

A Study on the Rapid Propagation Technology of Water-Free Virus Seeds

Piaopiao Chai^{1*}, Changxu Chen^{1*}, Xiaojie Chu¹, Xiaorong Chen², Mengfei Yang², Yipeng Li², Shangfa Zhang², Xiaojun Zha^{1#}

¹College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

²Jinhua Academy of Agricultural Sciences, Jinhua Zhejiang

Email: 15762075548@163.com, #zhaxj2005@163.com

Received: May 1st, 2020; accepted: May 15th, 2020; published: May 22nd, 2020

Abstract

Through the study of the tissue culture of *T. chinensis* explants with different hormone concentration ratios, a suitable system for in vitro regeneration of *T. chinensis* has been established, and it also provides a good test material for artificial inoculation of *T. glutinosa*. In this paper, the shoots of the underground plant and the stem tip of the white seedlings about 40 cm in height were used as explants, and the corresponding biological hormones such as NAA, 6-BA, and KT were added on the basis of the MS culture medium, and some explant pollution was taken. The anti-brown method completes disinfection of explants, induction of buds, proliferation, and selection of plant growth regulators in the rooting medium. Some results have been achieved in cultivating the white virus-free seedlings.

Keywords

Zizania latifolia Turcz, Stem Tip, Tissue Culture

茭白脱毒苗组织快繁技术研究

柴飘飘^{1*}, 陈昶旭^{1*}, 褚晓洁¹, 陈晓荣², 杨梦飞², 李怡鹏², 张尚法², 查笑君^{1#}

¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华

²金华市农业科学研究院, 浙江 金华

Email: 15762075548@163.com, #zhaxj2005@163.com

收稿日期: 2020年5月1日; 录用日期: 2020年5月15日; 发布日期: 2020年5月22日

*共一作者。

#通讯作者。

文章引用: 柴飘飘, 陈昶旭, 褚晓洁, 陈晓荣, 杨梦飞, 李怡鹏, 张尚法, 查笑君. 茭白脱毒苗组织快繁技术研究[J]. 自然科学, 2020, 8(3): 187-195. DOI: 10.12677/ojns.2020.83025

摘要

通过不同生物激素含量和浓度的配比对脱毒茭白外植体组织培养的方法进行研究, 确立了一套安全适宜的茭白离外植体组织再生培养体系, 也为茭白苗人工培育和接种茭白菰黑粉菌提供一个良好的环境和试验材料。本文以茭白脱毒苗植株地下部分的芽和高约40 cm茭白脱毒苗的茎尖为外植体, 在高约40 ms生根培养基的基础上通过添加NAA、6-BA、KT等激素及相应的生物素对外植体进行了诱导, 并在基础上采取了一些外植体组织污染抗褐的方法, 完成了对外植体消毒、芽的诱导、增殖和茭白生根外植体培养基中所含的植物激素和生长环境调节剂的筛选。在人工培育茭白外植体脱毒苗中, 取得了一定的成效。

关键词

茭白, 茎尖, 组织培养

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

茭白(*Zizania latifolia* Turcz.)别称茭瓜、茭笋、高瓜、菰等, 是禾本科菰属(*Zizania Gronov. ex L.*)的植物[1]。在系统发育上, 该属在禾本科中占有一个重要的根系分枝。与李氏禾属(*Leersia*)一样, 菰属也是离禾本科稻属最近的属[2]。目前, 人们已经成功驯化了两个菰属的成员: 一年生沼生菰(*Zizania palustris*), 原产于欧洲和北美, 被人们称为“野生稻”[3]; 以及多年生菰(*Zizania latifolia*), 原产于北美和亚洲, 被人们称为“茭白”[3][4][5]。早在大约2000年前, 茭白就被人们驯化为一种重要的蔬菜和经济作物, 秦朝(公元前207~221年)的第一部汉语词典《尔雅》中就提到了这一点。由于茭白在营养和经济上的重要性[6], 它现在在中国和一些其他的亚洲国家中被广泛种植。

