

库拉索芦荟组培快繁技术研究

祁芳斌

(福建广播电视大学 350003)

摘要:以库拉索芦荟的茎尖、茎段为外植体进行组培快繁研究,结果表明:库拉索芦荟的诱导培养,以MS+6-BA 4.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基对芽的诱导效果最佳,芽的诱导分化率最高;增殖培养基以MS+KT 2.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L的增殖效果最佳;高浓度IBA不利于库拉索芦荟试管苗的诱导与增殖;库拉索芦荟试管苗代限为4代,代期在25~35 d。

关键词:库拉索芦荟;组培快繁;代限;代期

芦荟为百合科芦荟属多年生肉质草本植物,迄今为止,已发现有500多个种。芦荟含有18种微量元素、11种游离氨基酸、21种有机酸,以及糖蛋白、维生素、缓激肽等70多种成分和抗癌物质——芦荟素A。因此,芦荟被广泛用作药物、制作饮料(如芦荟酒等)和芦荟化妆品^[1]。芦荟性味苦涩、寒,归经入肝、脾、胃、大肠,具有泻火、通经、消炎、杀虫、解毒等作用,可用于治疗白浊、尿血、闭经、痢肿、胃溃疡等病症;被用于眼科、内科、外科、妇科、口腔科、儿科及老年病等^[2]。芦荟是集药用、食用、美容及观赏于一身的热带植物,有极高的开发应用前景。联合国粮农组织(FAO)将其誉为“21世纪人类的最佳保健品”。随着芦荟的各种医药、功能食品、美容化妆品相继问世并受消费者的喜爱,芦荟种植业也随之得到迅速发展。

然而,芦荟通常采用分株繁殖或扦插繁殖等传统的吸芽繁殖方法,繁殖率低,已不能满足芦荟系列产品的生产要求,于是人们应用生物技术,组织培养快速繁殖芦荟苗^[3],可以在短期内为生产提供大量种苗,以加速新品种的推广。有关芦荟的组织培养和试管苗繁殖,国内外已进行了较多研究,并取得了可喜成效,但同时也碰到了诸多问题,如在芦荟试管苗繁殖的不同阶段,其对植物生长调节剂种类、浓度、数量的要求不同;6-苄氨基嘌呤(6-BA)在芦荟组织培养过程中的沉淀现象会降低试管苗的生根率;生根苗移栽成活率低;试管苗在

大田生长的速度不及分蘖苗等^[4]。

本研究用不同植物生长调节剂比较对库拉索芦荟芽苗分化、增殖的影响,寻找培养库拉索芦荟的最佳条件,为其大规模发展提供质优、价廉的种苗。

1 材料与方 法

1.1 取材与消毒 试验材料以库拉索芦荟一、二年生的茎段、吸芽或顶芽作为外植体。从田间取回芦荟植株,去除外层老叶,并切掉内层较老的叶片,保留基部4~5 cm的茎段作外植体;在清水中冲洗数次,将外植体置于超净工作台上,用70%的酒精浸泡30 s;无菌水冲洗3~5次,再用2%的次氯酸钠溶液或者用0.1%的升汞溶液消毒8~13 min,最后用无菌水冲洗3~5次备用。

1.2 接种与培养 在无菌条件下,将茎段切成0.3~0.5 cm,接种于诱导分化培养基上。培养一个月后,可直接诱导出芽丛。用丛生芽切割成2~3小块,以增殖培养基诱导增殖芽,比较增殖率。

1.3 代次高限及代期的设计 切取已分化的芽苗转入到培养基,即MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L上进行继代培养,观察比较继代培养所需的时间(即代期),以及在变异许可范围内获得有效的增殖个体数量的继代培养次数(即代次高限)。

1.4 培养条件 培养温度为25℃,培养光照1 000 lx,每日光照时间14 h。

2 结果与分析

2.1 芽苗的诱导分化 库拉索芦荟通过茎段、茎尖能快速地诱导出不定芽,不定芽的诱导受植物生长调节剂浓度的调控(表1)。接种后15 d,在MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基上,基

部较易分化出芽点。芽苗的分化随着 6-BA 浓度的升高, 分化率也随之增加; 当 6-BA 为 4.5 mg/L 时, 芽的分化率达到最高值。吲哚-3-丁酸 (IBA) 浓度对芽的分化影响较大, 随着 IBA 浓度的提高, 芽的分化率下降, 表明高浓度的 IBA 对库拉索芦荟芽苗的分化有抑制作用。

表 1 不同培养基对外植体培养的影响

培养基(mg/L)	外植体(个)	不定芽分化率(%)	差异显著性	
			0.05	0.01
MS + 6-BA2.5 + NAA 0.2	40	12.5	c	C
MS + 6-BA 3.5 + NAA 0.2	40	17.3	b	B
MS + 6-BA 4.5 + NAA 0.2	40	20.5	a	A
MS + 6-BA 0.2 + IBA 0.2	40	18.0	a	A
MS + 6-BA 0.2 + IBA 0.3	40	13.0	b	B
MS + 6-BA 0.2 + IBA 0.4	40	6.0	c	C

