

奉化大芋茛脱毒苗的组培快繁研究

詹忠根¹ 徐程²

(1. 浙江经贸职业技术学院 杭州 310018; 2. 浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

摘要:组织培养试验表明,培养在MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L上的奉化大芋茛茎尖,不定芽诱导率可达75%,月增殖系数为4倍。若在上述培养基中添加芋头汁、椰子汁等有机物则可实现不定芽继代繁殖和诱导生根一步完成,0.5~1 mg/L的三十烷醇在壮苗过程中的应用进一步提高了芋苗的根数、根长、苗高和鲜重。

关键词 奉化大芋茛 茎尖 组织培养

Study on Virus-free Plantlets Rapid Propagation of *Colocasia esculenta* cv. *Fenghuayunaitou*

Zhan Zhonggen¹, Xu Cheng²

(1. Zhejiang Economic&Trade Polytechnic, Hangzhou 310018;
2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012)

Abstract: Shoot tips as explants of field *Colocasia esculenta* (cv. *Fenghuayunaitou*) were cultured on MS basal salts medium supplemented with 2.0 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L NAA. 75% New buds can be obtained, and 4-times new buds were proliferated within one month. If 10% organism (such as taro or coconut milk) is added in media, the new buds were proliferated faster and plantlets with roots were obtained. In addition, 0.5-1 mg/L triacontanol increased the number and length of roots, also enhanced shoot growth and fresh weight.

Key words *Colocasia esculenta* cv. *Fenghuayunaitou* Shoot tip Plant tissue culture.

奉化大芋茛(*Colocasia esculenta* cv. *Fenghuayunaitou*)为国产芋中众多优良品种之一,由于长期采用种芋直接繁殖导致病毒感染现象十分普遍,陈集双等^[1]的调查表明奉化大芋茛的自然感病检出率接近100%。病毒侵染不仅使植物生长衰退、块茎逐年变小,而且使部分芋头变成僵芋而“煮不熟”,严重影响了产量和品质。在目前对病毒感染尚无有效药剂防治的情况下,为保持品种的优良性状,非常有必要通过组织培养技术进行脱毒复壮研究^[2]。

1 材料与方 法

1.1 材料处理

将收获后的奉化大芋头放置于阴暗和干燥处贮藏1个月,然后在25℃、光照和保持充足湿度条件下进行催芽。当芋芽长至2~3 cm时小心切取其顶芽和腋芽,经洗洁精浸泡5 min及流水冲洗30 min后置于含1滴吐温-80的70%酒精溶液中浸泡2 min,再放入0.1%的HgCl₂溶液中浸泡15 min后用无菌水冲洗4次后置解剖镜下小心剥去芋芽外面的包叶,切取直径茎尖作外植体。

1.2 外植体培养

以MS为分化培养基,观察BA、KT、NAA、三十烷醇及马铃薯汁、芋头汁、椰子汁和香蕉汁等因素对不定芽的分化与增殖的影响。以上培养基中均加入30 g/L的蔗糖作碳源,pH 5.8,培养温度为(25±1)℃,日光灯做光

收稿日期:2005-11-25。

基金项目:浙江省科技厅项目资助(011102204)。

作者简介:詹忠根(1971~),男,讲师,硕士;主要从事植物组织培养研究。

源, $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 16 h。

2 结果与分析

2.1 激素对不定芽诱导及增殖的影响

接种于 MS + 2 mg/L 6-BA 固体培养基上茎尖在培养过程中褐化率较高, 尤其是直径较小的茎尖褐化率更高。成活的茎尖培养 10 d 后明显变绿并开始膨大生长, 50 d 后会会长出球状的组织块, 从茎尖到球状体的生长过程中并未见到愈伤组织的形成。将球状组织块一分为四后接种在含有不同激素及配比的 MS 培养基上, 30 d 后均有数量不等的芽长出。不定芽增殖时, 在其芽基周围也相继分化出新芽, 并且在个别生长较快的芽茎上也会长出数个新芽, 逐渐形成丛生小苗。不定芽的诱导及增殖与培养基中激素的种类、浓度与配比有很大的关系 (见图 1, 2)。从图 1 可以看出, 激素对不定芽的诱导极为重要, 在没有激素的情况下几乎看不到不定芽形成。而激素的种类及对比对不定芽的发生也有明显的不同。如 KT 对不定芽的诱导不及 6-BA 的一半, 而 6-BA 与 NAA 配合使用后, 不定芽的诱导率达到 65.0% ~ 75.0%。在本试验中, 芋芽诱导与增殖的最佳配方为 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L。在这一培养条件下, 当不定芽长成丛生小苗后, 有的小苗不再继续增殖, 而出现长根现象。试验表明, 若将这种小苗转接在 MS + 6-BA 2 mg/L 的培养基上可以抑制生根, 从而保持快速增殖的能力。

