

61-64

芋茎尖离体培养和快速繁殖*

毕可华 赵建萍 蒋小满 柏新付

(烟台师范学院生物系, 烟台 264025)

S632.3035

摘要 对芋优良品种莱阳毛芋头进行茎尖培养和快速繁殖。试验表明, 外植体表面灭菌的最佳方案是乙醇→新洁尔灭→剥幼叶→升汞。在较软的培养基中, 茎尖大于 0.6 mm, 成活率为 90% 以上。不定芽分化的最适培养基为 MS+BA 1 (mg/L 以下单位相同)+NAA 0.2+Spm 20, 其分化率为 100%。不定芽在 MS+BA 2+NAA 0.1+Spm 50 的培养基中, 可实现继代繁殖和诱导生根一步完成, 月增殖系数达 7.3, 生根率 88.3%。芋试管苗移栽于沙壤土基中, 成活率为 90% 以上, 且生长健壮, 根系发达。

关键词 芋; 茎尖培养; 快速繁殖

In vitro shoot-tip culture and rapid propagation of *Colocasia esculenta*

Bi kehua Zhao Jianping Jiang Xiaoman Bai Xinfu

(Department of Biology, Yantai Teachers College, Yantai 264025)

Abstract The methods of shoot-tip culture and rapid propagation of *Colocasia esculenta* were studied. The most suitable procedure for surface sterilization of explants was: ethanol→saponation of cresol→stripping tender leaves→sublimate. On softer media, survival rate of shoot-tip, over 0.6 mm in diameter, was over 90%. The frequency of adventitious buds differentiation was 100% on MS medium supplemented with 1 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA and 20 mg/L spermine. The subculture and the rooting induction were simultaneity when adventitious buds were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA and 50 mg/L spermine. The monthly coefficient of proliferation was 7.3, and rate of root formation was 88.3%. The survival rate of planting was over 90% after plantlets transplanted in the sand soil, they grew well and had a good root system.

Key words taro (*Colocasia esculenta*); shoot-tip culture; rapid propagation

芋 (*Colocasia esculenta*) 又名芋头、芋艿, 为天南星科草本植物, 原产我国及印度。马来半岛等热带地区。芋适应性广, 生长强健, 是世界上广为栽培的蔬菜和粮食作物⁽¹⁾。在我国, 芋的栽培历史

1998-01-09 收稿

第一作者简介: 毕可华, 男, 1944 年出生, 副教授, 从事植物组织培养教学和研究工作。

* 山东省教委资助项目

悠久, 优良品种极多, 如广西荔浦芋、上海白梗芋及四川宜宾的串根芋及山东莱阳毛芋头^[1,2,3]。莱阳毛芋头属多子芋, 产量高, 品质好, 近年其加工品出口量增加迅速。芋做为我国重要的土特产品, 进一步发展生产与出口业具有广阔的发展前途。但长期以来, 芋多采用无性繁殖方法, 病毒病十分普遍, 从而严重影响了产量和品质的提高。因此, 通过组织培养技术对现有名种进行脱毒复壮研究很有必要^[4]。本试验以莱阳毛芋头为试材, 对其茎尖离体培养过程中, 外植体的表面灭菌、茎尖的启动、不定芽继代繁殖及试管苗诱导生根、移栽等进行了研究和探讨, 旨在为解决芋的品种退化, 开发脱毒种源奠定基础。

1 材料和方法

供试材料为莱阳毛芋头, 取自山东省莱阳市岚子乡青扬奋村。将顶芽饱满、充实的球茎, 剥去其上的鳞片毛, 经自来水冲洗后, 切取顶芽或侧芽进行表面灭菌。采用的灭菌剂有升汞、新洁尔灭和次氯酸钠等, 试验在联用乙醇的情况下, 不同灭菌剂的效果。为进一步提高灭菌效果, 本试验设计了灭菌过程中, 再剥除二层幼叶的处理。将经表面灭菌处理的芋芽, 剥取 0.3~1.2 mm 大小的茎尖, 接种于 MS 培养基上进行培养。不同培养阶段附加不同浓度的 BA、NAA、精胺 (Spm) 及芋块茎提取液。培养基加蔗糖 30 g/L, pH 值 5.8, 在 1.2 kg/cm²、121 ℃ 饱和蒸汽压下灭菌 20 min。培养温度 25±1 ℃, 每天光照 12 h, 光照强度 1500~2000 lx。试管苗移栽前, 先置于自然散射光下开瓶炼苗 7 d, 然后移至分别盛有蛭石、河砂或砂壤土的营养钵中, 用 MS 大量元素营养液浇透, 加盖塑料薄膜保湿 2 周, 期间注意保持土温 25 ℃ 左右。待 4 月下旬将成活试管苗定植于大田, 如大棚栽培则定植期提前到 4 月上旬。

