

大野芋种子形成丛生芽的微繁殖*

龙春林¹, 程治英¹, 蔡秀珍^{1,2}

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 湖南师范大学生命科学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 大野芋 (*Colocasia gigantea*) 的成熟种子 (褐色) 和未成熟的种子 (淡黄色) 在 1/2MS 培养基上均能萌发, 种子萌发率最高达 50%, 种子没有休眠期。在室温下, 种子在 1/4MS + 1% 蔗糖培养基上, 寿命约可达 1 年。种子在 MS + BA2 mg·L⁻¹ + IAA0.25 mg·L⁻¹ 的培养基上, 产生丛生芽。增值率 1:4/60 d。生根培养基为 MS + NAA0.3 mg·L⁻¹, 生根率达 95% 以上。通过诱导大野芋种子产生丛生芽, 建成了快繁无性系, 并成功地实现了种子的离体保存。本研究工作的完成, 对于芋头的这一野生近缘种的保存和利用、芋头品种的改良, 均具有较大意义。

关键词: 大野芋; 丛生芽; 微繁殖; 种子

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)03-0327-04

Micropropagation of *Colocasia gigantea* by Crowded Buds from Seeds

LONG Chun-Lin¹, CHENG Zhi-Ying¹, CAI Xiu-Zhen^{1,2}

(1 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2 College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The mature seeds (brown) and immature seeds (light yellow) of *Colocasia gigantea* started to germinate after they were grown on 1/2MS media for 30 days. The germination rate was up to 50%. There is not dormancy behavior in gigantean seeds. The longevity of seeds could be almost one year if they were stored on 1/4MS + 1% sugar media. The seed and seedlings with height of 1 cm could produce bud cluster on the media of MS + BA2 mg·L⁻¹ + IAA0.25 mg·L⁻¹, and the proliferation rate could be 1:4/60 d. The media for rooting was MS + NAA0.3 mg·L⁻¹, and the rooting rate could be over 95%. The successful induction of bud clusters *in vitro* from seeds would be valuable in *Colocasia* breeding and cultivation, and selection of fine clone of *C. gigantea*, and exploration, utilization and protection of *C. gigantea* resources.

Key words: *Colocasia gigantea*; Crowded buds; Micropropagation; Seeds

大野芋 (*Colocasia gigantea* Hook. f.), 又名水芋、山野芋、滴水芋、抬板蕉、抬板七、大芋荷等, 为天南星科 (Araceae) 芋属多年生草本植物, 分布于云南南部和东南部, 生于海拔 100~1 100 m 的沟谷密林或石灰岩下湿地或林下石缝中 (吴征镒和李恒, 1979)。大野芋具

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30170102)、云南省自然科学基金 (2001C0058M)、中国科学院 (KSCX2-SW-117)

收稿日期: 2004-07-09, 2004-10-25 接受发表

作者简介: 龙春林 (1964-) 男, 湖南人, 理学博士, 研究员, 主要从事植物资源学和生物多样性研究。

丛生的长圆状心形叶，叶色碧绿。被长而粗壮的淡绿色叶柄盾状撑起，叶柄具白粉，株型十分优美，不经改造即可作为观赏植物加以开发；其叶做猪饲料；叶柄可做蔬菜；其根茎入药（李延辉等，1996），有解毒、消肿、祛痰、镇痛之功效，但仅局限在少数民族地区使用。

国内开展过大野芋细胞学、分类鉴定（吴征镒和李恒，1979；曹利民和龙春林，2004）及花粉形态工作（杨雪等，2003）；国外的大野芋种间杂交减数分裂染色体行为的研究（Okada 等，1989），解释了芋属中三倍体的来源；运用叶绿体 DNA 序列分析方法，探讨了大野芋和芋属其它种的进化关系（Makoto 等，1999）；Nyman 等（1987，1986）及 Stranss 等（1979）对芋头 *C. esculenta* 和野芋 *C. esculenta* var. *antiquorum* 的种子胚进行过形态和生理等方面的研究。但是，大野芋种子产生丛生芽的微繁殖，至今在国内外尚未见报道。

大野芋利用种子进行的快速繁殖，不仅有利于大野芋种质资源的离体保存，而且有利于芋头这一作物的品种改良和育种。大野芋长期生长在温暖潮湿地区，据我们初步观察，其种子不适宜在干燥和低温条件下保存。浆果成熟 1~2 d 便腐烂、发霉变质。其内种子易感染杂菌造成活力下降或丧失，大野芋种子的离体培养成功能解决种子保存问题，而且保持了种子的变异性，为选择提供更多的材料。但是大野芋这一种质并不是在各个分布地或某一分布地年年开花结果，所以至今无人利用种子。目前，各地种植的芋头，以高产优质为选择标准，造成栽培品种单一，一旦病害发生，该作物将毁于一旦。我们以食用芋近缘野生近缘种大野芋为研究对象，探讨了其种子产生丛生芽的过程，用每 1 粒种子建成了一个无性系。该项工作对扩大芋的遗传基础，进行芋头品种改良和种质创新具有较大意义。大野芋是无性繁殖作物，与其它种群之间的遗传物质交换甚少，有性繁殖将有助于大野芋遗传物质的交换，保持其遗传多样性。若将它与食用芋进行生物技术育种，将对提高食用芋生长量、抗逆性等有效。我们所做种子再生植株的技术是育种获得成功的前提。

