

甜叶菊组培快繁技术研究

胡松梅 (湖南娄底职业技术学院, 湖南娄底 417000)

摘要 [目的]研究甜叶菊的组培快繁技术。[方法]以甜叶菊茎段为外植体,筛选其最佳外植体消毒条件、最佳不定芽增殖及壮苗生根培养基。[结果]甜叶菊外植体材料的灭菌最佳条件为75%酒精20 s,0.1%升汞5~8 min;最佳不定芽增殖培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,此时不定芽增殖率达80%;最佳壮苗生根培养基为1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA。[结论]该研究为甜叶菊的工厂化规模生产提供了科学依据。

关键词 甜叶菊;快繁;不定芽;生根

中图分类号 S566.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00041-02

Research on Tissue Culture and Rapid Propagation Technology of *Stevia rebaudiana*

HU Song-mei (Loudi Polytechnic, Loudi, Hunan 417000)

Abstract [Objective] The aim was to study the tissue culture and rapid propagation technology of *Stevia rebaudiana*. [Method] The best explants sterilization method, optimal media of adventitious bud proliferation and seedling rooting were screened by using shoot tips of *S. rebaudiana* as explants. [Result] The best explants sterilization method was to sterilized with 0.1% HgCl₂ for 5-8 min after being treated with 75% alcohol for 20 s; the optimal adventitious bud proliferation medium was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA and the adventitious bud proliferation rate was 80%; the optimal seedling rooting medium was 1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA. [Conclusion] This study provided a scientific basis for the industrialized and large-scale production of *S. rebaudiana*.

Key words *Stevia rebaudiana*; Rapid propagation; Adventitious bud; Rooting

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)又名甜菊,素有“巴拉圭甜茶”之称^[1-3],为菊科甜菊属多年生草本植物。甜菊糖是甜叶菊的主要化学成分之一,其甜度约为蔗糖的300~400倍,热量却仅为蔗糖的1/300,是一种低热量、高甜度的天然甜味剂,可预防肥胖症、高血压、小儿龋齿等疾病^[4]。近年来甜叶菊已被广泛地应用于医药与饮食业,深受人们青睐。因甜叶菊种子小,极易丧失活力,发芽率低,且实地育苗要求技术性强,成活率低,遗传性状不稳定,从而使甜叶菊生产受到一定限制^[5]。许多研究已证实,采用组培快繁技术培养无菌苗可保持优良原性状,提高繁殖系数^[6-12]。但至今,关于甜叶菊快速繁殖的研究在国内外尚少见报道,据此,笔者对甜叶菊的组培快繁技术进行初步研究,以期得到甜叶菊无菌苗,旨在为其工厂化规模生产提供重要科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 试验所用植物材料为娄底职业技术学院试验田内所种植的甜叶菊植株。

1.2 外植体的消毒与不定芽的诱导 选取生长健壮、无病虫害的植株,去叶后放入低浓度的洗衣粉水中漂洗3~5 min,用流水冲洗30 min后放置于超净工作台上,进行消毒处理。外植体的消毒分别采用3个处理:①75%酒精10 s,0.1% HgCl₂ 3~5 min;②75%酒精20 s,0.1% HgCl₂ 5~8 min;③75%酒精40 s,0.1% HgCl₂ 8~10 min,消毒后外植体均用无菌水冲洗5~6次。将消毒好的茎段(具茎尖或带腋芽)切成长约1.5~2.0 cm,接种于MS基本培养基。每处理接种10瓶,每瓶5个外植体,3次重复,将接种瓶放入培养室培养,培养温度为24~28℃,光照时间为16 h/d,光照强度为2 000 lx。接种后40 d内观察外植体生长状况,并计算不定

芽的萌动率。萌动率(%)=萌动外植体数/接种外植体数。

1.3 不定芽的增殖 选取无菌健壮植株,切为小段,接种至以MS为基本培养基,添加激素组合6-BA(0.5、1.0、1.5 mg/L)+NAA(0.1、0.2 mg/L)的增殖培养基中,共6个处理,且每处理培养基均添加30 mg/L蔗糖,7 mg/L琼脂,pH调至5.8。每处理接种10瓶,每瓶5个外植体,3次重复。培养温度为24~28℃,光照时间为16 h/d,光照强度为2 000 lx。接种后40 d内观察外植体生长状况,并计算芽增殖率。芽增殖率(%)=增殖外植体数/接种外植体数。

