

罗汉果的组织培养与快速繁殖

秦新民, 杨华, 韦素玲 (广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

摘要 [目的] 进一步探讨罗汉果高效再生系统的建立条件。[方法] 通过研究外植体苗龄、激素组合等因素对罗汉果离体繁殖影响, 建立了罗汉果高效再生系统。[结果] 3~9 d 苗龄子叶与不定芽分化的关系研究表明, 在 3~6 d 内, 子叶不定芽的分化率随着苗龄的增加而增加, 以 6 d 的子叶出芽效果最好(83.3%), 随后不定芽分化率逐渐下降。BA 和 IBA 不同浓度组合对子叶不定芽诱导的影响表明, 在 MS + BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.65% 琼脂 (pH 值 5.8) 培养基上子叶外植体不定芽的诱导率达到 85.7%; 在 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L 液体培养基上无菌苗发根率可达 91.7%。抗生素敏感性试验表明, 当培养基中添加 10 和 20 mg/L 的潮霉素即能完全抑制不定芽和不定根的分化。[结论] IBA 与 BA 配合使用对罗汉果不定芽的分化有明显的促进作用。

关键词 罗汉果; 组织培养; 子叶

中图分类号 S567.1*9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)09-03553-02

Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation of *Siraitia Grosvenorii*

QIN Xin-min et al (College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract [Objective] The aim of the research was to discuss the conditions for establishing the efficient regeneration system of *Siraitia grosvenorii* further. [Method] Based on studying the effects of factors such as the seedling age of explant, hormone combinations on the propagation in vitro, the efficient regeneration system of *S. grosvenorii* was established [Result] The research on the correlation between cotyledon with the seedling age of 3~9 d and the adventitious bud differentiation showed that the differentiation rate of adventitious bud in cotyledon was increased with the increasing of the seedling age within 3~6 d. The germination effect of cotyledon with the seedling age of 6 d was best (reaching 83.3%) and then the differentiation rate of adventitious bud was gradually decreased. The research of the effects of combination of BA and IBA with different concn. on the adventitious bud differentiation of cotyledon showed that the differentiation rate of adventitious bud in cotyledon explant on the medium of MS + BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 3% sucrose + 0.65% agar (pH value of 5.8) reached 85.7%. The rooting rate of aseptically seedlings on the liquid medium of 1/2MS and IBA 1.0 mg/L could reach 91.7%. The antibiotic sensitivity test showed adding 10 and 20 mg/L hygromycin to the medium could inhibit the differentiation of adventitious buds and roots. [Conclusion] The combination use of IBA and BA had an obvious promotion effect on the differentiation rate of adventitious bud in *S. grosvenorii*.

Key words *Siraitia grosvenorii*; Tissue culture; Cotyledon

罗汉果 [*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery] 主要产于广西桂林, 是我国传统的药用植物, 有润肺止咳、凉血、润肠通便的功效。同时, 罗汉果甜甙是一种低热量高甜度的天然甜味剂, 用途非常广泛^[1]。目前罗汉果生产中存在根结线虫病、疮叶丛枝病、花叶病等问题, 严重影响了罗汉果的产量和品质。因此, 培育高抗性品种以适应生产的需要已成为亟待解决的问题。

通过植物基因工程的方法, 将外源抗性基因导入受体植物培育抗病、抗虫品种, 是进行罗汉果选育种的有效途径, 而罗汉果组织培养中高效再生系统的建立是实现上述目标的关键步骤之一^[2]。罗汉果的快速繁殖和脱毒研究已有一些报道^[3-5], 笔者在前人工作的基础上进一步探讨了罗汉果高效再生系统的建立条件, 为今后开展罗汉果抗病、抗虫基因工程研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为罗汉果种子。

1.2 试验方法

1.2.1 子叶不定芽的诱导。 选取饱满种子, 剥去种壳, 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 8~10 min 后, 用无菌水冲洗 4 次。然后用无菌纸将其表面水分吸干, 最后将消毒过的罗汉果种子分别接种在不同培养基中诱导萌发。培养条件为: 光照强度 1 000~1 500 lx, 光照时间 16 h/d, 温度为 25℃ 左右。切取不同苗龄的子叶, 接入含不同生长调节剂组合的 MS 培养基上诱导

