

虎舌红组织培养的研究进展

曾云英

(九江学院 土木与城建院, 江西 九江 332005)

摘要: 综述了虎舌红组织培养技术的研究进展, 介绍了用于虎舌红组培研究的茎段培养, 茎尖培养和叶片培养几种主要的组织培养技术。分析了组培中存在的问题, 并指出了以后的研究重点。

关键词: 虎舌红; 组织培养; 进展

中图分类号: S 685 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0155-03

虎舌红(*Ardisia mamillata* Hance)是紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia*)多年生常绿小灌木, 属珍稀观赏植物。虎舌红叶花果并美, 是一种罕见的观赏药用植物, 其通体长满了茸毛, 在阳光的照射下, 紫红色的叶和鲜红的果相映, 折射出太阳七色光彩, 给人带来喜庆吉祥的气氛, 曾荣获“中国 99 昆明世界园艺博览会单项竞赛室内观叶植物大奖”, 成为 21 世纪初期花卉新宠。虎舌红还有一定的药用价值, 全草有清热利湿、活血、止血止痛、祛腐生肌等功效。虎舌红属世界濒危植物, 其自然分布区比较狭小, 在自然界存在的数量不多, 多为散生分布, 且长势较弱, 少有挂果。传统的繁殖方式周期长, 工作量大, 组织培养加速了这一进程。至 1999 年虎舌红荣获“中国 99 昆明世界园艺博览会单项竞赛室内观叶植物大奖”后, 一些专家学者们开展了对其组织培养体系的研究, 现就虎舌红组织培养研究作一回顾, 并结合存在的问题展望未来的研究, 以期为进一步研究这一珍稀观赏植物提供借鉴。

1 虎舌红组织培养外植体的选择及种类

1.1 茎段、芽及茎尖的培养方法

虎舌红组织培养所用的材料以茎段和茎尖为主。已报道的虎舌红的茎段培养均是采取成年植株的带芽茎段进行培养^[1], 在适宜的培养基中腋芽萌发生长成独立植株。茎尖培养与茎段等外植体培养相比, 具有形成丛生芽的比例高, 增殖率高, 变异性小等优点^[3], 虎舌红植株矮小, 生长极缓慢, 如以茎尖作为外植体, 虽然较易获得试管苗, 但取材数量很少, 为了获得较多外植体, 可以采取在早春给虎舌红打顶等栽培措施, 促使多发新梢。

1.1.1 外植体取材 外植体的取材时期影响虎舌红外

植体的成活。影响外植体存活的一个重要因素是污染率, 虎舌红通体布满茸毛, 大量外生菌隐藏于茸毛中并滋生, 这给外植体的表面消毒造成一定的困难, 导致外植体在培养过程中污染率很高。研究表明, 8 月份是虎舌红外植体污染率最高期, 3 月份次之, 11 月份最低。影响虎舌红外植体成活的另一个重要因素是外植体褐变, 外植体中酚含量及多酚氧化酶的氧化活性在春季较弱, 以后逐渐增强, 从而使褐变加重, 8 月份取材褐变率最高。所以, 虎舌红外植体最佳的取材时期是在 3 月份, 主要是因为此时期植株营养充足, 芽生长点处于活跃时期, 茎尖、茎段存活率高^[4]。

1.1.2 外植体处理 外植体消毒, 所用的消毒剂种类及消毒时间的长短对外植体存活率都有明显影响, 消毒时间过长可能引起外植体褐变而降低存活率, 过短则达不到灭菌的目的。虎舌红因其通体布满茸毛, 致使大量外生菌隐藏于茸毛中并滋生, 给外植体的表面消毒造成一定的困难, 是外植体在培养过程中受污染而死亡的主要原因。综合已有的报道, 得出适宜虎舌红外植体的消毒方式: 取当年生枝, 去掉叶, 用去污剂(肥皂水或洗衣粉水)浸泡并刷洗后, 流水冲洗 1~2 h, 用 75% 的酒精表面消毒 30~60 s(低于 30 s 消毒不彻底, 高于 60 s 材料易失活), 无菌水冲洗 1~3 次后放入 0.1% 升汞中灭菌 8~10 min 并不停振荡, 无菌水冲洗 5~8 次备用, 这种方法能有效降低污染率。

