

杜尚广. 脚板薯的组织培养与快速繁殖研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(6): 39–42.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.009

# 脚板薯的组织培养与快速繁殖研究

杜尚广

(南昌师范学院生物系, 江西南昌 330000)

**摘要:**为建立一套完整的脚板薯离体快速繁殖体系,以脚板薯茎段为试验材料,研究脚板薯茎段表面灭菌、丛生芽诱导、无菌苗增殖及移栽等。结果表明,脚板薯茎段丛生芽诱导的最佳培养基为 MS + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 3.2 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 活性炭 1.2 g/L,诱导率为 93.6%;丛生芽增殖的最佳培养基为 MS + NAA 0.7 mg/L + 6-BA 0.8 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 活性炭 1.6 g/L + 蔗糖 40 g/L,增殖倍数为 4.61,组培苗炼苗成活率达 70% 以上。本研究建立了脚板薯的离体快速繁殖技术体系,研究结果可为脚板薯的工业化育苗提供技术参考。

**关键词:**脚板薯;快速繁殖;增殖;组织培养

**中图分类号:** S632.104. +3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)06-0039-04

脚板薯(*Dioscorea batatas* Decne)是薯蓣科薯蓣属一年生或多年生藤本植物,因其地下块茎呈不规则的扁块形,形如脚掌而得名<sup>[1]</sup>,薯块单块质量 1~2 kg,颜色有紫红色、白色 2 种。脚板薯以其肉质紫红、块大味美,并具有健脾、养胃、补肝等功效而闻名<sup>[2]</sup>,现已广泛种植于广东省、广西壮族自治区、福建省、江西省、湖南省等地。由于脚板薯块茎中富含蛋白质、淀粉、维生素、矿物质,以及较多的皂苷等成分,目前已作为一种经济作物在全球范围内大面积种植<sup>[3-5]</sup>。脚板薯中所含皂苷具有降血脂、调节血压和辅助治疗癌症的作用,具有很高的营养价值和药用价值,是一种具有很大开发价值的药食同源产品<sup>[4-6]</sup>。

近年来,随着对脚板薯化学成分及药理作用的研究不断深入,以及人们对健康饮食要求的逐渐提高,脚板薯的需求量进一步增加<sup>[7-8]</sup>。传统的无性繁殖方式出苗早、生长快,但繁殖系数低,用种量较大;长期的无性繁殖导致品种严重退化,产量大幅降低,迫切需要对脚板薯栽培品种进行脱毒改良,建立快速繁殖体系。传统的种子繁殖方式易造成薯蓣科植物后代单株之间差异较大,难以稳定保持优良性状。组织培养快繁技术是以优良无性系为外植体,通过无菌培养快速得到组培苗;该技术具有产量高、易于生产管理且能保持原有品种的优良性状等优点,可以有效克服传统无性繁殖和种子繁殖存在的问题<sup>[9-10]</sup>。

目前,有关薯蓣科组织培养方面的研究国内外均有报道。Malaurie 等对不同品种山药进行了增殖和生根培养<sup>[11]</sup>。Jasik 等在培养基中添加茉莉酸对山药进行诱导<sup>[12]</sup>。Alizadeh 等对菊叶薯蓣进行体外增殖,表明适量外源激素对薯蓣科组织培养有较大促进作用<sup>[13]</sup>。王应想等对脚板薯试管苗的生长、茎节产生和零余子诱导进行研究,但尚未建立离体快繁技术体

系<sup>[14]</sup>。目前,对脚板薯离体快繁的研究尚未见报道,本研究采用脚板薯的茎段为外植体,通过对脚板薯茎段表面灭菌、不定芽诱导、无菌苗增殖及移栽等,增殖过程同步壮苗和生根,省时省力且移栽成活率很高,无需专门进行壮苗和生根培养;本研究建立了离体快速繁殖体系,以期脚板薯工厂化育苗及脱毒苗的培育提供技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脚板薯块茎由江西省万载县辉明有机农业科技开发有限公司提供。琼脂、蔗糖等所用试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