有研究表明, 茭白孕茭与其茎基部内生的肉质茎菰黑粉菌(*Ustilago esculenta*)的侵染互作密切相关[7]。菰黑粉菌的侵染抑制了茎基部的茭白开花并同时刺激了茎基部的膨大从而形成可食用的白茭肉质茎[8]。但若灰茭的菰黑粉菌未成功侵染则过早形成雄茭, 成功侵染的菌丝中灰茭潜育期的缩短则过早侵入形成冬灰茭的孢子, 从而使灰茭成为不能直接食用的灰茭, 植株的生长和分蘖可能趋于迅速衰退[9]。雄茭和灰茭都认为不可以直接食用。由此可知, 茭白黑粉菌也是导致茭白肉质茎膨大的重要因素[10]。然而茭白的孕茭生长机制、形成的机理, 黑粉菌对于单、双季茭肉质茎形成的主要影响, 以及茭白生产上由于黑粉菌形成的雄茭和灰茭的主要原因等诸多问题尚不明确, 这些问题严重地限制了我国茭白优质高产青灰茭栽培的重要性的发展。

如何准确验证接种茭白孕茭和黑粉菌的密切联系, 就是需要人工接种茭白黑粉菌脱毒苗的组织培养及人工的接种黑粉菌脱毒苗来验证完成。水生蔬菜如茭白芋头、莲藕、慈姑和荸荠等的组织培养技术研究报道较多, 而茭白脱毒苗作为一种无性繁殖的水生植物, 关于其黑粉菌的再生发育体系的培养技术研究报道较少[10]。在这些组织培养研究中, 基本研究都是以黑粉菌胚芽作为外植体, 附加75%的酒精和次氯酸钠对黑粉菌进行外植体的消毒, 芋头和莲藕中添加2,4-D和TDZ形成的愈伤组织[11][12]。茭白的愈伤组织中的诱导培养基添加了2,4-D、IAA、VB1和谷胱酰胺[13]。1.0 mg/L IAA + 1.0 mg/L 6-BA 适宜

外源激素诱导原球茎出芽,这两种茭白外源激素的联合使用与王怀利[14]外源激素诱导的茭白原球茎相同,但外源激素浓度稍高。王怀利等[15]茭白原球茎侧分生组织外源激素诱导原球茎出芽,所用的外源激素诱导原球茎培养基的配方如下:MS + IAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + VB1 4 mg/L + KT 1 mg/L + 0.1%的活性炭。茭白的茎侧芽分生组织诱导接种在该分生组织诱导的培养基上,经30 d左右的培养,分生组织的生长点在其颜色逐渐变绿,顶部膨大,60 d以后,在其顶部逐渐产生嫩绿的原球茎。但是还有许多的地方有待专家进一步完善,如活性炭的吸附机理是完全没有任何选择性的,在外植体内吸附酚、醌的同时也可能会直接吸附体内的营养代谢物质和生长激素,影响外植体的正常发育和生长[16];生长素 IAA在黑粉菌的体内很容易经过新陈代谢而被营养物质破坏,所以黑粉菌在外施时的效果短暂[17]。而且,在这些黑粉菌的研究中,基本采用的是以未发育孕茭的雄茭黑粉菌作为组织培养的外植体培养材料,尚未充分体现黑粉菌在茭白体内的正常生长状态的密切关系,因此我们需要探究以正常茭作为外植体材料培育脱毒苗的组织培养技术。

植株遗传再生培养体系中主要培养目的之一就是增殖,丛生芽增殖的2,4-D和TDZ是用于芋头丛生芽增殖和外植体培养的主要两种外源激素,6-BA和NAA是用于慈姑、莲藕和荸荠丛生芽增殖的主要两种外源激素[18]。不同的外植体组织和部位丛生芽增殖的培养方式不同,采用薄层的培养对外植体产生的再生芽增殖进行有效的增殖,增殖的系数一般为4左右[19]。外植体薄层的培养(micro cross section)是将外植体横切成大约1 mm厚的薄片进行培养,香蕉和马铃薯植株进行这种薄片的培养,这样能够有效地诱导大量的丛生植株发芽,薄层培养是优良的农杆菌转化受体,横切面的培养期间伤口较大,增大了植株转化的几率。在这种薄片的培养期间进行农杆菌遗传侵染,建立了一种简便、高效的农杆菌遗传转化植株再生体系,也就是建立了一种简便、高效的遗传转化体系[10]。

生根和驯化是检验再生体系成功与否的关键阶段,NAA的主要作用就是促进根和不定根的形成,使用0.5 mg/L NAA可成功诱导生根,而组培苗从适宜生长的无菌条件转入大田种植需要一个过渡阶段来提高成活率,即驯化。茭白组织培养再生体系的初步研究为今后研究茭白孕茭提供有效方法以及通过茭白脱毒培育不同品种雄茭,同时也可根据不同类型黑粉菌接种培育茭白新品种奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