1.4 壮苗及生根培养 对诱导出的甜叶菊不定芽进行增殖壮苗培养,将其分别接种于1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA及1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA培养基,并添加20 mg/L蔗糖和7 mg/L琼脂,pH调至5.8。接种后30 d内观察生根效果,计算生根率。生根率(%)=生根外植体数/接种外植体数。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒与不定芽的诱导 一般在培养3~4 d后,不定芽开始萌动,起初为白色略带黄色,渐转为淡黄绿色,形成主芽。由表1可知,当消毒条件为75%酒精10 s,0.1% HgCl₂ 3~5 min时,外植体材料灭菌不够彻底,虽然易诱导出不定芽,萌动率较高,为98%,但不定芽仍带菌;当消毒条件为75%酒精40 s,0.1% HgCl₂ 8~10 min时,灭菌时间过长,易使灭菌材料褐化死亡,很难诱导出不定芽,且每个外植体上长出的不定芽数量较少;75%酒精20 s,0.1% HgCl₂ 5~8 min为最佳消毒条件,此时外植体灭菌彻底,易诱导出不定芽,且每个外植体上长出的不定芽数量较多。

2.2 不定芽的增殖 6-BA和NAA是常用生长调节剂,其添加量对甜叶菊不定芽增殖的影响很大,同时6-BA的浓度也影响不定芽诱导的效果。由表2可知,在添加量小于1.0 mg/L的情况下,随6-BA浓度的提高,不定芽增殖率明显上

基金项目 湖南省教育厅科研基金项目(10CC0285)。

作者简介 胡松梅(1971-),女,湖南双峰人,副教授,硕士,从事植物资源与细胞工程研究,E-mail:husongmei2005@163.com。

收稿日期 2012-10-30

升,当 6-BA 添加量达 1.5 mg/L 时,其增殖率出现下降趋势,表明在该试验条件下 6-BA 的适宜添加量为 6-BA;生长素 NAA 对甜叶菊不定芽的诱导与增殖具有明显的促进作用,随着 NAA 浓度的增加,不定芽增殖率增加,当 6-BA 浓度固定为 1.0 mg/L 时,2 个 NAA 浓度下的芽增殖率最高,均为 80%,且芽壮,颜色较绿。综合成本等因素考虑,确定该试验中甜叶菊不定芽增殖的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA。

表 1 不同灭菌条件对不定芽诱导的影响

灭菌条件	接种		芽体生	
	数	率//%	数量	长状况
75%酒精 10 s, 0.1% HgCl ₂ 3~5 min	50	98	85	芽数多,容易带菌
75%酒精 20 s, 0.1% HgCl ₂ 5~8 min	50	90	95	芽数较多,生长旺盛
75%酒精 40 s, 0.1% HgCl ₂ 8~10 min	50	30	30	芽数少,生长缓慢

表 2 不同激素浓度对甜叶菊不定芽增殖的影响

处理	激素组合	平均芽增		芽体生长状况
		殖率//%	殖率//%	
1	0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	30		芽较弱,颜色黄白
2	0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	45		芽较壮,颜色嫩绿
3	1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	80		芽壮,颜色较绿
4	1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	80		芽壮,颜色较绿
5	1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	75		芽较弱,颜色较绿
6	1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	70		芽较弱,颜色较绿

2.3 壮苗生根培养 将甜叶菊继代苗进行生根培养,30 d 后发现 1/2MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA 培养基的生根效果较好,根粗壮,呈白色,每株苗的平均生根数为 6.8 条,且生根苗较壮,叶色浓绿,生根率达 90%;而当培养基中 NAA 的浓度增加至 0.5 mg/L 时,平均生根数

表 3 不同生根培养基对甜叶菊不定芽生根的影响

生根培养基	接种		平均生根	
	数	率//%	数//条/株	数//条/株
1/2MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA	50	90	6.8	
1/2MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA	50	86	6.9	

(上接第 40 页)

