

· 技术方法 ·

# 栽培薯蓣茎段离体再生体系的建立

冯雯, 王玉国

复旦大学生命科学学院, 上海 200438

**摘要** 为建立栽培薯蓣(*Dioscorea polystachya*)组培再生体系, 以茎尖及茎尖下4个不同长度的茎段为外植体, 探讨了不同浓度植物生长调节剂、培养基类型及茎段对腋芽诱导和植株再生的影响。结果表明, 培养基配比为MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT和茎尖下12–20 cm的茎段为栽培薯蓣不定芽诱导的最佳组合, 诱导率达90.0%; 继代培养最适培养基配方为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> KT, 低浓度NAA固定时, 增殖系数在一定范围内随着6-BA浓度的升高而增高; 在相同外源激素条件下, 快繁生根采用DKW培养基明显优于常规1/2MS培养基, 生根率显著提高, 达92.86%。添加1 mg PVP以及增加转接次数均能明显降低褐化率。该研究有效解决了栽培薯蓣种质资源离体稳定繁殖取材部位优化的问题, 为规模化生产栽培薯蓣优质脱毒苗奠定了良好基础。

**关键词** 栽培薯蓣, 茎段, 组织培养, 离体再生

冯雯, 王玉国 (2024). 栽培薯蓣茎段离体再生体系的建立. *植物学报* 59, 792–799.

薯蓣(*Dioscorea polystachya*) (山药)为单子叶植物, 隶属薯蓣科, 药食同源, 富含淀粉、多糖、氨基酸和山药黏蛋白等营养物质, 以及皂苷元、尿囊素和类黄酮等药用活性成分(Li et al., 2023)。山药最早记载于我国《神农本草经》, 其栽培历史已有3 000多年, 并在长江南北形成各具特色的地方栽培品种(杭悦宇等, 1992)。近年来, 山药市场需求量逐年攀升, 但因其块茎生长周期长, 且品质多与土壤、气候及栽培周期等密切相关, 极易受到病毒侵染而影响产量和品质, 大大缩短了生产寿命。病毒感染可造成块茎类作物产量损失, 其中木薯(*Manihot esculenta*)产量损失高达20%–90% (Terry and Hahn, 1980; Thresh et al., 1994)。栽培薯蓣也不例外, 感染病毒后的瑞昌山药会出现花叶斑驳、明脉, 光合作用能力下降, 导致品质受到显著影响(贺哲等, 2016)。目前, 栽培过程中病毒的侵染使得山药品质在逐年轮作中不断退化。通过组织培养获得山药脱毒苗是保护山药种质资源的重要途径。因此, 山药组培苗规模化繁育是亟需解决的现实问题。

长期以来, 在栽培山药的组培快繁研究中外植体的选择非常重要。目前, 已有多个栽培薯蓣品种成功

快繁, 如铁棍山药(平阿敏等, 2016)、佛手山药(刘金英等, 2006)和利川山药(朱云芬等, 2015); 还有参薯(*D. alata*)明准2号山药(陈芝华等, 2018)及其同属物种也有成功扩繁的报道, 如盾叶薯蓣(*D. zingiberensis*)、*D. belizensis*、*D. rotundata*、*D. cayenensis*、*D. dumetorum*、*D. bulbifera*和*D. tokoro* (Blunden et al., 1966; Cabanillas and Martins, 1978; Vander Zaag and Fox, 1981; Ng and Hahn, 1985; Ng, 1988; 李明军等, 2012; Ishizaki, 2021)。研究表明, 茎段作为外植体进行组培扩繁, 其诱导率及萌发率明显优于其它外植体(如零余子和叶片), 更有利于保持品种的稳定。但在具体组培实践中, 选择什么位置的茎段更适合仍然不够明确, 且缺乏比较分析。对于栽培薯蓣而言, 后续的多芽诱导、继代培养及不定根生长等关键阶段, 仍需探索不同培养基和植物生长调节剂浓度配比组合对成功获得脱毒苗的影响。本研究选用上海崇明长期栽培的崇蓣1号为研究材料, 以茎尖及茎尖以下不同部位茎段为外植体, 探究各个关键阶段植株离体组织培养的最适条件, 优化栽培薯蓣组织培养体系, 以期获得适合组培苗规模化生产的有效方法,

收稿日期: 2024-04-08; 接受日期: 2024-05-27

基金项目: 上海市崇明区农业科创项目(No.2021CNKC-01-02)

