维普资讯 http://www.cqvip.com

热带亚热带植物学报 2007,15(2): 141-146
Journal of Tropical and Subtropical Botany

辣木组织培养与四倍体植株诱导

向素琼，梁国鲁*，郭启高，李晓林，何 桥
（西南大学园艺园林学院，重庆 400716）

摘要：建立了印度辣木（*Moringa oleifera*）和非洲辣木（*Moringa stenopetala*）离体再生体系，并利用秋水仙碱进行了四倍体的诱导。结果表明：离体培养时以茎段为外植体可快速获得无菌苗，愈伤组织诱导与不定芽分化时，印度辣木以 MS+ BA 0.6 mg L^{-1}+ NAA 0.1 mg L^{-1} 的固体培养基为最佳，非洲辣木以 MS+ BA 0.5 mg L^{-1}+ NAA 0.2 mg L^{-1} 的固体培养基为最佳，生根培养基均以 MS+IBA 0.2 mg L^{-1} 最适。用不同浓度秋水仙碱对染色体进行加倍诱变，以 0.2%秋水仙碱处理 5 d，加倍效果最好，印度辣木达到 40.0%，非洲辣木为 36.7%。获得了印度辣木和非洲辣木四倍体新种质，四倍体植株初步表现枝粗、叶片变大变厚且叶色更绿等特征。

关键词：印度辣木；非洲辣木；组织培养；四倍体；秋水仙碱
中图分类号：Q943.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1005-3395(2007)02-0141-06

Tissue Culture and Tetraploid Induction of Drumstick

XIANG Su-qiong, LIANG Guo-lu*, GUO Qi-gao, LI Xiao-lin, HE Qiao
(*Horticulture and Landscape College, Southwest University*, Chongqing 400716, China)

Abstract: An effective protocol for plant generation was developed for *Moringa oleifera* and *M. stenopetala*. The colchicine induced tetraploid of drumstick was investigated. Plentiful plantlets were rapidly obtained using stem explants. Shoots were obtained on MS supplemented with BA 0.6 mg L^{-1} and NAA 0.1 mg L^{-1} for *M. oleifera* and MS with BA 0.5 mg L^{-1} and NAA 0.2 mg L^{-1} for *M. stenopetala*. Best rooting was observed on MS supplemented with IBA 0.2 mg L^{-1}. After 5-day treatment with colchicine, 40.0% of *M. oleifera* regenerants and 36.7% of *M. stenopetala* regenerants were found chromosome doubling. The tetraploids were characterized by their thick shoots and large thick green leaves.

Key words: *Moringa oleifera*; *Moringa stenopetala*; Tissue culture; Tetraploid; Colchicine

辣木(drumstick)为辣木科（Moringaceae）辣木属（*Moringa*）植物，原产于印度和非洲，本科仅1属，有14-15种，具栽培价值的主要是印度辣木(*Moringa oleifera*)和非洲辣木(*Moringa stenopetala*)。由于它们含有丰富的氨基酸、维生素、矿质元素和活性酶类物质，抗逆性强，因此被誉为“神奇之树”和“母亲最好的朋友”[1-3]，很多发展中国家利用其来改善儿童营养不良，具有食用、园艺植物、工业、药用等多种用途[4]。现在亚洲、非洲和中美洲的30多个热带、亚热带国家或地区广泛种植，我国在20世纪60年代就引入了辣木，但对提高生物器官产量、保鲜与品种改良等问题还有待深入研究。辣木离体再生体系的建立可以成为基因工程育种或其他研究的技术平台，同时多倍体育种可增加生物器官产量，并且在有效成分含量、抗性等方面也可能得以提高，而目前有关辣木多倍体的研究尚未见报道。本文通过建立辣木离体培养体系，再用秋水仙碱诱导产生辣木四倍体植株，为培育辣木四倍体或

收稿日期：2006-07-19 **接受日期**：2006-10-26
基金项目：农业部948项目（2001-220，2005-C4）资助
* 通讯作者 Corresponding author

