

罗汉果叶组织培养的研究

林 荣 王秀琴 王润珍

(广西植物研究所)

摘要 用MS基本培养基培养罗汉果叶组织, 研究植物激素对形成器官的影响。不同细胞分裂素的试验结果表明: 在试验浓度范围内(0.5—1.0毫克/升), BA明显促进芽的形成, KT和对照(基本培养基)均无形成芽, BA为罗汉果叶组织形成芽所必需的。IAA或IBA0.5毫克/升和BA1.0毫克/升配合使用, 对叶组织形成芽有增效作用。芽进一步长出茎叶, 将茎叶转入含有NAA0.2毫克/升的 $\frac{1}{2}$ MS的生根培养基, 明显促进根的形成和发展成完整植株。

我们进行长滩果、拉江果及青皮果等三个罗汉果主要品种的叶组织离体培养, 均能诱导形成丛生芽, 将丛生叶分开, 可不断扩大繁殖, 促进芽的增殖, 能获得大量绿苗。幼苗移栽土壤获得成活, 成活率达80—100%, 幼苗生长良好。

引 言

罗汉果(*Momordica grosvenori* Swingle)系原产我国广西特有的经济植物。果实含有丰富的葡萄糖、果糖及多种维生素。用途广泛, 既是果品, 又是良药, 畅销国内外, 为我国传统的出口物资, 在国际市场上享有很高的声誉。

罗汉果历来采用压蔓繁殖, 繁殖系数低。近年来植物组织和细胞培养的研究迅速发展, 在生产上的作用日益明显。利用组织培养法进行无性系快速繁殖, 现已广泛应用于花卉、蔬菜、果树、林木的生产^[1]。在组织培养中, 通过愈伤组织再生植株, 染色体数目常易发生变化。而很多植物的叶片具有强大的再生能力, 在离体培养时, 可直接诱导形成芽和根器官^[2]。罗汉果叶组织取材方便, 我们试图通过叶组织离体培养, 促使其大量增殖, 从而有效地提高繁殖系数, 为罗汉果良种的快速繁殖提供新的途径。为此, 我们于1979年开始进行罗汉果的叶组织培养研究, 现将研究结果报导如下:

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种子和青皮果成年植株的茎段。材料经表面消毒。种子需去掉种皮后进行消毒, 培养无菌苗。当无菌苗长至4—5枚叶片时, 采取已完全展开的叶片切成约5×5毫米²的小块, 每试管接种1—2块, 每处理一般接种20—30块。

采用MS为基本培养基^[3], 根据试验要求分别附加不同浓度和组合的激动素(KT)。

○韦春榕、扈晓姝两同志参加工作。梁晓芬同志和广西科协魏丁宁同志协助摄影。谨此一并致谢。

6 苄氨基嘌呤 (BA)、萘乙酸 (NAA)、吲哚丁酸 (IBA)、吲哚乙酸 (IAA) 及 2,4-D 等。蔗糖或白糖浓度 2—3%，琼脂 0.7—1.0%。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、细胞分裂素对形成芽的影响

采用青皮果品种的叶组织，在 MS 基本培养基附加 BA 或 KT 的不同浓度 (0.5—1.0 毫克/升) 细胞分裂素的试验结果表明 (表 1)。BA 和 KT 均能诱导叶组织发生愈伤组织，但不同细胞分裂素对形成芽有明显的影响。在试验浓度范围内，BA 促进罗汉果叶组织形成芽，而 KT 和对照 (基本培养基) 均无形成芽。可见，罗汉果叶组织形成芽，细胞分裂素 BA 是必需的。

表 1 细胞分裂素对罗汉果叶组织形成芽的影响

细胞分裂素 (毫克/升)	外植体 数目(块)	发生愈伤组织		形 成 芽		芽生长 情况
		块	%	块	%	
MS	25	1	4.0	0	0	—
MS+BA 0.5	20	20	100.0	10	50.0	丛生
MS+BA 1.0	22	22	100.0	14	63.6	丛生
MS+KT 0.5	19	19	100.0	0	0	—
MS+KT 1.0	19	11	57.9	0	0	—

