

辣木组织培养技术研究进展^①

黄洲 陈思 庞基良

(杭州师范大学生命与环境科学学院 浙江杭州 310036)

摘要 辣木作为一种新兴的多功能经济树种。近年来,因市场需求旺盛,资源短缺,促使辣木组织培养技术发展迅速。本文综述了辣木组培外植体的选择、增殖培养、瓶内生根以及炼苗移栽等方面的研究进展,并对培养过程中存在的问题进行了分析,以期对辣木的组培提供一定的参考。

关键词 辣木;组织培养;外植体

中图分类号 Q943.1 文献标志码 A Doi: 10.12008/j.issn.1009-2196.2017.04.010

Research Progress in Tissue Culture of *Moringa oleifera* Lam.

HUANG Zhou CHEN Si PANG Jiliang

(College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036)

Abstract As a multi-functional economic tree species, *Moringa oleifera* Lam has been developed rapidly in recent years due to high market demand, and its rapid propagation via tissue culture has also been developed very fast. The research progress in the selection of explants, multiplication culture, rooting culture, acclimatization and transplantation of *M. oleifera* Lam were reviewed. The exiting problems arising from tissue culture of *M. oleifera* Lam were analyzed to make reference for the tissue culture of *M. oleifera* Lam.

Keywords *Moringa oleifera* Lam; tissue culuture; explant

辣木(*Moringa* sp.)为辣木科(Moringaceae)辣木属(*Moringa Adans.*)多年生木本植物,别名“油辣木”、“辣根树”或“鼓槌树”,原产热带、南亚热带的干旱或半干旱地区^[1]。辣木作为一种用途广泛的速生树种,整株均有利用价值,其根和树皮是传统的医药原材料;嫩叶和嫩果荚营养丰富而全面,适宜食用;种子富含油脂,且油脂质量很高,通常被食用或作为高档化妆品的添加剂;种子榨油后剩下的枯饼对污水有较好的净化作用^[2-3]。由于辣木全身是宝,我国云南、海南、四川、福建等气候适宜地区都有引种栽培。而传统的繁殖方式主要是通过种子育苗,但这种方法存在性状不稳定、抗病差、产量低等问题,再加上辣木种子价格昂贵,随储存时间的延长其发芽率又逐渐下降^[4],所以辣木种苗资源短缺,使得近年来人们开始探索利用组织培养的方式建立辣木的快速繁殖体系,来获得大量

优质的辣木种苗^[5],以满足市场对辣木的大量需求。本文对近些年辣木组织培养技术的研究进展进行了较为系统的综述,以期对辣木组培技术的进一步发展提供参考。

1 外植体的取材和消毒处理

1.1 取材

在辣木的组织培养实验中,外植体主要选用种子和辣木实生苗的不同器官。用辣木的种子作为外植体操作较容易,消毒方便,污染率低,并且组培过程中萌发率高,培养的幼苗生长较快^[6]。根据杨俊俊等^[5]报道,切下辣木种子萌发的无菌苗的子叶结组织培养,增殖倍数可以达到6左右,平均35d即可获得生根苗且用种子作为组织培养的原始材料可以保持种子的优良性状。而以辣木实生苗的一些器官作为外植体材料资源丰富,取材方便。武新琴

基金项目:杭州市科技局项目(No.CC15022)。

收稿日期:2016-12-26;责任编辑/叶庆亮;编辑部 E-mail: rdnk@163.com。

黄洲(1993~),男,在读硕士,主要从事植物发育生物学研究。

通讯作者, E-mail: pangrenshuilian@aliyun.com。

等用传统辣木实生苗的嫩梢^[7]，朱尾银用优树新长出的嫩芽^[8]，姜艳等用新抽发的辣木嫩茎^[9]，黎国运等用当年生辣木实生苗顶芽、幼嫩侧枝^[10]，均得到了辣木的组培苗。高燕等^[11]还对比了不同部位嫩芽的诱导效果，发现不同部位嫩芽的诱导效果为中部 > 下端 > 上端。向素琼等^[12]用辣木带腋芽茎段、无芽茎段和叶片进行培养，发现前 2 种都可作为外植体，腋芽出芽快，而茎段的增殖系数高，但叶片分化诱导比较困难，故不适合作为外植体。

