

辣木组织培养技术研究

马秋月, 黄海泉, 黄蔚霞, 徐 俊, 杨炳巧, 黄美娟
(西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224)

摘要:为了促进辣木组培快繁,以辣木种子为外植体建立无菌体系,并对其进行增殖及生根诱导研究。结果表明:辣木种子较好的灭菌条件为不剥皮+70%酒精(30 s)+0.1%升汞(8 min),其成活率达73.3%,污染率和灭死率分别为26.7%和0;最适的增殖培养基为MS+NAA0.01 mg·L⁻¹+6-BA0.4 mg·L⁻¹,增殖系数达3.9,且苗生长健壮;较好的生根培养基为1/2MS+IBA0.4 mg·L⁻¹,其生根率达92%,平均根数为6.5根,根粗达0.044 mm。

关键词:辣木;组织培养;增殖培养;生根培养

中图分类号:Q949.748.5 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)12-0018-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.12.0018

辣木(*Moringa oleifera* Lam.),又称鼓槌树,其适应性广,抗性强,现广泛种植于亚洲、非洲和拉丁美洲等30多个热带、亚热带国家和地区^[2];由于辣木叶片、果实富含多种矿物质、维生素,可开发作为木本蔬菜、油料作物及功能保健食品^[3-7]。组织培养技术具有条件可控、不受季节限制,并能实现周年生产等优点,广受生产及研究人员欢迎,尤其对木本植物而言,优势更为明显^[8]。近年来随着辣木种植面积及市场需求不断扩大,开展其组培快繁研究可以有效地解决种苗缺乏及

质量等相关问题^[9]。本研究在前人研究的基础上,以辣木种子为材料探讨辣木的进瓶诱导、增殖和生根研究,为辣木的组培快繁提供一定的基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为采自非洲的辣木种子。

1.2 方法

1.2.1 辣木的进瓶诱导 选择生长饱满的辣木种子,采用剥皮与不剥皮两种方式进行处理后予以分组,每组30粒,先用70%酒精处理30 s,再用0.1%升汞分别处理6、8和10 min,再用无菌水清洗3~4次,最后于无菌滤纸上吸干后接入MS基本培养基,蔗糖30 g·L⁻¹,琼脂6.6 g·L⁻¹,pH5.8。放入25℃,2 500 lx的培养箱进行培养,并对其进行观察记载。

收稿日期:2015-09-21
基金项目:云南省园林植物与观赏园艺省级重点学科及云南省高校园林植物与观赏园艺重点实验室资助项目
第一作者简介:马秋月(1989-),女,吉林省四平市人,硕士,从事园林植物研究。E-mail:1375746969@qq.com。
通讯作者:黄美娟(1972-),女,江西省贵溪市人,在读博士,副教授,从事园林植物研究。E-mail:xmhhq2001@163.com。

Effect of Different Culture Medium Formula on the Content of Protein and Amino Acid in *Cordyceps militaris*

LIU Fang^{1,2}, LI Shuai¹, GAO Jian¹, YANG Chuan-wei¹, YU Shuang¹

(1. College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011; 2. Mudanjiang Institute of Forestry Science, Mudanjiang, Heilongjiang 157009)

Abstract: *Cordyceps militaris* was cultivated by different culture medium formulation in order to improve its nutritional value. Analyzing the content of protein and amino acid in *Cordyceps militaris* which determined by kjeldahl method and amino acid auto analyzer. The results suggest that the average content of protein in the formulation C(40 g of rice, 56 mL of nutrient solution 1) was the highest in the six formulations, and the average content was 20.430 g per 100 g. The highest content of essential amino acids, non-essential amino acid and total amino acids is formulation A(40 g of corn, 56 mL of nutrient solution 1), to 3.882 g per 100 g, 12.512 g per 100 g and 16.394 g per 100 g respectively.

