

芦荟的组织培养与快繁技术

吕复兵, 朱根发, 陈明莉

(广东省农业科学院花卉研究所, 广州 510640)

中图分类号: S682.33, S603.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2000)04-0032-02

芦荟学名为 *Aloe*, 属百合科芦荟属, 多年生常绿多肉草本植物, 原产非洲, 全世界约有 300 余种, 相当一部分具有观赏价值。其中, 库拉索芦荟、木立芦荟等品种含有的芦荟素等物质具有药用价值而被用作保健品、化妆品和食品的原料。在美国、日本等发达国家, 芦荟作为一种保健佳品已有 30 多年的历史。近年来, 在我国随着一些芦荟产品的问世及一些芦荟产品公司的大力宣传。首先在沿海一些城市刮起一阵“芦荟风”, 此风逐渐北上、波及全国, 在全国掀起了一股“芦荟热”并逐渐升温。目前市场上五花八门、形形色色的芦荟产品铺天盖地, 许多口服液、化妆品都标上了“芦荟”字样。在这股热潮的冲击下, 对芦荟的需求也越来越大, 常规的分株、扦插等繁殖方法远远满足不了市场的需求。在这样的背景下, 以组织培养为基础的芦荟种苗工厂化生产如雨后春笋蓬勃发展且规模迅速扩大。年产几万、几十万组培苗的工厂已为数不少, 有些甚至年产超过百万。即使这样, 由于我国芦荟发展起步晚, 目前全国种植面积也只有 600hm² 左右, 与美国的 66 万 hm² 相距甚远。由此可见我国的芦荟种苗的市场广阔、前景看好。为了使芦荟组织培养快速繁殖技术迅速推广, 以解决芦荟种苗市场供小于求的问题, 本文将目前市场上畅销的库拉索芦荟 (*Aloe vera*) 的组织培养文献结合我们的实际工作经验加以综述, 供读者参考。

1 接种材料的选择与灭菌

由于培养策略不同, 不同的研究者所选取的外植体也有所不同。总的看来采用营养组织的居多。Natali 等^[1] 选取成年母株的 7~8mm 茎尖, 经表面灭菌后, 在解剖镜下剥取顶端分生组织作为接种材料。Meyer 等^[2] 从成年母株的分株苗中选取 8~10cm 的小植株, 除去根及外部四片叶, 用自来水冲洗干净, 整株表面灭菌后在无菌条件下除去余下的叶、茎端和茎基, 用整个去顶的茎干作外植体。这些外植体经诱导培养可直接产生丛生芽(包括腋芽和不定芽)。一般说来, 只要培养基合适, 用腋芽

或顶芽作外植体较易成功^[3]。Roy 等^[4] 选取了从母株地下茎上新长出的 3~5cm 长的幼嫩腋芽, 切成 0.5~1cm 小段作外植体诱导出愈伤组织并再生植株。我国学者桂耀林^[5] 等选取了相似的材料也培养成功。Richwine 等^[6] 选取未成熟花序(花芽膨胀前)的含有苞片(最少一个)的切段作外植体, 这是外植体的又一来源, 对于营养芽易污染的植株特别有用。

关于外植体灭菌, 常用的药剂有乙醇、升汞、次氯酸钠及漂白粉等。通常乙醇不单独使用, 都是与其它灭菌剂配合, 对材料进行预灭菌, 使用浓度一般为 70%~75%, 灭菌时间为 30~60s; 升汞的使用浓度为 0.1%~0.2%, 灭菌时间为 10min 左右; 次氯酸钠的使用浓度为 9% 左右, 灭菌时间为 7min 左右, 灭菌时要不断摇动; 漂白粉的使用浓度为 10%, 灭菌时间为 10min。为了使灭菌剂更有效地发挥作用, 可在灭菌溶液中加入 0.1% 左右的吐温 20 或适量的吐温 80。材料灭菌后要用无菌水冲洗 5 次左右, 使用升汞则要清洗 8 次左右。