维普资讯 http://www.cqvip.com

三倍体新品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

印度辣木（*Moringa oleifera*）和非洲辣木（*M. stenopetala*）的种子均从印度引进。

1.2 离体培养

外植体的选择与无菌体系建立 种子无休眠期，成熟即可播种，对土壤光照无特殊要求，生长最适宜温度为25-35℃，水份做到湿而不涝即可。播种后1月时取带腋芽(腋芽未萌发)茎段、幼嫩无芽茎段和叶片为外植体，常规表面消毒，带腋芽茎段放入培养基MS+BA 0.5 mg L^{-1}，促进腋芽萌发；无芽茎段和叶片接入MS + BA 0.5 mg L^{-1} +NAA 0.1 mg L^{-1}中促进芽的分化或愈伤组织的形成。培养温度(28±2)℃，光照12 h d^{-1}。

增殖培养基筛选 以MS为基本培养基，附加不同浓度的BA、NAA及白砂糖30 g L^{-1}和卡拉胶5.8 g L^{-1}，pH为5.8。

生根培养基筛选 以MS为基本培养基，附加不同浓度NAA或IBA，白砂糖30 g L^{-1}，卡拉胶5.8 g L^{-1}，pH为5.8。

1.3 四倍体诱导与检测

采用秋水仙碱浸泡法进行四倍体诱导。将无菌苗切成1 cm长茎段，在室温下，用0.1%、0.2%、0.3%秋水仙碱，每个浓度分别处理1 d、3 d、5 d、7 d，置于摇床上摇动（50 r min^{-1}）。每处理30个茎段，以无菌水处理7 d作对照，处理后用无菌水冲洗3-4次，转入不含秋水仙碱的增殖培养基上继续培养，一般会先形成愈伤组织再分化成芽，最初从叶片的大小、颜色与厚度目测作出初步判断，待芽伸长至1.5-2 cm时，切取嫩叶或茎尖检测染色体倍性，生根后取根尖进行复检。

倍性鉴定 染色体制备采用去壁低渗-火焰干燥法[5]并稍加改进。其中预处理采用0.002 mol/L 8-羟基喹啉水溶液20-25℃处理1.5-2 h，酶解以3%纤维素-果胶酶混合酶液25℃解离2 h为宜。以未诱导材料为参照，通过观察染色体数目检出有变异的材料。

嵌合体的分离 将鉴定出的染色体倍性嵌合的材料接种到促腋芽萌发或增殖培养基上，诱导芽萌发或分化，对芽苗进行反复分离检测染色体倍性，直至成为同质四倍体。

1.4 四倍体材料的扩繁

确认为四倍体的株系按二倍体离体快繁体系进行扩繁、生根和移栽。

2 结果和分析

2.1 辣木离体培养体系的建立

2.1.1 外植体的选择与处理

用印度辣木和非洲辣木实生苗的不同外植体进行培养，结果表明，腋芽在培养基MS+BA 0.5 mg L^{-1}上萌发启动快，5-8 d全部萌发，伸长也极快，10-15 d便可伸长至2-3 cm；幼嫩茎段和叶片虽然均可诱导形成愈伤组织，但茎段较叶片更快更易诱导，叶片诱导的愈伤组织不易分化成芽，而用茎段10 d可诱导出愈伤组织，35 d即分化成芽且增殖系数平均为5。可见以未萌发的腋芽为外植体出芽快，30 d左右便可获得较多无菌苗，而以茎段为外植体的增殖系数高，所以两者均可作为外植体，经短期培养后可获得大量无菌苗。

