

辣木组织培养技术初步研究

陆滢灵, 安冰* (广西国有派阳山林场, 广西南宁 532500)

摘要 [目的]初步研究辣木组织培养技术。[方法]以辣木种子为外植体,通过组织培养诱导不定芽,形成完整的组培再生植株,并研究辣木诱导、增殖和生根的适宜培养基和培养条件。[结果]最佳外植体诱导培养基为1/2MS+6-BA0.80 mg/L+NAA0.40 mg/L+益培灵0.10 g/L,萌芽率为95%;最佳增殖培养基为MS+6-BA0.30 mg/L+NAA0.02 mg/L+益培灵0.05 g/L,增殖个数为6.4个;最佳生根培养基为1/2MS+IBA0.30 mg/L+ABT1号0.015 mg/L+益培灵0.03 g/L,生根率可达95%,根长为5.21 cm。[结论]辣木组培快繁技术有助于解决良种缺乏的问题,并为种质资源开发利用提供技术支持。

关键词 辣木;外植体;组织培养

中图分类号 S792.99 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)33-0140-02

Preliminary Study of Tissue Culture Technology of *Moringa oleifera* Lam.

LU Yan-ling, AN Bing* (Guangxi Paiyangshan State Forest Farm, Ningming, Guangxi 532500)

Abstract [Objective]To preliminarily study the tissue culture technology of *Moringa oleifera* Lam. [Method]Seeds of *M. oleifera* Lam. were used as explants to induce adventitious buds and form a complete tissue culture plant by tissue culture technology. The suitable medium and culture condition for induction, multiplication and rooting of *M. oleifera* Lam. were studied. [Result]The most suitable culture combination for explants induction was 1/2MS+6-BA0.80 mg/L+NAA0.40 mg/L+Yipeiling 0.10 g/L, the germination rate was 95%. The best culture combination for multiplication was MS+6-BA0.30 mg/L+NAA0.02 mg/L+Yipeiling 0.05 g/L, the number of multiplication was 6.4. The best rooting medium was 1/2MS+IBA0.30 mg/L+ABT1 0.015 mg/L+Yipeiling 0.03 g/L, the rooting rate could reach 95% and the root length was 5.21 cm. [Conclusion]Rapid propagation technology of *M. oleifera* Lam. can help to solve the lack of seeds and provide technical support for development and utilization of germplasm resources.

Key words *Moringa oleifera* Lam.; Explant; Tissue culture

辣木(*Moringa oleifera* Lam.)又称鼓槌树(Drumstick tree),原产于印度北部,是多年生热带落叶乔木,其适应力强,耐干旱、贫瘠和病虫害,能适应砂土、黏土和微碱性土壤,被誉为“奇迹之树”^[1-2]。辣木叶片、种子、果荚、根系、茎秆和幼苗均可食用,营养丰富而全面,是目前已发现的最好的植物蛋白、叶酸、泛酸、钙铁硒等多种营养来源,含多种矿物质和维生素,可作为蔬菜食用,也可广泛应用于医药、保健等领域^[3],美国Discovery频道曾在“另类医学指南”系列报道中指出辣木含有丰富的营养素,被广泛应用于改善各种疾病,成效显著。

目前辣木繁殖方式以播种为主,扦插为辅,但仅依靠播种和扦插,种质混杂,质量参差不齐,不能满足优良品系大规模产业需求^[4]。辣木组培快繁技术有助于解决良种缺乏的问题,并为种质资源开发利用提供技术支撑。

组培由于条件可控,不受季节限制可全年生产,利用组培技术,可实现优良无性系或单株迅速推广,不改变其遗传性,保持原有优良性状不变。通过组织培养技术有望建立“种质银行”或“基因库”,便于种植保存和交流,加速优良品种的推广,缩短育种周期,获得常规育种难以或无法得到的新基因型,创造新的物种或品种。辣木组培可保持单株优良特性,达到优良遗传材料的快速繁殖(良种快繁)、脱毒良种苗和无病毒苗的大量繁殖、特殊育种材料的快速繁殖、基因工程植株的快速繁殖和离体种子的快速繁殖等^[5]。该试验通过组织培养手段,以印度辣木种子为材料,对外植体诱导

