

木铎芦荟腋芽离体培养的研究

高永利¹,宗宪春²,刘玉波²

(1.黑龙江省香坊实验农场, 哈尔滨 150030; 2.牡丹江师范学院生物系, 157300)

摘要:以 MS 为基本培养基,以木铎芦荟腋芽为外植体进行离体培养。结果表明:4.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L(毫克/升)NAA 的组合诱导频率最高,经 25 d~30 d(天)培养,芽数可增殖 4.5 倍。诱导生根培养基以 1/2MS 培养基并附加 0.02 mg/L 6-BA、0.1 mg/L(毫克/升)NAA、0.3% 活性炭为最佳。经 15 d(天)培养,生根 4~5 条,苗高达 5 cm~6 cm(厘米)。

关键词:木铎芦荟; 离体培养; 快速繁殖

中图分类号: S682.33; S603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2004)06-0081-02

植物组织培养是本世纪初开始以植物生理学为基础发展起来的一项技术。它是以植物细胞全能性为理论依据,在无菌条件下分离并培养植物的器官、组织或细胞的技术(曹子仪等,1996)。历经近一世纪的辛勤探索,这项技术已在科学研究和生产上开辟了令人振奋的新领域。在快速繁殖、去除病毒、加速育种进程、次生代谢产物生产和种质资源的保存等方面取得了巨大的经济效益、社会效益及生态效益。

植物组织培养的优越性在于:可以研究植物体的某一部分在不受其它部分的干扰下的生长及分化情况,而且可以人为地控制培养条件,从不同角度研究影响被培养部分生长及分化的各种因素。如培养基中各种成分、环境条件的温度、光强、光周期等,从而解决理论和实践上的问题。此外,植物组织培养具有取材少,培养材料经济方便,效率高,周期短的特点。根据植物细胞具有全能性的特点,在实验和实际生产中只需几毫米的材料即可以进行培养。试验微型化,精密化,一个人可以同时多项试验,从而提高了工作效率,方便了管理。还可以避免其它微生物等的干扰。生长快,周期短,一般 1~3 个月为一个生长周期。

近年来,植物组织培养的研究十分活跃。无病毒优良种的生产已广泛应用于花卉、果树、蔬菜等方面,成为植物组织培养在应用上的主流之一(潘瑞之等,1979)。同时用组织培养繁殖难以无性繁殖的植物,这对珍稀、濒临绝种的新品种也是非常有效的快速繁殖方法。据统计,目前用于快速繁殖的花卉有数百种。其中,木铎芦荟的组织培养和快速繁殖也屡见报导:如司徒琳莉的“木铎芦荟愈伤组织的诱导和植株再生”。

木铎芦荟为百合科芦荟属多年生肉质长绿草本植物,原产于非洲和阿拉伯半岛等热带地区(余叔文等,1999)。叶片中含有芦荟大黄素,芦荟宁。芦荟苦素以及各种芦荟肽酶如血管紧张肽等多种芦荟活性成分,具有医药,美容,保健以及食用和观赏等多种功能。可以抗菌,抗癌,强心,镇痛,利尿,健胃,自古以来就有“人类最伟大的医生”的美称(吴毅锡等,

2001)。芦荟的市场需求量很大,但是芦荟植株要生长数年后才开花结实,加之雌雄花开放时间不一致,故种子很少,若采取种子育苗,繁殖率低,手续繁琐。生产上多用简单的分枝法多分株法,其繁殖速度也不快,且不能保证质量,然而组织培养可以弥补这些不足。本文研究了用组织培养技术快速繁殖木铎芦荟的方法,为在短时间内提供大量的组培苗提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

室内盆栽芦荟取自基因所。

1.2 培养基

基本培养基为 MS,按不同的处理方案添加不同类型的植物激素及活性炭,用 1N NaOH 和 1N HCl 调节 pH 值为 5.4~5.8,高压灭菌锅中高温 122℃灭菌 20 min(分钟)。

