

## 魔芋组培快繁中常见的几个问题及对策\*

崔继梅, 梁艳丽, 谢世清\*\*

(云南农业大学魔芋研究所, 云南昆明 650201)

**摘要:** 针对魔芋组织培养过程中存在的污染, 外植体褐变, 玻璃化现象, 组培苗的遗传变异, 移栽成活率低等问题进行了综述并探讨了相应的解决对策, 为魔芋组培工厂化提供了一定理论依据。

**关键词:** 魔芋; 组培; 褐变; 玻璃化; 移栽成活率

**中图分类号:** S 632.035.3   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1004-390X (2008) 01-0096-03

### Several Common Problems In *Amorphophallus* Tissue Culture and Their Settlements

CUI Ji-mei, LIANG Yan-li, XIE Shi-qing

(Institute of *Amorphophallus* Research, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** The existing problems in the process of *Amorphophallus* tissue culture, such as the pollutions, browning of explants, the vitrifications and the genetic variations of tube shoots, low transplantation survival rate and so on, were reviewed. Then the corresponding settlements were discussed. The conclusion provided a theoretical base for the factorization of *Amorphophallus* tissue culture.

**Key words:** *Amorphophallus*; tissue culture; browning; vitrification; transplantation survival rate

魔芋 (*Amorphophallus Konjac* C. Koah) 是云南星科魔芋属多年生宿根性草本植物, 也是主要的经济作物之一<sup>[1]</sup>。主要分布于四川、云南等地, 其经济器官为球茎, 富含葡甘露聚糖, 是目前世界上公认最好的膳食纤维之一, 葡甘露聚糖由于其特殊的理化性质, 在工业、食品、医药等方面有着广泛的用途<sup>[2,3]</sup>。随着近年来种植面积的不增加, 魔芋用种量激增, 魔芋种芋处于供不应求状态<sup>[4]</sup>。加之魔芋体积大, 皮薄, 水分多, 采用传统的繁殖方法 (如块茎和根状茎作种), 长期无性繁殖, 易受创伤和病害感染, 导致魔芋种性退化严重, 为了从根本上解决上述问题, 采用魔芋组织培养技术进行快速繁殖是一条有效的途径。尽管魔芋的组培研究在国内外均取得了一定的进展, 但在实际的魔芋组培中仍然存

在着菌类污染、褐变现象、玻璃化现象、遗传不稳定及试管苗移栽成活率低等突出问题。本文针对魔芋组培快繁过程中存在的问题进行了分析, 并对解决措施进行了探讨, 为实现魔芋组培生产工厂化提供了理论依据。

#### 1 污染问题及其控制

污染问题是植物组织培养中长期存在的问题。污染严重影响着外植体无菌体系的建立, 而无菌体系的建立是魔芋组织培养中最基础也是最关键的一步, 外植体是否既能彻底消毒又能使其具有较高的生长力, 是建立魔芋组培快繁体系的一大难题<sup>[5]</sup>。如能降低污染率, 可大大降低魔芋组培工厂化生产的成本, 提高经济效益。污染一般包括真菌性污染和细菌性污染, 其来源可分为3大类<sup>[6,7]</sup>。第1类是

收稿日期: 2007-05-09

\* 基金项目: 云南省科技攻关计划项目 (NG200159)。 \*\* 通讯作者

作者简介: 崔继梅 (1984-), 女, 云南曲靖人, 在读硕士研究生, 主要从事薯类作物栽培研究。

E-mail: cui.jimei@163.com

材料带菌;第 2 类是接种污染;第 3 类是培养污染。

### 1.1 培养材料污染及对策

不同来源的培养材料(植物种类、外植体类型及大小),其选择的消毒处理方式不同,污染率也有所不同。长期暴露于大田中的魔芋外植体,由于大气及土壤中的种种污染源致使其被严重污染,因此,在选取试验材料时,应该选择球茎表面较光滑,无伤口的健康球茎或根状茎为材料。彭昌操<sup>[8]</sup>在对《花魔芋的愈伤组织诱导研究》中报道,不同外植体在不同种类的表面灭菌剂及不同处理时间作用下其污染率有明显差异。对于不同的外植体表面,应选择不同的消毒剂和灭菌时间。陈永波<sup>[9]</sup>等报道,利用熏气 20 min—酒精浸泡 1 min—HgCl 浸泡 25 min 的综合消毒灭菌方法,既有效地杀死了外植体的内生菌,又杀死了表面细菌,使初次接种污染率控制在了 10% 以下,继代培养污染率在 5% 以下。