试验材料取自金华市农科院。以“浙茭911”为材料诱导茭白茎尖分化。

2.2. 试验方法

2.2.1. 外植体的制备

在大田养殖场采集整株的茭白,保湿晾干后带回实验室,以茭白茎尖和植株地下部分的嫩芽(如图1(A))为外植体,剥去茭白表面包被着的叶片,剥取茭白的茎尖,滴入酒精后加一滴中性洗洁精,用流水冲洗30 min,移至大田的超净台,以下的操作均在超净实验台中进行:先用75%的酒精将外植体浸泡1 min;然后用无菌水将外植体清洗一遍;再用15%的次氯酸钠 + 0.1%吐温-80的溶液中无菌水消毒30 min;然后再用无菌水将外植体清洗2~3次,置于无菌水的滤纸上充分地吸干外植体的水分;最后采取0.5~1 cm的外植体将茭白茎尖接种于MS培养基上进行诱导。

消毒溶液及时间处理

采用75%的加热酒精溶液消毒2~3次(10 min),无菌水清洗2次,结合不同的浓度吐温-80和消毒药剂溶液和使用的时间(15 min、20 min、30 min)。每个处理30个外植体左右,一周后记录污染率和褐化率。

2.2.2. 培养基的制备和培养条件

采用 MS 固体培养基进行培养, 并在 MS 固体培养基中加入蔗糖 30 g/l 作碳源, 加入 2.5 g/l 植物凝胶作固化剂。根据不同的培养发育阶段的植物芽发育和生长状态, 分别通过添加不同培养浓度的 NAA、6-BA、KT 共同培养诱导不定芽和根的生长分化。培养的容器用 250 ml 的三角瓶, 培养室温度控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度为 2000~3000 lx, 光照时间为 16 h/d。为解决茭白茎尖组培过程中褐化问题, 设了以下四种培养基:

预培养培养基: MS 基础培养基, PH = 5.8~6.2, 预培养 2~3 天;

分化培养基: MS + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 6-BA + 0.5 mg/l KT, PH = 5.8~6.2, 一周左右再转接一次;

分化继代培养基: MS + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 6-BA + 1 mg/l KT, PH = 5.8~6.2;

生根壮苗的常用培养基: 1/2 MS + 0.5 mg/l NAA, PH = 5.8~6.22。

3. 结果与分析

3.1. 消毒溶液及时间对芽污染率和褐化率的影响

由以下表 1 可清楚得知, 不同的外植体运用不同的的消毒方法进行消毒, 不同的消毒溶液浓度和不同的外植体消毒的持续时间分别对外和内植体进行了多次消毒, 结果从中可以明显发现(表 1), 次氯酸钠消毒溶液需要消毒的药物浓度不能过低或过高, 消毒的持续时间短或长, 均达不到良好的污染率和消毒杀菌效果, 而且由于外植体的发芽组织幼嫩, 使用过高的次氯酸钠溶液的消毒会使得发芽组织软化发黄、无法正常生长。而 15% NaClO + 0.1% 吐温-80 和 15% NaClO 的消毒组合可以使外植体达到较好的污染率和消毒杀菌效果, 显著地降低了外植体的污染率和内植体的褐化率。以各品种消毒持续时间一般为 15 min 的消毒效果最佳, 污染率一般为 56%, 褐化率为 0.3%。因此, 在外植体进行消毒的过程中, 要通过多次实验, 选择合适的消毒试剂浓度及时间, 以达到最佳效果[20]。

Table 1. Effect of disinfection solution and time on bud pollution rate and browning rate

表 1. 消毒溶液及时间对芽污染率和褐化率的影响

消毒溶液	消毒时间(min)	芽污染率(%)	褐化率(%)
30% NaClO	20	100	0
15% NaClO + 0.1% 吐温-80 或 15% NaClO	各 15	56	0.3
30% NaClO + 0.1% 吐温-80	20	83.3	50
30% NaClO + 0.1% 吐温-80	30	30.4	43.5

3.2. 茎尖分生组织诱导分化成芽

在诱导茭白茎尖分化成芽的过程中, 通过多次实验, 选择合适的激素配比, 以达到最佳效果。先选用茭白诱导用培养基: MS + 0.5 mg/L NAA 0.5 + 0.5 mg /L 6-BA + 0.5 mg /L KT (表 2), 茭白茎侧芽分生组织接种在茭白诱导用培养基上, 经 5~6 d 左右的培养, 分生组织侧芽生长点的颜色逐渐变绿, 顶部膨大(如图 1(B)), 20 d 左右, 不定芽分化较壮, 这组的生芽率高达 37.5% (表 2)。

