



# 基于间歇浸没式生物反应器的荔浦芋 组培快繁体系优化

董伟清, 何芳练, 江文, 高美萍, 杨柳, 李小泉, 蒋慧萍, 黄诗宇, 韦绍龙\*

(广西农业科学院 生物技术研究所, 南宁 530007)

**摘要:**【目的】优化基于间歇浸没式生物反应器系统(TIBs)的荔浦芋组培快繁体系,为荔浦芋脱毒组培苗的工厂化、自动化生产提供技术支持。【方法】以荔浦芋新品种桂芋2号茎尖分生组织脱毒诱导获得的不定芽为外植体,利用TIBs培养系统筛选出适合组培苗增殖及生根的最佳激素组合,并分析不同继代材料、接种密度及浸没间歇频率对组培苗增殖和生根效果的影响。【结果】利用TIBs培养系统可有效提高荔浦芋组培苗的增殖效果,增殖倍数达28.96倍,约是传统固体培养方法(2.87倍)的10倍,且组培苗的株高和生根数均极显著高于传统固体培养植株( $P<0.01$ )。在TIBs培养系统中,含4.00 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.05 mg/L 萘乙酸(NAA)的培养基最适合荔浦芋组培苗增殖和生长,其组培苗增殖倍数为32.04倍。当接种材料为第4代荔浦芋继代材料、接种密度为10株/L、浸没间歇频率为5 min/6 h时,最有利于组培苗增殖和生长,增殖倍数均在30.00倍以上,可缩短萌芽时间,组培苗长势良好,且培养基污染率为0。【结论】利用TIBs培养系统对荔浦芋继代材料进行高效快繁具有可行性,可为实现及推动荔浦芋健康种苗繁育的工厂化生产提供技术支持。

**关键词:** 荔浦芋; 组培快繁; 间歇浸没式生物反应器系统(TIBs); 体系优化

中图分类号: S632.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2018)06-1164-07

## Optimization of Lipu taro tissue culture rapid propagation in temporary immersion bioreactors system

DONG Wei-qing, HE Fang-lian, JIANG Wen, GAO Mei-ping, YANG Liu,  
LI Xiao-quan, JIANG Hui-ping, HUANG Shi-yu, WEI Shao-long\*

(Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract:**【Objective】The rapid propagation system of Lipu taro was optimized by using temporary immersion bioreactors system (TIBs) in order to provide technical supports for industrialized and automated production of its virus-free plantlets. 【Method】The adventitious buds induced by meristem of Lipu taro variety Guiyu 2 was used as explants, the suitable hormone combination for multiplication and rooting of adventitious buds was screened by using TIBs, and the effects of different subculture materials, inoculated densities and intermittent frequencies of TIBs on the multiplication and rooting were analyzed. 【Result】In TIBs, the multiplication effect of Lipu taro plantlets was enhanced effectively, and the multiplication rate of buds reached 28.96 times, which was as 10 times as that of traditional solid culture (2.87 times); and both of plantlet height and rooting number of induced plantlets were extremely higher than those of traditional solid culture ( $P<0.01$ ). The hormone combination of 4.00 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA added in culture medium was the best for multiplication and growth of Lipu taro plantlets in TIBs, and the multiplication rate of plantlet reached 32.04 times. When the 4<sup>th</sup> sub-cultured plantlet was used as explants, 10 plantlets per liter of inoculation densities and 5 min per 6 hours of immersion frequency were found to be the best for growth and multiplication of plantlets, the multiplication rate reached more than 30.00 times, and could shorten the germination of plantlets with well growth vigor in TIBs, and the contamination rate of culture medium was 0. 【Conclusion】The results showed that it is of highly practicable to use TIBs for rapid propagation of Lipu taro sub-culture plantlets, this will provide important technical supports for implementing and promoting large-scale industrialized production of Lipu taro healthy seedling propagation.

**Key words:** Lipu taro; rapid propagation; temporary immersion bioreactors system(TIBs); system optimization

收稿日期: 2018-04-02

基金项目: 国家现代农业(特色蔬菜)产业技术体系建设项目(CARS-24-G-17); 广西创新驱动发展专项项目(桂科AA17204046-3); 广西荔浦芋试验站建设项目(桂TS201413)

作者简介: \*为通讯作者, 韦绍龙(1964-), 研究员, 主要从事热带特色作物组织培养研究工作, E-mail: weishaolong@gxass.net. 董伟清(1981-), 主要从事芋种质资源及育种研究工作, E-mail: dwq5899@126.com

