

罗汉果茎段组培快繁技术研究

唐凝, 朱晓琴, 韩霜, 徐园园, 宋旻, 张晓涵, 裴冬丽*

(商丘师范学院生物与食品学院/植物与微生物互作河南省高校重点实验室, 河南 商丘 476000)

摘要:以青皮果品种的罗汉果幼嫩茎段作为试验材料, 探讨不同消毒试剂、消毒时间、激素组合及激素浓度梯度对罗汉果组织培养过程中的影响, 以期在短时间内获得大量罗汉果组培苗。结果表明: 外植体最佳消毒方式为0.1%氯化汞溶液消毒6 min, 成活率达85%; 激素组合为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA的培养基可诱导发芽; 激素组合为MS+0.4 mg/L IBA + 1 mg/L 6-BA为最佳继代增殖培养基, 增殖系数达6.3; 最佳芽苗伸长培养基为MS+0.05 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃, 35 d平均伸长5.1 cm; 最佳生根培养基为1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA, 生根数量在3~8条之间, 生根率达86%。

关键词:罗汉果; 组织培养; 茎段; 激素

中图分类号: S668.9

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)02-0038-04

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Siraitia grosvenorii* Stem

TANG Ning, ZHU Xiaoqin, HAN Shuang, XU Yuanyuan, SONG Yang, ZHANG Xiaohan, PEI Dongli*

(Department of Biology and Food Science, Shangqiu Normal University / Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions in Henan Province, Shangqiu 476000, China)

Abstract: The effects of different kinds of reagents and disinfection time, hormone combination and hormone concentration gradient on the tissue culture of *Siraitia grosvenorii* were studied by using tender stems as experimental materials. The best disinfection way for *Siraitia grosvenorii* is 0.1% HgCl₂ solution disinfecting 6 min, efficiency of sterilization can reach 85%. The tender stems were cultured on the medium of 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, and the seedlings with large shoots were obtained, and the stem segments of the seedlings were removed as explants for further cultivation. It was found that the 0.4 mg/L IBA + 1 mg/L 6-BA was the best subculture medium, and the multiplication coefficient was up to 6.3. The best culture medium of shoots development was 0.05 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L GA₃, the average elongation of 35 d was 5.1 cm. The best rooting medium was 1/2MS + 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L NAA, and the number of rooting was 3-8. Rooting rate was up to 86%.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; Tissue culture; Stem; Hormone

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)属于葫芦科多年生藤本植物, 主要分布于广西永福县、临桂县、龙胜县等地区。罗汉果每年夏秋季节开花结果, 果实含有葡萄糖、果糖、蛋白质、维生素等营养成分, 是中国传统的食药两用药材^[1]。中医认为罗汉果果实具有清热解毒、生津止渴、止咳化痰、凉血舒胃、活血化瘀等功效, 临床上用于治疗肺结核、哮喘、急慢性气管炎、胃炎等疾病^[2]。此外, 日本学者发现罗汉果苷的甜度是蔗糖甜度的256~

344倍, 并且热量非常低, 是高血糖、高血压、高血脂和肥胖症患者的首选天然甜味剂^[3]。随着生活水平的提升, 高血糖和肥胖症患者数量逐年上升, 市场对罗汉果甜苷的需求量逐渐增高, 以添加罗汉果提取物为原料的食品生产企业迅速崛起, 带动罗汉果种植业的蓬勃发展^[4]。

罗汉果在中国的栽培历史较长, 农业生产中通常采用扦插或压蔓的方法进行罗汉果的繁殖。但无性繁殖会随着繁殖代数的增加引起作物品种退化^[5], 毒素堆积降低植物抗病性, 导致罗汉果大幅减产^[6]。近年来随着罗汉果种植面积的增加, 花叶病发生流行, 广西永福县受害面积甚至达到100%, 严重植株减产达到50%以上^[7]。利用植物组织培养技术培育脱毒罗汉果苗是解决罗汉果种性退化问题的重要方法。利用组培快繁技术诱导

收稿日期: 2019-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(31902066, 31571997); 河南省高校科技创新团队(21IRTSTHN025)

作者简介: 唐凝(1992-), 男, 助理实验师, 硕士, 研究方向: 微生物生物技术与植物保护。

通讯作者: 裴冬丽, 女, 博士, 教授, E-mail: peidongli@126.com

茎段芽的增殖,经壮苗生根后能够培育出优质的罗汉果苗^⑧。本试验通过优化组培快繁方法,提高分化效率,建立高效的罗汉果离体再生培育体系,为工厂标准化优质罗汉果苗的生产提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

