

# 珠芽魔芋不同外植体诱导愈伤组织研究初报

秦正伟, 周光来<sup>2\*</sup>, 陈琳, 杨程, 余展深

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000; 2. 湖北省野生动植物保护与利用重点实验室, 湖北恩施 445000)

**摘要** [目的] 研究珠芽魔芋的快速繁殖技术以扩大珠芽魔芋的种植规模。[方法] 以珠芽魔芋的珠芽、球茎、叶片、叶脉和叶柄为外植体, 以MS为基本培养基, 添加不同浓度的6-BA和NAA, 研究不同的外植体及接种方式和不同的激素对诱导愈伤组织的影响。[结果] 5种外植体中以带叶叶脉的诱导率最高(92%)。外植体接种方式对愈伤组织的形成有一定影响, 水平接种有利于快速获得大量愈伤组织, 背接方式获得的愈伤诱导率远远高于竖插和正接方式的。MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.1 ng/L的培养基能快速诱导出质量较高的愈伤组织。[结论] 珠芽魔芋带有叶片的叶脉是诱导愈伤组织的最佳外植体, 且以叶背水平与培养基接触效果比较理想, 具有分化时间短、速度快的特点。

**关键词** 珠芽魔芋; 外植体; 诱导; 愈伤组织

中图分类号 S632.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03551-02

## A Preliminary Study on the Callus of *Amorphophallus bulbifer* Induced by Different Explants

QIN Zheng-wei et al (College of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the rapid propagation technology of *Amorphophallus bulbifer* so as to enlarge the planting scale of *A. bulbifer*. [Method] With the bulblet, corm, leaf blade, nervation and leaf stalk of *A. bulbifer* as explants, MS was taken as basic medium to add different concn. of 6-BA and NAA. And the effects of different explant and inoculation ways and different hormone on the callus induction were studied. [Result] The induction rate of nervation on the leaf was highest (92%) among 5 kinds of explants. The inoculation ways of explants had certain effects on the callus formation. Horizontal inoculation was favorable for quickly obtaining a great deal of calli. The induction rate of callus obtained by inoculation on the back side was greatly higher than that of vertical intercalation and inoculation on the right side. The optimum medium of MS+0.5 ng/L 6-BA + 0.1 ng/L NAA could quickly induce calli with higher quality. [Conclusion] Nervations on the leaf in *A. bulbifer* was the optimum explant for callus induction. The effect of connecting back side of leaf connected horizontally with medium was more ideal and it had the characteristics of short differentiation time and fast differentiation speed.

**Key words** *Amorphophallus bulbifer*; Explant; Induction; Callus

在现已开发的魔芋品种<sup>[1-2]</sup>中, 绝大部分都是通过地下大的魔芋球茎旁生长出小魔芋球或茎的方式来繁殖, 而珠芽魔芋是唯一的例外<sup>[3]</sup>。珠芽魔芋能通过地上植株“珠芽”小球茎生长及开花并无性繁殖结籽。作为一种独特的魔芋种质资源, 珠芽魔芋具有抗病能力强、葡甘聚糖含量高、产量高、耐高温高湿等特点, 开发潜能大、种植风险低、经济效益高, 是一种能进行低成本生产的魔芋种类<sup>[4-5]</sup>。2004年引入湖北试种表现较好, 为了扩大珠芽魔芋的种植规模, 笔者进行了珠芽魔芋快速繁殖技术的研究。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 珠芽魔芋的球茎、珠芽、叶柄及叶片。

### 1.2 方法

**1.2.1 材料预处理。**选健康的球茎、珠芽除去泥土洗净, 将幼叶及叶柄切成10 cm长的小段, 流水冲洗1~2 h, 转入超净工作台进行材料表面消毒。

**1.2.2 材料消毒与接种。**用75%酒精浸泡材料30~60 s, 之后无菌水漂洗1次, 然后在0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液中珠芽和球茎灭菌12~15 min, 叶柄和叶片灭菌8~10 min。最后用无菌水漂洗4~5次, 每次3~5 min。消毒之后将球茎和珠芽切成1 cm×1 cm×0.5 cm大小方块, 球茎的中部和外部分开接种; 叶柄切成1.0~1.5 cm的小段, 用平放和横放两种方式接种; 整个叶片切成叶脉、叶片、带部分叶片的叶脉三部分, 大小均为1 cm×1 cm, 采取竖插、正接、背接3种方式分开接种。