二、不同激素组合对形成芽的影响

采用青皮果品种的叶组织，在 MS 基本培养基附加不同浓度的 BA 或 KT (0.5—1.0 毫克/升) 和 IBA、IAA、NAA 及 2,4-D (0.1—0.5 毫克/升) 的不同组合均能诱导发生愈伤组织，但不同激素组合对叶组织形成芽的效应有明显的差异 (表 2—3)。附加 BA 1.0 毫克/

表 2 BA 和生长素组合对罗汉果叶组织形成芽的效应

激素组合 (毫克/升)	外植体数 目(块)	愈 伤 组 织		形 成 芽		芽生长情况
		块	%	块	%	
MS	25	1	4.0	0	0	—
MS+IBA0.1+BA0.5	25	25	100.0	11	44.0	丛生
MS+IBA0.1+BA1.0	24	21	87.5	17	70.8	丛生
MS+IBA0.5+BA0.5	25	25	100.0	2	8.0	丛生
MS+IBA0.5+BA1.0	25	25	100.0	23	92.0	丛生
MS+IAA0.1+BA0.5	25	25	100.0	14	56.0	丛生
MS+IAA0.1+BA1.0	24	24	100.0	10	41.7	丛生
MS+IAA0.5+BA0.5	23	23	100.0	3	13.0	丛生
MS+IAA0.5+BA1.0	27	27	100.0	19	70.4	丛生
MS+NAA0.1+BA0.5	25	25	100.0	0	0	—
MS+NAA0.1+BA1.0	23	23	100.0	5	21.7	单生 1—2
MS+NAA0.5+BA0.5	25	25	100.0	0	0	—
MS+NAA0.5+BA1.0	25	25	100.0	0	0	—
MS+2,4-D0.1+BA0.5	25	25	100.0	0	0	—
MS+2,4-D0.1+BA1.0	25	25	100.0	12	48.0	单生 1—2
MS+2,4-D0.5+BA0.5	19	19	100.0	0	0	—
MS+2,4-D0.5+BA1.0	23	23	100.0	1	4.4	单生 1

表 3

KT和IAA组合对罗汉果叶组织形成芽的效应

激素组合 (毫克/升)	外植体数目(块)	愈 伤 组 织		形 成 芽	
		块	%	块	%
MS+IAA0.1+KT0.5	20	20	100	0	0
MS+IAA0.1+KT1.0	20	17	85	0	0
MS+IAA0.5+KT0.5	20	20	100	0	0
MS+IAA0.5+KT1.0	20	20	100	0	0

升和IBA0.5毫克/升的组合,效果最好,形成芽频率达92%,同时形成丛生芽的数量较多;其次是附加BA1.0毫克/升和IAA0.5毫克/升及BA1.0毫克/升和IBA0.1毫克/升两组合,形成芽频率分别为70.4%和70.8%;BA1.0毫克/升和低浓度的NAA或2,4-D,亦可诱导叶组织形成芽,但形成芽的数量较少,一般仅1—2个;BA和较高浓度的NAA或2,4-D的组合,发生大量愈伤组织,影响芽的形成;而附加KT和IAA的各组合及对照(基本培养基)均无形成芽,这表明外源激素对罗汉果叶组织形成芽是必需的,但必需附加适宜的激素种类和浓度,IBA或IAA0.5毫克/升和BA1.0毫克/升配合使用对叶组织形成芽有增效作用。

三、不同品种与形成芽的关系

采用罗汉果的长滩果、拉江果及青皮果等三个主要品种,每个品种选用苗龄基本相同的无菌苗10株的叶组织,在MS+IBA0.5毫克/升+BA1.0毫克/升的培养基进行培养,其试验结果表明(表4),各品种的叶组织均能诱导形成芽。在同一品种的不同株间采取的培养材料,不仅形成芽频率有显著差异,而且形成芽的数量亦有明显的差别,如长滩果8号的叶组织形成芽频率达100%,平均每块叶组织形成芽数达10.16个(丛);而长滩果7号的叶组织,形成芽频率仅27.27%,芽数为1.67个(丛),这可能由于培养材料的生理状态所致,有待进一步深入研究。因此,在优良品种中筛选分化频率高和增殖能力强的无性系,以提高繁殖系数,加速良种繁殖。

