

花魔芋组织培养的研究

郭政宏^{1,2}, 乐超银¹, 王健¹, 刘海军¹, 李金鞠¹, 郭春绒² (1. 三峡大学生物技术中心, 湖北宜昌 443002; 2. 山西农业大学文理学院, 山西太谷 030801)

摘要 [目的] 筛选适合花魔芋生长的诱导、分化和生根培养基。[方法] 以湖北省秭归县的花魔芋球茎和鳞片作为外植体, 以 MS 培养基为基本培养基, 添加不同激素, 分别组配成 10 种诱导培养基和分化培养基进行组织培养, 然后将诱导的魔芋丛芽切成单株后接入 MS + NAA 0.1 ~ 0.5 mg/L 生根培养基, 研究不同激素对比对愈伤组织形成和芽分化以及生根的影响。[结果] 球茎和鳞片在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 培养基上容易诱导愈伤组织, 诱导效率分别为 92% 和 90%, 且愈伤组织容易分化。球茎在 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.15 mg/L 培养基上分化效率为 86.7%, 鳞片在 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基上分化效率为 83.3%。将球茎和鳞片分化出的不定芽转至 MS + NAA 0.5 mg/L 的培养基上, 生根率可达 94%, 20 d 后培养出完整植株。[结论] 该试验初步建立魔芋的再生体系, 为进行大规模生产魔芋种苗提供良好技术支持。

关键词 魔芋; 外植体; 激素; 再生植株

中图分类号 S603.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-11867-02

Study on the Tissue Culture of *Amorphophallus albus*

GUO Zheng-hong et al (Biotechnical Center of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002)

Abstract [Objective] The study aimed to screen the media suitable to induction, differentiation and rooting of *Amorphophallus albus*. [Method] With the corm and scale of *A. albus* in Zigui County in Hubei Province as tested material, MS was used as the basic medium with different hormones to respectively match 10 kinds of media for induction, differentiation for tissue culture of *A. albus*. The induced clumpy buds were cut into single plants and were put into the rooting medium of MS + NAA 0.1 - 0.5 mg/L and the effects of different hormone matching on callus formation, bud differentiation and rooting were studied. [Result] The corm and scale were easy to induce the callus on the medium of MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA, with the induction of 92% and 90% resp. and the induced callus was easy to differentiate. The corm had the differentiation rate of 86.7% on the medium of MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.15 mg/L NAA and the scale had the differentiation rate of 83.3% on medium of MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA. When the adventitious buds differentiated by corm and scale were transferred into the rooting medium of MS + 0.5 mg/L NAA, the rooting reached to 94% and the whole plants were obtained after culture for 20 d. [Conclusion] The regenerative system of *A. albus* was established preliminarily in the experiment, which provided good technique support for producing *A. albus* seedlings in great scope.

Key words *Amorphophallus albus*; Explants; Hormones; Regenerative plant

魔芋 (*Amorphophallus albus*) 是天南星科魔芋属的多年生草本植物, 其变态茎宿存于地下, 通常呈球形、扁球形或柱状球形^[1]。英文名是 konjac, 印度称之为 Suranor amorphophallus^[2]。魔芋是重要的经济作物之一, 被广泛地应用于食品、医药、化工、纺织等方面。魔芋种质资源丰富, 在我国主要分布于四川、云南、江苏等长江流域, 且以花魔芋 (*Amorphophallus albus*) 分布最广^[3]。在大面积推广种植中, 由于魔芋种芋质量不断退化, 而且魔芋退化的原因至今尚未明确^[4], 种芋储藏难, 播种后易感染腐烂, 魔芋软腐病发病后的产量一般损失 30% ~ 50%, 甚至可造成大面积绝收^[5]。魔芋病害已成为制约我国魔芋及其相关产业持续发展的关键因素。组培是目前加快魔芋快速繁殖, 提供的无病优质种苗的有效途径, 笔者对组培方法进行了优化, 以为魔芋良种繁育体系的建立打下基础, 以及为转基因等其他遗传操作提供技术储备。