**1.2.3 培养条件。**该实验所用培养基均以MS为基本培养基, 其中蔗糖30 g/L, 琼脂5.0 g/L, pH值5.8, 121 高压灭菌20 min。培养基附加激素浓度: M<sub>1</sub>, 6-BA 0.5 ng/L; M<sub>2</sub>, 6-BA 0.5 ng/L + NAA 0.01 ng/L; M<sub>3</sub>, 6-BA 0.5 ng/L + NAA 0.1 ng/L; M<sub>4</sub>, 6-BA 0.5 ng/L + NAA 1.0 ng/L; M<sub>5</sub>, 6-BA 0.5 ng/L + NAA 2.0 ng/L; M<sub>6</sub>, NAA 1.0 ng/L; M<sub>7</sub>, 6-BA 0.01 ng/L + NAA 1.0 ng/L; M<sub>8</sub>, 6-BA 0.1 ng/L + NAA 1.0 ng/L; M<sub>9</sub>, 6-BA 1.0 ng/L + NAA 1.0 ng/L; M<sub>10</sub>, 6-BA 2.0 ng/L + NAA 1.0 ng/L。

接种后先在温度(25±1) 黑暗条件下培养3 d, 之后移到温度(28±1) , 光照强度1200 lx, 光周期12 h条件下培养。接种7 d后每2 d观察记载1次。

## 2 结果与分析

**2.1 外植体种类对褐化的影响** 由表1看出, 球茎做外植体时, 褐化率高达69%, 叶柄、叶脉、叶片和带叶叶脉未出现褐化。实验还发现, 块茎表面发生褐化, 暴露在空气中的部分变成暗褐色, 厚度约0.1~0.2 cm, 当切下褐化部分重新转入培养基培养时, 除体积过小的外其余大部分块茎均可分化出愈伤组织。球茎褐化是由于球茎被切块后, 体内酚类化合物在伤口附近释放被氧化, 形成棕褐色有毒的醌类物质, 从而对魔芋组织产生毒害作用。由于光能促进酚类化合物的氧化, 因此在接种后把培养物置于暗处并在培养基中加入一些抗氧化剂对防止培养基褐变有一定的效果<sup>[6]</sup>。

**2.2 外植体种类与污染的关系** 实验发现, 球茎、珠芽污染发生在接种14 d后。由表1看出, 球茎的污染率为60.6%, 珠芽污染率为70.6%, 叶柄、叶脉、叶片和带叶叶脉无污染。球茎污染率高, 可能是因为其体积过大, 必须切成小块后再进行消毒, 此过程会使球茎体内的葡甘聚糖从伤口溢出遇水形成胶体, 将菌体包裹在胶体中, 在消毒时不易被杀灭; 而珠

基金项目 国家科技攻关项目(2003BA901A05); 湖北省教育厅重点项目(2004D001)。

作者简介 秦正伟(1985-), 男, 湖北十堰人, 本科生, 专业: 生物工程。

\* 通讯作者, 高级实验师。

收稿日期 2008-01-02

芽污染率高可能是因为生长过程中暴露在空气中,表面粗糙有裂纹,彻底灭菌困难<sup>[7]</sup>。因此,实验建议采用小球茎,尽可能不用珠芽做外植体。

**2.3 外植体种类对愈伤诱导的影响** 珠芽魔芋的带叶叶脉切块接种8~10 d后开始膨大,叶柄和叶脉8~12 d后开始膨大,球茎则在15~17 d后开始膨大,叶片一直未见膨大而颜色变绿。外植体膨大的同时变的疏松,切口处形成大量愈伤

组织。由表1看出,带叶叶脉的诱导率最高,为92%,而后依次是叶柄85.2%、叶脉84.4%、球茎30.8%,珠芽由于污染及褐化未长出愈伤,而叶片不能诱导出愈伤组织,接种7 d后叶片变翠绿,培养20 d由翠绿变为淡黄色并逐渐枯萎死亡。由此可见,带叶叶脉是最佳外植体,其次是叶柄和叶脉。在材料充足时最好选择带叶叶脉做外植体,以提高实验成功率。

**2.4 接种方式对愈伤诱导的影响** 实验发现,叶柄平放培

表1 不同外植体诱导愈伤组织比较

Table 1 Comparison of callus induction from different explants

外植体 Explants	接种数 块 No. of inoculated	污染数 块 No. of contaminated	褐化数 块 No. of browning	出愈时间 d Callus forming time	污染率 % Contamination rate	出愈数 块 No. of callus	出愈率 % Callus forming rate
叶柄Stipe	54	0	0	10 ± 2	0	46	85.2
叶脉Nervation	32	0	0	10 ± 2	0	27	84.4
叶片Lamina	85	67(死亡)	0	-	78.8	0	0
带叶叶脉	25	0	0	9 ± 1	0	23	92.0
Leaf with nervation							
球茎Corm	66	40(污染)	18	16 ± 1	60.6	8	30.8
珠芽Bulblet	34	24(污染)	10	-	70.6	0	0

