

辣木主枝嫩芽无菌培养及植株再生研究

高燕, 姜艳*, 白燕冰, 耿秀英, 李泽生, 李桂林, 罗凯 (云南省德宏热带农业科学研究所, 云南瑞丽 678600)

摘要 [目的] 确定不同部位嫩芽外植体与植物生长素及天然提取物诱导辣木不定芽的分化能力及不定根生长的最佳条件。[方法] 选择优良辣木主枝嫩芽的茎段为外植体, 采用组织培养技术对嫩芽中部茎段诱导、增殖、生根等进行研究。[结果] 不同部位的嫩芽是影响辣木诱导和增殖最关键的因素, 嫩芽诱导效果: 中部 > 下端 > 上端, 辣木诱导最适宜培养基是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + 马铃薯水汁 20 g/L + 蔗糖 25 g/L, 诱导率为 83%; 增殖分化培养基为 3/4 MS + 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L + 马铃薯水汁 20 g/L + 蔗糖 30 g/L, 增殖系数为 3.63; 生根培养基为 1/2MS + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 香蕉水汁 20 g/L + 蔗糖 20 g/L, 生根率达 83%, 不定根诱导效果: IBA > IAA > NAA。[结论] 以主枝嫩芽中部为外植体可建立辣木嫩芽快繁体系, 可提高增殖系数和生根率。

关键词 辣木; 离体培养; 不定芽

中图分类号 S604+.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)15-025-03

Sterile Culture of *Moringa oleifera* Buds and Plants Regeneration Test

GAO Yan, JIANG Yan*, BAI Yan-bing et al (Dehong Institute of Tropical Agricultural Sciences in Yunnan Province, Ruili, Yunnan 678600)

Abstract [Objective] Accord with the test make sure different parts of the buds explant and auxin induction and natural extracts of adventitious bud differentiation ability, and the best condition of adventitious roots growth. [Method] Selecting *M. oleifera* bud as explants, using tissue culture to study the problems such as bud induction, proliferation and rooting. [Result] Different parts of the bud is the key factor to affect induction and proliferation, the buds induction results: middle > lower > upper, the optimum culture medium of *M. oleifera* is MS + 6-BA 0.5 mg/L + The potato water juice 20 g/L + sucrose 25 g/L, induction rate is 83%; the optimum culture medium of proliferation differentiation is 3/4 MS + 6-BA 0.5 mg/L + KTO. 1 mg/L + The potato water juice 20 g/L + sucrose 30 g/L, k-factor is 3.63; the optimum culture medium of rooting is 1/2MS + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + banana water juice 20 g/L + sucrose 20 g/L, rooting rate is 83%, adventitious roots induction effect: IBA > IAA > NAA. [Conclusion] The central of the main branch buds as explants can establish *M. oleifera* buds micropropagation system, which can improve the multiplication and rooting rate.

Key words *Moringa oleifera*; *in vitro* culture; Adventitious buds

辣木(*Moringa oleifera* Lam), 又称奇树、鼓槌树, 原产于印度和非洲, 为辣木科(Moringaceae)辣木属多年生多功能热带植物, 仅一个属, 世界共有 14 种^[1]。辣木全株均可利用, 营养物质种类多而全^[2]。印度传统医学认为, 辣木可预防 300 种疾病, 具有降压、降胆固醇、降糖、医疗保健等功效, 此外具有护肝、利尿、消炎、止痛、降压、催欲等功能, 被科学誉为“神奇之树”和“母亲最好的朋友”^[3-5]。

我国辣木主要分布于云南、广西、广东、海南、澳门与台湾地区, 由于辣木喜温, 耐干旱, 生长快, 非常适宜云南省热区广泛种植^[6]。由于辣木神奇的功效和潜在的市场价值, 种植辣木的地区越来越多, 传统的种子育苗已不能满足市场需要。目前, 生产上种植的辣木 90% 以上是采用种子育苗, 存在性状不稳定、抗病差、产量低等问题, 而以主枝嫩芽为外植体, 通过不定芽诱导、增殖分化、不定根诱导的种苗, 可保证品种的稳定性、抗病性及品质, 对促进云南辣木良种选育及种苗繁殖推广具有重要意义。2006 年起, 云南省德宏热带农业科学研究所进行辣木引种、栽培试验示范技术研究, 针对种苗价格高、抗性差、生产成本高、严重影响辣木产量和品质的提高等问题, 笔者于 2013~2014 年以辣木主枝嫩芽不同