2.1.2 分化培养基的筛选

将茎段接入MS附加不同浓度BA、NAA的培养基中，一般先形成愈伤组织，然后从愈伤组织上分化出不定芽，不断重复切割带不定芽的愈伤组织，通过愈伤组织的增殖和分化实现芽的增殖，从而达到快繁目的。BA与NAA配比对不定芽分化和生长质量有重要影响。不加任何激素时，愈伤组织诱导率较低，分化出的芽长势较纤细。随着加入BA和NAA浓度上升，愈伤组织诱导率增加，同时不定芽增殖也有增加的趋势，但到一定高度后，当BA浓度超过0.6 mg L^{-1}后增殖系数下降，植株表现下部叶片黄化与顶端萎蔫，说明过高BA浓度反而会抑制芽的增殖和生长，印度辣木以0.6 mg L^{-1}、非洲辣木以0.5 mg L^{-1}时增殖系数最高，分别达到6.20和6.03（见表1），长势好。综合增殖系数与芽苗长势情况，诱导不定芽分化与继代培养时，印度辣木以固体培养基MS+ BA 0.6 mg L^{-1}+ NAA 0.1 mg L^{-1}+ 3%白砂糖为最佳，非洲辣木以MS+ BA 0.5 mg L^{-1}+ NAA 0.2 mg L^{-1}+ 3%白砂糖为最佳，培养的芽较粗壮，叶片翠绿，长势好（图1A）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度 BA 与 NAA 对愈伤诱导和芽分化的影响

Table 1　Effects of BA and NAA on callus induction and shoot proliferation of *Moringa oleifera* and *M. stenopetala*

BA (mg L^{-1})	NAA (mg L^{-1})	茎段数 Stems	愈伤组织诱导率 Callus induction frequency (%)		出芽数 Shoots		增殖系数 Multiplication coefficient	
			M. oleifera	*M. stenopetala*	*M. oleifera*	*M. stenopetala*	*M. oleifera*	*M. stenopetala*
0	0	30	60.0	63.3	45	34	1.50	1.13
0.4	0.1	30	70.0	66.7	60	56	2.00	1.87
0.4	0.2	30	76.7	73.3	106	102	3.53	3.40
0.4	0.3	30	86.7	86.7	114	116	3.80	3.87
0.5	0.1	30	83.3	83.3	146	150	4.87	5.00
0.5	0.2	30	86.7	86.7	167	181	5.57	6.03
0.5	0.3	30	93.3	90.0	163	157	5.43	5.23
0.6	0.1	30	83.3	80.0	186	152	6.20	5.07
0.6	0.2	30	93.3	90.0	176	137	5.87	4.57
0.6	0.3	30	96.7	93.3	161	121	5.37	4.03
0.7	0.1	30	93.3	90.0	121	102	4.03	3.40
0.7	0.2	30	100	100	92	83	3.07	2.77
0.7	0.3	30	100	100	85	71	2.83	2.37

2.1.3 生根、炼苗与移栽

选择生长良好并达到一定株高（约 2–3 cm）的芽苗，置于附加不同浓度 NAA 或 IBA 的 MS 培养基上诱导生根，接入 25 d 后统计生根率。结果表明，印度辣木和非洲辣木的生根条件差异不明显，不加生长素时生根晚，根粗短易老化；从表 2 可看出，芽苗在含 IBA 或 NAA 的 MS 培养基上都可生根，但生根时间与根系状态有差异。生长素浓度较高时，产生愈伤组织多且植株下部叶片易黄化，顶端易萎蔫，浓度低时，只有少量生根，并且诱导时间长。含 IBA 的培养基上的根系和植株整体长势比含 NAA 的更好，其中以附加 IBA 0.2 mg L^{-1} 的 MS 培养基上生根快而且质量好、数目多，根系与茎间愈伤少，地上部分也生长良好（图 1B）。

当试管苗根长约 2–3 cm 时，便可将其移出培养室，经炼苗 3–5 d 和抗菌处理后栽入盛有灭菌营养土的营养钵内(图 1C)精心管理，移栽后值得特别注意的就是保温保湿与防涝，只要试管苗成活后生长极其迅速，管理可以变粗放。

表 2　生长素对组培苗生根的影响

Table 2　Effects of auxins on shoot rooting

NAA (mg L^{-1})	IBA (mg L^{-1})	接入芽苗数 Shoots inoculated	生根时间 Rooting time (d)	生根芽苗数 Rooting shoots	生根率 Rooting frequency (%)
0	0	40	20	36	90.0
0.1		40	18	36	90.0
0.2		40	15	40	100
0.3		40	15	40	100
	0.1	40	15	38	95.0
	0.2	40	12	40	100
	0.3	40	18	40	100

