

· 应用技术 ·

罗汉果种苗组织培养与快繁技术

郑晓峰, 黄刚

(黔东南民族职业技术学院, 贵州 凯里 556000)

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Momordica grosvenorii* Seedlings

ZHENG Xiao-feng, HUANG Gang

摘要:不同激素的对比对罗汉果茎尖诱导不同器官的分化影响较大, 实验中以 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为适宜的芽诱导培养基; MS + BA 1.0 为适宜的芽增殖培养基, 其增殖率可达 8 ~ 10 倍。罗汉果根系诱导分化的适宜培养基为 1/2 MS + NAA 0.4。

关键词: 罗汉果; 茎尖; 不定芽; 诱导; 分化; 继代培养

中图分类号: S687.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-4705(2008)04-0102-03

罗汉果: *Grosvenor momordica* (*Momordica grosvenori* Swingle) 为葫芦科多年生宿根草质藤本植物, 罗汉果的果实, 又名汉果、拉汉果、青皮果、罗晃子、假苦瓜等。罗汉果可鲜吃, 但常烘干保存, 是一种风味独特的干果。罗汉果含丰富的 Vc (每 100 g 鲜果中含 400 ~ 500 mg) 以及糖甙、果糖、葡萄糖、蛋白质、脂类等。罗汉果是一种多用途的药用保健果品, 是全世界特有的药用植物, 1987 年卫生部将罗汉果列为既是药品又是食品的中药之一。据《中药大辞典》等书记载, 罗汉果具有清肺止咳、清热解毒、祛痰补血、益肝、健脾、降压等功效。近年来, 科学家又从罗汉果中分解出罗汉果苷, 其甜度为蔗糖的 250 ~ 350 倍, 对糖尿病、高血压、慢性支气管炎等患者是一种极为理想的保健品。罗汉果还可与绿茶、桂花、绿豆等配制成各具特色的保健饮料。随着人们生活水平的不断提高, 保健意识的逐渐加强, 罗汉果的需求量也不断增大。罗汉果利用传统繁殖速度很慢, 不能满足市场需求。为了扩大罗汉果的繁殖, 可采用组织培养技术来快速繁殖罗汉果。目前罗汉果的离体再生途径主要是以叶片为外植体诱导愈伤组织的再生途径。对茎尖诱导不定芽的研究, 报道较少。因此, 通过系统的研究植物激素对罗汉果茎尖不定芽分化、继代、根分化的影响, 可以为进一步完善罗汉果的快繁体系提供依据。

我院组培中心于 2005 年开始对罗汉果进行组织

培养研究, 经两年的实验研究, 现已掌握了罗汉果的组织培养技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料取自贵州省黎平县地坪乡。

1.2 培养基

以 MS 为基础培养基, 蔗糖 3%、琼脂 0.4%, pH 5.8, 芽诱导分化培养基: MS + BA (0.5、1.0) + NAA (0.1、0.2、0.5); 丛生芽继代增殖培养基: MS + BA (0.5、1.0) + NAA (0、0.1、0.2); 根诱导分化培养基: 1/2 MS + NAA (0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6) + IBA (0、0.5、1.0) + 活性炭 0.2%。在 121 °C、1.1 kg/cm² 高温高压下灭菌备用。

1.3 培养条件

温度: (25 ± 1) °C、光照度为 2 000 lx、12 h/d。

1.4 方法与步骤

将从田间采取的罗汉果茎蔓, 分别以叶片、茎蔓侧芽、茎尖 3 个部位作为外植体进行处理, 先用洗涤剂轻轻洗去外植体上的污渍, 再用流水冲洗 30 ~ 40 min 后, 用 75% 的酒精消毒 20 s, 然后用 0.1% 的升汞消毒 4 ~ 7 min (设消毒处理分为 4、5、7 min), 再用无菌水冲洗数次。接种前先用无菌滤纸轻轻吸干材料表面的水分, 然后将叶片切成 1 cm 见方的小块, 剪取茎蔓侧芽 0.5 cm 及剥取茎尖 4 ~ 5 mm, 分别接种在指定的培养基上。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间处理对外植体不同部位离体培养的影响

将经不同时间消毒处理的叶片、侧芽和茎尖接种于 MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L 的培养基中, 每个处理接种 25 瓶, 观察记录见表 1。

从表 1 得知, 3 个部位的处理中, 不论是叶片、侧芽还是茎尖, 随着消毒时间的延长 (由 4 ~ 7 min), 污染率逐渐降低, 但同时死亡率也在增加, 成活率下降。就处理时间而言, 均以 5 min 处理为宜; 从不同部位的

收稿日期: 2007-12-27

作者简介: 郑晓峰 (1965 -), 女, 副教授, 主要从事植物组织培养技术研究。

处理来看,以茎尖的处理成活率较高。综合处理部位和时间,其外植体适宜的消毒方式为:以茎尖为处理部位,消毒时间 5 min,其成活率 42.7%,污染率 40.5%,死亡率 16.8%。