2 繁殖中间体的诱导与增殖

繁殖中间体是指外植体经培养形成的具有无限增殖力且能再生小植株(组培苗)的组织培养物。繁殖中间体的诱导一般可通过三条途径^[7]: 一是器官发生途径, 即通过外植体腋芽发育和不定芽的产生, 形成丛生芽块的过程; 二是愈伤组织诱导及再分化途径, 即外植体首先经诱导形成愈伤组织, 然后再经分化培养形成不定芽的过程; 三是胚状体发生途径, 即通过外植体直接诱导产生胚状体或先形成愈伤组织, 再经愈伤组织形成胚状体的过程。在芦荟组织培养过程中, 这三条途径都存在, 对于胚状体发生途径的说法不一, 有人认为所形成的胚状体应称为球状体。

芦荟组织培养所使用的基本培养基几乎都是 MS 培养基。Richwine^[6] 用未成熟花序作外植体时, 使用了修改的 MS 培养基[MS 盐和 Nitsch (1967) 培养基的维生素]。

对于不同的外植体材料和不同的培养策略, 所用的

激素组合不同, 接种材料在培养基中的表现也不同。以微茎尖作外植体^[1], 仅用细胞分裂素(BA 或 KT)导致外植体严重褐化, 最后死亡。仅用 2, 4-D, 外植体形成黄色易碎的愈伤组织, 但这些愈伤组织无形态发生能力。2, 4-D 加高浓度 BA(2mg/L)导致外植体褐化和愈伤组织形成; 2, 4-D 加低浓度 BA(1mg/L 和 0.5mg/L)仅诱导初始外植体发育, 只有 2, 4-D+KT 诱导了微茎尖形成丛生芽块, 建立了繁殖中间体, 2, 4-D 与 KT 的最佳组合为 0.24mg/L 2, 4-D+0.5mg/L KT。外植体接种 15d 后即可形成丛生芽块, 60d 后丛生芽块可继代培养(每月继代 1 次)。最适的继代增殖培养基为 MS+0.024mg/L 2, 4-D+0.5mg/L BA。用去顶芽的茎干作外植体^[2], 腋芽和不定芽的最适诱导、增殖和生根培养基皆为 MS+1mg/L IBA。2, 4-D 单独使用抑制形态发生。KT、BA 和 TDZ 单独使用对外植体有毒, 外植体产生褐色分泌物, 最后死亡。比较试验结果表明, IBA 比 NAA 和 IAA 更有效。用未成熟花序的带苞片切段作外植体^[6]也能诱导产生芽丛, 建立繁殖中间体, 但培养基稍微复杂一点, 如前所述, 要用修正的 MS。外植体接种于含 1.2mg/L ZT(玉米素核糖核苷)的培养基后, 8~12 周芽萌发。丛生芽继代增殖培养基为修改的 MS+1.2mg/L ZT 或 0.9mg/L BA。

