



论著 • Article

芋头愈伤组织诱导及芋头细胞悬浮培养的研究

钟德盈 牛春宇 赖晓君 李小龙

(贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州 542899)

摘要 目的: 筛选出适宜进行芋头愈伤组织诱导的外植体, 探究适宜芋头愈伤组织继代培养及细胞悬浮培养的部分条件。方法: 以芋头顶芽、腋芽、新生的幼嫩叶片、块茎和须根作为外植体材料, 开展芋头愈伤组织诱导、不同条件下继代培养, 不定芽、不定根增殖研究及不同条件下芋头细胞悬浮培养研究。结果: 芋头愈伤组织诱导的最佳外植体为块茎, 腋芽适宜进行不定芽、不定根的增殖研究; 其继代培养宜在光照条件、NAA0.5 mg/L+6-BA1 mg/L 激素组合下进行; 6-BA1 mg/L+NAA0.5 mg/L 激素组合中不定芽增殖系数最高, 达到 4.67, 6-BA 0.5 mg/L+NAA1 mg/L 激素组合中不定根增殖系数最大, 达到 5.33; 芋头细胞悬浮培养的最佳激素配比为 6-BA2 mg/L+2,4-D1 mg/L, 最佳蔗糖浓度为 40 g/L; 建立悬浮细胞动态生长曲线, 发现芋头细胞悬浮培养最佳继代周期为 16 d; 最后, 进行到第五代继代培养时细胞大部分呈现球形, 细胞系趋于稳定。

关键词 芋头; 愈伤组织; 细胞培养

文章编号 019-2024-0121

Study on Induction of Callus Tissue and Suspension Culture of Taro Cells

Zhong Deying, Niu Chunyu, Lai Xiaojun, Li Xiaolong

(School of Food and Biological Engineering, Hezhou University, Hezhou 542899, China)

Abstract Objective: To screen out suitable explants for taro callus induction and to explore the conditions for appropriate subculture and suspension culture of taro callus. Methods: Using top buds, axillary buds, young leaves, tubers, and fibrous roots of taro as explant materials, this study conducted research on taro callus induction, subculture under different conditions, adventitious bud and root proliferation, and suspension culture of taro cells under various conditions. Results: The optimal explant for taro callus induction is the tuber, with axillary buds suitable for adventitious bud and root proliferation studies; subculture under light conditions and NAA0.5 mg/L+6-BA1 mg/L hormone combinations is recommended; the highest proliferation coefficient for adventitious buds was achieved with the 6-BA1 mg/L+NAA0.5 mg/L hormone

收稿日期: 2023-11-02 录用日期: 2023-11-20

通讯作者: 李小龙; 单位: 贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州

引用格式: 钟德盈, 牛春宇, 赖晓君, 等. 芋头愈伤组织诱导及芋头细胞悬浮培养的研究[J]. 现代精准农业快报, 2023, 1(1): 29-41.

combination, reaching 4.67; the highest proliferation coefficient for adventitious roots was observed with the 6-BA 0.5 mg/L+NAA1 mg/L hormone combination, reaching 5.33; the optimal hormone ratio for taro cell suspension culture is 6-BA2 mg/L+2,4-D 1 mg/L, with the optimal sucrose concentration being 40 g/L; a dynamic growth curve for suspended cells was established, revealing that the optimal subculture cycle for taro cell suspension culture is 16 days; finally, by the fifth subculture, most cells exhibited spherical shapes, indicating a stable cell line.

Keywords Taro; Callus tissue; Cell culture

1 前言

芋头 (*Colocasia culenta schott*) 为天南星科属, 是一种多年生草本植物, 通常作为一年生作物栽培。芋头中含有丰富的蛋白质、钙、磷、铁、钾、镁、钠、胡萝卜素、烟酸、及维生素 C、B 族维生素等多种营养成分^[1], 是一种重要的菜蔬及粮食作物。芋头的块茎含丰富淀粉且淀粉颗粒较小, 尤其适合婴儿和病人食用。此外, 芋头可提取芋头多糖用于免疫调节、降血糖和降血脂^[2], 芋头块茎入药还可以用于治疗乳腺疾病、口舌疮、痈肿疔疮、颈淋巴结核等, 其叶子可用于治疗荨麻疹、疮疥^[3]。而且, 芋头的叶柄剥皮后可以煮食或者晒干食用, 整株可作为常用的猪饲料。可以说芋头是具有多种饲用、药用、食用价值且容易培植的农作物。

芋头最早生产于中国、马来西亚和印度半岛等炎热潮湿的沼泽地带, 后来在全世界各地广为栽植^[4]。我国的芋头产品种类也十分丰富, 种植主要分布在珠江、长江及淮河流域。但其只能靠子孙芋进行传统的无性繁殖, 不可以进行有性繁殖; 这种传统的繁殖方式会导致芋头种植出现繁殖系数低和发生严重病毒的问题, 而且病毒容易累积在植株体内^[5], 从而给芋头产业带来了产量减少、品质下降和品种退化等负面影响。因此, 要提高芋头的产量、品质及推动芋头产业的发展, 应尽快设法解决芋头种苗的病毒, 改进芋头的繁殖方式, 提高种苗的繁殖系数和促进芋头种性恢复。芋头组培技术的研究可以为提高种苗品质、产量, 降低成本

与保存种质资源提供基础技术支持。而植物细胞悬浮培养作为细胞工程的重要组成部分, 已经运用于作物、药用植物、经济树植等的育种, 所以可以尝试细胞悬浮培养的方法解决芋头产业受产量、品质限制的问题。

