

芋脱毒快繁技术研究

刘玉平 柯卫东 叶元英 黄新芳 黄来春

摘要 对不同激素类型、激素浓度对芋茎尖组织分化的影响进行了研究,利用双抗夹心酶联免疫法检测芋茎尖分生组织分化的再生植株带病毒情况,并进行脱毒试管芋大田评比试验。结果表明:茎尖分化培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 3.0 % 蔗糖,小茎尖的脱毒效果最好,脱毒率达 100 %,脱毒试管芋种植大田较其常规种芋增产 20.14 %。

关键词 芋 茎尖脱毒 试管芋 激素

芋[*Colocasia esculenta* (L.) Schott] 是天南星科芋属多年生宿根草本植物,又名芋艿、芋头。长期以来,芋多采用无性繁殖方式,导致各种病害侵染,特别是病毒积累,逐年加重,造成产量下降,品质变劣,种性退化,甚至绝种。1970 年 Zettler 等报道新泽西的芋被芋花叶病毒(Dasheen mosaic virus, DMV)感染^[1]。1987 年 Zettler 第 1 次采用血清学的方法分析了福建、浙江、广东省栽植的芋品种及在香港市场上购买的产自中国的芋,发现所有样品均被 DMV 侵染^[2]。目前已鉴定的感染芋的病毒有芋花叶病毒、香蕉束顶病毒、大杆(菌)状病毒、小杆(菌)状病毒、芋瘦小病毒和芋叶脉缺绿病毒等^[3-5],其中芋花叶病毒分布最广,为害最大,严重影响芋生产。另外,常规种芋每 667 m² 用量 150 kg 以上,需解决种芋越冬难题,且种芋生产周期长,易带病菌,不利于芋新品种的推广。因此建立一个脱毒芋种苗快繁生产体系是当前首要解决的问题。芋的组培快繁,国内已有报道^[6-7],笔者从 1996 年开始进行芋的组织培养^[8-10],本试验对芋脱毒快繁技术进行了研究,旨在探讨芋脱毒种苗工厂化生产的可能性,为芋脱毒种苗产业化生产提供一定的理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为武汉市蔬菜科学研究所水生蔬菜研究室组织培养实验室培养的武芋 1 号的丛芽。芋花叶病毒试剂盒购自于美国 AGDIR 公司。

1.2 方法

1.2.1 芋茎尖培养及病毒检测 在接种实验室的超净工作台上,从武芋 1 号丛芽中切取不同大小(0.3 ~ 1.0 mm)的茎尖,置于不同激素类型和激素浓度的培养基中进行培养。培养基分别为 C1: MS + NAA 0.2 mg · L⁻¹; C2: MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹; C3: MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹; C4: MS + 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹。每天光照 10 h,光照强度 2 000 lx,培养温度(25 ± 2)℃,25 d 后调查生长分化情况,从中筛选出最佳培养基。当组培苗高 4 ~ 5 cm、3 ~ 4 片叶时,取叶片分析其脱除芋花叶病毒情况。病毒检测采用双抗法(夹心法)(ELISA)。

1.2.2 脱毒苗继代增殖及病毒检测 脱毒苗的继代增殖参照文献[9]。待继代 5 次后,从中随机挑选一定数量的再生植株,取其叶片进行病毒检测。

1.2.3 脱毒试管芋诱导和育苗 脱毒试管芋的诱导和育苗参照文献[10]。

1.2.4 脱毒试管芋与其常规种芋田间评比 试验在本所水生蔬菜资源圃内进行。4 月中旬将脱毒试管芋苗定植于大田,以同一品种的常规种芋作对照。栽培方法相同,株距 38 cm,行距 80 cm,每小区 3

刘玉平,武汉市蔬菜科学研究所水生蔬菜研究室,430065

柯卫东,叶元英,黄新芳,黄来春,武汉市蔬菜科学研究所

收稿日期:2007-07-20

基金项目:武汉市科技型中小企业技术创新基金项目,湖北省农业科技成果转化基金项目

行,每行 12 株,3 次重复,按常规大田管理。11 月中下旬收获球茎时,采用五点取样法调查母芋、子芋、孙芋的质量,子、孙芋的个数及子孙芋的产量。

2 结果与分析

2.1 不同大小茎尖不同培养基培养生长情况

2.1.1 小茎尖培养 由表 1 可知,对于小茎尖(0.3~0.5 mm)的培养,C4 培养基中成活率、丛芽分化率最高,分别为 81.82 %、36.4 %。C1 培养基的成活率最低,且成活的外植体都没有分化。C2 培养基的成活率较高,但外植体未分化。C3 培养基的愈伤分化率最高,为 34.3 %,但没有愈伤丛芽分化。在 4 种培养基中,只有 C4 培养基中的外植体有愈伤、丛芽的分化,分化率为 20.08 %。因此,对于小茎尖来说,C4 为最佳培养基。

表 1 不同激素浓度对小茎尖分化的影响

处理	成活率 %	丛芽分化率 %	愈伤分化率 %	愈伤、丛芽 分化率/%	备注
C1	14.29	0	0	0	—
C2	72.00	0	0	0	—
C3	63.50	29.2	34.3	0	+
C4	81.82	36.4	25.4	20.08	++