表 4 不同品种的叶组织与形成芽的关系

品种	长 滩 果			拉 江 果			青 皮 果		
	外植体数 目(块)	%	个(丛)/块	外植体数 目(块)	%	个(丛)/块	外植体数 目(块)	%	个(丛)/块
1	14	21.43	1.00	21	33.33	1.86	19	15.79	1.67
2	20	20.00	2.25	16	25.00	1.00	20	80.00	4.30
8	10	50.00	1.40	19	5.26	1.00	12	66.67	2.00
4	11	81.82	1.33	18	33.33	1.17	20	70.00	2.80
5	12	83.33	1.80	16	87.50	2.29	29	37.93	2.18
6	10	40.00	1.00	22	100.00	6.20	14	78.57	3.90
7	11	27.27	1.67	33	96.97	7.50	13	38.46	2.60
8	19	100.00	10.16	21	90.48	6.90	12	100.00	5.50
9	22	95.45	11.95	20	100.00	14.00	13	100.00	5.40
10	12	100.00	7.50	23	91.30	5.50	18	55.56	1.30

罗汉果叶组织在适宜的培养基,接种后约一周叶组织开始拱起,培养两周叶组织明显增大和开始形成少量愈伤组织,到第三至四周在叶组织切口及表面开始形成丛生芽,随后长出茎叶,将茎叶转到生根培养基形成根,获得完整再生植株(图1—3)。将丛生小芽分开转

到新鲜培养基扩大培养,可促进芽的增殖,培养约30—40天可长出粗壮的绿芽,茎叶和密集的小芽,每支试管又可切成约10块带芽的切块,已继续培养四次,仍保持旺盛的繁殖能力,每30—40天转管一次,以10倍速度增殖,能繁殖大量绿苗。

我们还采用青皮果实生苗的胚轴、子叶、茎尖、茎段、叶片、叶柄、根尖及成年植株的茎段等不同外植体进行试验的结果表明(表5),罗汉果的不同组织诱导形成芽的频率有很大的差异。叶柄和根尖不能形成芽;子叶形成芽频率较低;茎段和茎尖形成芽的频率高,但形成芽数较少,一般仅1—4个;而叶组织不仅形成芽的频率较高,而且形成丛生芽,芽数也较多,因此,植物组织培养诱导芽的形成,不仅与外源激素有关,而且因植物材料而异。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。我们通过罗汉果的各种组织诱导形成的各种类型的愈伤组织再分化的试验结果表明,分化率低,均不到10%,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〔4,5,6,7,8〕。由于罗汉果叶组织具有较强的分化器官的能力,不经过明显的脱分化过程,可诱导形成丛生芽,同时叶组织取材方便,作为无性系快速繁殖是较好的培养材料。

表5 不同外植体与形成芽的关系

外植体	* MS+IAA0.5+BA1.0						MS+IBA0.5+BA1.0					
	外植体 数 目 (块)	愈伤组织		形成芽		芽生长情况	外植体 数 目 (块)	愈伤组织		形成芽		芽生长情况
		块	%	块	%			块	%	块	%	
下胚轴	20	20	100	15	75.0	丛生1—4	15	15	100	14	93.3	丛生2—4
子叶	20	20	100	2	10.0	单生1—2	20	20	100	8	40.0	单生1—2
上胚轴	20	20	100	6	30.0	单生1	18	18	100	15	83.3	单生1
茎尖	20	20	100	20	100.0	单生1	20	20	100	20	100.0	单生1
**茎段	20	20	100	20	100.0	单或丛1—4	20	20	100	20	100.0	单或丛1—4
节间	20	20	100	0	0	—	20	20	100	0	0	—
叶片	20	20	100	13	65.0	丛生2—10	20	20	100	20	100.0	丛生2—14
叶柄	20	20	100	0	0	—	20	20	100	0	0	—
根尖	20	18	90	0	0	—	20	20	100	0	0	—
成年植株茎段	23	23	100	20	87.0	单生1—2	30	30	100	28	93.3	单生1—2

