

陈汉鑫. 罗汉果组培苗生产体系的建立 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (3): 253-257.

CHEN H-X, et al. Establishment of Tissue Culture System for *Siraitia grosvenorii* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (3): 253-257.

罗汉果组培苗生产体系的建立

陈汉鑫

(福建省漳州市农业科学研究所, 福建 漳州 363005)

摘要: 以罗汉果带节茎段为材料, 对其诱导、继代、生根和移栽等条件进行研究, 为罗汉果组培苗生产体系的建立提供条件。结果表明: MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为诱导培养基, 诱导率可达 40.0%; 继代培养采用单节茎段扦插和促进腋芽生枝方法, 适合的培养基为 2/3 改良 MS+IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +GA₃ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 增殖系数为 4.0; 生根培养基为 1/2 改良 MS+IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 2.0%+活性炭 0.1%+琼脂 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根率达到 94%; 栽培基质以泥炭土:珍珠岩=10:2 为宜, 移植成活率可达 97.8%。

关键词: 罗汉果; 茎段; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S 682

文献标识码: A

Establishment of Tissue Culture System for *Siraitia grosvenorii*

CHEN Han-xin

(Zhangzhou Agriculture Science Institute, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

Abstract: The stem segment of *Siraitia grosvenorii* was used as the material for establishing of tissue culture system with micropropagation. The results showed that the medium of MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + agar $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ was suitable for inducing axillary bud with induction rate of 40.0%. Single nodes cutting and accelerating for axillary buds growth were applied in subculture and optimal medium was 2/3 in modified MS + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + agar $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, with proliferation coefficient 4.0. The optimal rooting medium was 1/2 in modified MS + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose 2.0% + AC 0.1% + agar $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, with rooting rate of 94%. The suitable transplanting medium was peat soil + perlite in the ratio of 10 : 2, with survival rate for 97.8%.

Key words: *Siraitia grosvenorii* Swingle C; stem; tissue culture;

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* Swingle C. Jeffereg 是我国广西特有的葫芦科多年生草质藤本植物, 其叶心形, 雌雄异株, 夏季开花, 秋天结果, 以果实入药, 具有止咳祛痰、润肠通便等功效^[1]。罗汉果含有的甜甙是一种低热量、高甜度、用途广的天然甜味剂, 深受广大消费者的青睐^[2-3]。漳州市南靖、华安等地在调整产业结构中, 大量引进种植, 初具生产规模。

罗汉果主要利用雌株进行种植, 但种子繁殖后代中出现雄株的比例偏高, 因此在实际生产中仍主要采取压蔓的方式来繁殖种苗, 但这种繁殖方式不仅繁殖系数低, 且易感染病毒^[4]。病毒在植物体内

世代累积, 导致品种退化、质量下降和产量锐减。利用组织培养进行种苗繁殖是良种快繁和控制病毒蔓延的有效途径, 而且能生产出大量优质种苗。随着研究的不断深入, 有关罗汉果快速繁殖和脱毒研究也有一些报道^[5-10], 但大多是采用诱导愈伤组织培养成苗或采用种子播种培养成苗的途径, 这对于容易产生变异的罗汉果不是最佳的繁殖方法。因此, 笔者在前人工作的基础上采用单节茎段扦插和促进腋芽生枝的方法来探讨罗汉果生产体系的建立, 旨在为罗汉果的规模化生产及大面积推广种植提供技术支持。

收稿日期: 2014-10-12 初稿; 2015-02-14 修改稿

作者简介: 陈汉鑫 (1978-), 男, 助理研究员, 主要从事组织培养与设施栽培研究 (E-mail: zzchxe@163.com)

基金项目: 漳州市科技计划项目 (ZZ2014037)

1 材料与方法

1.1 试验材料

罗汉果茎段取自华安县沙建镇汰内村“青皮果”雌株，于 2013 年 10 月晴天午后切取已结果的罗汉果雌株顶端，顶端自上而下 4~8 节为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 材料消毒处理及诱导培养 将叶片去掉，仅留 0.5 cm 左右的叶柄，自来水冲洗后，用软毛刷把材料由上而下刷洗干净。用 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的利福平处理 30 min。然后在超净工作台，用 70% 的酒精浸泡 30 s，再用 0.1% 的升汞（加 2~3 滴吐温-80）消毒 8 min，最后用无菌水冲洗 4 次，用无菌滤纸滤干残余的水分。在无菌条件下，将茎段接入诱导培养基（1）MS；（2）MS+6-BA（0.50、1.00、1.50 共 3 种浓度）（单位： $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，以下单位相同）+NAA（0.05、0.10、0.15 共 3 种浓度）组合成 9 种培养基，共 10 种培养基（表 1），所有培养基均加入蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，pH5.8。每处理接 50 瓶（每瓶接 1 个带节茎段）。培养条件为温度 $26 \sim 28^\circ\text{C}$ ，光照强度 2000 lx （下同）。25 d 后统计诱导率。