\* 通讯作者。E-mail: wangyg@fudan.edu.cn

为实现长期无性繁殖导致病毒积累的块茎作物快速修复和抗逆性强化提供技术支持。

## 1 植物材料

实验材料为上海崇明长期栽培的地方薯蓣(*Dioscorea polystachya* Turcz.)崇蓣1号。将带芽块茎移植到复旦大学江湾基地栽培。

## 2 培养基成分与培养条件

### 2.1 取样及处理

从生长健壮且无病虫害的栽培薯蓣植株上剪取不同成熟度的茎段,包括茎尖、距离茎尖2–5 cm、5–12 cm、12–20 cm和20 cm以外的茎段作为外植体。去除叶片得到单节外植体,使用表面活性剂清洗茎段以去除表面污垢,用自来水冲洗30分钟。在超净工作台上,将上述不同长度茎段外植体用无菌水清洗后,再用新洁尔灭消毒液浸泡30分钟,无菌水冲洗1遍,置于超净工作台上用乙醇消毒30秒至1分钟,再用无菌水冲洗1遍,然后用0.1%升汞消毒8分钟(嫩枝条)或12分钟(老枝条),无菌水冲洗5遍,用无菌纸吸干水分。用无菌刀将茎段切成1 cm的小段,按极性方向迅速转接到多芽诱导培养基中,每瓶接种2–3个小段,封好瓶口,做好标记(品种、接种时间和接种次数),转入培养室中。培养条件:温度(25±2)°C,相对湿度为65%–70%,光照强度为28–32 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间为每天12–14小时。培养基pH5.8,添加6 g·L<sup>-1</sup>琼脂糖和30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖。培养基高压灭菌温度为121°C。

### 2.2 腋芽诱导

取出茎段,置于滤纸上吸干水分,剪去茎段两端,将其接种到分别添加NAA (0和0.5 mg·L<sup>-1</sup>)、6-BA (0.5、1.0、2.0和3.0 mg·L<sup>-1</sup>)和KT (0.5和0.1 mg·L<sup>-1</sup>)的MS培养基上,以不添加激素的MS培养基为对照。每瓶接种3–4个外植体,实验重复3次。在接种后30天记录并统计茎段诱导分化情况。

诱导率=(出芽外植体数/接种的外植体数)×100%;

污染率=(污染的外植体数/接种的外植体数)×100%;

死亡率=(死亡的外植体数/接种的外植体数)×100%。

### 2.3 继代与生根

取距茎尖12–20 cm茎段分化出的1 cm不定芽连带基部组织的芽块,接种于添加不同浓度的6-BA (0.2、0.3和2.0 mg·L<sup>-1</sup>)、NAA (0.05、0.2和0.3 mg·L<sup>-1</sup>)以及KT (0和1.0 mg·L<sup>-1</sup>)的1/2MS培养基上,30天后统计不定芽的增殖情况和转接不定芽的增殖系数。选取不同培养基(DKW和1/2MS) (pH5.8),不同浓度IBA (0.1、0.3和1.0 mg·L<sup>-1</sup>)和NAA (0.05、0.1和0.3 mg·L<sup>-1</sup>),以1/2MS培养基为对照,切取增殖分化的单株芽转入生根培养基。每个培养基接种3–4个外植体,设3次生物学重复。45天后观察生根情况,统计生根率并记录根系生长状况。

增殖系数=增殖芽数/接种数;

生根率=(生根苗数/接种苗数)×100%。

### 2.4 炼苗与移栽

取根系发达的幼苗进行炼苗,采用无蔗糖培养,用特制的坚硬透明塑料容器,培养基质为蛭石和珍珠岩按2:1 (v/v)的比例混合(厚度为2–3 cm),附加营养液(800–1 000 mL),温度和湿度同多芽诱导。