部位的茎段为外植体, 探索不同植物激素浓度及天然提取物对不定根诱导培养的影响, 为云南辣木良种选育和种苗繁殖提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料 辣木(PKM1)主枝嫩芽采自于云南省德宏热带农业科学研究所辣木栽培示范园, 选择健壮、腋芽饱满、无病虫害的嫩芽茎段作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体选取。 选取生长健壮无病虫害及性状优良的粗壮植株, 剪取主枝顶端带 5~7 个节的绿色嫩芽, 嫩芽除去枝叶, 置于自封袋保存。取材应选择晴天的 10:00 以前或阴天, 尽量避开雨天。

1.2.2 外植体消毒。 将嫩芽切成长 4 cm 左右的茎段, 分为上端(顶端以下 1~2 节)、中部(顶端以下 3~4 节)、下端(顶端以下 5~7 节) 3 种不同部位嫩芽, 用无菌水冲洗 2 次, 放入 250 mg/L 速洁(过氧化乙酸)消毒液预处理 10 min, 在无菌操作台上加入 75% 乙醇消毒 30 s, 再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 15 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 无菌滤纸吸干水分, 备用。

1.2.3 不定芽诱导培养。 将消毒处理的茎段切成带一个节 2 cm 左右的茎段接种于不定芽诱导培养基上, 以 MS 为基本培养基, 附加 6-BA 浓度为 0.1、0.5、1.0 mg/L 及马铃薯水汁(去皮切大小 1 cm³ 小方块加水煮沸 10 min 后过滤) 20 g/L 共 6 种处理, 培养基中蔗糖 25 g/L, pH 5.8, 培养温度(28 ± 2) °C, 光照强度 1 600~2 000 lx, 光照时间 10 h/d, 先暗培养 3 d, 再转入光照培养室。茎段每个处理均接种 10 个外植体, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接 1 个茎节, 重复 3 次。培养 20 d

基金项目 德宏州科技创新项目“辣木优质组培苗繁育及栽培试验示范”(2014-21); 德宏州生物产业办项目“辣木无性系组培快繁技术研究”。

作者简介 高燕(1965-), 女, 湖南祁东人, 高级农艺师, 从事药用植物资源收集与种苗培育技术研究。* 通讯作者, 助理研究员, 硕士, 从事药用植物选育种与种苗快繁技术研究。

收稿日期 2015-04-09

后,统计污染率、死亡率和诱导率。

污染率 = (茎段污染外植体数/外植体总数) × 100%

死亡率 = (茎段死亡外植体数/外植体总数) × 100%

诱导率 = (茎段萌发外植体数/外植体总数) × 100%

1.2.4 继代增殖分化培养。选择生长健壮、5 cm 以上的不定芽,将不定芽切成带一节的小段接种于附加不同浓度植物激素的不定芽诱导培养基上。以 3/4MS 培养基为基本培养基,附加马铃薯水汁 20 g/L 及 6-BA 0.5 mg/L 和 KT、NAA、GA₃ 浓度分别为 0.05、0.10、0.20 mg/L 共 9 个处理的增殖分化培养基上。培养基中蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 光照强度 1 800 ~ 2 200 lx, 光照时间 12 h/d, 培养温度 (28 ± 2) °C。茎段每个处理接种 10 个小段, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接 1 个茎节, 重复 3 次。培养 20 d 后, 统计增殖系数及生长状况。

增殖系数 = 继代增殖芽数/接种芽数

1.2.5 不定根诱导培养。选择茎段诱导的健壮不定芽, 切取枝叶带一个节长 2 cm 茎段接种于不同浓度植物生长调节剂的不定根诱导培养基上。以 1/2MS 培养基为基本培养基, 附加 NAA、IBA、IAA 浓度为 0.1、0.5、1.0 mg/L 共 9 个处理; 附加香蕉水汁(去皮加水煮沸 10 min 后过滤) 20 g/L 及 IBA