## 0 引言

【研究意义】芋(*Colocasia esculenta* L.)又名芋艿、芋头或毛芋,是天南星科芋属中能形成地下球茎的栽培种,是一种重要的蔬菜和药用植物,在我国具有悠久的栽培历史,已被列为我国14种重点发展的特色蔬菜(中国农业科学院蔬菜花卉研究所,2010)。芋还是迄今发现耐盐性最强的蔬菜作物,长期栽培可降低土壤的盐渍化程度,对滩涂的开发利用具有重要意义。广西是芋的主产区之一,以盛产荔浦芋而闻名,根据园艺学分类,荔浦芋为魁芋类粗魁芋副型槟榔芋品种群,其芋肉有红丝,肉质细腻、松软、香粉糯,具有特殊风味,是国家地理标志产品之一(江发茂和欧利,2016;覃自由等,2017)。芋的常规栽培是以球茎为种,每公顷用种量1500~2250 kg,不仅耗费大量商品芋,还需要解决芋种的越冬问题。此外,由于忽视种源提纯复壮工作,荔浦芋品质已出现严重退化,其抗病抗逆性能及产量品质明显下降。随着荔浦芋产业的快速发展,荔浦芋脱毒组培苗的需求量迅速增长,传统的固体培养基组培方式已难以实现大规模生产。因此,亟需建立高效快速的荔浦芋组培快繁体系以满足生产上对荔浦芋脱毒种苗的需求。【前人研究进展】目前,国内关于芋的组织培养已有大量研究报道,主要包括茎尖脱毒、提纯复壮及快繁技术(崔瑾,2002;张志勇等,2008)。其中,采用传统固体培养基培养茎顶生长点附近的芽(顶芽、腋芽),使之大量分蘖繁殖并诱导生根,形成完整植株,既可保持品种的优良品质,又能节约用种成本(韩晓勇等,2014;殷剑美等,2015;张培通等,2017)。间歇浸没式生物反应器系统(Temporary immersion bioreactors system, TIBs)是一种在无菌环境下将组培材料在培养液中进行周期性浸泡培养的快繁方式,可使组培材料获得最大的增殖倍数(Etienne and Berthouly, 2002;杨柳等,2010b)。这种培养方式的优点是可刺激和促进组培苗对营养元素和激素的吸收,同时因培养介质的间歇及连续振动能有效保障液体培养基中氧气充足,从而更有利于提高组培苗的增殖效率(Mehrotra et al., 2007)。由于TIBs简化了部分培养环节,减少了人工操作过程,降低了生产成本,因此,国内外利用其进行组织快繁研究的植物种类越来越多,如马铃薯(Xuan et al., 2003)、苹果(Zhu et al., 2005)、香蕉(Ikram-ul-Haq and Dahot, 2007;杨柳等,2010a)、甘蔗(Bernal et al., 2008;Mordocco et al., 2009)、草莓(张乔丽等,2014)等均已有关报道。【本研究切入点】传统的组织培养方法是

一种劳动密集型技术,生产成本低,不利于产业扩大,因此,基于液体培养基的流动特性,采用自动化、机械化方法进行组织培养以扩大生产规模及提供优质种苗已成为研究热点,但至今尚无应用TIBs进行荔浦芋组培快繁的相关研究报道。【拟解决的关键问题】以荔浦芋新品种桂芋2号茎尖分生组织脱毒诱导获得的不定芽为外植体,利用TIBs进行组培快繁研究,并优化相关技术体系参数,以期为荔浦芋脱毒组培苗的工厂化、自动化生产提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以广西农业科学院生物技术研究所选育的桂芋2号茎尖分生组织脱毒诱导不定芽为外植体材料。参照Lorenzo等(2001)的设计路线建立基于TIBs的荔浦芋组培快繁体系,其中,培养瓶和储液瓶为容积3.0 L的广口白色玻璃瓶(瓶高30.0 cm,直径15.0 cm),储液瓶中的液体培养基体积为1.0 L,培养基配置完成后,整套装置采用湿热灭菌法进行灭菌后备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 传统固体培养方法与TIBs培养方法比较 传统固体培养方法的增殖培养基为MS+3.00 mg/L 6-苊氨基嘌呤(6-BA)+0.05 mg/L萘乙酸(NAA)+30.00 g/L蔗糖,生根培养基为MS+0.30 mg/L NAA+0.40 mg/L吲哚乙酸(IBA)+30.00 g/L蔗糖。TIBs培养系统参数设置参照Lorenzo等(2001)的方法,接种密度10株/L,浸没间歇频率(浸没/间歇)5 min/6 h。TIBs培养系统继代增殖培养30 d,传统固体培养方法每18 d继代1次。比较不同培养方法对组培苗增殖倍数、株高及生根数等指标的影响。