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同外植体及植物生长调节剂对芽诱导的影响

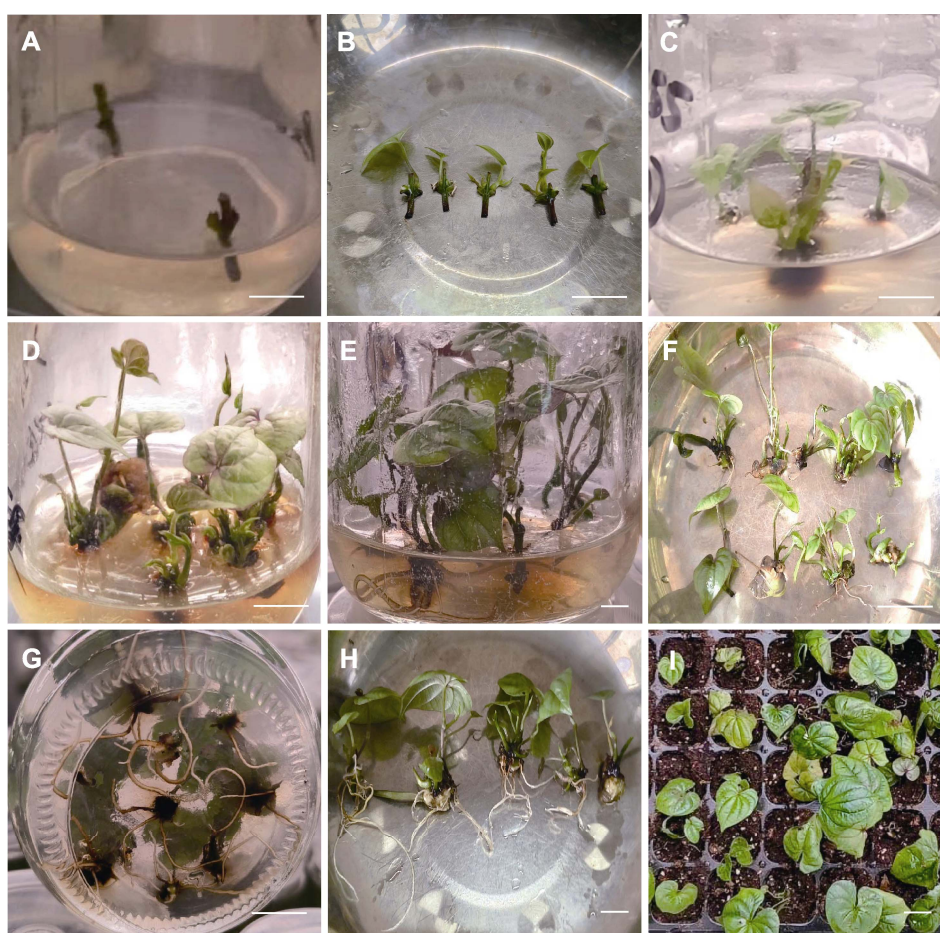
以茎段为外植体的诱导率及萌发率明显优于其它外植体(如零余子和叶片),更有利于保持品种的稳定。然而,茎段的获得方式包括直接截取和零余子催苗。零余子催苗获得茎段的方式面临打破休眠的困难,无法大规模生产,且存在茎尖小和接种效率低等问题(李锐忠,2005)。本研究通过直接截取的方式,采用不同位置茎段和不同浓度6-BA和KT组合(表1;图1)进行栽培薯蓣的茎段腋芽诱导。结果表明,在5种茎段中,茎尖最为幼嫩,极易在消毒阶段丧失活性,即使存活下来也会出现玻璃化,在MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT培养基中死亡率最高,达88.9%,基本不适用于芽诱导。随着外植体成熟度的提高,距茎尖5–12 cm的茎段死亡率显著低于茎尖和距茎尖2–5 cm的茎段,且诱导成功率较高,腋芽诱导效果最佳;而对于更为成熟的茎段,距茎尖12–20 cm的茎段在MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT培养

**表1** 不同浓度6-BA与KT对比对栽培薯蓣不同部位带腋芽茎段诱导的影响**Table 1** Effects of different concentrations of 6-BA and KT ratios on the induction of axillary bud stem segments in different parts of *Dioscorea polystachya*

| No. | Length of stem segment (cm) | 6-BA (mg·L <sup>-1</sup> ) | KT (mg·L <sup>-1</sup> ) | Induction rate (%) | Death rate (%) | Pollution rate (%) | Growth condition |
|-----|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------|----------------|--------------------|------------------|
| 1   | Stem tip                    | 1.0                        | 0.5                      | 11.1               | 88.9           | 0                  | +                |
| 2   | 2–5                         | 1.0                        | 0.5                      | 68.4               | 15.8           | 5.3                | +++              |
| 3   | 5–12                        | 1.0                        | 0.5                      | 88.6               | 6.8            | 2.3                | +++              |
| 4   | 5–12                        | 2.0                        | 0.5                      | 54.1               | 4.2            | 4.2                | +++              |
| 5   | 12–20                       | 1.0                        | 0.5                      | 90.0               | 10.0           | 0                  | +++++            |
| 6   | 12–20                       | 2.0                        | 0.5                      | 66.7               | 26.7           | 6.7                | ++++             |
| 7   | 12–20                       | 3.0                        | 0.5                      | 60.0               | 26.7           | 13.3               | +++              |
| 8   | >20                         | 3.0                        | 0.5                      | 75.0               | 6.3            | 18.8               | +++              |

加号(+)数量越多表示长势越好; 反之长势越弱。

The more the number of plus signs (+), the better the growth, and vice versa, the weaker the growth.

