

罗汉果茎段离体培养研究

林 荣 王秀琴 王润珍

(广西植物研究所)

摘要 罗汉果茎段培养在MS基本培养基中, 研究植物激素对器官形成的影响, 试验结果表明细胞分裂素BA促进芽的形成和增殖; 而KT则有利于根的形成, 却抑制芽的增殖, BA和IBA配合使用, 对茎段形成芽有增效作用。通过继代培养, 能繁殖大量绿苗, 这揭示出同一块离体茎组织培养出许多小植株的可能, 将嫩梢转入含有NAA 0.2毫克/升的1/2MS培养基中, 能诱导生根, 形成完整小植株, 试管苗成功地移栽田间, 并已开始开花结果。

关键词 罗汉果; 茎段离体培养; 植物激素; 器官形成

罗汉果*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 系原产我国广西的特有经济植物。果实含有丰富的葡萄糖, 果糖及多种维生素。鉴于罗汉果历来采用压蔓繁殖, 繁殖系数低, 发展良种生产受到一定的限制, 利用组织培养法进行繁殖, 具有繁殖系数高、速度快和成苗率高等特点, 可作为罗汉果良种快速繁殖的有效途径。作者曾报道罗汉果叶组织培养的研究结果^[1-2], 本文报道罗汉果茎段离体培养的研究结果。

材 料 和 方 法

材料采用罗汉果的长滩果、拉江果及青皮果等品种的母株的茎段或种子培养无菌苗的茎段。

罗汉果的块茎长出新梢后, 剪取嫩梢去掉叶片, 洗干净后用70%酒精浸渍片刻, 再用0.1% HgCl_2 溶液消毒5—6分钟, 用无菌水冲洗4—5次, 吸干水分, 然后切成长约1厘米带腋芽的茎段进行接种。种子需去掉种皮后进行表面消毒再行播种。

采用MS基本培养基^[3], 根据试验要求分别附加不同浓度和组合的激动素(KT)、6-苄基氨基嘌呤(BA)、玉米素(ZT)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)等。蔗糖或白糖浓度2—4%, 琼脂0.4—0.9%。pH为5.8, 以1公斤/厘米²高压蒸汽灭菌20分钟, 接种后培养于 25 ± 2 ℃, 每天用日光灯照光9—10小时, 约2,000勒克司。

结 果 和 讨 论

一、细胞分裂素对器官形成的影响

罗汉果茎段在MS基本培养基中, 附加BA、KT及ZT的不同浓度(0.5—2.0毫克/升)的细胞分裂素的试验结果表明(见图1), BA、KT、ZT及对照(基本培养基)均能诱导茎段形成幼芽和长出梢, 可见罗汉果茎段的内源激素含量较高, 在没有附加激素的基本培养基, 亦能使茎段形成芽和梢, 但仅是单生, 而附加细胞分裂素能促进芽的增殖, 其中以BA效果最好, 不

