

芦荟试管微克隆繁育中芽增殖体系的建立^{*}

宋运贤¹, 陈耀锋¹, 傅建熙², 郭东伟¹, 任惠莉¹, 曹团武¹, 高 蓝²

(1 西北农林科技大学 农学院 细胞工程实验室; 2 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 研究了库拉索芦荟茎尖组织、叶盘组织和茎盘组织的离体培养特性, 发现芦荟茎尖组织芽增殖效率较低, 叶盘组织无再生能力, 而茎盘组织是芦荟试管克隆芽增殖系建立的最佳外植体。利用茎盘组织建立微克隆增殖系与茎盘组织在茎段上的位置有关, 库拉索短宿茎的中部茎段不定芽形成能力最强。细胞分裂素是诱导库拉索芦荟芽增殖的主要激素, 但质量浓度过高, 不定芽生长弱, 玻璃化现象严重。1.0 mg/L 6-BA, 1.5 mg/L KT 和 0.5 mg/L NAA 组合的MB培养基(该培养基由MS培养基大量元素、微量元素、铁盐, B₅培养基的有机物质构成)是库拉索芦荟试管苗增殖的最佳培养基。

[关键词] 芦荟; 微克隆; 组织培养; 芽增殖

[中图分类号] Q 813.1⁺ 2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0107-04

芦荟原产于非洲, 属百合科芦荟属多年生草本植物。近年来研究表明, 芦荟含有多种生理活性物质, 具有抗溃疡、细胞赋活、强心、促进血液循环、镇痛、抗癌、消炎、皮肤收敛、防腐等多种药理作用^[1], 其作为药用、绿色保健食品及美容化妆品已引起人们的广泛关注, 开发利用前景十分广阔。

芦荟雄、雌花开放时间不一致, 授粉不亲和, 结籽很少, 且种子繁殖发育时间太长, 因此种子繁殖在生产上很少利用。现阶段生产上主要靠扦插和分枝进行无性繁殖以保持品种的特性, 长期的分枝繁殖将带来芦荟种性的退化。试管微克隆繁殖技术是利用植物组织培养方法快速超常繁殖植物个体的一种生物技术, 它能在较短的时间内快速大量繁殖个体, 并能很好保持植物的种性。这一技术在芦荟上已得到利用, 这方面的相关报道较多^[1~12]。美国库拉索芦荟是芦荟中较好的品种之一, 但在离体繁殖条件下增殖效率低。本研究对美国库拉索芦荟试管微克隆繁殖中高效芽增殖体系的建立进行了初步的探讨, 以期建立美国库拉索芦荟高效试管微克隆繁殖技术体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为西安百隆生物工程有限公司提供的美国库拉索芦荟。

1.2 试验方法

从田间取回一年生芦荟, 除去大的叶片, 将芦荟短宿茎和未展开的叶片放入体积分数75%的乙醇中迅速漂洗消毒后, 用体积分数0.1%的升汞消毒10~12 min, 无菌水冲洗3~4次。于无菌条件下切下茎尖、茎盘和未展开的叶片组织, 茎盘厚度为0.5 cm左右, 分别接种于不定芽诱导培养基中。茎尖以下位置各茎盘依次标记为1, 2, 3, 4, 5, 6, 7。不定芽诱导培养基MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+CA 500 mg/L+Su(质量分数3%)+琼脂(质量分数0.5%)。培养温度为25~28℃, 采用昼夜24 h全光照, 光照强度为3 000 lx。12 d左右, 茎段开始生成丛生芽。30 d后丛生芽分单株, 以研究芽的最佳增殖培养基。增殖培养基以MB培养基为基本培养基, 附加不同激素配比(详见表3)。

2 结果与分析

2.1 库拉索芦荟不同组织的培养特性

在附加1.0 mg/L KT, 2.5 mg/L 6-BA, 质量分数3%蔗糖的MB培养基上, 研究了美国库拉索芦荟不同组织的培养特性。结果(表1)表明, 在芽增殖培养基上, 茎尖组织有一定的生长, 并有一定的芽增殖, 但增殖效率低, 且大多数为单芽生长。茎盘组织(中间)在形成层产生大量不定芽, 增殖效率普遍较高, 且通过此组织产生的芽体能很快通