**图1** 栽培薯蓣再生体系的建立

(A) 茎段外植体; (B), (C) 腋芽诱导; (D), (E) 继代苗; (F), (G) 不定根诱导; (H) 再生植株; (I) 炼苗。Bars=1 cm

**Figure 1** Establishment of a regeneration system for cultivated *Dioscorea polystachya*

(A) Stem segment; (B), (C) Axillary buds induction; (D), (E) Subculture seedlings; (F), (G) Adventitious root induction; (H) Regenerated plants; (I) Acclimatization. Bars=1 cm

基中出芽率最高(达90%), 但芽相对较小, 而更高浓度的植物生长调节剂不利于生长。在诱导阶段, 污染主要来源于外植体自身携带的内生菌, 在培养基中添加抗生素能减少污染, 幼嫩茎尖和茎段在消毒时间较短时消毒效果较好。随着外植体成熟度的提高, 污染率有所升高, 距茎尖20 cm以外的茎段污染率最高为18.8%。随着6-BA浓度的增加, 诱导率降低且污染率升高。

### 3.2 6-BA、KT及NAA组合对继代培养的影响

将外植体诱导获得的幼芽从外植体茎节基部切下, 分成单芽。用淮山药继代培养适用的高浓度6-BA ( $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和NAA ( $0.2$ 或 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )培养时(李锐忠, 2005), 继代苗中均出现黄叶玻璃化现象, 说明该激素配比不适用于薯蓣的组织培养。我们参考怀山药继代培养适用浓度(李琼等, 2004)并进行调整, NAA浓度为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数为1.4; 随着6-BA浓度的增高, 增殖系数也有所增高; 当6-BA浓度增至 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数为1.7。在此体系中添加 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT, 增殖系数明显提高, 为2.0 (表2)。

**表2** 不同浓度激素对栽培薯蓣继代分化率的影响

**Table 2** Effects of different hormone concentrations on the subculture differentiation rate of cultivated *Dioscorea polystachya*

| No. | 6-BA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | NAA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | KT ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Subculture numbers | Total bud numbers | Propagation coefficient | Growth condition |
|-----|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|------------------|
| 1   | 2.0                                    | 0.2                                   | 0                                    | 70                 | Low               | Low                     | +                |
| 2   | 2.0                                    | 0.3                                   | 1.0                                  | 70                 | Low               | Low                     | +                |
| 3   | 0.5                                    | 0.05                                  | 0.1                                  | 70                 | 140               | 2.0                     | ++++             |
| 4   | 0.5                                    | 0.05                                  | 0                                    | 70                 | 121               | 1.7                     | +++              |
| 5   | 0.3                                    | 0.05                                  | 0                                    | 70                 | 105               | 1.5                     | ++               |
| 6   | 0.2                                    | 0.05                                  | 0                                    | 70                 | 98                | 1.4                     | ++               |

加号(+)数量越多表示长势越好; 反之长势越弱。

The more the number of plus signs (+), the better the growth, and vice versa, the weaker the growth.

**表3** 不同浓度激素对栽培薯蓣生根率的影响

**Table 3** Effects of different hormone concentrations on the rooting rate of cultivated *Dioscorea polystachya*

| No. | Different media | IBA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | NAA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Active charcoal ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Rooting rate (%) | Growth condition |
|-----|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|------------------|------------------|
| 1   | 1/2MS           | 0.1                                   | 0.3                                   | 0.2  | 38.00            | +                |
| 2   | 1/2MS           | 0.3                                   | 0.1                                   | 0.2  | 64.00            | ++               |
| 3   | 1/2MS           | 1.0                                   | 0.05                                  | 0  | 58.00            | ++               |
| 4   | DKW             | 1.0                                   | 0.05                                  | 0  | 92.00            | ++++             |

加号(+)数量越多表示长势越好; 反之长势越弱。

The more the number of plus signs (+), the better the growth, and vice versa, the weaker the growth.

### 3.3 不同基础培养基及植物生长调节剂浓度对生根的影响

在1/2MS培养基中添加低浓度NAA和IBA, 当添加 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭时, 生根率均不理想, 不超过64%; 不添加活性炭, 即用较高浓度( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的IBA和较低浓度( $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的NAA, 生根率未得到改善。而此时用DKW取代1/2MS, 崇蓣1号的生根效果最好, 根多且粗壮, 生根率达92%, 说明低浓度( $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )NAA更适合生根培养, 而DKW培养基比1/2MS培养基更有利于生根, 生根率达92% (表3)。