必须在“不伤害人”的伦理原则下开展生物技术创新活动,要有强烈的责任意识,“作为科技行为的主体,其行为对整个社会和环境具有直接和深远的影响。在传统社会中,科技共同体内成员的伦理关系,是依靠科学的精神气质和科学家的荣誉感来维系的;现代社会经济发展与科技进步之间的互动,已使得功利的因素从内外两个方面对科技共同体产生了巨大的压力”^[6]。因此,从事现代生物技术研究科技工作者,在利益与道德发生冲突的时候,必须以“不伤害人”的精神和品格来决择自己的科研活动。其次,国家和各级政府在现代生物技术的科技政策制定、科技项目攻关、科技经费投入、成果鉴定及转化、市场应用及监管、效益反馈及评估等方面要严谨论证、严格控制,并建立健全相关法律法规和生物安全评估机制。第三,现代生物技术类企业要树立伦理道德和责任意识,所制造的生物制品(特别是食品、药品、保健品、器械

等)必须是无伤害的和无后遗症的产品,不能在商业利益前唯利是图。第四,医疗机构利用基因工程、细菌工程等技术

3 结论

该试验得出,甜叶菊外植体材料的灭菌最佳条件为 75%酒精 20 s, 0.1% 升汞 5~8 min,此时外植体灭菌彻底,且易诱导出不定芽,而灭菌时间过长或过短都不适宜外植体的不定芽诱导;最佳不定芽增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,此时不定芽的增殖率较高,达 80%,且诱导的不定芽生长粗壮,叶色浓绿;最佳壮苗生根培养基为 1/2MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA,此时生根率可达 90%。同时由于无菌苗最终需移至培养室外培育,因此甜叶菊的生根试验需进一步优化,便于以后对其进行移栽试验。

参考文献

- [1] 崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗北京[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [2] WANG Y B, HAO Z B, LI H Y, et al. Separation and Purification of Antioxidant Endophytic Fungi from Stevia Leaves[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(1): 123-126, 142.
- [3] 蒋光月,李帆,朱宏斌,等. 安徽省明光市甜叶菊产业提升探讨[J]. 园艺与种苗, 2011(3): 107-110.
- [4] 马琴玉,楼凤昌,李翱. 甜叶菊的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 1992, 19(1): 5-9.
- [5] 朱东顺,宋晴晴,傅在秋,等. 山东省甜叶菊的主要病害及防治措施[J]. 中国糖料, 2002(3): 27-29.
- [6] ZHAO Y, XU N, MA Z Y, et al. Effect of Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and *in vitro* Rapid Propagation of Wild *Petunia* Juss. [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(5): 931-934.
- [7] 赫福霞,于晶,李范雪,等. 多因子正交试验对甜叶菊丛生芽诱导条件的筛选[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 80-81.
- [8] 赵平丽,邓小梅,叶小玲. 白玉银桦组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 8864-8867.
- [9] YANG C D, ZHANG X, NI D J. Establishment of *in vitro* rapid propagation system for *Ampelopsis grossedentata* [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(3): 382-386.
- [10] 李启任,刘娟,董立华,等. 甜叶菊茎尖组织培养快繁技术[J]. 云南大学学报:自然科学版, 1992, 14(4): 425-426.
- [11] LAN Y T, LIU S Y, LUO Y T, et al. Sterile germination of *Dendrobium chrysotoxum* seeds and rapid propagation of its plantlets [J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(11/12): 89-91.
- [12] 沈秀丽,徐仲. 甜叶菊组织培养条件的研究 II. 不同基本培养基、不同碳源对愈伤组织形成及芽诱导的影响[J]. 中国糖料, 1997(4): 9-10.

等)必须是无伤害的和无后遗症的产品,不能在商业利益前唯利是图。第四,医疗机构利用基因工程、细菌工程等技术

参考文献

- [1] 邓心安,王世杰,姚庆筱. 生物经济与农业未来[M]. 北京:商务印书馆, 2006: 4.
- [2] 韩跃红. 现代生物技术的社会应用及其伦理问题[J]. 云南社会科学, 2003(S2): 195-197.
- [3] WANG X L. Philosophical Reflection on Risks of Transgenic Technology [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(7): 1543-1546.
- [4] 邱仁宗. 生命伦理学:一门新学科[J]. 求是, 2004(3): 44.
- [5] 李航. 浅析生命伦理学“四原则”[J]. 科协论坛, 2009(4): 80-81.
- [6] 刘人椿. 科学技术哲学导论[M]. 北京:中国人民大学出版社, 2005: 189.