ZY100 型同时蒸馏萃取仪,上海银泽仪器设备有限公司生产;LMQC 型立式灭菌锅,山东新华医疗器械股份有限公司生产;SW-CJ-2FD 净化工作台,上海博迅实业有限公司生产;JY3002 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司生产;艾柯 DZG-303A 超纯水仪,成都唐氏康宁科技发展有限公司生产;RDX 型智能人工气候箱,宁波东南仪器有限公司生产。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 外植体的表面灭菌** 选择块茎大、无病虫害、肉质紫红色的脚板薯,将其切成小块,每块 50~100 g,确保每小块块茎均带有芽眼;然后,将每小块的切面沾满草木灰,放在太阳下晒 1~2 h,室内晾 1~3 d;待切面愈合后再播种,可防止切口腐烂,促使发芽整齐。当芽长至 2~3 cm 时,取 1 cm 茎段,每个茎段含有 1 个节点,洗衣粉浸泡 10 min,流水冲洗 30~60 min,在无菌工作台上利用 2 步法脱毒,即 75% 乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 2~3 次,然后用 0.1% 氯化汞浸泡 2~3 min,无菌水冲洗 4~5 次。将处理好的外植体接种到 MS 培养基中。

**1.3.2 丛生芽诱导培养基的筛选** 为获得最适丛生芽诱导培养基,以 MS 培养基为基本培养基,选用  $L_{16}(4^5)$  设计进行 4 因素 4 水平的正交试验,14 d 后,统计丛生芽诱导率;根据设计在每种培养基中接种 40 个茎段,每种 20 瓶,每瓶 2 个。

收稿日期:2017-11-01

基金项目:南昌师范学院科研项目(编号:16KJYB02);江西省教育厅科技重点项目(编号:GJJ181070)。

作者简介:杜尚广(1987—),男,安徽宿州人,博士,讲师,主要研究方向为植物资源开发与利用。E-mail: duguangss@foxmail.com。

丛生芽诱导率 = 诱导出丛生芽的外植体数 ÷ 接种的外植体数 × 100%。

1.3.3 丛生芽增殖培养基的优化 以 MS + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 3.2 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 活性炭 1.2 g/L + 蔗糖 40 g/L + 琼脂 7 g/L 为诱导培养基,培养茎段 20 d。选用 MS 培养基为基本培养基,添加 1.6 g/L 活性炭以防褐化,并选用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)设计进行 4 因素 4 水平的正交试验。每种培养基中转接 40 个上述含有丛生芽的茎段,培养 20 d,观察、统计每组的增殖倍数。

增殖倍数 = 丛生芽数 ÷ 接种的外植体数。

1.3.4 炼苗和移栽 将接种于丛生芽增殖培养基中的芽体培养 60 d 后,向组培瓶中加入丛生芽增殖的液体培养基,约 1 cm 深,15 d 之后进行室外炼苗。将组培瓶从组培室中移至室外阴凉处放置 5~7 d,然后开盖保持 5~7 d,在此过程中喷洒少量水,保持湿润环境。取出组培苗,用自来水洗净根部残留的培养基,再用 0.1% KMnO<sub>4</sub> 浸泡 30 s,最后用自来水清洗,将处理好的组培苗移栽至土壤:珍珠岩(1:3)的混合基质中,组培苗长出 3 片新叶即计为成活,统计移栽成活率。

1.4 培养条件

组培室白天温度(25±2)℃,夜间温度(20±2)℃,光周期 12 h/d,光照度 3 000 lx。

2 结果与分析

2.1 丛生芽诱导培养

激素是诱导丛生芽分化的关键物质,对丛生芽的生长起到决定性的作用。接种 5 d,脚板薯茎段节点处开始萌动,然后芽不断生长膨大,叶片逐渐由紫红色变成深红色;14 d 后,丛生芽生长速度加快,设计正交试验探索不同激素组合对脚

