

建昌红梗芋组培技术及其遗传稳定性研究

崔瑾 李式军 周双庆 陈洪富 杨旭东

摘要 研究不同琼脂、TDZ 和 BA 浓度对芋组培苗诱导、生长和增殖的影响,并对组培苗在大田种植过程中生物学特性、产量、品质以及遗传稳定性进行了初步研究。结果表明:适当降低琼脂浓度和添加 TDZ 可以提高红梗芋茎尖诱导率,缩短组培苗培养周期和提高组培苗质量。组培苗大田种植第一年表现出原种的生物学特性,根尖染色体观察和蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱表明,组培苗具有遗传稳定性。

关键词 芋 组织培养 遗传稳定性

建昌红梗芋属多子芋类型,是金坛市的名优地方品种。但由于长期传统栽培中一直采用球茎进行无性繁殖,病毒病发生普遍,产量和品质逐年降低,品种退化,栽培面积大幅度缩小,严重影响了建昌红梗芋的发展。利用茎尖脱毒培养生产组培苗来替代种芋是解决这一问题的有效途径。国内外已有不少有关芋组织培养的报道,但由于芋茎尖诱导效率低,初代培养时间一般长达 60 天以上,组培苗驯化成活率低导致芋组培快繁研究成果难以广泛应用于生产。目前国内有关芋快繁技术及组培苗大田生长状况和遗传稳定性进行研究的报道还不多。本研究为建立芋组培苗商品化生产体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 红梗芋脱毒快繁

先将种芋在室温 25℃ 以上催芽,待芽长 2~3 cm 时,剝割顶芽或侧芽,用自来水冲洗 2 h,先用 75% 的乙醇表面消毒 45 s,再用 0.1% 的氯化汞振荡消毒 12~14 min,每次用无菌水冲洗 4 次以上。在超净工作台上剝取茎尖分生组织,接种于不同激素配比的 MS 启动培养基中(见表 1),重复 3 次。茎尖分生组织在上述培养基中培养一个月后,转入 MS 增殖培养基中(见表 2),重复 3 次。每隔 30~40 天转接一次,经过 2~3 次转接,生成数量较多的丛生芽。红梗芋的丛生芽转接到 MS 生根培养基上(见表 3),重复 3 次,比较不同琼脂浓度、激素处理对茎尖生长,芽增殖和组培苗生根的影响。以上 MS 培养基中,蔗糖浓度 3%,pH5.8。在室温(25±2)℃,光照强度 2 500 lx 条件下培养。

1.2 组培苗驯化移栽

在温度 20~30℃,相对空气湿度 85% 以上,散射光条件下,以蛭石为驯化基质,7 天后浇营养液,移栽 14 天后,红梗芋组培苗可产生 4~5 条新根,1~2 片新叶。一个月后,组培苗高 15~20 cm,定植大田。

1.3 组培苗大田种植及产量、品质测定

试验田设在建昌镇农技站农场,耕深 20 cm,定植前结合整畦,每 667 m² 施腐熟有机肥 1 800 kg,速效复合肥 27 kg。2000 年 4 月 16 日定植组培苗并播种普通红梗芋种芋作为对照,每 667 m² 定植或播种 3 000 棵,畦宽 1.2 m,沟宽 0.3 m,株距 0.3 m,进行常规管理。9 月 24 日进行球茎膨大生长期的生长状况调查,调查株高,成叶数,最大叶的叶长,最大叶的叶宽,主茎基部直径即茎基粗。11 月 25 日收获,调查母芋重,子芋总重,子芋个数,折合 667m² 产量,并用旋光法和考马斯亮蓝 G-250 法测定各处理组的总淀粉和粗蛋白质含量,重复 3 次。

1.4 遗传稳定性研究

①分别随机抽取红梗芋组培苗和对照 10 株根尖为材料,用 8-羟基喹啉进行预处理,电镜观察细胞分裂中期染色体数目和形态。

②以红梗芋组培苗及对照的母芋和子芋为材料,进行蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度 5%。先稳压 80 V,溴酚蓝迁移至分离胶时,稳压 100 V。

2 结果与分析

2.1 不同琼脂、激素处理对茎尖生长的影响

由表 1 可知,在相同的琼脂浓度下,TDZ 和 BA 两种激素对红梗芋茎尖萌动、生长的影响差异较大。与 BA 相比,TDZ 对红梗芋茎尖 3 天转绿率、30 天后生根率、30 天后根长和 30 天后苗高这些指标