* 激素用量单位为毫克/升 ** 茎段为带侧芽的茎切段

四、根的诱导

罗汉果叶组织培养形成芽,长出茎叶,在原培养基上不能形成根,必需将已形成茎叶的无根苗,切下转入含有生长素的生根培养基,一般转管后10天开始形成根,获得完整植株。在MS基本培养基,附加各种生长素的试验结果表明(表6),罗汉果诱导生根较容易,附加IBA、IAA或NAA0.5—2.0毫克/升均能诱导生根,生根率达75.8—100%。较高浓度的NAA,形成大量愈伤组织,然后长出许多丛生根,移栽洗根时容易脱落,影响移栽成活;附加IAA或IBA,则形成根的数量少,影响地上部生长不良,易于枯苗;而 $\frac{1}{2}$ MS基本培养基,附加NAA0.2毫克/升,能获得良好效果,不仅生根率达100%,且根系生长粗壮,有利于移栽成活。此外,在培养基中用白糖代替蔗糖,亦获得相同的结果。

五、幼苗移栽

组织培养获得植株移栽成活与否?关系到组织培养的成败。由于组织培养分化的试管苗,处于温度适宜,湿度较大,光照较弱的玻璃瓶内,将试管苗移入土壤,从异养到自养,这是

表6 不同生长素对生根的影响

生长素 (毫克/升)	培养材料数 (株)	生根株数 (株)	生根率 (%)	根系生长情况
1/2 MS+NAA0.2	200	200	100.0	根粗壮
MS+NAA0.5	38	38	100.0	愈伤组织较多, 丛生细根多
MS+NAA1.0	191	191	100.0	愈伤组织多, 丛生细根多
MS+NAA2.0	33	25	75.8	愈伤组织多, 丛生细根多
MS+IAA0.5	21	19	90.5	根少
MS+IAA1.0	73	73	100.0	根少
MS+IAA2.0	71	71	100.0	根少
MS+IBA0.5	18	14	77.9	根少
MS+IBA1.0	63	63	100.0	根少
MS+IBA2.0	34	34	100.0	根少

□ 铁盐用全量, 白蜡或蔗糖2%

一个很大的转变, 如不加注意不易成活。罗汉果的试管苗较幼嫩, 通过幼苗长势、幼苗的光照处理的移栽试验结果表明(表7—8)。罗汉果的试管苗具有根粗、苗壮, 长出3—4片叶, 叶片呈绿色或深绿色的壮苗, 移栽成活率达92.9—100%; 而幼苗的根细长, 茎纤细, 叶片呈淡绿色的弱苗, 移栽成活率仅35.7—50.0%。

表7 幼苗的长势对移栽成活的影响

幼苗的长势	移栽日期 (年, 月, 日)	移植株数 (株)	成活株数 (株)	成活率 (%)
壮苗	80, 6, 5,	28	26	92.9
弱苗	80, 6, 5,	28	10	35.7
壮苗	80, 6, 12,	22	22	100.0
弱苗	80, 6, 12,	10	5	50.0

表8 幼苗的光照处理对移栽成活的影响

处 理	幼苗长势	移植株数 (株)	成活株数 (株)	成活率 (%)
光照处理5—7天	叶大, 叶色深绿色	86	84	97.67
室内自然光	叶小, 叶色淡绿色	66	17	25.76

罗汉果叶组织培养增殖能力较强, 在一支试管内往往长出许多茎叶, 其叶片小, 叶色呈淡绿色。将茎叶转到生根培养基, 形成根后, 加强光照处理5—7天, 明显地看到叶片变大, 叶色转深绿色, 幼苗移栽成活率可达97.67%; 而未经光照处理, 在室内自然光下培养的幼苗, 叶片小, 叶色呈淡绿色, 移栽成活率仅25.76%。

我们还采用竹箩、塑料袋及盆等不同移栽容器和不同移栽基土等试验, 其对幼苗移栽成活率均无明显影响, 成活率达80—90%。于5—9月间进行移植时期试验(表9), 其幼苗的成活率亦无明显差异。桂林地区7—8月间, 绝对最高温度达37—38℃, 对幼苗移栽的成活亦影响不大, 但应加强水分供应, 增加淋水次数。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供应是移栽成活的关键。