姚军和吴聚雁两同志参加部分工作。

仅形成芽、梢的数量较多，而且较粗壮，而KT和ZT的各种浓度形成芽、梢数量均较少，但有不同程度形成根的现象，因此促进芽的分化和增殖，细胞分裂素BA是必需的。

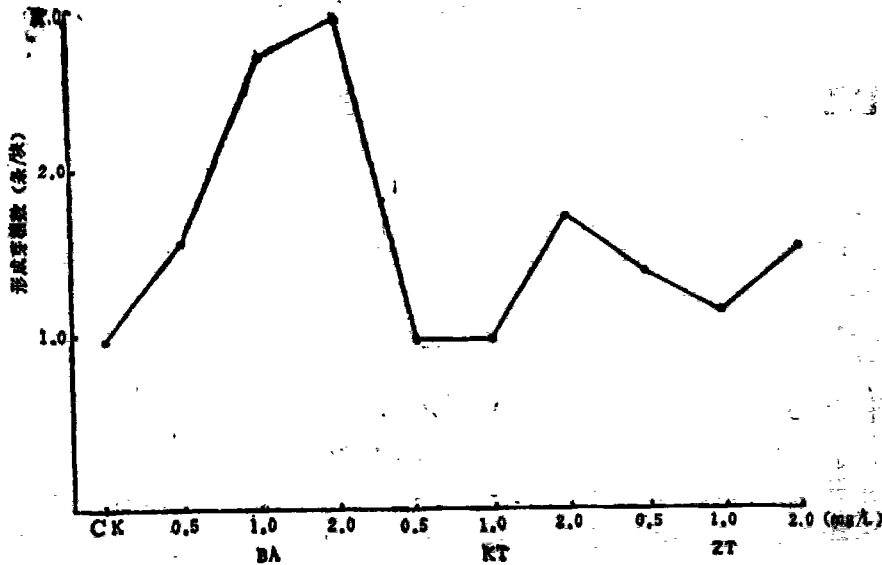


图1 细胞分裂素对器官形成的影响

二、不同激素组合对器官形成的影响

罗汉果茎段在MS基本培养基附加不同浓度BA(0.5—1.0毫克/升)和IBA(0.1—0.5毫克/升)的不同组合的试验结果表明(见表1),各种组合均能诱导茎段形成芽,长出梢,在IBA浓度相同的情况下,随着BA浓度的提高,形成芽的数量也随着增多,BA和IBA配合使用对茎段形成芽有增效作用。

表1 激素对罗汉果茎段形成器官的影响

激素 (毫克/升)	外植体 数目(块)	形成芽、梢			激素 (毫克/升)	外植体 数目(块)	形成芽、梢		
		块	%	条/块			块	%	条/块
MS	20	20	100	1.0	MS + BA1.0 + IBA0.1	20	20	100	3.0
MS + BA0.5	20	20	100	1.6	MS + BA2.0 + IBA0.1	20	20	100	3.5
MS + BA1.0	20	20	100	2.7	MS + BA0.5 + IBA0.5	20	20	100	1.6
MS + BA2.0	20	20	100	2.9	MS + BA1.0 + IBA0.5	20	20	100	3.0
MS + BA0.5 + IBA0.1	20	20	100	1.7	MS + BA2.0 + IBA0.5	20	20	100	3.7

三、糖分浓度与器官形成的关系

作为炭源一般采用分析纯的蔗糖、为了便于生产上应用,以分析纯的蔗糖和市售白糖作对比试验结果表明(见表2)罗汉果茎段在适宜的培养基中,两种不同质量的糖分,其诱导茎段形成芽、梢的效果相似,这说明市售白糖没有含有对茎段培养的有害物质,完全可以代替分析纯的蔗糖,从而降低培养基的费用。

表2 糖分浓度与罗汉果茎段形成芽、梢的关系

糖分浓度 (%)	外植体 数目(块)	形成芽、梢		
		块	%	条/块
分析纯蔗糖 3	20	20	100	3.0
白糖 2	20	20	100	3.0
白糖 3	20	20	100	3.4
白糖 4	20	20	100	2.3

培养基的渗透压对于诱导细胞分裂, 增殖有重要的作用。糖分浓度对器官分化的影响可能与改变培养基的渗透压有关, 在适宜的培养基中采用白糖 2、3 及 4% 等三种不同浓度的试验结果表明(见表 2), 罗汉果茎段培养诱导形成芽和梢, 糖分浓度以 2% 为宜。