^{*} [收稿日期] 2001-12-27
[基金项目] 杨凌农业高新技术产业示范区科研专项基金资助项目(99KG05)
[作者简介] 宋运贤(1976-), 男, 江苏宿迁人, 在读硕士, 主要从事农业生物技术研究。

过转移培养基增殖。叶盘组织在培养过程中直接转褐死亡。这表明库拉索芦荟不同组织培养特性差异很大, 茎盘组织是建立芽增殖体系的最佳组织。

表 1 库拉索芦荟不同组织的培养特性

Table 1 Cultural character of the different tissues of CURACAO Aloe			
取样部位 Primary explant	接种外植体数 No. of inoculation explant	增殖芽总数 Total No. of plantlet formed	增殖倍数 Multi- plication rate
茎尖 Shoot tip	10	15	1.50
茎盘 (中间) Stem segment (middle)	27	96	3.56
叶盘 Leaf segment	20	0	0

2 2 不定芽的诱导与发育

库拉索芦荟外植体培养 7~ 10 d 后, 中部茎盘组织的形成层组织上形成一团或几团白色球状突起, 后逐渐变绿, 形成丛生芽, 并进一步发育成苗 (图 1)。茎尖组织在保持长期绿色后, 有一定程度的生长, 但生长速度迟缓, 部分蘖芽开始发育并分裂, 形成 1~ 2 个芽体。茎尖组织和腋芽形成的芽体经转移继代后生长能力较差, 不定芽分生能力也较差。而茎盘组织形成的不定芽体, 在转移继代后分生能力强, 芽体生长旺盛, 增殖快, 因此从总体上看, 茎盘组织增殖优于茎尖组织。