国外开始研究芋头组培脱毒苗比较早, Yam 等^[6]研究发现, 芋头腋芽在添加芋头球茎提取物和椰子汁等有机物的 1/2MS 培养基上培养时较易诱导得到愈伤组织, 且组培苗生根容易, 组培苗再生频率高。Sabapathy 等^[7]发现在添加一定浓度的 NAA 和 KT 的 LS 培养基上培养芋茎尖时, 顶芽、腋芽或类原胚体 (PLB) 中均长出芋头组培苗。我国对芋头组织培养的研究也有了不少进展。李云玲^[8]研究发现芋头茎尖在 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 培养基中分化率和繁殖系数都较高, 且丛生芽生长较快; MS+NAA 基 0.5 mg/L 的培养基中生长的根系发达、根粗壮, 利于培养种苗及移栽。张培通^[9]等根据脱毒种芋快繁生产实践和多数研究结果, 对芋头脱毒快繁技术的主要流程以及各环节管理操作的量化指标进行了总结, 得出了芋头脱毒快繁技术体系。吴伟等^[10]开展仙居红芋的组培快繁技术和田间生产试验, 得到了较优的增殖培养基和生根培养基配方, 并发现中性土壤中移栽的组培苗培养较成功。

然而, 目前关于芋头愈伤组织培养条件的研究尚少, 所研究的植物激素较单一; 现发表关于芋头细胞悬浮培养的研究成果还鲜少。本研究开展了芋头不同条件下愈伤组织诱导及继

表 1 实验材料表

Table 1 List of Experimental Materials

名称	来源
芋头	市售
琼脂粉	上海伊卡生物技术有限公司
氧化高汞	贵州省铜仁化学试剂厂
MS 培养基	杭州木木生物科技有限公司
6- 苄氨基嘌呤 (6-BA)	杭州木木生物科技有限公司
2,4 二氯苯氧乙酸 (2,4-D)	杭州木木生物科技有限公司
萘乙酸 (NAA)	杭州木木生物科技有限公司
吲哚丁酸 (IBA)	杭州木木生物科技有限公司
蔗糖	西陇化工股份有限公司
高压灭菌锅	重庆雅马拓科技有限公司
电子天平	常州市双洁测试仪器厂
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
电子显微镜	奥特光学仪器有限公司
振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司

代培养实验, 对不同培养条件下的芋头细胞悬浮培养进行了探究。为芋头组培技术研究提供参考及芋头细胞工程研究提供理论支持。

2 材料与方法

2.1 实验材料 本实验所采用的材料见表 1

2.2 芋头愈伤组织的诱导

2.2.1 芋头不同外植体的愈伤组织诱导 以芋头顶芽、腋芽、新生的幼嫩叶片、块茎和须根作为外植体诱导。外植体于流动的清水下冲洗干净, 然后置于 75% 的酒精中消毒 5 min, 再用无菌水冲洗一遍后, 用 0.15% 的升汞消毒 10 min^[11], 接着用无菌水漂洗 3~5 遍, 在超净工作台中切取大约 1 cm² 大小的切块接种在 4.74 g·L⁻¹MS 培养基 + 1 g·L⁻¹6-BA + 0.5 g·L⁻¹2,4-D + 3% 蔗糖 + 1% 琼脂粉的愈伤组织诱导培养基上。置于 25℃、光照下培养, 每隔 1 d 观察芋头不同外植体是否产生愈伤组织并记录愈伤组织形态。

2.2.2 光照条件对愈伤组织继代培养的影响 将大并且健康的愈伤组织切至 0.5 cm², 再放于 4.74 g·L⁻¹MS 培养基 + 1 g·L⁻¹6-BA + 0.5 g·L⁻¹2,4-D + 3% 蔗糖 + 1% 琼脂粉的培养基上进行继代培养。将其分别置于黑暗和 16 h/d、1000 lx 光照下进行培养。设置温度为 25℃, 继代培养 14 d 后, 观察并记录愈伤组织在继代过程中的变化情况。

2.2.3 不同激素对愈伤组织生长的影响 将大并且健康的愈伤组织切至 0.5 cm²。再以 4.74 g·L⁻¹MS 培养基 + 3% 蔗糖 + 1% 琼脂粉为基础培养基, 按照表 2 的植物激素配比配制培养基。培养温度为 25℃, 培养时间为 14 d, 观察芋头愈伤组织形态特点。14 d 后, 在超净工作台中取出愈伤组织, 称取愈伤组织鲜重。

2.2.4 不定芽和不定根的增殖 将腋芽愈伤组织切至 0.5 cm²。再以 4.74 g·L⁻¹MS 培养基 + 3% 蔗糖 + 1% 琼脂粉为基础培养基, 按照表 3 的植物激素配比配制培养基。设置温度为 25℃,

表 2 不同植物激素及浓度组合

Table 2 Different plant hormones and concentration combinations

处理	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	6-BA (mg/L)
1	0.3		1.0
2	0.3		2.0
3	0.3		3.0
4	0.5		1.0
5	0.5		2.0
6	0.5		3.0
7		0.5	1.0
8		1.0	1.0
9		2.0	1.0

观察腋芽愈伤组织产生不定芽和不定根的情况，于 30 d 后计算芋头不定芽增殖系数。

将长至 5 cm 左右的增殖芽在超净工作台
中分离成单株，再接种至生根培养基中，激素
配比如表 3。经过 20 d 的生根培养，观察记录
生根情况并统计不定根增殖系数（不定根增殖
系数 = 不定根数 / 接种的增殖芽数）。

2.3 芋头细胞悬浮培养

2.3.1 不同激素对芋头细胞悬浮培养的影响 在

表 3 不定芽和不定根诱导激素组合

Table 3 Combination of hormones for inducing adventitious buds and adventitious roots

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
1	0.5	0.5
2	1	0.5
3	1.5	0.5
4	0.5	1
5	1	1
6	1.5	1
7	0.5	2
8	1	2
9	1.5	2