1.2 消毒处理

外植体消毒是组织培养中的关键步骤，它直接影响后续实验的进行。在对外植体进行消毒时，消毒方法依据外植体种类的不同而改变。消毒剂的种类、消毒剂浓度以及消毒时间这 3 个因素均会影响消毒效果，从而影响外植体的存活率和污染率。

对于辣木种子来说，首先其外壳在消毒时是否要保留存在争议，有学者认为外壳对内部的种子起到保护的作用，不剥壳可以提高成活率^[13]；但也有些学者认为辣木外壳表面细菌较多，保留外壳会使污染率提高^[14]。对不剥壳的辣木种子消毒时，用 70% 酒精浸泡 30s，再以 0.1% 的升汞处理 8 min，污染率仅为 26.7%^[13]；但升汞是剧毒的化学试剂，所以有研究者认为改用 75% 酒精浸泡 30s + 1% 次氯酸钠处理 15 min 效果更好^[5]。对剥壳的辣木种子消毒时，基本都采用 0.1% 的升汞处理，在升汞处理之前，有用 15% 的 H₂O₂ 先浸泡 6~8 h^[15]，也有用 75% 的酒精浸泡 30 s 至 1 min 的。效果最好的是用 84 消毒液预处理 + 0.1% 升汞处理 15 min，污染率只有 10%^[14]。

在消毒处理除辣木种子外的其他外植体时，一般要先用洗涤剂^[7]或次氯酸钠预处理之后，再用酒精和升汞处理。姜艳等^[9]认为，对于消毒灭菌，实验中次氯酸钠和 75% 的酒精效果相似，都只能杀死表面细菌，组合起来消毒效果欠佳，而升汞(重金属离子使酶损伤甚至失活)和 75% 酒精可以互补不足，因此消毒效果显著。就消毒时间来说，消毒时间过短，外植体容易污染；而时间过长，又会使外植体受到毒害而死亡，所以，需要筛选一个最佳的消毒时间。用辣木茎段作为外植体时，0.2 g/L 升汞处理 5 min 是最佳的消毒时间。

2 外植体的诱导、增殖培养

2.1 基本培养基的选择

据报道辣木茎段组织培养使用过的培养基主要是 MS、WPM 和改良的 MS 培养基。朱尾银^[8]比较了 3 种培养基的优劣，得出不管是在辣木茎段的诱导阶段，还是增殖阶段，改良 MS 培养基都是最适合的培养基。在改良 MS 培养基上诱导出的芽大多为丛芽，没有黄化现象，且诱导和增殖系数最高。辣木种子作为外植体时使用的培养基有 1/2 MS、MS、改良 Mc(钙盐 1/2、钾盐 4/5)和 B5 等^[14]，其中改良 Mc 培养基中种子发芽率最高，所以高浓度的无机盐有利于辣木种子的萌发。

2.2 激素种类和浓度

基本培养基只能使外植体存活下来，如果想要获得更加优质的试管苗，需要按照不同要求添加相应的植物生长调节剂来促使其生长和分化。而决定植物形态发生启动和分化方向最重要的 2 个因素是生长素和细胞分裂素浓度的配比。在辣木的诱导和增殖阶段，通常使用的激素为 6-BA 和 NAA，对于 6-BA，单独使用浓度在 0.4~2.0 mg/L^[14]。根据相关研究，其用量与愈伤组织的生长呈正相关；在一定范围内，6-BA 浓度越高，侧芽生长越明显，茎节距越小^[7,16]；向素琼等^[12]也得出，当 6-BA > 0.6 mg/L 时，增殖系数不增反降，并且植株下部叶片黄化、顶端萎蔫，说明过量的细胞分裂素对辣木生长不利。对 NAA 来说，培养基中添加少量的 NAA 可以促进茎的生长，但浓度升高以后，茎的生长速度又会受到抑制^[7]，这和 6-BA 的反应类似，说明过量的生长素也不利于辣木生长。这可能是由于辣木是速生树种，本身内源激素含量高，所以其生长更偏向低浓度的生长调节剂。罗云霞等^[15]在辣木增殖培养基中添加了 0.6 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA，增殖倍数可达 5.8。而在杨俊俊等^[5]的实验中单独添加了 6-BA，不仅减少了激素的种类，还提高了增殖倍数。所以就单一激素而言，辣木增殖的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA。

2.3 培养条件

一般的培养条件大都是在基本培养基中添加蔗糖 30 g/L、琼脂 6~8 g/L，用 1 mol 的 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 5.8 左右；培养基在 121°C、131 kPa 的

