

文章编号:1001-4829(2008)03-0770-05

魔芋无毒叶柄离体快繁体系的建立

吴毅歆^{1,2}, 范成明³, 陈海如¹, 隋启君^{2*}

(1. 云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院经济作物研究所, 云南 昆明 650205; 3. 中国农业科学院作物研究所, 北京 100081)

摘要:以经检测合格无毒的花魔芋试管苗叶柄为外植体, 构建魔芋脱毒离体快繁体系。在 12 种培养基上进行愈伤组织诱导, 筛选出 M8 (MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L) 为愈伤组织诱导最适培养基, 诱导率达 100%; 以叶柄愈伤组织为外植体, 在 5 种培养基上进行芽的分化, 筛选出 M9 (MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L) 为芽分化最适培养基, 分化率达 66.7%; 以芽分化中形成的有效芽苗为外植体, 在 7 种培养基上进行根的诱导, 筛选出 M11 (MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.15 mg/L) 为生根培养最适培养基, 生根率达 100%。

关键词:魔芋; 花魔芋; 脱毒叶柄; 离体快繁;

中图分类号:S632 **文献标识码:**A

System establishment of plant virus-free regeneration from explants of *Amorphophallus konjac*

WU Yi-xin^{1,2}, FAN Cheng-ming³, CHEN Hai-ru¹, SUI Qi-jun^{2*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Biodiversity and Pests Control, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China; 2. Cash Crop Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Kunming 650205, China; 3. Institution of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Explants were leaf-stalk segments by detection. Small leaf-stalk segments were inoculated in M1-M12 12 kinds of media. M8 (MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L) medium was suitable for callus induction, the rate of induction was 100%; Callus of leaf-stalk segments were inoculated in M8-M12 5 kinds of media. M9 (MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L) medium was suitable for differentiation of buds, the rate of differentiation was 66.7%; Efficiency seedlings were inoculated in M8-M14 7 kinds of media. M11 (MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.15 mg/L) medium was suitable for formation of roots, the root growth rate reached 100%.

Key words: *Amorphophallus konjac*; *Amorphophallus konjac* K. Koch; virus-free leafstalk; rapid propagation in vitro

魔芋种质资源丰富, 中国有 21 种, 9 种为特有种^[1]。尤以云南最丰富, 有 14 种, 占全国的 67%^[2]。主要分布于四川盆地、云贵高原、陕西南部、湖北西部和湖南山区^[3], 以云南南部和东南部最为集中^[4], 且以花魔芋 (*Amorphophallus rivieri* Durieu) 分布最广, 以其为具开发价值的品种^[5]。云南大部地区都可划入魔芋最适宜种植区。随着现代魔芋加工业的兴起, 国内外对魔芋的需求量大大增加, 使魔芋由零星种植逐步走上了规模化种植、系列化生产的产业化发展之路。云南省已成为魔芋产业发展最

快的省区之一^[6]。

自从栽培面积迅速扩大后, 随着种植方式、种植环境的改变, 魔芋病害, 特别是以种芋和土壤带菌传染为主的软腐病和白绢病日趋严重, 发病率可高达 50% 以上, 直至产量绝收^[7]。魔芋软腐病已成为当今生产上的一大障碍, 被视为魔芋“癌症”^[8]。由于魔芋根腐病中的腐霉 (*Phytlum* sp.) 病原菌能传病毒^[9], 魔芋病毒病近年来也危害加重, 已成为魔芋产业发展的一个瓶颈问题。

魔芋是无性繁殖作物, 繁殖系数低, 长期种植种芋, 病菌逐代累积, 导致品质退化, 作物产量显著下降。为解决无性繁殖作物病毒病的危害和提高其繁殖系数, 应用脱毒组织培养技术可有效解决这一问题。魔芋组织培养技术的研究前人^[10-18]已做了许

收稿日期: 2007-07-27

作者简介: 吴毅歆 (1968-), 女, 福建福州人, 副研究员, 在读博士, 主要从事分子植物病理及马铃薯研究开发工作, E-mail: wyx680705@sina.com; * 为通讯作者。