1.2.2 不同激素组合对荔浦芋TIBs组培快繁效果的影响 选用传统固体培养基培养的第4代荔浦芋组培苗为材料,接种密度10株/L, TIBs培养系统浸没间歇频率为5 min/6 h,6-BA质量浓度分别为2.00、3.00、4.00和5.00 mg/L, NAA质量浓度分别为0.05和0.10 mg/L,比较不同激素组合对组培苗增殖倍数、株高及叶片数等指标的影响。

1.2.3 不同继代不定芽对荔浦芋TIBs组培快繁效果的影响 选用传统固体培养基培养的第1~8代荔浦芋组培苗为材料,增殖培养基为MS+4.00 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+30.00 g/L蔗糖, TIBs培养系统浸没间歇频率为5 min/6 h,接种密度10株/L,比较不同继代材料(不定芽)对组培苗增殖倍数、萌芽时间、株高及叶片数等指标的影响。

1.2.4 不同接种密度对荔浦芋TIBs组培快繁效果的影响 选用传统固体培养方法培养的第4代荔浦芋组培苗为材料,增殖培养基配方及TIBs培养系统浸没间歇频率参数同1.2.3,接种密度分别设为5、10、15、20和25株/L,比较不同接种密度对组培苗增殖倍数、株高、萌芽时间、叶片数及污染率等指标的影响。

1.2.5 不同浸没间歇频率对荔浦芋TIBs组培快繁效果的影响 选用传统固体培养方法培养的第4代荔浦芋组培苗为材料,接种密度及增殖培养基同1.2.3,TIBs培养系统浸没间歇频率按浸没5 min后分别间歇1、3、6、12和24 h,比较分析不同浸没间歇频率对组培苗增殖倍数、株高、萌芽时间、叶片数及污染率等指标的影响。

以上各试验每处理均设8套TIBs培养系统,重复3次。继代增殖培养条件:温度(28±1)℃,光照强度1500 lx,光照周期为光照12 h/黑暗12 h;生根培养条件:温度(28±1)℃,光照强度1500 lx,光照周期为

光照14 h/黑暗10 h。

### 1.3 统计分析

试验数据采用SPSS 18.0的SNK法进行统计及多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 荔浦芋TIBs组培快繁效果

以荔浦芋茎尖分生组织脱毒诱导处理获得的第4代不定芽为材料,利用TIBs培养系统(图1)及传统固体培养方法进行组织快繁培养,结果(表1)显示,采用TIBs培养系统培养获得的荔浦芋组培苗增殖倍数达28.96倍,约是传统固体培养方法(2.87倍)的10倍,二者差异极显著( $P<0.01$ ,下同);TIBs培养系统培养获得的组培苗株高达16.47 cm,比传统固体培养获得的组培苗高8.24 cm;此外,TIBs培养系统培养获得的组培生根苗健壮(图1-D),生根数也极显著高于传统固体培养植株。



图 1 TIBs培养系统培养获得的荔浦芋组培苗

Fig.1 Lipu taro tissue culture seedlings by TIBs system

A: 接种1 d的组培苗;B: 接种10 d的组培苗;C: 接种20 d的组培苗;D: TIBs培养获得的生根苗

A: Tissue culture seedlings inoculated for 1 d; B: Tissue culture seedlings inoculated for 10 d; C: Tissue culture seedlings inoculated for 20 d; D: The rooted plantlet cultivated in TIBs culture system

表 1 传统固体培养与TIBs培养荔浦芋组培苗的比较

Table 1 Comparison on tissue culture seedlings of Lipu taro between traditional tissue culture method and TIBs system

培养方式 Cultured method	增殖倍数 Multiplication times	株高(cm) Plantlet height	生根数 Rooting number
传统固体培养 Traditional solid culture	2.87±0.33	8.23±0.37	7.56±0.71
TIBs培养系统 TIBs system	28.96±1.15**	16.47±0.55**	18.89±0.28**

\*\*表示不同培养方式间差异极显著( $P<0.01$ )

\*\* represented extremely significant difference between the different culture methods( $P<0.01$ )

### 2.2 不同激素组合对荔浦芋TIBs组培苗的影响

利用TIBs培养系统进行荔浦芋组培快繁时,培养基中添加适宜的激素组合对组培苗的增殖和生长起重要作用。由表2可知,当NAA质量浓度固定为

0.05或0.10 mg/L时,随6-BA质量浓度的增加,组培苗的增殖倍数和株高均呈增加趋势,但其叶片数无明显变化,各处理组间差异均不显著( $P>0.05$ ,下同)。其中,6-BA为5.00 mg/L、NAA为0.05 mg/L时,