罗汉果青皮果品种“永青一号”的花前期幼嫩枝条于2017年8月取自广西壮族自治区桂林市永福乡。剪取健壮、无病虫害的植株嫩梢。

1.2 方 法

1.2.1 培养基的制备

以MS加入7 g/L的琼脂和30 g/L的蔗糖为基本培养基,与不同种类、浓度的植物激素制备培养基;1/2MS生根培养基以1/2MS加入7 g/L的琼脂和15 g/L的蔗糖为基础培养基。调节pH在5.7~5.9。

1.2.2 外植体消毒处理

参考谭秀梅和赵春莉等的消毒方法^{⑨-⑩}。将幼嫩枝条用清水洗净,在流水中冲洗30 min后放入超净工作台,75%酒精消毒30 s,无菌水冲洗3~4次,分别用0.1%氯化汞和2%次氯酸钠各消毒5、6、7 min,最后用无菌水冲洗3~4次,置于无菌滤纸上,吸干表面水分。

1.2.3 芽的诱导培养

将消毒过的幼嫩枝条切成0.5 cm带腋芽小段,接种在激素组合为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA的培养基中,置于26 °C培养室中,每日光照16 h,光照强度1 000 lx。5 d后统计污染率、死亡率,40 d后统计不同消毒处理中的腋芽成活率。污染率=(污染个数/消毒外植体总数)×100%;死亡率=(死亡个数/消毒外植体总数)×100%;成活率=(成活个数/消毒外植体总数)×100%。

1.2.4 继代增殖培养

切取诱导出的不定芽分别接种到不同激素浓度继代增殖培养基中,26 °C培养室培养,每日光

照16 h,光照强度1 000 lx。继代增殖培养基:(1)MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA;(2)MS+0.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA;(3)MS+0.5 mg/L 6-BA+0.6 mg/L IBA;(4)MS+0.5 mg/L 6-BA+0.8 mg/L IBA;(5)MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA;(6)MS+1 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA;(7)MS+1 mg/L 6-BA+0.6 mg/L IBA;(8)MS+1 mg/L 6-BA+0.8 mg/L IBA。培养30 d观察芽的生长情况;增殖系数=出芽数/原有芽数。

1.2.5 芽苗伸长培养

切取继代增殖培养中生长状况良好、叶片嫩绿的不定芽接种到不同激素浓度芽苗伸长培养基中。26 °C培养室培养,每日光照16 h,光照强度1 000 lx。芽苗伸长培养基:(1)MS+0.05 mg/L 6-BA+0.05 mg/L GA₃;(2)MS+0.05 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃;(3)MS+0.05 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA₃;(4)MS+0.1 mg/L 6-BA+0.05 mg/L GA₃;(5)MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃;(6)MS+0.1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA₃。接种35 d后测量芽苗的长度。

1.2.6 生根培养

将生长健壮的芽苗转移至生根培养基中,26 °C培养室培养,每日光照16 h,光照强度1 000 lx。生根培养基:(1)MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA;(2)MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA;(3)1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA;(4)1/2MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA;(5)1/2MS+0.5 mg/L IBA+1 mg/L NAA;(6)1/2MS+1 mg/L IBA+1 mg/L NAA。培养30 d统计生根数量、计算生根率;生根率=(生根个数/培养芽苗总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒试剂及消毒时间对外植体处理效果的影响

由表1可知,选取0.1%氯化汞和2%次氯酸钠为消毒试剂时,相同处理时间使用0.1%氯化汞的茎芽的成活率高于2%次氯酸钠。另外,外植体表面消毒处理时间越长,消毒越彻底,污染率越低,污染率与处理时间呈正相关;随着消毒时间进一步延长,

表1 不同消毒试剂及消毒时间对外植体处理效果的影响

处理	消毒试剂	处理时间(min)	消毒外植体数(个)	污染数(个)	污染率(%)	死亡率(%)	成活率(%)
1	0.1%氯化汞	5	20	5	25	10	65
2	0.1%氯化汞	6	20	2	10	5	85
3	0.1%氯化汞	7	20	1	5	25	70
4	2%次氯酸钠	5	20	7	35	5	60
5	2%次氯酸钠	6	20	4	20	5	75
6	2%次氯酸钠	7	20	3	15	20	65

