

西盟魔芋组织培养初步研究

吴金平^{1,2}, 宋志红¹, 刁英^{2,3}, 郭兰⁴, 向发云¹, 曾祥国¹, 顾玉成^{1*}, 胡中立²

(1. 湖北省农业科学院 经济作物研究所, 湖北 武汉 430064; 2. 武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072;

3. 重庆文理学院 生命科学系, 重庆 永川 402160; 4. 湖北省农业厅, 湖北 武汉 430070)

摘要:以西盟魔芋芽鞘为外植体, 研究了不同浓度激素对比对愈伤组织诱导、芽分化及植株再生的影响。结果表明: 愈伤组织诱导适宜培养基为: MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 芽分化和增殖培养基为 MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 壮苗及生根培养基为 1/2MS+NAA 0.1 mg/L。

关键词: 西盟魔芋; 组织培养; 再生植株

中图分类号: S632 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)11-0098-03

魔芋是天南星科 (Araceae) 魔芋属 (*Amorphophallus* Blume.) 的总称。该类植物是多年生草本植物, 具有发达的地下块茎, 部分魔芋种的块茎中含有丰富的葡甘露聚糖 (konjac glucomannan)。葡甘露聚糖是一种在植物中罕见的高分子碳水化合物, 具有高膨胀系数、高持水性、黏稠性、凝胶性、低蛋白、低热值等特性, 因而广泛用于食品、医药、化工等行业中, 有较高的经济价值。

魔芋属虽有 163 个种^[1], 但有些根茎组织粗糙, 未形成食用器官, 多数则因球茎含生物碱及其他有毒物质, 毒性过剧难加工去毒而无食用价值。目前可食用的仅 20 种, 而中国重要的魔芋主栽品种为花魔芋、白魔芋和黄魔芋^[2]。黄魔芋因其球茎肉质呈黄色而得名, 实际包含了不同的几个种。随着魔芋组织培养研究技术的不断发展, 白魔芋^[3~5] (*A. albus*)、花魔芋^[6~8] (*A. konjac*) 2 个主栽品种的普通快繁技术已趋于完善, 但黄魔芋的组织培养仅见谢庆华等^[9]的报道。本研究用黄魔芋类型的一种——西盟魔芋 (*A. ximengensis*) 的芽鞘进行愈伤组织诱导及植株再生研究, 以期扩大数量, 加快其开发利用。

1 材料和方法

1.1 材料

西盟魔芋球茎由武汉大学生命科学学院发育生物学教育部重点实验室提供。选取球茎上生长健壮

的芽鞘为外植体。

1.2 方法

用手术刀将带部分球茎组织的芽鞘取出, 用自来水冲洗干净; 放到 1% 洗衣粉水中冲洗 2 次, 每次搅拌 5 min; 然后用清水冲干净, 在滤纸上晾干表面的水, 置于超净工作台上, 75% 的酒精中浸泡 1 min; 用 0.1% 升汞水浸 8 min, 并搅拌; 最后用无菌水洗 3~4 次, 每次 2~3 min。将消毒好的材料切成长宽 0.5 cm 左右小块, 接种到添加不同浓度植物激素的 MS 培养基上。其中, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 5.8~6.0。培养温度 25~28℃, 愈伤诱导阶段为散射光, 光照时间 12 h/d, 继代培养和不定芽的形成及生根培养光照强度为 300 μmol/(m²·s) 左右, 光照时间 10 h/d。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

芽鞘培养 7 d 左右, 外植体开始上翘或拱起, 厚硬, 切口端开始膨大且形成一层很薄的愈伤组织, 并不断增殖, 约 1 个月后形成愈伤组织。从表 1 可以看出, 植物激素的不同对比对愈伤组织的诱导率、颜色、质地和生长速度有着明显影响。随着 6-BA, NAA 浓度的增加, 愈伤组织诱导率先升高后降低, 过高过低的浓度都不利于愈伤组织的形成。根据愈伤组织的诱导率, 颜色, 质地和生长速度的分析比

收稿日期: 2007-06-26

基金项目: 湖北省科技攻关项目 (2006AA205A04)

作者简介: 吴金平 (1978-), 女, 安徽合肥人, 助理研究员, 主要从事植物生物技术研究。

通讯作者: 顾玉成 (1957-), 男, 江苏常州人, 研究员, 主要从事植物生物技术研究。

较,筛选出适宜于西盟魔芋芽鞘愈伤组织诱导的培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,在这种培养基上产生的愈伤组织颜色红嫩,质地坚硬,生长速度快。