组培苗的增殖倍数达36.94倍,显著高于其他组合( $P<0.05$ ,下同);而在NAA为0.10 mg/L处理中组培苗的增殖倍数显著小于0.05 mg/L处理。当培养基中的NAA为0.05 mg/L、6-BA为5.00 mg/L时,组培苗的株高最高,为15.30 cm,显著高于除NAA 0.10 mg/L、6-BA 5.00 mg/L处理外的其他组合。此外,研究发现当6-BA质量浓度达5.00 mg/L时,虽然组培苗的增

殖倍数及株高均有明显提高,但其植株较细、长势较其他处理浓度差,可能与6-BA质量浓度过高有关。因此,综合考虑荔浦芋组培苗的变异率,保证植株质量的同时不影响组培苗增殖,荔浦芋TIBs培养系统中以添加4.00 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA的组培快繁效果最优。

表 2 不同激素组合对荔浦芋TIBs组培苗的影响

Table 2 Effects of different hormone combinations on Lipu taro tissue culture seedlings in TIBs system

处理 Treatment	激素浓度(mg/L) Hormone concentration		增殖倍数 Multiplication times	株高(cm) Plantlet height	叶片数 Number of leaves
	6-BA	NAA			
1	2.00	0.05	22.82±0.80e	10.24±0.40e	7.00±0.84ab
2	3.00	0.05	27.96±1.35c	10.31±0.32de	7.22±0.65ab
3	4.00	0.05	32.04±1.14b	11.51±0.25b	7.61±0.70a
4	5.00	0.05	36.94±1.39a	15.30±0.28a	7.22±0.73ab
5	2.00	0.10	17.41±0.89g	10.33±0.25de	6.83±1.04ab
6	3.00	0.10	19.59±1.47f	10.53±0.24cd	6.72±0.83b
7	4.00	0.10	24.81±1.43d	10.72±0.32c	6.94±0.99ab
8	5.00	0.10	31.78±1.57b	15.26±0.31a	6.89±0.83ab

同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。表3~表5同

Different lowercase letters in the same column represented significant difference( $P<0.05$ ). The same was applied in Table 3-Table 5

### 2.3 不同继代材料对荔浦芋TIBs组培苗的影响

由表3可知,在以TIBs培养系统进行荔浦芋组培苗快速繁殖的过程中,不同荔浦芋组培继代材料对组培苗增殖和生长的影响存在明显差异。以第1~2代荔浦芋组培苗为接种材料时,其增殖倍数在10.00倍左右;第3~7代组培苗的增殖倍数均显著高于第1~2代;组培苗继代数不同对荔浦芋TIBs组培苗

的萌芽时间、株高、叶片数的影响也存在明显差异,综合3项指标,以第4代组培苗为材料时的组培快繁效果较优。在污染率方面,第1~5代组培苗的污染率均为零,而第6和7代组培苗的污染率分别为16.29%和18.61%。因此,在保证荔浦芋组培苗有足够材料且不影响其增殖的情况下,宜选择第4代组培苗作为TIBs培养系统的继代材料。

表 3 不同继代材料对荔浦芋TIBs组培苗的影响

Table 3 Effects of different subcultured materials on Lipu taro tissue culture seedlings in TIBs system

继代数 Subculture number	增殖倍数 Multiplication times	萌芽时间(d) Germination time	株高(cm) Plantlet height	叶片数 Number of leaves	污染率(%) Pollution rate
1	9.79±0.38g	3.77±0.22cd	10.18±0.29d	7.06±0.73c	0c
2	10.37±0.56f	3.94±0.30c	10.46±0.16c	7.11±0.68bc	0c
3	31.59±0.66e	3.69±0.34d	11.57±0.19b	7.56±0.92abc	0c
4	32.67±0.57d	3.68±0.13d	11.78±0.27a	7.50±0.92abc	0c
5	35.26±0.94b	4.17±0.37b	12.02±0.38a	7.83±0.79ab	0c
6	36.29±0.85a	4.61±0.24a	11.86±0.35a	7.89±0.83a	16.29±0.74b
7	34.51±1.10c	4.60±0.19a	11.94±0.34a	7.78±0.73abc	18.61±0.67a