及无菌组织培养体系进行尝试,初步建立无菌组培体系,并获得辣木诱导、增殖和生根的适宜培养基和培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料 以辣木种子为材料,原产地为印度。

1.2 方法

1.2.1 外植体的取材与灭菌。选择饱满无皱缩的辣木种子作为外植体,去除纸质白翼,材料用饱和洗衣粉溶液刷洗干净后备用。外植体灭菌采用2个处理:M₁为75%乙醇30 s+1%氯化汞10 min;M₂为15%新洁尔灭30 min+15%次氯酸钠15 min,统计不同处理的污染率、灼伤率、萌芽率。

1.2.2 辣木组织培养体系的建立。

1.2.2.1 外植体诱导培养。将灭菌后的材料接种到培养基上,至于光强3 000 lx,温度25℃诱导不定芽,外植体诱导培养基采用4个处理,Y₁为MS+6-BA0.80 mg/L+NAA0.40 mg/L+益培灵0.10 g/L;Y₂为MS+6-BA1.00 mg/L+NAA0.50 mg/L+益培灵0.10 g/L;Y₃为1/2MS+6-BA0.80 mg/L+NAA0.40 mg/L+益培灵0.10 g/L;Y₄为1/2MS+6-BA1.00 mg/L+NAA0.50 mg/L+益培灵0.10 g/L,统计不同处理的保存率、萌芽数、萌芽率。

1.2.2.2 增殖培养。增殖培养基采用3个处理:Z₁为MS+6-BA0.70 mg/L+NAA0.06 mg/L+益培灵0.05 g/L;Z₂为MS+6-BA0.50 mg/L+NAA0.04 mg/L+益培灵0.05 g/L;Z₃为MS+6-BA0.30 mg/L+NAA0.02 mg/L+益培灵0.05 g/L。培养条件:温度24~26℃,光照12~14 h/d,光强2 500~3 000 lx,统计不同处理的增殖个数、茎芽长度。

1.2.2.3 生根培养。生根培养基采用3个处理:S₁为1/2MS+IBA0.40 mg/L+ABT1号0.020 mg/L+益培灵0.03 g/L;S₂为1/2MS+IBA0.30 mg/L+ABT1号0.015 mg/L+

作者简介 陆滢灵(1981—),女,广西崇左人,助理工程师,从事植物组织培养研究。*通讯作者,工程师,硕士,从事植物组织培养研究。

收稿日期 2017-07-26

益培灵 0.03 g/L; S₃ 为 1/2MS + IBA0.20 mg/L + ABT1 号 0.010 mg/L + 益培灵 0.03 g/L。培养条件: 温度 24 ~ 26 ℃, 光照 12 ~ 14 h/d, 光强 3 000 ~ 3 500 lx, 统计不同处理的苗高、根长、生根率。

以上所有培养基均加入 30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂。培养基中所使用的益培灵, 是一种新型组织培养专用防污染杀菌剂, 其作用机理是穿透微生物的细胞壁进入细胞内部, 与核酸碱基结合, 干扰复制或通过断开微生物关键蛋白质的键而起杀菌作用, 购自上海稼丰园艺用品有限公司。

2 结果与分析

2.1 外植体的取材与灭菌 由表 1 可知, 处理 M₁ 比处理 M₂ 污染率低 22 百分点、萌芽率高 27 百分点、灼伤率低 14 百分点, 灭菌后的外植体生长良好、萌发正常, 有明显优势, 但有褐化现象。这说明 75% 乙醇 + 1% 氯化汞可以有效降低外植体的污染率, 但对外植体有一定伤害作用, 易出现褐化, 因此无菌水清洗时, 一定要清洗彻底。如果褐化情况严重, 可以尝试在 1% 氯化汞灭菌时, 将 10 min 灭菌过程分为 2 次 5 min 灭菌, 中间用无菌水清洗数次, 这样对褐化、灼伤现象有较明显的抑制作用, 且对灭菌效果影响不大。