### 3.4 讨论

外植体的选择对于建立高效的组培再生体系非常重要。山药组织培养可选用的外植体包括叶和叶柄(Kohmura et al., 1995; Anike et al., 2012)、茎(Nagasawa and Finer, 1989; Chen et al., 2003)、块茎(Twyford and Mantel, 1996)、合子胚(Viana and Mantell, 1989)、茎尖(Baker and Phillips, 1962)以及零余子(李明军等, 2000)。栽培薯蓣多为怀山药, 在其组培快繁中, 茎蔓、块茎和零余子均能诱导出不定芽(王红娟等, 2006)。零余子、叶片及茎段在添加KT和

NAA的培养基上均能产生愈伤组织且出愈率最高,但用叶片诱导不能成苗(梁方刚等, 2001)。以山药茎尖作为外植体得到的试管苗质量较好,用0.3–2.0 mm的茎尖培养,病毒含量少,在MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> GA培养基上成苗率最高(南怀林等, 2005)。但在佛手山药以块茎、叶片和茎段作为外植体的比较中,茎段作为外植体萌发率较高,叶片仅分化出愈伤组织且诱导时间长,诱导率接近0(刘金英等, 2006)。本研究选择茎尖和不同位置的茎段作为外植体,均可诱导出不定芽,以距茎尖12–20 cm的茎段诱导率最高(达90%)。

外源细胞分裂素对外芽再生至关重要(Liu et al., 2020)。而生长素对植物根尖再生非常关键(Matosevich et al., 2020)。细胞分裂素/生长素的比值高促进不定芽形成(Skoog and Miller, 1957; Long et al., 2022)。本研究用NAA和6-BA作为外源激素,结果表明,茎尖不适用于栽培薯蓣稳定性快繁,茎尖的病毒载量比其它外植体少,但在消毒阶段易死亡或发黑,导致接种效率低。在尝试使用更低浓度的6-BA (0.5 mg·L<sup>-1</sup>)和KT (0.1 mg·L<sup>-1</sup>)后,茎尖存活率得到显著提升(达89%),显著改善幼嫩茎尖诱导困难的状况。病毒载量随茎尖长度的增加而增高,即污染率随茎段成熟度的增高而显著升高。距离茎尖12–20 cm的茎段最适于初代培养,适用于低浓度6-BA (1.0 mg·L<sup>-1</sup>)和KT (0.5 mg·L<sup>-1</sup>),诱导率达90%;而使用高浓度6-BA (2.0 mg·L<sup>-1</sup>)和NAA (0.2–0.3 mg·L<sup>-1</sup>),植株出现生长停滞和玻璃化现象,表明植株内生理失调,植物细胞分裂与体积增大的速度超过干物质生产和积累的速度,而降低6-BA浓度后,植株恢复正常生长。

继代培养是将前期诱导得到的苗分割成小块并重新扩繁的过程。对于不同类型的山药由于其基因表达的差异,离体再生不同阶段的最适激素配比存在差异(潘梅等, 2014; 陈芝华等, 2018)。在以往研究中,2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA适用于薯蓣,2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA适用于参薯(潘梅等, 2014, 陈芝华等, 2018)。而上述培养基均不适用于崇蓣1号,在上述2个培养基配方下,生长特性表现为不长高、不爆芽及玻璃化。在外源NAA浓度固定时,植物的玻璃化程度随着6-BA浓度的升高而明显加剧(Liu et al., 2017)。当NAA浓度

固定时,随着6-BA浓度的增高,增殖系数增大;在MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA培养基配方下,添加0.1 mg·L<sup>-1</sup> KT比不添加KT薯蓣的继代生长状况更好。

生根培养是当丛生芽苗增殖到一定数量时,转到生根培养基中形成完整的植株,因而生根培养多使用1/2MS或1/4MS培养基(刘也楠等, 2022)。DKW培养基为中等浓度的培养基,在一些藤本植物(如葡萄(*Vitis vinifera*))中,将DKW作为基质培养基组培效果较好(胡文斌等, 2018)。DKW与低浓度(0.05 mg·L<sup>-1</sup>) NAA组合,在IBA和NAA浓度固定的情况下,DKW培养基比1/2MS培养基更有利于生根培养,植株根系更粗壮,枝条更多。因此DKW更适用于栽培薯蓣的生根培养。

大多数栽培薯蓣的组织培养过程中,多芽诱导和继代培养的最佳激素浓度比较相近,但在生根培养阶段,佛手山药、利川山药和铁棍山药的最佳培养基配方与大多数生根培养基配方并不相同。常规条件下,大多数栽培薯蓣多芽诱导阶段的适用培养基配方为0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA或1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT,继代培养用低浓度6-BA (0.5–1.0 mg·L<sup>-1</sup>)和NAA (0.05–0.1 mg·L<sup>-1</sup>),DKW培养基配合低浓度(0.05 mg·L<sup>-1</sup>) NAA适用于栽培薯蓣的生根培养。