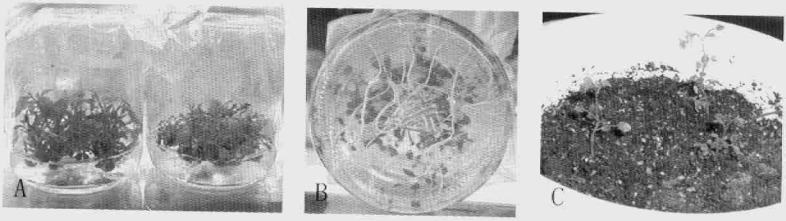

图 1　印度辣木组织培养

Fig. 1　Tissue culture of *M. oleifera*

A：芽分化 Shoot proliferation　B：生根 Rooting　C：移栽 Transplantation

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 四倍体诱导

2.2.1 倍性鉴定

体细胞染色体计数表明：印度辣木和非洲辣木未经秋水仙碱处理的离体再生植株根尖染色体数目均为 2n=2x=28(图 2A, C)，未发现有其它倍性的植株。经秋水仙碱处理后获得的染色体倍性变异植株，不仅包含染色体加倍的常见 4x 植株（2n=4x=56）(图 2B, D)、2x 和 4x 倍性嵌合植株，还发现有部分 8x 植株（2n=8x=112）(图 2E),这可能是在秋水仙碱处理过程中分裂旺盛的细胞多次加倍或融合形成。

2.2.2 秋水仙碱对辣木茎段存活及染色体加倍的影响

由表 3 可看出，未经秋水仙碱处理的离体再生植株中无染色体倍性变异出现，说明即使在离体培养条件下发生染色体倍性变异的频率极低，要获得染色体倍性变异必须经过人为干预。

经秋水仙碱处理的茎段在培养基上前期生长缓慢，这种现象随着处理浓度的升高或时间的延长而加剧，从而使茎段死亡率增加，相同浓度下处理时间与其受伤害程度也呈正相关。因此，要掌握合适的处理浓度和时间才能获得最好的染色体加倍效果。从表 3 可以看出，秋水仙碱处理 5 d 以上印度辣木和非洲辣木均能诱导染色体加倍，2 种植物差异不显著。0.2%的秋水仙碱处理 5–7 d 的诱导率为 26.7%–40.0%，以 0.2%的秋水仙碱处理 5 d 的效果最好，变异率最高，印度辣木达到 40%，非洲辣木为 36.7%，同时获得的同质四倍体植株也最多。

2.2.3 嵌合体的分离与四倍体植株的扩大繁殖

秋水仙碱诱导很容易产生染色体倍性嵌合的植株，多数为 2x 和 4x 嵌合。嵌合体在培养过程中，各种倍性的细胞增殖速度不同，为避免多倍体细胞发生“回复突变”，应尽早对嵌合体进行分离，尽可能减少未加倍的细胞，否则加倍的细胞会因为分裂

表 3 秋水仙碱的诱变效果

Table 3 Effects of different concentration colchicine on *Moringa*

	秋水仙碱浓度 Colchicine concentration (%)	处理时间 Immersion days	处理苗数 Shoots treated	死亡率 Death frequency (%)	染色体倍性变异数 Polyploids		诱导率 Induction frequency (%)
					同质4x Homogenous tetraploid	嵌合体 2x+4x Chimera	
印度辣木 *M. oleifera*	0(Control)	7	30	0	0	0	0
	0.1	1	30	0	0	0	0
		3	30	0	0	0	0
		5	30	0	0	1	3.3
		7	30	6.7	1	1	6.7
	0.2	1	30	0	0	0	0
		3	30	3.3	2	4	20.0
		5	30	16.7	5	7	40.0
		7	30	20.0	4	6	33.3
	0.3	1	30	0	0	0	0
		3	30	13.3	2	6	26.7
		5	30	23.3	4	5	30.0
		7	30	40.0	1	1	6.7
非洲辣木 *M. stenopetala*	0(Control)	7	30	0	0	0	0
	0.1	1	30	0	0	0	0
		3	30	0	0	0	0
		5	30	0	1	1	6.7
		7	30	3.3	1	1	6.7
	0.2	1	30	0	0	0	0
		3	30	6.7	2	5	23.3
		5	30	13.3	5	6	36.7
		7	30	16.7	3	5	26.7
	0.3	1	30	0	0	0	0
		3	30	10.0	3	4	23.3
		5	30	20.0	3	5	26.7
		7	30	33.3	1	2	10.0

