得杂种和多倍体植株,可有效克服植物有性杂交不亲和现象,有利于培育新品种^[14]。

关于马铃薯^[15]和甘薯^[16]等原生质体再生试验国内外已有相关报道,但关于淮山原生质体培养的报道较少。Tor等^[17]研究山药原生质体的培养,结果表明,在合适的培养条件下,山药生长早期叶片(长度<110 cm)可以诱导出生产量和存活力都较高的原生质体。原生质体培养技术要求较高,难度大,目前还需要经过探索和研究,以促进育种工作的进行。

此外,20世纪80年代,一些研究者对薯蓣植物体细胞胚胎培养进行研究,目前有些种离体培养胚胎的萌发率可达100%。薯蓣属植物体胚培养的再生植株,叶形、大小和倍性水平变异很大,从二倍体到多倍体到非整倍体,偶见白化突变型和花叶植株^[18]。虽然现在利用体胚培养还不可能进行薯蓣植物的大量、快速繁殖,但是利用体胚培养获得的优良个体作为育种和细胞、组织培养的起始材料仍有一定意义。在植物细胞培养方面,我国已开展盾叶薯蓣高皂素含量植株的细胞连续培养研究以及三角叶薯蓣的细胞培养。随着科技的不断发展,这方面的技术将越来越成熟,能够更好地促进育种工作的进行。

1.4 培养基的选择 关于薯蓣植物的快速繁殖,培养基类型是其组织培养的重要影响因素,大部分学者以MS为基本培养基;也有人以改良MS、B5和MS培养基混合为基本培养基探讨培养基类型对组织培养的影响^[19]。牛洁等^[20]以毕克齐山药零余子为外植体,以MS、3/4MS、1/2MS和1/4MS为基本培养基,在无附加激素的情况下,1/4MS培养基上零余子诱导率最高,为40%,不加激素MS培养基上的诱导率最低。孟玲等^[19]用盾叶薯蓣的腋芽和顶芽作外植体,试验MS与B5组合的5种培养基对芽诱导的影响,发现MS与B5混合培养基中添加AgNO₃,对芽的诱导有显著地促进作用;采用1/2MS为基本培养基对盾叶薯蓣的生根效果最好。总的来说,在淮山组织培养中,供试品种及其外植体类型不同,基本培养基类亦不同,但以MS为基本培养基居多。

1.5 植物生长调节剂的使用 在淮山组织培养中,使用的生长素类有NAA和2,4-D,细胞分裂素类有6-BA、KT、BAP和2ip等^[21],但最常见的是将生长素NAA和分裂素6-BA组合使用。李明军等^[11-12]认为,在愈伤组织诱导过程中,在没有或单独使用1种激素的培养基上均不能诱导愈伤组织的形成,而细胞分裂素和生长素二者配合使用则可以诱导形

成愈伤组织,同时也指出PP₃₃₃具有抑制愈伤组织形成的作用,而GA₃与6-BA、NAA组合使用对愈伤的诱导具有协同促进作用。

除6-BA与NAA作为主要的诱导激素外,已有研究表明添加KT、PP₃₃₃、10%的椰汁等激素或天然物质对芽诱导具有不同程度的促进效应。李明军^[11]研究指出在多芽体的形成过程中,PP₃₃₃促使多芽体中芽的数目增多,对多芽分化有促进作用,并认为可能是通过降低茎段内源GA的含量实现的。苏超等^[22]对细毛山药茎尖培养的研究指出KT促进不定芽再生,其成苗作用显著优于6-BA,KT与NAA或IAA组合对细毛山药的组培苗建立和繁殖有良好作用。

一般认为器官分化的倾向是取决于内源细胞分裂素(CK)和生长素的平衡,由于植物的外植体中原有的内源激素种类和浓度不同,为达到这种平衡,需要补加的激素种类及浓度也就不同。相关的研究也指出淮山腋芽、愈伤组织等诱导培养及植株再生,受品种基因型和培养基中激素配比双重因素的制约,品种间对外源激素有较强的选择性^[23]。

1.6 培养条件 培养条件包括温度、光照、湿度等,是影响组培试验成败的关键因素。淮山适宜温暖气候,25~28℃为生长最适宜温度,模拟其生长的最适温度,使培养室温度一般为25℃,结果表明在该温度下组培苗生长良好。

淮山组织培养受光照条件影响较大,不同外植体在光、暗条件下愈伤组织的诱导情况不同。李明军等^[12]认为,在暗处有利于零余子的诱导,而在光下则有利于叶片的诱导。对零余子和叶片来说,光下褐化严重,而在暗处则褐化较轻或无褐化。尧俊英等^[24]研究指出光暗条件不但影响培养物的生长速度,而且影响其形态建成。

