

LFS、N⁶-BA 和 KT 在罗汉果组织培养中不同的生物效应

许鸿源 周凤珏 何冰 蓝桃菊 余乃明 陈亮 沙波

(广西大学农学院 南宁 530005)

摘要:为改进罗汉果组培技术,以脱毒植株带腋芽茎段作外植体,MS为基本培养基,分别添加LFS、N⁶-BA和KT进行单因子对比试验。结果:(1)LFS 0.2 mg/L可以促进外植体腋芽迅速萌动生长,成苗率可达90%以上,愈伤组织发生少。在继代培养中,LFS 0.2 mg/L能直接诱导不定根的发生,无需添加任何生长素。(2)BA 0.2 mg/L和KT 0.2 mg/L则使外植体长大量愈伤组织,腋芽萌发迟缓,成苗率不足30%。BA 0.2 mg/L和KT 0.2 mg/L在继代培养中,都抑制不定根的发生。

关键词 罗汉果 组织培养 灵发素 激动素 N⁶-苄基腺嘌呤 不定根

Different Bio-effects of LFS,KT and N⁶-BA on the Tissue Cultuer of *Siraitia Grosvenori* (Swingle) C. Jeffrey in *Vitro*

Xu Hongyuan, Zhou Fengjue, He Bing, Lan Taoju, Yu Naiming, Chen Liang, Sha Bo

(Agricultural college of Guangxi University, Nanning 530005)

Abstract:The stem explants with one bud of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) from the plant without virus were cultured on MS basal medium supplied with LFS or N⁶-BA or KT, respectively. The results showed that:(1) 0.2 mg/L LFS could induce the axillary bud of explants germinating quickly and more than 90% grew to be plantlet. At the same time, it retard significantly the formation of callus. 0.2 mg/L LFS could also induce the formation of adventitious roots. Without any auxin supplied. (2) In the case of 0.2 mg/L N⁶-BA or KT callus formation had been accelerated, but the axillary bud germinating was retarded, only less than 30% grew to be plantlet. N⁶-BA and KT inhibited the formation of adventitious roots in secondary culture.

Key words *Siraitia grosvenori* (Swingle) Tissue culture LFS KT N⁶-BA Adventitious root

罗汉果 [*Siraitia grosvenori* (Swingle) C. Jeffrey],又叫汉果、拉汗果、长寿果、神仙果、罗幌子、假苦瓜、光果木鳖等,为葫芦科(Cucurbitaceae)罗汉果属(*Siraitia* Merr)多年生草质藤本,雌雄异株植物,是广西最重要的特产中药材之一,在医疗与保健方面有很高的应用价值和广泛的开发前景^[1,2]。因此,桂林市各县已把罗汉果种植作为支柱产业。由于组培苗可以在平地种植,打破了数百年来罗汉果只能在一定海拔山坡地种植的传统,而且可以当年开花结果,又能有效控制病毒的传播,适宜规模化栽培,所以发展迅速,近年来在罗汉果种苗供应中,已经占据了主导地位。

但是,自林荣等^[3]1980年发表罗汉果组培技术研究的第一篇论文,至今的25年里,可检索到的有关罗汉果组培的论文仅有10篇左右,罗汉果的组培技术远未成熟^[4,5]。据笔者2003~2005年对产区的多次实地调查和查阅政府有关部门的文件均表明,从20世纪末罗汉果组培苗商品化以来,生产单位迅速增多。但是,几乎年年都有较严重的不良事件发生,特别是花期滞后,小果低产,甚至数十、数百公顷连片不开花结果,还有抗逆能力下降和植株畸形。这些都给种植者带来很大的风险。所以,改进罗汉果的组培技术,提高其组培苗的质量,已经成为整