0.5 mg/L 和 IAA 浓度为 0.1、0.2、0.5 mg/L 共 6 个处理。培养基中蔗糖 20 g/L, pH 5.8, 光照强度 2 000 ~ 2 400 lx, 光照时间 12 h/d, 培养温度 (28 ± 2) °C。茎段每个处理接种 10 个小段, 重复 3 次。培养 20 d 后, 统计生根率及生长情况。

平均根数 = 生根茎段总数/生根茎段数

生根率 = (生根茎段数/接种茎段数) × 100%

2 结果与分析

2.1 不同部位外植体对辣木不定芽诱导的影响 为了确定辣木不定芽的最佳诱导部位, 分别将上端、中部、下端接种于以 MS 为基本培养基添加 6-BA 0.2 mg/L 的培养基上, 20 d 后统计不定芽诱导情况。从表 1 可以看出, 中部茎段嫩芽未木质化, 接种 3 d 后, 基部切口出现愈伤组织分化, 5 d 中部茎段嫩芽开始萌发, 不定芽萌发的时间较早, 诱导的不定芽效果最好, 诱导率为 76.7%; 下端嫩芽有一部分半木质化, 外植体消毒处理不彻底, 污染率较高, 接种 7 d 下端嫩芽才萌发, 诱导率为 63.3%; 上端嫩芽稍弱, 外植体消毒处理易杀伤幼嫩组织, 导致褐化死亡, 死亡率达 43.3%, 诱导率为 50.0%。因此, 绿色嫩芽顶端下(中部)3~4 节腋芽是辣木不定芽诱导的最佳外植体。

表 1 不同部位外植体对辣木不定芽诱导的影响

外植体	接种外植体数	污染数	污染率 %	死亡数 株	死亡率 %	萌发数 芽	诱导率 %	诱导情况
茎尖	30	2	6.7	13	43.3	15	50.0	芽细弱
茎中	30	3	10.0	4	13.3	23	76.7	芽粗壮
茎下	30	5	16.7	6	20.0	19	63.3	芽较粗壮

2.2 不同 6-BA 浓度对辣木不定芽诱导的影响 因中部茎段外植体不定芽诱导优于上端及下端, 选择中部茎段外植体接种于不定芽诱导培养基上培养 3 d 后, 外植体切口处逐渐膨大, 出现愈伤组织, 培养 5 d 后, 茎段腋芽开始萌发, 诱导出的多数是单芽, 苗细弱易黄化落叶, 在培养基中添加马铃薯水汁 20 g/L 时, 诱导出的多数是丛生芽, 苗粗壮无黄化落叶现象。从表 2 可以看出, 不同浓度 6-BA 对辣木外植体不定芽诱导有较大差异, 每个浓度 6-BA 都能诱导出辣木不定芽, 随着 6-BA 浓度的增加诱导不定芽呈抛物线, 当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L, 添加马铃薯水汁 20 g/L 时, 外植体切口处出现乳白色愈伤组织, 质地紧密, 外植体萌发数达 25 个, 诱导率为 83%, 平均萌发数为 1.96 个, 平均芽长 5.2 cm, 不定芽的诱导效果最佳; 其次为 6-BA 浓度 0.5 mg/L 时, 外植体萌发数达 24 个, 诱导率为 80%, 平均萌发数为 1.42 个, 平均芽长 4.8 cm; 最差的为 6-BA 浓度 0.1 mg/L 时, 外植体切口处出现乳黄色愈伤组织, 颗粒状, 外植体萌发数 16 个, 诱导率为 53%, 平均萌发数为 1.13 个, 平均芽长 3.7 cm。

2.3 不同浓度植物激素组合对辣木增殖分化的影响 从表 3 可以看出, 不同浓度植物激素组合不同, 辣木增殖分化能力相差较大, 当 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L 时, 增殖系数可达 3.63, 其次是 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.2 mg/L 时, 增殖系数达 3.02, 最差是 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L 时, 增殖系数为 2.13。接种 7 d 后会出现黄化和落叶现象, 15 d 后从顶

