



王葡萄, 孙静宇, 单楠, 等. 南城淮山脱毒苗培养及扦插繁殖研究[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(4): 832–840.
WANG P T, SUN J Y, SHAN N, et al. Study on virus-free seedling culture and cuttage propagation of tuber of Nancheng Huaishan[J].
Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(4): 832–840.

南城淮山脱毒苗培养及扦插繁殖研究

王葡萄^{1,2}, 孙静宇^{1,2}, 单楠^{1,2}, 朱强龙^{1,2}, 肖遥^{1,2}, 张宏玉^{1,2},
陈欣^{1,2}, 胡锐^{1,2}, 黄英金^{1,2*}, 周庆红^{1,2*}

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省薯芋生物学重点实验室, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】研究构建江西名优地方特色山药品种南城淮山脱毒快繁技术体系, 为其健康种薯工厂化生产提供重要技术支撑。【方法】以南城淮山健壮植株茎蔓腋芽为外植体, 采用组培技术进行茎尖脱毒和试管苗培养、利用 RT-PCR 技术对试管苗脱毒效果进行检测, 并利用茎节微扦插和带叶茎节扦插技术开展脱毒苗增殖及快繁种薯研究。【结果】剥取南城淮山茎蔓腋芽 0.2~0.3 mm 的茎尖接种于 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基中成苗率达 80%; 利用 RT-PCR 技术对试管苗进行病毒检测, 表明茎尖培养能够有效脱除日本山药花叶病毒 (JYMV)、马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVD); 脱毒试管苗茎节微扦插增殖的最佳培养基为: MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 在培养基中添加 1.5 g/L 活性炭 (AC) 后, 可有效抑制试管苗褐化; 试管苗移栽 30 d 后, 剪取移栽苗带叶茎节并蘸取 100 mg/L NAA 溶液进行扦插, 扦插苗 7 d 生根率达 96.7%, 120 d 所结种薯平均质量为 28.09 g, 符合生产用种标准。【结论】茎尖培养可有效脱除南城淮山植株多种病毒, 结合微扦插和带叶茎节扦插技术, 可实现南城淮山脱毒苗和健康种薯的快速繁育。

关键词: 南城淮山; 茎尖脱毒培养; 病毒检测; 微扦插; 种薯快繁

中图分类号: S632.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2022)04-0832-09

Study on Virus-free Seedling Culture and Cuttage Propagation of Tuber of Nancheng Huaishan

WANG Putao^{1,2}, SUN Jingyu^{1,2}, SHAN Nan^{1,2}, ZHU Qianglong^{1,2},
XIAO Yao^{1,2}, Zhang Hongyu^{1,2}, CHEN Xin^{1,2}, HU Rui^{1,2},
HUANG Yingjin^{1,2*}, ZHOU Qinghong^{1,2*}

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of Tuber and Root Plant Biology, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] This study aims to construct the virus-free and rapid propagation technology system of the local well-known yam of Nancheng Huaishan (*Dioscorea opposita*) in Jiangxi province, thus provide important technical support for the factory production of the vigorous tubers. [Method] Taking the axillary buds

收稿日期: 2021-12-27 修回日期: 2022-03-11

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20192BBF60005, 20201BBF61002)

Project supported by the Jiangxi Province Key Research and Development Projects (20192BBF60005, 20201BBF61002)

作者简介: 王葡萄, orcid.org/0000-0001-9294-7370, wangputao_kele@126.com; *通信作者: 黄英金, 教授, 博士, 主要从事植物种质创制与基因组学研究, orcid.org/0000-0002-8256-1383, yjhuang_cn@126.com; 周庆红, 教授, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, orcid.org/0000-0002-8552-7738, qinghongzhou@126.com。

of vines of healthy and robust Nancheng Huaishan as experimental material, this study implemented the detoxification of shoot tip and cultivation of seedlings in vitro by tissue culture technique. In addition, RT-PCR was adopted to detect the virus-free effect of test tube seedlings, and the microcuttings of stem node and cuttings of stem node with leaves were used for the proliferation of virus-free seedlings and rapid propagation of tubers with. [Result] The results showed that the seedling survival rate reached 80% of 0.2–0.3 mm shoot tips of vines auxillary bud of Nancheng Huaishan yam with inoculation on the medium of MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, and RT-PCR detection indicated that Japanese yam mosaic virus (JYMV), potato virus Y (PVY) and potato spindle tuber-like virus (PSTVD) could be eliminated effectively from test-tube plantlets. In addition, the optimal medium for the micro-cuttage of stem node of virus-free seedlings was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+30 g/L sucrose+6.5 g/L agar. The browning reaction of virus-free seedlings could be inhibited effectively by adding 1.5 g/L activated carbon on medium. After 30 days of transplanting, the stem node with one leaf as cutting dipped in 100 mg/L NAA solution 1 hour was used for propagation of seed tubers. The rooting rate of cuttings was 96.7% 7 d later, and the average weight of seed tubers was 28.09 g 120 d after cutting, and the tubers could be used as seed tuber for production. [Conclusion] Stem tip culture could effectively remove multiplex viruses from plants of Nancheng Huaishan yam, and the combination of microcuttings and the cuttings of stem node could rapidly propagate the virus-free seedlings and vigorous tubers.