多工作,但脱毒组培快繁技术尚未见报道。本文以经检测花魔芋无毒叶柄为外植体,通过对培养基激素配比调节,建立了高效的魔芋脱毒组织培养的方法。该方法简化了培养程序,降低了生产成本,提高了成苗率,缩短了培养周期,在魔芋种业化生产过程中,为优良魔芋原原种供给提供了技术保证。

1 材料与方 法

1.1 材 料

取经电镜检测合格的花魔芋无毒试管苗^[19]。

1.2 培 养 条 件

以 MS^[20]为基本培养基,设计 14 种培养基进行比较试验(表 1)。培养基依不同的实验目的,附加不同浓度的细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA、食用白糖 30 g/L、琼脂 5.5 g/L、活性炭(AC)0.1 g/L^[21]。培养基用自来水配制,pH 调至 5.8 后,分装于 350 mL 的罐头瓶中,每瓶 40 mL,封口后,在温度 121 °C 下灭菌 20 min。

1.3 方 法

1.3.1 叶柄愈伤组织诱导培养基的筛选 将已检测的无毒叶柄,切成 0.5~1 cm 的小段,分别接种于 M1~M12 共 12 种培养基上。在室内弱光和 22±2 °C 下进行愈伤组织诱导。每隔 7 d 观察 1 次,第 35 天时观察叶柄愈伤组织的诱导情况,根据诱导率的大小,确定叶柄愈伤组织诱导的基本培养基和最适培养基。

1.3.2 不定芽分化最适培养基的筛选 将诱导培养基上产生的愈伤组织,分别转入不同激素浓度 M8~M12 共 5 种培养基中,在 25±1 °C,光照强度 1000 lx,每日光照 10 h 下进行芽的分化培养。第 30 天时观察不定芽的分化情况,并计算其芽分化率。

表 1 不同激素浓度培养基配方

Table 1 Media with different concentrations of hormones

培养基	组成成分 (mg/L)	培养基	组成成分 (mg/L)
M1	MS+6-BA0.5+NAA0.5	M8	MS+6-BA0.5+NAA0.1
M2	MS+6-BA0.5+NAA1.0	M9	MS+6-BA1.0+NAA0.1
M3	MS+6-BA1.0+NAA1.0	M10	MS+6-BA1.5+NAA0.1
M4	MS+6-BA0.5+NAA1.5	M11	MS+6-BA1.5+NAA0.15
M5	MS+6-BA0.5+NAA2.0	M12	MS+6-BA2.0+NAA0.1
M6	MS+6-BA1.0+NAA1.5	M13	MS+0.5NAA
M7	MS+6-BA1.0+NAA2.0	M14	MS+1.0NAA

1.3.3 根诱导最适培养基的筛选 将切去愈伤组织的有效芽苗(高 1~2 cm 生长健壮的小苗)单苗转入不同的生根培养基 M8~M14 共 7 种培养基中,在 22±2 °C,光照强度 2000 lx,每日光照 10 h 下进行根的诱导。第 20 天时观察生根情况,筛选出根诱导的最适培养基。

1.3.4 炼苗与移栽 当小苗经 20 d 生根培养后,苗高达 6~8 cm 时,去玻璃瓶的封口膜,在室内强光下锻炼 2 d 后,移栽至基质中培养,温度 23~28 °C,盖塑料薄膜保湿遮荫 10~15 d,相对湿度达 80%。移栽基质为腐殖土:珍珠岩比例为 3:1。成活率达 95%~100%。

2 结果与分析

2.1 叶柄在不同激素组合培养基上愈伤组织的诱导

叶柄在适合的培养条件下,切块培养 20 d 左右,在靠培养基一面开始膨大并愈伤组织化,35 d 左右在朝上面的切口形成白色的愈伤组织,靠培养基一面则形成黄褐色瘤状愈伤组织(图 1)。

从叶柄在不同激素浓度培养基上愈伤组织的诱导结果(表 2)可以看出,叶柄在附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 12 种 MS 培养基上都有一定量的愈伤组织形成,但诱导率随培养基的不同表现出一定的差异。MS 培养基可作为叶柄诱导愈伤组织的基本培养基。在 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,培养基 M8、M9、M10、M12 的诱导率随 6-BA 浓度的升高而下降;在 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,培养基 M1、M2、M4、M5 的诱导率随 NAA 浓度的升高而成下降趋势;

