



秋水仙素对离体培养辣木多倍体的诱导

张洁, 何林, 王力超, 梁国鲁

(西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要: 以印度辣木栽培品种 PKM (*Moringa oleifera* PKM-1) 一年生植株茎尖为外植体, 采用秋水仙素结合组织培养技术诱导多倍体的方法, 研究了秋水仙素浓度及处理时间对诱导染色体倍性变异的影响, 以及不同外源植物生长调节剂浓度对茎段培养的增殖影响, 结果表明: 辣木芽初代培养的最适培养基为 MS + 6-BA2.0 mg/L + NAA0.2 mg/L, 不定芽增殖的最佳培养基为 MS + 6-BA0.6 mg/L, 增殖系数为 3.57, 用 0.1% 秋水仙素处理 24h 左右, 可诱导获得四倍体再生植株。

关键词: 辣木; 组织培养; 秋水仙素; 四倍体

中图分类号: S649 文献标识码: A 文章编号: 1672-450X (2007) 01-0027-04

Colchicines to Induce polyploid on *Moringa oleifera* in Tissue Culture

ZHANG Jie, HE Lin, WANG Li-chao, LIANG Guo-lu*

College of Horticulture and Landscape of Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstracts: A study of inducing polyploidy by treating in vitro stem segment of *Moringa oleifera*, PKM-1, was carried out with different concentrations of colchicines solution and different treated durations, also the effect of different exterior plant growth regulators with different concentration on proliferation. The results indicated that MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.2 mg/L was the optimum medium for generation, MS+6-BA 0.6 mg/L was the favorable medium for adventitious bud proliferate medium, tetraploid plantlets were obtained by treatment with 0.1% colchicines for about 24h.

Key words: *Moringa oleifera*; tissue culture; colchicines, tetraploid

辣木 (*Moringa oleifera*) 又称鼓槌树, 为辣木科辣木属热带落叶乔木^[1], 原产于印度和非洲, 含有丰富的蛋白质、维生素、氨基酸、矿质元素及活性酶类物质, 是对抗营养不良的健康食品, 也可药用、作为生长促进剂^[2]等等, 被西方科学家誉为奇迹之树^[3]。

目前世界上有关辣木的研究方向和思路单一, 而我国的辣木研究还刚刚开始。利用多倍体育种来创新资源是一个理想手段, 多倍体育种是植物育种的新途径, 不仅可对性状进行改良, 还可提高植物体内有效成分的含量^[4], 增强植物的生态适应性和对逆境的抗耐性, 降低蒸腾作用, 提高光合效率等。目前尚未见辣木的多倍体报道。本文采用秋水仙素诱导辣木多倍体, 以期培育出高产、优质的辣木四倍体新品种, 更好地满足生产需求。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为印度辣木栽培品种 PKM (*Moringa oleifera* PKM-1) 一年生植株, 来自西南大学果树重

点实验室。

1.2 培养条件

培养温度 20 ~ 26℃, 光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 光照时间 10 ~ 12h/d。

1.3 辣木的初代培养

取生长旺盛枝条上的茎尖为外植体, 用自来水洗净表面, 然后用中性洗涤剂浸泡 7min, 并不断摇动, 再用自来水冲洗 30min, 用滤纸吸干水分后置于超净工作台进行灭菌。以 75% 乙醇处理 10 ~ 15s 和 0.1% 升汞 HgCl₂ (加数滴吐温-20) 处理 8 ~ 10min, 无菌水冲洗 5 ~ 6 次, 接种于分化培养基, 30d 后观察结果。

1.4 辣木苗的继代增殖培养

切取长 1.5 ~ 2.0cm 生长相对一致的茎段进行增殖培养。增殖培养基以 MS 为基本培养基, 附加一定浓度的 BA、NAA, 市售白砂糖 30 mg/L 和卡拉胶 5.6 mg/L, pH5.6 ~ 5.8。

1.5 多倍体的诱导

采用过滤灭菌配制浓度分别 0.05%、0.1%、0.2%、0.4% 的秋水仙素水溶液, 从刚长出约 0.5 ~ 1cm 生长健康旺盛的丛生芽或幼苗上取 0.2 ~ 0.3cm 的茎

收稿日期: 2006-12-15

基金项目: 农业部 948 后续项目 (2005)