崔瑾,南京农业大学园艺学院,210095

李式军,杨旭东,通讯地址同第一作者

周双庆,陈洪富,江苏省金坛市建昌镇农技站

收稿日期:2001-07-18

表 1 不同琼脂和激素浓度对茎尖生长的影响

处理	琼脂浓度 g/L	BA mg/L	TDZ mg/L	NAA mg/L	天后转绿 率/%	天后生根 率/%	天后根长 cm	天后苗长 mm
1	4	0	0.01	0.02	95.0abc	43.5c	3.80b	17.0c
2	4	0	0.1	0.02	99.1a	90.5a	5.08a	30.0a
3	4	0	1	0.02	93.2cd	33.7e	0.78e	9.8e
4	4	1	0	0.02	83.0f	0g	0f	7.2g
5	4	2	0	0.02	85.3ef	0g	0f	9.2ef
6	4	3	0	0.02	89.5de	0g	0f	8.7efg
7	6	0	0.01	0.02	93.5bcd	41.7d	2.12d	14.5d
8	6	0	0.1	0.02	98.2ab	88.0b	3.28c	26.8b
9	6	0	1	0.02	91.7cd	31.8f	0.58e	8.5efg
10	6	1	0	0.02	77.2g	0g	0f	7.3g
11	6	2	0	0.02	82.5f	0g	0f	8.0fg
12	6	3	0	0.02	82.5f	0g	0f	8.0fg

注:不同小写字母分别代表 0.05 水平上相关显著

表 2 不同琼脂和激素浓度对芽增殖的影响

处理	琼脂浓度 g/L	BA mg/L	TDZ mg/L	NAA mg/L	增殖系 数
1	4	0	0.01	0.05	7.5c
2	4	0	0.1	0.05	15.7a
3	4	0	1	0.05	4.5e
4	4	1	0	0.05	8.1bc
5	4	3	0	0.05	11.2b
6	4	5	0	0.05	3.7ef
7	6	0	0.01	0.05	8.2bc
8	6	0	0.1	0.05	16.1a
9	6	0	1	0.05	6.0d
10	6	1	0	0.05	7.0c
11	6	3	0	0.05	8.3bc
12	6	5	0	0.05	3.2ef

注:不同小写字母分别代表 0.05 水平上相关显著

的作用显著,说明 TDZ 能够明显诱导茎尖的萌发和生长,在 25~30 天诱导茎尖形成具 2~4 片叶,少量根系的完整植株,大大缩短初代培养时间,而 BA 则完全不能诱导茎尖的生根,对茎尖萌动、生长的

作用迟缓。根据以往芋组织培养的报道,培养基中琼脂浓度一般在 6~7 g/L,本试验设 4 g/L 和 6 g/L 两个处理,结果发现在 TDZ 同一浓度水平下,琼脂浓度为 4 g/L 与琼脂浓度为 6 g/L 在 30 天后生根率,30 天后根长和 30 天后苗高这三组数据上有显著差异,降低琼脂浓度可以明显提高红梗芋茎尖初代培养 30 天后生根率、30 天后根长和 30 天后苗高。但在 BA 的同一浓度水平下,琼脂浓度的改变对红梗芋茎尖初代培养的影响不显著。最优初代培养基为 2 号处理。

2.2 不同琼脂、激素处理对芽增殖的影响

由表 2 可看出,在同一激素浓度水平下,处理 30 天,不同琼脂浓度对红梗芋芽的增殖系数的影响差异不显著,因此,在增殖培养基中降低琼脂浓度并不能提高芽的增殖系数。当琼脂浓度相同时,芽增殖系数的差异主要是由于激素种类和浓度的变化引起的,与 BA 相比,TDZ 显著提高芽增殖系数。TDZ 和 BA 的浓度分别为 0.1 mg/L 和 3 mg/L 时,芽的增殖系数达到最大。

2.3 不同琼脂、激素处理对组培苗商品性质的影响

由表 3 可以看出,在同一激素浓度水平下,琼脂浓度变化引起的差异显著,适当降低琼脂浓度可以明显促进根、茎部的生产,提高驯化成活率。当琼脂浓度相同时,与 BA 相比,TDZ 对组培苗质量的