Keywords: *Cordyceps militaris*; culture medium formulation; protein; amino acid

表 1 辣木的进瓶诱导

Table 1 Primary culture of <i>Moringa oleifera</i>			
处理 Treatments	是否剥皮 Peding or not	灭菌剂 Sterilization agent	灭菌时间 Sterilization time
S1	剥皮	酒精(70%) + 升汞(0.1%)	30 s + 6 min
S2	剥皮	酒精(70%) + 升汞(0.1%)	30 s + 8 min
S3	剥皮	酒精(70%) + 升汞(0.1%)	30 s + 10 min
S4	不剥皮	酒精(70%) + 升汞(0.1%)	30 s + 6 min
S5	不剥皮	酒精(70%) + 升汞(0.1%)	30 s + 8 min
S6	不剥皮	酒精(70%) + 升汞(0.1%)	30 s + 10 min

1.2.2 辣木的增殖培养 以上述获得的无菌苗茎段为材料,采用三因素三水平的正交试验(见表2),开展辣木的增殖培养研究。

1.2.3 辣木的生根培养 以上述获得的无菌苗茎段为材料,分别以 1/2MS 和 1/2B₅ 为基本培养基,添加 IBA 浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4 mg·L⁻¹,蔗糖 30 g·L⁻¹,琼脂 6.6 g·L⁻¹,pH5.8。具体组合为 R1:1/2MS+IBA 0.05 mg·L⁻¹;R2:1/2MS+IBA 0.1 mg·L⁻¹;R3:1/2MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹;R4:1/2MS+ IBA 0.4 mg·L⁻¹; R5: 1/2B₅ + IBA 0.05 mg·L⁻¹;R6:1/2B₅ + IBA 0.1 mg·L⁻¹;R7: 1/2B₅ + IBA 0.2 mg·L⁻¹ 和 R8: 1/2B₅ + IBA 0.4 mg·L⁻¹。

表 3 不同处理对辣木种子灭菌的效果

Table 3 The effects of different treatments on the sterilization of <i>Moringa oleifera</i> 's seeds							
处理 Treatments	种子数 Seed number	污染数 Number of contaminated seed	污染率/% Contamination rate	成活数 Number of survival seed	成活率/% Survival rate	灭菌数 Seed number of death	灭菌率/% The death rate
S1	30	20	66.7	10	33.3	0	0
S2	30	14	46.7	16	53.3	0	0
S3	30	8	26.7	12	40.0	10	33.3
S4	30	16	53.3	14	46.7	0	0
S5	30	8	26.7	22	73.3	0	0
S6	30	6	20.0	18	60.0	6	20.0

2.2 辣木的增殖培养

由表 4 中的 R(极差分析)值可知,基本培养基 R 值最大,为 0.94,所以在 3 个因素中基本培养基为最主要影响因子;其次为细胞生长素 NAA;再次为细胞分裂素 6-BA。3 个因素的主次顺序是:基本培养基>NAA>6-BA。

各因子水平变化,对辣木无菌苗增殖系数影响的变化规律是:①从基本培养基对苗的增殖率来看,从高到低排列为 MS>B₅>改良 MS。②就

表 2 辣木的增殖培养基

Table 2 Proliferation media of <i>Moringa oleifera</i>			
培养基 Media	基本培养基 Basic medium	NAA/ (mg·L ⁻¹)	6-BA/ (mg·L ⁻¹)
P1	MS (1)	0.01 (1)	0.4 (1)
P2	MS (1)	0.02 (2)	0.6 (2)
P3	MS (1)	0.04 (3)	0.8 (3)
P4	改良 MS (2)	0.01 (1)	0.6 (2)
P5	改良 MS (2)	0.02 (2)	0.8 (3)
P6	改良 MS (2)	0.04 (3)	0.4 (1)
P7	B ₅ (3)	0.01 (1)	0.8 (3)
P8	B ₅ (3)	0.02 (2)	0.4 (1)
P9	B ₅ (3)	0.04 (3)	0.6 (2)

2 结果与分析

2.1 辣木无菌系的建立

由表 3 可知,辣木种子剥皮与不剥皮处理相比较,在相同的灭菌时间下,不剥皮处理成活率相对较高,可能与种皮包裹对种子起到一定的保护作用有关。从灭菌效果来看,随升汞灭菌时间延长,污染率逐渐降低;当升汞处理时间达 10 min 时,尽管污染率较低,但同时也出现了灭死现象。综合比较来看,辣木种子较好的灭菌条件为 S5 不剥皮 + 70%酒精(30 s) + 0.1%升汞(8 min),其成活率较高达 73.3%,污染率和灭死率分别为 26.7%和 0。