表 1 不同处理的灭菌效果

Table 1 The sterilization effect of different treatments %

处理 Treatment	污染率 Contamination rate	灼伤率 Burn rate	萌芽率 Germination rate
M ₁	16	15	59
M ₂	38	1	32

2.2 辣木组织培养体系的建立

2.2.1 外植体诱导培养。由表 2 可知, 诱导培养基的激素溶度配比以处理 Y₃ 效果最佳, 萌芽率高, 生长快且芽长势良好。在保存率相差不大的情况下, 处理 Y₁、Y₂ 和 Y₄ 的萌芽率较 Y₃ 分别低 28 百分点、20 百分点和 14 百分点, 说明在基础培养基相同的情况下, 激素配比 6 - BA0.80 mg/L + NAA0.40 mg/L 更为适宜; 在相同激素配比下, 1/2MS 较 MS 更适宜; 最佳培养基配比为 1/2MS + 6 - BA0.80 mg/L + NAA0.40 mg/L + 益培灵 0.10 g/L。当激素浓度过高时, 辣木容易出现大团愈伤组织, 不易萌芽, 且出现玻璃化现象, 即使萌芽较多, 也容易成为无效芽。

表 2 不同处理的外植体诱导培养效果

Table 2 The induction effect of different treatments

处理 Treatment	保存率 Preserving rate//%	萌芽数 Germination number//株	萌芽率 Germination rate//%
Y ₁	84	56	67
Y ₂	85	64	75
Y ₃	86	82	95
Y ₄	90	73	81

2.2.2 增殖培养。由表 3 可知, 增殖培养基以处理 Z₃ 效果最佳, 增殖个数为 6.4 个, 茎芽可伸长 7.8 cm, 芽生长旺盛,

茎粗壮, 叶片展开良好; 处理 Z₁ 激素浓度偏高, 增殖个数较处理 Z₃ 低 51.6%, 茎芽伸长低 42.3%, 生长较弱, 基部易形成愈伤团块, 芽点密集但不易伸长, 且出现黄叶或落叶; 处理 Z₂ 激素浓度稍好, 增殖个数较处理 Z₃ 低 20.3%, 茎芽伸长低 20.5%, 茎叶细长, 长势较弱。

表 3 不同处理的增殖培养效果

Table 3 The multiplication effect of different treatments

处理 Treatment	增殖个数 Multiplication number//个	茎芽长度 Stem and bud length//cm
Z ₁	3.1	4.5
Z ₂	5.1	6.2
Z ₃	6.4	7.8

2.2.3 生根培养。由表 4 可知, 以处理 S₂ 生根效果最佳, 接种 25 d 后, 辣木苗根系发达, 根长 5.21 cm, 苗木生长旺盛, 移栽后成活率可达 95%; 处理 S₁ 激素浓度过高, 苗高和根长分别较处理 S₂ 低 29.2% 和 32.5%, 生根率低, 且根基部出现膨大或褐化现象, 苗木生长缓慢细弱, 部分苗木不生根, 长势弱, 移栽后成活率低; 处理 S₃ 激素浓度偏低, 苗高和根长分别较处理 S₂ 低 18.4% 和 23.2%, 生根率较低, 根系较弱, 移栽后成活率不高, 抗性差。

表 4 不同处理的生根培养效果

Table 4 The rooting effect of different treatments

处理 Treatment	苗高 Seedling height//cm	根长 Root length//cm	生根率 Rooting rate//%
S ₁	3.69	2.68	72
S ₂	5.21	3.97	95
S ₃	4.25	3.05	81

