

莲藕组织培养研究进展

陈丽萍 周可明 张志友

(浙江省湖州市农业科学研究院,浙江湖州 313000)

摘要 通过植物组织培养,特别是茎尖培养技术可培养出大量不带病菌的组培苗。影响莲藕组织培养脱毒快繁体系的因素很多,笔者主要从不同的莲藕品种和取材时间、培养基及其成分、增殖周期等方面,探讨其对莲藕组织培养脱毒快繁效果的影响,以促进组织培养技术在莲藕组织培养中的应用,为提高莲藕的产量和品质奠定基础。

关键词 莲藕;脱毒;组织培养

中图分类号 S645.1 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)20-0015-02

莲藕主要以块茎进行无性繁殖,种质容易退化。以常规法进行繁育,繁殖率低,用种量大,生产成本较高;而且由于病毒病、褐斑病、腐败病等病害易发生,给莲藕的制种和品质改良带来了巨大的困难,使莲藕产量和质量受到很大影响。利用组织培养技术,特别是莲藕茎尖培养技术培养莲藕的脱毒种苗和茎尖培养苗,不仅降低了种藕成本,解决了长期存在的种藕繁殖高成本、低速度的问题,而且改善了莲藕的品质、提高了莲藕的产量。

1 外植体的消毒方法及培养条件

组织培养的材料称为外植体(explant),主要形式有器官、胚胎、单细胞、原生质体等^[1]。莲藕的组培和其他植物组培一样,要求在严格的无菌条件下进行,除了对培养基进行高温高压灭菌外,对于首次培养的材料,也必须经过严格的表面消毒灭菌。切取健康莲藕的顶芽,在自来水下冲洗干净,并用洗衣粉溶液浸泡15min后,用自来水冲洗干净。在无菌条件下,用70%~75%的乙醇浸泡30s,再用0.1%升汞浸泡10~15min,无菌水冲洗3~4次,用解剖刀剥去外层叶鞘,切取约0.5cm长的茎尖接种于培养基中,置25±2℃、光照强度2000Lx、光照时间12h/d的条件下培养。

2 影响莲藕组织培养的因素

2.1 影响莲藕茎尖分化的因素

培养基是莲藕培养物离体生长、发育的重要营养源,它主要由基本培养基和植物生长调节物质2部分组成。基本培养基是由多种无机盐和有机营养元素组成。植物组织培养中采用的基础培养基有MT、MS、SH、White、N等,植物因所需的生长环境不同,所采用的培养基亦不同。莲藕的最适基本培养基是MS培养基(Murashige and skoog, 1962),琼脂0.6%,pH值5.8左右。

2.1.1 不同品种对莲藕茎尖分化的影响。基因型对莲藕茎尖分化的影响很大,不同的莲藕品种接种在同一种培养基上其分化情况不同。何碧珠等^[2]将不同品种的子莲地下茎茎尖接种于MS+2.0mg/L ZT+0.5mg/L GA₃培养基上,结果发现,不同莲藕品种的外植体分化率之间存在一定的差异。经t检验,“太空莲19号”与“建莲21号”相比差异不显著,而“建莲1号”与“太空莲19号”、“建莲21号”相比差异显著。

作者简介 陈丽萍(1980-),女,满族,辽宁鞍山人,助理农艺师,硕士研究生,主要从事蔬菜生理生物技术研究。

收稿日期 2008-09-24

2.1.2 不同生长时期取材对莲藕茎尖分化的影响。从萌发起始,随着生育期的进行,莲藕茎尖培养的分化率开始不同。在春季萌动期(2~4月)和冬季结藕期(10~12月)时取材,莲藕茎尖分化率较高;6~8月茎尖分化率则相对较低;但以4月取材为最佳,分化率最高。原因可能是莲藕在春季萌动期和冬季结藕期,自身积累的养分较多,莲藕茎尖易于分化;而在生长旺季,因长叶、开花、结籽消耗养分较多,莲藕茎尖分化率较低^[3]。

2.1.3 不同外源激素对莲藕茎尖分化的影响。植物生长调节剂是培养基的重要组成部分,其种类和浓度在莲藕茎尖培养的整个过程中都有较大影响,其中,使用的细胞分裂素主要有ZT和6-BA,生长素主要有NAA和GA₃。莲藕分化芽的时间及分化率因植物生长调节剂的种类及浓度的不同而有所差别。研究发现^[4],当细胞分裂素的浓度在0.05~6.40mg/L范围内莲藕茎尖都可以进行分化,当ZT和6-BA浓度在0.05~0.50mg/L时,6-BA对莲藕茎尖分化的效果好于ZT;当ZT和6-BA浓度在0.5~2.0mg/L时,ZT对莲藕茎尖分化的效果好于6-BA。

