

# 食籽栝楼离体快繁的初步研究

朱勤<sup>1,2</sup>, 杨六萍<sup>3</sup>, 杨许琴<sup>3</sup>, 吴新德<sup>2</sup>, 江雅<sup>3</sup>, 朱立武<sup>1</sup> (1.安徽农业大学, 安徽合肥 230036; 2.池州市农业技术推广中心, 安徽池州 247000; 3.池州市农业良种繁育组培站, 安徽池州 247000)

**摘要** 以雌性栝楼块根萌发苗的茎段腋芽为外植体进行无菌试管苗的诱导、继代增殖快繁、生根以及试管苗移栽试验。结果表明: MS+BA 0.2 mg/L+IAA 0.6 mg/L 最适合诱导栝楼茎段腋芽形成无菌试管苗; MS+BA 0.1 mg/L+IAA 0.6 mg/L 是继代增殖快繁最适培养基; 在 1/2MS+NAA 0.2 mg/L 是生根最适培养基。试管苗移栽在蛭石和珍珠岩(1:3)的混合基质苗床上成活率可达 85% 以上。

**关键词** 雌性; 栝楼; 茎段腋芽; 无菌试管苗; 培养基

**中图分类号** Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)16-3965-02

栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim), 亦称瓜蒌、天瓜、野葫芦、吊瓜, 为葫芦科栝楼属雌雄异株、宿根、攀援草质藤本植物。栝楼为我国传统常用中药材。现代医学研究发现, 天花粉蛋白能够抑制肿瘤的生长和多种病毒繁殖, 特别是对 HIV 病毒复制有较强抑制作用<sup>[1]</sup>。栝楼籽营养丰富, 对高血压、高血脂、高胆固醇有辅助疗效。同时, 栝楼籽能提高肌体免疫功能, 并有瘦身、美容功效。

20 世纪 90 年代中后期, 安徽潜山、浙江长兴两地几乎同时向市场推出食用栝楼籽(安徽称“野葫芦籽”、浙江称“吊瓜籽”)。由于该瓜籽外观褐色艳丽、籽仁饱满, 炒熟后口感润绵、脆香特异, 食之回味无穷, 被誉为“瓜籽之王”<sup>[2]</sup>。但由于受品种资源研究滞后、现有品种产量低下等影响, 市场上食用栝楼籽货源奇缺。2005 年生瓜籽收购价达 36~40 元/kg, 商品瓜籽售价高达 70 元/kg。

缺乏适合现代化种植方式的高产、优质、高效品种是目前制约栝楼生产发展的主要原因, 特别是对安徽、浙江食籽栝楼的主产区(引种的种苗皆为当地野生栝楼)。利用植物组织培养技术, 建立栝楼优良品种离体快繁体系, 能在短期内培育出大量基因遗传稳定、经济性状表现一致的优质种苗, 从而迅速实现栝楼优良品种的大面积推广利用。这对推动食籽栝楼的产业发展, 意义重大。栝楼的组织培养始于 20 世纪 90 年代, 刘志强等以带腋芽茎段为外植体, MS 为基本培养基添加外源激素实现植株的再生<sup>[3]</sup>。其后, 又有多位学者进行了相关研究, 取得了良好的进展。但由于他们所取用的外植体材料均不是来自生产中的优良株系, 并且绝大部分都来自种子实生苗, 而种子实生苗中 95% 都为雄株。刘芸研究表明, 雌、雄栝楼生长发育过程中内源激素水平差异颇大。因此, 对栝楼优质种苗组培快繁需作更深入的研究。为此, 笔者以生产中发现的优良单株(雌栝楼)为材料, 探寻离体快繁关键技术, 旨在为栝楼优质种苗工厂化生产提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试栝楼为从池州市种植的食籽栝楼中按照食味佳、瓜子品象好、产量高、抗性强 4 个指标筛选出来的 1 株雌性栝楼优良单株, 在田间挖取块根带回实验室。