收稿日期:2006-04-25。

基金项目:广西教育厅植物学硕士点重点建设项目基金(D1008)和专利专项基金(C160009)资助。

作者简介:许鸿源(1941~),男,教授;主要从事植物生理学和生物化学的教学与科研工作。

个罗汉果产业继续发展必须解决的关键性问题之一。

在目前罗汉果组培苗的生产中,BA(N^6 -BA, N^6 -苜基腺嘌呤)几乎是唯一被各生产单位选用的细胞分裂素^[5]。无论是促进原始外植体腋芽的萌动成苗,还是对继代苗的增殖,BA都被当作主导激素^[3,5-7]。然而,BA在罗汉果组培中的生物学效应,与其在其它植物材料的组培中有明显差别,即便是在较低的有效浓度下,也几乎不可避免地会诱导出大量愈伤组织。以致有人认为,没有大量愈伤组织的伴生,罗汉果组培苗就搞不成。笔者则怀疑,大量愈伤组织的发生,很可能就是影响罗汉果组培苗遗传稳定性,最终导致各种劣质变异和生产中不良事件发生的起因。因此,本研究试图通过对不同细胞分裂素的对比筛选,寻找BA的替代品。

1 材料

以防虫网中栽培的,经过脱毒处理的青皮果开花株二级侧蔓的+3~+6位腋芽(约带2cm茎段)为原始外植体。

BA,KT(N^6 -糠基腺嘌呤,激动素)购自南宁市医药站化剂公司,进口分装。LFS(Lingfasu,灵发素, N^9 -狭霉糖基腺嘌呤,研究代号PGR-08^[8])为实验室制备的重结晶品。

2 方法

2.1 原始外植体腋芽的萌动

将采得的腋芽用0.1%升汞表面消毒5min,在净化工作台上用无菌水洗涤6次,然后分别接入下列各组培养基:(1)MS(ck);(2)MS+BA 0.2mg/L;(3)MS+KT 0.2mg/L;(4)MS+LFS 0.2mg/L。各组培养基均添加蔗糖3%,琼脂粉4.5g/L,调pH至5.8,每组接种20瓶,每瓶5~6个腋芽。培养温度:昼/夜29/(22±2)℃,光照1500lx,11h/d。

3天后,去掉污染瓶,每组选择5瓶作为记录对象。逐日观察动态变化,连续35d。2005年4~9月共重复4批。

2.2 继代苗的增殖

将上述由原始腋芽获得的无菌苗在净化工作台上切去两端,取+2~+4节,分切成单节茎段,同时切除叶片,保留部分叶柄,分别扦插于上述4组培养基做继代培养。每组20瓶,每瓶6苗。培养条件同上。

2.3 计量与记录

愈伤组织团块的大小,以茎段横切面以外愈伤组织的平均厚度(mm)表示。初始阶段,只在个别皮孔露白,愈伤组织尚未连成一片,记录为:<1mm,随后以目测厚度记录。

根系发达程度,以株平均根数和最长根的长度(cm)表示。

苗高,只计算成苗株的平均数。

3 结果与讨论

3.1 原始外植体腋芽和愈伤组织的生长

BA、KT和LFS的直接对比试验表明,在其他各种培养条件都相同的情况下,LFS 0.2mg/L,7d内即可诱导15%以上的腋芽萌动生长,最快的5d便可萌动。15d左右萌发率可达50%。这时,ck组及BA、KT各组只有不足10%的萌发率。到20d,LFS组萌发成苗率可达90%~100%,苗高平均已达3cm以上,而其他各组,不仅萌发成苗率不足30%,即使成苗,高也不到2cm(表1)。

值得注意的是,培养3d,BA与KT组的外植体就发生明显的愈伤组织。7~10d,两组的腋芽几乎尚未萌动,愈伤组织却已大量增殖,并将茎段和腋芽深深包埋;ck组的愈伤组织虽然相对较少,但腋芽的萌动亦慢;而LFS组的愈伤组织最少,腋芽则生长迅速(图1)。

在BA与KT组,愈伤组织的快速生长,必然导致营养的大量消耗,这可能就是腋芽萌发受到抑制的重要原因。结果,大多数原始外植体只长愈伤组织,腋芽根本不能萌发,甚至枯死,所以成苗率很低。相反,LFS组的外植体在培养初期很少,或者几乎没有愈伤组织发生,所以有足够的营养供应腋芽,使其迅速萌动生长成苗。

LFS、BA和KT都是腺嘌呤类细胞分裂素,但是在本实验中,LFS优先促进细胞分化,使得腋芽快速萌发,建

成新的茎叶器官;而 BA、KT 则优先促进细胞脱分化,形成大量愈伤组织。这种生理效应的显著差异,其内在机制如何,还有待进一步研究。不过,LFS 能有效控制愈伤组织的大量形成,这对罗汉果组培苗遗传性状的稳定,当是有益无害的。同时也缩短了成苗时间,并提高成苗效率。