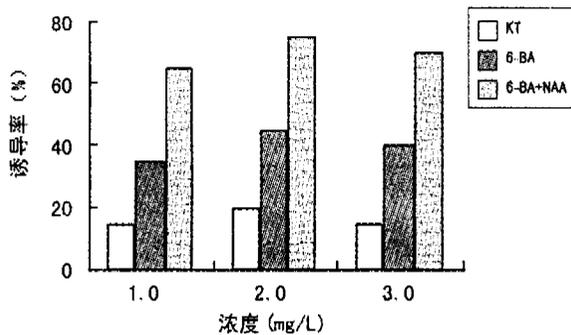


图1 激素与不定芽分化的关系

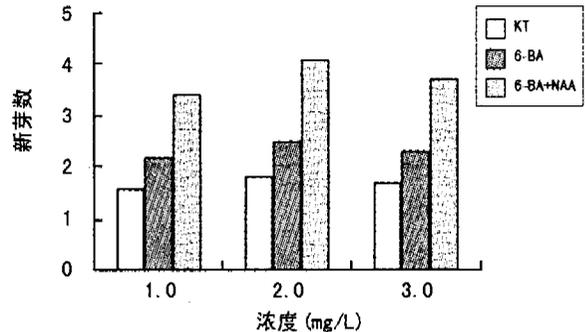


图2 激素与不定芽增殖的关系

2.2 有机添加物对不定芽增殖及根诱导的影响

将长约 1.5 cm 的无根芽苗分别接转到含有 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 10% 马铃薯汁、芋头汁、椰子汁或香蕉汁的 MS 培养基上培养 45 d 后发现有机添加物对芋芽增殖及根诱导有明显的影 响, 其中添加 10% 的椰子汁对不定芽的增殖最为有利; 添加 10% 的香蕉汁有利于芋苗长高, 但不定芽的增殖量较少; 而添加 10% 的马铃薯汁或 10% 的芋头汁可以实现继代繁殖和诱导生根一步完成, 且根的生长状态较好, 移栽试验也表明这类苗的移栽成活率也较高 (图 3)。

2.3 三十烷醇对试管苗壮苗的影响

三十烷醇 (triacontanol, 简称 TA) 是由 30 个碳原子组成的长链伯醇, 其作为增产剂它已在多种作物中得到应用, 但在组织培养中的应用极少。TA 处理 23 d 后测定植株生物量, 获得了芋再生苗的株高、根数、最长根长和鲜重的数据, 用 DPS 软件对获得的数据进行分析表明不同浓度的 TA 对芋苗生长的影响有显著的差异 (图 4)。即在芋苗生根培养过程中, 0.5 mg/L、1 mg/L TA 处理后能使芋再生苗的株高、根数、最长根

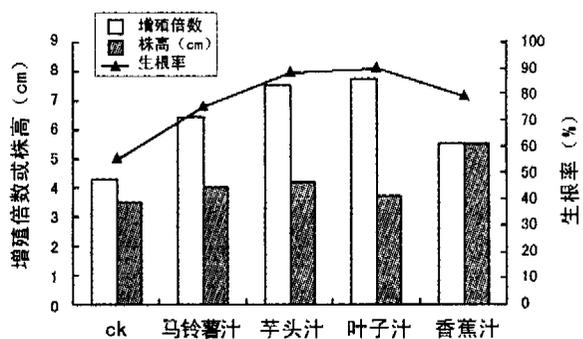


图3 有机添加物与不定芽增殖、苗高和生根率的关系

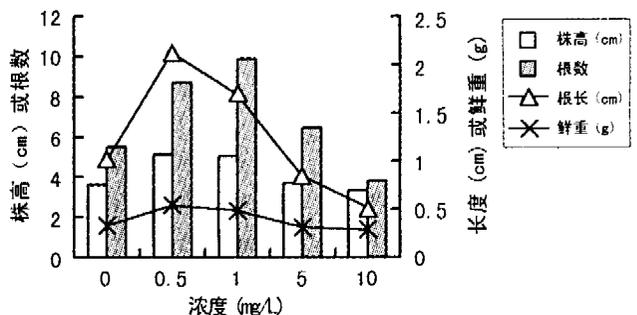


图4 三十烷醇对芋苗生长的影响

长和鲜重都显著性地高于对照,即促进了芋再生苗的生长,其中以0.5 mg/L的TA处理效果最佳;相反,5 mg/L、10 mg/L TA处理则显著性地抑制芋再生苗的生长。