1 材料和方法

1.1 材料 大野芋种子

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 适时采收的大野芋橘黄色浆果，在水中挤出种子，去掉杂质和上浮的种子，清洗干净后，过 70% 乙醇，用 0.2% HgCl_2 液消毒 20 min，无菌水冲洗 4~5 次，每次 5 min，用干燥的无菌滤纸吸干种子表面的水分待接种。

1.2.2 培养条件 种子萌发培养基为①1/2MS；丛芽诱导和培养基为②MS + BA2 (mg/L, 单位下同) + IAA0.25，试管苗生根培养基为③MS + NAA0.3。糖浓度①、③为 2%，②为 3%，培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照强度 2 000 lx，光照时间 12 h/d，培养基用琼脂固化，pH 5.8。种子萌发试验每处理接种数为 100 粒，3 次重复。

1.2.3 种植练苗基质 消毒过的腐叶土与珍珠岩 (2:1) 混合。

2 结果

2.1 大野芋在昆明的生长发育特性

大野芋在昆明地区（中国科学院昆明植物研究所内）11~3 月间，有部分叶呈现枯倒伏，根茎以休眠方式度过低温时期。4 月初，大野芋出新叶，以后叶片不断增加，至每株 5~6 叶现花苞。花期为 4~9 月，每个佛焰花序寿命 7 d 左右。花后 3~4 个月浆果成熟。最适浆果采收期短（2~3 d）。否则长而软果柄因果重难以支撑而倒伏在地，被动物（如

鼠类等)取食或腐烂霉变,致使种子失去活力。

2.2 大野芋种子萌发与保存

大野芋饱满的种子近纺锤形,长2 mm,宽1.5 mm,种子表面呈褐色。种子顶尖有一小黑点,可与芋属其它种相区别。在光学显微镜下,大野芋种子结构包括种皮、胚乳和胚。胚较小,包含有胚芽、胚轴、胚根和一个未发育的子叶。种子在培养基①上,吸胀后30 d左右种子萌发,首先下胚轴伸长,顶出二裂状的单子叶,然后下胚轴基部出现根。这表明大野芋种子没有休眠期。随着培养时间延长约60 d,种子萌发率可达50%,第一片长心形真叶生长,在离体培养条件下,种子苗每月长叶约1片。当种子苗高约5~6 cm,4~5片叶,根系健壮时,可用以移植。培养中发现,未熟的淡黄色种子(指极核受精后发育的胚乳处于游离核时期,用支撑物夹住,徒手切片时为水状物)和成熟的褐色种子(胚乳形成了细胞结构,且充满整个胚囊)在培养基①上,能正常发育。种子大小在宽1 mm和长1.5 mm以下的在培养基上未能萌发。

为了筛选种子萌发培养基最适的无机盐浓度,我们设计MS+2%蔗糖,1/2MS+2%蔗糖和1/4MS+2%蔗糖3种培养基,种子在MS+2%蔗糖和1/2MS+2%蔗糖培养基上培养1个月,种子萌发率分别达到10%和30%,培养39 d,两种培养基上的种子萌发率均达到50%,而1/4MS+2%蔗糖培养基上的种子,培养56 d仅个别萌发。为了提高1/4MS培养基上种子的萌发率,我们又设计了光和暗两种处理(其它的培养条件相同)。培养60 d后,光下培养种子个别萌发,而暗处理下种子萌发率达5%。这说明培养基无机盐浓度过低不利于种子萌发,暗培养能提高种子萌发率。

种子离体保存,我们采用降低无机盐浓度和碳源的方式,即用1/4MS+1%蔗糖培养基,保存种子255~400 d,转接到培养基①上,种子又恢复萌发能力。

2.3 丛生芽的诱导

将高度为1 cm以下的种子苗转移到培养基②上,30~50 d后,在试管苗基部膨大处或叶柄处形成丛芽。每苗可产生10多个不定芽,同时在基部形成淡黄绿色致密的颗粒状愈伤组织,或坚实的块状愈伤组织,其上能形成不定芽丛。丛芽分化率高达80%以上。这些丛芽块可切割、断代,达到增殖的目的。增值率为1:3~4/60 d。值得注意的是培养基上使用高剂量的细胞分裂素(BA5~8、KT5和Zip15)对丛芽分化不利,表现为分化丛芽所需培养时间的延长,平均为40 d以上。分化率仅为25%~30%,每株产生丛生芽数为2~3芽,极少能达到10个不定芽。另外高剂量细胞分裂素的使用,使大野芋的生长受抑制,还产生畸形根,如大野芋根尖膨大为白色、直径0.3 cm左右的小球,或根系呈球状或块状生长,体积达0.3~1 cm³。