培养基体积 70 mL、摇床转速为 100 r·min⁻¹ 和
光照下，在超净工作台中切取 5 g 松脆的愈伤组
织置于液体培养液中，轻微摇晃使其分散。以
4.74 g·L⁻¹MS 培养基 + 3% 蔗糖作为液体培养基
配方，探究如表 4 的激素配比对芋头细胞悬浮
培养的影响。每隔 1 d 观察愈伤组织形态的变化，
培养 14 d 后观察愈伤组织形态特点并称取生物
量鲜重。

2.3.2 不同蔗糖浓度对芋头细胞悬浮培养的影响

表 4 悬浮培养不同植物激素及浓度组合

Table 4 Suspension culture with different plant hormones and concentration combinations

处理	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)
1	1.0	0.5		
2	1.0	1.0		
3	1.0	2.0		
4	2.0	0.5		
5	2.0	1.0		
6	2.0	2.0		
7	1.0		0.5	
8	1.0		1.0	
9	1.0		2.0	
10	1.0			0.5
11	1.0			1.0
12	1.0			2.0

响 在培养基体积 70 mL、摇床转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和光照培养条件下, 在超净工作台中切取 5 g 松脆的愈伤组织置于液体培养液中, 轻微摇晃使其分散。以 $4.74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MS 培养基 + 2,4-D 1 mg/L + 6-BA 2 mg/L 为液体培养基配方, 探究不同蔗糖浓度 (30、35、40、45、50、55、 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对芋头细胞悬浮培养的影响。培养 14 天后测定细胞鲜重。

2.3.3 悬浮细胞动态生长曲线建立 取 5 g 松脆的愈伤组织接入新鲜培养基, 从培养的第 2 天起, 每隔 1 d 取样 1 次, 称取细胞鲜重。横坐标为培养时间, 纵坐标为细胞培养物鲜重, 制作芋头悬浮细胞动态生长曲线。

2.3.4 芋头细胞悬浮系的建立 在培养基体积 70 mL、摇床转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和光照培养条件下, 取 5 g 悬浮培养物接种到液体培养液中。

液体培养基配方为: 4.74 g/L MS 培养基 + 2,4-D 1 mg/L + 6-BA 2 mg/L + 4% 蔗糖, 进行振荡培养, 每隔 16 d 继代一次, 用胶头滴管取培养液滴 2~3 滴于灭菌的培养皿中, 再于显微镜下观察细胞形态。

3 结果与讨论

3.1 芋头不同外植体的愈伤组织发生情况 本实验采用了顶芽、腋芽、新生的幼嫩叶片、块茎、须根五种外植体进行芋头愈伤组织诱导实验。经过 15 天观察发现, 不同外植体诱导出愈伤组织的能力及愈伤组织形态存在差异。幼嫩叶片未形成愈伤组织, 芋头顶芽、腋芽、块茎切片、须根均诱导产生了较明显的愈伤组织, 但愈伤组织形态和颜色各有差异。结果如下: 顶芽形成少量黄绿色愈伤组织并继续生长

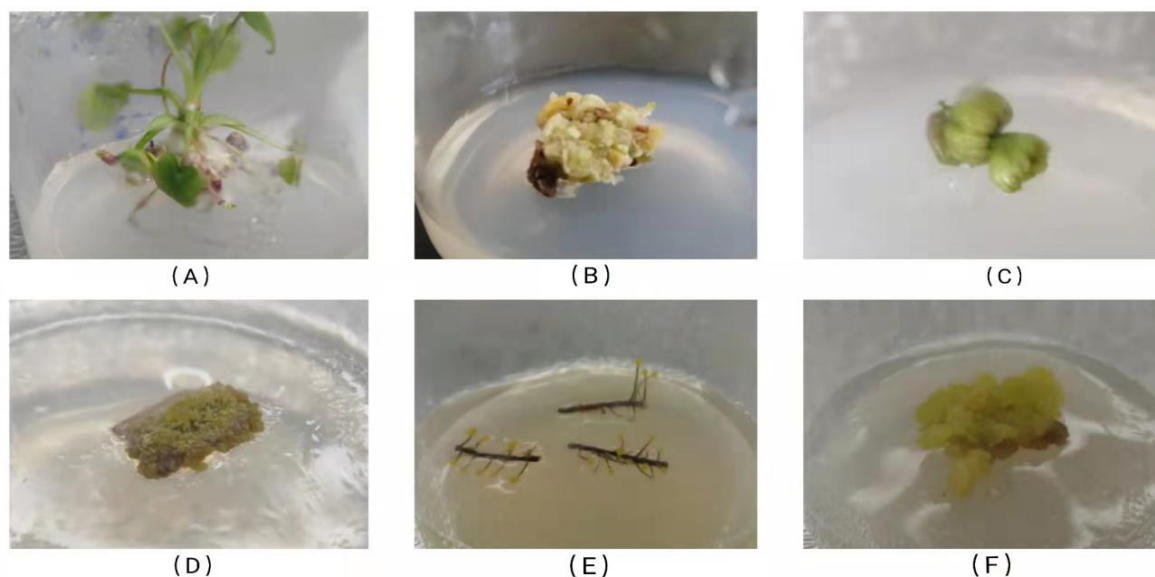


图1 芋头外植体愈伤组织生长情况。A: 顶芽愈伤组织诱导; B: 腋芽愈伤组织诱导; C: 叶片愈伤组织诱导; D: 块茎 15 d 诱导培养长出黄绿色颗粒状愈伤组织; E: 须根愈伤组织诱导; F: 块茎 30 d 诱导培养后形成黄绿色愈伤组织。

Fig. 1 Growth of callus tissue on taro explants. A: Induction of callus tissue from apical buds; B: Induction of callus tissue from axillary buds; C: Induction of callus tissue from leaves; D: Yellow-green granular callus tissue grown from tuber after 15 days of induction culture; E: Induction of callus tissue from fibrous roots; F: Yellow-green callus tissue formed after 30 days of tuber induction culture.