2.2 影响已分化苗生长和增殖的因素

2.2.1 培养基成分对已分化苗的生长和增殖的影响。①外源激素对已分化苗生长和增殖的影响。外源激素的加入对已分化苗的生长和增殖有着重要的作用,但因外源激素种类的不同而有差异。研究发现,不同浓度的6-BA和NAA对比对已分化的外植体成苗有明显影响,在MS+3%蔗糖的培养基中添加0.3mg/L 6-BA时,对已分化外植体生长和繁殖的促进作用最大,其生长量增加19.2倍,繁殖系数达4.47。6-BA浓度过低,增殖系数较小,不利于快速繁殖;6-BA浓度过高,丛芽增多,但试管苗茎、芽变细小,长势弱。且最适宜的激素浓度和莲藕品种也有较大关系。添加NAA对外植体的生长和繁殖有一定的抑制作用,抑制作用随NAA浓度的增大而增强。②蔗糖对已分化苗生长和增殖的影响。在植物组织培养中,培养基中的糖是试管苗生命活动所必不可少的碳源和能源,其同时具有调节渗透压的作用。一般培养基中添加的糖种类有蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖等,糖的种类和浓度影响着组培苗的生长。在组织培养中,蔗糖经高压灭菌,部分分解为葡萄糖和果糖,一般来说这更利于植物体的吸收和利用^[5]。

培养基中的蔗糖浓度对培养苗的生长和增殖产生影响,当增殖培养基中蔗糖质量浓度为30mg/L时,培养苗瘦弱,茎细长,叶小而多,叶柄细长,长势较弱,不利于增殖快繁;当蔗糖质量浓度为50mg/L时,茎粗壮,叶大且叶数多,长势很旺;当蔗糖质量浓度为80mg/L时,茎短粗,叶最少,叶面积最小,培养苗生长受抑制。因此,增殖培养的最佳培养基为MS+0.5mg/L 6-BA+50mg/L蔗糖^[6]。

2.2.2 外植体大小对增殖效果的影响。将经初代培养的培养苗在无菌条件下切割成不同大小的组织块,并接种到相同培养基中增殖,培养第15天和第30天的繁殖系数分别达到3.67和7.33。在相同条件下,外植体以1片展开叶+1片未展开叶带1个芽的增殖效果最好,繁殖系数最大,与其他处理相比,均差异显著;1片展开叶+1个芽次之;2片展开叶+1个芽最差,表明外植体的大小也会影响增殖的效果。

2.2.3 增殖周期对增殖效果的影响。不同的增殖周期对莲藕茎尖培养苗增殖效果有明显的差异。研究发现,以“美人红”茎尖培养苗1片展开叶+1片未展开叶带1个芽材料为外植体,经过不同时间,培养增殖效果亦不同。以40d为1个增殖周期,繁殖系数最大;以20d为1个增殖周期,繁殖系数最小。增殖30d和40d的繁殖系数差异不显著,而与其他增殖周期有显著差异的情况下,增殖培养以30d为最佳周期。

2.2.4 活性炭对莲藕增殖效果的影响。加入活性炭(active carbon)可以降低组织培养物的有害代谢物浓度,对细胞生长有利,但在莲藕试管苗的继代增殖过程中,活性炭的加入对莲藕的茎尖培养有抑制作用。随着活性炭浓度的增加,试管苗的增殖系数逐渐降低,同时叶柄变细长,生根率增加,植株长势变弱。因此,在莲藕试管苗继代增殖过程中,不适宜加入活性炭。

2.3 培养基成分对培养苗生根的影响

2.3.1 不同生长素对培养苗生根的影响。将芽苗切成带2~3片叶、1~2个腋芽的茎段接入生根培养基中,1周后开始陆续长根,培养20d左右可以长出较多的根。在生根阶段,随着NAA浓度的增加,试管苗生根率也逐渐增加;但当NAA浓度超过2.0mg/L时,出现植株枯死现象。在质量浓度为1

(上接第14页)

由图1可知,经过处理后的多糖溶液样品,在波长260nm和280nm处无吸收峰,说明样品中的核酸和蛋白质基本去除干净。200nm附近的强吸收峰与之前紫外扫描的未脱除蛋白的茶树菇多糖样品的强吸收峰一致,是茶树菇多糖的特征吸收峰,这与文献报道一致。

3 结论

通过试验获得一种新的茶树菇多糖提取液脱蛋白质方法,其能够快速去除茶树菇多糖中的蛋白质,具有脱蛋白效率高、操作简单、多糖损失小等特点;该法还能有效地去除茶树菇多糖中的其他杂质,如色素、核酸等大分子物质。