3.3. 不定芽的分化和继代培养

在继代培养中, 通过多次实验, 选择合适的激素配比, 选择生芽率最高的一组, 分化继代培养基为 MS + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 6-BA + 1 mg/l KT (表 2), 待植株生长较为健壮转至一个继代生根培养基。30 d 左右生根茭白植株的基部有根生出(如图 1(C)), 生芽率高达 50% (表 2)。在原球茎的增殖和生根发芽

的分化与生根茭白培养中,激动素对种类和含量的变化起着十分重要的抑制作用[14]。生根培养方法是将茭白诱导成功的不定芽的基础上,将不定芽接种在一个继代生根分化培养基上,15 d左右,在原球茎上形成一株完整的植株。

3.4. 茭白生根壮苗培养

当茎尖接种苗萌发至2 cm左右时,将新芽茎尖的小苗接种到带激素的1/2 MS + 0.5 mg/l NAA(表2)生根壮苗的培养基中(如图1(D))。最后用一层封口膜将培养基密封,放置于25℃培养箱,光照充足即可培养。已接种的小苗经15 d左右的光照培养,长出3~5条根,植株较壮,即可移植大棚。

Table 2. The effect of different hormone ratios on the germination rate and rooting rate in the differentiation medium
表 2. 分化培养基中不同激素配比对于生芽率和生根率的影响

分化培养基配方	生芽率(%)	生根率(%)
MS + 1 mg/l IAA + 1 mg/l 6-BA	45.5%	0
MS + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 6-BA + 0.5 mg/l KT	37.5%	0
MS + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 6-BA + 1 mg/l KT	50%	80%
MS + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 6-BA + 1 mg/l KT + 0.1%活性碳	50%	80%
MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l 6-BA	/	/

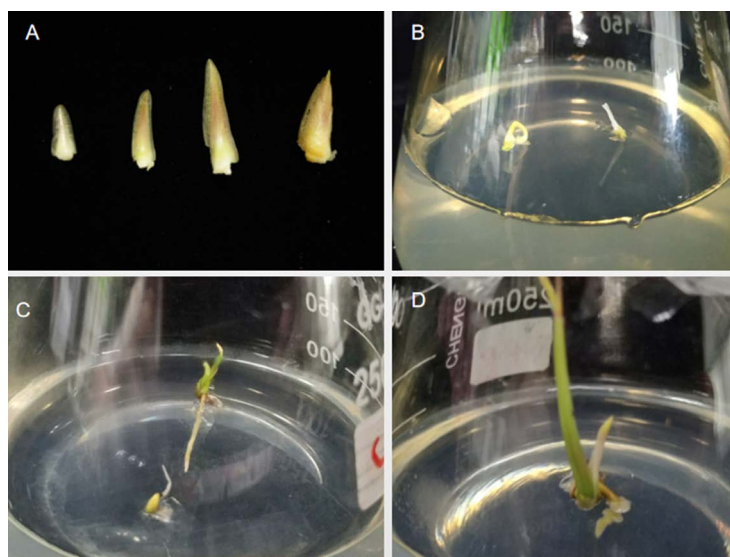


Figure 1. The process of tissue culture differentiation of *Zizania* sp. (A) Underground part of buds of wild rice plants; (B) Differentiation of buds of underground rice plants; (C) Underground bud rooting; (D) Rooting strong seedlings

图 1. 茭白茎尖组培分化的过程。(A) 茭白植株地下部分芽; (B) 茭白地下芽分化; (C) 地下芽生根; (D) 生根壮苗

4. 讨论

目前,茭白的种植主要是采用茭墩分离筛选的种植方式,繁殖的系数相对较低,速度慢,种质遗传资源少,同时茭白繁殖的过程中种质受影响也有季节的局限。因此在生产上茭白若连续两年不进行选种,雄茭和灰茭的繁殖发生率将达30%左右,严重影响到当地农民的生产和经济效益[21]。因此开展茭白组培快繁的试验,对于保存茭白种质遗传资源和促进茭白育种,加速和推广茭白种植均质化具有十分重要的科学研究意义。其中,茎尖培养快繁试验是对获得无菌茭白培养物很有效的一种方法。由于目前茭白