注: + 越多表示分化的丛芽越多;—表示没有丛芽分化;下表同。

2.1.2 中等茎尖培养 中等茎尖(0.5~0.8 mm)的培养,C4 培养基的成活率、丛芽分化率最高,分别为 87.50 %、42.5 %;但愈伤分化率最低。C2 培养基的愈伤分化率最高,达 50.7 %。C3 培养基的愈伤、丛芽分化率最高,为 44.57 % (表 2)。由于用愈伤组织诱导形成再生植株存在一定的变异,因此在组培快繁中一般不用愈伤组织快繁。所以,对于中等茎尖的分化培养,C4 培养基较适宜。

表 2 不同激素浓度对中等大小茎尖分化的影响

处理	成活率 %	丛芽分化率 %	愈伤分化率 %	愈伤、丛芽 分化率/%	备注
C1	47.30	5.3	34.7	0	+
C2	83.34	6.7	50.7	20.97	+
C3	79.40	13.3	21.5	44.57	+++
C4	87.50	42.5	20.4	24.96	++++

2.1.3 大茎尖培养 大茎尖(0.8~1.0 mm)的培养,C2 培养基的成活率最高,为 100.0 %,其次为 C4 培养基,C1 培养基的成活率最低。C4 培养基的丛芽分化率最高,为 64.8 %,C3 培养基的丛芽分化率次之,最低的为 C1 培养基。C1 培养基的愈伤分化率最高,为 45.7 %,其次为 C2 培养基,C4 培养基

中没有愈伤分化,但其愈伤、丛芽的分化率最高(表 3)。虽然 C4 培养基的成活率不是最高,但是其每个茎尖上的丛芽数量多于其他培养基,因此,C4 培养基也是最适合大茎尖分化培养的。

表 3 不同激素浓度对大茎尖分化的影响

处理	成活率 %	丛芽分化率 %	愈伤分化率 %	愈伤、丛芽 分化率/%	备注
C1	85.7	15.7	45.7	0	+
C2	100.0	58.3	28.0	6.73	+
C3	92.8	61.5	23.6	7.69	+++
C4	95.1	64.8	0	30.25	++++

2.2 不同大小茎尖组培快繁苗脱毒效果

由表 4 可知,大茎尖材料带毒率 9.1 %,脱毒率为 90.9 %;中等茎尖材料带毒率 5.6 %,脱毒率 94.4 %;小茎尖材料没有检测出病毒,带毒率 0,脱毒率 100 %。就 OD 值介于 1.5~2.0 之间材料比例而言,大茎尖材料和中等茎尖材料分别为 15.2 % 和 15.8 %,基本相同。实际上,OD 值为 1.5~2.0 的材料一般不用于快繁增殖。总体而言,以 0.3~0.5 mm 的小茎尖材料脱毒效果最好,其次为中等茎尖材料,再次为大茎尖材料。

表 4 不同大小茎尖培养组培苗的病毒检测

茎尖 大小	检测材料 总份数	1.5≤OD 值<2.0 的材料		OD 值≥2.0 的材料	
		份数	占总份数的比例/%	份数	占总份数的比例/%
大	33	5	15.2	3	9.1
中等	19	3	15.8	1	5.3
小	10	0	0	0	0

注:OD = 被检材料测量值/阴性对照测量值。OD 值≥2 为阳性,视为带毒。

2.3 脱毒苗继代增殖及病毒检测

脱毒苗继代 5 次后的病毒检测显示,70 份材料中没有阳性,脱毒效果较好。但是,其中有 4 份材料的检测值为阴性对照值的 1.5~2.0 倍,较接近规定的阳性值。在实际应用中,这 4 份材料一般不被利用。

2.4 脱毒试管芋育苗

5 月上旬,将育成的试管芋植株移栽大田前调查植株农艺性状(表 5)。在混合基质中,植株除叶片数比其他基质少外,其余各项指标都好于其他基质,说明混合基质中的再生植株有些徒长;在土基质中,植株叶片数最多,但土基质易板结,植株移栽时易伤根;在沙基质中,植株的株高、根数、根长最低,说明其根系不发达;在蛭石基质中,植株较整齐,且须根、侧根多,苗壮,移栽时不易伤根,长势较稳定。综合以上分析并结合植株的生长情况及其成活率,

以蛭石作为育苗基质较好。

表5 移栽前试管芋植株性状

处理	株高 cm	叶片数 片	叶片长/宽 cm/cm	根数 根	根长 cm	备注
混合基质	8.17	2.69	4.00/3.75	9.98	11.91	须根较多
土	5.95	2.93	3.20/3.16	9.50	8.25	须根少或无
沙	4.50	2.90	2.91/2.86	8.61	7.58	须根少
蛭石	5.93	2.87	2.58/2.61	9.50	7.95	须根、侧根多