Keywords: Nancheng Huaishan; stem tip virus-free culture; virus detection; micro-cutting; rapid propagation of tubers

【研究意义】山药(*Dioscorea* L.)为薯蓣科薯蓣属攀缘草本植物,其地下块茎营养丰富、药用价值高,是粮、菜、药兼用的特色经济作物^[1]。江西是我国地道山药的主产区之一,出产的山药品质上乘,南城淮山是江西省传统名优地方山药品种,2011年获全国农产品地理标志,其产地南城县也是中国三大淮山生产地之一^[2]。南城淮山光条和淮山饮片是“建昌帮”中药体系中的当家药材,产品远销东南亚及港台地区^[3]。然而,由于南城淮山长期以地下块茎做种,植株病毒累积,造成山药种性不断退化、产量和品质逐年下降,块茎商品率低,严重影响了种植户的积极性^[4]。另外南城淮山以可食用部位繁殖,成本高,投入大,从而制约了南城淮山的种植规模和产业化发展。开展南城淮山脱毒苗培养及扦插繁殖研究,构建其脱毒种薯繁殖技术体系,可为南城淮山种性恢复和健康种薯快繁、工厂化生产提供重要技术支撑。【前人研究进展】现已报道的侵染山药植株的病毒种类主要有山药坏死花叶病毒(yam necrotic mosaic virus YNMV)、山药温和花叶病毒(Yam mild mosaic virus YMMV)、日本山药花叶病毒(Japanese yam mosaic virus JYMV)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y PVY)、马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus PLRV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus CMV)等^[5-7],病毒一般通过粉蚜、蚜虫和机械损伤传播^[8-9],感染病毒的山药植株叶片通常表现为脉间花叶、卷曲和发育不良等,从而导致山药块茎产量和品质的下降^[10-11]。目前,防治植物病毒病最经济有效的途径是采用茎尖培养获得无病毒种苗。对山药植株茎尖进行离体培养,获得脱毒试管苗,利用脱毒苗繁殖健康种薯,是解决山药病毒病的根本方法之一^[12]。

【本研究切入点】近年来,研究人员对铁棍山药、惠楼山药、佛手山药等地方山药品种开展了茎尖脱毒培养相关研究^[13-16],表明不同地方品种茎尖脱毒培养条件和培养效果存在较大差异。此外,通过诱导愈伤组织分化产生丛生芽是实现试管苗增殖的常用方法,但一般培养周期长,且常常发生性状的遗传变异^[17]。白玉娥等^[18]、张映卿等^[19]以腋芽为外植体进行微扦插研究,结果表明试管苗生长速度快,繁殖系数高,且遗传稳定性好;再者,扦插技术被广泛应用于作物的快速无性繁殖,近几年研究人员也在陆续探索山药的扦插繁殖技术^[20-21],为节省山药块茎生产用种开辟了一条新途径。【拟解决的关键问题】为解决南城种源带病毒导致种性退化,缺乏脱毒快繁技术体系等问题,本研究以江西名优特色山药品种南城淮山为研究对象,系统开展其茎尖脱毒培养、脱毒苗微扦插快繁、带叶茎节扦插繁殖等研究,旨在为南城淮山脱毒健康种薯获得以及工厂化生产提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 供试材料

选取江西农业大学山药种质资源圃中南城淮山的健壮植株,取其茎蔓腋芽(图1a,图1b)为外植体。

1.2 方法

1.2.1 茎尖脱毒培养 将南城淮山藤蔓腋芽切下,自来水快速冲洗干净,置于超净工作台上,无菌水冲洗1次,体积分数为75%乙醇浸泡30 s,无菌水洗3~4次,质量分数为0.1% HgCl_2 消毒8 min后,无菌水重复洗3~4次,于解剖镜下将山药茎尖由外到内剥离至0.2~0.3 mm大小,随后将剥离的茎尖(图1c)分别接种在添加有0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA、0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA的MS培养基上,每种培养基接种20个,3次重复,培养30 d后统计茎尖的成活率与成苗率。

1.2.2 试管苗病毒检测与继代增殖 随机选取大田种植的南城淮山叶片与茎尖培养的试管苗叶片(90 d),利用RNA提取试剂盒(北京宝日生物科技有限公司)提取RNA,参考TaKaRa反转录试剂盒进行cDNA合成。

参照前人报道^[22-26]设计相关病毒检测引物(北京擎科生物技术有限公司合成)。PCR总体系为20 μL : 10 μL 2X TSingKe Master mix, 2 μL cDNA, 正向引物0.5 μL , 反向引物0.5 μL , 7 μL dd H_2O 。95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。通过PCR扩增得到的PCR产物,经质量分数为1%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照(表1)。

表1 山药病毒类型及引物
Tab.1 Virus types and primers of yam

引物 Primer	正向引物 Forward primers	反向引物 Reverse primers	大小/bp Size
JYMV	CATGGCTTATTTRGVCARGCTC	CATTACCTACACATAGCTTAC	1 100
PVY	GCCAACTGTGATGAATGGGC	TGTACTGATGC-CACCGTCCA	400
PVX	ATGTCAGCACCAGCTAGCAC	GGATCCTTATGGTGCTGGTAGAG	720
PVS	ATGGGTGATTCAACGAAGAAGCTG	GCTTGGGACCTTGCAAAATAGCAC	642
PSTVD	ATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAAC	CCCTGAAGCGCTCCTCCGAG	360

将检测后的脱毒苗接种在4种添加不同浓度6-BA和NAA(0.5 mg/L+0.1 mg/L、1.0 mg/L+0.5 mg/L、2.0 mg/L+0.1 mg/L、3.0 mg/L+0.3 mg/L)的MS培养基上,培养60 d后统计脱毒苗增殖系数。