出新的幼嫩叶片并分化出带有白色根毛的不定根；腋芽形成少量白色雪花状愈伤组织并产生蘖芽；块茎切片在切口处形成黄绿色颗粒状愈伤组织；须根根尖形成圆球状黄绿色愈伤组织（如图 1 A-E）。经过 30 天观察发现，大部分以块茎为外植体的愈伤组织生长旺盛，质地较为松脆，含水量较大（如图 1 F）。因此，芋头块茎可作为诱导愈伤组织和进行细胞悬浮培养的理想外植体。

3.2 光照条件对愈伤组织继代培养的影响 观察黑暗和 16 h/d、1000 lx 光照条件下培养 14 d 的芋头块茎愈伤组织，结果发现：两种培养条件下愈伤组织都能继续生长，但是生长率、褐变率有较明显差异（如表 5）。光照条件下的愈伤组织生长较为明显，且褐变率较低。因此，芋头愈伤组织的继代培养宜在光培养下进行。

两种条件下的愈伤组织呈现出不同的状态。愈伤组织在黑暗条件下培养呈黄色并带有褐色，质地较紧实，愈伤组织在继代中生长迟

缓，产生较多褐变（如图 2 左）；愈伤组织在光照条件下培养则呈现黄绿色、质地疏松，在继代中生长较快速（如图 2 右）。因此，选择在光照条件下进行愈伤组织的继代培养。

3.3 不同植物生长激素对愈伤组织生长的影响 不同的激素浓度会影响芋头愈伤组织的继代培养，导致其状态、质地和生长量均表现出一定差异（表 6）。6-BA 浓度愈高长出的愈伤组织愈紧实，添加 IBA 培养的愈伤组织质地紧实，且内部为绿色的不易分散结构，不适合进行细胞悬浮培养。而 NAA 含量较高的组织中生长的愈伤组织呈黄绿色，较为疏松，经过五次继代培养后呈分散性较好的浅黄色颗粒状愈伤组织。因此，根据愈伤组织的颜色、质地及生长量的情况，确定此实验的最佳激素浓度组合为 NAA 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L。

3.4 不定芽和不定根的增殖

3.4.1 不定芽的增殖 将腋芽愈伤组织接种到不同激素配比的培养基中，30 d 后大部分愈伤

表 5 光照条件对愈伤组织形成的影响

Table 5 The influence of light conditions on callus tissue formation

光照条件	接种外植体数量 / 瓶	愈伤组织生长率 / %	褐变率 / %
光照	20	85	5
黑暗	20	65	20



图 2 不同光照条件下愈伤组织的生长情况。左：黑暗条件下愈伤组织继代培养；右：光照条件下愈伤组织继代培养。

Fig. 2 The growth of callus tissue under different lighting conditions. Left: Subculturing of callus tissue under dark conditions; Right: Subculturing of callus tissue under light conditions.

表 6 不同植物激素组合及浓度对愈伤组织的影响

Table 6 The impact of various plant hormone combinations and concentrations on callus tissue

处理	生长调节剂 /mg·L ⁻¹			愈伤组织形态		
	NAA	IBA	6-BA	颜色	质地	生长量 /g
1	0.30		1.00	浅绿色	较疏松	8.78
2	0.30		2.00	浅绿色	较紧实	8.94
3	0.30		3.00	黄绿色	较紧实	9.21
4	0.50		1.00	黄绿色	疏松	9.46
5	0.50		2.00	黄绿色	较疏松	8.93
6	0.50		3.00	绿色	较紧实	9.15
7		0.50	1.00	浅绿色	较紧实	9.43
8		1.00	1.00	绿色	紧实	10.20
9		2.00	1.00	绿色	紧实	9.46

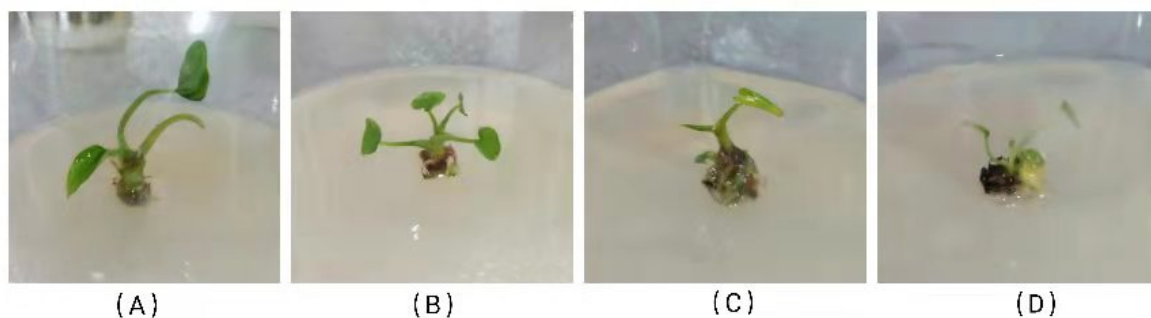


图 3 不同植物激素下不定芽的生长情况。A: 6-BA 1 mg/L+NAA0.5 mg/L; B: 6-BA 1.5 mg/L+NAA1 mg/L; C: 6-BA 0.5 mg/L+NAA2 mg/L; D: 6-BA 1.5 mg/L+NAA2 mg/L。

Fig. 3 The growth of adventitious buds under different plant hormones. A: 6-BA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L; B: 6-BA 1.5 mg/L + NAA 1 mg/L; C: 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2 mg/L; D: 6-BA 1.5 mg/L + NAA 2 mg/L.