表 1 激素对芽鞘愈伤组织形成的影响

植物激素(mg/L)		愈伤组织诱导率 (%)	颜色	质地	生长速度
6-BA	NAA				
0.6	0.1	75.2	淡黄	坚硬	慢
1.0	0.1	90.8	红嫩	坚硬	一般
1.5	0.2	94.5	红嫩	坚硬	快
1.8	0.5	83.2	淡黄	外硬内软	快
2.0	0.5	78.9	灰白	疏松	很快

2.2 继代培养和不定芽的诱导

将诱导形成的愈伤组织切割成 0.3 cm 左右大小,转入增殖培养基中,进行愈伤组织继代和芽点的分化培养。观察不定芽诱导过程,经过约 4 周的分化培养,愈伤组织膨大,均能分化出淡绿色的不定芽。但有的愈伤组织上密布不定芽,有的愈伤组织不定芽的数量很少,有的不定芽健壮,有的不定芽细弱(表 2)。以培养 1 个月后愈伤组织上分化的不定芽不低于 1 cm 为基准,统计不定芽的形成率,根据不同培养基上分化的不定芽的数量和长势,MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基最适宜不定芽的诱导及增殖(图 1)。

表 2 激素组合对不定芽诱导的影响

植物激素(mg/L)		接种愈伤数 (个)	不定芽个数 (个)	长势
6-BA	NAA			
1.0	0.2	100	147	健壮
1.2	0.2	100	215	健壮
1.5	0.2	100	178	一般
1.5	0.4	100	103	细弱
2.0	0.5	100	92	细弱



图 1 西盟魔芋不定芽的诱导及增殖

2.3 壮苗及生根培养

由于魔芋芽是叶芽,且仅 1 片复叶,茎的生长点在叶柄基部内。因此,再生植株在长到出叶期时,带少量愈伤组织切下来,转入 1/2MS+NAA 0.1 mg/L 培养基中,1 周后可见不定根突起,大概 2 周

后在叶柄基部的茎上有大量根发生,30 d 后长出 5~8 条白色带有根毛的不定根,形成完整根系,生根率达 100%(图 2)。



图 2 西盟魔芋的再生植株

2.4 试管苗的移栽

再生植株长出良好根系就可以移栽。移栽前将在培养室培养的再生植株移至室内自然条件 2 d,然后打开瓶塞再炼苗 2 d;清水洗净附着在根系上的培养基后,移栽到装有蛭石和珍珠岩(1:1)的育苗箱内,覆盖塑料薄膜,1 周后揭膜。在整个育苗期注意遮荫、保湿,成活率可达 95% 以上。

3 讨论

因西盟魔芋是魔芋属中的一个种,所以和白魔芋、花魔芋等的组织培养有相同之处。其一是无菌材料的获得,前人针对这个问题展开了大量的研究^[6,10],取得了一定的效果,但操作程序复杂。魔芋含有的葡甘露聚糖大分子遇水膨胀,包裹病菌,使其难以彻底消毒,而本研究在消毒前晾晒外植体,使其失去部分水分,从而有利于酒精和升汞的渗透,达到彻底消毒的效果。其二是激素在愈伤组织的诱导、芽分化、增殖、生根中所起的作用。6-BA 用量低,愈伤组织诱导率低,形成的不定芽少但粗壮;6-BA 用量过高,则愈伤组织过于膨大、疏松,形成的不定芽多但弱,且分化率低。本研究获得的西盟魔芋最佳愈伤组织诱导培养基是 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,分化培养基是 MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L,壮苗及生根培养基是 1/2MS+NAA 0.1 mg/L。

由西盟魔芋愈伤组织诱导、芽分化、生根形成完整植株,整个过程仅需 2 个月左右,能在较短的时间里获得大量试管苗,达到快繁目的。该研究对黄魔芋类型的魔芋的组织培养提供了基础数据,从而能有效地增加和保护该魔芋资源,对魔芋产业的发展具有十分重要意义。 (下转第 114 页)

红细胞体阴性血清及羊支原体病阳性血清均未出现特异性条带,说明羊附红细胞体抗原只识别羊附红细胞体病阳性血清,具有较好的特异性。

2.4 ELISA 检测与涂片镜检结果

ELISA 检测与涂片镜检结果见表 1。由表 1 可见,64 份被检血清样本中,ELISA 检测的阳性率为 66.7%(42/64),而涂片镜检的阳性率为 43.8%(28/64),ELISA 阳性率比涂片镜检检出率高 22.9 个百分点。说明该抗原可作为血清学诊断用抗原。