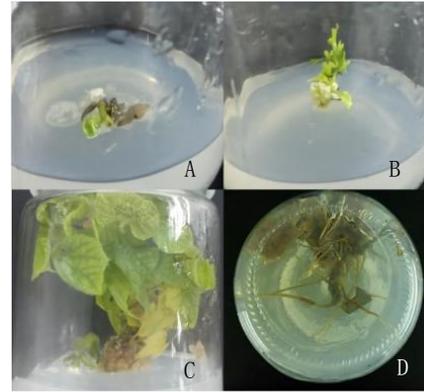
对外植体内部结构造成损伤的增加,处理时间为7 min时,死亡率达到20%。结果表明,0.1%氯化汞溶液消毒6 min处理的茎芽成活率最高,为85%。将消毒过带腋芽的茎段接种至芽诱导培养基上,培养40 d得到带有大量嫩芽的罗汉果苗(图1A)。

2.2 不同激素配方对罗汉果继代增殖诱导的影响

切取罗汉果苗的嫩芽茎段接种不同激素浓度继代增殖培养基,结果见表2。发现IBA浓度过高或过低均不利于芽的生长,浓度过低会导致芽变得细小且生长缓慢,浓度过高会导致叶片发黄从而会影响芽的生长发育,甚至出现褐化现象。MS+1 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA为最佳继代增殖培养基,增殖系数为6.3,芽苗生长状况最好(图1B)。

2.3 不同激素配方对芽苗伸长的影响

切取继代增殖培养后的芽苗接种到芽伸长培养基进行伸长培养。由表3可知,培养基GA₃浓度影响芽苗的伸长能力。MS+0.05 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃为最佳芽苗伸长培养基,芽苗伸长长度为5.10 cm,芽苗茎粗壮,叶片大且嫩绿(图1C)。



A:带腋芽的茎段;B:增殖芽;C:芽苗伸长培养;D:生根培养
图1 罗汉果组培苗的培养及扩繁

2.4 不同激素配方对罗汉果苗根系生长的影响

将伸长培养后生长状况良好的无根罗汉果苗接种至生根培养基培养30 d。由表4可知,1/2MS、IBA、NAA浓度均会影响罗汉果生根率。1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA为最佳生根培养基,生根率86%,根生长的粗壮,长势较好(图1D)。

表2 不同激素配方对罗汉果芽继代增殖诱导的影响

处理	激素浓度	增殖系数	生长状况
1	MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA	2.3	芽细小,叶片黄绿,生长缓慢
2	MS+0.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA	3.7	芽细小,部分叶片黄绿,生长缓慢
3	MS+0.5 mg/L 6-BA+0.6 mg/L IBA	5.4	芽健壮,叶片淡绿,生长迅速
4	MS+0.5 mg/L 6-BA+0.8 mg/L IBA	2.8	叶片发黄,部分褐化,生长迅速
5	MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA	4.7	芽细小,叶片淡绿,生长缓慢
6	MS+1 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA	6.3	芽健壮,叶片嫩绿,生长迅速
7	MS+1 mg/L 6-BA+0.6 mg/L IBA	6.1	芽健壮,叶片嫩绿,生长迅速
8	MS+1 mg/L 6-BA+0.8 mg/L IBA	5.2	芽健壮,叶片黄绿,生长迅速

表3 不同激素配方对芽苗伸长的影响

处理	激素浓度	芽苗伸长(cm)	生长状况
1	MS+0.05 mg/L 6-BA+0.05 mg/L GA ₃	3.30±0.36	芽苗伸长不明显,叶片黄绿,茎细小
2	MS+0.05 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA ₃	5.10±0.26	芽苗伸长明显,叶片嫩绿,茎粗壮
3	MS+0.05 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA ₃	4.70±0.30	芽苗伸长明显,叶片淡绿,茎粗壮
4	MS+0.1 mg/L 6-BA+0.05 mg/L GA ₃	3.80±0.26	芽苗伸长比较明显,叶片淡绿,茎细小
5	MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA ₃	4.30±0.17	芽苗伸长明显,叶片嫩绿,茎粗壮
6	MS+0.1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA ₃	4.10±0.61	芽苗伸长比较明显,叶片淡绿,茎粗壮

3 讨论

通过组织快繁技术培养罗汉果苗过程中,外植体成活率直接影响生产效率和成本。试验发现0.1%氯化汞进行消毒处理的结果优于2%次氯酸钠,与潘丽梅等^[11]试验结果一致。在外植体消毒过程中,消毒时间十分关键,消毒时间的延长提

高消毒效果,但会降低外植体生命力。谭秀梅等^[9]认为0.1%氯化汞消毒8 min的效果最好(成活率为58%),本试验适当降低消毒时间,采用氯化汞处理6 min,使外植体成活率提高到85%。