上述外植体都是通过以芽(营养芽或花芽)生芽(腋芽或不定芽), 形成丛生芽块, 从而建立繁殖中间体, 属器官发生途径。

Roy 等^[4]用新长出的幼嫩腋芽切段作外植体, 成功地诱导出了愈伤组织, 筛选出了最佳诱导培养基 MS+2, 4-D1mg/L+KT0.2mg/L。培养基中附加 P-氨基苯甲酸(0.1mg/L)能促进愈伤组织旺盛生长。此后, 降低培养基中 2, 4-D 的浓度, 同时增加 KT 的浓度能促进愈伤组织分化出芽。最佳的芽分化培养基为 MS+2, 4-D0.02mg/L+KT1mg/L。Roy 等的试验成功不仅为芦荟的快速繁殖又提供了一条技术途径, 而且它还还为芦荟品种的改良打下了基础。芦荟在自然条件下是通过营养繁殖的, 这种繁殖方法导致芦荟栽培品种的遗传变异降低, 遗传基础单一, 这使芦荟品种易于遭受病虫害的侵袭甚至灭亡。从愈伤组织再生植株有利于产生新的遗传变异^[8], 从中可以选择抵抗力强的突变体(体细胞无性系变异), 以改良芦荟品种、提高芦荟的生活力和生存力。桂耀林等^[5]也用芦荟幼嫩茎段作外植体诱导出了淡黄色颗粒状愈伤组织, 但此后愈伤组织不是直接再分化出芽, 而是先从愈伤组织表面分化出球状体(也有人称之为胚状体), 进一步形成不定芽, 生成大量再生植株。诱使这一过程发生并不断重复的最佳培养基为 MS+ZT2mg/L+NAA0.5mg/L。

中间繁殖体诱导和增殖的适宜培养温度为 25℃左

右, 需要持续光照。在中间繁殖体的诱导和增殖过程中, 会产生培养物褐化现象, 这很可能是外植体和培养物分泌的萜类化合物氧化所致, 也有人认为是酚类物质氧化所致。褐化能导致培养物的组织死亡, 影响培养物的生长发育, 甚至可能导致培养物整体死亡。这一问题可以通过三种方法加以克服或减轻: 一是靠培养物自身的生理机能, 生长发育旺盛的培养物的褐化程度明显小于生长发育弱的培养物; 二是在培养基中加入一些抗氧化剂, 如 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、抗坏血酸和活性炭等; 三是适时切除培养物的褐化部分。

3 生根壮苗与移栽

芦荟试管苗生根比较容易, 将长至 2~3cm 的小芽苗转入生根培养基中, 少则几天、十几天, 多则一个月左右, 生根率接近 100%。常用的生根培养基有: MS 基本培养基(无任何激素或生长调节物质)、MS+0.02~1mg/L IBA、1/2MS+0.1~0.5mg/L NAA。待根系生长强壮后, 炼苗几日即可取出试管苗, 洗净根部培养基后移栽, 注意洗苗移栽时不要伤根, 一般成活率极高。移栽基质可用砂、砂+草碳+土(1:1:1)、珍珠岩+泥炭(1:1)或在阴地(4000Lx)作适应性栽培后直接转到自然条件下露地栽培。移栽后的小苗浇水要适量, 不可过多^[1~6, 9]。

参考文献

- 1 Luscia Natali, Isidro Castorena Sanchen and Andrea Cavallini. In vitro Culture of Aloe Barbadosensis Mill; Micropropagation from vegetative meristems. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1990, 20 (1): 71~74
- 2 H. J. Meyer and J. Van staden. Rapid in vitro propagation of Aloe barbadensis Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1991, 26(3): 167~171
- 3 K Hirimburegama N. Gamages. In vitro multiplication of Aloe vera meristem tips for mass propagation. Horticultural Science, 1995, 27(3/4)15~18
- 4 S. C. Roy and Aparajita Sarkar. In vitro regeneration and micropropagation of Aloe vera L. Scientia Horticulturae 1991, 47: 107~113
- 5 桂耀林, 徐廷玉, 顾淑荣等. 芦荟茎组织培养及器官分化的研究[J], 植物学报, 1990, 32(8): 606~610
- 6 Arthur M. Richwine Jimmy L. Tipton and Gary A. Thompson. Establishment of Aloe, Gasteria and Haworthia Shoot Cultures from inflorescence explants. Hortscience, 1995, 30(7): 1443~1444
- 7 陈俊愉, 程绪珂主编. 中国花经[M]. 上海文化出版社, 1990, P67
- 8 P.J. Larkin, W.R. Scowroft. Somaclonal Variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet 1981, 60: 197~214
- 9 林建, 陈绍潘. 芦荟组织培养快速繁殖试验研究[J]. 广西热作科技, 1997, 2: 22~24