### 2.4 不同接种密度对荔浦芋TIBs组培苗的影响

由表4可知,荔浦芋组培苗增殖倍数随接种密度的增加呈先增加后减少的变化趋势,其中以接种密度为10和15株/L时的增殖效果最佳,对应的增殖倍数分别为32.17和32.86倍。组培苗的萌芽时间整体上随接种密度的增加呈缩短趋势,接种密度为5株/L时的萌芽时间(6.23 d)显著长于其他接种密度;而接种密度为15~25株/L的萌芽时间差异不显著。不同接种密度对荔浦芋组培苗株高及叶片数的影响不显著,但随接种密度的增加,培养基污染率呈递增

趋势,接种密度为25株/L时的污染率高达36.54%。因此,综合考虑组培苗的增殖倍数、生长情况及其污染风险,确定以10株/L的接种密度最适宜。

### 2.5 不同浸没间歇频率对荔浦芋TIBs组培苗的影响

由表5可知,随着浸没间歇频率的降低,荔浦芋TIBs组培苗的增殖倍数呈先增加后减少的变化趋势,当浸没间歇频率为5 min/6 h时,组培苗的增殖倍数最高(32.42倍),显著高于其他浸没间歇频率处理。不同浸没间歇频率处理对组培苗的萌芽影响不

表 4 不同接种密度对荔浦芋TIBs组培苗的影响

Table 4 Effects of different inoculation densities on Lipu taro tissue culture seedlings in TIBs system

接种密度(株/L) Inoculation density(plantlet/L)	增殖倍数 Multiplication times	萌芽时间(d) Germination time	株高(cm) Plantlet height	叶片数 Number of leaves	污染率(%) Pollution rate
5	25.28±0.33c	6.23±0.48a	11.16±0.38	7.05±1.11	0d
10	32.17±0.95a	3.59±0.30b	11.50±0.46	7.56±1.15	0d
15	32.86±0.66a	3.16±0.32c	11.26±0.48	7.56±1.34	7.31±0.86c
20	26.25±1.72b	3.25±0.26c	11.27±0.45	7.56±1.47	18.06±0.93b
25	26.56±1.64b	3.07±0.38c	11.06±0.40	7.00±1.41	36.54±1.09a

表 5 不同浸没间歇频率对荔浦芋TIBs组培苗的影响

Table 5 Effects of different immersion frequencies on Lipu taro tissue culture seedlings in TIBs system

浸没间歇频率 Immersion frequency	增殖倍数 Multiplication times	萌芽时间(d) Germination time	株高(cm) Plantlet height	生根数(根/株) Number of roots(root/plantlet)	根长(cm) Root length	污染率(%) Pollution rate
5 min/1 h	28.42±1.72c	3.73±0.29	8.17±0.81e	10.11±2.63d	7.16±0.55d	0c
5 min/3 h	29.60±1.59b	3.48±0.39	9.41±0.71d	13.00±2.00c	8.55±0.60c	0c
5 min/6 h	32.42±1.96a	3.48±0.51	11.41±1.11c	14.50±1.69b	9.78±1.14b	0c
5 min/12 h	24.11±1.66d	3.20±0.48	15.87±1.23b	17.06±1.31a	10.32±0.91b	11.38±0.69b
5 min/24 h	18.43±0.96e	3.16±0.46	17.45±1.47a	17.27±1.49a	11.09±0.97a	17.62±1.42a

显著,萌芽时间均在3.50 d左右;组培苗的株高、生根数及根长随浸没间歇频率的降低而呈递增趋势,当浸没间歇频率为5 min/24 h时,组培苗株高达17.45 cm,生根数为17.27根/株,根长为11.09 cm,但与此同时培养基受污染的风险提高,培养基污染率达17.62%。因此,综合考虑荔浦芋组培苗的继代增殖效果及培养基污染情况,TIBs培养系统的浸没间歇频率以5 min/6 h为宜。

### 3 讨论

利用生物反应器进行优质健康种苗大规模自动化培养是解决重要经济作物市场供苗需求的最佳途径。本研究发现在TIBs培养系统中荔浦芋组培苗的增殖倍数高达28.96倍,约是传统固体培养方法的10倍,其原因:一方面是TIBs培养系统对组培材料的周期性浸泡培养,有效抑制了顶端优势而促使更多叶芽诱导及增殖;另一方面,培养材料能充分接触液体培养基,更有利于对营养元素和植物激素的吸收,从而促进叶芽增殖(张乔丽等,2014)。此外,在TIBs培养系统中,液体培养基是以过滤除菌的空气作为动力对组培苗进行浸没间歇式培养(Lorenzo et al., 2001),保障培养基中拥有足够的氧气,从而促进组培苗快速生长(汤青林等,2006)。