幼苗移栽前揭开试管塞让幼苗在自然光下或培养室光照下锻炼两天, 取出幼苗, 洗净粘附在根部的培养基, 立即栽植于营养箩或盆中, 基土用草皮泥, 腐植土和粗砂各占三分之一或粗砂三分之一和草皮泥三分之二混合均可。栽植后盖上玻璃罩5—10天, 将营养箩种植于砂

表9

移栽时期对幼苗成活的影响

移栽时期 (年,月,日)	移植株数 (株)	成活株数 (株)	成活率 (%)
80, 5, 14,	20	20	100.0
80, 6, 12,	22	22	100.0
80, 7, 14,	30	28	93.3
80, 8, 1,	108	106	98.1
80, 8, 16,	70	64	91.4
80, 9, 1,	100	100	100.0
80, 9, 12,	77	75	97.4

池中(图4),便于控制水分的供应,待幼苗长出新叶后揭盖,继续培养约10天,将营养钵或幼苗移植于圃地,让幼苗在自然条件下生长。幼苗移栽获得成活(图5—7),成活率最高达100%,一般为80—90%,幼苗生长良好。移栽三个月,苗高2—3米,藤蔓已上棚架,根深叶茂,当年可形成种薯(图8),与常规繁殖的幼苗长势相似。