条件下灭菌不超过 20 min。接种后培养温度为 25~30℃, 光强度为 2 000 lx, 光周期为 12 h 光照、12 h 黑暗的条件。褐化和玻璃苗是影响木本植物快速繁殖的 2 个最大障碍, 辣木组培过程中也同样存在这些问题。王洪峰等^[17]研究表明, 在辣木的组培过程中, 通过增强光照可以控制苗的玻璃化; 减少琼脂的用量, 缩短培养的时间, 增加继代的频率也可以减少苗的黄化。黎国运等^[10]采用将外植体先暗培养一段时间, 再见光的方法基本解决了辣木外植体氧化褐变的现象, 并且用自然散射光代替日光灯, 使得玻璃化苗减少, 芽苗生长健壮。

3 试管苗的生根培养

培养基种类、激素、外源添加物等对组培苗的生根均会产生一定的影响。据报道, 辣木的生根诱导比较容易^[18], 在辣木的生根阶段, 大多使用 1/2 MS 培养基, 减少蔗糖和琼脂的用量, 添加的激素有 I-BA、NAA 和 IAA, 单独使用 IBA 0.01~0.5 mg/L^[12-13, 15]或 NAA 0.2~1.0 mg/L^[7]均可促进不定根生长, 这 3 种激素的诱导效果是 IBA > IAA > NAA, 并且根据 R K Saini^[19]等的研究结果显示 IBA 和 IAA 复合使用比单一任何一种激素诱导效果都要好, 0.5 mg/L IAA + 1 mg/L IBA 的生根诱导率可以达到 100%。李惠波^[16]等在辣木生根的过程中加入一定量的活性炭, 用于抑制辣木愈伤组织的生长, 提高生根苗的质量, 从而提高移栽的成活率。黎国运等^[10]探索了无机盐浓度对辣木生根的影响, 得出高无机盐对生根不利, 且易使切面产生愈伤组织, 所以生根时应降低无机盐的浓度。辣木根系很脆, 移栽清洗培养基时, 根系容易断裂, 不利于移栽, 因此武新琴等^[7]在诱导生根阶段, 采用形态学上端朝下接种, 结果植株仍可在形态学下端生根, 根部没有培养基使清洗变得容易, 有利于移栽成活。

4 炼苗移栽

组培苗是处于一个以蔗糖作为碳源, 恒温、高湿的无菌环境中, 这与自然界中的植物所处的靠光合作用自养, 多菌、气温变化无常的环境有很大的区别, 因此在组培苗移栽之前, 通常需要进行炼苗, 使其逐渐适应外界环境, 从而提高成活率。辣

木的组培苗炼苗时间和移栽介质每个研究者不尽相同, 但在辣木的移栽过程中都需要注意以下三点: 第一, 由于辣木的根为肉质根, 含较多水分, 所以移栽介质应选较为透气、排水良好的, 以免根系腐烂; 第二, 辣木组培苗非常容易失水, 因此环境的湿度一定要足够高; 第三, 辣木是热带树种, 移栽环境的温度也要保证。马崇坚等^[20]将试管苗放在阴凉处 2 d, 再置于育苗棚内继续炼苗 3d 左右, 移入装有腐殖土和细沙按 2:1 的比例混合的基质的花盆中。盖上塑料薄膜保湿 5~7 d 后移去, 最后成活率可以达到 100%。黎国运等^[10]将试管苗移栽入红心土和河沙按 4:1 配比的基质中, 成活率也在 80%以上。而赵翠翠等^[6]将试管苗炼苗 3 d, 移栽入珍珠岩和营养土 1:2 的基质中, 成活率只有 22.5%。从中可以看出, 辣木组培苗移栽成活率还相差较大, 需要进一步探索基质条件、移栽时间、环境条件等以建立一套普遍适用的体系来提高其成活率。