组织形成不定芽 (图 3)。不定芽系数随 6-BA 的增加呈现先增后减趋势, 而随着 NAA 的增加出现增长趋势 (表 7)。6-BA 用量达到 1 mg/L, NAA 用量为 0.5 mg/L 时, 不定芽增殖系数最高并且芽伸长明显。培养基中 6-BA 为 0.5 mg/L、1.5 mg/L, NAA 用量达到 2 mg/L 时, 不定芽出现芽弱小、叶片卷曲及轻微玻璃化问题 (图 3C、D)。因此, 可认为 6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 是进行不定芽增殖研究的理想激素组合, 此激素组合下不定芽增殖系数最高, 达到 4.67,

不定芽伸长明显且叶片舒展 (图 3 A)。

3.4.2 不定根的增殖 将生长至 5cm 左右的增殖芽分离成单株, 接种至如表 8 所示的 9 种激素组合的生根培养基中, 经过 20 d 的不定根诱导。通过观察发现, 增殖芽在试验的 9 种生根培养基中都能很好的生根, 不过在不同培养基中生根的效果存在差异 (图 4)。

不定根增殖系数随着 MS 培养基中 6-BA 的用量增加整体上增殖系数表现出下降趋势, 而随着培养基中 NAA 用量的增加表现出先升

表 7 不同植物激素组合及浓度对不定芽的影响

Table 7 The impact of different plant hormone combinations and concentrations on adventitious buds

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	增殖系数	不定芽长势
1	0.50	0.50	3.67	芽正常，叶片舒展
2	1.00	0.50	4.67	芽伸长明显，叶片舒展
3	1.50	0.50	3.33	芽正常，叶片舒展
4	0.50	1.00	3.33	芽正常，叶片舒展
5	1.00	1.00	4.33	芽正常，叶片舒展
6	1.50	1.00	3.67	芽伸长明显，叶片舒展
7	0.50	2.00	2.33	芽正常，叶片卷曲
8	1.00	2.00	3.33	芽正常，叶片舒展
9	1.50	2.00	2.67	芽弱小，轻微玻璃化

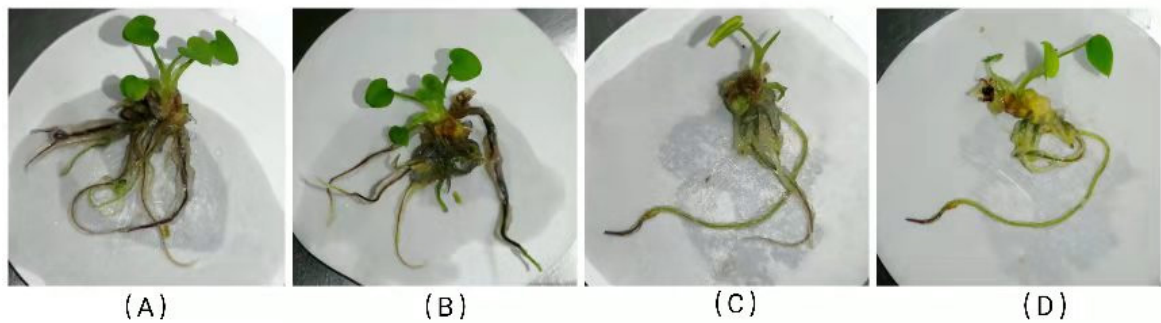


图 4 不同植物激素下不定根的生长情况。A: 6-BA 0.5 mg/L+NAA1 mg/L; B: 6-BA 1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L; C: 6-BA 1.5 mg/L+NAA1 mg/L; D: 6-BA 1.5 mg/L+NAA2 mg/L。

Fig. 4 The growth of adventitious roots under different plant hormones. A: 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1 mg/L; B: 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L; C: 6-BA 1.5 mg/L + NAA 1 mg/L; D: 6-BA 1.5 mg/L + NAA 2 mg/L.

表 8 不同植物激素组合及浓度对不定根的影响

Table 8 The impact of different plant hormone combinations and concentrations on adventitious roots

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	增殖系数	生长情况
1	0.50	0.50	3.67	主根粗壮，侧根数量较多，长势快
2	1.00	0.50	4.33	主根粗壮，侧根数量较多，长势快
3	1.50	0.50	3.33	主根粗壮，侧根数量多，长势慢
4	0.50	1.00	5.33	主根粗壮，侧根数量多，长势快
5	1.00	1.00	4.33	主根粗壮，侧根数量较多，长势快
6	1.50	1.00	4.67	主根粗壮，侧根数量较多，长势快
7	0.50	2.00	4.33	主根较弱，侧根数量多，长势快
8	1.00	2.00	3.33	主根较弱，侧根数量多，长势慢
9	1.50	2.00	3.67	主根较弱，侧根稀疏，长势慢

后降的趋势。培养基中 6-BA 为 0.5 mg/L ~ 1.5 mg/L, NAA 用量达到 2 mg/L 时, 不定根出现主根较弱易断、侧根稀疏及长势慢问题 (图 4C、D)。总体上看, 培养基中添加较低浓度的 NAA 和 6-BA 有利于芋头增殖芽产生不定根, 且当培养基中的激素组合为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L 时, 增殖系数最大, 而且长出的主根粗壮、侧根数量多, 长势快, 有利于缩短生根时间 (图 4 A)。

3.5 芋头细胞悬浮培养

3.5.1 不同激素对芋头细胞悬浮培养的影响 愈伤组织在不同激素配比的液体培养基中培养 14 d 后, 观察发现液体培养基中的生物量鲜重均有所增加, 但生长量存在差异 (表 9)。