1.2.3 试管苗微扦插快繁 取长至3~5 cm高长势较好的试管苗,在超净工作台将带腋芽茎段切下(图2b),分别接种在添加有0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA、2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA的MS培养基上,每种培养基接种20个外植体,重复3次,待腋芽萌发后长成完整植株,统计生根率;间隔30 d反复进行以上操作,进行规模快繁,每继代1次,调查增殖系数与生根率。此外,在此培养基中分别加入1.5 g/L活性炭、0.01 g/L VC、0.15 g/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP),每个处理接种20个外植体,重复3次,培养15 d时统计试管苗褐化率。

1.2.4 试管苗移栽与扦插繁种 将微扦插培养的5 cm高生根试管苗,移栽到基质配比为草炭:珍珠岩:蛭石=5:1:1的营养钵中培养(图3a),浇足水分置于培养室中,给予弱光照,保持基质湿润,缓苗后正常管理。30 d后对健壮生长的南城淮山脱毒苗藤蔓(图3b),剪成单叶单节插穗(图3c),各插穗茎节处分别浸泡于0, 50, 100, 150 mg/L NAA溶液中1 h,后扦插于32穴育苗盘基质中,基质配比为草炭:珍珠岩:蛭石=5:1:1,茎节处深入基质下1.5 cm深。每处理浓度扦插20株,每穴扦插1株,重复3次。扦插后及时浇透水,并搭棚遮荫,保持基质及棚内湿度,生根成活后去掉遮阳网,常规管理。扦插14 d时调查插穗生根率,45 d时调查插穗出苗率,120 d时统计新生脱毒薯块的横纵径及质量。

1.2.5 数据分析 采用Excel 2007和SPSS 17.0软件进行数据统计和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对南城淮山茎尖成活率的影响

由表 2 可知,不同激素配比对南城淮山茎尖成活率的影响差异显著。南城淮山茎尖在 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基中成活率(85%)显著高于其他培养基,其成苗率也最高,为 80%。此外,由图 1d、图 1e、图 1f、图 1g 和图 1h 可以看出,接种的健康茎尖分生组织在 10 d 左右开始转绿,30 d 后明显膨大,60 d 时第 1 片叶长出并展平。

表 2 不同浓度 6-BA 与 NAA 对茎尖成活的影响
Tab.2 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA on survival of stem tips

培养基编号 Medium number	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	成活率/% Surviving rate	成苗率/% Seedling rate
1	0.5	0.1	45.00±0.12 ^c	30.00±0.11 ^c
2	0.5	0.5	30.00±0.09 ^c	15.00±0.04 ^c
3	1.0	0.1	85.00±0.15 ^a	80.00±0.13 ^a
4	1.0	0.5	65.00±0.23 ^b	50.00±0.19 ^b

不同小写字母表示不同处理间存在显著差异($P<0.05$)。
Different letters indicate the significant differences among various treatments at $P<0.05$.