### 1.2 接种污染及防控措施

接种污染主要是由于接种过程中使用了未消毒好的工具及人工呼吸时排出的细菌等致使病菌污染材料而造成的。针对这种细菌性污染,可以要求操作人员接种前清洗手,并用 70% 酒精棉球擦拭双手消毒,接种用的镊子和解剖针或接种针要在火焰上灼烧灭菌。材料接种好后,要对接种瓶瓶口进行消毒。

### 1.3 培养过程感染及对策

如果接种室中病菌多、湿度大、温度高或超净工作台运行不良,在培养过程中也会使培养材料污染,表现为在培养基上出现黄、白、黑等不同颜色的霉菌。针对这种污染,可定期对接种室和培养室用高锰酸钾和甲醛熏蒸,提前 20 min 打开超净工作台,接种前对接种室进行紫外灯照射等灭菌。

## 2 褐变现象及防控措施

褐变现象是魔芋初代培养中一个重要的问题。它是指在魔芋组培过程中由于魔芋外植体内具有防御性的酚类化合物,在伤口或幼嫩组织附近释放氧化后,形成了棕褐色有毒的醌类物质,使培养基变成褐色,从而对魔芋组织产生毒害作用<sup>[1,3,10]</sup>。褐变已经成为魔芋组培中常见的问题之一,若处理不当或不及时防控,则会阻碍魔芋组培生产工厂化的进行。

### 2.1 影响魔芋褐变的因素

影响魔芋褐变的因素有很多,主要有以下几种:①外植体的生理状态。王玲<sup>[11]</sup>等研究发现,在魔芋组培过程中,同样的培养条件下,种龄越大的魔芋球茎,在培养时越容易褐变,成功的几率越小。②培养条件。高温、强光照的培养条件,会提高多酚氧化酶(PPO)的活性,促进酚类物质的氧化,加速褐化。③外源激素的类型和浓度。培养基中外源激素的种类和浓度对培养材料的褐变有一定的影响。④琼脂浓度和氧化剂。

### 2.2 减少魔芋褐变的方法

针对上述影响魔芋褐变现象的主要因素,可以采取以下措施:①选取年龄幼小,体积适宜的外植体做培养材料,切割时尽可能减小伤口面积,缩短切片在空中暴露时间。②对培养基多进行一段时间低温和黑暗条件的培养,魔芋的低温培养是否能够降低褐变目前还没有报道,但是低温培养能够降低薯蓣的褐变率已经得到了证实<sup>[12]</sup>。③培养基中生长激素 2,4-D 浓度适当降低,细胞分裂素 6-BA 浓度相对提高,褐变率变小。④一般液体培养容易使有毒物质扩散,因此魔芋组培大多采用固体培养,在培养过程中,可以调整琼脂浓度来降低褐变率,并在培养基加入一些抗氧化剂,如活性炭(500 mg/L)、半胱氨酸、二氧化硫、抗坏血酸等,这些抗氧化剂均能预防醌类物质的形成,从而达到控制褐变的目的。

## 3 玻璃化现象及对策

在魔芋组织培养中经常会出现组培苗的玻璃化现象,与正常苗相比,表现为试管苗叶片,茎段如水浸一般;呈水晶状透明或半透明;整株矮小肿胀,失绿,叶片内卷变厚,质地脆弱<sup>[1,10]</sup>。体内水势高于正常苗,叶绿素、蛋白质、纤维素、木质素等含量降低,生长出现不良甚至死亡现象。

### 3.1 魔芋玻璃苗形成的原因

国内外许多研究者在玻璃化植株的形态特征、生理生化变化及防控措施方面均取得了很大的进展,但在玻璃苗的机理和诱发因素方面至今还没有确切定论。

有关研究表明,琼脂和蔗糖浓度与玻璃苗的比例呈负相关,即琼脂或蔗糖浓度越高,玻璃苗的比例越低,另外培养材料,培养基成分、植物激素、培养的环境条件等均会造成魔芋组培中玻

璃苗的形成。

### 3.2 防止和克服魔芋玻璃苗的措施

魔芋组培中的玻璃化现象需要从培养基及其环境条件和生理生化方面入手,具体措施如下:

- ①选择不易玻璃化的基因型及部位做外植体。
- ②增加琼脂浓度和蔗糖含量。
- ③在 MS 培养基中,减少或除去  $\text{NH}^{13}$ ,并及时转接。
- ④提高光照强度,改变培养材料通气状况。
- ⑤在培养基中添加一些物质。如活性炭、K, P, Fe, Cu 等元素。
- ⑥适当低温处理,避免过高的培养温度。