不同激素配比下的愈伤组织形态也有所差异。主要出现了鱼雷状、瘤状、白色水渍状、颗粒状四种形态 (图 5)。鱼雷状的愈伤组织生长缓慢, 容易产生褐变, 且生长量较少; 瘤状

表 9 不同植物激素组合及浓度对悬浮培养的影响

Table 9 The impact of different plant hormone combinations and concentrations on suspension culture

处理	生长调节剂 /mg·L ⁻¹				形态	生长量 /g
	6-BA	2,4-D	NAA	IBA		
1	1.00	0.50			颗粒状	9.50
2	1.00	1.00			颗粒状	9.42
3	1.00	2.00			颗粒状	9.75
4	2.00	0.50			颗粒状	9.77
5	2.00	1.00			颗粒状	9.85
6	2.00	2.00			白色水渍状	7.86
7	1.00		0.50		瘤状	9.70
8	1.00		1.00		鱼雷状	8.76
9	1.00		2.00		瘤状	9.65
10	1.00			0.50	鱼雷状	7.77
11	1.00			1.00	瘤状	7.75
12	1.00			2.00	瘤状	9.46

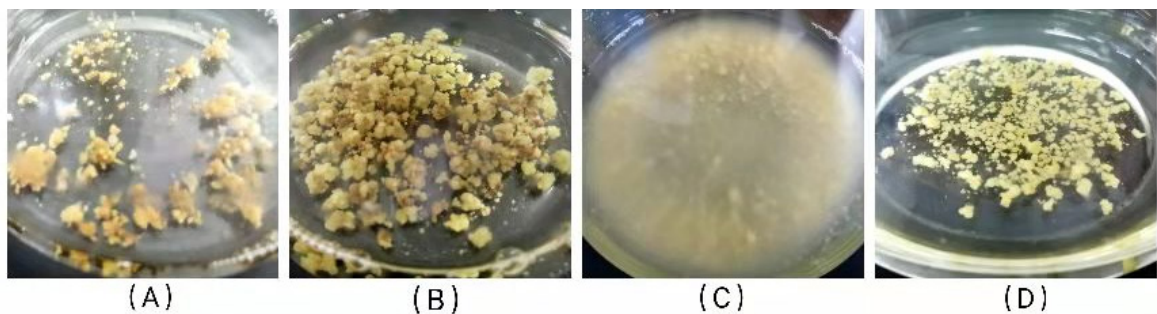


图 5 不同激素组合下愈伤组织的生长情况。A: 6-BA 1 mg/L+NAA1 mg/L; B: 6-BA 1 mg/L+IBA2 mg/L; C: 6-BA 2 mg/L+NAA2 mg/L; D: 6-BA2 mg/L+2,4-D1 mg/L。

Fig. 5 The growth of callus tissue under different hormone combinations. A: 6-BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L; B: 6-BA 1 mg/L + IBA 2 mg/L; C: 6-BA 2 mg/L + NAA 2 mg/L; D: 6-BA 2 mg/L + 2,4-D 1 mg/L.

愈伤组织较容易产生褐变, 生长量多但不易分散; 白色水渍状愈伤组织失去活性, 生长量无明显变化; 颗粒状愈伤组织呈淡黄色, 培养液带有黄绿色, 较容易分散, 且生长量较多, 经三次继代培养后颗粒变小且培养液呈黄色。因此, 选择 6-BA 2 mg/L+2,4-D 1 mg/L 的激素配比进行芋头愈伤组织的细胞悬浮培养。

3.5.2 不同蔗糖浓度对芋头细胞悬浮培养的影响 蔗糖是细胞生长所需要的碳源, 而且具有调节细胞内外渗透压、维持细胞稳定性的作用^[12]。适量添加蔗糖浓度可促进细胞生长, 蔗糖浓度过低不利于细胞生长, 过高则有可能导致细胞失水胀破死亡, 生长量降低。本次实验中, 液体培养基设 30 g/L、35 g/L、40 g/L、45 g/L、50 g/L、55 g/L、60 g/L 7 个处理水平, 初始量为 5 g/L。14 d 培养后发现, 55、60 g/L 产生愈伤组织产生少量褐变, 30、35、40、45、50 g/L 培养液颜色呈淡黄色至黄色, 生长量均有明显增加。结果表明, 培养基中蔗糖浓度为 40 g/L 时, 生长量最大, 为 4.12 g (图 6)。

3.5.3 悬浮细胞动态生长曲线建立 采用激素配比为 2,4-D 1 mg/L+6-BA 2 mg/L、蔗糖浓度为 40 g/L 的液体培养基进行芋头细胞悬浮培

养。结果发现, 细胞生长经历迟滞期、对数生长期、平衡期和衰亡期四个阶段, 芋头悬浮细胞呈“S”型曲线生长趋势 (图 7)。0~6 d 细胞生长量少, 为细胞生长迟滞期; 第 6 天后, 细胞快速生长, 进入对数生长期, 持续时间为 6~16 d; 16 天之后, 细胞鲜重无明显变化, 进入平衡期, 持续时间在 16~20 d; 20 天之后, 细胞鲜重有所下降, 进入衰亡期。在本实验优化条件下, 芋头悬浮培养细胞最大生长量为 5.43 g, 最佳继代周期为 16 d。