芽逐渐向下出现软腐萎蔫, 基部长出白色膨松愈伤组织等。但在培养基上添加马铃薯水汁 20 g/L 时, 缩短培养时间和增加光照强度, 基本上可以缓解上述现象。

表 2 不同 6-BA 浓度对辣木不定芽诱导的影响

6-BA 浓度 mg/L	培养基		接种外植体数	萌发数	萌发总芽数	平均萌芽数	平均芽长 // cm	诱导率 %
	马铃薯水汁 g/L	接种外植体数						
0.1	20	30	17	24	1.41	4.1	57	
0.5	20	30	25	49	1.96	5.2	83	
1.0	20	30	21	36	1.71	4.5	70	
0.1	-	30	16	18	1.13	3.7	53	
0.5	-	30	24	34	1.42	4.8	80	
1.0	-	30	19	24	1.26	4.2	63	

2.4 不同植物激素对辣木不定根诱导的影响 将诱导生长较一致的不定芽切成 2 cm 长的带一节以上茎段分别接种于不同激素 IBA、NAA、IAA 培养基上, 培养 4 ~ 5 d 后, 基部开始膨大, 切口慢慢愈伤化, 12 d 左右基部愈伤组织或皮层长出不定根。从表 4 可以看出, 不同 IBA、NAA、IAA 浓度对不定根的诱导有明显差异, 但每个处理都能诱导出不定根, 诱导效果为 IBA > IAA > NAA, 随着不同激素浓度的增加诱导不定根呈抛物线; 当 IBA 0.5 mg/L 时, 生根率最高达 77%, 平均根数为 4.4 条; 其次当 IAA 0.5 mg/L 时, 生根率达

73%,平均根数为 3.9 条。由此可知,随着不同激素浓度的增加生根率先增加后下降。

表 3 不同浓度植物激素组合对辣木增殖分化的影响

激素配比 mg/L	接种芽数	增殖芽数	增殖系数	生长情况
6-BA 0.5 + NAA 0.05	30	64	2.13	+
6-BA 0.5 + NAA 0.10	30	82	2.73	++
6-BA 0.5 + NAA 0.20	30	73	2.43	+
6-BA 0.5 + KT 0.05	30	85	2.84	++
6-BA 0.5 + KT 0.10	30	109	3.63	+++
6-BA 0.5 + KT 0.20	30	96	3.02	+++
6-BA 0.5 + GA ₃ 0.05	30	70	2.33	+
6-BA 0.5 + GA ₃ 0.10	30	88	2.94	+++
6-BA 0.5 + GA ₃ 0.20	30	77	2.57	++

注: + 表示差; ++ 表示一般; +++ 表示好。

表 4 不同激素浓度对辣木不定根诱导的影响

激素 种类	激素浓度 mg/L	接种茎 段数	生根茎 段数	生根总茎 段数	平均 根数	生根率 %
IBA	0.1	30	16	42	2.6	53
	0.5	30	23	101	4.4	77
	1.0	30	21	80	3.8	70
NAA	0.1	30	14	32	2.3	47
	0.5	30	20	72	3.6	67
	1.0	30	17	56	3.3	57
IAA	0.1	30	15	36	2.4	50
	0.5	30	22	86	3.9	73
	1.0	30	18	63	3.5	60

2.5 不同激素浓度组合对辣木不定根诱导的影响 将诱导的不定芽切成 2 cm 带一节以上茎段分别接种于不同激素浓度组合及香蕉水汁 20 g/L 的培养基上,均能诱导生根,培养 3~4 d 后,基部开始膨大,切口慢慢愈伤化,10~12 d 基部愈伤组织或皮层长出不定根。从表 5 可以看出,当 IBA 浓度 0.5 mg/L 时,在低浓度下随着 IAA 浓度增加生根率随之增加,当 IBA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L 再附加香蕉水汁 20 g/L 时,生根率高,根多粗壮,平均根数为 4.7 条,生根率为 83%,效果最佳;当 IBA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L 时,生根率较低,根少细弱,平均根数为 4.3 条,生根率为 77%;当 IAA 浓度 0.5 mg/L 时,生根率下降。