将栝楼块根洗净, 切成 5 cm 左右的小段, 放入高锰酸钾 500 倍液浸泡消毒 40 min, 装入填有高温蒸汽灭菌处理

蛭石的发芽盒中, 置于温度(28±1)℃, 光照 16 h, 光照强度 4 500 lx 左右的条件下进行催芽。当苗高 13~15 cm, 含 7~8 个节时, 剪苗备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 栝楼无菌苗的诱导** 将栝楼苗剪成 1.0 cm 左右带节的切段, 于自来水下流水冲洗 1 h, 剪去叶片, 吸干水后置于超净工作台。将栝楼苗切段浸入 75% 的酒精中 30~45 s, 无菌水冲洗 1 次, 再用体积比为 1:25 的次氯酸钠溶液消毒 8~10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 滤纸吸干表面水分, 在无菌条件下将茎断面和叶柄再切去 1 小段(减少灭菌药物毒害)。然后将切段接种于添加不同激素组合的 MS+3%蔗糖+0.8%琼脂(pH 5.8)培养基上, 置于温度(25±1)℃, 光照 14 h, 光照强度 2 500 lx 左右的条件下培养。获得栝楼无菌苗。

**1.2.2 栝楼试管苗的快繁** 将栝楼无菌苗切成 0.5~0.8 cm 茎段, 接种于添加不同激素组合的 MS+3%蔗糖+0.8%琼脂(pH 5.8)培养基上, 置于温度(25±1)℃, 光照 14 h, 光照强度 2 500 lx 左右的条件下进行增殖培养。

**1.2.3 栝楼试管苗的生根和移栽** 将具有 3~4 节、3.5~4 cm 长的健壮试管苗转入添加不同浓度 NAA 的 1/2 MS+2%蔗糖+0.8%琼脂(pH 5.8)培养基上进行生根培养。将根系健壮的试管苗经 4~5 d 炼苗后, 移栽到栽培基质中。

## 2 结果与分析

**2.1 栝楼无菌苗的诱导** 依据文献资料<sup>[4-6]</sup>, 笔者以前人优选的 5 种不同激素配比的培养基进行栝楼无菌苗诱导试验, 结果见表 1。表 1 表明, 茎段接种 30 d 后, 在 MS+BA 2.0 mg/L+水解酪蛋白 500 mg/L 和 MS+BA 2.0 mg/L 培养基上, 只有少量外植体侧芽萌发, 且随外植体基部愈伤组织的迅速膨大, 侧芽生长停滞, 最后被愈伤组织淹没, 基部愈伤组织直径达 2.5~3.5 cm。在 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 和 MS+BA 1.0 mg/L 培养基上, 侧芽萌发较多, 成苗数不多, 苗矮小, 苗基部愈伤组织直径达 2.0~2.5 cm; 且加 0.2 mg/L NAA 的培养基中苗基部愈伤组织明显要大。在 MS+BA 0.5 mg/L 培养基上, 萌芽、成苗最好, 萌芽率和成苗率均为 100%, 平均苗高达 3.5 cm, 但叶片较小, 培养 25 d 后, 小苗叶色均偏黄, 长

表 1 5 种培养基对栝楼无菌苗诱导的效果

激素组合//mg/L	30 d				
	外植体//个	萌芽数	萌芽率//%	成苗数	成苗率//% 苗高 cm
MS+BA 2.0+水解酪蛋白 500	25	4	16	0	0 -
MS+BA 2.0	25	5	20	0	0 -
MS+BA 1.0+NAA 0.2	25	9	36	1	4 1.6
MS+BA 1.0	25	20	80	5	20 1.5
MS+BA 0.5	25	35	100	31	100 3.5