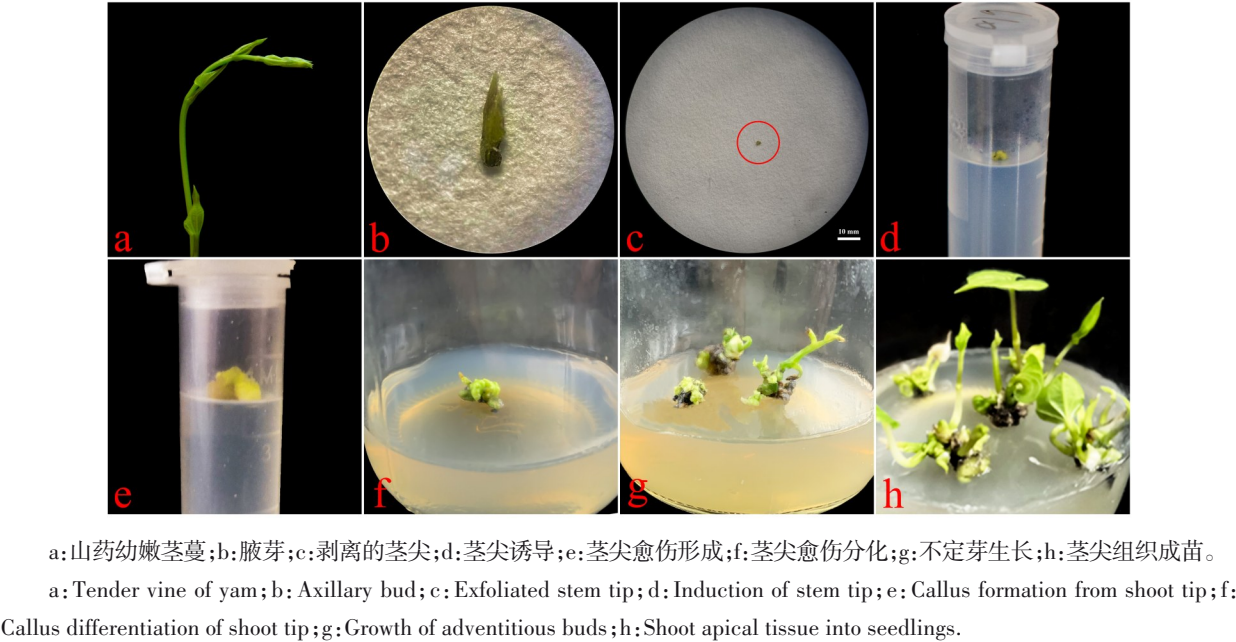


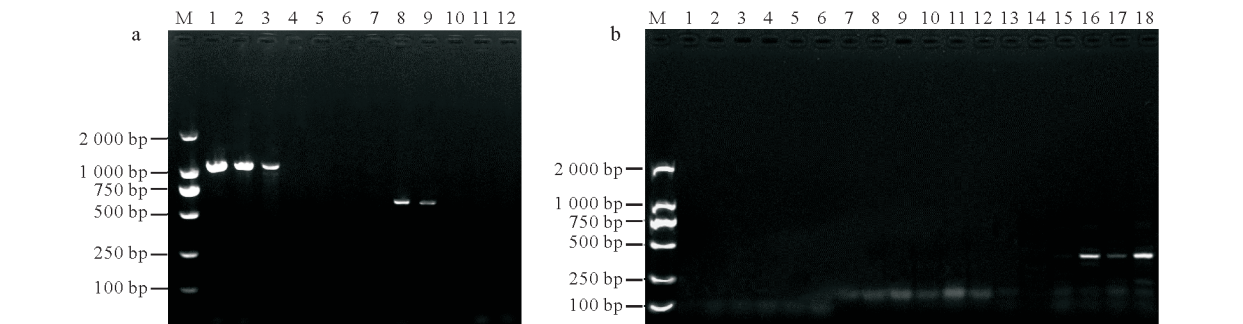
图 1 南城淮山茎尖培养
Fig.1 Culture of stem tip of Nancheng Huaishan

2.2 试管苗 RT-PCR 病毒检测

对茎尖培养的试管苗进行 RT-PCR 病毒检测,结果(图 2)表明,大田植株材料共检测到日本花叶病毒(JYMV)、马铃薯 Y 病毒(PVY)与马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVD)等 3 类病毒,其对应的病毒序列片段分别为 1 100,581,360 bp,所有试管苗中均未扩增出 JYMV、PVY 与 PSTVD 病毒。此外,大田植株与试管苗叶片中均未检测到马铃薯 S 病毒(PVS)与马铃薯 X 病毒(PVX)。

2.3 不同激素配比对脱毒苗增殖的影响

将检测后的脱毒苗接种至 4 种增殖培养基上,生长 60 d 后统计增殖系数,结果见表 3 所示。由表 3 可知,4 个不同浓度 6-BA 与 NAA 的组合均可诱导脱毒苗增殖和分化。其中,脱毒苗在 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基上的增殖系数达到 4.5,显著高于其他培养基,是脱毒苗增殖的最佳激素配比。在 3.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA 的 MS 培养基上的脱毒苗增殖系数最低,多数直接分化成苗,未发生增殖。



a:JYMV 与 PVY 检测,1~3:大田植株 JYMV 检测,4~6:试管苗 JYMV 检测,7~9:大田植株 PVY 检测,10~12:试管苗 PVY 检测;b:PVS、PVX 与 PSTVD 检测,1~3:试管苗 PVS 检测,4~6:大田植株 PVS 检测,7~9:试管苗 PVX 检测,10~12:大田植株 PVX 检测,13~15:试管苗 PSTVD 检测,16~18:大田植株 PSTVD 检测,M:DL 2 000。

a:JYMV and PVY detection, 1~3:Detection of JYMV of field plants, 4~6:Detection of JYMV of test tube seedling, 7~9:Detection of PVY of field plants, 10~12:Detection of PVY of test tube seedling;b: PVS, PVX and PSTVD, 1~3:Detection of PVS of test tube seedling, 4~6:Detection of PVS of field plants, 7~9:Detection of PVX of test tube seedling detection, 10~12:Detection of PVX of field plants, 13~15:Detection of PSTVD of test tube seedling, 16~18:Detection of PSTVD of field plant, M:DL 2 000.

图2 大田植株及试管苗叶片 RT-PCR 病毒检测

Fig.2 Virus detection of leaves from field and in vitro plantlet by RT-PCR

表3 不同浓度 6-BA 与 NAA 对脱毒苗增殖的影响

Tab.3 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA on proliferation of virus-free vaccine				
培养基编号 Medium number	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	接种数 Number of vaccination	增殖系数 Growth modulus
1	0.5	0.1	20	2.00 ^b
2	1.0	0.5	20	4.50 ^a
3	2.0	0.1	20	2.30 ^b
4	3.0	0.3	20	1.20 ^{bc}

不同小写字母表示不同处理间存在显著差异($P<0.05$)。
Different letters indicate the significant differences among various treatments at $P<0.05$.