褐化现象多由物理损伤导致末端酚类物质渗出,增加转接次数、加入抗氧化剂或降低光强均可减缓褐化进程(Ammirato, 1984)。在栽培薯蓣培养过程中,活性炭和Vc抑制褐化效果不明显,但添加1 mg PVP褐化现象可得到缓解;增加转接次数,褐化程度明显降低。

本研究以栽培薯蓣崇蓣1号的茎尖及茎尖以下不同部位茎段为外植体,调整不同浓度生长调节剂配比,建立并优化组织培养体系,为探索栽培薯蓣规模化育苗提供了技术支持,确定了稳定繁殖外植体茎段的具体选材位置,发现DKW培养基在栽培薯蓣的生根培养中具有优势,可稳定地保护优良种质资源,为栽培薯蓣的遗传改良奠定了基础。

## 作者贡献声明

冯雯: 完成实验、数据分析和论文撰写; 王玉国: 构思并设计实验、数据分析和论文撰写。

## 参考文献

Ammirato PV (1984). Yams. In: Ammirato PV, Evans DA,

- Sharp WR, Yamada Y, eds. Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 3. Crop Species. New York: Macmillan. pp. 327–354.
- Anike FN, Konan K, Olivier K, Dodo H** (2012). Efficient shoot organogenesis in petioles of yam (*Dioscorea* spp). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **111**, 303–313.
- Baker R, Phillips DJ** (1962). Obtaining pathogen-free stock by shoot tip culture. *Phytopathology* **52**, 1242–1244.
- Blunden G, Hardman R, Trease GE** (1966). Some observations on the propagation of *Dioscorea belizensis* Lundell and other steroid-yielding yams. *Planta Med* **14**, 84–89.
- Cabanillas E, Martin FW** (1978). The propagation of edible yams from cuttings. *J Agric Univ Puerto Rico* **62**, 249–254.
- Chen YQ, Fan JY, Yi F, Luo ZX, Fu YS** (2003). Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **73**, 75–80.
- Chen ZH, Hua SM, Li LH, Luo XF, He PZ** (2018). Optimization of technical conditions for tissue culture and rapid propagation of Chinese yam. *Fujian J Agric Sci* **33**, 164–170. (in Chinese)
- 陈芝华, 华树妹, 李丽红, 罗晓锋, 贺佩珍 (2018). 山药组培快繁技术条件的优化. *福建农业学报* **33**, 164–170.
- Hang YY, Qin HZ, Ding ZZ** (1992). A survey and quality research on the new resources of Shan Yao (rhizoma dioscoreae). *J Plant Resour Environ* **1**(2), 10–15. (in Chinese)
- 杭悦宇, 秦慧贞, 丁志遵 (1992). 山药新药源的调查和质量研究. *植物资源与环境* **1**(2), 10–15.
- He Z, Huang T, Qin SL, Cui CY, Jiang JX** (2016). Pathogen identification of Ruichang yam virus disease. In: Chinese Society for Plant Pathology (CSPP), ed. Proceedings of the 2016 Academic Annual Meeting of CSPP. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. pp. 305. (in Chinese)
- 贺哲, 黄婷, 秦双林, 崔朝宇, 蒋军喜 (2016). 瑞昌山药病毒病原鉴定. 见: 中国植物病理学会. 中国植物病理学会2016年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社. pp. 305.
- Hu WB, Zhang SF, Sun N** (2018). Stem tissue culture of red grape in Longnan area. *Shaanxi Forest Sci Technol* **46**, 6–9. (in Chinese)
- 胡文斌, 张少飞, 孙娜 (2018). 陇南红提葡萄茎段组织培养研究. *陕西林业科技* **46**, 6–9.
- Ishizaki T** (2021). A tissue culture system for callus formation and plant regeneration using tuber discs of *Dioscorea tokoro* Makino, a pharmaceutical yam species. *Biologia* **76**, 1141–1145.
- Kohmura H, Araki H, Imoto M** (1995). Micropropagation of ‘Yamatoimo’ Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **40**, 271–276.
- Li MJ, Guo J, Li X, Li JQ, Wang YP, Zhang XL, Liu YK** (2012). A regeneration system and ploidy identification of plantlets for endosperm of *Dioscorea zingiberensis*. *Chin Bull Bot* **47**, 654–660. (in Chinese)
- 李明军, 郭婧, 李翔, 李纪强, 王医鹏, 张晓丽, 刘永康 (2012). 盾叶薯蓣胚乳再生体系的建立及其染色体倍性鉴定. *植物学报* **47**, 654–660.
- Li MJ, Zhang JB, Zhang HB** (2000). Study on the callus induction and plantlet regeneration from the bulbil of *Dioscorea opposita*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* **20**, 772–777. (in Chinese)
- 李明军, 张嘉宝, 张海波 (2000). 怀山药零余子愈伤组织诱导及植株再生的研究. *西北植物学报* **20**, 772–777.
- Li Q, Yang B, Li HL, Fu ZH** (2004). Research on tissue rapid propagation of a specified cultivar “Foshou” yam from Hubei province. In: Chinese Society for Agricultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University eds. Proceedings of the 2nd National Symposium on Plant Tissue Culture, Detoxification and Rapid Propagation, and Industrial Production. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. pp. 96–101. (in Chinese)
- 李琼, 杨波, 李洪林, 付志惠 (2004). 一种特有经济作物“佛手山药”的组织快繁研究. 见: 中国农业生物技术学会, 福建农林大学. 第二届全国植物组织培养、脱毒快繁及工厂化生产学术研讨会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社. pp. 96–101.
- Li RZ** (2005). Method for tissue culture of Huaishan yam. Chinese patent, ZL1653888A. 2005-08-17. (in Chinese)
- 李锐忠 (2005). 淮山(山药)组织培养方法. 中国专利, ZL-1653888A. 2005-08-17.
- Li Y, Ji SY, Xu T, Zhong YH, Xu MH, Liu YQ, Li MJ, Fan B, Wang FZ, Xiao JB, Lu BY** (2023). Chinese yam (*Dioscorea*): nutritional value, beneficial effects, and food and pharmaceutical applications. *Trends Food Sci Technol* **134**, 29–40.
- Liang FG, Ma KL, Li MJ, Liu AX** (2001). Effect of different explant of *Dioscorea opposita* on callus induction and plantlets regeneration. *J Henan Vocation-Tech Teachers College* **29**, 24–27. (in Chinese)