不定芽的产生。培养 30 d 后统计子叶不定芽诱导情况。

1.2.2 生根及试管苗移栽。 当诱导的不定芽长到 3~4 cm, 有 4~6 片叶子时, 将无菌苗切下, 转至含不同生长调节剂的液体培养基中诱导生根。培养 20 d 后统计根的生长情况及每株苗的出根数。然后将生长壮健的试管苗开盖, 在培养室光照下, 炼苗 2 d 后取出试管苗, 将根部培养基冲洗干净后移栽到盆中, 用塑料薄膜遮荫保持一定湿度, 7 d 后揭开塑料薄膜, 待幼苗生长良好后放到室外培养。

1.2.3 潮霉素(Hyg)抗性筛选。 切取 6 d 的无菌苗的子叶和 2~3 cm 高的不定芽分别接种于含不同浓度的 Hyg 的 MS + BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L 培养基和 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L 液体培养基上, 观察不定芽和不定根发生情况。

表 1 子叶生长时间对罗汉果不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of cotyledon growth time on adventitious bud induction of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery

子叶生长时间//d Cotyledon growth time	接种数//块 No. of inoculated	分化数//块 No. of differentiation	分化率//% Differentiation rate
3	30	14	46.7
4	30	18	60.0
5	30	21	70.0
6	30	25	83.3
7	30	22	73.3
8	30	15	50.0
9	30	9	30.0

2 结果与分析

2.1 不同苗龄对不定芽分化的影响 比较了 3~9 d 苗龄子叶与不定芽分化的关系, 在 3~6 d 内随着苗龄的增加, 子叶不定芽的分化率也随着增加。随后不定芽分化率逐渐下降。

基金项目 广西自然科学基金项目(桂科自 0728095)。

作者简介 秦新民(1956-), 男, 广西灵川人, 博士, 教授, 从事分子生物学研究。

收稿日期 2007-12-03

由表 1 可见,6 d 的子叶出芽效果最好,苗龄短和苗龄长的子叶对不定芽的分化不太理想。

2.2 BA 和 IBA 不同浓度组合对子叶不定芽诱导的影响

子叶接入含 IBA 0.5 mg/L + BA 1.0~2.0 mg/L 的培养基 3 d 后开始长大,变绿,2 周左右子叶切口一端开始长出绿色的愈伤组织,并陆续长出芽。结果表明(表 2),3 种培养基均能诱导出不定芽,但诱导率和不定芽的生长情况有一定差异,以 IBA 0.5 mg/L + BA 1.0 mg/L 的组合诱导率最高。

表 2 BA 和 IBA 不同浓度组合对罗汉果子叶外植体不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of different BA and IBA combination concentration on adventitious bud induction of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery

生长调节剂//mg/L		接种数//块	分化数//块	分化率//%
Growth regulator		No. of inoculated	No. of differentiation	Differentiation rate
BA	IBA			
1.0	0.5	28	24	85.7
1.5	0.5	64	51	79.7
2.0	0.5	57	40	70.2

注:基本培养基均为 MS。

2.3 罗汉果组培苗的生根培养 将 3~4 cm 高的不定芽切下,转移到含不同生长调节剂组合的培养基中诱导生根,9 d 后陆续诱导生根。由表 3 可见,NAA 和 IBA 都能诱导不定根的发生,但两者效果不同。笔者使用 NAA 时植株基部产生大量白色疏松状愈伤组织,在清洗和移栽过程中根容易脱落,且愈伤组织较多易造成烂根现象,影响移栽成活率;而 IBA 表现为不定根生长健壮,产生愈伤组织较少,移栽成活率高。其中以添加 IBA 1.0 mg/L 的生根效果最好,表现为根多、根较粗短、叶色浓绿、植株粗壮,具有浓密的根毛。

表 3 不同生长素对罗汉果苗生根的影响

Table 3 Effects of different BA and IBA combination concentration on rooting of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery

生长调节剂//mg/L		接种数//块	生根数//块	生根率//%
Growth regulator		No. of inoculated	No. of rooted seedlings	Rooting rate
IBA	NAA			
0.5	-	16	12	75
-	0.5	21	15	71.4
1	-	16	14	87.5
-	1	12	11	91.7