表1 不同CTK对罗汉果外植体腋芽萌发及愈伤组织生长的影响

培养时间 (d)	ck 组			BA 组			KT 组			LFS 组		
	萌发率 (%)	苗高 (cm)	愈伤组织 (Φmm)									
3	0			0		<1	0		<1	0		
5	0			0		≥1	0		≥1	8	≈0.2	<1
7	0		<1	0		≈2	0		≈2	15	≈0.8	<1
10	3	≈0.5	≈2	1	≈0.3	≈2	3	≈0.3	≈2	30	≈17	<1
15	5	≈0.5	≈2	9	≈0.6	≈3	10	≈0.8	≈3	50	≈2.6	≈1
20	8	≈0.7	≈3	18	≈1.1	≈4	23	≈1.3	≈4	100	≈3.2	≈2
25	9	≈1.0	≈4	23	≈1.5	≈6	24	≈1.7	≈5	100	≈3.6	≈2
35	9	≈1.0	≈5	23	≈1.7	≈8	27	≈1.9	≈6	100	≈4.5	≈3

3.2 继代苗的生长

3.2.1 LFS、BA 和 KT 对继代苗不定根发生的影响

由表2可见,LFS组在5d内即有少数材料于下端切口边缘直接发生不定根。10d发根率可达80%,15d几乎达100%。20d平均每株有根3.5条,平均根长4.3cm,最长根达到6.0cm。然而BA和KT组,在切口边缘始终没有直接发生不定根。15天后,极个别材料能从愈伤组织上冒出一二不定根,但是继续生长困难。连续4批试验,都取得了一致结果。从而证明,LFS对罗汉果茎段不定根的发生与生长确有极显著的促进作用(图2),这与其对蒲公英^[8]和三七^[9]不定根的促进效应是一致的。

目前学术界普遍认为,细胞分裂素(CTK),特别是常见的BA、KT、ZT(玉米素)对植物不定根的发生与生长均有抑制作用^[10,11]。然而,LFS作为它们同类结构的细胞分裂素,却能显著促进不定根的发生与生长。如能深究这一现象的内因,对于从理论上探索植物不定根发生的机理将不无益处。

3.2.2 LFS、BA 和 KT 对继代苗愈伤组织和植株茎叶生长的影响

在继代培养的初期,各组之间并无明显不同,5~7d之后,各组之间不定根的发生和愈伤组织的生长逐步呈现极显著的差异。LFS组在培养20d后,均长出完整的根系,却很少有愈伤组织;而BA和KT组的情况却恰好相反(表2,图2)。

由于LFS组的愈伤组织得到有效控制,所以植株茎叶的生长也更匀称,健壮。而BA组幼叶展开明显滞后,叶色亦呈淡绿。KT组植株茎叶较正常。(下转第9页)



图1 LFS、N⁶-BA 和 KT 对罗汉果原始外植体腋芽启动效果的差别(培养10d)

表2 LFS、BA 和 KT 对罗汉果继代苗不定根发生与生长的影响

	不定根的变化				
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
MS + LFS 0.2	0.3/0.2	0.8/2.4	2.1/4.3	3.5/6.0	3.8/6.5
MS + N ⁶ -BA 0.2	-	-	-	0.1/1.2	0.1/2.5
MS + KT 0.2	-	-	0.1/0.2	0.1/0.5	0.2/3.2

注:表中数字为:株平均根数/最长根长度(cm)。

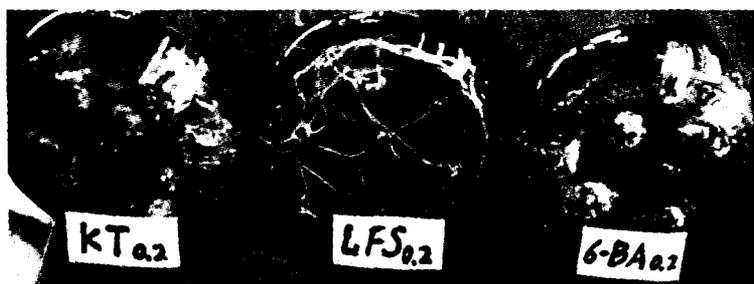


图2 LFS、BA 和 KT 对罗汉果继代苗不定根和愈伤组织的影响(培养25d)