表 2 叶柄在不同培养基上愈伤组织的诱导

Table 2 Callus induction of leaf-stalk segments on media of different concentrations

培养基	接种外植体	愈伤组织	诱导率 (%)
M1	15	3	20
M2	20	3	15
M3	10	6	60
M4	25	7	28
M5	15	3	20
M6	15	7	46.7
M7	14	5	35.7
M8	13	13	100
M9	19	16	84.2
M10	20	7	35
M11	10	9	90
M12	17	11	64.7

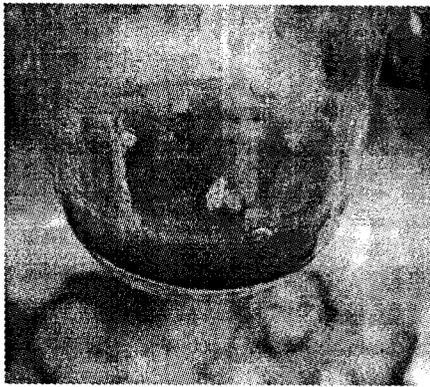


图1 试管苗叶柄 35 d 诱导的愈伤组织

Fig.1 Callus initiated from segments of leaf-stalk after 35 days

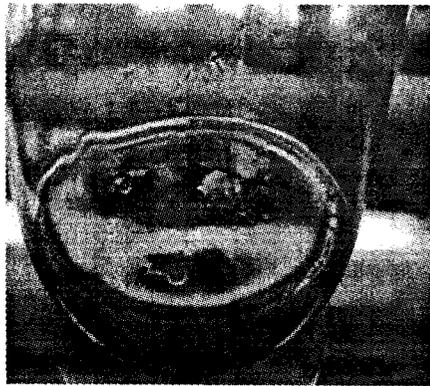


图2 叶柄愈伤组织分化成淡绿色芽点

Fig.2 Callus of leaf-stalk differentiated



图3 M12 培养基上生根的试管苗

Fig.3 Rooting plantlets on medium M12

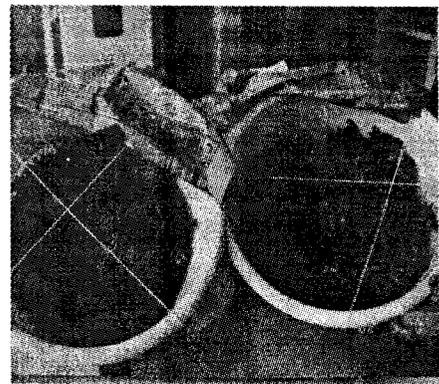


图4 消毒中的试管苗

Fig.4 Sterilizing plantlets



图5 试管苗大棚移栽

Fig.5 Transplanting plantlets in greenhouse

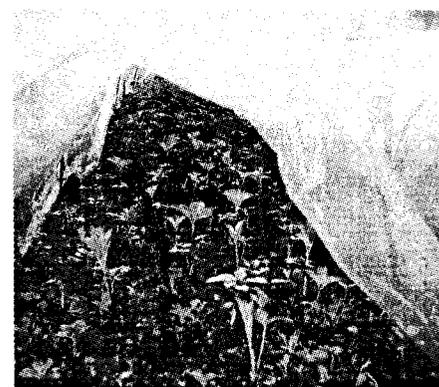


图6 移栽成活的试管苗

Fig.6 Surviving plantlets

在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,培养基 M3、M6、M7、M9 的诱导率也随 NAA 浓度的升高而下降;可见,低浓度的 NAA 对叶柄愈伤诱导有利;同时,6-BA 浓度为 0.5 mg/L 的培养基 M8 愈伤诱导率明显高于 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的培养基 M9,达 100%。

2.2 叶柄愈伤组织在不同激素组合培养基上芽的分化

将 M8 培养基诱导形成的愈伤组织,分别横放

入分化培养基 M8 ~ M12 中培养。经过培养 30 d 左右,愈伤组织在不同激素组合培养基上继续生长扩大,在愈伤组织的表面形成许多淡绿色芽点(图 2)。

叶柄愈伤组织的芽分化率随激素浓度的变化而不同(表 3)。当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,芽分化率随 6-BA 浓度的升高大致呈先上升再下降的趋势;只有在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的 M9 培养基,芽分化率最高,达 66.7%;此培养基可作为叶柄愈伤组织的芽分化的最适培养基。