注:基本培养基均为 1/2MS。

2.4 潮霉素对不定芽和不定根诱导的影响 切取培养 6 d 的无菌苗子叶,接种于含不同浓度 Hyg 的 MS + BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L 培养基中,结果表明,潮霉素对子叶器官分化影响较大。10 mg/L 的潮霉素能完全抑制子叶不定芽分化,即使低浓度的 Hyg 也能使其分化系数明显降低(表 4)。潮霉素对不定根的诱导同样有很大影响,20 mg/L 的潮霉素能完全抑制根的发生(表 5)。

2.5 幼苗移栽 幼苗移栽前揭开培养瓶瓶盖,让幼苗在培养室光照下锻炼 2 d,然后取出幼苗,洗净根部的培养基,移栽植于盆中。栽植后盖上塑料薄膜 7 d,保温保湿,待幼苗恢复生长后揭盖。幼苗长势良好后移至自然条件下生长。试管苗的质量对移栽成活率有很大的影响,根粗、苗壮、具有 3~4 叶片、呈绿色或深绿色的壮苗较易成活,而根细长、苗细、

叶片呈淡绿色的试管苗较难移栽成活,结果与林荣等^[6]的报道一致。

表 4 潮霉素浓度对罗汉果不定芽诱导的影响

Table 4 Effects of different hygromycin concentration on adventitious bud induction of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery

Hyg//mg/L	外植体数//个	外植体萌发数//个	诱导率//%
	No. of explants	No. of explants germinated	Induction rate
0	20	17	85.0
5	20	5	25.0
10	20	0	0
15	20	0	0

表 5 潮霉素浓度对罗汉果不定根诱导的影响

Table 5 Effects of different hygromycin concentration on adventitious root induction of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery

Hyg//mg/L	接种数/株	生根数/株	诱导率//%
	No. of inoculated	No. of rooted seedlings	Induction rate
0	20	18	90.0
5	20	9	45.0
10	20	4	20.9
15	22	1	4.5
20	20	0	0
25	19	0	0

3 讨论

基因工程的发展,使人们有可能通过转基因途径较快地获得优质、高产、抗病虫害以及抗逆的农作物新品种。而利用基因工程手段来改良农作物,首先需要建立一个高效的再生系统^[7],在植物组织培养中外植体的生理状态对器官发生有重大影响^[8]。在罗汉果不定芽分化的研究中,笔者发现 IBA 与 BA 配合使用对罗汉果不定芽的分化有明显的促进作用,BA 1.0 mg/L 和 IBA 0.5 mg/L 配合使用对罗汉果子叶外植体不定芽的分化率最高,达 85.7%,可满足罗汉果转基因工作的需要,形成的芽茎粗壮,叶色浓绿。获得健壮完整的植株是组培苗移栽成活的关键。通过 IBA 和 NAA 对罗汉果生根效应的对比试验,发现 MS + IBA 1.0 mg/L 对罗汉果组培苗的生根作用效果较好,根系发达、植株健壮、生长迅速、移栽成活率高。

潮霉素抗性试验结果表明,10 和 20 mg/L 的 Hyg 足以完全抑制罗汉果不定芽和不定根的分化,因此,采用 10 和 20 mg/L 的 Hyg 作为罗汉果转基因植株的筛选是适宜的。

参考文献

- [1] 李峰,李典鹏,蒋水元,等.罗汉果栽培与开发利用[M].北京:中国林业出版社,2004:111-138.
- [2] 黄春梅,吴金寿,曾黎辉,等.罗汉果胚轴培养再生植株及其细胞学观察[J].福建农林大学学报:自然科学版,2005,34(4):454-457.
- [3] 林治良,陈振光.罗汉果无花叶病苗的培育[J].福建农业大学学报,1995,24(2):162-166.
- [4] 蔡时可,苏海,谢海新,等.罗汉果组织快繁试验[J].广东农业科学,2005(3):30-31.
- [5] 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.
- [6] 林荣,王秀琴,王润珍.罗汉果茎段离体培养研究[J].广西植物,1985,5(3):273-277.
- [7] 贾士荣,曹东孙.转基因植物[J].植物学通报,1992,9(2):3-15.
- [8] 黄学林,李菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:72-73.