表 5 不同激素浓度组合对辣木不定根诱导的影响

激素配比 mg/L	培养基		接种数	生根数	生根 总数	平均 根数	生根率 %
	香蕉水汁 g/L	接种数					
IBA 0.5 + IAA 0.1	20	30	24	108	4.5	80	
IBA 0.5 + IAA 0.2	20	30	25	118	4.7	83	
IBA 0.5 + IAA 0.5	20	30	23	97	4.2	77	
IBA 0.5 + IAA 0.1	-	30	22	90	4.1	73	
IBA 0.5 + IAA 0.2	-	30	23	99	4.3	77	
IBA 0.5 + IAA 0.5	-	30	20	76	3.8	67	

3 结论与讨论

(1)辣木组织培养外植体有多种,该试验主要以主枝嫩芽(上端、中部、下端)进行试验。结果表明,主枝嫩芽的诱导效果为中部 > 下端 > 上端。黎国运等^[7]研究表明,外植体(侧芽)未通过愈伤组织阶段,至少需要 60 d。而该研究采用主枝嫩芽中部茎段,能诱导愈伤组织并分化再生植株,只需要 45 d 即可获得一定量的试管苗,且诱导不定芽粗壮,增殖系数高。

(2)辣木茎段组织培养的关键之一是诱导不定芽增殖分化,而在增殖分化培养过程中变异和玻璃化苗是影响植物快繁的重要原因^[8],同时易出现黄化落叶、顶端干枯、落叶萎蔫,基部长出白色膨松愈伤组织,不定芽细弱等现象,朱尾银^[9]通过更改基本培养基中 Ca²⁺、PO₄⁻ 比例,基本上可以缓解上述现象。笔者通过在培养基中添加不同天然提取物(马铃薯水汁、香蕉水汁),不仅可缓解上述现象,而且对茎段增殖分化及生根有明显的促进作用^[10]。

(3)不定根的诱导受许多因素的影响,其中生长素类物质起着重要的调控作用^[11]。目前,植物组织培养常用生长素类调控剂为 IBA、IAA、NAA 等。研究表明,它们对辣木根的诱导都有一定的效果,在不同浓度 IBA、IAA、NAA 试验中,诱导效果为 IBA > IAA > NAA。辣木主枝嫩芽中部茎段诱导最适宜培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + 马铃薯水汁 20 g/L + 蔗糖 25 g/L,诱导率为 83%;增殖最适宜的培养基为 3/4 MS + 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L + 马铃薯水汁 20 g/L + 蔗糖 30 g/L,增殖系数为 3.63;最适宜生根培养基为 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 香蕉水汁 20 g/L + 蔗糖 20 g/L,生根率达 83%。

参考文献

- [1] 刘昌芬,李国华. 辣木的研究现状及其开发前景[J]. 云南热作科技, 2002,25(3):20-24.
- [2] 董小英,唐胜球. 辣木的营养价值及生物学功能研究[J]. 广东饲料, 2008(9):39-41.
- [3] 张燕平,段玉芬,苏建荣. 辣木的开发与利用[J]. 热带农业科技,2004,24(4):42-48.
- [4] 刘昌芬,李国华. 辣木的营养价值[J]. 热带农业科技,2004,27(1):4-7.
- [5] 盘李军,刘小金. 辣木的栽培及开发利用研究进展[J]. 广东林业科技, 2010,26(3):71-77.
- [6] 罗云霞,陆斌,石卓功. 辣木的特性与价值及其在云南引种发展的景况[J]. 西部林业科学,2005,35(4):137-145.
- [7] 黎国运,李大周. 辣木组培育苗技术研究总结[J]. 热带林业,2006,3(1):31.
- [8] 魏健,刘旭彩,孙振雷. 刺嫩芽快繁体的系建立[J]. 安徽农学通报, 2008,36(8):3127-3128.
- [9] 朱尾银. 辣木的组织培养及快速繁殖研究[J]. 安徽农学通报,2011,17(7):54.
- [10] 高燕,李泽生,耿秀英,等. 铁皮石斛杂交种组织培养技术试验[J]. 热带农业科技,2014,37(2):21-24.
- [11] DAVIS T D, HAISSIG B E. Biology of adventitious root formation[M]. New York:Plenum Press,1994:275-280.