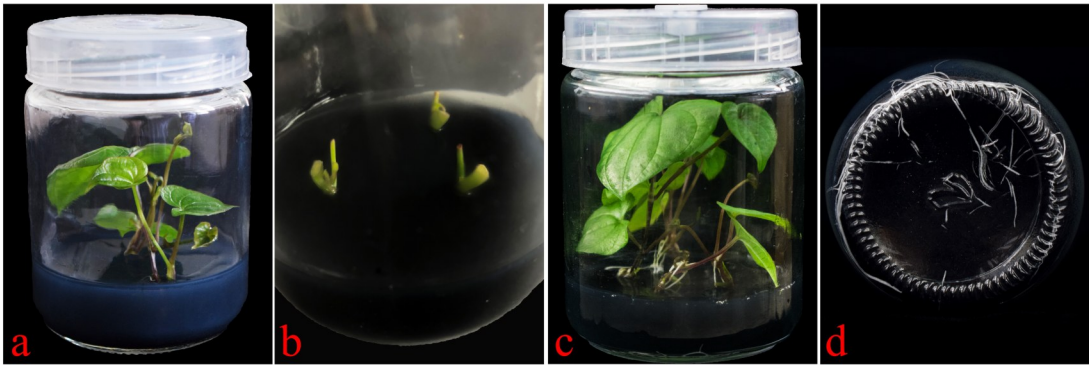
2.4 不同激素配比对试管苗微扦插快繁的影响

由表4可以看出,在MS培养基中加入不同浓度的6-BA 与 NAA 均能使脱毒苗茎段诱导出新芽,但诱导效果差异显著。将带腋芽的茎段接入 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基中,5~7 d 后侧芽萌动,出芽率为 98.33%,诱导效果最佳,25 d 侧芽长成健壮的脱毒试管苗,且生根率达到 100%,增殖系数为 5.93,茎段未见分化出愈伤组织(图 3c,图 3d)。在 MS 培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA 与 0.5 mg/L NAA 时,茎基部形成少量愈伤组织并很快褐化,茎段出芽率最低,为 53.33%,增殖系数为 1.60,未见有根生成。

表4 不同浓度 6-BA 与 NAA 对试管苗茎段快繁与生根的影响

Tab.4 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA on stem rapid propagation and grow root of test tube seedling					
培养基编号 Medium number	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	出芽率/% Bud ratio	增殖系数 Growth modulus	生根率/% Rooting percentage
1	0.5	0.5	60.00±0.03 ^c	1.80±0.09 ^c	25 ^{bc}
2	1.0	0.1	81.67±0.02 ^b	2.47±0.04 ^b	42 ^b
3	1.0	0.5	53.33±0.03 ^c	1.60±0.10 ^c	0 ^d
4	2.0	0.2	98.33±0.02 ^a	5.93±0.07 ^a	100 ^a

不同小写字母表示不同处理间存在显著差异($P<0.05$)。
Different letters indicate the significant differences among various treatments at $P<0.05$.



a:脱毒苗健壮生长;b:茎节微扦插;c:微扦插增殖培养;d:脱毒苗生根。
a:Robust growth of virus-free seedlings;b:Microcuttings of stem nodes;
c:Culture of microcuttage pro-pagation;d:Root of virus-free seedlings.

图3 试管苗茎段微扦插成苗

Fig.3 Seedling formation of test-tube stem by microcuttage

2.5 抗褐化剂对试管苗生长的影响

如表 5 所示,在前期筛选出的试管苗微扦插成苗最适的 MS 培养基中分别加入不同浓度的活性炭 (AC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)与 VC 等抗褐化剂,与空白对照相比,三者均能抑制试管苗的褐化。其中,培养基中添加 1.5 g/L AC,其试管苗褐化率最低,为 10.33%,显著低于 PVP 与 VC 处理,添加 1.5 g/L PVP 后试管苗的褐化率最高,达到 68.33%。

表 5 不同抗褐化剂对试管苗褐化的影响

Tab.5 Effect of different browning agent in media on browning rate of test tube seedling		
抗褐化剂种类	浓度/(g·L ⁻¹)	褐化率
Types of browning agents	Concentration	Browning rate
活性炭 Activated carbon(AC)	1.50	10.33±0.03 ^d
聚乙烯吡咯烷酮 Polyvinylpyrrolidone(PVP)	0.15	68.33±0.14 ^b
维生素 Vitamin C(VC)	0.01	31.67±0.03 ^c
对照(CK)	—	93.33±0.27 ^a

不同小写字母表示不同处理间存在显著差异($P<0.05$)。
Different letters indicate the significant differences among various treatments at $P<0.05$.

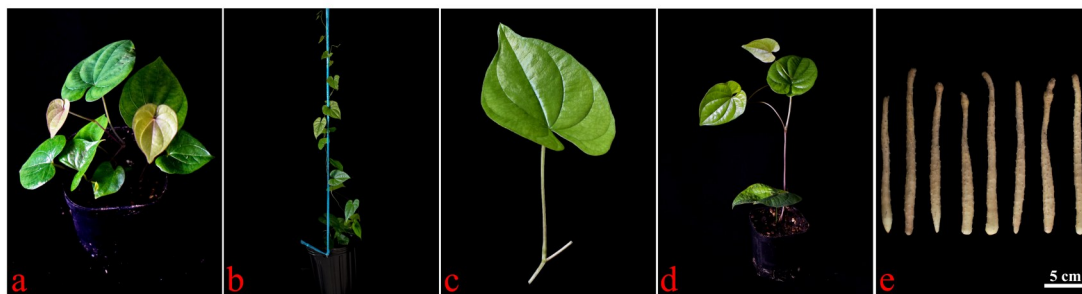
2.6 不同NAA 浓度对试管苗扦插成活率及脱毒种薯生长的影响

如表 6 和图 4(d,e)所示,NAA 处理下试管苗扦插成活率及种薯生长情况显著优于清水处理。其中,100 mg/L NAA 处理下插穗生根率为 96.67%,且扦插培养获得的脱毒种薯平均纵、横径分别为 22.52 cm 和 13.12 mm,平均质量为 28.09 g,显著高于其他处理。50、100 mg/L NAA 处理下扦插苗成活率与种薯纵、横径与平均质量均没有显著差异,清水处理下扦插生根率最低,为 81.67%,且脱毒种薯生长情况最差。100 mg/L NAA 处理对试管苗扦插成活及脱毒种薯的生长有一定的促进作用。