1.2.2 继代培养 在继代培养中，为降低变异率，本试验采用促进腋芽生枝和单节茎段扦插的方式进行快繁。为提高苗木质量及减少玻璃化苗的形成，笔者对基本培养基 MS 中的大量元素进行调整，即：适当降低培养基中的 NH_4^+ 及 Cl^- 浓度，提高培养基中的 K^+ 、 P^{3+} 及 Ca^{2+} 浓度，即适当减少 NH_4NO_3 和 CaCl_2 的量，增加 KH_2PO_3 的量，加入适量的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 。调整后的基本培养基暂称改良 MS。单节茎段扦插试验采用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交试验设计，以改良 MS（A）、IBA（B）、 GA_3 （C）和蔗糖（D）为因素（表 2）选择适宜培养基。每个处理接 20 瓶，每瓶接 5 节。重复 3 次，接种 4 周后统计增殖系数。

1.2.3 生根培养 以高度 3 cm 以上，具 2~3 个节的小苗为材料，以 1/2 改良 MS 为基本培养基，蔗糖浓度 2.0%，活性炭 0.1%。分别添加生长素 IBA（0.1、0.5、1.0），NAA（0.1、0.5、1.0），ABT1 号（0.1、0.5、1.0），进行单因素试验，共 9 个处理，以加蔗糖和活性炭、不加任何生长素的 1/2 改良 MS 为对照（CK）（表 3）。每个处理接 20 瓶，每瓶接 5 株。试验重复 3 次。30 d 后统计生根率。

1.2.4 移植试验 移植试验于次年 3 月进行。将根部无愈伤组织且具 2 条根以上、5~6 cm 高、带 3~4 片叶、生长健壮的生根苗，进行适应性炼苗 10 d 后，移栽于温室大棚中。以泥炭土和珍珠岩为基质，按不同比例调配（表 4），每个处理种植 100 株，重复 3 次。移栽后按常规方式管理。45 d 统计移栽成活率。

1.3 数据处理与分析

萌芽率/% = (萌芽数/没有污染的茎段) $\times 100\%$

增殖系数 = 新长出茎段的节数/接入茎段的节数

生根率/% = (具有 2 条根及以上的苗数/接入的苗数) $\times 100\%$

移栽成活率/% = (成活株数/100 株) $\times 100\%$

正交试验结果采用 DPS 软件进行方差分析，差异显著性用新复极差法进行平均数的多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对罗汉果芽诱导的影响

表 1 可看出：激素对罗汉果芽的诱导有重要的作用，在不加激素的情况下，其诱导率为零。随着激素总浓度的增高，芽的诱导率提高，但同时也出现玻璃化的现象及切口长愈伤组织。当 6-BA 浓度保持不变时，随着 NAA 浓度的增高，芽的长势较快，但同时会出现玻璃化的现象。因此，NAA 浓度维持在 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果较好。当 NAA 浓度保持不变时，随着 6-BA 浓度的增高，诱导率提高，因此，影响罗汉果诱导率高低主要是 6-BA。但当 6-BA 浓度过高时，切口会出现愈伤组织。综合各项指标，处理 6 比较适合罗汉果诱导培养。

2.2 不同培养基对罗汉果继代培养的影响

在诱导试验中，笔者观察到，加入 6-BA 会导致罗汉果产生愈伤组织，而愈伤组织的出现又会影响种苗的质量。为保证种苗质量及降低变异率，在继代试验中，笔者采用促进腋芽生枝和单节茎段扦插的办法进行快繁。其茎芽增殖的方式如图 1 所示。

以改良 MS（A）、IBA（B）、 GA_3 （C）和蔗糖（D）为因素，采用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交进行试验设计，正交结果如表 2 所示。从表 2 可看出：由 4 因素的 R 值大小可得出，不同因素对罗汉果继代影响的主次关系为 IBA > 改良 MS > GA_3 > 蔗糖。由此可知，在采用促进腋芽生枝和单节茎段扦插进行快繁的过程中，IBA 对罗汉果增殖系数的影响最大，其次为改良 MS，说明对 MS 进行改良后，其对增殖也有重要的影响。由方差分析结果可知，处