种子直接接种在培养基②上,10 d左右种子膨大,呈现白色状物,约30 d形成淡黄绿色致密的颗粒状愈伤组织,可切割继代增殖。这种致密、绿色颗粒状愈伤组织经过约1个月培养出现丛芽(5芽左右/粒),丛芽分化率约66%(表1),产生了丛芽的组织块可切割继代,增殖率为1:4/60 d。

2.4 生根培养

丛生试管芽达到2 cm高时,可切割为单芽,接种到培养基③上,约15 d生根,形成完整试管苗。生根率95%以上。

表 1 植物激素对大野芋种子产生丛生芽的影响

Table 1 Effect of hormones on crowded buds from seeds

培养基 (mg·L ⁻¹)	苗次产生丛生芽所需天数 (d)	每粒种子产生丛生芽数	丛芽分化率 (%)
MS + BA5 + NAA5	153	单芽	0
MS + BA5 + NAA0.5	73	2~3 芽	25
MS + BA8 + NAA0.5	153	1~2 芽	5
MS + BA2 + NAA0.2	107	2~3 芽	10
MS + BA2 + IAA0.25	65	5 芽左右	66
MS + KT5	153	单芽	0
MS + Zip15 + IAA1	153	单芽	0

状况, 加强管理、通风和补水。移出后 30 d 便可用粗放大田管理模式。移活率 95% 以上。

2.5 移栽

当试管苗高 5 cm 左右, 4 片叶和根 3 条以上, 根长 1~2 cm, 揭去封口膜, 用镊子轻轻地将植株取出, 注意不要伤及根和叶片, 用水洗净根部黏附的培养基, 将根放入杀菌剂中浸泡 5 min, 栽到已准备好的基质上, 浇透定根水, 注意保湿, 避免阳光直射。注意观察苗

3 讨论

大野芋每个果内含种子量多达 3 400 粒左右, 但由于花粉量的不足或花粉不萌发, 导致受精失败 (将另文报道), 所得饱满种子量不足种子总数的一半。发育不完全的种子, 大小为 1 mm × 1.5 mm, 在培养基上不萌发。包含在浆果内种子成熟采收时间极短 (2~3 d), 采收不及时会造成种子活力丧失, 再加上大野芋从种子萌发到幼苗期生长缓慢, 这给种子繁殖带来一定难度。大野芋主要靠无性繁殖, 繁殖速度慢。大野芋种子不休眠, 可随采随播。室温下, 在离体培养的条件下, 种子寿命可达 1 年左右。大野芋种子丛生芽的诱导比芋属其它种 (如异色芋 *Colocasia heterophyllum* 和李氏香芋 *C. lihengiae* 等) 容易, 这可能与它们的生理年龄幼化有关。诱导丛生芽最适培养基为 MS + BA2 + IAA0.25。值得注意的是: 大野芋种子苗高度在 1 cm 时, 诱导丛生芽产生比高度在 2~5 cm 的试管苗更容易。种子长成种子苗用于定植, 整个周期约需 4 个月。种子形成丛生芽到定植需 4~5 个月。快繁无性系建成后, 整个繁殖周期需 3~4 个月。

〔参 考 文 献〕

- 李延辉, 裴盛基, 许再富, 1996. 西双版纳高等植物名录 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 524
- 吴征镒, 李恒, 1979. 云南植物志 [M]. 北京: 科学出版社, Vol. 2: 775—780
- Cao LM (曹利民), Long CL (龙春林), 2004. Chromosome numbers of eight *Colocasia* taxa and karyotypes of five species occurring in China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26 (3): 310—316
- Nyman LP, Webb E, Gu Z, et al, 1986. Structure and in vitro growth of zygotic embryos of Taro (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) [J]. *Annals of Botany*, 57: 623—630
- Nyman LP, Webb E, Gu Z, et al, 1987. Effects of growth regulators and glutamine on in vitro development of zygotic embryos of taro (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) [J]. *Annals of Botany*, 59: 517—523
- Okada H, Hambali GG, 1989. Chromosome behaviors in meiosis of the inter-specific hybrids *Colocasia esculenta* (L.) Schott and *C. gigantea* Hook. f [J]. *Cytologia*, 54: 389—393
- Strass MS, Michand JD, Arditto J, 1979. Seed storage and germination and seedling proliferation in taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott [J]. *Annals of Botany*, 43: 603—612
- Tahara M, Suefiji S, Ochiai T, et al, 1999. Phylogenetic relationships of taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott and related taxa by non-coding chloroplast DNA sequence Analysis [J]. *Aroideana*, 22: 79—88
- Yang X (杨雪), Wang H (王红), Long CL (龙春林), 2003. Pollen morphology of the genus *Colocasia* (Araceae) from China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 25 (5): 603—608