3.5.4 继代次数对细胞形态的影响 进行细胞培养时, 细胞液的颜色, 细胞形态、大小和数目会发生变化。为了得到状态稳定的细胞系, 可以通过连续继代来筛选细胞, 并选择状态良好的细胞进行继续培养。本实验在进行第 1、2 次继代后观察细胞悬浮液及细胞, 发现细胞悬浮液为黄绿色或黄色的混浊液体, 并含有许多大颗粒, 在显微镜下观察到细胞大多呈长条形、球形、不规则形 (图 8A、B), 并且细胞成团。3、4 次继代后, 细胞悬浮液呈颗粒分散较均匀的黄色液体, 在显微镜下观察到的分裂细胞团增多, 单细胞数目增多。第 5 次继代后, 细胞悬浮液呈澄清的浅黄色液体, 颗粒分散很均匀,

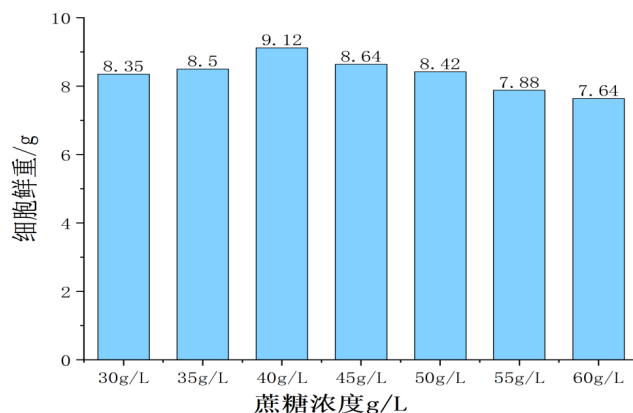


图 6 不同蔗糖浓度下愈伤组织的生长量

Fig. 6 Growth of callus tissue under different sucrose concentrations

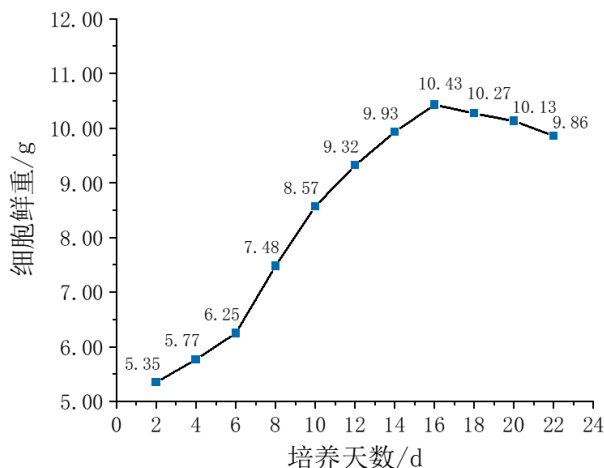


图7 悬浮细胞动态生长曲线

Fig. 7 Dynamic growth curve of suspended cells

在显微镜下观察到呈球形的细胞团和单细胞均变多(图8C、D), 不过单细胞较少, 这可能与细胞聚集成团的特性有关。总体来说: 继代培养过程中, 随着继代次数的增多, 细胞悬浮液由黄色变为浅黄色、由混浊变为澄清, 颗粒分散由不均匀到均匀, 最终在显微镜下观察, 细胞由长条形、球形、不规则形变成球形, 细胞系逐渐趋于稳定。

4 结论

愈伤组织的诱导需要选择合适的外植体, 光照条件、植物生长调节剂对外植体愈伤组织的诱导也存在影响。本实验表明, 虽然利用芋头的顶芽、腋芽、新生的幼嫩叶片、块茎和须根作为外植体均可诱导出愈伤组织, 但本实验中块茎的诱导出愈伤组织的效果显著, 且芋头块茎产生的愈伤组织的颜色、质地较优, 长势也是最好的; 除此之外, 腋芽可诱导出不定

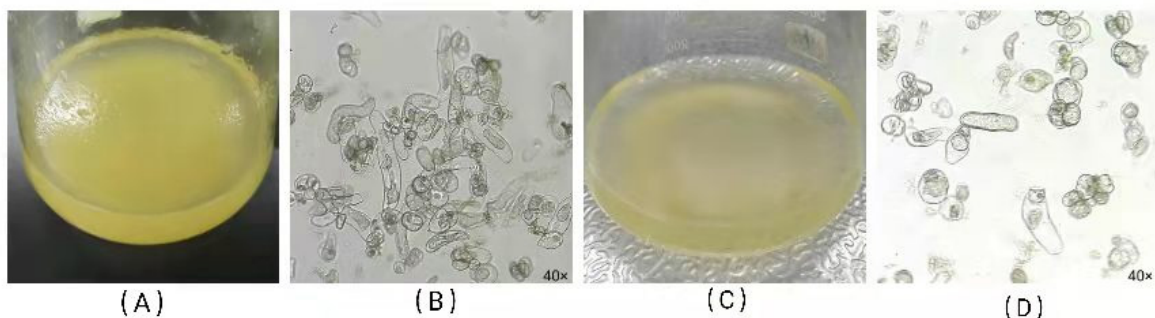


图8 细胞悬浮培养液及镜检图。A: 第2次继代培养后的细胞悬浮培养液; B: 第2次继代培养后的细胞悬浮培养液镜检图(40X); C: 第5次继代培养后的细胞悬浮培养液; D: 第5次继代培养后的细胞悬浮培养液镜检图(40X)。

Fig. 8 Cell suspension culture medium and microscopic examination images. A: Cell suspension culture medium after the second subculture; B: Microscopic examination image (40X) of cell suspension culture medium after the second subculture; C: Cell suspension culture medium after the fifth subculture; D: Microscopic examination image (40X) of cell suspension culture medium after the fifth subculture.