外植体在初代或再分化和继代茭白培养的过程中存在十分严重褐化的现象,导致外植体材料大量的死亡,所以给茭白脱分化和再分化的种植带来了严重的影响。很多的研究者都认为茭白植物组培苗的褐化一直是茭白植物组培技术快速进步和发展的一大瓶颈其中,茎尖培养苗褐化是对获得无菌培养物很有效的一种方法。茭白外植体初代或者后继代幼苗在培养的过程中褐化十分严重,导致培养材料大量的死亡,从而对于茭白外植体的第一次脱分化和再次脱分化的发展带来了严重的影响,成为了制约茭白植物组培技术快速进步和发展的一个重要瓶颈[22],是茭白组培常见的难题之一。很多的研究者都认为茭白植物组培苗的褐化一直是当前决定茭白植物组培成功与否的一个重要关键因素,其与对菌类的污染和玻璃化被并称为茭白植物组织培养的三大常见的难题[23]。因此,如何有效减轻茭白植物组培苗褐化的程度及其发生已经逐渐成为当前我国茭白组培技术发展过程中一个亟待解决的关键性问题。

组培种苗褐化的问题解决与否一直是影响和决定水生植物茭白组培成功与否的一个关键因素。因此,如何有效解决茭白组培苗的褐化已经发展成为当前水生植物茭白组培苗种植过程中一个亟待解决的基础性问题。

在直接到组培苗开发生产的过程中,常常可能会使种植者遇到一些实际的环境问题,比如大量的组培苗木材被污染、玻璃化苗、褐化苗等,影响直接到组培苗的生产质量和组培苗生产量,而给组培苗的生产经营单位和种植者带来直接或间接的社会经济损失[20]。

4.1. 外植体污染

组培工作中,常出现的问题还有培养室工作台内环境的污染和培养室内人为的污染。定期对工作台和培养室环境进行清洁和消毒,检查超净环境和工作台的洁净度,及时发现并措施有效解决空气污染问题,减少对产品工作室及周围环境的直接污染,严格的产品灭菌处理消毒操作程序,熟练的员工操作各种灭菌消毒技巧,杜绝了各种细菌的频繁入侵,避免人为污染。除此之外,外植体污染主要分外植体外部污染和外植体内部污染。

不同植物来源的健康茎培养作为材料(由于植物的种类、外植体的类型及繁殖茎的大小),其需要选择的材料和消毒处理方式不同,污染率也可能会有所的不同。长期种植于培养室或大田土壤中的茭白外植体比长期种植在其他培养室的中更容易受到细菌污染,因此,在培养室中选取健康的试验培养材料时,应该尽量选择外植体表面较干净且无任何伤口的健康茎为试验材料。对于不同的外植体培养表面,应需要选择不同的植体消毒剂和其灭菌的时间。

选择的植物杀菌剂和溶液的灭菌效果时间既要能尽可能彻底完全杀死外植体表面的所有微生物,又要尽可能不直接伤害其他植物的组织和外植体表层的细胞为宜。目前常用的植物杀菌剂主要有:乙醇、次氯酸盐、 HgCl_2 和双氧水等,通常几种杀菌药液可以配合选择和使用,以达到加强其灭菌的效果[20]。与次氯酸钠相比, HgCl_2 具有良好的杀菌效果剧毒,0.1% HgCl_2 溶液 1 min 即可有效杀菌并且有抑制植物组培褐化的效果[10],但剧毒,购买药品受制且人工操作具有较大安全隐患,故本实验中选择了 75%乙醇 10 min 和 15%次氯酸钠 30 min 配合使用作为杀菌剂,也有较好的杀菌效果,但褐化防治效果不佳。

内部环境污染主要是由茭白组织内部环境中存在的一些微生物受到细菌感染引起的,包括病毒、类病毒、细菌等。它们的侵染可以认为是长期潜伏的,茎尖培养也可以是对获得无菌的培养物很有效的一种培养方法[20]。由于内生的茭白孕茭与其内生的茭白菰黑粉菌(*Ustilago esculenta*)的侵染互作密切相关[7],丁小余研究结果发现黑粉菌一直都是在茭白植株体内直接存在,只是冬天的茭白有时候以菌丝的形式直接存在于茭白体内,到第二年春天才开始生长,并非外界直接侵入的细菌所致[24]。因此在做茭白茎尖组培时选材和对材料的处理尤为重要,本试验以茭白植株地下部分芽和高约 40 cm 茭白苗茎尖为外植体,剥取茭白茎尖时尽量分离肉质茎。