表 6 不同浓度 NAA 对插穗成活率及脱毒种薯生长的影响

Tab.6 Effect on surviving rate of scions and growth of virus-free seeds treated with different concentrations of NAA					
处理	浓度/(mg·L ⁻¹)	扦插成活率/%	纵径/cm	横径/mm	平均质量/g
Treatment	Concentration	Cutting survival rate	Vertical length	Diameter length	Average mass
清水(CK)	0	81.67±1.67 ^c	11.62±0.41 ^d	6.645±0.55 ^c	5.97±0.68 ^c
	50	90.00±1.67 ^b	20.84±0.70 ^b	11.01±0.43 ^b	16.44±0.82 ^b
NAA	100	96.67±1.67 ^a	22.52±0.62 ^a	13.12±0.64 ^a	28.09±3.45 ^a
	150	86.67±1.67 ^{bc}	16.68±0.32 ^c	10.64±0.47 ^b	12.07±0.78 ^b

不同小写字母表示不同处理间存在显著差异($P<0.05$)。
Different letters indicate the significant differences among various treatments at $P<0.05$.



a: 试管苗移栽; b: 试管苗移栽后正常生长; c: 插穗; d: 扦插茎节成苗; e: 扦插苗结薯。

a: Transplant test-tube plantlet; b: Growth of seedlings vigorously after transplanted;

c: Cutting; d: Seedling formation of cuttage stem nodes; e: Tubers from cutting seedling.

图4 南城淮山脱毒苗移栽与扦插繁殖

Fig.4 Transplant and cuttage propagation tuber of virus-free seedling of Nancheng Huaishan

3 结论与讨论

山药作为典型的无性繁殖作物,在长期营养繁殖过程中病毒逐年积累,导致其种性不断退化。近年来,研究人员通过茎尖培养、超低温疗法(Cryotherapy)、热处理、化学药剂处理、微型嫁接等方法进行植株病毒脱除^[27-29]。其中热处理和化学药剂处理步骤繁多、技术难度高;微型嫁接程序复杂,费时费工,甚至可能存在嫁接不亲和的问题^[27];超低温疗法存在脱除植株病毒不彻底、试管苗存活率和再生率降低等问题^[30-31]。茎尖脱毒技术是剥取植物顶端无毒或带病率极低的分生组织(茎尖)进行组织培养^[32],此技术已成功应用到多种栽培植物中^[33]。刘星月等^[34]利用茎尖脱毒技术成功脱除芋(*Colocasia esculenta*)的芋花叶病毒(DsMV),并获得脱毒芋。李会等^[35]通过对半夏(*Pinellia ternata*)微茎尖脱毒培养,成功脱除半夏中的芋花叶病毒(DsMV)。本研究利用茎尖脱毒技术,研究不同质量浓度6-BA与NAA对茎尖诱导的影响,筛选出最佳茎尖诱导成苗培养基,高效脱除了南城淮山中的日本花叶病毒(JYMV)、马铃薯Y病毒(PVY)与马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVD)。

酚类物质的种类与含量是导致组织培养过程中褐变的重要因素。由于山药富含酚酸、黄酮及花色苷类等酚类物质^[36],导致其在组织培养过程中容易造成外植体褐变甚至死亡。前人研究表明,在培养基中添加适量的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)、维生素C(vitamin C, VC)和活性炭(active carbon, AC)等物质,能够有效减少褐化物的积累^[37-38]。廖焕琴等^[39]认为在MS培养基中添加1.0 g/L活性炭可有效抑制褐化。有研究发现0.5 g/L PVP可以抑制芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)褐化^[40]。本研究结果显示,在MS培养基中添加1.5 g/L AC较可有效的抑制南城淮山组织培养过程中的褐化现象,其效果优于PVP和VC的处理。活性炭可以吸附培养基中的有害物质,包括琼脂中所含的杂质、外植体在培养过程中分泌的酚、醌类等对外植体自身有害的物质,同时又能吸附生长调节物质。

通常,山药茎尖脱毒培养是由茎尖诱导获得不定芽再进行增殖、分化、生根^[13-14],而本研究中利用茎尖获得不定芽并增殖,诱导分化后,以南城淮山的单芽茎段为外植体,直接诱导腋芽萌发,获得大量继代苗,增殖系数达到5.93,可在较短的时间内实现大量繁殖种苗。此外试验结果还表明,南城淮山茎段在MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基上,可以实现试管苗增殖与生根诱导同步进行,继代繁殖周期20~30 d,生根诱导率达100%。既缩短培养时间,又降低了组培成本。采用微扦插技术大量繁殖试管苗,并伴有根的生成,对简化培养程序、降低快速繁殖成本具有重要作用。

山药规模种植通常以块茎切块为种,每公顷需种薯3 000 kg以上,用种量大、成本高,且伤口容易感染病虫害。山药地上部茎蔓生长旺盛,通过藤蔓扦插结薯已有相关报道。如Oyetunji等^[41]利用非洲白山药(*Dioscorea rotundata*)藤蔓扦插生产微型块茎,大大降低了山药种植成本。本研究在培育出南城淮山脱毒苗基础上,以脱毒苗带叶茎节为插穗,在100 mg/L NAA处理下,培育出平均质量为28.09 g的微型块茎,可做为脱毒种薯用于田间生产,也便于长途运输,对加快优良山药品种提纯复壮和推广种植十分有利。本研究对南城淮山健康种薯的获得及快繁规模化生产可提供重要的技术支撑。