表 1 ELISA 与涂片镜检对 64 份被检血清的检测结果

检测方法	份数	阳性份数	阴性份数	阳性率(%)
ELISA	64	42	22	66.7
涂片镜检	64	28	36	43.8

3 讨论

试验在牛附红细胞体体外培养成功的基础上,用不含有血清成分的 RPMI-1640 和 M-199 培养液对羊附红细胞体进行了培养,目的是使附红细胞体易从红细胞表面分离下来,使其游离于培养液中,确保收集大量的附红细胞体。其次是保证在收集的培养物中不含血清蛋白成分,避免在电泳分析时出现杂蛋白带。另外,测定抗原蛋白浓度的结果显示,RPMI-1640 培养液培养羊附红细胞体明显优于 M-199 培养液,可能是因为 RPMI-1640 培养液更适合附红细胞体的增殖,这与国内外培养附红细胞体选择培养液的观点基本一致^[7]。本试验获得的 56kDa,32kDa,26kDa 和 21kDa 4 种羊附红细胞体抗原蛋白,与邱松得到的 18.4kDa,25kDa 和 45kDa 3 种人附红细胞体蛋白^[8]及王永明得到的 76.4kDa,66kDa,58.9kDa 和 26.5kDa 4 种猪附红细胞体蛋白^[9]有所不同,这可能与附红细胞体的种属特异性及蛋白的提取方法不同有关。以上两者均未对抗原

的免疫性进行分析,而本次试验则确定了 56kDa 和 26kDa 的抗原具有较好的免疫性,不与羊附红细胞体阴性血清及羊支原体病阳性血清发生交叉反应,具有较好的特异性。试验对羊附红细胞体抗原进行分析的基础上,又对该抗原进行了初步应用,检测的 64 份血清样本的阳性率为 66.7%(42/64),比涂片镜检的检出率 43.8%(28/64)高 22.9 个百分点。说明该抗原可作为血清学诊断用抗原,也证实了该羊场有羊附红细胞体病的流行,应引起养殖户重视。

参考文献:

- [1] 张守发,李艳,张国宏. 附红细胞体体外杀灭试验[J]. 畜牧与兽医,2004,36(6):10-12.
- [2] 薛书江,贾立军,田万年,等. 猪附红细胞体几种染色方法的比较[J]. 畜牧与兽医,2005,37(11):35-37.
- [3] 张守发,张国宏,宋建臣,等. 牛附红细胞体体外培养试验[J]. 中国兽医杂志,2002,32(8):27-29.
- [4] 贾立军,张守发,薛书江,等. 牛附红细胞体分离方法的比较[J]. 吉林畜牧兽医,2005(6):7-8.
- [5] 贾立军,张守发,曲平,等. 猪附红细胞体可溶性抗原的分析[J]. 中国预防兽医学报,2006,28(5):569-571.
- [6] 秦建华. 羊附红细胞体病 ELISA 检测方法的建立[C] // 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会家畜寄生虫学分会第 5 次代表大会暨第 8 次学术研讨会论文集. 北京:中国农业出版社,2004:77-80.
- [7] J E Smith, J E Cipriano, S M Hall. In vitro and in vitro glucose consumption in swine eperythrozoonosis[J]. J Vet Med,1990,37:587-592.
- [8] 邱松,王莉敏,黄汉菊,等. 附红细胞体对 Vero 细胞生长的影响及其临床应用前景[J]. 华中医学杂志,2005,29(1):31-32.
- [9] 王永明. 猪附红细胞体生物学特性的研究及间接 ELISA 方法的建立[D]. 莱阳:莱阳农学院,2005:28-29.

(上接第 99 页)

参考文献:

- [1] Hettterscheid W, Ittenbach S. Everything you always wanted to know about Amorphophallus but were afraid to stick your nose into[J]. Aroideana,1996,19:13-16.
- [2] 刘佩英. 魔芋学[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [3] 孙凡伦,肖亮,王爱霞. 白魔芋的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学报,1986(1):41.
- [4] 曾昭初,高翔,罗鸿源,等. 白魔芋组织培养快速繁殖技术的研究[J]. 贵州农业科学,1997,25(1):28-31.
- [5] 王平华,谢庆华,吴毅歆,等. 白魔芋不同外植体组培分化条件研究[J]. 西南农业大学学报,2001,23(1):63-65.

- [6] 彭昌操. 花魔芋愈伤组织诱导研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2000,18(3):1-3.
- [7] 谢庆华,吴毅歆,谢世清,等. 花魔芋不同外植体分化及生根条件研究[J]. 云南农业大学学报,2004,19(6):696-699.
- [8] 陈永波,赵清华,滕建勋,等. 正交试验优化花魔芋组织培养条件[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(2):29-30.
- [9] 谢庆华,张云峰,严胜柒,等. 不同外植体诱导魔芋微球茎的比较研究[J]. 云南农业大学学报,2005,20(3):350-355.
- [10] 陈永波,赵清华. 魔芋试管苗批量生产过程中外植体消毒灭菌技术研究[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(3):27-29.