维普资讯 http://www.cqvip.com

缓慢而遭淘汰，这样才能保证加倍细胞的繁殖。本试验采取将嵌合体继续接种到促腋芽萌发或增殖培养基上诱导芽萌发或分化，对芽苗进行多次分离检测倍性，最终获得较多同质四倍体，复检其倍性稳定，但其过程复杂费时，还有待于改进。

在二倍体的最适增殖和生根培养基上，四倍体增殖、生根情况良好。

2.2.4 二倍体和四倍体植株外部形态的初步比较

通过扩大繁殖获得了较多的辣木四倍体植株，观察二倍体和四倍体的生长状况和形态，四倍体植株比二倍体植株的枝条粗，叶更大更厚、叶色更深（图 2 F,G）。

3 讨论

3.1 辣木离体培养

辣木繁殖育苗容易，种子繁殖或枝条扦插皆可，因此少见有离体培养报道，但国外近年也有倡导利用组织培养进行资源抢救和繁殖[4]。本文运用常见的 MS 基本培养基，附加常见外源激素 BA 和 NAA、IBA 就能建立起离体培养体系，辣木生长迅速，一般 20–25 d 左右需继代一次，如需加快繁殖还可缩短周期，通过诱导腋芽萌发或茎段诱导愈伤组织再分化均可达到目的。

3.2 四倍体的诱导及鉴定

组织培养与秋水仙碱诱导相结合培育植物多倍体在短期内可达到改良植物品种和丰富种质资源的目的[6]。多倍体植株在形态上一般比二倍体植株大，如枝粗，叶片较大较厚，且叶色浓绿，但生长缓慢等。本研究的结果与此相似。但有的四倍体植株叶片、植株高度并不都大于或高于对照，如雷家军等[7]发现草莓混倍体植株（即存在加倍和未加倍的细胞）的形态上也表现出未加倍植株的特征。因此仅凭外观可能会遗漏一些倍性变异植株，最可靠的检验方法仍是检查染色体数目。而染色体加倍诱导易产生倍性嵌合体，如何快速分离获得真正同一倍性的同质多倍体，抑制二倍体细胞增殖尚需进一步研究。

秋水仙碱能够影响有丝分裂正常活动而导致染色体加倍，产生倍性效应，是多倍体育种的重要内容。但关于秋水仙碱的非倍性效应迟迟未能引起重视，不过越来越多的事实证明非倍性效应作为倍性育种的一个方面具有很大的潜力[8]。