四、琼脂质量对形成器官的影响

琼脂是常用的凝固剂, 琼脂的浓度和质量对诱导器官分化有很大的影响。琼脂浓度过高, 使配制的培养基过硬, 往往抑制组织的生长和分化。如果琼脂质量较差, 由于含有杂质对细胞生长会造成不良的影响, 根据试验结果表明各地所产的琼脂质量有很大的差异, 以广西合浦产的琼脂质量较好, 因此琼脂适宜浓度应根据琼脂质量而定。我们又采用合浦产的粉状琼脂和条状琼脂的不同浓度的试验结果表明(见表 3), 以粉状琼脂质量较好, 只需 0.45—0.50% 的浓度即可, 不仅可以节约琼脂用量, 而且形成芽、梢的数量较多, 每块外植体平均芽、梢数为 5.9—6.4 条; 而条状琼脂浓度需提高到 0.7% 以上, 培养基才能凝固, 而且形成芽、梢数较少, 每块外植体只有 3.8—4.0 条, 因此采用合浦产粉状琼脂, 可以降低培养基的成本。

五、继代培养

罗汉果的茎段在适宜的培养基, 接种后约一周, 茎段开始膨大, 培养两周可见到茎段的腋芽开始形成幼芽, 同时在切口一端形成愈伤组织, 培养到第三至四周, 由腋芽形成 1 至数个嫩梢或丛生芽(见图版 1 图 1), 将嫩梢分段和丛生芽分割, 通过继代培养, 不断扩大繁殖, 获得大量绿苗, 这揭示出同一块外植体培养出许多小植株的可能。如经表面消毒的一块外植体, 培养约两个月获得一株幼苗, 随后每隔 40—50 天分管一次, 以 9—13 倍速度增殖, 一年内一块外植体可繁殖几十万株小苗。其增殖速度如下所示:

1 $\xrightarrow{60}$ 9 $\xrightarrow{45}$ 66 $\xrightarrow{45}$ 500 $\xrightarrow{45}$ 6000 $\xrightarrow{45}$ 78,000 $\xrightarrow{45}$ 748,800 个芽, 再培养 60 天形成完整植株。如以 50% 的成苗率计算, 一年内一块外植体亦可获得约 37 万株小苗。

罗汉果的各种组织均易诱导发生愈伤组织, 但愈伤组织再分化形成芽较困难, 不仅分化频率低, 而且形成的芽生长缓慢, 这与葫芦科植物利用愈伤组织再生植株, 仅获得有限成功的研究结果相似^[3-7]。因此, 罗汉果带腋芽的茎段作为无性系快速繁殖是较好的培养材料。

罗汉果在自然条件下, 当温度下降到 15℃ 以下开始落叶枯藤, 以块茎越冬, 而利用组织培养法繁殖试管苗, 在冬季培养室温度保持在 20—25℃ 之间, 可以周年培养繁殖试管苗, 不受季节影响。

罗汉果为雌雄异株植物, 从不同性别的植株采取的外植体, 没有发生性别变异的现象, 即从同一块外植体培养出许多植株, 其性别是相同的, 因此茎段培养可作为良种快速繁殖的有效途径。

表 3 琼脂质量对罗汉果茎段形成芽、梢的影响

琼 脂	外 植 体 (克/升)	数 目 (块)	形 成 芽、 梢		
			块	%	条/块
粉 状	4.0	20	20	100	5.5
	4.5	20	20	100	5.9
	5.0	20	26	100	6.4
	5.5	20	20	100	5.0
	5.5	20	20	100	5.0
条 状	6.0	20	20	100	3.5
	7.0	20	20	100	4.0
	8.0	20	20	100	3.9
	9.0	20	20	100	3.8

六、诱导生根

罗汉果茎段培养在附加BA的MS培养基中,有利于芽的形成和增殖,但不能生根,必需将无根苗切下转入含有生长素的生根培养基,一般转管10天后开始形成根,获得完整植株(见图版1图2)。经试验结果表明以附加NAA0.2毫克/升的 $\frac{1}{2}$ MS培养基,效果最好,不仅生根率达100%,且根系生长良好,有利于移栽成活。亦可将茎段培养在附加适当浓度激素的培养基,经一次培养获得完整植株。