植物激素在植物的生长发育过程中发挥着极其重要的作用(李祖芳等,2017)。在TIBs培养系统中,由于组培苗与液体培养基直接接触,促使植物激素能更有效地调控组培苗的增殖和发育;而在培养基中所添加的激素种类及其配比对细胞诱导分化及生长起决定性作用(胡雪丹等,2016;李敏等,2016)。李瑞雪等(2012)研究表明,高浓度的细胞分裂素与低浓度的生长素配合可直接诱导外植体再生不定芽

或诱导形成胚状体,其中6-BA对茎尖及叶片的发育具有显著促进作用。本研究结果表明,在利用TIBs培养系统进行荔浦芋组培苗快速繁殖的过程中,以4.00 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA的激素配比最适合组培苗的增殖和发育。在TIBs培养系统中不同继代组培苗的增殖效果也不相同。Quiala等(2012)研究发现,以第2代菠萝继代苗为TIBs培养材料时,菠萝组培苗的增殖和生长能力较好;杨柳等(2010a)研究发现,以第7代的香蕉继代苗为培养材料时,香蕉组培苗的生长和增殖效果最优。本研究结果表明,在TIBs培养系统中为保证荔浦芋组培苗有足够材料且不影响其增殖的情况下,宜选择第4代组培苗作为快速扩繁的继代材料。此外,在TIBs培养系统中外植体的接种密度对组培苗增殖影响显著。杨柳等(2010a)研究发现,在TIBs培养系统中接种密度为10株/L时最适合香蕉组培苗的生长和增殖;但接种密度为10~15株/L时,甘蔗组培苗的生长和增殖效果最优(杨柳等,2011)。高美萍等(2016)研究表明,接种密度为10株/L时慈姑组培苗的生长和增殖效果最优,且污染率为0。本研究结果表明,利用TIBs进行荔浦芋组培苗大规模培养时,反应器中的接种密度以10株/L为宜,既可控制培养基污染率,又可促进组培苗增殖和生长。

基于TIBs的组培方式为浸没间歇培养,组培苗在没有培养基浸没时可能会分泌代谢产物,而有培养基浸没时代谢产物可溶于培养基中并不断积累,对组培苗的分化生长起促进或抑制作用(刘丽敏等,2013)。浸没间歇频率是TIBs培养系统的一个重要参数,能影响组培苗的增殖和生长,但不同作物对浸没间歇频率参数的要求不同。Pérez等(2013)研究表明,相对于1 min/12 h的浸没间歇频率,1 min/6 h

或1 min/4 h的浸没间歇频率能显著增加栓皮栎体细胞胚组织的数量和质量; Valdez-Tapia等(2014)研究指出, 浸没间歇频率为5 min/24 h较5 min/12 h对酒店草组培苗的影响更明显。本研究结果显示, 浸没间歇频率为5 min/6 h时最有利于荔浦芋组培苗的增殖和生长, 同时发现提高浸没间歇频率有利于降低培养基的污染风险, 但其具体原因有待进一步探究。

## 4 结论

在TIBs培养系统中, 适宜荔浦芋组培苗增殖生长的培养基激素组合为4.00 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA, 在以第4代继代材料为外植体进行培养、接种密度为10株/L、浸没间歇频率为5 min/6 h的条件下, 组培苗的增殖倍数均在30.00倍以上, 说明利用TIBs培养系统对荔浦芋继代材料进行高效快繁具有可行性, 可为实现及推动荔浦芋健康种苗繁育的工厂化生产提供技术支持。

### 参考文献:

崔瑾. 2002. 芋(*Colocasia esculenta* L. Schott)脱毒快繁体系的构建以及组培苗无糖培养的研究[D]. 南京:南京农业大学. [Cui J. 2002. Study on construction micropropagation system of virus-free taro(*Colocasia esculenta* L. Schott) and on sugar-free tissue culture[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University.]

高美萍, 林志城, 张驰, 江文, 何芳练, 杨柳, 韦绍龙. 2016. 利用间歇浸没式生物反应器进行慈姑组培快繁研究[J]. 西南农业学报, 29(11):2704-2708. [Gao M P, Lin Z C, Zhang C, Jiang W, He F L, Yang L, Wei S L. 2016. Optimization of *Sagittaria sagittifolia* rapid propagation in temporary immersion bioreactors system[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 29(11):2704-2708.]

韩晓勇, 宋婷婷, 王立, 张培通, 郭文琦, 李春宏, 殷剑美. 2014. 靖江香沙芋组织培养快繁技术研究[J]. 江苏农业科学, 43(1):50-52. [Han X Y, Song T T, Wang L, Zhang P T, Guo W Q, Li C H, Yin J M. 2014. Study on tissue culture and rapid propagation of Jingjiang taro[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 43(1):50-52.]