光质是组织培养过程中重要的外部影响因素,主要是作为光信号来调节植物的生长、分化和代谢。不同光质条件下,植物愈伤组织的形成及分化存在一定的差异^[25-26]。郭君丽等^[27-28]研究不同光质对47号山药愈伤组织诱导生长的影响,认为红光和黄光对47号山药零余子愈伤组织的生长有促进作用,而绿光会抑制生长;红光对47号怀山药叶片的愈伤组织的生长有促进作用;有研究表明,白光和红光有利于促进铁棍山药试管苗的生根^[29]。此外,光质不仅影响体外形态发生的表达,而且影响其生理生化特性的变化。郭君丽等^[30]研究认为,蓝光下47号怀山药叶片愈伤组织中的蛋白质含量明显高于其他几种光质,蓝光有利于愈伤组织中可溶性蛋白的形成。根据诸多报道认为其原因有以下两方面:一是蓝光促进蛋白质的合成;二是蓝光阻止蛋白质的丧失^[31]。

淮山组织培养还受光照强度、光照时间、pH和湿度等培养条件的影响。大部分研究认为,淮山较合适的光照强度为1500~2500 lx,光照时数为10~16 h/d,pH为5.8~6.0,相对湿度一般要求在70%~80%。

2 存在的问题

2.1 褐化 淮山含有较多的酚类和醌类化合物,在组织培养过程中,由于外植体组织被切割和接种快繁时,损伤切面细胞中酚类物质(底物)在酚氧化酶的作用下与氧气聚合发生

氧化反应,形成有毒的醌类物质,使得外植体切面迅速变成棕褐色或暗褐色,并逐步扩散至培养基中,抑制其他酶的活性,导致组织代谢紊乱,生长受抑制,甚至最终致使外植体死亡。试验研究认为,外植体的生理状态和部位、取材时间和大小、受伤程度及所用消毒剂等对褐化有一定程度的影响。

目前,克服或减轻淮山组培过程中褐化的方法主要有以下几种:一是选择合适的外植体材料,一般生长发育旺盛的培养物,其褐化程度明显较小,有研究表明山药植株后期结出的零余子褐化程度最严重,而幼嫩节间部褐化程度较轻^[32];二是在培养基中添加褐变抑制剂与吸附剂,褐变抑制剂主要包括抗氧化剂和PPO抑制剂,如抗坏血酸、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等^[32-33]、吸附剂如活性炭等^[34];三是适时切除培养物的褐化部分,适时转接,提高转接次数,随继代次数增多,使褐化逐渐减轻,从而不影响组织生长和芽分化^[35]。此外,还要选择合适的培养基和培养条件,有研究表明采用液体培养基以及降低培养温度和光照强度可以有效降低外植体褐变的程度^[32]。当然,影响褐变的因素很多,因此在取材时,为了防止褐变的发生,要考虑多方面因素的影响。

2.2 组培苗移栽成活率低 不同淮山品种之间组培苗移栽成活率差异较大,但总的来说,移栽成活率不高。主要原因是淮山组培苗炼苗之前生长在培养瓶中,里面的光照、温度、湿度、营养水平、渗透压等都比较稳定,根系的自主吸收能力比较弱,移植后,一旦驯化管理不当,根系乃至整株植株一时适应不了外界的环境条件而导致种苗死亡。因此,为了提高移栽成活率,组培苗首先应该在生根阶段进行壮苗,提高不定根质量;其次,在移栽前进行炼苗,提高组培苗适应环境的能力;第三,在移植时,要选择好适合其生长的栽培基质。相关的研究指出在淮山组培苗的假植过程中,园土(CK)较黏重,透气性不良,根系生长缓慢,容易死亡,不宜直接移植到大田中,应选择疏松、透气的基质假植,等淮山苗健壮时,再进行定植^[36-38]。

3 展望

淮山是集加工、医药、保健、食品、蔬菜等于一身的高效经济作物,发展淮山产业,不仅可以有效地提高农民收入,而且通过加工业、医药业的发展,还可以更大限度地提高淮山附加值,带动第三产业和经济发展。尤其是近年来,植物组织培养技术日臻完善,淮山离体培养技术也得到迅速发展,这将会大大提高淮山的育种效率,加快淮山品种改良和产业化的进程。同时可以结合基因工程将抗病基因转入栽培品种;也可以与分子生物学方法结合起来,在细胞水平上进行遗传修饰,重组DNA,从而开辟淮山良种繁育的新途径。

参考文献

[1] 袁书林.山药的化学成分和生物活性作用研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(3):176-179.
[2] 陈艳,姚成.淮山中氨基酸含量的测定[J].氨基酸和生物资源,2014,26(2):47-48.
[3] 李明军,李金亭,朱命炜,等.怀山药的离体繁殖[J].中草药,1999,30(4):296-298.