4.2. 褐化现象

褐化污染是指, 在某一种植物的组培细胞分化过程中, 在细胞脱分化或再分化的过程中, 切取芽时的伤口激活组织中的多酚氧化酶, 将多酚氧化成棕褐色醌类物质, 导致外植体的切口发生褐变, 产生可见的茶色、褐色或黑色, 称为“酚氧化物污染”[25]。醌类物质将直接渗透到外植物的培养基中, 导致内植物的培养基褐化, 这将严重直接影响培养物的正常生长和细胞分化, 甚至直接导致培养物的死亡。

褐化的现象主要由于白色多酚氧化酶(PPO)能够催化植物中的多酚化合物与培养基发生氧化反应引起的, 生成的棕褐色多酚醌类物质逐渐地渗透到外植体的培养基中将会有效地抑制其他氧化酶的活性, 并且会起到对外植体细胞产生毒害的作用。引起外植体褐变的因素复杂。就内因而讲, 外植体的生理状态、基因型、同一基因型的不同品种栽培的条件、营养状况、生长的部位和其大小等等都会直接影响植株褐变[26], 同时 Bonga [11]也认为外植体越小, 切面与其体积的伤害程度比率越大, 褐变的伤害程度就越大; 就植株外因而言, 培养基的各种成分、外加激素的含量及比例、培养的条件(接受温度、光照的时间、光照强度、通气的状况等)等也都会直接影响植株褐变的同时发生, 褐变的同时发生往往也是多种因素同时作用的影响及结果[27]。研究实验结果表明, 1/3 MS 培养基由于抑制雄性褐变的大量发生使其效果明显好于 1/2 MS 和 MS 的培养基, 同时由于抑制雄性褐变的大量持续发生还明显地直接受益于培养基中某些雄性激素的受体含量的影响, 比如较高浓度的 6-BA 和 KT 含量可直接有效促进抑制褐变的大量持续发生[28]。

在腰果和培养基中同时加入一种适宜浓度的专一性抗氧化剂或专一性吸附辅助剂, 这样可以有效地防止腰果的褐变。由于聚乙烯二甲基吡咯烷酮(PVP)同时是对酚类物质的专一性有效吸附辅助剂, 在生化置备中常用来当作酚类专一性物质和对细胞器的保护辅助剂, 可以广泛应用于有效防止细胞器的褐变[29]。但也同时有研究报道这些吸附辅助剂有时对腰果有一定的副作用, 如腰果中的活性炭(AC)和 PVP 可以直接使得腰果的组织培养物发生坏死[16]。腰果中的活性炭也被认为能有效地吸附腰果培养基中的专一性激素和酚类物质, 影响腰果茎尖的组织分化和生长。

故本研究中, 在继续进行茭白的茎尖组织培养时, MS 茎尖组织培养基中(含 6-BA 和 KT)不选择在球茎中加入任何抗氧化剂, 选择先对球茎进行预培养(注意即培养在以球茎为基础的培养基中) 2~3 天(如果球茎的分泌物多, 如利用花魔芋的方法对球茎进行组织培养时, 适当地延长预培养的时间并多次地更换培养基), 再重新培养或种植到已经添加了激素的茭白组织培养基上。不断重复一次地(每隔 1~2 d)将基本的培养物重新转移或种植到新鲜的培养基上, 以彻底摆脱老培养基中褐色物质的不利生长影响。

4.3. 茭白的组织培养研究现状与展望

菰(*Zizania latifolia*)驯化成茭白是由于真菌内生菌黑粉菌(*Ustilago esculenta*)的持续侵染, 导致茭白可食性茎干膨大, 开花损失减少[30]。近 2000 年来, 由于可食性内生菌黑粉菌无性繁殖造成的开花损失一直迫使茭白通过根茎无性繁殖方式产, 而受黑粉菌影响的茭白根茎无性繁殖方式一直是茭白农业生产的唯一正常繁殖途径。在田间, 茭白有正常的茭白、灰茭及雄茭三种无性繁殖表型, 这三种无性繁殖表型与黑粉菌在正常茭白体内的正常生长和繁殖状态密切相关[21]。本文的培养实验主要通过茭白的茎尖组织培养人工培育脱毒茭白幼苗, 为人工培养接种黑粉菌的茭白提供一个良好的农业生产试验环境和材料, 以期茭白找到一种人为的控制茭白孕茭的有效方法, 减少茭白农业生产中雄茭、灰茭两种植株的正常繁殖数量, 为其生产高产、优质的茭白提供了一个更加快捷、有效的农业生产方法。