理 5 是罗汉果较适合的增殖培养基，与其他处理相比均达到极显著水平差异。而在本试验的设计范围内，得到的罗汉果继代的较优组合为 $A_2B_2C_3D_3$ ，即 2/3 改良 MS+ IBA0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA3 $\text{mg} \cdot$

L^{-1} + 蔗糖 4%。把罗汉果带节茎段接入 $A_2B_2C_3D_3$ 培养基中，4 周后统计增殖系数达到 4.0，比正交设计中任何一个处理都高，证实了正交试验筛选的结果。

表 1 不同培养基对罗汉果芽诱导的影响
Table 1 The effects of different medium on induction of *Siraitia grosvenorii* buds

处理	激素浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		材料数 /个	出芽数 /个	诱导率 /%	生长势
	6-BA	NAA				
1	0.00	0.00	29	0	0	未诱导出芽
2	0.5	0.05	27	8	30.0	芽长势较慢,无愈伤,无玻璃化现象
3	0.5	0.10	25	8	32.0	芽长势较慢,无愈伤,无玻璃化现象
4	0.5	0.15	27	9	33.3	芽长势快,无愈伤,有轻微玻璃化现象
5	1.0	0.05	27	10	37.0	芽长势慢,无愈伤,无玻璃化现象
6	1.0	0.10	30	12	40.0	芽长势快,无愈伤,无玻璃化现象
7	1.0	0.15	28	12	42.9	芽长势快,无愈伤,有轻微玻璃化现象
8	1.5	0.05	26	10	38.5	芽长势慢,有愈伤组织,无玻璃化现象
9	1.5	0.10	28	13	46.2	芽长势快,有愈伤组织,有轻微玻璃化现象
10	1.5	0.15	27	13	48.1	芽长势快,有愈伤组织,玻璃化现象较严重

注:材料数=接种数-污染数。

表 2 不同培养基对罗汉果茎段增殖的影响
Table 2 The effects of different medium on stem segment multiplication of *Siraitia grosvenorii*

处理	因素				增殖 倍数
	改良 MS (A)	IBA(B)/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	GA ₃ (C)/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	蔗糖 (D)/%	
1	1(1/3 改良 MS)	1(0.25)	1(0.1)	1(2)	2.2fE
2	1(1/3 改良 MS)	2(0.5O)	2(0.2)	2(3)	2.8eD
3	1(1/3 改良 MS)	3(1.00)	3(0.3)	3(4)	3.2cC
4	2(2/3 改良 MS)	1(0.25)	2(0.2)	3(4)	3.1cCD
5	2(2/3 改良 MS)	2(0.50)	3(0.3)	1(2)	3.8aA
6	2(2/3 改良 MS)	3(1.00)	1(0.1)	2(3)	2.9deD
7	3(改良 MS)	1(0.25)	3(0.3)	2(3)	3.0cdCD
8	3(改良 MS)	2(0.50)	1(0.1)	3(4)	3.4bB
9	3(改良 MS)	3(1.00)	2(0.2)	1(2)	2.8eD
K1	2.72	2.77	2.83	2.94	
K2	3.26	3.36	2.89	2.90	
K3	3.09	2.94	3.34	3.22	
R	0.54	0.59	0.51	0.32	

注:同列数据后不同大、小写字母表示差异极显著($P<0.01$)和差异显著($P<0.05$)。下表同。

2.3 不同生长素对罗汉果生根培养的影响

从表 3 可看出:在不加生长素的情况下,罗汉果也会长根,但生根时间相对较长,且生根率相对

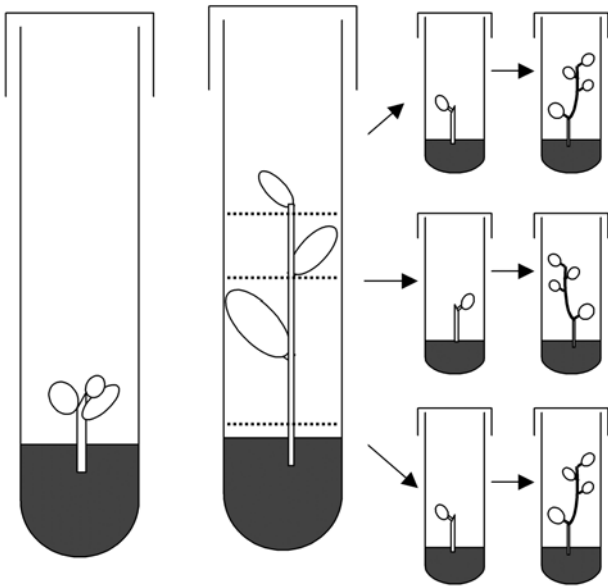


图 1 单节茎段扦插和促进腋芽生枝方法模式图^[11]
Fig.1 The mode chart of single nodes cutting and accelerating axillary buds growth