表 3 不同琼脂和激素浓度对组培苗质量的影响

处理	琼脂浓度 g/L	BA mg/L	TDZ mg/L	NAA mg/L	苗高 cm	根鲜重 g	最大根长 cm	驯化成活 率/%
1	4	0.5	0	0.5	4.52dc	0.738h	6.67def	77.5d
2	4	1	0	0.5	5.55a	0.830g	7.18cde	81.3c
3	4	2	0	0.5	4.18e	0.485k	5.32ef	74.3e
4	4	0	0.05	0.5	5.18b	2.123b	12.78a	85.0b
5	4	0	0.1	0.5	5.75a	2.423a	11.48ab	92.5a
6	4	0	0.2	0.5	4.45d	1.415e	9.03bcd	82.2bc
7	6	0.5	0	0.5	4.12e	0.503j	5.80ef	74.3e
8	6	1	0	0.5	4.68c	0.668i	7.22cde	78.0d
9	6	2	0	0.5	3.75f	0.312l	4.53f	69.2f
10	6	0	0.05	0.5	5.12b	1.870d	11.18ab	81.7c
11	6	0	0.1	0.5	5.60a	1.982c	12.05a	82.7bc
12	6	0	0.2	0.5	4.18e	1.222f	9.35bc	80.2cd

注:不同小写字母分别代表 0.05 水平上相关显著

表 4 组培苗生长情况、产量和品质分析

处理	成叶数	最大叶长/cm	最大叶宽/cm	株高 cm	母芋 重/g	子芋总 重/g	子芋个 数/个	子芋单 重/g	折合 667 m ² 产量/kg	子芋总淀粉 含量/%	子芋粗蛋白含 量 mg/g·fw ⁻¹
组培苗	5.4 a	26.1 bA	23.7 a	36.7 bB	267.2 a	231.7 B	8.8 bA	26.4 a	1003.1 bA	15.23 a	24.10 aA
对照	5.7 a	30.6 aA	25.5 a	52.2 aA	283.9 a	394.3 A	11.4 aA	34.4 a	1337.5 aA	15.01 a	21.45 bA

注:不同小写字母分别代表 0.01、0.05 水平上相关显著

影响,尤其是对根鲜重和驯化成活率的影响,效果显著,并且 TDZ 处理的最佳浓度为 0.1mg/L,5 号培养基为最优培养基。

2.4 红梗芋组培苗大田生长状况、产量和品质分析

由表 4 可知,在相同栽培密度和水肥等条件下,在田间生长盛期,红梗芋组培苗和对照(普通种芋)的最大叶长和株高有显著差异,但在成叶数和最大叶宽两组数据上不存在显著差异。再通过产量和品质的比较分析,可以知道,红梗芋组培苗在母芋重、子芋单重和子芋总淀粉含量这三组数据上与对照一致,并且子芋粗蛋白含量显著高于对照,但组培苗的子芋个数、总重以及折合 667 m² 产量显著小于对照组。

2.5 红梗芋组培苗遗传稳定性研究

红梗芋组培苗和普通种芋对照田间生长过程中,植株的生物学特征没有发生变异,红梗芋组培苗保持了茎秆呈紫红色的品种特点。电镜观察结果说明,与普通对照相比,组培苗根尖染色体的数目(2n=28)和形态基本没有发生变异。组培苗与普通对

照的母芋和子芋蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱相近,表明组培苗保持了原种的特性,即遗传的稳定性。

3 讨论

试验结果表明,和 BA 相比,TDZ 是一种更适于红梗芋茎尖诱导,促使不定芽发生、增殖的细胞分裂素,可以大大提高芋组培苗的生产效率,具有应用潜力。琼脂浓度影响着培养基和培养物的水分状况。较高琼脂浓度可以降低试管苗的玻璃化,提高水稻的幼胚愈伤组织分化率,国内外有关芋组织培养的报道中,琼脂浓度一般在 0.5%~0.8%。本文的研究结果与前人的发现并不矛盾,适当降低培养基中琼脂浓度,不仅提高了培养物对水分的吸收,有可能也降低了内源脱落酸含量,提高内源细胞分裂素的含量,从而促进芋茎尖诱导率、器官生长和分化速率提高。