板薯丛生芽的影响(表 1 至表 3)。

从表 1 可以看出,4 个因素对脚板薯诱导的影响大小依次为活性炭 > 烯效唑 > NAA > 6-BA。分析结果表明,当 NAA 浓度为 0.4 mg/L 时,诱导率最高,较低浓度的 NAA 有助于芽的生长;当 6-BA 浓度为 3.2 mg/L 时,脚板薯的丛生芽诱导效果最好,原因是不同浓度的 6-BA 具有促进或抑制酶的活性,从而影响芽的生长;当活性炭浓度为 1.2 g/L 时,诱导出的腋芽数最多,长势最好,随着活性炭浓度的升高,脚板薯褐化情况显著改善,但腋芽数目降低、长势较差;可能是活性炭吸附脚板薯切口处的酚类物质,防止褐化的产生,同时也吸附培养基中丛生芽诱导所需的激素和营养物质,不利于诱导的进行;当烯效唑浓度为 2.9 mg/L 时,叶片浓绿、茎粗壮、长势最好,诱导率最高;随着烯效唑浓度的增大诱导率先增大后减小,可能是高浓度的烯效唑活性较强,抑制芽的生长。由极差分析可知,丛生芽诱导效果最佳的组合是 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即:MS + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 3.2 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 活性炭 1.2 g/L。在此条件下试验在正交表的 16 次试验中并没有出现,通过做补充试验,结果得到丛生芽诱导率为 93.6%、芽数达 2.05 个,大于正交试验结果中的诱导率最高值(90.0%)、芽数(1.97 个),说明利用正交试验优化丛生芽诱导是成功的。

2.2 丛生芽增殖培养

脚板薯组培苗在 16 种不同培养基上培养 20 d 后,对丛生芽的数量进行统计,结果见表 4、表 5。从表 4 可以看出,NAA、6-BA、烯效唑、蔗糖 4 个因素对脚板薯丛生芽增殖生长影响差异较大,不同因素影响大小依次为 NAA > 烯效唑 > 蔗糖 > 6-BA。随着 NAA 浓度增大,增殖倍数呈先增大后减小趋势,当 NAA 浓度为 0.7 mg/L 时增殖倍数最大;当 6-BA

表 1 不同激素对比对丛生芽诱导率的影响

处理	A:NAA (mg/L)	B:6-BA (mg/L)	C:活性炭 (g/L)	D:烯效唑 (mg/L)	诱导率 (%)	芽数 (个)
1	1(0.2)	1(3.2)	1(1.2)	1(2.7)	89.47	1.34
2	3(0.6)	1(3.2)	3(1.6)	3(3.1)	83.33	1.52
3	4(0.8)	1(3.2)	4(1.8)	4(3.3)	52.50	1.43
4	2(0.4)	1(3.2)	2(1.4)	2(2.9)	90.00	1.53
5	2(0.4)	3(3.6)	4(1.8)	1(2.7)	90.00	1.97
6	4(0.8)	2(3.4)	3(1.6)	1(2.7)	73.33	1.95
7	3(0.6)	4(3.8)	2(1.4)	1(2.7)	30.66	1.18
8	1(0.2)	4(3.8)	4(1.8)	3(3.1)	80.00	1.85
9	4(0.8)	4(3.8)	1(1.2)	2(2.9)	90.63	1.60
10	1(0.2)	3(3.6)	3(1.6)	2(2.9)	69.57	2.30
11	2(0.4)	4(3.8)	3(1.6)	4(3.3)	74.19	1.87
12	2(0.4)	2(3.4)	1(1.2)	3(3.1)	67.74	1.57
13	3(0.6)	3(3.6)	1(1.2)	4(3.3)	73.53	2.12
14	3(0.6)	2(3.4)	4(1.8)	2(2.9)	80.65	2.00
15	4(0.8)	3(3.6)	2(1.4)	3(3.1)	62.96	1.35
16	1(0.2)	2(3.4)	2(1.4)	4(3.3)	57.69	1.47
k <sub>1</sub> (诱导率)	74.2	78.8	80.3	70.9		
k <sub>2</sub> (诱导率)	80.5	70.0	60.0	82.7		
k <sub>3</sub> (诱导率)	67.0	74.0	75.1	73.5		
k <sub>4</sub> (诱导率)	70.0	68.9	75.8	64.5		
R	13.5	9.9	20.3	18.2		