表3 不同培养基上叶柄愈伤组织芽分化情况

Table 3 Bud differentiation from leaf-stalk segments callus on different media

培养基	接种愈伤组织	形成芽点的愈伤组织	分化率(%)
M8	6	2	33.3
M9	9	6	66.7
M10	8	4	50
M11	8	5	62.5
M12	7	4	57.1

2.3 诱导芽的根分化

从叶柄愈伤组织诱导出的有效芽的茎的基部切断,转入不同的生根培养基 M8 ~ M14 共 7 种中,第 20 天时观察生根情况,记录生根时间、平均生根数、生根率、平均根长和平均株高(表 4)。有效芽在不同激素培养基上,生根的数量、长度和株高存在着一定的差异。生根最快的培养基 M10、M11、M12, 5 d 即可生根,只有 M11 培养基生根率达 100%,再生小植株最高,达 7.6 cm;虽然 M12 培养基上的苗的根数、根长和株高与 M11 的相差不多,但生根率只有 52.9%; M13、M14 培养基只添加了激素 NAA,虽然也能生根,但苗的生长状况较差;可见只有 NAA 和 6-BA 的合理配比,才能筛选出根诱导最适的培养基。M12 培养基上的生根情况见图 3。

2.4 炼苗与移栽

魔芋试管苗移栽前,选用过筛的腐殖土和珍珠岩配制的营养土,其比例为 3:1,充分混合均匀后,装入大棚内苗床上。用 0.2% 甲醛水溶液灌透苗床的营养土,然后用塑料薄膜盖严消毒 7d,揭膜后充分翻挖苗床土壤 3~4 次,使甲醛气味挥发掉,1 个星期后便可栽苗。

当小苗经 20 d 生根培养后,苗高达 6~8 cm 时,把培养瓶放到移栽的大棚中,在自然光照下锻炼 2~3 d。将已锻炼好的试管苗,揭去封口膜,倒入少许浓度为 0.03% 优氯净溶液,片刻后轻轻摇动瓶子,使溶液渗透到培养基中,然后用消毒过的镊子将试管苗连同基部取出,放在上述优氯净溶液中洗净根部粘附的培养基,并在溶液中浸泡 20 min(图 4)。

用小木棍在棚内苗床上作条状小沟,轻轻放入单株试管苗,埋土至苗基部,不压根,浇透水。切记操作时不要损伤着幼苗,如有损伤,需置于上述优氯净溶液中浸泡 20 min 后,再移栽(图 5)。

幼苗移栽后,15~20 d 大棚顶部薄膜盖一层遮荫网,前 3 d 一般不浇水,浇水时应尽量将水浇在苗基部,夜间注意透气,2 周左右,苗定根及生根后,视天气情况可逐步揭去遮荫网,此阶段应保持幼苗不出现萎焉,防止遭水及阳光的直接照射,保持湿度在 80%~90%。植株成活率能达到 95% 以上(图 6)。保持温度在 25℃ 左右,幼苗迅速生长,木质化程度不断增加,25 d 后移栽大田。

3 讨论

3.1 外植体的选择

外植体的大小和生理状态与愈伤组织的诱导有密切关系,如直径小于 2 mm 的叶柄切段,愈伤组织的诱导率很低^[22];本试验用试管苗中较粗的叶柄作外植体,在培养基 M8(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L)上叶柄愈伤诱导率达 100%;由于叶柄形成黄褐色瘤状愈伤组织较小,其大小约 1 cm 左右,影响了后期芽的分化,导致芽分化率较低,达 66.7%。

在根的诱导过程中,单用 1 mg/L NAA 或 1 mg/L 6-BA 不能提高生根率,只有 95% 的生根率^[10]。在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L 培养基上,培养 15 d 后才长出许多小根,生根率达 80%^[12]。本

表4 不同激素对生根培养的影响

Table 4 Effects of different hormones on rooting culture

培养基	外植体数	生根时间(d)	生根率(%)	平均根数(条)	平均根长(cm)	平均株高(cm)
M8	14	10	50	4.7	1.6	1.1
M9	23	15	65.2	4.7	4.0	3.8
M10	10	5	20	5.0	2.6	3.2
M11	19	5	100	6.4	3.9	7.6
M12	17	5	52.9	6.3	3.4	6.7
M13	11	9	81.8	11.2	1.4	0.5
M14	15	20	13.3	3.2	1.1	2.2

注:生根时间为从植入培养基到发根之间的天数。

Note: Rooting time is days from planting to rooting.