植物生长激素是植物代谢反应的主要产物, 同时又对其的生长发育仍然起着重要的生理调控性和抑制作用[31]。早在 2005 年, 王怀利[14]等人就经过大量的试验和分析, 探究出一种适合于茭白组织培养的诱导性茭白培养基。但其研究和试验的过程, 还有许多的地方和技术有待进行进一步完善, 要使茭白的生产技术步入一条产业化发展之路, 还是有待进一步的研究。近期, 在 2018 年杨峰[20]等在对茭白

离体再生体系的探究中, 茭白侧芽愈伤组织的诱导激素组合配比的最佳激素组合为 NAA 1 mg/L + 6-BA 1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L, 各激素对茭白侧芽愈伤组织诱导的作用和效果分别是 NAA > 6-BA > 2,4-D。虽然我们在该试验中也表明茭白有较高的愈伤组织诱导分化效率, 但是从侧芽愈伤的诱导组织分化成愈伤, 再由愈伤的诱导组织分化成愈伤苗的整个过程, 繁殖的速度较慢, 而且在该试验的过程中, 愈伤的组织侧芽褐化的现象严重, 其形成原因很有可能也就是愈伤的组织培养基生长过快, 未能及时更换愈伤的培养基, 从而直接导致了培养基中离体营养供应的不足和培养基所产生的代谢物大量积累, 使愈伤的组织逐渐出现侧芽褐化[32]。此外, 激素也会直接影响材料的褐变, 2,4-D, NAA 和 IAA 等不会直接引起愈伤组织细胞的褐化。在对茭白离体再生诱导体系的侧芽诱导探究中, 茭白愈伤和侧芽组织诱导分化的最佳组合是激素与侧芽配比的组合最佳组合激素为 6-BA 2 mg/L + NAA 1 mg/L + KT 0.1 mg/L, 各侧芽诱导激素间对茭白愈伤和侧芽组织诱导分化的作用和影响最佳组合是 6-BA > NAA > KT。细胞分裂素 6-BA 或 KIN 能够有效地使材料中的 PPO 活性坏死细胞提高, 在 MS 培养基上材料添加适量的 6-BA、ZT、NAA 上材料培养, 戴维逊棉可以取得新的细胞再生植株, 而在 MS 和 2,4-D, ZT, NAA 上材料培养 14 d, 全部材料褐变死亡[29]。

在茭白科植物的组织培养的过程中, 外源组织培养激素的工作是其中一个不可缺少的一种组织培养物质, 是如何影响茭白组织培养激素再生效率的一个重要的因素[21]。本试验也充分证明了 NAA、6-BA 和 KT 三种组织培养激素可以通过合理的配比和使用可以有效诱导和促进茭白茎尖的分化、生根。本试验研究中, 通过对茭白的组织培养的研究, 找出了适宜的诱导、增殖、生根快繁培养基, 通过综合利用茭白科植物组织培养的方法可以解决茭白目前的生长繁殖系数低、种质资源少、繁殖的过程中组织培养受环境和季节的局限等问题。虽然本试验获得了一定的进展, 但是目前茭白要真正的实现茭白工厂标准化的育苗与生产, 还仍然需要更加深入的科学研究。

基金项目

2018 全国大学生创新创业训练项目(201810345020), 国家特色蔬菜产业技术体系(CARS-24-A-13)。

参考文献

- [1] Xu, X., Walters, C., Antolin, M.F., *et al.* (2010) Phylogeny and Biogeography of the Eastern Asian-North American Disjunct Wild-Rice Genus (*Zizania* L., Poaceae). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, **55**, 1008-1017. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.018>
- [2] Kellogg, E.A. (2009) The Evolutionary History of Ehrhartoideae, Oryzaceae, and *Oryza*. *Rice*, **2**, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s12284-009-9022-2>
- [3] Hayes, P.M., Stucker, R.E. and Wandrey, G.G. (1989) The Domestication of American Wildrice. *Economic Botany*, **43**, 203-214. <https://doi.org/10.1007/BF02859862>
- [4] Guo, H.B., Li, S.M., Peng, J., *et al.* (2007) *Zizania latifolia* Turcz. Cultivated in China. *Genetic Resources & Crop Evolution*, **54**, 1211-1217. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9102-8>
- [5] Xu, X.W., Ke, W.-D., Yu, X.-P., *et al.* (2008) A Preliminary Study on Population Genetic Structure and Phylogeography of the Wild and Cultivated *Zizania latifolia* (Poaceae) Based on *Adh1a* Sequences. *Theoretical & Applied Genetics*, **116**, 835-843. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0717-3>
- [6] Feldbrgge, M., Kellner, R. and Schipper, K. (2013) The Biotechnological Use and Potential of Plant Pathogenic Smut Fungi. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **97**, 3253-3265. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4777-1>
- [7] Yang, H.C. (1978) Formation and Histopathology of Galls Induced by *Ustilago esculenta* in *Zizania latifolia*. *Phytopathology*, **68**, 1572-1576. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-1572>
- [8] You, W., Liu, Q., Zou, K., *et al.* (2011) Morphological and Molecular Differences in Two Strains of *Ustilago esculenta*. *Current Microbiology*, **62**, 44-54. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9673-7>
- [9] Zhang, J.Z., Chu, F.Q., Guo, D.P., *et al.* (2014) The Vacuoles Containing Multivesicular Bodies: A New Observation in Interaction between *Ustilago esculenta* and *Zizania latifolia*. *European Journal of Plant Pathology*, **138**, 79-91. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0303-7>