芽、不定根。因此可选择芋头块茎作为继代培养和悬浮培养的优质实验材料,腋芽愈伤组织作为诱导不定芽、不定根的实验材料。

根据实验所得数据可知,在光照条件下继代培养的芋头愈伤组织生长较好,此条件继代培养的黄绿色愈伤组织质地松脆、生长较快。外植体诱导愈伤组织和愈伤组织增殖跟植物生长调节剂的种类、质量及比例相关^[13]。根据实验所得数据分析可知,6-BA 的浓度越高,愈伤组织的质地越紧实。添加 NAA 的培养基上生长的愈伤组织相比添加 IBA 的培养基上生长的愈伤组织较疏松,且有研究表明外植体愈伤组织在添加 NAA 的培养基中能更好地形成,在一定低浓度范围内,形成的愈伤组织质地随 NAA 浓度越高而越好^[14]。而 6-BA 和 IBA、NAA 组合都能促进愈伤组织的生长且生长量无较大差异。

芋头不定芽、不定根诱导和增殖继代过程中,观察发现:6-BA 和 NAA 的浓度配比会影响不定芽、不定根的生长。不定芽和不定根在较高浓度的 6-BA 和 NAA 培养基中增殖效果不好,此结果与郭克婷^[15]的研究结果一致。在不定芽诱导过程中,6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 激素组合中不定芽增殖系数最高,长势最好;6-BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L 激素组合中不定根增殖系数最高,长势最好,且侧根数量多。

进行大规模细胞培养的关键是建立一个稳定的悬浮细胞培养体系,而植物细胞悬浮培养的影响因素较多。激素配比和培养基蔗糖浓度是影响细胞悬浮培养的重要因素^[16],本实验结果表明,6-BA 和 2,4-D 组合培养的愈伤组织多为颗粒状;6-BA 和 NAA、IBA 组合培养的愈伤组织大部分为鱼雷状、瘤状。所以,本实验采用 2,4-D 1 mg/L+6-BA 2 mg/L 的激素配进行芋头愈伤组织的细胞悬浮培养。该条件下悬浮

培养的芋头愈伤组织呈淡黄色颗粒状,质地松脆,适合进行悬浮培养研究。而本实验结果中最适宜愈伤组织继代培养的蔗糖浓度为 40 g/L,与其他文献报道的研究成果相差不大^[17, 18]。由于植物本身特性的差异,其他植物适宜的培养条件不一定适合另一种植物。而悬浮培养的重要影响因素如摇床转速、pH 初始接种量等,对芋头悬浮培养的影响还有待进一步研究。

该实验对芋头愈伤组织诱导的适宜光照条件、激素组合、细胞悬浮培养的激素组合、蔗糖浓度进行了探究,初步摸索出芋头细胞悬浮培养的适宜条件,并建立了悬浮细胞动态生长曲线,发现芋头悬浮细胞符合“S”型曲线生长趋势。希望对芋头快繁培养技术和芋头细胞悬浮培养研究提供理论上的参考。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] 韩笑,张东旭,王磊,等.芋头的营养成分及加工利用研究进展[J].中国果菜,2018,38(03):9-13.
- [2] 李哲斌.芋头多糖提取纯化、结构表征及生物活性研究进展[J].食品与发酵工业,1-8.
- [3] 段文倩,孙河龙,金书情等.芋头对癌症术后康复的食疗研究[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(85):145+155.
- [4] 蒙真铖,苏翠,岳建伟等.芋头栽培技术及组织培养研究进展[J].热带农业科学,2019,39(11):67-71.
- [5] 郑永敏.芋头脱毒快繁与栽培技术[J].安徽农业科学,2006,34(22):5824-5932.
- [6] Yam T W, Ichihashi S, Artiditti J. Callus growth and plantlet regeneration in taro *Colocasia esculenta* var[J]. *Esculenta Schott (Aracea) Annals of Botany*, 1991, 67(4):317-323.
- [7] Sabapathy S, Nair H. In vitro propagation of

- taro with spermine, arginine and ornithine Plant-let regeneration via callus [J]. *Plant Cell Report*, 1995, 14(8): 520-524.
- [8] 李云玲. 白塔芋的组织快速繁殖技术研究 [J]. *北京农业*, 2013(09): 16.
- [9] 张培通, 殷剑美, 王立等. 芋头脱毒快繁技术规程 [J]. *蔬菜*, 2017, 322(10): 39-42.
- [10] 吴伟, 屈为栋, 赵永彬等. 芋脱毒苗快繁技术研究与应用 [J]. *浙江农业科学*, 2018, 59(7): 1159-1161.
- [11] R.M.AKPLOGAN1, G.H.T.CACAÏ1, S.S.HOUED-JISSIN1, V.MÈGNIKPA1, C.AHANHA ZO. Influence of mercuric chloride and sodium hypochlorite on apical and axillary buds regeneration of *Colocasia esculenta* in tissue culture [J]. *American Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2018, 2(10).
- [12] 吴春霞. 植物细胞悬浮培养的影响因素 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(1): 36-38.
- [13] 张义, 刘云利, 刘子森等. 植物生长调节剂的研究及应用进展 [J]. *水生生物学报*, 2021, 45(03): 700-70.
- [14] 张志勇. 六月红早熟芋茎尖脱毒研究初报 [J]. *广东农业科学*, 2008(10): 30-32.
- [15] 郭克婷, 何金明. 张溪香芋茎尖组培快繁技术研究 [J]. *广东农业科学*, 2015, 42 (6): 25-29.
- [16] 彭静, 柯卫东, 刘玉平等. 莲藕的组织培养及其影响因素 [C]. 全国植物组培、脱毒快繁及工厂化生产技术学术研讨会, 2001.
- [17] 陈江山, 胡臣, 冯陈龙等. 莲藕的组织培养研究 [J]. *武汉轻工业大学学报*, 2013(1): 31-34.
- [18] 徐君, 刘凤军, 余旭东等. 苏州荸荠组培快繁技术研究 [J]. *园艺与种苗*, 2011(6): 7-8.