- 梁方刚, 马克莉, 李明军, 刘爱霞 (2001). 怀山药不同外植体对愈伤组织形成和植株再生的影响. 河南职业技术学院学报 29, 24–27.
- Liu JY, Xu YM, Li SL, Guo CF, Guo ZC (2006). Tissue culture of *Dioscorea opposita* “foshou”. *Bull Bot Res* 26, 323–328. (in Chinese)
- 刘金英, 徐有明, 李双来, 郭春风, 郭治成 (2006). 佛手山药组织培养的研究. 植物研究 26, 323–328.
- Liu M, Jiang FL, Kong XY, Tian J, Wu ZX, Wu Z (2017). Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. *Sci Hort* 217, 285–296.
- Liu YN, Chen YL, He XB, Hong X, Mi M (2022). Tissue culture technology of Chinese yam. *Bot Res* 11, 560–563. (in Chinese)
- 刘也楠, 陈银龙, 何贤彪, 洪霞, 米敏 (2022). 山药的组织培养技术. 植物学研究 11, 560–563.
- Liu ZH, Dai XH, Li J, Liu N, Liu XZ, Li S, Xiang FN (2020). The type-B cytokinin response regulator ARR1 inhibits shoot regeneration in an ARR12-dependent manner in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 32, 2271–2291.
- Long Y, Yang Y, Pan GT, Shen YO (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Front Plant Sci* 13, 926752.
- Matosevich R, Cohen I, Gil-Yarom N, Modrego A, Friedlander-Shani L, Verna C, Scarpella E, Efroni I (2020). Local auxin biosynthesis is required for root regeneration after wounding. *Nat Plants* 6, 1020–1030.
- Nagasawa A, Finer JJ (1989). Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). *Plant Sci* 60, 263–271.
- Nan HL, Liu JP, Wang YQ (2005). Research on the propagation technology of yam stem tip. *Crops* (6), 34–36. (in Chinese)
- 南怀林, 刘建平, 王耀琴 (2005). 山药茎尖繁殖技术的研究. 作物杂志 (6), 34–36.
- Ng SYC (1988). *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 14, 121–128.
- Ng SYC, Hahn SK (1985). Application of tissue culture to tuber crops at IITA. In: Proceedings of the Inter-Center Seminar on International Agricultural Research Centers (IARCs) and Biotechnology. Los Baños: IRRI. pp. 29–40.
- Pan M, Huang S, Wang JF, Lü DR, Qi HS, Jiang DQ (2014). Study on *in-vitro* cultivation conditions and cultivating techniques of *Dioscorea opposita*. *Guizhou Agric Sci* 42(3), 125–129. (in Chinese)
- 潘梅, 黄赛, 王景飞, 吕德任, 戚华莎, 姜殿强 (2014). 山药茎段的离体培养与育苗基质筛选. 贵州农业科学 42(3), 125–129.
- Ping AM, Hou LP, Xing GM, Li ML (2014). Study on tissue culture from shoot tip and stem segment of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. ‘Tiegun’. *Heilongjiang Agric Sci* (9), 6–10. (in Chinese)
- 平阿敏, 侯雷平, 邢国明, 李梅兰 (2016). 铁棍山药茎尖组培及茎段侧芽成苗研究. 黑龙江农业科学 (9), 6–10.
- Skoog F, Miller CO (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11, 118–130.
- Terry ER, Hahn SK (1980). The effect of cassava mosaic disease on growth and yield of a local and an improved variety of cassava. *Trop Pest Manage* 26, 34–37.
- Thresh JM, Fargette D, Otim-Nape GW (1994). Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. *Trop Sci* 34, 26–42.
- Twyford CT, Mantell SH (1996). Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the Greater Yam. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 46, 17–26.
- Vander Zaag P, Fox RL (1981). Field production of yams (*Dioscorea alata*) from stem cuttings. *Trop Agric* 58, 143–145.
- Viana AM, Mantell SH (1989). Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl. and *D. cayenensis* Lam. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 16, 113–122.
- Wang HJ, Wang TL, Bai ZW, Xu YX, Li MJ (2006). The effect of hormone ratio on inducing adventitious buds from different explants of Chinese yam. *Henan Agric Sci* 35 (12), 73–74. (in Chinese)
- 王红娟, 王天亮, 白自伟, 徐艳霞, 李明军 (2006). 激素配比对怀山药不同外植体诱导不定芽的影响. 河南农业科学 35(12), 73–74.
- Zhu YF, Yin HQ, Liu HM, Wang YL, Xiang JQ, Yang YK, Ran Q, Ye ZY, Cheng Q, Xu Y, Chen QL, Tian TF (2015). A rapid propagation method for tissue culture of Lichuan yam. Chinese patent, ZL105145373A. 2015-12-16. (in Chinese)
- 朱云芬, 殷红清, 刘河明, 王应玲, 向极轩, 杨永康, 冉强, 叶紫云, 程群, 徐怡, 陈巧玲, 田腾飞 (2015). 一种利川山药组培快繁方法. 中国专利, ZL105145373A. 2015-12-16.