七、幼苗移栽

组织培养获得罗汉果的试管苗,处于温度适宜,湿度较大,光照较弱的培养瓶内,将试管苗移入土壤,这是一个很大的转变,如不加注意移栽难以成活。试管苗的质量对移栽成活率有很大的影响,培养根粗、苗壮、具有3—4枚叶片、呈绿色或深绿色的壮苗,移栽成活率可达92.9—100%,而根细长、苗细、叶片呈淡绿色的试管苗、移栽成活率仅35.7—50.0%。

罗汉果的茎段培养增殖能力较强,在一个培养瓶内往往形成许多无根苗,其叶片小,叶色呈淡绿色,将无根苗转到生根培养基,形成根后,加强光照处理,使叶片变大,叶色呈深绿色,有利于移栽成活,成活率可达97.67%;而不经光照处理培养的幼苗,叶片小、叶色呈淡绿色,移栽成活率仅25.76%。

移栽时期对移栽成活率无明显的影响,在5—9月间进行移栽,成活率均在90%以上,但在7—8月份高温季节,应加强水分供应,才能保证成活率。移栽时期对形成块茎大小有很大的影响,越早移植,形成的块茎越大,如6月上旬移栽的试管苗,当年可形成块茎作种薯,平均每个块茎120.5克,最大块茎重333克;而9月下旬移栽的试管苗,由于移栽后气温逐渐下降,虽然能移栽成活,但幼苗生长不良,当年只形成小块茎,平均重仅0.5克,不能作种薯,因此以7月份以前移栽为宜,不仅幼苗生长良好,而且当年可形成块茎作种薯(见图版1图3)。由此可见培育壮苗是罗汉果试管苗移栽成活的基础,幼苗锻炼及控制水分的供应是移栽成活的关键,移植时期是决定形成块茎大小的因素。定植的组培苗已开始开花结果(见图版1图4),其生育情况与常规繁殖苗相似(组培苗的生育情况另文报道)。

参 考 文 献

- [1] 林荣等, 1981: 罗汉果叶组织培养的研究, 广西植物, 1(1): 18—24。
- [2] 林荣等, 1981: 罗汉果叶组织培养中的器官形成, 实验生物学报14(3)323—329。
- [3] 许智宏等, 1979: 用离体培养无性繁殖三倍体无籽西瓜, 植物生理学报, 5(3): 245—252。
- [4] 唐定台, 1980: 植物激素对哈密瓜(Cucumis melo L.)子叶形成愈伤组织和植株再生的作用, 植物学报, 22(2): 132—135。
- [5] Barnes, L. R. 1979: In vitro propagation of watermelon, Scientia Horticulturae 11: 223—227。
- [6] Jelaska, S. 1972: Embryoid formation by fragments of cotyledons and hypocotyls in Cucurbita pepo. Planta, 103: 278—280。
- [7] Jelaska, S., 1974: Embryogenesis and organogenesis in Pumpkin explants Physiol. Plant, 31: 257—261。
- [8] Murashige, T. and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue Culture, Physiol. Plant, 15: 473—497。

STUDIES ON THE STEM CULTURE OF LUOHANGUO IN VITRO

Lin Rong, Wang Xiu-qin and Wang Run-zhen
(Guangxi Institute of Botany)

Abstract The stem explants of Luohanguo, *Siraitia grosvenorii* (Swingle) *C. jeffrey* were grown on MS basal medium, the effects of plant hormones on organogenesis were studied. The result showed that BA stimulated the bud formation and proliferation; KT stimulated the root formation, but bud proliferation was inhibited. In using the combination of BA and IBA, the efficiency of bud formation and proliferation of the stem explants was increased. Through subculture numerous plantlets could be propagated. It suggests that the possibility of numerous plantlets could be secured from a single stem explant. When the shoots were transferred into $\frac{1}{2}$ MS basal medium with 0.2mg/l NAA, they developed into whole plantlets with root systems. Transplanting of the test-tube plantlets in the field was succeeded and the plants began to blossom and to bear fruits.

Key words Luohanguo; in vitro; Plant hormones; Organogenesis