1 材料与方法

1.1 材料 以湖北省秭归的健康花魔芋球茎和鳞片作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 消毒前的处理。 将魔芋用自来水冲洗干净, 切下鳞片, 小刀轻轻削去外皮, 球茎切成 3 cm³ 大小的含芽孢的块状。将鳞片和球茎放在干净的烧杯里, 在烧杯口蒙上一层纱

布, 扎口后放在水龙头下流水冲洗 30 ~ 60 min。

1.2.2 消毒处理。 不同外植体用不同消毒处理方法, 具体操作为: 鳞片: 75% 酒精处理 5 s 后无菌水冲洗 2 次, 0.1% HgCl₂ 浸泡消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次。球茎: 75% 酒精处理 10 s 后无菌水冲洗 2 次, 0.1% HgCl₂ 浸泡消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次。

1.2.3 培养方法。 消毒后, 在无菌条件下, 削掉因灭菌而损坏变色的外植体, 将鳞片和球茎切成 1.5 cm³ 大小的块状接种在以下 10 种愈伤组织培养基上 (表 1)。接种后外植体置于 25 °C 条件下黑暗培养 20 d, 同培养基继代后, 在强光下每天光照 8 h, 诱导培养 20 ~ 25 d 后, 愈伤组织转入以下 10 种分化培养基中进行分化培养 (表 2)。同等温度光照条件下培养 15 ~ 20 d 后继代 1 次, 观察分化结果。

表 1 不同配比的诱导愈伤培养基

Table 1 The induction of callus media at different proportion

编号 No.	成分 Components
A1	MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + add1
A2	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + add1
A3	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + add1
A4	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + add1
A5	MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + add1
A6	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + add1
A7	MS + 1.5 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L NAA + add1
A8	MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.15 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + add1
A9	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + add1
A10	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA + add1

注: add1 = 30 g/L 糖 + 8 g/L 琼脂 + 0.5 g/L 活性炭。

Note: add1 = 30 g/L sugar + 8 g/L agar + 0.5 g/L active carbon.

基金项目 国家自然科学基金 (30871579)。

作者简介 郭政宏 (1982 -), 女, 内蒙古乌盟人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。

收稿日期 2009-04-29

表2 不同配比的分化培养基

Table 2 The differentiation media at different proportion

培养基编号	成分
No. of media	Components
B1	MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + add2
B2	MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + add2
B3	MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.15 mg/L NAA + add2
B4	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + add2
B5	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + add2
B6	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + add2
B7	MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + add2
B8	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L IBA + add2
B9	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + add2
B10	MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 1.0 mg/L IBA + add2

注: add2 = 40 g/L 糖 + 8 g/L 琼脂 + 0.5 g/L 活性炭。

Note: add2 = 40 g/L sugar + 8 g/L agar + 0.5 g/L active carbon.

通过分化培养阶段产生的魔芋丛芽经切成单株后接入到 MS + 0.1 ~ 0.5 mg/L NAA + 40 g/L 糖 + 8 g/L 琼脂 + 0.5 g/L 活性炭 5 种生根培养基中生根成苗, 同等温度光照条件下培养 15 ~ 20 d 后观察生根情况。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对愈伤组织形成的影响 试验结果表明, 不同激素浓度配比的培养基对花魔芋愈伤组织的诱导率是不同的。6-BA 和 NAA 的组合对愈伤组织诱导发挥主要作用, 而 IBA 对愈伤的诱导影响不明显。从表 3 中可以看出, 球茎和鳞片在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 培养基上的愈伤诱导率分别达 92% 和 90%。

2.2 不同激素处理对芽分化的影响 魔芋外植体经过 40 d 左右的培养, 愈伤组织表面形成许多粉红色芽点。球茎在培养基 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.15 mg/L NAA 的出芽率达 86.7%, 鳞片在培养基 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 的出芽率达 83.3% (表 4) 但是不同激素配比的培养基能够使愈伤组织分化形成芽点的数目不一样。