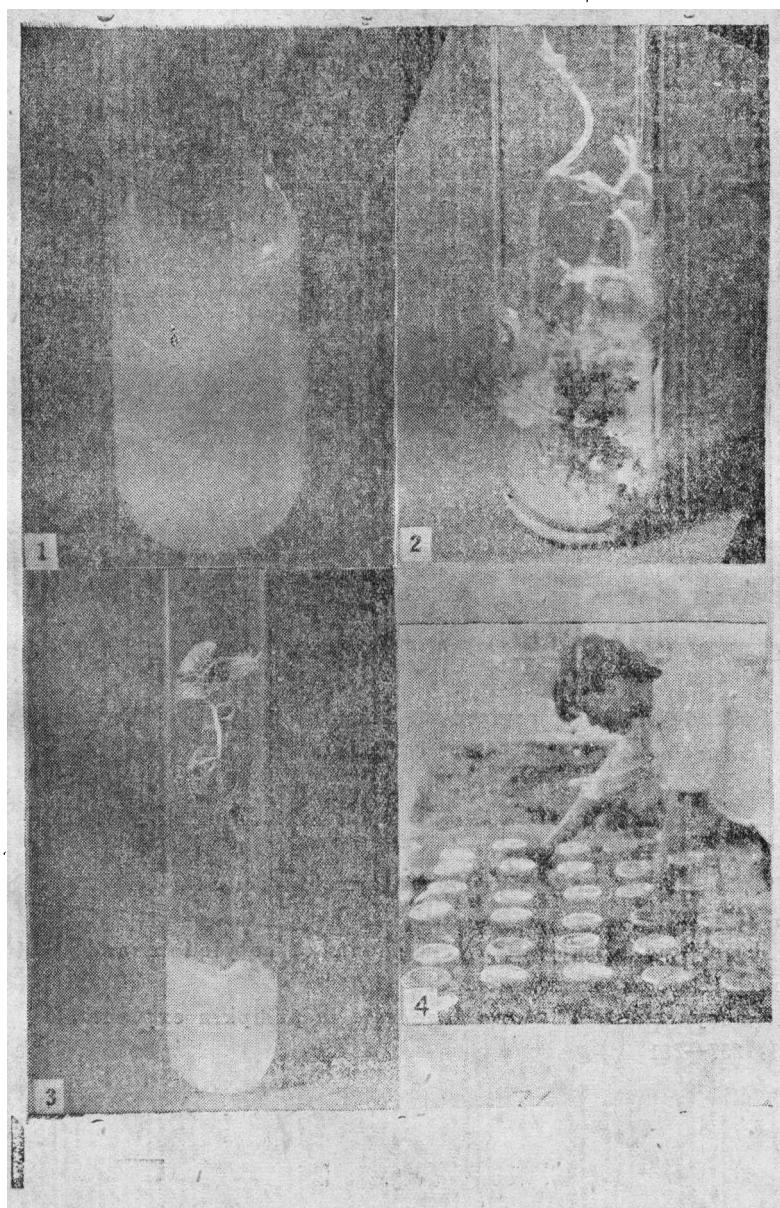


图1 叶组织增大和形成愈伤组织

图2 形成绿芽和长出茎叶

图3 再生完整植株

图4 幼苗移栽,营养钵种植在砂池

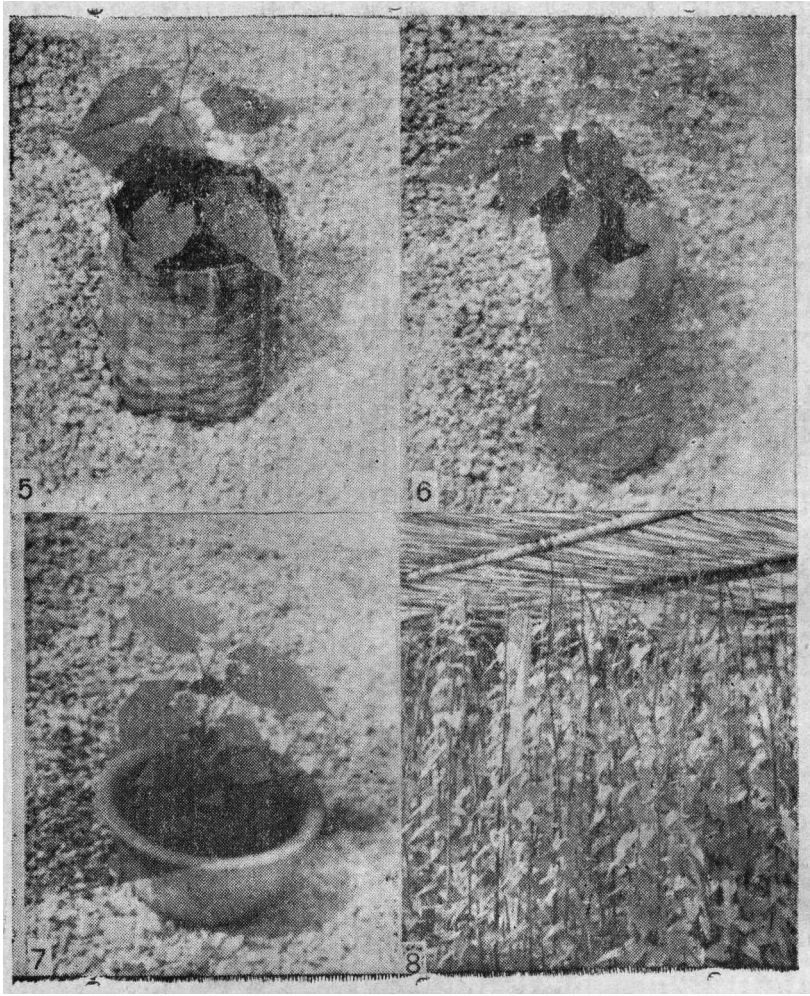


图 5 移栽在竹篓一个月，成活的小植株

图 6 移栽在塑料袋一个月，成活的小植株

图 7 移栽在盆上一个月，成活的小植株

图 8 移栽在苗圃地三个月，生长茂盛的植株

参 考 文 献

- (1) 罗士韦, 1978: 植物组织与细胞培养研究工作的进展及其应用. 植物生理学报, 4(1): 91—112
- (2) 中国科学院上海植物生理所细胞室编译, 1978: 植物组织和细胞培养. 上海科学技术出版社, 208—213
- (3) Murashige, T. & F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473—497
- (4) 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
- (5) 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
- (6) Barnes, L.R., 1979: In vitro propagation of watermelon. *Scientia Horticulturae*, 11: 223—227
- (7) Jelaska, S., 1972: Embryoid formation by fragments of cotyledons and hypocotyls in *Cucurbita pepo*. *Planta*, 103: 278—280
- (8) Jelaska, S., 1974: Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiol. Plant.*, 31: 257—261