表 1 不同消毒时间处理对外植体不同部位离体培养的影响

处理部位	处理时间 (min)	接种瓶数	污染率 (%)	死亡率 (%)	成活率 (%)
叶片	4	25	85.6	9	5.4
	5	25	61.0	12.5	26.5
	7	25	69.2	20.8	10.0
侧芽	4	25	66.5	20.3	13.2
	5	25	45.0	18.3	36.7
	7	25	42.6	31.4	26.0
茎尖	4	25	53.6	14.4	32.0
	5	25	40.5	16.8	42.7
	7	25	40.0	38.4	21.6

2.2 不同激素配比对罗汉果不定芽诱导分化和生长的影响

将剥取的茎尖接种在处理 1~6 号分化培养基上,从表 2 中得知,在诱导外植体形成不定芽的分化中,不同激素的比对不定芽的分化能力影响较大,尤其是 NAA 的影响更为明显,随着 NAA 的浓度的增加,愈伤组织分化增加,并阻碍不定芽的分化;而 BA 的影响则是随着浓度的增加,不定芽的分化能力增强。本实验中以处理 5 即 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为适宜的不定芽诱导培养基。

表 2 不同激素配比对罗汉果不定芽诱导分化和生长的影响

处理	植物激素配比 (mg/L)		分化情况
	BA	NAA	
1	0.5	0.1	茎尖接种 11 天后,在外植体周围出现一些小突起,20 天后不断形成白色的、膨松的愈伤组织。
2	0.5	0.2	茎尖接种 11 天后,在外植体周围出现一些小突起,20 天后不断形成白色的、膨松的愈伤组织。
3	0.5	0.5	茎尖接种 11 天后,在切口处有较多的白色的、膨松的愈伤组织形成,不定芽生长较慢。
4	1.0	0.1	茎尖接种 11 天后,不定芽开始分化,同时,在切口处有少量白色的、膨松的愈伤组织形成。
5	1.0	0.2	茎尖接种 12 天后,不定芽开始分化,20 d 后不定芽生长迅速,同时,在切口处有少量白色的、膨松的愈伤组织形成。
6	1.0	0.5	茎尖接种 11 天后,不定芽开始分化,21 天后不定芽生长迅速,同时,在切口处有较多白色的、膨松的愈伤组织形成,在以后,愈伤组织生长迅速,不定芽生长受阻。

2.3 植物激素比对罗汉果不定芽继代增殖培养的影响

将处理 5 中的不定芽剪掉基部及愈伤组织,接种到处理 7~12 号培养基中。25 天后观察记录于表 3 中。从表 3 可见,植物激素的配比,对丛生芽的增殖影响很大,尤其是 NAA 浓度的影响更为明显。当 BA 从 0.5~1.0, NAA 从 0.1~0.5 的 MS 培养基上,丛生芽都能增殖,但切口处均形成较多的愈伤组织,而在处理 10 即 MS + BA 1.0 + NAA 0 的培养基中,去掉 NAA 后,愈伤组织的分化得到有效控制,并且,芽苗生长健壮,丛生芽分化增殖率高,可达 8~10 倍。

表 3 植物激素比对罗汉果继代增殖培养的影响

处理	植物激素配比 (mg/L)		丛生芽生长状况
	BA	NAA	
7	0.5	0	丛生芽增殖较多,平均每芽增殖 4~5 个,愈伤组织较少。
8	0.5	0.1	丛生芽增殖较多,平均每芽增殖 4~5 个,同时愈伤组织分化较多,影响芽苗生长。
9	0.5	0.5	丛生芽增殖较多,平均每芽增殖 4~5 个,同时切口部分愈伤组织分化多,叶片轻度玻璃化,影响芽苗增殖生长。
10	1.0	0	丛生芽增殖显著,平均每芽增殖 7~8 个,切口处愈伤组织减少,该培养基再继代 1 次后,愈伤组织得到有效控制。在丛生芽增殖的同时,芽苗不断长长、长高,生长健壮,增殖率高。可达 8~10 倍。
11	1.0	0.1	丛生芽增殖明显,平均每芽增殖 6~7 个,同时切口处愈伤组织分化较多,影响芽苗的正常分化和生长。
12	1.0	0.5	丛生芽增殖明显,平均每芽增殖 5~6 个,同时伴有大量的愈伤组织分化,影响芽苗的正常分化和生长。