表 2 脚板薯诱导正交试验诱导率方差分析

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	2 251.957	12	187.663	0.329	0.929
NAA	410.884	3	136.961	0.240	0.864
6-B A	247.507	3	82.502	0.145	0.927
AC	906.632	3	302.211	0.530	0.693
S3307	686.934	3	228.978	0.401	0.763
误差	1 711.523	3	570.508		
总计	88 972.171	16			

表 3 脚板薯诱导正交试验出芽数的方差分析

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	13 896.750	12	1 158.063	2.190	0.282
NAA	652.188	3	217.396	0.411	0.758
6-B A	4 911.187	3	1 637.062	3.096	0.189
AC	6 360.688	3	2 120.229	4.010	0.142
S3307	1 972.687	3	657.562	1.244	0.431
误差	1 586.188	3	528.729		
总计	472 797.000	16			

表 4 脚板薯丛生芽增殖的正交试验结果

处理	A:NAA (mg/L)	B:6-B A (mg/L)	C:蔗糖 (g/L)	D:烯效唑 (mg/L)	增殖倍数
1	1(0.5)	1(0.5)	1(30)	1(2.7)	2.97
2	3(0.7)	3(0.7)	1(30)	3(3.1)	2.71
3	4(0.8)	4(0.8)	1(30)	4(3.3)	2.98
4	2(0.6)	2(0.6)	1(30)	2(2.9)	2.31
5	2(0.6)	4(0.8)	3(50)	1(2.7)	2.03
6	4(0.8)	3(0.7)	2(40)	1(2.7)	2.76
7	3(0.7)	2(0.6)	4(60)	1(2.7)	2.94
8	1(0.5)	4(0.8)	4(60)	3(3.1)	3.50
9	4(0.8)	1(0.5)	4(60)	2(2.9)	2.14
10	1(0.5)	3(0.7)	3(50)	2(2.9)	3.30
11	2(0.6)	3(0.7)	4(60)	4(3.3)	3.25
12	2(0.6)	1(0.5)	2(40)	3(3.1)	3.19
13	3(0.7)	1(0.5)	3(50)	4(3.3)	3.46
14	3(0.7)	4(0.8)	2(40)	2(2.9)	4.61
15	4(0.8)	2(0.6)	3(50)	3(3.1)	3.72
16	1(0.5)	2(0.6)	2(40)	4(3.3)	2.73
<i>k</i> <sub>1</sub> (增殖系数)	3.13	2.94	2.74	2.68	
<i>k</i> <sub>2</sub> (增殖系数)	2.70	2.93	3.32	3.09	
<i>k</i> <sub>3</sub> (增殖系数)	3.43	3.01	3.13	3.28	
<i>k</i> <sub>4</sub> (增殖系数)	2.90	3.28	2.96	3.11	
<i>R</i>	0.73	0.35	0.58	0.60	

表 5 脚板薯丛生芽增殖正交试验的方差分析

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	3.041	12	0.253	0.247	0.966
6-B A	1.192	3	0.397	0.388	0.771
NAA	0.328	3	0.109	0.107	0.951
烯效唑	0.731	3	0.244	0.238	0.866
蔗糖	0.790	3	0.263	0.257	0.853
误差	3.073	3	1.024		
总计	153.737	16			