1.3 实验方法

表 1 培养基成分

培养基 (media)	组成成分 (composition)
1	6-BA _{4.0} +NAA ₀
2	6-BA _{4.0} +NAA _{0.1}
3	6-BA _{4.0} +NAA _{0.2}
4	6-BA _{4.0} +NAA _{0.3}
5	6-BA _{4.0} +NAA _{0.5}
6	6-BA ₀ +NAA _{0.1}
7	6-BA _{1.0} +NAA _{0.1}
8	6-BA _{2.0} +NAA _{0.1}
9	6-BA _{3.0} +NAA _{0.1}
10	6-BA _{4.0} +NAA _{0.1}
11	6-BA _{5.0} +NAA _{0.1}

1.3.1 无菌材料的获得 取两年生木铎芦荟幼苗,剥去外层老叶后用流水冲洗干净,切取腋芽留用。在超净工作台上用 75%酒精消毒 30 s(秒),放入无菌水中冲洗一次,再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 7 min~8 min(分钟)。灭菌后用无菌水冲洗 4 次,每次大约 2 min(分钟),在无菌条件下把芦荟腋芽放入带滤纸

条的无菌培养皿中。待吸干表面水分后将材料用无菌工具切割成 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ (平方毫米) 小块, 作为供试外植体。

1.3.2 丛生芽诱导培养 将无菌外植体接种在培养基上进行丛生芽的诱导。每瓶接种 3~5 片外植体, 以 MS 作为基本培养基, 附加细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA, 调整激素配比, 见表 1。接种后先暗培养 4 d~5 d(天), 然后置于光下培养, 光照强度 $1\,500 \text{ Lx} \sim 2\,000 \text{ Lx}$, 每天光照 12 h(小时), 温度 $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.3.3 壮苗培养 将丛生苗转入壮苗培养基中进行壮苗。壮苗培养基为 MS 附加 2.0 mg/L 6-BA, 0.2 mg/L (毫克/升) NAA 及 0.3% 活性炭, 光照 12 h/d (小时/天), 光强 $1\,500 \text{ Lx} \sim 2\,000 \text{ Lx}$, 培养温度 $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.3.4 诱导生根培养 取生长良好的试管苗进行诱导生根。生根培养基为 $1/2\text{MS}$, 附加 0.02 mg/L (毫克/升) 6-BA, 不同浓度的 NAA 及 0.3% 的活性炭, 其它培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 丛生芽的诱导增殖及丛生苗的壮苗

将外植体接种在不同激素配比的培养基 1~11 上, 培养 8 d(天)后切口附近可以膨大, 12 d(天)左右在边缘出现浅绿色米粒状愈伤组织。25 d~30 d(天)后陆续出现细小的突起即为芽点。其中 1、2、10 号培养基出芽数量最多, 3、8、9、11 号培养基出芽数量较多, 4、5、7 号培养基出芽数量少, 6 号培养基无芽出现。芽的具体长势及分化程度见表 2。

表 2 不同浓度与不同激素对芽分化的比较

培养基序号	激素 (mg/L)	接种个数 (外植体)	长芽 个数	芽的状况
1	6-BA _{4.0} +NAA ₀	20	280	芽多, 细弱
2	6-BA _{4.0} +NAA _{0.1}	20	300	芽多 粗壮 分化清晰
3	6-BA _{4.0} +NAA _{0.2}	20	260	芽多 分化清晰
4	6-BA _{4.0} +NAA _{0.3}	20	150	芽少 分化不清晰
5	6-BA _{4.0} +NAA _{0.5}	20	60	芽少 分化差
6	6-BA ₀ +NAA _{0.1}	20	0	无芽 分化不清晰
7	6-BA _{1.0} +NAA _{0.1}	20	40	芽少 分化差
8	6-BA _{2.0} +NAA _{0.1}	20	160	芽多 分化清晰
9	6-BA _{3.0} +NAA _{0.1}	20	224	芽多 分化清晰
10	6-BA _{4.0} +NAA _{0.1}	20	280	芽多 粗壮 分化明显
11	6-BA _{5.0} +NAA _{0.1}	20	185	芽多 分化不明显