注: 同一列不同小写字母表示差异显著, 不同大写字母表示差异极显著。

2.2 芽苗的增殖培养 将诱导生成的芽苗移到增殖培养基中, 10 d 后, 每个芽体都能分化出 2~5

个新芽, 25~30 d 可形成大量芽丛。不同生长调节剂对芽的增殖有很大影响。图 1 表明, 在 IBA 浓度 (0.1 mg/L) 一定时, 使用较高浓度的 6-KT 2.5~3.5 mg/L 有利于芽的增殖, 且随着 KT 浓度进一步提高, 不定芽的分化数增多, 但易产生大量的玻璃化苗; 当 KT 浓度 (2.5 mg/L) 一定时, 随着 IBA 浓度增加, 芦荟芽的增殖率呈递减趋势; 当玉米素 (Ze) 浓度 (1.0 mg/L) 一定时, 增加 IBA 的浓度, 芽苗增殖率下降。当 IBA 浓度 (0.5 mg/L) 一定时, 低浓度的 Ze 促进芽苗增殖, 但 Ze 浓度超过 1.2 mg/L 时, 芽苗增殖率下降, 且芽基部愈伤组织增多, 出现玻璃化苗。

细胞分裂素和生长素均能诱导外植体形成愈伤组织, 并由愈伤组织再分化出球状体和不定芽。当生长素 IBA 或 KT、Ze 配合使用时, 对球状体的发生和不定芽的增殖均有一定作用。库拉索芦荟芽的增殖, 以 MS 基本培养基, 附加生长调节剂 KT 2.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 为最佳, Ze 1.0mg/L + IBA 0.5 mg/L 次之, 其增殖的芽较多且粗壮。从图 1 可知, 较高浓度 IBA 对库拉索芦荟芽的增殖不利。

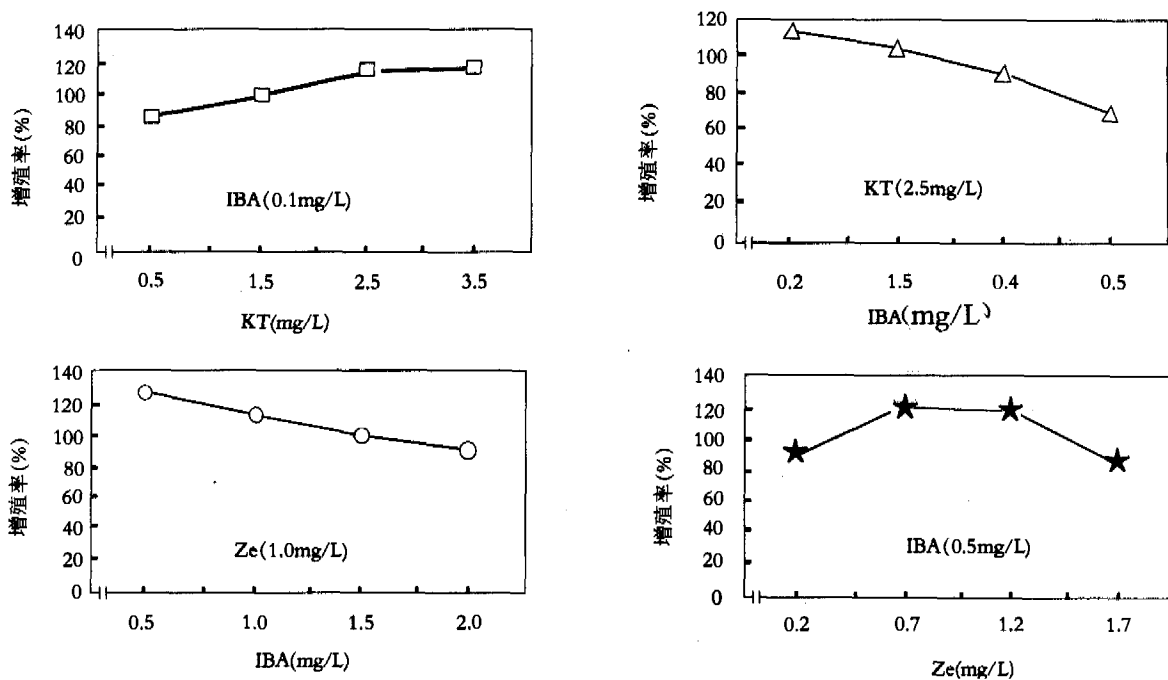


图 1 不同植物生长调节剂浓度对芽增殖的影响

2.3 代次高限的界定 在 MS + 6-BA 3.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 糖 3% + 琼脂 0.7%、pH 5.8 的培养基上, 进行库拉索芦荟无菌苗继代培养。图 2 表