致谢:江西省现代农业产业技术体系建设专项(JXARS-19)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] OBIDIEGWU J E, LYONS J B, CHILAKA C A. The dioscorea genus (Yam)-an appraisal of nutritional and therapeutic potentials[J]. Foods, 2020, 9(9): 1304.
- [2] 洪森荣. 南城淮山脱毒苗移栽驯化期的光合生理[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(11): 4823-4828.
HONG S R. Photosynthetic physiology of virus-free plantlets of *Dioscorea opposita* thumb.cv.Nancheng during transplanting and domestication[J]. Genomics and applied biology, 2017, 36(11): 4823-4828.
- [3] 张为. 南城淮山[J]. 质量探索, 2013, 10(6): 13.
ZHANG W. Nancheng yam[J]. Quality exploration, 2013, 10(6): 13.
- [4] 苗利娟, 韩锁义, 张新友, 等. 怀山药茎尖脱毒培养与茎段增殖研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(11): 123-125.
MIAO L J, HAN S Y, ZHANG X Y, et al. The establishment of system for detoxified Huai yam by stem tip culture and stem cut rapid propagation[J]. Journal of Henan agricultural sciences, 2011, 40(11): 123-125.
- [5] THOUVENEL J C, FAUQUET C. Yam mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast[J]. Annals of applied biology, 2010, 93(3): 279-283.
- [6] 李明军, 张峰, 陈明霞, 等. 怀山药病毒病的研究[J]. 中草药, 2003, 34(11): 100-102.
Li M J, Zhang F, Chen M X, et al. Study on virus disease of *Dioscorea opposita* [J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2003, 34(11): 100-102.
- [7] ENI A O, KUMAR P L, ASIEDU R, et al. First report of cucumber mosaic virus in Yams (*Dioscorea* spp.) in Ghana, Togo, and Republic of Benin in West Africa[J]. Plant disease, 2008, 92(5): 833.
- [8] PHILLIPS S, PIGGOTT J D, BRUNT A A. Further evidence that *Dioscorea* latent virus is a potexvirus[J]. Annals of applied biology, 1986, 109(1): 137-145.
- [9] ODU B O, HUGHES J A, ASIEDU R, et al. Responses of white yam (*Dioscorea rotundata*) cultivars to inoculation with three viruses[J]. Plant pathology, 2010, 53(2): 141-147.
- [10] THOUVENEL J C, DUMONT R. Perte de rendement de l' 'igname infectee par le virus de la mosaïque en Cote d' Ivoire[J]. Lagronomie tropicale, 1990, 45: 125-129.
- [11] ADENIJI M O, SHOYINKA S A, IKOTUN T, et al. Yield loss in Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) due to infection by yam mosaic virus (YMV) genus potyvirus[J]. Ife journal of science, 2012, 14(2): 237-244.
- [12] EFFIOM E I, EDAK A U, IKUO N, et al. Efficient elimination of yam mosaic virus (YMV) from white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) by cryotherapy of axillary buds[J]. South African journal of botany, 2020, 130: 123-129.
- [13] 李明军. 怀山药组织培养及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 142-162.
LI M J. Tissue culture and application of *Dioscorea opposita* [M]. Beijing: Science Press, 2004: 142-162.
- [14] 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.
ZHANG Z Y, LIANG J P, HUANG P P. Studies on tissue culture and rapid propagation of shoot tip of Yam[J]. Shanghai agricultural science and technology, 2008(4): 82.
- [15] 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.
LIU G Q, ZHOU Y L, JIANG S G, et al. Detoxification and application technology of Huilou Yam[J]. Jiangsu agricultural sciences, 2009(3): 47.
- [16] 向发云, 张庆华, 曾祥国, 等. 山药微块茎研究进展[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(3): 17-20.
XIANG F Y, ZHANG Q H, ZENG X G, et al. Research progress on Chinese yam micro tuber[J]. Hubei agricultural sciences, 2020, 59(3): 17-20.
- [17] 李栋, 孙亮亮, 罗晓梅, 等. 水茄组织培养技术体系的建立[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2019, 39(2): 69-74.
LI D, SUN L L, LUO X M, et al. Establishment of tissue culture technology system of *Solanum torvum* [J]. Journal of Shanxi agricultural university (natural science edition), 2019, 39(2): 69-74.
- [18] 白玉娥, 彭鹏, 段国珍, 等. 荷兰菊不同外植体组织培养快繁体系[J]. 分子植物育种, 2017, 15(5): 301-307.
BAI Y E, PENG P, DUAN G Z, et al. Tissue culture and regenerated of the different explants of *Aster novi-belgii* [J]. Molecular plant breeding, 2017, 15(5): 301-307.
- [19] 张映卿, 钟川, 刘斯晗, 等. 茄子野生近缘种托鲁巴姆试管微扦插繁殖技术研究[J]. 广西植物, 2021, 41(12): 2084-2090.
ZHANG Y Q, ZHONG C, LIU S H, et al. Rapid propagation technology for eggplant rootstock (*Solanums torvum*) by micro-cutting[J]. Guihaia, 2021, 41(12): 2084-2090.
- [20] 肖颖, 郭凤领, 周洁, 等. 山药枝条扦插快繁试验研究[J]. 长江蔬菜, 2021(2): 68-70.
XIAO Y, GUO F L, ZHOU J, et al. Research on rapid propagation of branch cutting of yam[J]. Journal of changjiang vegetables, 2021(2): 68-70.