4 参考文献

[1] 牛广财,朱丹.马齿苋多糖脱蛋白方法的研究[J].食品研究与开发,2005,26(5):51-53.

mg/L的NAA中,添加0.5mg/L BA及0.1mg/L IBA的生根效果最好,根多且壮;而仅添加NAA的生根较差些,根较细小。

2.3.2 活性炭对培养苗生根的影响。在试管苗生根培养阶段,活性炭的加入可以促进根的再生和发育,原因是其给试管苗提供一个暗环境,从而避免强光对根生长的抑制^[7]。在莲藕试管苗生根阶段,随着活性炭浓度的不断升高,生根率逐渐升高,枯死率逐渐降低,试管苗也比较健壮。当活性炭浓度为0时,生根率最低,枯死率最高;当活性炭浓度达到0.15%时,生根率最高,枯死率最低;随着活性炭浓度的继续加大,生根率反而有所下降,枯死率也随之升高。因此,适当的活性炭浓度有利于莲藕试管苗生根^[8]。

3 莲藕组织培养技术的应用前景

植物组织培养技术具有不受季节和气候限制、繁殖周期短、扩繁速度快等优点^[9],在育种和良种繁殖、无性繁殖作物的脱毒和快繁、种质的保存及提高农作物产量等方面具有广阔的应用前景。自20世纪60年代以来,国内外植物组织培养技术的发展突飞猛进,目前,这项技术已完全成熟。而莲藕在长期的栽培和种植过程中,体内被侵染而携带病毒,出现种质退化现象,利用组织培养及快繁脱毒方法对莲藕品种进行提纯复壮,从而改善莲藕的品质和提高莲藕的产量,对加快莲藕良种工厂化生产具有极其重要的作用。

4 参考文献

- [1] NEGUSSIC A. Induce more buds of juniperus excelsa's tissue culture [J]. For. Eco1. Manage, 1997, 98(2): 115-123.
- [2] 何碧珠,曾明星,赵时端,等.建莲茎尖离体培养研究初报[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,1(31):59-61.
- [3] 彭静,柯卫东,刘玉平,等.莲藕组织培养技术[J].长江蔬菜,2001(S1):89-90.
- [4] 李良俊,何小弟,赵有为,等.莲藕茎尖培养技术的初步研究[J].江苏农学院学报,1995,16(3):31-34.
- [5] 王守明,胥学峰,廉美兰,等.培养基中糖和氮对脱毒甘薯组培苗生长的影响[J].延边大学农学报,2006,28(2):102-106.
- [6] 李良俊,赵有为.莲藕茎尖培养苗的快繁技术[J].南京农业大学学报,1998,21(1):113-115.
- [7] 徐春明,赵兵,耿袖,等.植物激素和活性炭对新疆雪莲组培苗生根的影响[J].中国农学通报,2006,22(2):41-43.
- [8] 王志敏,宋明.莲藕脱毒快繁研究进展[J].种子,2003(1):35-36.
- [9] 曹敦义,刘国民.实用植物组织培养技术教程(修订本)[M].兰州:甘肃科学技术出版社,2001.
- [2] 付桂明,刘成梅,涂宗财.茶树菇水溶性多糖的分离纯化和化学组成的研究[J].食品科学,2005,26(9):180-184.
- [3] 徐大伦,欧昌荣,黄晓春,等.浒苔多糖脱蛋白方法的研究[J].水产科学,2005,24(5):26-27.
- [4] 李志敏,王伯初,周菁,等.植物多糖提取液的集中脱蛋白方法的比较分析.重庆大学学报,2004,27(8):57-59.
- [5] 欧阳小丽,张晓昱,王宏勋,等.茶树菇菌丝体多糖提取方法的研究[J].中国食用菌,2004,23(5):35-37.
- [6] 赵国华,陈宗道,李志孝,等.活性多糖的研究进展[J].食品与发酵业,2001,27(7):45-48.
- [7] 倪德江,谭少波.脱蛋白工艺对茶多糖提取率及蛋白质含量的影响[J].中国茶叶,2002,24(4):6-7.
- [8] 李娟,张耀庭,曾伟,等.应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J].中国生物制品学杂志,2000,13(2):118-120.
- [9] 王丽华,李元瑞,陈懿,等.姬松茸多糖脱蛋白方法的研究[J].食品科技,2000(1):18-19.
- [10] 邢小黑,吴明忠.灵芝多糖化学研究[J].中国食用菌,1996,15(3):14-15.