值得一提的是,在丛生芽继代增殖培养过程中,既可以以丛生芽丛切割转移的方式繁殖,又可以以剪取芽苗茎节转移的方式继代增殖,从而大大提高罗汉果组培苗继代繁殖的倍数。

2.4 试管苗的生根

将生长健壮的无根苗,剪取带 2~3 片叶的小苗,接种在诱根培养基 13~19 号处理中,10 天后首先在处理 15 中有少量根系分化,18 天后 13~19 号处理中均有根系的分化。13、14、15、16 号 4 个处理在 30 天后,根系分化全部完成,40 天后 17、18、19 号处理的根系也全部分化完毕。但从苗的质量和根系的生长状况来看,不同的处理间差异较大。这与激素的配比关系密切。从表 4 中可见,本实验中 NAA 和 IBA 两种激素

表4 植物激素对比对试管苗生根的影响

处理	植物激素配比(mg/L)		根系生长状况
	BA	NAA	
13	0.2	0	17天后有极少量根系分化,30天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高3~4 cm,大叶达3×4 cm ² ,脚叶枯黄较轻(++),白根较细(+),盘根较少。
14	0.3	0	12天后有少量根系分化,30天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高4~5 cm,大叶达4×6 cm ² ,脚叶枯黄较轻(+),白根较粗(++),盘根较多(++).
15	0.4	0	10天后有少量根系分化,30天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高5~6 cm,大叶达5×6 cm ² ,脚叶生长正常无枯黄现象,白根较粗(+++),盘根较多(+++).
16	0.5	0	15天后有少量根系分化,30天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高3~4 cm,大叶达4×5 cm ² ,脚叶枯黄较轻(++),白根较粗(++),盘根较少(+).
17	0.6	0	15天后有少量根系分化,40天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高4~5 cm,大叶达3×5 cm ² ,脚叶枯黄较重(++),白根较粗(++),盘根较少(+).
18	0	0.5	16天后有少量根系分化,40天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高4~6 cm,大叶达3×5 cm ² ,脚叶枯黄较轻(+),白根较细(++),盘根较多(++).
19	0	1.0	16天后有少量根系分化,40天后所转移的小苗的根系基本分化完毕,此时苗均高4~6 cm,大叶达3×5 cm ² ,脚叶枯黄较重(++),白根较粗(+),盘根较少(+).

相比较,NAA的处理相对比IBA的处理,根系分化早,根粗,盘根多,植株生长健壮。就NAA单一激素而言,随着激素浓度的增加,根系分化增加,但浓度高(0.6)时,盘根反而少,脚叶枯黄较重。因此,综合处理13~19号,以处理15即1/2 MS+NAA 0.4为罗汉果适宜的诱根培养基。

2.5 试管苗的移栽

经诱导生根,40天后形成苗高5~6 cm,带3~4叶、2~3条白根的试管苗,再经2~3 d炼苗,随后洗去根部附着的培养基,将其移至经消毒灭菌的营养土(腐质土:珍珠岩=2:1)中,移栽一周内,完全密闭保湿,一周后,用1/2 MS营养液每3~4 d喷施1次,连喷2~3次。以后,每周喷施1~2次,直至成苗。移栽成活率高达90%以上。

3 小 结

3.1 以罗汉果叶片、侧芽、顶芽不同部位的外植体消毒处理来看,以顶芽的处理成活率较高,其适宜的消毒方式为:消毒时间5 min,成活率42.7%,污染率40.5%,死亡率16.8%。

3.2 不同激素的对比对不定芽的分化能力影响较大,尤其是NAA的影响更为明显,随着NAA浓度的增加,愈伤组织分化增加,并阻碍不定芽的分化,实验中以MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L为适宜的不定芽诱导培养基;同时,植物激素的配比,对丛生芽的增殖影响很大,当BA从0.5~1.0,NAA从0.1~0.5,的MS

培养基上,丛生芽都能增殖,但切口处均形成较多的愈伤组织,而在处理10即MS+BA 1.0+NAA 0的培养基中,去掉NAA后,愈伤组织的分化得到有效控制,且增殖率可达8~10倍。

3.3 诱导罗汉果根系分化的适宜培养基为1/2 MS+NAA 0.4。移入腐质土:珍珠岩=2:1的营养土中,其移栽成活率高达90%以上。

3.4 在罗汉果离体培养中,利用茎尖诱导,形成丛生芽,比通过叶片诱导愈伤组织再诱导丛生芽要快得多。同时也为罗汉果组织培养快繁体系的进一步完善,提供一定的依据。

3.5 通过茎尖培养获得的组培苗,与通过叶片经愈伤组织诱导获得的组培苗,两者在生产中及产量上的差异,有待进一步研究。

参考文献:

- [1]桂耀林.罗汉果叶组织培养中的器官发生[J].植物学报,1984,(2):120-122.
- [2]杭林.罗汉果茎尖脱毒快繁技术[J].西南农业学报1999,(3):125-127.
- [3]谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].中国林业出版社,1998:8.
- [4]苏明申,陈振光.罗汉果的组织培养[J].中国南方果树,2002,(3):43-45.
- [5]林荣.罗汉果叶组织培养的研究[J].广西植物,1981,(1):18-20.