- [21] 许竹激,余文慧,张鑫,等.不同营养液对紫山药扦插繁殖的影响[J].浙江农业科学,2020,61(12):2583-2585.
XU Z W, YU W H, ZHANG X, et al. Effects on different nutrient solutions on cutting propagation of purple yam [J]. Journal of Zhejiang agricultural sciences, 2020, 61(12): 2583-2585.
- [22] 吴志明,贾晓梅,谢晓亮,等.马铃薯纺锤块茎类病毒RT-PCR检测及全序列分析[J].华北农学报,2003,(S1):63-65.
WU Z M, JIA X M, XIE X L, et al. Detection of potato spindle tuber viroid by RT-PCR and analysis of its complete sequence [J]. Acta agriculturae Boreali-Sinica, 2003, 18(S1): 63-65.
- [23] 吴丽萍,王蒂,司怀军,等.马铃薯S病毒的RT-PCR检测[J].中国马铃薯,2006,20(4):200-203.
WU L P, WANG D, SI H J, et al. Detection of potato S virus by RT-PCR [J]. Chinese potato journal, 2006, 20(4): 200-203.
- [24] 白建明,杨琼芬,李先平,等.利用RT-PCR快速检测马铃薯X病毒(PVX)[J].西南农业学报,2009,22(6):1596-1598.
BAI J M, YANG Q F, LI X P, et al. Rapid detection of potato virus X (PVX) by RT-PCR [J]. Southwest China journal of agricultural sciences, 2009, 22(6): 1596-1598.
- [25] 冯光惠,杜虎平,李夏隆,等.陕北地区马铃薯Y病毒的RT-PCR检测及其序列分析[J].山西农业科学,2014,42(9):941-944.
FENG G H, DU H P, LI X L, et al. RT-PCR detection and sequence analysis of potato virus Y in northern Shanxi [J]. Journal of Shanxi agricultural sciences, 2014, 42(9): 941-944.
- [26] 鄢明峰,贺哲,黄婷,等.瑞昌山药花叶型病毒病原的分子鉴定及其遗传变异性分析[J].江西农业大学学报,2017,39(6):1126-1130.
YAN M F, HE Z, HUANG T, et al. Molecular identification and genetic variation of virus causing yam mosaic virus disease in Ruichang city [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2017, 39(6): 1126-1130.
- [27] FACCIOLI V C, MARANI F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: (Hadidi A, Khetarpal R K, Koganezawa H Eds.) [J]. Plant virus disease control, 1998: 346-80.
- [28] WANG B, WANG R R, CUI Z H, et al. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication [J]. Biotechnology advances, 2014, 32(3): 583-595.
- [29] FACCIOLI G. Control of potato viruses using meristem culture and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy [J]. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes, 2001: 365-390.
- [30] HELLIOT B, PANIS B, SWENNEN R, et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic or banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) [J]. Plant cell reports, 2002, 20(12): 1117-1122.
- [31] DING F, JIN S X, HONG N, et al. Vitricification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huang long bing pathogen, from in vitro adult shoot tips [J]. Plant cell reports, 2008, 27(2): 241-250.
- [32] MILOSEVIC S, CINGEL A, EVREMOVIC S, et al. Virus elimination from ornamental plants using in vitro culture techniques [J]. Pestic fitomed, 2012, 27(3): 203-211.
- [33] PRAMMANEE S, THUMJAMRAS S, CHIEMSOMBAT P, et al. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants [J]. Crop protection, 2011, 30: 1425-1429.
- [34] 刘星月,朱强龙,李慧英,等.红芽芋脱毒试管芋诱导及植株再生[J].园艺学报,2020,47(12):2427-2438.
LIU X Y, ZHU Q L, LI H Y, et al. Induction and plant regeneration of virus-free microtuber in red bud taro [J]. Acta horticulturae Sinica, 2020, 47(12): 2427-2438.
- [35] 李会,张庚,孟义江,等.掌叶半夏微茎尖培养脱毒和快繁体系的建立[J].作物杂志,2016(3):51-57.
LI H, ZHANG G, MENG Y J, et al. Establishment of virus-elimination and rapid propagation system of *Pinellia pedatisecta* Schott [J]. Crops, 2016(3): 51-57.
- [36] 邢颖,薛文婧,徐怀德,等.薯类茎叶化学成分与生物活性研究进展[J].食品工业科技,2022,43(7):457-466.
XING Y, XUE W J, XU H D, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of stems and leaves of Potato [J]. Science and technology of food industry, 2022, 43(7): 457-466.
- [37] JOHANSSON L. Effects of activated charcoal in anther cultures [J]. Physiologia plantarum, 1983, 59: 397-403.
- [38] RAGHUVANSHI S S, SRIVASTAVA A. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation [J]. Plant cell tissue organ cult, 1995, 41(1): 83-85.
- [39] 廖焕琴,钟敏艳,徐放,等.朱顶红鳞茎组织培养中的抗褐化研究[J].林业与环境科学,2020,36(4):90-95.
LIAO H Q, ZHONG M Y, XU F, et al. Study on anti-browning in bulbs tissue culture of *Hippeastrum rutilum* [J]. Forestry and environmental science, 2020, 36(4): 90-95.
- [40] CAI X, WEI H, LIU C, et al. Synergistic effect of NaCl pretreatment and PVP on browning suppression and callus induction from petal explants of *Paeonia Lactiflora* Pall. 'Festival Maxima' [J]. Plants, 2020, 9(3): 346.
- [41] OYETUNJI, KABEYA M, SHIWACHI H. Production of mini-tubers from vine cuttings of *Dioscorea rotundata* (white yam) [J]. Journal of applied horticulture, 2007, 9(2): 167-172.