尖,放入秋水仙素溶液中 120r/min 摇床中振荡,分别培养 12h、24h、36h 后,将茎尖转入到不含秋水仙素的增殖培养基中进行培养。

1.6 观察内容

对试验诱导的多倍体进行外部形态(枝、叶、茎、根)初步判断^[5]和体细胞染色体数目的鉴定。

染色体鉴定采用去壁低渗火焰干燥法制片^[6]。选取诱导过的生长健壮的茎尖或根尖,用 0.02 mol/L 的 8-羟基喹啉预处理 2.5h,再用固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 3h;弃去固定液后,用去离子水清洗 3 遍并浸泡 30min 后,转入 0.3% 纤维素酶和 0.3% 果胶酶的混和酶液酶解 2.5h;吸出酶液,加入去离子水中后低渗 10min,再加入固定液固定 30min 以上;弃去固定液,夹取材料在冰冻的玻璃片上敲散,待干燥后,用 2~5%Giemsa 染色 15min 左右,镜检观察到分散较好的染色体,确定植物倍性。

1.7 统计方法

加倍处理的实验参数用下列参数统计:

存活率(%) = 处理 15d 后的存活材料数 / 处理材料数 × 100

加倍率(%) = 从处理后的再生苗中诱导出的多倍体再生苗数 / 用秋水仙素处理的再生苗数 × 100

增殖培养 15d 后统计每个茎段产生的有效不定芽(长度 > 0.5cm) 数量

增殖系数 = 增殖后不定芽数 / 接种茎段数

2 结果与分析

2.1 不同激素配对外植体的影响

结果(表 1)表明:不加激素,辣木外植体不能萌芽。而且 6-BA 对辣木芽的分化起着关键的作用,随着其浓度的升高,出芽时间减短,平均腋芽数增多。NAA 也起着一定的作用。结合出芽天数及平均腋芽

表 1 不同激素配对外植体的影响

处 理 (mg/L)	接种数 (块)	出芽天数 (d)	平均 腋芽数
6-BA+NAA 0.0+6-BA+NAA 0.0	30	—	0.00
6-BA+NAA 1.0+6-BA+NAA 0.05	30	24~26	2.35
6-BA+NAA 1.5+6-BA+NAA 0.05	30	21~24	3.03
6-BA+NAA 2.0+6-BA+NAA 0.05	30	21~23	2.10
6-BA+NAA 1.0+6-BA+NAA 0.1	30	21~22	2.56
6-BA+NAA 1.5+6-BA+NAA 0.1	30	22~23	2.61
6-BA+NAA 2.0+6-BA+NAA 0.1	30	21~23	3.12
6-BA+NAA 1.0+6-BA+NAA 0.2	30	22~24	1.25
6-BA+NAA 1.5+6-BA+NAA 0.2	30	21~22	2.38
6-BA+NAA 2.0+6-BA+NAA 0.2	30	20~22	3.17

数,认为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为初代培养的最适培养基。

2.2 不同激素配对外植体增殖的影响

结果(表 2)表明,以处理 MS+6-BA 0.6 mg/L 为好,平均每个茎段增殖 3 个不定芽,增殖倍数为 3.10,不定芽长势好。当 6-BA 的浓度高于 0.6mg/L 时,增殖倍数降低,且不定芽平均高度下降,部分茎尖出现了萎蔫状。一个月后愈伤组织下部出现了黑色状,上部组培苗已死。

当加入了 NAA 时,辣木茎段基部产生较大的愈伤组织,增殖系数却比只加 6-BA 时下降。可能是辣木本身所含生长素高, NAA 的加入更导致愈伤增加,应不加为宜。实验发现,诱导后的辣木四倍体与未诱导的二倍体的最适增殖培养基是相同的。

2.3 秋水仙素不同浓度和处理时间对材料的影响

本实验中,经秋水仙素处理后的叶片变软,接种在分化培养基上培养 20d 左右后,开始在切口处长出致密、淡黄色愈伤组织。继代培养后,愈伤组织逐渐扩大,在愈伤处零星分化出许多微小的不定芽。随着秋水仙素浓度的提高和处理时间的延长,茎尖的生长受抑制程度大,当秋水仙素浓度为 0.4%,处理时间为 36h 时,仅有 16.7% 的茎尖能够存活,多数茎尖由于