浓度为 0.8 mg/L 时增殖倍数最高;随着蔗糖浓度的增加,增殖倍数先增大后减小,当蔗糖浓度达 40 g/L 时增殖倍数最高;烯效唑具有控制营养生长,抑制细胞伸长、缩短节间、矮化植株,促进侧芽生长的作用,当烯效唑浓度为 3.1 mg/L 时增殖倍数最大。本试验结果表明,不同培养基对丛生芽的增殖无显著影响,最佳增殖效果的培养基为:MS + NAA 0.7 mg/L + 6-B A 0.8 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 蔗糖 40 g/L + 活性炭 1.6 g/L,增殖倍数为 4.61。

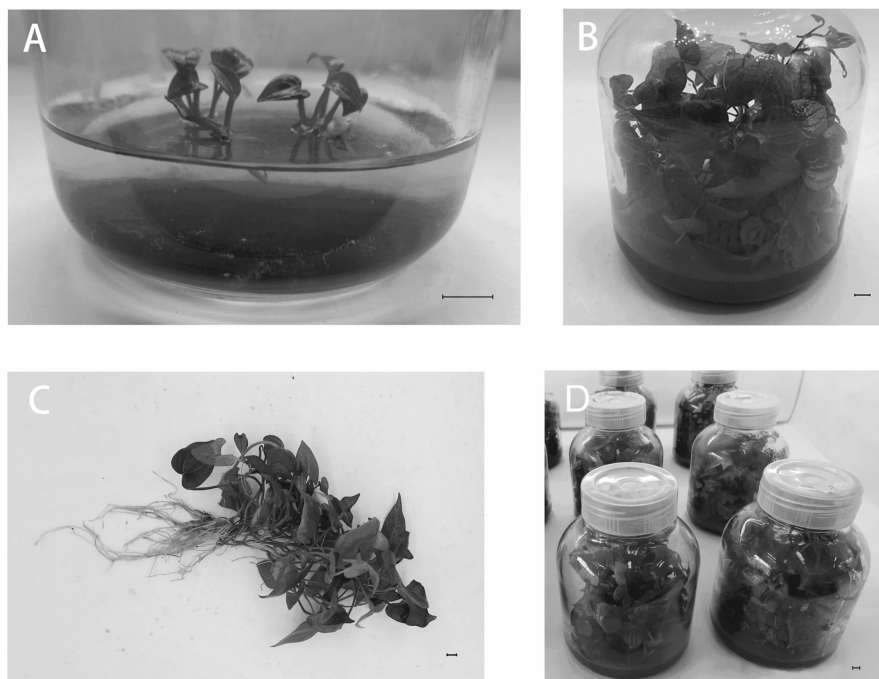
在培养的过程中,当 MS 培养基中添加 NAA 0.7 mg/L、

活性炭 1.6 g/L、烯效唑 3.1 mg/L、6-B A 0.8 mg/L、蔗糖 40 g/L 时,丛生芽生长快、繁殖系数高;叶色浓绿、茎段粗壮,所以无需专门进行壮苗培养;同时,茎段节点处萌动生根并形成发达的根系,有时根的生长速度高于茎的生长(图 1-B、图 1-C),炼苗和移栽环节成活率较高,可满足生产的需要,所以无需再进行生根培养。即,丛生芽增殖过程中壮苗和生根同步进行,并取得很好的效果,所以,本试验无需专门进行壮苗和生根培养。这大大缩短快繁体系所用时间、降低培养成本,建立更为有效的脚板薯快繁体系(图 1-D)。

2.3 炼苗和移栽

完整的再生植株炼苗之前(图 1-B),在组培瓶中加 1 cm 深的液体增殖培养基,组培苗生长更快、茎秆更加粗壮,对比发现,加液体培养基比不加液体培养基的组培苗平均高约 1.5 cm;并且在炼苗过程中,组培瓶内部环境湿润,能够有效防止叶片枯萎,提高成活率。