2.4 试管苗移栽

在试管苗移栽前,先在培养瓶中炼苗4~5 d后再打开瓶盖继续炼苗2~3 d,洗去琼脂后移栽到已灭菌过的蛭石和珍珠岩(1:1)的营养钵中。移栽后的芋苗放在25℃的温室中培养,在培养的前2周用1/10 MS大量元素营养液浇灌蛭石和珍珠岩,并加盖塑料薄膜保湿,移栽成活率最高可达90%。当移栽苗长到具4~5片叶,株高达15 cm左右时,以DsMV基因组和CMV基因组RNA的cDNA探针,对芋组培苗进行DsMV和CMV检测表明经过茎尖培养处理,约10%的组培苗已无DsMV和CMV。

3 小结

脱毒苗的离体快繁不受地区、气候的影响,其繁殖速度比常规方法提高数万倍到数百万种,能在短时间内提供大量优质种苗。芋脱毒苗的使用不但能达到芋病害防治和品质改良的目的,也解决了常规育种所需大量商品芋的问题,并为国际间种质资源的交流提供了便利。本试验中,将茎尖在MS+2 mg/L 6-BA培养基中所形成不定芽转移至MS培养基中能迅速生根而长成完整的小植株,炼苗的成活率为90%以上。

参考文献

- 1 陈集双. 我国13种天南星科作物芋花叶病毒的研究. 微生物学报, 1996, 36(2): 126~131.
- 2 曹欢欢, 陈九南, 马国华. 芋茎尖培养去病毒研究. 上海农学院学报, 1990, 8(3): 215~220.

(上接第3页)

3.2 在播种试验中发现,春、夏、秋播种时间在实践中可作适当调整:在承德市区,春播时间选在谷雨前后2 d;第一批夏播时间选在夏至前2 d,第二批选在大暑前2 d;秋播时间选在立秋后2 d。

3.3 由表2可见,春播苗应季生长,附合“春播秋收”规律,但由于初春气温偏低,出苗经过较长。秋播时间气温适宜,墒情好,出苗快而齐,当年不能开花,但翌年与春播苗相比,能提早2个月开花,收获期也相应提前。夏播苗正值雨季,易被雨水冲没;另外,由于21℃以上的高温即抑制野罌粟幼苗生长^[6],遇高温多湿环境,还易生病。故生产中不宜采用夏播;采用春播、秋播均可,而以秋播最好。生产中可将春播与秋播结合起来应用,还可以延长赏花期。

3.4 由表3可见,野罌粟播种后20 d内,施肥区与不施肥区无差别;30 d后略有差别;40 d后施肥区长势明显优于不施肥区。由此认为,有条件的地区在种植野罌粟前,应施用有机肥。

3.5 野罌粟幼苗移植后也应用了“缓苗期”一词,但有别于蔬菜定植中的“缓苗期”^[7]。野罌粟幼苗移植适期主要以其叶片数的多少来确定。春播苗夏移最适时期是Ⅱ期苗(6月6日左右移植),此时的野罌粟幼苗叶片数在11片左右。野罌粟幼苗移植成活率虽高,但与播种相比,幼苗移植费工费时,成本相对较高。

3.6 育苗时带纸袋或切块,移植时操作方便,幼苗不易露根,缓苗快。叶片数长到7~8片即可进行移植。移植面积比约为1:25,即1 hm²地的幼苗可移植25 hm²大田。此法育苗成本虽高,但由于移植成活率高,集中育苗易管理,可节约大田用水等多项开支。从移植面积比分析,浇灌1 hm²地幼苗用水就可代替25 hm²大田用水。从这个角度考虑,此法宜在生产中推广应用,因为它的综合经济效益可观。

参考文献

- 1 陈冀胜, 郑硕. 中国有毒植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 444~445.
- 2 全国中草药编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987, 570.
- 3 李云祥, 甄占萱. 野罌粟生态环境调查初报[J]. 中草药, 2003(增刊): 234~235.
- 4 韩生玉, 赵春颖. 野罌粟野生变家种的初步研究[J]. 承德医学院学报, 2002(3): 234.
- 5 李云祥, 甄占萱, 那淑芝等. 野罌粟种子形态、品质与萌发规律的研究[J]. 种子, 2005, 24(6): 4~6.
- 6 甄占萱, 李云祥, 那淑芝等. 野罌粟种子萌发温度的研究[J]. 种子, 2005, 24(7): 32~33.
- 7 何文菊, 杨世杰. 蔬菜栽培技术[M]. 石家庄: 河北省科普创作协会, 1984, 5~6.