表 2 不同激素配对外植体增殖的影响

培养基 (mg/L)	接种 茎段数	不定芽 数	增殖系数	愈伤组织	不定芽平均 高度 (cm)	不定芽长势
MS+6-BA 0.2	30	48	1.60	愈伤白色, 较小, 直径 0.2cm	1.0	较粗壮,
MS+6-BA 0.6	30	93	3.10	愈伤白色, 较大, 直径 0.5cm	1.2	较粗壮,
MS+6-BA 0.8	30	90	3.00	愈伤较大, 白色, 直径 1.0cm	1.0	部分茎尖萎蔫, 长势不好
MS+6-BA 1.0	30	30	1.00	愈伤较大, 白色, 直径 1.2cm	0.7	部分茎尖萎蔫, 长势不好
MS+6-BA 0.2+NAA 0.05	30	46	1.53	愈伤白色, 较大, 直径 0.5cm	0.7	较粗壮, 长势好
MS+6-BA 0.2+NAA 0.1	30	43	1.43	愈伤白色, 较大, 直径 1.1cm	0.7	较粗壮, 长势好
MS+6-BA 0.4+NAA 0.05	30	51	1.70	愈伤白色, 较大, 直径 0.8cm	0.8	较粗壮, 长势好
MS+6-BA 0.6+NAA 0.1	30	54	1.80	愈伤白色, 较大, 直径 1.5cm	0.6	较粗壮, 长势好



秋水仙素的毒害作用，虽被转入无诱变剂的培养基中，却慢慢萎蔫失去生活力。

由表3可见，高浓度的秋水仙素使多倍体诱导率升高，但浓度太高会导致叶片萎蔫或严重抑制愈伤组织再生能力；而低浓度、短时间处理，则不易获得加倍材料。实验结果表明：0.1%秋水仙素处理24h左右，可诱导获得19%的辣木四倍体再生植株，效果最好。

表3 秋水仙素不同浓度、不同处理时间对丛生芽茎尖的诱导

秋水仙素浓度 (%)	处理时间 (h)	处理茎尖数	存活率 (%)	加倍株数	加倍率 (%)
0.05	12	30	100	0	0
	24	30	66.7	0	0
	36	30	60	1	1.7
0.1	12	30	80	0	0
	24	30	70	4	19
	36	30	53.3	0	0
0.2	12	30	76.7	1	4.3
	24	30	60	2	11.1
	36	30	46.7	0	0
0.4	12	30	26.7	0	0
	24	30	33.3	1	10
	36	30	16.7	0	0

2.4 辣木多倍体鉴定

2.4.1 形态学观察

经秋水仙素处理辣木茎尖获得的材料，显示出多倍体的形态特征（表4），其茎、芽较二倍体粗壮，叶柄变粗变大，叶片肥厚，叶脉更清晰，颜色变深，分化能力弱，且生长迟缓（图2），因此，初步判断为多倍体。在经染色体鉴定后证明，外部形态与细胞学检验结果有很好的一致性。

2.4.2 染色体鉴定



图1 二倍体组培苗

表4 变异体与二倍体试管苗外形的比较

观察材料	小苗发育	叶片
二倍体苗	正常，芽苗较细	较细、较小，颜色较淡
变异体苗	矮化、分化能力弱，茎、芽较粗壮，生长迟缓	叶柄明显变粗变大，叶片肥厚，叶脉更清晰，颜色变深

将自然条件下生长的供试辣木和未经诱导的离体再生植株的茎尖采用去壁低渗火焰干燥制片法^[6]，进行染色体的检测，结果发现其染色体数目均为 $2n=2x=28$ （图3），未发现其它倍性植株。经秋水仙素溶液处理后所获得的倍性变异植株，获得了不少纯合的四倍体植株和少量的非整倍体存在，所得四倍体的染色体数目为 $2n=4x=56$ （图4）。



图3 二倍体细胞染色体数

($2n=2x=28$)



图4 四倍体细胞染色体数

($2n=4x=56$)

3 讨论

利用秋水仙素进行染色体加倍而诱导辣木多倍体是可行的，结合组织培养，不仅具有经济方便，诱导作用专一性强等特点，还可以提高多倍体发生频率，减少嵌合体出现。本实验以辣木茎尖为材料，研究了组织培养结合秋水仙素处理诱导辣木四倍体的方法，取得了较好的效果，以处理材料为单位，本方法的最



图2 四倍体组培苗



高四倍体诱导率达到 19%，远远高于裴新澍（1963）报道的传统方法仅 0.8% 的最高诱导率。

秋水仙素诱导的关键是既要获得较高的变异率，又要保持较高的成活率。本试验结果表明，当秋水仙素浓度为 0.4%，处理 36h 后，仅有 16.7% 的材料能够存活，诱导率为 0；0.4% 处理 24h 后，存活率增加，诱导率也升高。随着秋水仙素浓度的增加，处理时间的延长，多倍体的诱导率高，但茎尖的存活率降低，叶片出现萎蔫。而当秋水仙素浓度为 0.05% 时，全部存活，但未获得多倍体。由于低浓度、短时间处理，不易获得加倍材料，因此掌握合适的秋水仙素处理浓度和时间对获得较好的加倍效果极其重要。综上所述，0.1% 秋水仙素处理 24h 左右，可诱导获得 19% 的辣木四倍体再生植株，效果最好。