**作者简介** 朱勤(1970-), 男, 安徽东至人, 在读硕士, 从事植物组织培养工作。

**收稿日期** 2006-05-12

势变弱。

将上述培养得到的无菌苗切成含节茎段转入 MS+BA 0.2 mg/L、MS+BA 0.5 mg/L、MS+BA 1.0 mg/L 培养基中进行增殖培养。结果发现,在这些培养基中茎段腋芽萌发后迅速黄化,生长停滞,大部分不能成苗;少数虽能长到 2~3 cm 高,但继续进行继代增殖则只形成愈伤组织,而无芽的萌发和苗的生长,使得栝楼试管苗的快繁无法进行下去。

从栝楼无菌苗的初代生长和继代增殖表现来看,上述

培养基的激素水平过高,特别是 BA 的水平过高。为此,笔者选择低浓度激素配比,重新对栝楼进行无菌苗诱导(初代培养)和增殖快繁试验。表 2 表明,低浓度 BA 与 IAA 配比能在 30 d 内 100% 诱导栝楼茎段腋芽萌发成苗,并且叶片正常、叶色翠绿、茎秆健壮、茎节腋芽肥大,苗基部愈伤组织直径在 0.5 cm 以下。在 9 种激素配比中,以 MS+BA 0.2 mg/L+IAA 0.6 mg/L 诱导效果最好,30 d 内诱导的腋芽再生苗平均苗高达 5.3 cm,具有 5 个以上节位,最适合作为茎段增殖快

表 2 低浓度 BA 与 IAA 组合对无菌苗诱导的影响

激素组合 // mg/L	外植体 // 个	萌芽数	萌芽率 // %	成苗数	成苗率 // %	苗高 // cm	茎节数
MS+BA 0.1+IAA 0.2	30	30	100	30	100	4.2	3.91
MS+BA 0.1+IAA 0.4	30	30	100	30	100	4.5	3.94
MS+BA 0.1+IAA 0.6	30	30	100	30	100	4.7	4.01
MS+BA 0.2+IAA 0.2	30	30	100	30	100	4.5	4.11
MS+BA 0.2+IAA 0.4	30	30	100	30	100	4.8	4.49
MS+BA 0.2+IAA 0.6	30	30	100	30	100	5.3	5.01
MS+BA 0.3+IAA 0.2	30	30	100	30	100	4.1	4.23
MS+BA 0.3+IAA 0.4	30	30	100	30	100	4.2	4.33
MS+BA 0.3+IAA 0.6	30	30	100	30	100	4.2	4.35

繁材料。

**2.2 栝楼茎段增殖快繁** 以 MS+BA 0.2 mg/L+IAA 0.6 mg/L 培养基诱导的试管苗茎段作为增殖快繁材料,在 MS+BA 0.1 mg/L+IAA 0.6 mg/L、MS+BA 0.2 mg/L+IAA 0.6 mg/L、MS+BA 0.3 mg/L+IAA 0.6 mg/L 3 种培养基上,以 25 d 为周期进行连续转代培养试验,结果见表 3。表 3 表明,经 4 代连续培养,MS+BA 0.1 mg/L+IAA 0.6 mg/L 组合表现为每代之间苗高、茎节数稳定,繁殖系数高,茎秆健壮、茎节腋芽肥大,完全能满足离体快繁的需要。而其他激素组合经转代后苗高迅速下降,叶片呈刺状,茎秆细弱;在连续 3 代培养后,大

部分都丧失增殖成苗的能力。可能的原因是栝楼对 BA 十分敏感,当外源激素 BA 超过一定浓度后,会在栝楼组培苗中迅速积累,导致成苗能力丧失。

**2.3 栝楼试管苗的生根和移栽** 栝楼试管苗经多代增殖后,仅有少部分苗从苗基部愈伤组织或基部节位发根,且根量较少,移栽难以成活。所以必须要有生根培养阶段。栝楼试管苗在不同浓度 NAA 生根培养基中均表现见表 4。表 4 表明,在 4 个浓度 NAA 培养基中,栝楼试管苗 7 d 内生根率均大于 80%,12 d 内全部生根,其中以 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L 所生根系质量最好。