5 存在的问题及展望

由于辣木潜在的商业价值, 近年来, 国内外对辣木生产的研究已经开始加快。运用植物组织培养技术, 对辣木种质资源的保存和开发有着重要意义。开展辣木组织培养研究, 为保存不同基因型辣木的优良性状提供技术支撑, 可以使优良种质资源得以保存, 为优化的再生体系建立提供了保障。与常规育苗方法相比, 组织培养育苗可大大缩短培养周期, 在操作上更加简便, 并能培育出生长一致的组培苗, 不受季节地域的限制。而且通过建立起一套完整的组织培养体系, 可为辣木的工厂化育苗提供相应的理论基础, 为国内的辣木市场提供新的技术指导。虽然近年来关于辣木的研究有所增加, 但大多集中于其所含营养成分的分析及其在医药领域的作用, 而进行组织培养方面探索的学者较少, 所以在实际生产操作中仍旧存在较多问题, 例如: 在组织培养过程中, 污染率仍然较高, 分化率、成活率、生根率仍然有待提高; 炼苗时间差异较大, 移栽成活率不高; 组培苗还存在黄化萎蔫等现象。

为了真正实现工厂化育苗和人工栽培, 除了组培快繁要提高效率之外, 辣木种质资源的优选也十分重要。在辣木优良品种的选育方面, 有研究者将

辣木染色体加倍^[12,21-22], 希望以此来提高辣木产量, 并且增加其中营养成分的含量, 增强其抗逆性。

我国辣木的种植规模还比较小, 后续开发的产品也很单一, 人们对它的认知度还不高。所以, 辣木要产业化, 必须要将各方面综合起来全面发展, 扩大种植面积, 增加产品的开发力度, 对其进行深加工, 加大宣传, 提高辣木的知名度等。通过上述举措增大辣木的市场需求, 从而推动辣木的研究。

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] Ndagengesere A, Narasiah K S. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds [J]. Water Research Oxford, 1998, 32(3): 781-791.
- [3] 饶之坤, 封良燕, 李 聪, 等. 辣木营养成分分析研究[J]. 现代仪器, 2007(2): 18-20.
- [4] 龚德勇, 刘清国, 班秀文, 等. 辣木种子的发芽特性及育苗试验初报[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(Z1): 80-81.
- [5] 杨俊俊, 曲美玲, 李 月, 等. 辣木快速繁殖体系[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2015(3): 65-70.
- [6] 赵翠翠. 多用途木本植物辣木快繁体系建立的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [7] 武新琴, 智 顺. 不同激素配比对辣木组培苗生长的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2012, 32(5): 387-390.
- [8] 朱尾银. 辣木的组织培养及快速繁殖研究[J]. 安徽农业通报, 2011, 17(7): 54, 107.
- [9] 姜 艳, 高 燕, 耿秀英, 等. 辣木外植体消毒试验研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(17): 232-234.
- [10] 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.
- [11] 高 燕, 姜 艳, 白燕冰, 等. 辣木主枝嫩芽无菌培养及植株再生研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(15): 25-27.
- [12] 向素琼, 梁国鲁, 郭启高, 等. 辣木组织培养与四倍体植株诱导[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 141-146.
- [13] 马秋月, 黄海泉, 黄蔚霞, 等. 辣木组织培养技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2015, (12): 18-21.
- [14] 高 燕, 姜 艳, 李泽生, 等. 辣木组织培养与植物激素培养基筛选试验[J]. 热带农业科技, 2015, 38(3): 23-27, 32.
- [15] 罗云霞, 陆 斌, 石卓功. 辣木组织培养试验研究[J]. 江西林业科技, 2008, 2:20-25.
- [16] 李惠波, 李海泉, 周堂英, 等. 辣木种苗组培快繁技术研究[J]. 热带农业科学, 2016, 39(2): 14-16.
- [17] 王洪峰, 韦 强. 利用辣木茎段建立植株再生体系的研究[J]. 浙江林业科技, 2008, 28(5): 40-43.
- [18] LI G C, ZHOU Q Y, LI X, High-frequency Plant Regeneration from Leaf Cultures of *Moringa oleifera* Lam: a Multipurpose Plant [J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(6): 1 318-1 321, 1 358.
- [19] Saini R K, Shetty N P, Giridhar, G A. Ravishankar. Rapid *in vitro* regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants [J]. Biotech, 2012, 2: 187-192.
- [20] 马崇坚, 王玉珍, 任安祥, 等. 辣木的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 748.
- [21] 张 洁, 何 林, 王力超, 等. 秋水仙素对离体培养辣木多倍体的诱导[J]. 热带农业科技, 2007, 30(1): 27-30.
- [22] 张 洁. 辣木育苗及四倍体新种质诱导技术的研究[D]. 北碚: 西南大学, 2007.