本实验还缺乏对不同材料或不同处理方法的纵横比较，因而对于秋水仙素处理浓度和时间最佳组合的

规律还有待进一步探索。对辣木多倍体的产量、品质，特别是各种有效成分的含量变化，有待进一步观察。

参考文献：

- [1] 刘昌芬, 李国华. 辣木研究现状及其开发前景 [J]. 云南热作科技, 2002, 25 (3): 20-24.
- [2] Nautiyal B P, Venkataraman K G. Moringa (drumstick)-An Ideal Tree for Social Forestry: Growing Conditions and Uses-Part 1 [J]. Myforest, 1987, 23 (1): 53-58.
- [3] 刘永红, 李会珍. 辣木的利用价值与栽培技术 [J]. 福建热作科技, 2004, 29 (2): 34-35.
- [4] 刘惠吉, 王华, 肖守华. 四倍体白菜热优 2 号的选育 [J]. 南京农业大学学报, 1992, 15 (4): 39-44.
- [5] 常月梅. 果树多倍体鉴定进展 [J]. 山西林业科技, 2000, (1): 1-5.
- [6] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.

(上接第 26 页) 0.70%；烷烃类化合物有 9 种，占峰面积的 17.88%；烯烃类化合物有 7 种，占峰面积的 7.42%；其他类物质有 3 种，占峰面积的 1.46%。

其中挥发性成分中峰面积较高的有：愈创木酚 (7.93%)、2-甲氧基-4-甲基苯酚 (4.01%)、大茴香醛 (5.05%)、2,3,5,6-四甲基苯酚 (9.25%)、香兰素 (8.09%)、邻苯二甲酸二丁酯 (2.79%)、二十一烷 (3.23%)、二十二烷 (3.10%)、(顺)-二十三碳-9-烯 (2.54%)、二十三烷 (1.29%)、二十四烷 (3.67%)、二十五碳烯 (2.23%)、二十五烷 (4.81%) 等。

3 小结

用同时蒸馏萃取方法收集云南香荚兰的挥发性成分，所得到的香荚兰挥发性成分的二氯甲烷浓缩液用 GC-MS 法分离并分析鉴定其成分及质量分数，共鉴定出 49 个化合物，占总峰面积的 79.63%。醛类物质有 8 种；酸类物质有 5 种；酯类物质有 7 种；醇、酚类物质有 7 种；酮类物质有 3 种；烷烃类化合物有 9 种；烯烃类化合物有 7 种；其他类物质有 3 种。这些挥发性成分和许多不挥发性成分的综合作用产生了香荚兰独特的香气。文献报道^[2]，用 90% 的乙醇萃取香荚兰豆荚中的香味物质，鉴定出 19 个化合物。与本文用同时蒸馏萃取方法收集到的 49 个成分相比较，主要区别是挥发性成分的检出数量差别大，香草醛的相对含量差异较大。这些成分组成和含量上的差别，主要

是由于不同提取溶剂和不同提取方法存在的差异。采用同时蒸馏萃取 (SDE) 能将香荚兰挥发性成分较完全的提取出来，而用乙醇直接萃取，虽然提取充分，但萃取液中含有较多的非挥发性成份，不利于香荚兰挥发性香气成分的分析。文献报道^[3]，用超临界 CO₂ 流体萃取香荚兰香气成分，超临界 CO₂ 流体萃取具有临界温度低、化学性质稳定及无溶剂残留等特点，所得提取物香气完全。与本文所用方法相比较，两者都可以得到较好的分析结果。由于同时蒸馏萃取法简便、易操作，所以该法可作为香荚兰挥发性成分提取的重要方法。

香荚兰的品种、产地和加工方法的差异，导致香荚兰挥发性香气成分在组成和含量上的差异，造成香荚兰香气特性的不同。本文通过对云南香荚兰豆挥发性成分的鉴定研究，为更好地开发云南香荚兰资源提供了依据。

参考文献：

- [1] 林进能, 等. 天然食用香料生产与应用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 436-453.
- [2] 符史良, 黄茂芳, 周江, 等. 海南香草兰萃取物挥发性成分的 GC/MS 分析 [J]. 香料香精化妆品, 2002, (1): 13-14, 25.
- [3] 金丽, 夏文水, 陈德新. 香荚兰酶促生香及超临界 CO₂ 萃取香气成分的研究 [J]. 香料香精化妆品, 2002, (1): 21-25.