2 结果与讨论

2.1 几种消毒剂及灭菌方法比较

芋球茎生长在地下, 杂菌污染严重, 因此给外植体的表面灭菌带来很大困难。为了获得无菌培养物, 选择灭菌效果好, 对试材杀伤力尽可能小的药剂和灭菌方法尤为重要。升汞等三种杀菌剂及不同灭菌方法的试验结果见表 1。对芋芽进行表面灭菌, 在联用乙醇的情况下, 单用升汞、新洁尔灭或次

表 1 不同药剂及灭菌方法的效果比较 (接种 20 d)
Table 1 Comparisons of sterilization effect between different methods and reagents. (20 days after inoculating)

处理编号 No. of treatment	药剂及方法 Reagent and method of sterilization	接种日期(日/月) Date of inoculation (D/M)	接种数 No. of explant inoculated	污染数 No. of explant contaminated	污染率(%) Rate of contamination (%)
1	70%乙醇 5 min + 0.1%升汞 10 min	3/5	26	19	73.1
2	70%乙醇 5 min + 15%新洁尔灭 10 min	3/5	33	31	93.9
3	70%乙醇 5 min + 5%次氯酸钠 10 min	3/5	28	28	100.0
4	70%乙醇 5 min + 剥 2 层幼叶 + 0.1%升汞 10 min	4/5	32	14	43.8
5	70%乙醇 5 min + 15%新洁尔灭 10 min + 剥 2 层幼叶 + 0.1%升汞 10 min	4/5	32	10	31.3

氯酸钠等任何一种药剂的效果都不理想, 接种 20 d 污染率为 73.1%~100.0%, 其中升汞的效果略好一些, 次氯酸钠效果最差。试验表明, 将芋芽先用 70%乙醇浸泡 5 min, 然后在无菌条件下剥 2 层幼叶, 再经 0.1%升汞处理 10 min, 可以明显降低污染率, 如果再辅加以新洁尔灭则效果更好。说

明在外植体灭菌过程中,除了选择适当的灭菌剂外,操作方法也十分重要。芋芽灭菌先用乙醇、新洁尔灭长时间浸泡,然后在无菌条件下,剥去可能灭菌不彻底的外部幼叶,内部组织再经升汞处理,可以做到既灭菌彻底,又不使外植体受到大的伤害,接转后污染率较低,这种对地下器官进行表面灭菌,其污染率稳定地控制在 43.8% 以下的结果已属不易。

2.2 茎尖成活与分化、生长的影响因子

将茎尖接种到适宜的培养基中,5 d 后茎尖明显变绿并开始膨大生长,说明已经成活。茎尖成活率高低与其大小有密切关系。试验表明,茎尖小于 0.3 mm 其成活率很低,而在大于 0.6 mm 的情况下,只要剥离、接转速度较快,成活率可达 90% 以上(表 2)。茎尖成活率也与培养基的硬度有关,据试验,在每升培养基加琼脂(条状)不高于 6.5 g 的情况下,利于茎尖的成

表 2 茎尖大小与成活率的关系(接种 30 d)

Table 2 Relationship between size of shoot tip and survival rate

茎尖直径(mm) Diameter of shoot tip (mm)	接种数 No. of explant inoculated	成活数 No. of survival explant	成活率(%) Survival rate (%)
0.3	18	5	27.8
0.6	20	18	90.0
0.9	20	20	100.0
1.2	20	20	100.0

活。成活的茎尖约经 20 d 后,可直接分化形成不定芽,不定芽的分化能力与培养基中激素种类、配比及精胺¹⁾(Spm)的浓度有密切关系。试验表明,BA 对不定芽的分化最为重要。在缺乏 BA 的情况下,不定芽的分化率很低,只有 11.1%~15.0%。NAA 对不定芽的分化也有重要作用,缺乏 NAA,不定芽分化率只有 56.0%~68.1%。在 BA 与 NAA 配合使用的情况下,不定芽的分化率可达 75.0%~83.3%。精胺(Spm)对不定芽的分化也具有良好的影响。添加 BA、NAA,并配合使用较低浓度的精胺(Spm),不定芽的分化率高达 89.5%~100.0%,说明多胺类化合物精胺(Spm)对促进芋芽分化与 BA、NAA 间具有增益效应(表 3)。本试验芋芽分化的最佳培养基为 MS + BA1 + NAA 0.2 + Spm 20。芋不定芽的生长也能为激素和精胺(Spm)所促进,在上述芽分化最佳培养基中,不定芽的生长也较为健壮。

表 3 不同激素与精胺(Spm)对芽分化的影响(30 d)