从表 2 可以看出: 1~5 号培养基比较, 说明在 6-BA 浓度相同时, NAA 影响芽的增殖率。高浓度的 NAA, 明显抑制

了芽的产生, 当 NAA 为 0.1 mg/L (毫克/升) 时, 芽的增殖效果最好, 不加 NAA, 则芽变细弱, 不利于壮苗。6~11 号培养基比较, 说明在 NAA 浓度相同时, 随着 6-BA 浓度的增高, 分化的芽也随着增多, 当 6-BA 为 4.0 mg/L (毫克/升) 时, 芽分化达最高值, 以后随着 6-BA 浓度的再增高, 芽分化反而减少。结果表明: 6-BA_{4.0}与 NAA_{0.1} 的组合最适合于芽的诱导及分化。小芽生长 20 d(天)左右转接到壮苗培养基中培养, 壮苗后细密的丛生苗变得粗壮, 利于生根培养。

2.2 诱导生根培养

取 $3 \text{ cm} \sim 4 \text{ cm}$ (厘米) 高的大芽转到生根培养基中进行生根诱导, 15 d~20 d(天)后开始发根, 生根培养基为 $1/2\text{MS}$ 附加 0.02 mg/L (毫克/升) 6-BA, 0.3% 活性炭及不同浓度的 NAA, 培养 45 d(天)后, 结果见表 3。

表 3 不同浓度的 NAA 对诱导生根的影响

NAA 浓度 (mg/L)	供试苗数 (株)	生根苗数 (株)	生根率	根系 生长情况
0	20	12	60%	纤细脆弱
0.02	20	16	80%	较粗壮
0.05	20	19	95%	粗细均匀健壮
0.1	20	20	100%	最均匀最健壮
0.5	20	17	85%	过于粗壮

表 3 可以看出: NAA 在生根过程中起着明显的作用, 在一定范围内, 随着 NAA 含量的增加, 生根率逐渐增高, 根生长状况也越来越好。当 NAA 为 0.1 mg/L (毫克/升) 时, 生根率最高达 100%, 发根时间也较短, 平均为 15 d(天), 根长势也最好, 幼苗高达 $5 \text{ cm} \sim 6 \text{ cm}$ (厘米), 生长状况良好。低于或高于此浓度则生根率明显下降, 根也粗细不均。

2.3 炼苗与移栽

当苗长至 6.5 cm (厘米) 左右, 挑选出达到移栽标准的试管苗。打开瓶口在光线充足又无强光直射的地方炼苗 2 d~3 d(天), 取出试管苗, 用多菌灵 ($800 \text{ mg/L} \sim 1\,000 \text{ mg/L}$ (毫克/升)) 处理根部, 移栽到富含腐殖质, 疏松肥沃排水良好的沙土中。保持适宜的温度和湿度, 避免阳光直射, 观察幼苗生长状况, 采用适当的杀菌剂保护。小苗成活率很高, 可达 98% 以上。

3 结论

本实验研究了木铎芦荟腋芽的离体培养及快速繁殖。其中, 诱导丛生芽的培养基以 MS+6-BA_{4.0}+NAA_{0.1} 为最佳, 诱导生根的培养基以 $1/2\text{MS}+6\text{-BA}_{0.02} \text{ mg/L}+\text{NAA}_{0.1} \text{ mg/L}$ (毫克/升) 并附加 0.3% 活性炭为最佳。

参考文献:

- [1] 曹子仪, 刘国民. 实用植物组织培养技术. 甘肃出版社, 1996, 13.
- [2] 潘瑞之, 董愚得. 植物生理学. 高等教育出版社, 1979, 249.
- [3] 余叔文, 汤章程. 植物生理与分子生物学. 科学出版社, 1999.
- [4] 吴毅锡等. 几种影响芦荟芽器官发生和植株再生的研究. 裘闻达植物生理学通讯, 2001.