2.5 脱毒试管芋与其常规种芋大田种植比较

脱毒试管芋除单个孙芋质量、单株孙芋个数比常规种少0.6 g、0.8个外,其余都高于常规种芋,其中单个子芋质量、单株子孙芋质量、每667 m²子孙芋产量分别为73.5 g、1 160.0 g、2 517.9 kg,分别比常规种芋高40.5%、38.7%、25.2%,增产较明显(表6)。

表6 脱毒试管芋与常规种芋大田种植比较

材料	单个 母芋 质量/g	单个 子芋 质量/g	单株 子芋 数/个	单个 孙芋 质量/g	单株 孙芋 数/个	单株子 孙芋质 量/g	子孙芋产 量/kg· (667 m ²) ⁻¹
脱毒试管芋	475	73.5	11.7	30.7	9.6	1 160.0	2 517.9
常规种芋	374	52.3	9.2	31.3	10.4	836.6	2 010.8

3 讨论

本试验结果表明,C4即MS+BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹培养基为大、中、小茎尖分化和继代培养的最佳培养基。病毒检测结果显示:小茎尖的脱毒效果最佳,脱毒率达100%,但小茎尖的丛芽分化率不高,只有36.36%,且丛芽数也较少,所以再生植株也较少。如何提高小茎尖的成活率及丛芽分化率,还有待进一步研究。脱毒苗继代5代后病毒检测显示70份材料中没有阳性,脱毒效果较好。但是,其中有4份材料的检测值为阴性对照值的1.5~2.0倍。组培苗带毒与不带毒只是相对的,不是绝对的。这4份组培苗继续继代后,就可能会出现阳性反应材料;组培苗继代多少次后有阳性值出现及其阳性材料的比率有多高等,有待进一

步探讨。脱毒如何达到更好的效果,如何建立一个高效、灵敏的病毒检测方法,这是芋脱毒种苗能否进行产业化生产的一个关键技术。

脱毒试管芋大田种植后生长势强。其单个子芋质量、单株子孙芋质量、每667 m²子孙芋产量分别比常规种芋高40.5%、38.7%、25.2%,增产较明显。

试管芋较试管苗有以下几个优点:①育苗简单,成活率高;②远途运输时,对其成活率的影响不明显;③因试管芋是休眠器官,繁殖系数高,体积小,质量轻,运输方便,耐贮藏,路途损耗小;④试管芋有利于芋种质资源的保存和国际间的交流。试管芋的诱导成功,可减少用种成本,有利于良种的推广,有广阔的应用前景,为芋脱毒种苗产业化生产提供一定的实践和理论依据。因此,芋脱毒快繁应以诱导成脱毒试管芋为佳。

参考文献

- [1] Zettler F W, Foxe M J, Hartman R D, Edwardson J R, Christie R G. Filamentous viruses infecting dasheen and other araceous plants[J]. Phytopathology, 1970, 60: 983-987.
- [2] Zettler F W. Dasheen mosaic virus infecting taro in People's Republic of China[J]. Plant Disease, 1987, 71(9): 837-839.
- [3] Ram R D, Summanwar A S. Colocasia esculenta (L.) Schott, a reservoir of bunchy top disease of banana[J]. Current Sci, 1984, 53(3): 145-146.
- [4] Rodoni B C, Dale J L, Harding R M. Review of alomae disease of taro[J]. Papua New Guinea J Agr For Fisheries, 1994, 37(2): 14-18.
- [5] Pearson M N, Jackson G V H, Saele J, Morar S G. Evidence for two rhabdoviruses in taro (Colocasia esculenta) in the Pacific region[J]. Austral Plant Pathol, 1999, 28(3): 248-253.
- [6] 曹欢欢, 陈九南, 马国华, 赵建华. 脱毒或少毒芋芋开发与研究[J]. 上海农业科技, 1990(4): 9, 42.
- [7] 杨乃博. 芋的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1994(5): 357.
- [8] 刘玉平, 柯卫东, 黄新芳, 彭静. 芋的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1999(5): 378-379.
- [9] 柯卫东, 刘玉平, 黄新芳, 彭静. 芋的组织培养及其相关因素的研究[J]. 湖北农业科学, 2000(3): 47-49.
- [10] 刘玉平, 柯卫东, 黄新芳, 彭静. 试管芋诱导的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 43-46.

Studies on Technology for Virus-elimination and Rapid Propagation of Taro (*Colocasia esculenta*)

Liu Yuping, Ke Weidong, Ye Yuanying, et al. (Wuhan Vegetable Research Institute, Hubei 430065)

Abstract This paper studies the effects of different types and concentrations of hormone on the differentiation of shoot tip of taro (*Colocasia esculenta*). ELISA assay was used to test virus of the plants of taro, and field trial of in vitro corms of virus-elimination was made. The results show that suitable cultural medium is MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+3.0% sucrose for culturing shoot tip of taro. To the taro, small shoot tip (0.3-0.5 mm) is most effective for virus-elimination, the rate of virus-elimination is 100%. The yield of virus-elimination in vitro corms is increased by 20.14%.

Key words Taro (*Colocasia esculenta*), Shoot tip for virus-elimination, in Vitro corms, Hormone