处理后的组培苗(图 1-C),剪掉失水的叶片,可有效防止叶片细菌孳生,污染致死。组培苗较为脆弱,叶片易失水,移栽置于阴凉通风的温室大棚中,可提高成活率。研究发现,炼苗成活率达 70% 以上。



A. 丛生芽诱导培养; B. 丛生芽增殖培养; C. 生根的试管苗; D. 组培室培养的试管苗; 标尺均是 1.0 cm

图1 脚板薯组培苗培育全过程

### 3 结论

本试验得到了脚板薯茎段丛生芽诱导的最适培养基为 MS + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 3.2 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 活性炭 1.2 g/L, 诱导率为 93.6%; 丛生芽增殖的最佳培养基为 MS + NAA 0.7 mg/L + 6-BA 0.8 mg/L + 烯效唑 2.9 mg/L + 活性炭 1.6 g/L + 蔗糖 40 g/L, 增殖倍数为 4.61; 增殖过程同步进行壮苗和生根, 炼苗成活率可达 70% 以上。本研究建立了脚板薯脱毒快繁技术体系, 为工厂化育苗提供技术支持。

### 参考文献:

- [1] 陆国权, 唐忠厚. 脚板薯花青素提取及其纯化技术研究[J]. 粮油食品科技, 2006, 14(1): 34-35.
- [2] Duan Y, Kim G H, Kim H S. Study on physiologically active compounds and antioxidant activity of Korean yam (*Dioscorea batatas* Decne.) [J]. J of Korean Oil Chemists' Soc, 2016, 33(2): 342-351.
- [3] Jin M, Suh S J, Yang J H, et al. Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- $\kappa$ B and ERK1/2 inactivation[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(11): 3073-3079.
- [4] Kang M K, Kim J S, Kim G C, et al. Quality characteristics of pancake premix with *Dioscorea batatas* powder by steaming process [J]. Korean Journal of Food and Cookery Science, 2016, 32(5): 593-599.
- [5] Kim S, Shin M Y, Son K H, et al. Yam (*Dioscorea batatas*) root and bark extracts stimulate osteoblast mineralization by increasing Ca and P accumulation and alkaline phosphatase activity[J]. Prev Nutr Food Sci, 2014, 19(3): 194-203.
- [6] 叶文峰, 周秀玲. 超声波-酸解法制备脚板薯抗性淀粉的工艺条件[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 281-283.
- [7] Oh P S, Lim K T. Glycoprotein isolated from *Dioscorea batatas* Decne modulates expressions of IL-4 and IL-10 in primary-cultured mouse lymphocytes [J]. Cell biochemistry and function, 2009, 27(5): 316-322.
- [8] Choi E M, Koo S J, Hwang J-K. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*) [J]. Journal of ethnopharmacology, 2004, 91(1): 1-6.
- [9] Kim S, Jwa H, Yanagawa Y, et al. Extract from *Dioscorea batatas* ameliorates insulin resistance in mice fed a high-fat diet [J]. Journal of Medicinal Food, 2012, 15(6): 527.
- [10] 娄丽娜, 刘哲, 许园园, 等. 萝卜与芜菁异源三倍体杂种的获得及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 881-889.
- [11] Malaurie B, Pungu O, Trouslot M F. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata* complex and *D. praeheensis* [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1995, 41(3): 229-235.
- [12] Jasik J, Mantell S. Effects of jasmonic acid and its methyl ester on in vitro microtuberisation of three food yam (*Dioscorea*) species [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(9): 863-867.
- [13] Alizadeh S, Mantell S H, Mariaviana A. In vitro shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 53(2): 107-112.
- [14] 王应想, 杨薇, 杨柏云, 等. 脚板薯脱毒试管苗的快繁及零余子的诱导[C]. 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, 2004.