3 结论与讨论

该研究结果表明, 辣木种子使用乙醇和氯化汞灭菌 1 次的效果最好, 但容易灼伤种子, 引起褐化, 降低发芽率。新洁尔灭和次氯酸钠污染率次之, 基本无灼伤, 但污染率高, 这与类似研究得出的结果相一致^[6]。在实际操作时, 辣木种子比较轻, 容易漂浮起来, 灭菌不彻底, 可以用纱布包起来灭菌, 灭菌过程结束后, 晾干再接种。不同浓度激素对外植体诱导有显著影响, 处理 Y₃ 为最佳培养基配比, 接种 4 ~ 6 d 时开始萌动, 下胚轴基部有白色疏松的愈伤组织, 8 d 左右出现绿色凸起, 10 ~ 12 d 诱导出不定芽。从试验中发现, 激素浓度过高, 愈伤组织易膨大、畸形并难诱导出芽; 激素浓度过低, 又影响芽的萌动。试验结果表明, 在诱导阶段, 1/2MS 作为基础培养基, 明显优于 MS 培养基, 说明在一定浓度范围内, 辣木对培养基的吸收利用量是一定的, 浓度过高反而会抑制苗木的生长。当辣木茎段进行初代培养诱导出的芽伸长至 3 ~ 5 cm 时, 将其切下接种在辣木增殖培养基中, 定期观察其增殖情况。培养时, 要注意掌握好暗培养、弱光培养及自然光培养的时间, 才能够获得生长健壮、增殖个数适宜的芽, 建

(下转第 148 页)

表2 培养基对试管苗增殖生长的影响

Table 2 Effects of medium on proliferation growth of tube seedling

编号 No.	培养基 Medium	1个继代周期平均增殖梢数 Average number of proliferating shoots per subculture//个	增殖生长形态表现 Growth behavior of proliferation
1	MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L	4.1 ± 0.3 b	伸长生长良好,叶片伸展、较大,叶色黄绿
2	WPM + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L	2.3 ± 0.2 c	伸长生长良好,叶片伸展、大,叶色绿
3	QL + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L	5.1 ± 0.6 a	伸长生长较差,叶片卷曲、较小,叶色黄绿
4	MS + BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L	5.3 ± 0.7 a	伸长生长较差,叶片卷曲、较小,叶色黄绿

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$)

表3 培养基对试管苗生根的影响

Table 3 Effects of medium on rooting of tube seedling

编号 No.	培养基 Medium	生根率 Rooting rate %	平均单株生根数 Average rooting number per plantlet
1	MS + IBA 1 mg/L	83.8 a	2.5 b
2	MS + IBA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L	85.1 a	2.6 b
3	MS + IBA 2 mg/L	87.7 a	2.9 ab
4	MS + IBA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L	83.5 a	3.2 a

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$)

最适培养基组成因基因型的不同而不同。

不同品种或类型试管苗的增殖所用基本培养基、激素种类及浓度都有所不同。黑刺李^[11]、日本李^[6,10]等在添加细胞分裂素 BA 的 MS 培养基中获得了丛生芽增殖,而野生欧洲李在 MS 和 B5 培养基上都获得了良好的增殖^[7]。该研究中的“红美丽”李在 QL 培养基上可获得增殖倍数高的试管苗,而在 WPM 培养基上可获得健壮生长的试管苗,这 2 种培养基交替使用可获得既有良好增殖又有健壮生长的试管苗,这