Table 3 The effect of spermine and different hormones on differentiation of buds.
(30 days after inoculation)

培养基号 No. medium	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Spm	接种数 No. of explant inoculated	成活数 No. of survival explant	分化数 No. of explant of differentiation	分化率(%) rate of differentiation (%)
1	0	0	0	21	20	0	0
2	0	0.2	2.0	20	20	3	15.0
3	0	0.6	100	30	18	2	11.1
4	1.0	0	100	22	22	15	68.2
5	1.0	0.2	20	21	21	21	100.0
6	1.0	0.6	0	19	18	15	83.3
7	2.0	0	100	25	25	14	56.0
8	2.0	0.2	0	30	20	15	75.0
9	2.0	0.6	20	19	19	17	89.5

2.3 继代繁殖与根诱导

将高约 1.5~2.0 cm 的无根芽苗接转到适当的培养基中,可以实现继代繁殖和诱导生根一步完

1) 精胺(Spermine,Spm) Sigma 公司产品

成。由表4可见,无根芽苗在3号培养基中,60d即可大量增殖并发根。其月增殖系数为7.3,生根率88.3%。且发根质量较好。以后的移栽试验显示,这类苗的移栽成活率也高。上述结果表明,精胺(Spm)做为重要的多胺类化合物,在芋芽的增殖和不定根发生中具有重要作用,这与前人的研究结果是一致的^[5,6]。芋提取液在诱导芽增殖和生根方面的效果并不明显。

芋试管苗继代繁殖和诱导生根的一步完成,为今后工厂化,低成本地快繁芋脱毒试管苗打下了有利的基础。

表4 不同培养基对试管苗继代繁殖和生根的影响(接种60d)

Table 4 The effect of different media on the subculture and root formation of plantlet (60 days after inoculation)

培养基号 No. of medium	培养基配方 Medium	接种数 No. of explant inoculated	增殖数 No. of proliferation	月增殖系数 Monthly coefficient of proliferation	生根增殖苗数 No. of rooted plantlet	生根率(%) Rate of rooting	生根状态 Condition of rooting
1	BA2	30	126	2.1	7	5.6	根长 1.7 cm 较纤细、不整齐
2	BA2 + NAA 0.1	31	272	4.4	28	10.3	根长 1.5 cm 较纤细、整齐
3	BA2 + NAA 0.1 + Spm 50	28	409	7.3	361	88.3	根长 6.0 cm 整齐、粗壮
4	BA2 + NAA 0.1 + Spm 50 + 芋提取液	33	488	7.4	430	88.1	根长 6.0 cm 整齐、粗壮

2.4 试管苗的移栽

当试管苗株高4~6cm,生根3~5条,根长2cm左右时,即可进行移栽。移栽试验表明,在砂壤土中,芋试管苗成活率为90%,且生长健壮,根系发达。采用河砂,肥水控制难度大,试管苗成活率最低。而蛭石虽然移栽前期试管苗成活率较高,但后期长势明显偏弱。因此,在芋试管苗生产中,移栽基质以价廉高效的砂壤土为好。考虑移栽前期试管苗根际通透性的重要性,如果在砂壤土的基础上,试用分层培养基,即上层为河砂,中间为砂壤土,底层铺粗砂土,效果可能更好。此外,在移栽过程中,环境温度,尤其是基质温度也十分重要。在基质含水量较大的情况下,温度过低,过高,都会引起试管苗烂根,甚至整株死亡。我们认为,芋试管苗移栽过程中,基质温度以20~30℃较为适宜。

试管苗移栽成活后40d左右,具4~5片叶,株高达15cm左右时,进行病毒检测。酶联免疫吸附试验(ELISA)表明,培养茎尖小于0.6mm的试管苗已不带芋花叶病毒(Dasheen mosaic virus)¹⁾,其株系脱毒率为100%,可以做为脱毒种源利用。

参考文献

- 1 中国农业科学院蔬菜研究所.《中国蔬菜栽培学》.北京:农业出版社,1987.319~326
- 2 杨保国,孔庆东.芋种质资源的分类研究.武汉蔬菜科技,1995,(2):31~34
- 3 高中强,王彦建.《生姜、山药、芋头生产100问》.北京:中国农业出版社,1995.86~117
- 4 曹欢欢,陈九南,马国华.芋芽茎尖培养去病毒研究.上海农学院学报,1990,8(3):215~220
- 5 潘瑞琪.多胺是植物生长发育的调节物.植物生理学通讯,1985,(6):63~68
- 6 Sahapaty S, Nair H. *In vitro* propagation of taro, with spermine, arginine and ornithine. II. Plantlet regeneration via callus. *Plant Cell Reports*, 1995, 14: 520~524

1) 芋花叶病毒抗血清由美国 ATCC 公司提供