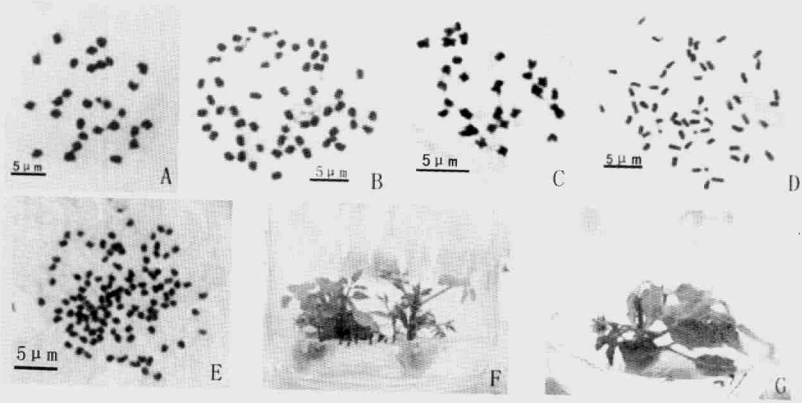

图 2　不同倍性辣木体细胞染色体与植株

Fig. 2 Somatic chromosomes and plantlets of drumstick at different ploidy levels

A–B: 印度辣木体细胞染色体 Somatic chromosomes of *M.oleifera* (A: 2n=2x=28; B: 2n=4x=56); C–D: 非洲辣木体细胞染色体 Somatic chromosomes of *M. stenopetala* (C:2n=2x=28; D:2n=4x=56); E: 非洲辣木八倍体体细胞染色体 Somatic chromosomes of 8x *M. stenopetala* (2n=8x=112); F–G: 非洲辣木四倍体与二倍体试管苗 4x and 2x shoots of *M. stenopetala* (F:2x; G:4x)

维普资讯 http://www.cqvip.com

3.3 辣木四倍体的应用前景

由于同源多倍体更易直接与经济效益相关，因此多倍体育种研究主要集中在同源多倍体尤其是同源四倍体上[9]。多倍体由于基因倍增、基因组冲击而引起基因表达变化，因此并不只限于原有性状的加强和提高，有的可能会产生新的性状和新的化学成分[10]。同时同源多倍体的基因序列增加提高了基因功能的保险性，为逆境条件下的生存竞争提供了稳定的基础[11]。辣木作为一种多用途速生植物，开展多倍体育种，是提高产量、改善品质和抗性的一条非常重要的途径。本研究建立了辣木离体培养体系，并成功获得了印度辣木和非洲辣木的四倍体植株，丰富了种质资源，为我国辣木优良品种的资源保存和推广提供了条件。四倍体植株初步表现枝粗、叶片变大变厚且叶色更深等，有可能在保鲜性、有效成分含量上得到提高，可能从中选出性状改良的新品种，但对于其产量、有效成分含量等确切结果还有待进一步测定。同时本试验所得四倍体材料可用于探讨植物人工多倍化后遗传物质的变异方向及其机理等问题的研究。

参考文献

[1] Liu C F(刘昌芬), Li G H(李国华). Actuality of study on *Moringa oleifera* and their exploitive foreground [J]. J Yunnan Trop Crops Sci Tech(云南热作科技), 2002, 25(3):20-24.(in Chinese)

[2] Mughal M H, Srivastava P S, Iqbal M. Drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.): a unique source of food and medicine [J]. J Econ Taxon Bot, 1999, 23(1):47-61.

[3] Zhang Y P (张燕平), Duan Q F (段琼芬), Su J R (苏建荣). Horseradish and its utnization: review [J]. Chin J Trop Agric(热带农业科学), 2004, 24(4):42-48.(in Chinese)

[4] Stephenson K K, Fahey J W. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm [J]. Econ Bot, 2004, 58(Supl):S116-S124.

[5] Chen R Y(陈瑞阳), Song W Q(宋文芹), Li X L(李秀兰). A new method for preparing mitotic chromosomes from plant [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1979, 21(3):297-298.(in Chinese)

[6] Tan D G(谭德冠), Zhuang N S(庄南生), Huang H S(黄华孙). A review of *in vitro* induction of polyploid plants with colchicines [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2005, 34(1):77-80.(in Chinese)

[7] Lei J J(雷家军), Wu L P(吴禄平), Dai H P(代汉萍), et al. Studies on chromosome doubling with shoot tip culture in strawberry [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 1999, 26(1):13-18.(in Chinese)

[8] Li S X (李树贤). Several problems on autopolyploid breeding in plants [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin (西北植物学报), 2003, 23 (10):1829-1841.(in Chinese)

[9] Deng Y(邓云), Zhang S N(张蜀宁), Sun M H(孙敏红), et al. Induction of autotetraploid non-heading chinese cabbage with high-quality and heattolerance by coichicine [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 2006, 24(2):159-162.(in Chinese)

[10] Soltis D E, Soltis P S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution [J]. Trends Ecol Evol, 1999, 9:348-352.

[11] Soltis D E, Soltis P S. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids [J]. PNAS, 2000, 97(13):7051-7057.