试验用培养基 M11 (MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.15 mg/L) 进行生根培养, 5 d 就能生根, 生根率达 100%, 缩短了生根时间, 小苗生长健壮。

3.2 降低生产成本

试管苗生产成本是决定其是否有推广价值的关键因素。本试验在培养基配制过程中, 用食用白糖代替蔗糖, 用自来水代替蒸馏水。在培养过程中, 只用价格便宜的 6-BA 和 NAA 常用激素, 两者合理搭配能明显提高脱毒苗的繁殖系数, 且简化了培养程序, 使诱导愈伤组织、分化和生根能在一种培养基上进行, 省时, 省工, 大大降低了生产成本。

3.3 应用前景

目前魔芋生产面临的主要问题是白绢病(真菌病害)、软腐病(细菌病害)、黄瓜花叶病毒和魔芋花叶病毒引起的病毒病, 采用细胞生物工程技术进行魔芋脱毒、脱菌, 恢复其种性, 使云南魔芋推广种植走出困境。

参考文献:

[1] 李恒, 龙春林. 中国魔芋属的分类问题[J]. 云南植物研究, 1998, 20(2): 167-170.
 [2] 孙茂林. 云南薯类作物的研究和发展[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.
 [3] 杨春禄, 邱建新, 马宝剑. 中国魔芋产业化的现实问题及对策[J]. 山区开发, 2000(9): 19, 21.
 [4] 张宁, 张德厚, 罗鸿源. 魔芋科学及应用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1997.
 [5] 陈运忠. 中国魔芋产业的发展战略[J]. 山区开发, 2000(9): 8-9.
 [6] 孙谷光. 抓住机遇迎接魔芋产业的新发展[J]. 山区开发, 2000(9): 5-7.

[7] 李松, 费甫华, 张化平, 等. 魔芋主要病害的发生、危害及防治技术[J]. 湖北植保, 2000(6): 24-25.
 [8] 陈雁. 魔芋种传病害管理探讨[J]. 种子, 2001(4): 40-42.
 [9] 阮义理. 真菌传植物病毒的种类和主要特征[J]. 植物保护, 1996, 22(6): 35-37.
 [10] 张兴国. 魔芋组织培养的研究[J]. 西南农业大学学报, 1988, 10(3): 345-349.
 [11] 黄丹枫, 刘佩瑛. 魔芋组织快繁技术的应用研究[J]. 上海农学院学报, 1991, 9(2): 162-164.
 [12] 张兴国, 苏承刚, 刘佩瑛. 魔芋快繁体系建立和人工种子研制[J]. 西南农业学报, 1993, 15(3): 259-261.
 [13] 曾昭初, 罗鸿源, 葛菁华, 等. 魔芋组织培养技术研究初报[J]. 贵州农业科学, 1994(5): 19-21.
 [14] 柳俊, 谢从华, 余展深, 等. 魔芋离体繁殖研究[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(3): 283-285.
 [15] 吕世安, 沈艳芬, 黄元勋, 等. 魔芋组织培养及快繁技术研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2003, 21(2): 6-8.
 [16] 黄远新, 何凤发, 张盛林. 魔芋组织培养与快繁技术研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(4): 309-311.
 [17] 王玲, 李勇军, 房亚南, 等. 魔芋组织培养的一步成苗技术研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(5): 636-638.
 [18] 鲁红学, 胡桂香, 周焱, 等. 花魔芋组织培养初步研究[J]. 长江大学学报(自科版), 2005, 25(2): 52-53.
 [19] 吴毅歆, 隋启君, 谢庆华, 等. 魔芋块茎脱毒高效快繁体系的构建[J]. 西南农业学报, 2006, 19(4): 722-727.
 [20] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473-497.
 [21] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214-217.
 [22] 庄承纪, 周建葵. 魔芋属植物愈伤组织的诱导和再生植株的研究[J]. 云南植物研究, 1987, 9(3): 339-347.

(责任编辑 谢晓慧)