## 4 遗传稳定性问题及对策

遗传稳定性就是指保持原有良种的性状。在组培过程中,有时经愈伤组织途径诱导完整植株,会出现遗传不稳定的现象,表现为生长习性、熟性、发育特性和抗性发生变异。有些是有益的变异,但更多是不良的变异,而且随着继代次数和时间的增加,变异率不断提高,这对生产造成了很大的损失。在魔芋组培中,黄丹枫等研究表明,魔芋继代培养多次后,可引起亚单倍体细胞,亚二单倍体细胞的增加,继代培养 11 代以后,出现较多的超二倍体细胞<sup>[1,10,14]</sup>。可见魔芋遗传稳定性与继代次数有关,另外培养基、生长调节剂的浓度和种类也会影响遗传稳定性。针对魔芋中存在的遗传变异问题,在进行组培快繁时,应采用不易发生变异的魔芋茎尖、幼嫩组织进行培养,缩短继代次数,并采用适当的生长调节剂浓度和种类,尽量减少培养基中容易引起诱变的化学物质。

## 5 试管苗移栽成活率及对策

试管苗在恒温,高温、弱光、异氧等特殊条件下增殖与生长,移栽后生态系统发生了很大的改变,此时它适应外界环境的能力比较差,生长力也较弱,需要经过一个逐步锻炼和适应的过程,才能有效提高魔芋组培苗的成活率。针对魔芋成苗率低的原因,应从以下几个方面加以考虑。

### 5.1 基质准备和培育壮苗

由于培养基是经过高压灭菌的,试管苗一旦接触外界环境,很容易滋生病菌,所以选择恰当的种植基质至关重要。魔芋组培上基质一般选用沙壤土,腐殖土和腐熟晒干敲碎过筛后的细猪粪,其比例为 0.1:10:1。

培育壮苗是移栽是否成活的首要基础。魔芋壮苗的含义包括苗高 4~5 cm,根系 3~5 根,根长 2 cm 以上。研究表明,凡叶柄粗壮,叶片宽大浓绿的试管苗,在自然光照下炼苗 2~3 d 后,移栽易成活。

### 5.2 生根培养

魔芋组培苗通常需要经过生根阶段后,移栽后才能保证其有较高的成活率。组培苗的生根方式有瓶内生根和瓶外生根两种。瓶内生根受培养条件影响大,生长周期长,成本高。而采用瓶外生根可以将生根与炼苗阶段结合起来,节约了成本,缩短了育苗周期,提高了生产效率<sup>[15]</sup>,但到目前为止,国内外对魔芋组培苗瓶外生根的研究及应用都很少,对其还需要进一步的研究。魔芋组培苗生根培养过程为:将增殖阶段培养产生的魔芋丛苗切成单株后接入到生根培养基中生根成苗。单株苗转到 MS 基本培养基 + (0.4~0.5) mg/L NAA 生根培养基上都能生根,但存在一定差异,最佳生根培养基为 MS 基本培养基 + (0.3~0.5) mg/L NAA,生根率达 100%<sup>[16]</sup>。

### 5.3 常温炼苗

炼苗是组培中较为关键的一环,它直接关系到组培苗能否尽快应用到大田生产中去。其中炼苗的环境条件至关重要,温度、湿度、光照等都会影响成活率。组培快繁中的魔芋组培苗,在移栽前,先在室内打开瓶盖,在自然光下培养 10 d 左右,以降低温度,增加光照,再将幼苗移出,经消毒处理后置于带土营养袋中,在室内锻炼 15 d 左右,便可以移栽到田间<sup>[17]</sup>。

### 5.4 魔芋组培生根苗出瓶后的杀菌处理

魔芋组培生根苗在无菌异氧变为有菌自养的过程中,由于其植株幼小,组织幼嫩,比较容易感染病菌死亡,因此有必要为试管苗创造一个可以促进幼苗良好生长的环境,在生根苗移栽前要进行杀菌处理。

魔芋组培苗的杀菌处理方法有 3 种:①用优氯净 0.01%~0.02% 溶液浸泡魔芋试管苗基部以下 2~3 min。②用高锰酸钾 0.001%~0.002% 配置成粉红色的溶液,浸泡魔芋试管苗基部以下 5~10 min。③用农用链霉素 2 000 倍溶液浸泡魔芋试管苗基部以下 10 min<sup>[1,4]</sup>。轻轻漂洗去试管苗根部的培养基,然后分株移栽到大棚中。一般采用卧式淹没根部,不压根,浇透水,注意遮阴保湿。

(下转第 117 页)