生长状况来说,MS 培养基中的苗木长势好,生长状况较优;B₅ 培养基中的苗木较一般;而改良 MS 中的苗木长势最差,普遍都是畸形苗。③从 NAA 浓度对苗的增殖影响来看,当 NAA 浓度从 0.01 mg·L⁻¹增加到 0.04 mg·L⁻¹时,可以看出 NAA 因素对辣木增殖呈现逐渐递减的变化,通过分析得出,NAA 的较适浓度是 0.01 mg·L⁻¹。④从 6-BA 浓度对苗的增殖的影响来看,当 6-BA 的浓度由 0.4 mg·L⁻¹增加到 0.8 mg·L⁻¹时,可以

看出 6-BA 因素对辣木增殖呈现逐渐递减的变化,通过分析得出 6-BA 的较适浓度为 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

综上所述,得出最好的增殖配方为:MS+NAA $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,增殖系数为 3.9。同时发现该结果与朱伟银^[10]、黎国运

等^[11]的结果存在一定差异,可能与添加激素种类及浓度存在一定的相关性。此外,基本培养基对辣木的增殖效果最为明显达到了极显著水平;其次为生长素 NAA;其对辣木增殖效果明显,并达到显著水平。

表 4 不同培养基对辣木增殖效果的影响

Table 4 Effects of different culture media on the proliferation of <i>Moringa oleifera</i>					
处理 Treatments	基本培养基 Basic medium	NAA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-BA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均增殖系数 Proliferation coefficient	生长状况 Growth status
A1	MS	0.01	0.4	3.9	苗较粗壮,叶无黄化
A2	MS	0.02	0.6	3.2	苗较粗壮,叶无黄化
A3	MS	0.04	0.8	2.7	苗较粗壮,叶黄化程度小
A4	改良 MS	0.01	0.6	2.7	苗木生长畸形
A5	改良 MS	0.02	0.8	2.4	苗木生长畸形
A6	改良 MS	0.04	0.4	1.9	苗木生长畸形
A7	B ₅	0.01	0.8	3.0	苗木较细弱,顶芽萎蔫较少
A8	B ₅	0.02	0.4	3.1	苗木较细弱,顶芽萎蔫一般
A9	B ₅	0.04	0.6	2.9	苗木较细弱,顶芽萎蔫严重
K1	9.8	9.6	8.9		
K2	7.0	8.7	8.8		
K3	9.0	7.5	8.1		
K1̄	3.27	3.2	2.97		
K2̄	2.33	2.9	2.93		
K3̄	3.00	2.5	2.7		
R	0.94	0.7	0.27		



图 1 辣木增殖

Fig. 1 The proliferation culture of *Moringa oleifera* plantlets

2.3 辣木的生根诱导培养

由表 5 可知,除了 R3 和 R5 生根较晚(12 d)外,其它处理均在接入后第 8 天开始生根;其中 R1 处理的生根率最高,达 100%;其次为 R4 和 R7,均为 92%;最低的为 R5,仅为 40%。然而,尽管 R1 的生根率达到 100%,其平均根数也达到了

7.1,但其根粗仅为 0.013 mm ,不仅纤细且易断,不利于后续组培苗的移栽、成活及生长;而处理 R4 平均根数为 6.5,根粗达 0.044 mm ,且生长更为健壮。综合而言,最适的生根培养基为 $1/2\text{MS}+\text{IBA}0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

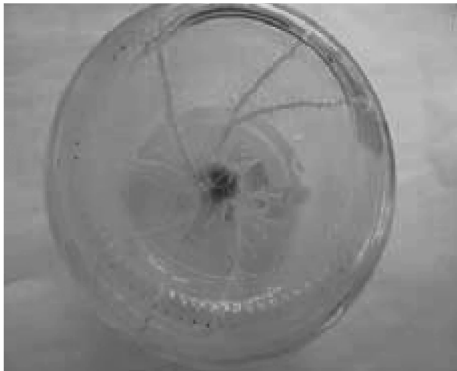


图 2 辣木生根

Fig. 2 The rooting culture of *Moringa oleifera* plantlets

表 5 不同培养基对辣木的生根诱导效果
Table 5 Effect of different culture medium on rooting induction of *Moringa oleifera*