养时,只有形态学上端形成不规则圆盘状的愈伤组织;横放培养时两端都形成哑铃形较松散的愈伤组织,一端愈伤组织较大,估计是形态学上端。叶脉背接时,向下反卷生长;正接时,向上反卷生长;一半竖插入时,叶脉卷向背面。三种方式都能诱导出团状不规则的白色或粉红色愈伤组织,但背接愈伤诱导最快最多,竖插次之,正接有少数没有形成愈伤组织。背接方式愈伤诱导率远高于竖插和正接方式,这可能与叶脉的极性有关,背面气孔多,有助于水分和养分的吸收;正接反卷生长,叶脉不能接触培养基,无法从培养基中吸收养分,从而造成生长停滞及死亡现象,造成出愈率低。

表2 激素对愈伤组织形成的影响

Table 2 Effects of hormones on callus induction

培养基 Medium	接种数 块 No. of inoculated	出愈数 块 No. of explants forming callus	诱导率 % Induction rate
M	32	6	18.8
M <sub>1</sub>	32	13	40.6
M <sub>2</sub>	32	28	87.5
M <sub>3</sub>	32	9	28.1
M <sub>4</sub>	28	0	0
M <sub>5</sub>	32	0	0
M <sub>6</sub>	32	4	12.5
M <sub>7</sub>	32	10	31.2
M <sub>8</sub>	34	24	70.6
M <sub>9</sub>	34	9	26.5

**2.5 激素对愈伤组织诱导的影响** 由表2可知,10种培养基中以M<sub>3</sub>和M<sub>9</sub>的效果最好,M<sub>3</sub>诱导率相对较高,建议采用MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.1 ng/L做愈伤组织诱导培养基。当6-BA质量分数为0.5 ng/L时,随NAA质量分数的提高,诱导率呈上升趋势,但NAA质量分数增加到0.1 ng/L

时,诱导率开始下降;以M<sub>5</sub>的诱导效果最差,不能诱导出愈伤组织。当NAA质量分数一定时,6-BA质量分数在1.0 ng/L以下诱导率均呈上升趋势,但6-BA质量分数为0时不能诱导出愈伤组织。由此可见,6-BA在愈伤组织诱导过程中起主导作用,低浓度NAA有利于愈伤组织的诱导。

### 3 结论与讨论

在实验中用珠芽魔芋的球茎和珠芽作外植体易褐化死亡,易污染,这与花魔芋的实验结果一致<sup>[8]</sup>;叶片没有分化最终干枯死亡,这可能与实验所用叶片为全展开时期成熟叶片有关;叶柄和叶脉都能分化出状态好的愈伤组织,其中以带部分叶片的叶脉分化效果最好,是诱导愈伤组织的理想外植体,具有分化时间短、速度快的特点。

外植体接种方式对愈伤组织的形成有影响,水平接种有利于快速获得大量愈伤组织;叶脉背接时出愈时间短、愈伤诱导率高,可能与叶脉背面的气孔多于正面更有利于从培养基中吸收养分有关。

实验结果表明,珠芽魔芋带有叶片的叶脉是诱导愈伤组织的理想外植体,且以叶背水平与培养基接触效果最理想,在MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.1 ng/L培养基上能快速诱导出状态较好的愈伤组织。

### 参考文献

- [1] 刘佩英. 魔芋芋 M. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] 关龙庆. 魔芋 J. 植物杂志, 1984(6): 32-34.
- [3] 张东华. 珠芽魔芋 M. 昆明: 云南科技出版社, 2004.
- [4] 张东华, 赵建荣. 珠芽魔芋良种繁育及栽培技术 J. 农村实用技术, 2005(2): 20.
- [5] 张东华, 赵建荣, 周凡, 等. 中缅边境一带发展潜力巨大的魔芋新品种——珠芽魔芋 J. 资源开发与市场, 2005, 21(2): 56-58.
- [6] 黄丹枫, 刘佩英. 魔芋组织培养快速繁殖技术的应用研究 J. 上海农学院学报, 1991, 9(2): 162-164.
- [7] 王玉英. 组织培养材料的消毒 J. 植物杂志, 1980(1): 13-15.
- [8] 周光来. 休眠期花魔芋植株再生外植体的筛选 J. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2005, 23(4): 375-377.