的田间防治效果有待进一步试验。

烯酰吗啉是肉桂酸衍生物类治疗剂, 为麦角甾醇生物合成抑制剂, 具有内吸传导特性, 且对辣椒疫霉菌菌丝的抑制作用较强<sup>[12]</sup>; 而氢氧化铜是一种多位点保护性杀菌剂, 对辣椒疫霉菌孢子囊释放具有强烈的抑制作用。二者作用机制不同, 作用于辣椒疫霉菌生长发育的不同阶段, 尝试二者的混配, 极有可能对辣椒疫病具有很好的防治效果。

#### [参考文献]

- [1] HAREMAN G L, WANG F C. Phytophthora Blight of Pepper: Screening for Disease Resistance [J]. Tropical Pest Management, 1992, 38 (3): 319-322.
- [2] 何允波, 唐丽萍, 张宝国. 辣椒疫病菌的抗药性和新药剂的筛选研究 [J]. 吉林农业科学, 2004, 29 (3): 26-29, 36.
- [3] 洪锡午. 植物病原菌抗药性研究进展 [J]. 农药科学与管理, 1996, (2): 25-26.
- [4] 方中达. 植病研究方法 (第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] 王宝华, 郑武, 鲁国东, 等. 稻瘟菌产孢培养基的筛选 [J]. 福建农业科技, 2000, (2): 1-2.
- [6] 常彩涛, 王鸣, 巩振辉. 诱发辣椒疫霉菌大量产孢的最佳方法 [J]. 西北农业大学学报, 1995, 23 (1): 90-92.
- [7] 徐矿红, 张子君, 田云. 辣椒疫霉产孢方法 [J]. 辽宁农业科学, 2000, (3): 53.
- [8] 李宝笃, 李梅, 沈崇尧. “霜霉威 (Propamocarb)” “甲霜灵 (Metalaxyl)” 对我国辣椒疫霉菌作用方式比较及交互抗性的研究 [J]. 植物病理学报, 1994, 24 (2): 169-174.
- [9] 华南农业大学主编. 植物化学保护 (第 2 版) [J]. 北京: 农业出版社, 1994.
- [10] 黄国洋. 农药试验技术与评价方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [11] 黄昌华. 农药试验中的问题及解决办法 [J]. 农药科学与管理, 2001, (增刊): 35-36.
- [12] 谢志庚, 李顺功, 王万立. 安克对辣椒疫霉菌的毒性测定 [J]. 天津农业科技, 1999, (5): 26-27.

~~~~~  
(上接第 98 页)

#### [参考文献]

- [1] 刘贵周, 赵庆云, 谢世清, 等. 魔芋组织培养技术研究进展 [J]. 中国农学通报, 2003, 19 (4): 101-102, 125.
- [2] 吕世安, 沈艳芳, 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, 2003, 21 (2): 6-8.
- [3] 李剑美, 寸湘琴, 谢世清, 等. 魔芋组织培养中的褐变机理及防控措施 [J]. 中国农学学报, 2006, 22 (5): 234-236.
- [4] 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.
- [5] 刘贵周, 谢世清, 赵庆云, 等. 优质魔芋组培快繁技术研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20 (6): 795-799.
- [6] 李富生, 杨生超, 杨清辉, 等. 植物组织培养与甘蔗腋芽快繁 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2002.
- [7] 欧阳磊. 桉树组培快繁中存在的问题与对策 [J]. 福建林业科技, 2006, 33 (1): 203-206.
- [8] 彭昌操. 花魔芋愈伤组织诱导研究 [J]. 湖北民族学院学报, 2000, 18 (3): 1-3.
- [9] 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.
- [10] 林蓉, 谢春梅, 谢世清. 优质魔芋组培快繁技术研究进展 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (1): 153-155.
- [11] 王玲, 房亚南, 马继琼, 等. 魔芋组织培养中褐变成因的探讨 [J]. 西南农业学报, 2006, 19 (4): 719-721.
- [12] 陈艳乐, 贾守菊, 林梦野. 低温对薯蓣褐变相关生理生化的影响 [J]. 甘肃科学学报, 2005, 17 (2): 57-60.
- [13] 张宏志, 唐前瑞, 凰朴华, 等. 观赏植物试管苗玻璃化现象及防治研究进展 [J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26 (4): 321-322.
- [14] 刘佩英. 魔芋学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [15] 刘贵周, 谢世清, 赵庆云. 优质魔芋组培苗瓶外生根的研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (4): 62-63.
- [16] 苏承刚, 张兴国, 张盛林, 等. 桂平魔芋组织培养研究 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23 (3): 228-229.
- [17] 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.