明, 在前 3 代, 增殖率逐渐提高, 到第 4 代达到最高峰, 第 5 代增殖率呈明显下降趋势。

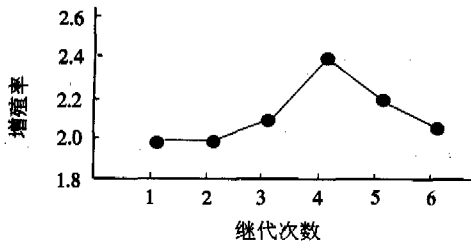


图2 继代次数对增殖率影响

2.4 代期对芽苗的影响 无菌芽苗培养代期低于25 d, 芽苗生长不充分, 不利于增殖培养(图3)。培养时间在25~35 d, 芽苗生长势旺盛, 增殖率高。当培养至35 d时, 苗的长势最好, 苗高可达到7 cm, 45 d后苗不再长高。无菌苗培养时限在55 d左右, 超过这个时间, 叶尖开始出现黄化, 培养至65 d后, 出现全叶黄化, 苗逐渐衰老。培养超过25 d的根数与25 d的相差无几, 但根变长, 变得粗壮。根与苗的生长势基本同步, 45 d达到生长最高峰。

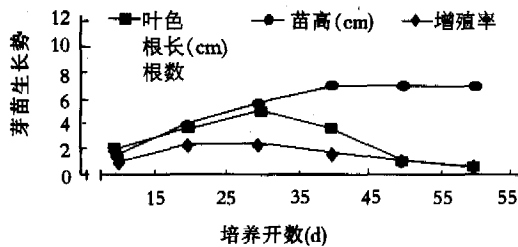


图3 代期对芽苗影响

注: 叶色描述: 浅绿-2, 绿色-3.5, 浓绿-5, 叶尖黄-1, 全叶黄-0.5

3 讨论

芦荟外殖体的诱导, 主要有两种途径: 一是通过茎尖或茎段诱导腋芽产生不定芽而获得无菌苗增殖; 二是通过茎尖或茎段诱导愈伤组织, 再从愈伤组织诱导分化出不定芽, 然后用不定芽增殖。从快速繁殖种苗的角度来看, 以茎尖或茎段诱导腋芽产生不定芽的途径效果较好, 因为芦荟通过茎尖诱导很容易诱导出不定芽, 省去了诱导愈伤组织步骤, 缩短了诱导时间, 而且可以减少种苗变异率^[5]。不同芦荟品种进行组织培养时, 其培养基最佳成分和比例不同。6-BA 2.5 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 有利于库拉索芦荟不定芽的诱导, 而 IBA 对芽的分化影响较大, 尤其是高的浓度 IBA 不利于库拉索芦荟的增殖, 对芽苗的分化有抑制作用。

库拉索芦荟在开始启动分化及随后的1~2代

培养中, 可适当使用较高浓度的细胞分裂素, 有利于加快繁殖, 但如果长期使用高浓度的细胞分裂素容易使分化芽肿胀, 愈伤组织增加, 甚至出现白化苗现象。在第4代之后, 需要逐渐减少生长调节剂使用量, 以提高芽苗的增殖率。库拉索芦荟每一代培养最适宜天数在25~35 d, 小于25 d或大于35 d都不利芽苗生长; 培养时期在55 d左右, 若超过这个时限, 芽苗呈现衰老迹象。

在大规模生产中, 常常需要考虑降低生产成本, 通常可采用食用糖代替蔗糖(化学纯或分析纯), 自来水代替蒸馏水, 自然光照代替人工光照等方法。黄贞光等人报道, 组织培养中用食用糖代替蔗糖、用自来水代替蒸馏水, 培养成本可降低30%^[6]。芦荟对光照条件要求不高, 芦荟的增殖期采用自然光照或人工光照皆可, 但如果光照过强, 加上温度过高, 分化苗容易出现僵化, 不利于芦荟快速繁殖。在工厂化生产过程中应采取自然光照, 以节省生产成本。此外, 温度也对芦荟分化产生重要影响, 温度过高或过低, 都不利于分化。

为扩大生产, 实现工厂化作业, 还需开展以下几方面工作: 一是组培苗遗传稳定性问题, 要研究组培苗各培养阶段的特性以便确定继代培养合适的代数 and 培养时间, 适时把握更新培养材料; 二是注意组培中经常性的技术难题如污染、褐变、玻璃化等; 三是应考虑市场和生产成本问题, 这是制约组培苗工厂化生产的一大难题^[7]。

参考文献:

- [1] 倪同汉. 神奇的芦荟(上)[J]. 中国野生植物, 1989(1): 20-25.
- [2] 谢启昆等. 药用植物组织培养[M]. 上海: 上海科学出版社, 1985: 125-132.
- [3] 丰锋, 李洪波, 吕庆芳, 等. 芦荟的组织培养[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 157-159.
- [4] 蒋林, 徐鸿华, 叶建华, 等. 库拉索芦荟的组织培养和快速繁殖[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2002, 15(4): 39-42.
- [5] 苏海, 钟明, 谢梅新, 等. 库拉索芦荟组织培养技术研究[J]. 广东农业科学, 2003(3): 27-28.
- [6] 黄贞光等. 中华猕猴桃组织培养繁殖[J]. 农业科技通讯, 1983(2): 23-24.
- [7] 唐玉明, 姚万春, 任道群, 等. 两种芦荟的组织培养研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(5): 439-441.

(责任编辑: 王景辉)