较低。对生根率进行方差分析,结果表明:任何一种生长素都能提高生根率和促进苗的生长,与对照相比均达到极显著水平差异。在培养基中添加 3 种生长素对生根有明显的促进作用,生根率明显提高。但 3 种生长素对苗的生长有着明显的差异,在加入较高浓度 ($\geq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 NAA 或

ABT1 号的生根培养基中，其基部会有泡沫状的愈伤组织，在移栽到基质后，容易出现烂根和死苗；同时，根的质量也不好，在洗苗的过程中容易在茎基部折断。因此，其中处理 3 是较适合的生根培养基。

表 3 生长素对生根培养的影响
Table 3 The effects of different on rooting of *Siraitia grosvenorii*

处理	激素/ (mg · L ⁻¹)	生根天数 /d	生根率 /%	平均根数 /条	生长势
1	0	22	42 fE	1.8	苗长势差,根短黄
2	IBA 0.1	14	89 bcdBC	3.2	苗长势一般,根细白,无愈伤组织
3	IBA 0.5	12	92 abAB	3.5	苗长势快,根细白,无愈伤组织
4	IBA 1.0	12	94 aA	3.6	苗长势快,根细白,无愈伤组织,
5	NAA 0.1	15	84 eD	2.8	苗长势慢,根细白,无愈伤组织
6	NAA 0.5	13	88 cdBCD	3.2	苗长势快,根粗白,有愈伤组织
7	NAA 1.0	13	90 bcABC	3.2	苗长势快,根粗白,有愈伤组织,脚叶轻微枯黄
8	ABT1 号 0.1	13	86 deCD	3.0	苗长势慢,根粗短,有愈伤组织
9	ABT1 号 0.5	13	88 cdBCD	3.2	苗长势快,根粗短,愈伤组织严重,脚叶轻微枯黄
10	ABT1 号 1.0	13	90 bcABC	2.8	苗长势快,根细短,愈伤组织严重,脚叶轻微枯黄

注:生根天数指从接种之日到有明显根长出时的天数。

2.4 不同栽培基质对罗汉果移栽成活率的影响

泥炭土与珍珠岩混合基质有利于罗汉果的移栽成活及生长发育。从表 4 可以看出，当泥炭土与珍珠岩比例为 10∶2 和 10∶3 时，两者之间差异未达显著水平，但与其他处理达极显著差异水平，表明按此配比的混合基质具有较强的透气性和保水性^[12]，有利于罗汉果根系的生长。但由于珍珠岩相对较轻，当比例偏高（泥炭土∶珍珠岩=10∶3）时，珍珠岩会浮在基质上面，移植时不好操作。因此，建议栽培基质以泥炭土∶珍珠岩=10∶2 为宜。

在温室大棚移植 45 d 后，此时罗汉果苗根系发育好，茎粗壮，真叶有 6~8 片，叶片深绿、肥厚，可移到大田定植。

表 4 不同栽培基质对罗汉果成活率的影响
Table 4 The effects of different transplanting medium on the survival rate of *Siraitia grosvenorii*

栽培基质	成活率/%
泥炭土∶珍珠岩=10∶1	90.40bB
泥炭土∶珍珠岩=10∶2	97.80aA
泥炭土∶珍珠岩=10∶3	97.30aA
泥炭土∶珍珠岩=10∶4	89.60bB
泥炭土∶珍珠岩=10∶5	84.40cC

3 讨论与结论

本试验结果表明激素对罗汉果芽的诱导有重要的作用，MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹+蔗糖 30 g · L⁻¹+琼脂 6.0 g · L⁻¹为诱导培养基，诱导率可达 40.0%。同时采用一定量的利福平对罗汉果表面的细菌及其孢子的去除有一定的作用^[13]，但本试验中采用的浓度和时间段是否为最佳选择，还需进一步的探讨。