[4] 李明军,杨建伟,张嘉宝.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.
[5] 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.
[6] 李明军,刘萍,张嘉宝.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.
[7] LAUZER D, LAUBLIN G, VINCENT G, et al. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch. and *D. mangelotiana* Miège [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1992, 28(2): 215-223.
[8] KOHMURA H, ARAKI H, IMOTO M. Micropropagation of 'Yamatoimo', Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1995, 40(2): 271-276.
[9] 南怀林,刘建平,王耀琴.山药茎尖繁殖技术的研究[J].作物杂志,2005(6):34-36.
[10] 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.
[11] 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.
[12] 李明军,薛建平,陈明霞,等.不同因子对山药愈伤组织诱导的影响[J].广西植物,2000,20(2):156-160.
[13] 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.
[14] 彭部锋,陆佳,陈永忠,等.木本植物原生质体培养体系研究进展[J].中国农学通报,2013,29(1):1-6.
[15] 李强,刘庆昌,马代夫.甘薯原生质体培养研究进展[J].杂粮作物,2004,24(5):271-274.
[16] 孙雪梅.马铃薯原生质体培养研究进展[J].黑龙江农业科学,2011(1):134-136.
[17] TOR M, TWYFORD C T, FUNES I, et al. Isolation and culture of protoplasts from immature leaves and embryogenic cell suspensions of *Dioscorea* yams: Tools for transient gene expression studies [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1998, 53(2): 113-126.
[18] 徐向丽.薯蓣植物组织培养研究进展[J].湖南林业科技,2000,27(1):5-9.
[19] 孟玲,朱宏涛,刘锡葵,等.盾叶薯蓣的快速繁殖[J].天然产物研究与开发,2000,12(6):17-21.
[20] 牛浩,霍秀文,梁慧宇,等.毕克齐山药离体培养诱导再生植株的研究[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2011,32(2):119-122.
[21] CHEN Y Q, FAN J Y, YI F, et al. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2003, 73(1): 75-80.
[22] 苏超,刘盼娜,袁金红,等.影响细毛山药离体快繁和再生因素的研究[J].种子,2012,31(2):48-50,56.
[23] 唐君,赵冬兰,张允刚. NAA 和几种细胞分裂素对怀山药离体快繁的影响[J].中国农学通报,2005,21(12):83-85.
[24] 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.
[25] 张真,李胜,李唯,等.不同光质对葡萄愈伤组织增殖和白藜芦醇含量的影响[J].植物生理学通讯,2008,44(1):106-108.
[26] 刘浩,李胜,马绍英,等.LED 不同光质对萝卜愈伤组织诱导、增殖和萝卜硫素含量的影响[J].植物生理学通讯,2010,46(4):347-350.
[27] 郭君丽,张晓丽,李明军,等.不同光质对 47 号山药零余子愈伤组织诱导的影响[J].河南师范大学学报(自然科学版),2013,41(4):145-148.
[28] 郭君丽,王俊甫,李明军,等.光质对怀山药微型块茎诱导形成的影响[J].浙江万里学院学报,2006,19(2):91-93.
[29] 郭君丽,王俊甫,张晓丽,等.光质对铁棍山药试管苗生根的影响[J].河南农业科学,2013,42(2):101-104.
[30] 郭君丽,王俊甫,蒋福稳,等.光质和 2,4-D 对 47 号怀山药叶片愈伤组织诱导形成的影响[J].北方园艺,2012(15):174-176.
[31] 李韶山,潘瑞焯.蓝光对水稻幼苗碳水化合物和蛋白质代谢的调节[J].植物生理学报,1995,21(1):22-28.
[32] 蔡建荣.山药组织培养褐化反应的研究[J].中国农学通报,2008,24(8):118-120.
[33] 廖明星,朱定和,罗杰宇.韶关淮山多酚氧化酶酶学特性研究[J].广东农业科学,2012,39(4):81-83.
[34] 蔡建荣.山药茎段愈伤组织褐变与外源药物抑制效应的研究[J].浙江农业科学,2008(5):523-525.
[35] 陈菲,李黎,宫伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺,2005(2):69.
[36] 王景飞,黄赛,戚华沙,等.淮山组培苗的移栽驯化技术分析[J].中国园艺文摘,2014(12):30-31.
[37] 王长龙.不同基质对淮山组培苗移植成活率的影响[J].农业与技术,2006,26(4):82-83.
[38] 杨培新,陈少雄,王长龙,等.淮山药组培苗假植基质的初步研究[J].安徽农业科学,2007,35(9):2561,2565.