同孙清荣等^[8]报道的 MS 和 WPM 培养基交替使用才能获得正常生长的“红艳 1 号”李试管苗的研究结果相一致。

参考文献

- [1] 何志祥, 曾艳玲, 谭晓凤. 冠梨茎段组织培养的研究[J]. 中南林业学院学报, 2006, 26(1): 66-68.
- [2] 裴东, 郑均宝, 凌艳荣, 等. 红富士苹果试管培养中器官分化及其部分生理指标的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 229-234.
- [3] 孙清荣, 孙洪雁, 刘鹏, 等. 杏品种龙王帽茎尖培养试验[J]. 中国果树, 2005(1): 19-21.
- [4] 孙洪雁, 孙清荣, 单公华, 等. 鲁枣 1 号组织培养和植株再生体系研究[J]. 山东农业科学, 2012, 44(1): 14-16.
- [5] 夏国海, 叶霞, 赵冰梅, 等. 樱桃组织培养研究进展[J]. 中国果树, 2003, 16(3): 46-50.
- [6] 陈卫雪, 石开明, 李闯, 等. 空心李组织培养条件研究[J]. 园艺与种苗, 2014(2): 47-49, 53.
- [7] 耿文娟, 吴玉霞, 袁海英, 等. 野生欧洲李组织培养技术[J]. 经济林研究, 2009, 27(1): 45-48.
- [8] 孙清荣, 王金政, 薛晓敏, 等. 欧洲李“红艳 1 号”的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2015, 51(7): 1024-1028.
- [9] 王金政, 李林光, 邹显昌. 极早熟李优良品种红美丽引种研究报告[J]. 山西果树, 1996(4): 16-17.
- [10] 赵艳华, 程和, 吴雅琴, 等. 李离体茎尖组培快繁试验[J]. 河北果树, 2009(3): 12-13.
- [11] 吴建华, 王立英, 闵丽霞. 黑刺李的组织培养与快速繁殖[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 37, 51.

(上接第 141 页)

立有效的无菌芽繁殖体系。增殖培养基中, 激素 6-BA 和 NAA 的浓度配比非常重要, 直接影响着增殖个数和有效芽的质量。在生根培养试验中, 处理 S₂ 为最佳配方, 接种 6 d 后芽基部开始形成根原基凸起, 8~10 d 出现小根, 15~20 d 长出茁壮的根系。由于组培苗是在无菌、恒温等人工控制的环境下生长, 因此炼苗过程非常重要。

基础培养基有效保证了辣木的生存和生理活动所需的基本营养物质及能量, 在适当植物生长调节剂配比下, 诱导细胞分裂分化, 愈伤组织进一步发育成根茎叶, 形成完整的植株, 也正是组织培养的难点所在, 除此之外, 在培养时, 还要注意温度、湿度和光照等培养条件, 寻找最佳的培育条件, 从而建立高效的无菌组培体系^[7-8]。在植物组培快繁过程中, 培养基、接种器具、超净工作台、接种室灭菌不规范等均可导致污染的发生, 而植物本身在茎叶表面容易滋生大量的微生物, 甚至一些菌丝体侵入表皮的薄壁组织, 不能被一般的表面灭菌方法所清除, 随着材料带入培养过程, 引起内生菌污染^[9]。该试验采用了益培灵这种新型组织培养专用防污染杀菌剂, 可有效减轻微生物污染, 提高成活率和成功率^[10]。在后续试验中, 使用和筛选新型组织培养专用防污

染杀菌剂, 对减轻微生物造成的污染, 提高培养成功率和培养物的成活率, 降低生产成本, 提高经济效益等都有重要意义。目前世界上还有很多辣木资源未被合理利用, 可以收集不同辣木品系, 建立辣木种质资源体系, 加速优良无性系的选育推广^[11]。

参考文献

- [1] 张燕平, 段琼芬, 苏建荣. 辣木的开发与利用[J]. 热带农业科学, 2004, 24(4): 42-48.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 杨春梅, 屈云慧, 汪国鲜, 等. 辣木组织培育和快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2218-2221.
- [5] 罗云霞. 辣木组织培养繁殖技术研究[D]. 昆明: 西南林学院, 2007: 1-64.
- [6] 张婧. 辣木组织培养及有效成分分析[D]. 福州: 福建林业大学, 2013: 1-64.
- [7] 潘瑞识. 植物生长调节剂原理与应用[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2003.
- [8] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 15.
- [9] 李晓燕. 抑菌剂抑菌能力比较及其对组培苗生长发育的影响[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2010: 1-74.
- [10] 施隆文, 汪霞, 卢佳. “益培灵”的抑菌效果及对大花蕙兰类原球茎增殖与分化的影响[J]. 北方园艺, 2012(4): 123-125.
- [11] 刘子记, 孙继华, 刘昭华, 等. 特色植物辣木的应用价值及发展前景分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1871-1878.