表3 激素对比对愈伤组织形成的影响

Table 3 Effect of the hormone proportion on the formation of callus

培养基编号	接种数		出愈数		出愈比率/%	
	Inoculation number		Callus number		Callus ratio	
	球茎	鳞片	球茎	鳞片	球茎	鳞片
No. of media	Corm	Squama	Corm	Squama	Corm	Squama
A1	50	50	46	45	92	90
A2	50	50	40	36	86	84
A3	50	50	32	30	64	60
A4	50	50	36	30	72	60
A5	50	50	25	20	50	40
A6	50	50	19	16	38	32
A7	50	50	44	42	88	84
A8	50	50	28	26	56	52
A9	50	50	24	20	48	40
A10	50	50	42	38	84	76

2.3 幼芽的生根 魔芋愈伤组织分化的苗在 MS + 0.1 ~ 0.5 mg/L NAA 生根培养基上都能生根, 生根率均达到 80%

以上, 其中以 MS + 0.5 mg/L NAA 为最佳生根培养基, 生根率可达 94%。

表4 激素对比对芽点形成的影响

Table 4 Effect of hormone proportion on the formation of bud tips

培养基编号	愈伤数		出芽数		出芽率/%	
	Callus number		Sprout number		Germination rate	
	球茎	鳞片	球茎	鳞片	球茎	鳞片
No. of media	Corm	Squama	Corm	Squama	Corm	Squama
B1	30	30	22	20	73.3	66.7
B2	30	30	21	19	70.0	63.3
B3	30	30	26	24	86.7	80.0
B4	30	30	24	25	80.0	83.3
B5	30	30	16	15	53.3	50.0
B6	30	30	18	17	60.0	56.7
B7	30	30	20	21	66.7	70.0
B8	30	30	16	16	53.3	53.3
B9	30	30	12	9	40.0	30.0
B10	30	30	14	9	46.7	30.0

3 讨论

对魔芋材料进行诱导培养, 材料的选择关系到快速繁殖的成败。用体积小种的魔芋作为外植体容易形成愈伤组织和不定芽。植物激素对组织分化的调节起着非常重要的作用, 尤其是细胞分裂素与生长素的比值对组织的发育方向起决定性作用^[6], 培养基激素浓度的选择决定了魔芋组织培养的成苗率。6-BA 与 NAA 配合对魔芋愈伤组织诱导、分化有明显促进作用, 而 IBA 对其诱导愈伤和分化芽没有明显作用。试验中发现, 诱导出愈伤组织呈浅褐色瘤状形, 有利于分化和生根。而当培养基里的细胞分裂素类激素含量与生长素类激素含量相比, 比值较高时, 培养基适宜芽体的生长。分化出来的芽在细胞生长素 NAA 存在的培养基上可以高效的培养生根, 再将生根的组培苗转至不含任何激素的 MS 培养基上培养 30 d 后, 可以长成完整的植株。

另外, 褐变是魔芋组培中常见的问题之一, 如果不正确的进行防控, 则魔芋的组织培养将会变褐死亡。为控制褐变, 采取先暗培养 20 d, 随后反复继代在加入了活性炭的培养基中的培养的方法。活性炭是一种吸附性较强的无机吸附剂, 能吸附各种微量物质和微小颗粒; 活性炭还在一定程度上降低了光照强度, 从两方面减轻了褐变^[7]。而且随着生长激素浓度的不断下降, 细胞分裂素浓度的相对提高, 外植体愈伤组织分化率在不断提高, 而褐变率也随之下降^[8]。试验中证实了这一点。

参考文献

- [1] 何家庆. 关于魔芋的农业科学 [M]. 合肥: 安徽大学出版社, 2002.
- [2] 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.
- [3] 李恒. 云南的魔芋资源 [J]. 云南农业大学学报, 1988, 3 (2): 137 - 144.
- [4] 张盛林. 魔芋良种繁育体系的建立 [J]. 山区开发, 2000 (9): 26 - 27.
- [5] 庞杰, 张盛林, 刘佩瑛, 等. 中国魔芋资源的研究 [J]. 资源科学, 2001, 23 (5): 87 - 89.
- [6] 曹攸义, 刘国民. 实用植物组织培养教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2001.
- [7] 谢庆华, 吴毅敏, 张勇飞, 等. 魔芋外植体组培分化条件的研究 [J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2001, 21 (3): 66 - 69.
- [8] 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): 97 - 99.