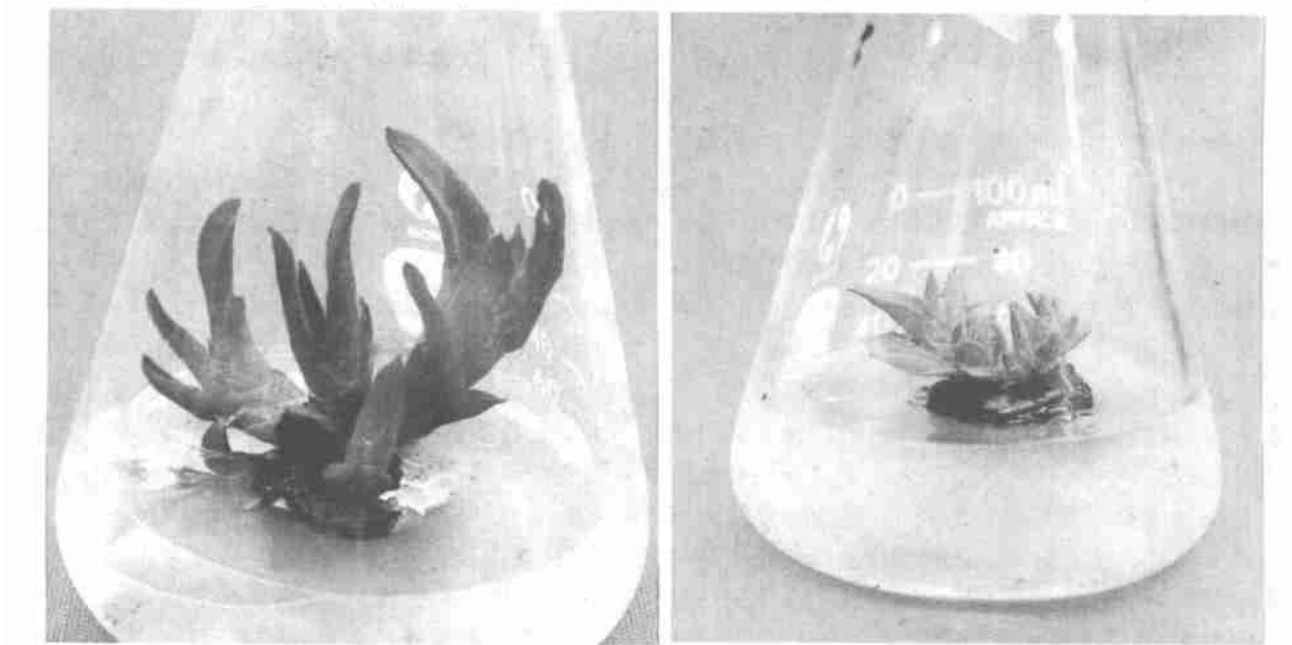


图 1 不定芽的诱导和发育

Fig. 1 The induction and development of adventitious bud

2 3 不同茎位茎盘组织形成不定芽的差异

试验分析了 9 个一年生芦荟茎段不同茎盘不定芽产生的特性。结果 (表 2) 表明, 库拉索芦荟茎段不同位置芽的增殖能力不同, 第 4 个茎盘位置芽的

增殖能力最强, 平均每盘芽增殖 5.78 个。该位置上下茎盘芽增殖能力逐渐降低, 茎尖下首段和茎段末段位置未出现芽分化。这表明美国库拉索芦荟茎盘不定芽的形成与茎段位置有关。

表 2 库拉索芦荟茎段不同茎盘对形成不定芽的影响

Table 2 The induction of adventitious bud from different part of the stem segments of CURACAO Aloe			
茎盘位置 (自上而下) Site of stem segment (up to down)	接种外植体数 NO. of inoculation explants	不定芽数 No. of adventitious buds	平均每盘不定芽数 No. of adventitious buds per segment (average)
1	9	0	0
2	9	0	0
3	9	26	2.89
4	9	52	5.78
5	9	18	2.00
6	9	0	0
7	9	0	0

2 4 激素配比对芽增殖效率的影响

将从生芽切割成单株，在附加不同激素配比的培养基上继代培养 30 d，观察库拉索芦荟芽增殖情况。结果（表 3）表明，在保持诱导培养基 NAA 质量浓度不变的情况下，不同的细胞分裂素及其组合对库拉索芦荟芽增殖效率影响很大。单独使用高质量浓度 6-BA 以及较高质量浓度的 6-BA 和 KT 组

合，虽然能获得较高的不定芽增殖率，但不定芽生长弱，玻璃化现象严重。低质量浓度的 6-BA，KT 与 NAA 组合，芽增殖效率较低，但可获得健壮、均一、无玻璃化现象的芽苗。对比分析表明，附加 1.0 mg/L 6-BA，1.5 mg/L KT 和 0.5 mg/L NAA 是库拉索芦荟的最佳增殖培养基。

表 3 不同激素配比对库拉索芦荟芽增殖的影响

Table 3 Effect of exogenous homones on the plantlet multiplication of CURACAO Aloe				
培养基/ (mg · L ⁻¹) Treatment	接入不定芽数 No. of inoculation bud	芽增殖数 No. of plantlet fomed	增殖率/% Multiplication rate	玻璃化苗数 No. of vitrification
6-BA 6.0+ NAA 0.5	18	96	5.33	5
6-BA 2.5+ KT 2.5+ NAA 0.5	21	140	6.67	3
6-BA 2.0+ KT 2.0+ NAA 0.5	20	105	5.25	1
6-BA 1.0+ KT 1.5+ NAA 0.5	55	231	4.20	0

3 讨论与结论

已有研究^[2,6]表明，芦荟茎尖是试管克隆的最佳外植体，叶片组织也能通过不定芽增殖。本研究证明：茎尖组织虽然能够建立起芦荟无性繁殖系，但需要时间长，且无性系繁殖效率低，同时无性系建立需要较高的激素质量浓度，而未展开的幼嫩叶片组织的任何部位都不具有再生能力，茎盘组织是无性系建立的理想外植体，通过这种外植体易建立起芦荟克隆增殖无性系，且增殖效率高而稳定。

通过茎盘组织建立芦荟试管克隆无性系，增殖效率与其在茎段上的位置有关。研究发现，库拉索芦荟短宿茎的中部茎段形成层组织不定芽形成能力

最强，而茎段的上部和下部茎段不定芽很难形成。细胞分裂素是诱导库拉索芦荟芽增殖的主要激素。Meyer H J, Staden 研究发现^[12]：芦荟组织培养过程中 6-BA，KT 能够增加组织褐变。本研究证实，高质量浓度细胞分裂素显著增加褐变，并且易引起试管苗的玻璃化现象；但低质量浓度的 KT，6-BA 和 NAA 配合使用可以显著降低褐变和玻璃化现象，同时也有利于库拉索芦荟芽苗增殖和健壮生长。在芦荟组织培养过程中一般采用 MS 培养基作为基本培养基^[1~12]，本研究在此基础上增加了有机物质的用量，采用 B₅ 培养基的有机物质，结果得到的试管苗健壮翠绿，移栽成活率高，这表明较高的有机物质有利于芽苗健壮生长。

[参考文献]

[1] 朴日子, 沈允权, 金英善, 等. 三种芦荟的组织培养 [J]. 延边大学农学报, 1997, 19 (3): 187- 191.