## Establishment of an *In Vitro* Regeneration System for Stem Segments of Cultivated *Dioscorea polystachya*

Wen Feng, Yuguo Wang\*

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

**Abstract** To establish a tissue culture regeneration system for cultivated Chinese yam (*Dioscorea polystachya*), the effects of different concentrations of plant growth regulators, and stem segments on axillary bud induction and plant regeneration were investigated with different concentrations of plant growth regulators, media types, and shoot tips and stem segments at four different positions under the shoot tip as explants. The results revealed that MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT hormone ratio and 12–20 cm stem segment under the stem tip were the best formulas for the induction of adventitious buds in *D. polystachya*, and the induction rate reached 90.0%. In the subculture, the optimal concentration was MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> KT, and the proliferation coefficient increased with increasing of 6-BA within a certain range when the low concentration of NAA was constant. With the same concentration of exogenous hormones, DKW medium was significantly better than the conventional 1/2MS medium, and the rooting rate is significantly improved, reaching 92.86%. Adding 1 mg PVP (polyvinylpyrrolidone) and increasing the number of transfers can significantly reduce browning. This study effectively solved the problem of optimizing the explant position for the stable of *in vitro* propagation of cultivated yam germplasm resources, laying a good foundation for the large-scale production of their high-quality virus-free seedlings.

**Key words** *Dioscorea polystachya*, stem segments, tissue culture, *in vivo* regeneration

Feng W, Wang YG (2024). Establishment of an *in vitro* regeneration system for stem segments of cultivated *Dioscorea polystachya*. *Chin Bull Bot* **59**, 792–799.

---

\* Author for correspondence. E-mail: wangyg@fudan.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

### 通讯作者/团队简介

王玉国, 复旦大学生命科学学院教授, 博士生导师。长期从事植物系统发育基因组学、进化生态学和重要遗传资源保护与利用研究。主持多项国家自然科学基金和省部级科研项目; 在 *Journal of Experimental Botany*、*Molecular Ecology Resources*、*PLoS Genetics*、*Molecular Phylogenetics and Evolution* 及生物多样性等国内外重要学术期刊上发表研究论文 80 余篇。目前其研究团队主要采用系统学、基因组学、进化生态学和生物信息学等多学科手段, 结合经典研究方法, 探讨复杂植物类群的种间关系与适应性进化机制, 开展重要作物的起源与进化和特有种质资源评价、保护与创新研究。