表 3 栝楼茎段在不同激素组合培养基中连续转代培养的表现

激素组合 // mg/L	外植体 // 个	第 1 代(25 d)		第 2 代(50 d)		第 3 代(75 d)		第 4 代(90 d)	
		苗高 // cm	茎节数	苗高 // cm	茎节数	苗高 // cm	茎节数	苗高 // cm	茎节数
MS+BA 0.1+IAA 0.6	40	4.9	5.10	5.1	5.21	5.0	5.15	5.1	5.18
MS+BA 0.2+IAA 0.6	40	4.0	4.72	3.1	4.65	2.4	4.20	绝大部分茎段腋芽不能萌发,成苗基部愈伤组织大	
MS+BA 0.3+IAA 0.6	40	3.4	4.25	2.2	4.21	1.9	4.23	绝大部分茎段腋芽不能萌发,成苗基部愈伤组织大	

表 4 不同浓度 NAA 对栝楼试管苗生根的影响

激素 // mg/L	无根苗 // 株	7 d 生根率	12 d 生根率	根系状况
1/2 MS+NAA 0.05	40	80	100	苗基部不膨大,根少 1~2 条,细长、生长慢,根上没有细小根毛
1/2 MS+NAA 0.1	40	88	100	苗基部不膨大,根较多 3~4 条,粗壮、生长快,根上细小根毛少见
1/2 MS+NAA 0.2	40	90	100	苗基部不膨大,根多 4~5 条,粗壮、生长快,根上有较多的细小根毛
1/2 MS+NAA 0.3	40	90	100	苗基部有膨大的愈伤组织直径 0.3~0.5 cm,根较多 3~4 条,粗壮,根上细小根毛多

生根培养 14 d 左右,将试管苗移入温室内炼苗 4~5 d。移栽时取出试管苗,放入清水中洗去根部的琼脂,移栽到蛭石和珍珠岩(1:3)的混合基质苗床上,浇足定根水,薄膜覆盖保湿。1 周内,每天用喷雾法浇水,保持大棚内湿度 90%、温度 25℃左右。7~10 d 后长出新根,植株开始正常生长,移栽成活率可达 85% 以上。

### 3 讨论

在栝楼的组织培养上,前人的研究材料主要集中在实生苗上。但由于栝楼性别的特殊性,导致许多研究对象都是雄性栝楼,大多数研究都只完成了无菌苗的诱导和快繁过程,而没有对育苗需要的栝楼试管苗进行多代增殖研究。该试验以实现栝楼优质种苗组培快繁工厂化生产为目的,以生产中发现的雌性栝楼优良单株为材料,从实现栝楼试管苗多代、健壮、稳定增殖入手,筛选出了适宜的无菌苗诱导

培养基和增殖培养基。但由于该研究是针对 1 个优良单株作出的,还需要增加试验材料,作更深入的研究。

### 参考文献

- [1] 宋振巧,王洪刚,王建华.栝楼的研究进展[J].山东农业科学,2005(5):72-75.
- [2] 杨廷桢,高敬东,杨明霞,等.栝楼的经济价值及栽培技术要点[J].甘肃农业科技,2003(10):48-49.
- [3] 刘志强,童恩懿,张晋豫.栝楼的快速繁殖的研究 I [J].河南师范大学学报:自然科学版,1992,20(4):782.
- [4] 刘芸.雌雄异株植物栝楼的生理生态和生殖生态研究[D].重庆:西南师范大学,2004.
- [5] 陈惠,梁清华.栝楼组织培养中植株再生的研究[J].中草药,1996,27(12):737-740.
- [6] 佟宏霞,李喜文,邢苗.栝楼组织培养和植株再生研究[J].中国中药杂志,1996,21(12):721-722.
- [7] 曹孟德,陈辉,王君健.栝楼的快速繁殖及愈伤组织的诱导[J].生物技术,1996,6(4):15-17.
- [8] 郑树松,苑华毅,王莉江,等.药用植物栝楼的组织培养及其表达蛋白的分析[J].生物工程学报,2001,17(4):420-422.