胡雪丹, 张曼, 侯茜, 徐锦华, 刘广, 姚协丰, 李莘芳, 任润生, 陈学好, 羊杏平. 2016. 不同影响因子诱导葫芦花药愈伤组织[J]. 江苏农业学报, 32(5):1155-1161. [Hu X D, Zhang M, Hou Q, Xu J H, Liu G, Yao X F, Li P F, Ren R S, Chen X H, Yang X P. 2016. Induction of calli in another culture of gourd influenced by temperature, hormone and activated carbon[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 32(5):1155-1161.]

江发茂, 欧利. 2016. 荔浦县荔浦芋产业发展现状及栽培技术[J]. 长江蔬菜, (8):27-28. [Jiang F M, Ou L. 2016. Development status and cultivation techniques of Lipu taro industry in Lipu County[J]. Journal of Changjiang Vege-

tables, (8):27-28.]

李敏, 王朴, 路喆, 王自健, 蒋新明. 2016. 不同激素、处理时间及基质对两种大马士革玫瑰扦插生根率的影响[J]. 江苏农业学报, 32(1):207-210. [Li M, Wang P, Lu Z, Wang Z J, Jiang X M. 2016. Effects of hormones, treating time and substrates on cutting rooting rates in two varieties of *Rosa damascena* Mill[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 32(1):207-210.]

李瑞雪, 汪泰初, 胡飞, 贾鸿英, 王伟. 2012. 6-BA、IBA、NAA对桑组培苗继代增殖的影响[J]. 农学学报, 2(11):37-39. [Li R X, Wang T C, Hu F, Jia H Y, Wang W. 2012. Influence of 6-BA, IBA and NAA on sub-proliferation of mulberry tissue culture[J]. Journal of Agriculture, 2(11):37-39.]

李祖芳, 孟潇, 秦江南, 张锐, 高山. 2017. 植物生长调节剂在核桃上的应用研究进展[J]. 贵州农业科学, 45(9):31-33. [Li Z F, Meng X, Qin J N, Zhang R, Gao S. 2017. Advances in application of plant growth regulators in walnut production[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 45(9):31-33.]

刘丽敏, 吴凯朝, 余坤兴, 刘俊仙, 刘红坚, 周珊, 淡明, 卢曼曼, 杨柳, 游建华, 李松. 2013. TIBs和传统培养方式培养的甘蔗脱毒苗生理生化指标比较[J]. 西南农业学报, 26(4):1444-1447. [Liu L M, Wu K C, Yu K X, Liu J X, Liu H J, Zhou S, Dan M, Lu M M, Yang L, You J H, Li S. 2013. Comparison of several physiological and biochemical parameters in virus-free sugarcane seedlings produced by TIBs and traditional tissue culture methods[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 26(4):1444-1447.]

覃自由, 叶国春, 江发茂. 2017. 荔浦芋生产现状、问题及发展对策[J]. 长江蔬菜, (16):23-25. [Qin Z Y, Ye G C, Jiang F M. 2017. Production status, problems and development countermeasures of Lipu taro[J]. Journal of Changjiang Vegetables, (16):23-25.]

汤青林, 牛义, 王志敏, 王小佳, 宋明, 李启波. 2006. 芋芽继代培养中激素、水解乳蛋白、碳源的调节研究[J]. 西南农业学报, 19(5):928-930. [Tang Q L, Niu Y, Wang Z M, Wang X J, Song M, Li Q B. 2006. Study on effect of hormone, LH and carbon source in taro buds sub-culture[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 19(5):928-930.]

杨柳, 秦钢, 粟靖, 杨丽涛, 罗瑞鸿, 李小泉, 林贵美, 邹瑜, 李杨瑞. 2010a. 利用间歇浸没式生物反应器进行香蕉(*Musa AAA Cavendish* var. Williams B6)组培快繁研究[J]. 果树学报, 27(6):1010-1013. [Yang L, Qin G, Su J, Yang L T, Luo R H, Li X Q, Lin G M, Zou Y, Li Y R. 2010a. Micro-propagation of banana(*Musa AAA Cavendish* var. Williams B6) in temporary immersion bioreactor system(TIBs)[J]. Journal of Fruit Science, 27(6):1010-1013.]

杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 罗瑞鸿, 游建华, Ariel D Arencibia, 魏源文, 李杨瑞. 2010b. 利用间歇浸没式生物反应器进行果

- 蔗组培快繁[J]. 热带作物学报, 31(4):614-620. [Yang L, Qin G, Yang L T, Luo R H, You J H, Arencibia A D, Wei Y W, Li Y R. 2010b. Optimization of *Saccharum sinensis* Roxb rapid multiplication in temporary immersion bioreactors system[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 31(4):614-620.]
- 杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 吴建明, 罗瑞鸿, 魏源文, 李杨瑞. 2011. 利用间歇浸没式生物反应器进行甘蔗组培快繁的研究[J]. 华南农业大学学报, 32(3):37-41. [Yang L, Qin G, Yang L T, Wu J M, Luo R H, Wei Y W, Li Y R. 2011. Optimization of sugarcane rapid propagation in temporary immersion bioreactors system[J]. Journal of South China Agricultural University, 32(3):37-41.]
- 殷剑美, 韩晓勇, 王立, 张培通, 郭文琦, 李春宏. 2015. 靖江香沙芋脱毒组培技术效应及种芋扩繁要点[J]. 江苏农业科学, 43(8):151-153. [Yin J M, Han X Y, Wang L, Zhang P T, Guo W Q, Li C H. 2015. Technical effect of virus-free tissue culture of Jingjiang taro and its key points for propagation of seed-used taro[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 43(8):151-153.]
- 张培通, 殷剑美, 王立, 韩晓勇, 刘水东, 吴薇, 常蕾, 罗敏. 2017. 芋头脱毒快繁技术规程[J]. 蔬菜, (10):39-42. [Zhang P T, Yin J M, Wang L, Han X Y, Liu S D, Wu W, Chang L, Luo M. 2017. Technical regulations for virus-free and rapid propagation of taro[J]. Vegetables, (10):39-42.]
- 张乔丽, 邵微, 高利梅, 姚允聪, 姬谦龙. 2014. 间歇浸没式生物反应器快繁草莓脱毒苗的参数[J]. 北京农学院学报, 29(2):20-24. [Zhang Q L, Shao W, Gao L M, Yao Y C, Ji Q L. 2014. Micro-propagation of *Fragaria* × *ananassa* Duch. optimization of process parameters in temporary immersion bioreactors system[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 29(2):20-24.]
- 张志勇, 黄萍萍, 梁金平. 2008. 芋茎尖脱毒应用研究进展[J]. 江西农业学报, 20(7):52-53. [Zhang Z Y, Huang P P, Liang J P. 2008. Research progress on application of taro stem tip virus-free[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 20(7):52-53.]
- 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 2010. 中国蔬菜栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社. [Institute of Vegetable and Flower, Chinese Academy of Agricultural Sciences. 2010. Chinese Vegetable Cultivation[M]. Beijing: China Agriculture Press.]
- Bernal A, Machado P, Cortegaza L, Carmona E R, Rivero O, Cabrera M, Zayas C M, Nodarse O, Perez A, Santana I, Arencibia A D. 2008. Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (TIBs)[J]. Sugar Technology, 10(1):42-47.
- Etienne H, Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69(3):215-231.
- Ikram-ul-Haq, Dahot M U. 2007. Effect of permanent and temporary immersion system on banana micro-propagation[J]. Pakistan Journal of Botany, 39(5):1763-1772.
- Lorenzo J C, Ojeda E, Espinosa A, Borroto C. 2001. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants[J]. In Vitro Cellular & Development Biology-plant, 37(6):803-806.
- Mehrotra S, Goel M K, Kukreja A K, Mishra B N. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micro-propagation: A progress towards commercialization[J]. African Journal of Biotechnology, 6(13):1484-1492.
- Mordocco A M, Brumbley J A, Lakshmanan P. 2009. Development of a temporary immersion system (RITA<sup>®</sup>) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids)[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 45(4):450-457.
- Pérez M, Bueno M A, Escalona M, Toorop P, Rodríguez R, Cañal M J. 2013. Temporary immersion systems (RITA) for the improvement of corkoak somatic embryo genetic culture proliferation and somatic embryo production[J]. Trees, 27(5):1277-1284.
- Quiala E, Cañal M J, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, de Fera M, Barbón R. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 109(2):223-234.
- Valdez-Tapia R, Capataz-Tafur J, López-Laredo A R, Trejo-Espino J L, Trejo-Tapia G. 2014. Effect of immersion cycles on growth, phenolics content, and antioxidant properties of *Castilleja tenuiflora* shoots[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 50(4):471-477.
- Xuan C, Chakrabarty D, Hahn E J, Paek K Y. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system[J]. Current Science, 84(8):81-86.
- Zhu L H, Li X Y, Welander M. 2005. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81(3):313-318.

(责任编辑 兰宗宝)