2.4 GA 和 Mn^{2+} 互作效应对棉花种子发芽耐盐性的影响

由表5可以看出:不同浓度的GA和 Mn^{2+} 混合液浸种对苗高、发芽指数、活力指数均有显著影响。 A_2B_2 与 A_2B_3 间对苗高、发芽率的影响差异不显著,对发芽指数、活力指数的影响达显著水平,总体而言, A_2B_3 效果最佳,其次为 A_2B_2 , A_1B_3 , A_1B_2 。 A_3B_2 和 A_3B_1 组合对发芽指数的影响效果差于对照; A_1B_1 和 A_3B_1 组合对活力指数的影响效果差于对照,其余均优于对照。

3 结论与讨论

由上述分析可知,GA和 Mn^{2+} 混合液浸种能够明显改善棉花种子发芽的耐盐性,对苗高的影响尤为明显,其中以 A_2B_3 组合整体效果为最佳,其次为 A_2B_2 、 A_1B_3 和 A_1B_2 。这可能是GA和 Mn^{2+} 对发芽过程中某些生理效应的调节使棉花种子发芽的耐盐性提高。如 Mn^{2+} 提高叶绿素的稳定性, Mn^{2+} 是许多酶的组成或酶系统的活化剂,还可以促进种子的呼吸作用, Mn^{2+} 还能改善物质运输的能量供应关系及碳水化合物等多种有机物的合成和运输^[5]等;而GA可以使水分胁迫下的抗氧化防御系统如抗氧化酶SOD和CAT活性提高等,从而使棉花种子生活力提高、发芽得到促进。

参考文献

- 1 席承藩主编. 中国土壤[M]. 北京:中国农业出版社,1998:650~660.
- 2 李付广,李凤莲,李秀兰. 盐胁迫对棉花幼苗不同组织水分含量的影响[J]. 作物学报,1994(6):5~7.
- 3 黄骏麒主编. 中国棉作学[M]. 北京:中国农业出版社,1998:187.
- 4 龚富生,张嘉宝主编. 植物生理学实验[M]. 北京:气象出版社,1995:172~178.
- 5 裴保华主编. 植物生理学[M]. 北京:中国林业出版社,1992:151.

(上接第6页)

4 小结

4.1 LFS、BA和KT虽然同属腺嘌呤类细胞分裂素,但其取代基团的性质与位置不同,对罗汉果试管苗形态建成的影响也迥然不同,这符合功能取决于结构的普遍规律,所以应用于试管苗的批量生产时应慎重选择。

4.2 在罗汉果组培中,LFS能同时在外植体腋芽萌发和继代苗增殖两个重要环节显著地减少愈伤组织的发生与生长,这对组培苗的遗传稳定性具有积极意义。

4.3 在罗汉果组培中,LFS能显著促进不定根的发生与生长,无需添加任何生长素即可建成全苗,有利缩短生产周期,简化操作程序。

参考文献

- 1 李峰编著. 罗汉果栽培与开发利用[M]. 北京:中国林业出版社,2004,第1版.
- 2 钟仕强编著. 七种中草药高效益栽培[M]. 北京:金盾出版社,2001,第1版.
- 3 林荣,王润珍. 罗汉果组织培养获得完整植株[J]. 广西植物,1980(1):11.
- 4 书芝霖,蒋纪森. 永福县罗汉果组培苗生产应用现状及发展对策[J]. 广西园艺,2003(3):14~15.
- 5 付长亮,马小军,白隆华等. 罗汉果组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(5):325~328.
- 6 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,1999,12(3):125~127.
- 7 苏明申,林顺权. 罗汉果的组织培养[J]. 中国南方果树,2002,31(3):43.
- 8 许鸿源,许鸿章,杨美纯等. PCR-08理化性质及生物活性的研究[J]. 广西植物,2003,23(5):461~463.
- 9 许鸿源,蒙爱东,李春霞等. 灵发素对三七胚状体发生及其成苗的影响[J]. 中药材,2004,27(10):711~712.
- 10 江玲,管晓春. 植物激素与不定根的形成[J]. 植物学通报,2000(11):17~19.
- 11 王金祥,严小龙,潘瑞焱. 不定根形成与植物激素的关系[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):133~142.