处理	瓶数	生根率/%	生根时间/d	平均根数	平均根长/cm	平均根粗/mm
Treatments	Bottle	Rooting rate	Rooting time	Average root number	Average root length	Average root width
R1	25	100	8	7.1	2.55	0.013
R2	25	72	8	4.4	1.54	0.039
R3	25	52	12	2.3	0.64	0.047
R4	25	92	8	6.5	1.50	0.044
R5	25	40	12	2.0	1.10	0.019
R6	25	60	8	4.0	0.81	0.024
R7	25	92	8	3.3	1.68	0.038

3 结论与讨论

通过辣木种子进行灭菌消毒的过程中发现,随着升汞灭菌时间的延长,污染率逐渐下降,然而当升汞处理时间达 10 min 时,则出现灭死现象。种子剥皮与不剥皮两种处理对比来看,不剥皮比剥皮的种子灭死率明显偏低,可能与种皮保护作用有关。辣木种子灭菌较好的条件为不剥皮+70%酒精(30 s)+0.1%升汞(8 min),成活率为 73.3%,污染率和灭死率分别为 26.7%和 0。通过三因素三水平的正交试验探讨不同培养基、激素种类及浓度对辣木增殖效果的影响,结果表明基本培养基对辣木的增殖效果最为明显,并达到极显著水平;其次为 NAA,其对辣木增殖效果也达到显著水平;最好的增殖培养基为 MS+NAA 0.01 mg·L⁻¹+6-BA 0.4 mg·L⁻¹,增殖系数达到 3.9,且苗生长健壮。对于生根而言,1/2MS 比

1/2B₅基本培养基生根效果要好,生根效果最佳的培养基为 1/2MS+IBA0.4 mg·L⁻¹,生根率达 92%,平均生根数为 6.5,根粗 0.044 mm。辣木组培快繁体系的建立,为解决目前市场上辣木种苗短缺、提升种苗质量及实现工厂化育苗技术提供了技术保障和理论基础。

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] 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,2003,9(2): 34-35.

[3] 张涛,马海乐,钟慧慧.分光光度法测定辣木多糖含量[J].粮油食品科技,2004,12(1):32-33.

[4] 刘昌芬,龙继明,杨焱,等.多功能植物辣木栽培技术研究初报[J].中国农学通报,2007,23(6): 590-593.

[5] 罗云霞,陆斌,石卓功.辣木的特性与价值及其在云南引种发展的景况[J].西部林业科学,2006,35(4): 137-140.

[6] Homa Manaheji,Soheila Jafari,Jalal Zaringhalam,et al. Analgesic effects of methanolic extracts of or root of *Moringa oleifera* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats[J]. Journal of Chinese Integrative medicine February, 2011,9(2): 45-47.

[7] Suresh Chandra Babu. Rural nutrition interventions with indigenous plant food-a case study of vitamin A deficiency in Malawi[J]. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2000,4(3):169-180.

[8] 盛玉婷.植物组织培养技术及应用进展[J].安徽农学通报,2008,14(9): 45-47.

[9] 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.

[10] 朱伟银.辣木的组织培养及快速繁殖研究[J].安徽农学通报,2011,17(7): 54.

[11] 黎国运,李大周,徐佩玲,等.辣木组培育苗技术研究总结[J].热带林业,2006,34(1): 31-32.

Study on Tissue Culture of *Moringa oleifera*

MA Qiu-yue,HUANG Hai-quan,HUANG Wei-xia,XU Jun,YANG Bing-qiao,HUANG Mei-juan
(College of Landscape Architecture,Southwest Forest University,Kunming,Yunnan 650224)

Abstract: In order to promote tissue culture fast propagation of *Moringa oleifera*, the seeds of *Moringa oleifera* Lam. were used as explants to establish their aseptic system, and the proliferation culture and rooting culture were carried out. The results showed that the optimal sterilization condition for the seeds of *Moringa oleifera* Lam. with seed capsule was 70% alcohol (30 s) + 0.1% mercuric chloride (8 min), in which the survival rate reached 73.3%, the rate of pollution and death were repectively 26.7% and 0; The optimal proliferation culture medium was MS+NAA0.01 mg·L⁻¹+6-BA0.4 mg·L⁻¹ among all the tested culture media, in which the proliferation index was 3.9, and the seedlings grew healthy and strong; And the optimal rooting culture medium was 1/2MS+IBA0.4 mg·L⁻¹, in which the rooting rate was 92%, the average number of roots reached 6.5 and root thickness was 0.044 mm respectively.

Keywords: *Moringa oleifera*; tissue culture; proliferation culture; rooting culture