[2] 郑新淑, 金光春, 金滢完, 等. 芦荟的生长点培养及其再生植株的诱导 [J]. 延边农学院学报, 1993, (1): 20- 22.

[3] 桂耀林, 徐廷玉, 顾淑荣, 等. 芦荟茎组织培养及器官分化的研究 [J]. 植物学报, 1990, 32 (8): 606- 610.

[4] 张 瑛, 林贵美, 莫磊兴, 等. 芦荟的组织培养和快速繁殖 [J]. 广西农业科学, 1999, (2): 103- 105.

[5] 朴泰浩, 安基哲, 金今松, 等. 芦荟组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 中国野生植物资源, 1994, (1): 45- 46.

[6] 金松男, 金今松. 芦荟腋芽的组织培养及其驯化栽培 [J]. 中国野生植物资源, 1994, (4): 43- 44.

[7] 陈彩艳, 张 驰, 刘选民, 等. 库拉索芦荟组织培养研究 [J]. 湖北民族学院学报 (自然版), 2000, 18 (4): 10- 12.

[8] 冯 凯, 刘 云, 寇德军, 等. 库拉索芦荟组织培养及快繁技术的研究 [J]. 农业与技术, 2000, 20 (1): 39- 41.

[9] Abrie A L, Staden J van. Micropropagation of the endangered Aloe polyphylla [J]. Plant Growth Regulation, 2001, 33 (1): 19- 23.

[10] Sanchita Chaudhuri, Usha Mukundan, Chaudhuri s, et al. Aloe vera L. micropropagation and characterization of its gel [J]. Phytomorphology, 2001, 51 (2): 155- 157.

[11] Natali L, Sanchez IC, Cavallini A. In vitro culture of Aloe barbadensis Mill: micropropagation from vegetative meristems [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1990, 20 (1): 71- 74.

[12] Meyer H J, Van Staden J. Rapid in vitro propagation of Aloe barbadensis Mill [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1991, 26: 167- 171.

Organogenesis and plantlet regeneration in vitro of CURACAO aloe micropropagation

NG Yun-xian¹, CHEN Yao-feng¹, FU Jian-xi², GUO Dong-wei¹, REN Hui-li¹, CAO Tuan-wu¹, GAO Lan²

(1 Laboratory of Cytoengineering, College of Agronomy, 2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The research of cultural character in vitro of CURACAO Aloe was carried out using young stem apex, leaf segments and stem segments as initial explants. The result indicated that young stem apex had lower reproducing rate while leaf segments had no ability to reproduce. Stem segment was the best explant for the plantlet regeneration in vitro of CURACAO Aloe. But the multiplication rate had relationship with the site where the stem segments set. The segment in the middle of the stem had more potent to produce adventitious bud. Cytokinin was the main exogenous hormone which induced the plantlet regeneration. But high concentration resulted in adventitious bud poor growth and severe vitrification. The best medium for the plantlet regeneration of CURACAO Aloe was MB medium (MB medium contains the macroelement, microelement, molysite of MS medium and organic matter of B₅ medium) with 6-BA 1 mg/L, KT 1.5 mg/L, NAA 0.5 mg/L.

Key words: aloe; micropropagation; tissue culture; plantlet regeneration

(上接第 106 页)

Study on asparagus spears physiological change in growing on field and after harvest

DUAN Xu-chang, GAO Peng-cheng, LI Zhi-cheng, YANG Gong-ming

(College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Respiration rate of asparagus spears measured in the field showed that the rate of the tip is four times to that of the butt for 190 mm high spear. After harvest, there was an immediate rise to a peak in the respiration rate, followed by a rapid drop during 24 h to a constant level 30% of the peak respiration rate. Result of sugars and proteins measured showed there are low level of sugars and high level of proteins in the spear tips than that in butt, sugars and proteins declined in the first 24 h after harvest. For 24 h after harvest, total free amino acids remained steady. Asparagine/aspartic acid increased, glutamine/glutamic acid and proline decreased. 48 h after harvest, total free amino acids increased by 75%.

Key words: asparagus spear; respiration rate; sugars; protein; free amino acid