将组培快繁技术用于原种扩繁,关键在于保持原品种特性。据报道,组培过程中由于各种因素的影响,常出现不同类型、不同程度的变异,如染色体数目与结构、基因表达的变化,但也有报道指出,以芽生芽的方式、不经过愈伤组织阶段进快繁,一般

能保持原植物生物学特征、生长发育特征以及染色体倍性、同工酶和蛋白质电泳图谱等特性。本研究是以茎尖为外植体,以芽生芽的方式组培快繁,大田种植第一年的结果表明,组培苗在生物学特征上与原种保持一致,成叶数、最大叶宽、母芋重、子芋单重和子芋总淀粉含量与普通对照无显著差异,子芋粗蛋白含量显著高于对照,显示了脱毒复壮的效果。由于子芋个数存在显著差异,组培苗第一年折

合 667 m² 产量与对照相比低 25%。通过根尖染色体细胞分裂中期的电镜观察,红梗芋组培苗的染色体个数为 2n=28,与对照相比,在形态和数目上都基本保持了一致,同时,组培苗和对照的母芋、子芋蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱相近。因此,基本可以认为红梗芋组培苗保持了原种的遗传稳定性。但本文未知染色体结构以上以及同工酶系是否发生改变,有待于今后研究。

主要水生蔬菜良种繁育技术

刘义满 傅新发 柯卫东

1 水生蔬菜的栽培繁殖特点

根据栽培繁殖特点,可将水生蔬菜分为 2 大类。

①有性繁殖 以种子繁殖为主的种类,包括菱角、芡实、籽藕、大叶豆瓣菜,均为常规种,在长江流域以种子形态越冬或越夏。栽培上,通过种子获得实生苗后,又可通过扦插或分株等无性繁殖方式扩繁。

②无性繁殖 以无性器官繁殖为主的种类,包括莲、芋、荸荠、慈姑、水芹、蒲菜、莼菜、小叶豆瓣菜、藤藕。

2 水生蔬菜品种混杂退化的主要原因

2.1 生物学混杂退化

①实生苗混杂 水芹、慈姑、莼菜、大部分莲品种及藤藕品种,虽在生产栽培上采用无性繁殖,但具一定开花结籽能力,可能在留种田内产生实生苗混杂。由于实生苗形成过程中,经过了基因分离重组,基因型与固有品种已不一样。

②异花授粉 对于有性繁殖类型而言,繁种过程中,若隔离不当,发生异品种花粉授粉现象,同样会导致固有品种遗传结构的改变。异品种花粉可能来自有性繁殖的品种,籽藕还可能来自生产栽培上无性繁殖且具开花能力的藤藕品种。

③突变 对无性繁殖品种而言,主要是芽变(染色体数量和结构变异及基因突变),而芽变中往

往以异劣变为主。在无性繁殖的水生蔬菜中,芽变通常可以固定。对有性繁殖而言,则主要是基因突变。

茭白的生物学混杂退化比较特别。由于茭白产品是黑粉菌侵染茭白植株后形成的病态器官,是二者共同作用的结果,因此不论是茭白植株本身,还是黑粉菌,哪一方发生变异,都可能导致固有品种种性的改变。

2.2 机械混杂

大多数水生蔬菜用种量都较大,如莲藕为 200~250 kg/667 m²、芋头为 100~125 kg/667 m²,因此在采收、贮藏、运输过程中容易发生机械混杂。留种田内,难以采收干净,翌年更新品种时,遗留部分萌发成苗,也导致机械混杂。

3 水生蔬菜良种繁育措施

搞好良种繁育工作是保证品种纯度、保证为生产者持续提供优良种苗的重要保障。技术上,主要应做好两方面工作:一是建立完善的良种繁育体系;二是严格做好选择和隔离工作。另外,还应配备强有力的良种繁育技术人员。具体要求:原原种、原种繁殖由育种者本人或从事水生蔬菜工作的高级农艺师指导;生产用种繁殖由从事水生蔬菜工作 5 年以上且熟悉品种特征特性的农艺师或农艺师以上技术人员指导。

3.1 莲藕

3.1.1 良种繁育体系

原原种和原种繁殖基地建立在“国家种质武汉水生蔬菜资源圃”内,管理工作全部由水生蔬菜研究室负责;生产用种基地的生产管理由基地负

刘义满,武汉市蔬菜科学研究所水生蔬菜研究室,430065

傅新发,柯卫东,通信地址同第一作者

收稿日期:2001-07-24