- [10] 耿园. 茭白黑粉菌人工接种雄茭技术体系的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [11] Deo, P.C., Harding, R.M., Taylor, M., *et al.* (2009) Somatic Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration in Taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, **99**, 61-71. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9576-0>
- [12] Deo, P.C., Taylor, M., Harding, R.M., *et al.* (2010) Initiation of Embryogenic Cell Suspensions of Taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and Plant Regeneration. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, **100**, 283-291. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9648-1>
- [13] 李帅, 崔海峰, 金晔, 等. 茭白愈伤组织诱导及基因组多态性分析[J]. 长江蔬菜, 2015(22): 84-88.
- [14] 王怀利, 褚志, 李子. 茭白的组织培养技术初探[J]. 种子, 2005, 24(9): 90-91.
- [15] Xin, W., Xie, W., Ma, X., *et al.* (1996) Studies on Introduction of Arrowhead Proteinase Inhibitor Gene into *N. tobacco* Protoplasts. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, **1**, 267-271. <https://doi.org/10.1007/BF02901241>
- [16] 刘杰, 张玉星, 董祯. 梨组培褐化及抗褐措施研究进展[J]. 河北林果研究, 2008, 23(2): 195-199.
- [17] 周莎莎, 王刚正, 罗义, 等. 生长素及其类似物增强香菇耐高温性的研究[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 171-178.
- [18] May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., *et al.* (1995) Generation of Transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants via Agrobacterium-Mediated Transformation. *Nature Biotechnology*, **13**, 486-492. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-486>
- [19] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 水稻纹枯病菌人工接种方法的研究[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2003, 2(3): 224-227.
- [20] 杨峰. 茭白离体再生体系的建立及菰黑粉菌注射接种的探讨[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [21] 邵龙珠, 赵淑君, 王淑荣, 等. 植物组织培养中的常见问题与解决技术措施[J]. 林业勘查设计, 2012(1): 49-51.
- [22] 汤浩茹. 用 8-羟基喹啉硫酸盐防止梨、苹果外植体褐变[J]. 果树学报, 1998(2): 112-115.
- [23] 冯代弟, 王燕, 陈剑平. 植物组培褐化发生机制的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(6): 1108-1116.
- [24] 丁小余, 陈维培. 茭白分蘖苗端的结构及发育研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1991(2): 60-68.
- [25] 崔继梅, 梁艳丽, 谢世清. 魔芋组培快繁中常见的几个问题及对策[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 96-98.
- [26] 于守超, 赵兰勇, 王芬, 等. 植物组织培养过程中外植体褐变机理研究进展[J]. 山东林业科技, 2004(5): 61-63.
- [27] 陈蕾, 曹后男, 宗成文, 等. 降低苹果梨组培过程中外植体褐化的研究[J]. 北方园艺, 2008(10): 139-142.
- [28] 刘兰英. “薄壳香”核桃组培中的褐化及防止措施研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 171-172.
- [29] 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78-84.
- [30] Yu, Y. (1962) Study on the Materials Secreted by *Ustilago esculenta* P. Henn. in *Zizania latifolia*. *Acta Botanica Sinica*, **4**, 339-350.
- [31] 张强. 茭白肉质茎膨大期间生理生化特性研究[D]: [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2004.
- [32] 陆振, 夏镇澳. 戴维逊棉的组织培养与原生质体培养研究[J]. 植物学报, 1991(2): 98-103.