本试验采用单节茎段扦插和促进腋芽生枝方法进行继代培养，适合的培养基为 2/3 改良 MS+IBA 0.5 mg · L⁻¹+GA₃ 0.3 mg · L⁻¹+蔗糖 40 g · L⁻¹+琼脂 6.0 g · L⁻¹，增殖系数为 4.0；以 1/2 改良 MS 为基本培养基，加不同生长素进行生根培养结果为 1/2 改良 MS+IBA 0.5 mg · L⁻¹+蔗糖 2.0%+活性炭 0.1%+琼脂 6.0 g · L⁻¹，生根率达到 94%。试验采用改良 MS 作为基本培养基，主要因为：（1）降低铵态氮的含量和提高钾的含量能改善芽的生长^[14]，钾对细胞的新陈代谢有重要的作用且组培中的用量有趋高的现象；（2）组培中适当提高磷的含量有利于培养物的生长，增加钙离子的含量有利于继代苗的生长；（3）氯离子过量对组织和细胞有不利的影 响，减少氯离子有利于继代苗的生长。本试验采用改良 MS 培养基，没有出现其他文献中所出现的在增殖过程中存在的弱

苗、玻璃化苗的现象^[15]。同时采用单节茎段扦插和促进腋芽生枝方法进行快繁，一个培养周期即以对数方式进行扩繁，并且茎尖细胞是二倍体，不易发生基因型的异化。故此在短时间内（当年10月到次年4月中旬）生产出大量的罗汉果组培苗，并尽量降低种苗的变异率。

此外罗汉果在组培过程中容易产生愈伤组织，观察发现罗汉果在培养过程中出现愈伤组织会严重影响种苗的质量，并引发广大种植者和生产单位产生疑虑^[16]，而且使植株发生变异的概率增加。因此，在组培过程中应尽量避免产生愈伤组织的发生。

在罗汉果移栽时，基质良好透气性和保水性是移栽成活率的关键，栽培基质以泥炭土珍珠岩=10:2或10:3时，有利于罗汉果根系的生长，特别是泥炭土:珍珠岩=10:2时，移植成活率可达97.8%。在移栽后的管理过程中，要适当控制水分，加强光照，加强棚内通风条件，以减少组培苗在基质中出现烂苗及猝倒的几率。罗汉果组培苗获得较高的移栽成活率，不仅是建立其生产体系的重要环节，同时为罗汉果种苗的进一步商业化生产奠定良好的基础。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[S]. 北京：化学工业出版社，2005：147.
- [2] 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.
- [3] 白隆华，马小军，莫长明，等. 罗汉果种质资源综合指数定量评价研究[J]. 中国中药杂志，2007，32（33）：2482—2483.
- [4] 周昌远，蒋纪森. 永福县罗汉果生产现状及发展对策[J]. 广西农业科学，2003，（6）：3.
- [5] 黄燕芬，范成五. 组织培养快速繁殖罗汉果种苗[J]. 种子，2005，24（8）：91—92.
- [6] 蔡时可，苏海，谢梅新，等. 罗汉果组培快繁试验[J]. 广东农业科学，2005，（3）：30—31.
- [7] 付长亮，马小军，白隆华，等. 罗汉果脱毒苗的快速繁殖研究[J]. 中草药，2005，36（8）：1225—1229.
- [8] 苏明申，林顺权，曾黎辉，等. 罗汉果的组织培养[J]. 中国南方果树，2002，31（3）：43.
- [9] 秦新民，杨华，韦素玲. 罗汉果的组织培养与快速繁殖[J]. 安徽农业科学，2008，36（9）：3553—3554.
- [10] 林伟，黎起秦，王爱勤，等. 罗汉果组织培养（简报）[J]. 植物生理学通讯，2002，38（5）：460.
- [11] 李浚明. 植物组织培养教程：第2版[M]. 北京：中国农业大学出版社，2004：262.
- [12] 张庆霞，金伊洙. 设施园艺[M]. 北京：化学工业出版社，2009：65.
- [13] 沈同，王镜岩. 生物化学[M]. 北京：高等教育出版社，1998：296.
- [14] 王水琦. 植物组织培养[M]. 北京：中国轻工业出版社，2007：35.
- [15] 姚绍娥，潘丽梅，白隆华，等. 正交试验优选罗汉果组培苗生根壮苗生产工艺[J]. 种子，2014，（5）：118—120.
- [16] 何金旺，石仁俊. 浅议罗汉果组培苗的种植风险及规避[J]. 广西农学报，2006，21（4）：312—314.

（责任编辑：黄爱萍）