李晓璐等^[12]认为6-BA和IBA与细胞增殖分裂有关,是罗汉果外植体继代增殖的关键激素,对不定芽的生长发育起重要作用。本试验研究表

表4 不同激素配方对罗汉果苗根系生长的影响

处理	激素浓度	生根数(条)	生根率(%)	生长情况
1	MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA	0~2	56.00±2.65 ^c	根细小,数量少
2	MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA	0~4	63.00±2.00 ^c	根细小
3	1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA	3~8	86.00±2.65 ^a	根粗壮,长势较好
4	1/2MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA	4~7	83.00±1.73 ^a	根粗壮,数量多
5	1/2MS+0.5 mg/L IBA+1 mg/L NAA	4~6	73.33±0.58 ^b	根细小,长势弱
6	1/2MS+1 mg/L IBA+1 mg/L NAA	2~6	60.00±5.29 ^c	根细小

注:同列不同的小写字母表示 $P<0.05$ 水平上差异显著

明在一定范围内,低浓度的6-BA会使叶片黄化,随着6-BA浓度的增加,罗汉果芽苗生长越健壮。王小敏等^[13]认为激素组合为MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA为罗汉果快繁的最佳继代增殖培养基,增殖系数为4.45,本试验筛选出MS+1 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA为继代增殖培养基,增殖系数达6.3。激素IBA具有诱导形成根源体、促进新根生成及维管系统分化等作用,是植物组织培养中常用的生根激素。本试验研究表明含0.5~1 mg/L IBA的培养基,罗汉果生根状况良好,其中1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA的激素组合生根率最高,达到86%,根数最高为8根、并且根茎粗壮适合移栽炼苗。

谭秀梅等^[9]认为GA₃能够有效促进罗汉果新芽的增殖和加快生长。为达到扩大增殖量的目的,本试验设计含GA₃的芽苗伸长培养基进行芽苗伸长试验,筛选出的MS+0.05 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃培养基可使不定芽在35 d内伸长5.1 cm。本试验采用的GA₃芽苗伸长培养和低浓度NAA诱导生根结合的方法,使芽苗诱导生根率处于较高水平,并未出现因愈伤组织过多而导致的芽苗生根率下降的现象,显著提高罗汉果无菌苗的质量^[4]。相较于无性繁殖,组织培养罗汉果苗能够提高作物产量、优化品种、减少病虫害,并且组织培养罗汉果具脱病毒、增殖倍数大、繁殖材料少、苗株大小一致等特点^[14]。本试验成功建立高效的罗汉果茎段组培快繁技术,对标准化、规模化生产优质罗汉果苗、提升培育质量提供理论研究依据。

参考文献:

- [1] 潘海燕. 罗汉果研究概要及展望[J]. 山西中医, 2008(12): 38-39.
- [2] 李典鹏, 张厚瑞. 广西特产植物罗汉果的研究与应用[J]. 广西植物, 2000(3): 269-275.
- [3] 张桂玲, 温四民. 甜味植物研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006(18): 4712-4713.
- [4] 陈继富. 无籽罗汉果的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2013(9): 968-972.
- [5] 张梅秀, 魏玉杰, 臧广鹏, 等. 脱毒马铃薯在高温低湿条件下的工厂化快繁技术研究[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(5): 79-80, 96.
- [6] 蒋玉梅, 于琴芝, 唐学军, 等. 不同整枝疏剪对罗汉果扦插苗产量和果实等级的影响[J]. 农业科技通讯, 2017(6): 174-176.
- [7] 杭玲, 陈丽娟, 陈少珍, 等. 罗汉果茎尖脱毒快繁技术[J]. 西南农业学报, 1999(3): 125-127.
- [8] 黄春梅, 吴金寿, 赖钟雄. 罗汉果组织培养与快繁研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2006(4): 298-303.
- [9] 谭秀梅, 王晓英, 田启建, 等. 罗汉果高效组培快繁技术的探究及优化[J]. 药物生物技术, 2013(6): 518-521.
- [10] 赵春莉, 李金英. 植物组织培养中污染原因及其控制方法[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(6): 11-13.
- [11] 潘丽梅, 莫长明, 马小军, 等. 无籽罗汉果组培无菌系的构建[J]. 中国农学通报, 2013, 29(28): 150-155.
- [12] 李晓璐, 岑秀芬, 韦鹏霄. 6-BA和IBA配合使用对罗汉果组培苗芽增殖的影响[J]. 广西热带农业, 2006(2): 29-31.
- [13] 王小敏, 叶晓霞, 龙海桂. 罗汉果茎段快繁技术研究[J]. 岳阳职业技术学院学报, 2014, 29(1): 69-72.
- [14] 白隆华, 蒲瑞翎. 罗汉果组培苗栽培技术特点及存在的问题[J]. 中国医学生物技术应用, 2004(1): 63-66.

(责任编辑:王 昱)