1.1.3 基本培养基的选择 虎舌红茎段培养所用的基本培养基有 MS、1/2MS、B5 几种。1/2MS 更适合于虎舌红的分化培养, 其次是 MS, 再次是 B5。张月娇认为低浓度的有机盐有利于外植体的生长并节省成本, 因此以 1/2MS 为诱导芽分化的基本培养基^[1], 康美玲^[4]试验结果表明, 培养初期低盐度的基本培养基能使培养物快速启动生长并能减轻褐变, 1/2MS 对诱导芽萌发的效果最佳。罗吉凤和江香梅的试验结果表明 MS 为最佳诱导分化培养基^[2,5]。多数试验表明: 以 MS 为虎舌红的继

作者简介: 曾云英(1976-), 女, 重庆长寿人, 硕士, 讲师, 现主要从事园艺植物方面的研究。

基金项目: 江西省教育厅科技资助项目(GJJ09603)。

收稿日期: 2009-03-25

代增殖培养基能成功获得试管苗。卢其能和杨妙贤^[6-7]试验结果表明, 1/2MS 是诱导芽分化和增殖的最佳基本培养基, 其次为 B5。杜敏华^[3,8]以虎舌红茎尖作为外植体, 用 MS 为基本培养基, 配合 NAA 0.2 mg/L(单位下同)+CPPU 0.4+AgNO₃ 4.0 使愈伤组织的分化率达到了 96%, 增殖率 5.5。

1.1.4 激素种类及其对培养效果的影响 基本培养基只能保证培养物的生存与最低的生理活动, 需要加入适当的植物生长调节物质才能诱导细胞分裂的启动和形态的变化。常用的植物生长调节物质有生长素、细胞分裂素、赤霉素等生长调节物质。一般来说, 生长素/细胞分裂素比值高时有利于生根, 比值低时有利于长芽, 中间比值时有利于愈伤组织的形成。在虎舌红的茎段培养中, 罗吉凤^[5]试验表明, 在添加 6-BA 5+NAA 1 的培养基上 10 d 左右腋芽萌动生长, 增殖系数可达 3~4。卢其能、杨妙贤认为 6-BA 1+NAA 0.01 对芽的分化增殖最为有效, 产生芽的数量和质量最好^[6-7]。江香梅^[2]的试验表明: 6-BA 2+IBA 0.5 能诱导芽分化, 6-BA 3+IBA 1 和 6-BA 1+IBA 0.2 均不能诱导芽分化。张月娇以 BA 0.3+NAA 0.1 的激素浓度配比 20 d 腋芽萌动, 在 6-BA 2.0+KT 1.0+IBA 0.5 中继代培养增殖倍数可达 3~4 倍^[1]。虎舌红植株矮小, 生长极缓慢, 如以茎尖作为外植体, 取材数量很少, 所以少见有关虎舌红茎尖培养的报道。至目前以止, 只有杜敏华等做过研究, 试验通过愈伤组织产生不定芽而再生植株。试验以 MS 作为基本培养基, 结果表明生长素 2, 4-D 和 NAA 对愈伤组织的诱导起着很重要的作用, 一定浓度范围的 2, 4-D 促进虎舌红茎尖脱分化及愈伤组织生长却抑制愈伤组织分

化, 而 0.1 mg/L 的 NAA 则使愈伤组织数量明显减少, 仅为前者的 1/4~1/3 倍, 甚至更少, 但愈伤组织能够迅速分化出大量不定芽及再生植株。确定: 最佳愈伤组织诱导培养基为 MS+2, 4-D 0.7+6-BA 0.2, 而在不定芽诱导方面, 首次使用了 CPPU (N-(2-氯-4-吡啶基)-N-苯基胍), 其在刺激细胞分裂, 诱导芽分化方面比 6-BA 效果好, AgNO₃ 对不定芽的增殖起一定的辅助作用, 并能控制黄化现象。不定芽诱导最佳培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L+CPPU 0.4 mg/L+AgNO₃ 4.0 mg/L, 分化率为 96%, 增殖率为 5.5^[3,8]。

1.2 叶片培养方法

取试管苗上部完全展开的健壮叶片, 沿主脉横向均匀的将叶片切伤 3~5 刀, 以远轴面接触培养基的方式接种, 先在黑暗下培养 2 周左右, 然后转入光照下培养。有关虎舌红叶片培养的报道极少, 杨妙贤、卢其能^[6,7]的试验表明: 适合虎舌红叶片培养的最适基本培养基为 1/2MS, 其次为 B5, 叶片在 MS 培养基中不能生长, 1/2MS+6-BA 1+NAA 0.01 能使切口生长出较多的愈伤组织并能促使腋芽萌动形成芽丛, 其次是 B5+2, 4-D+6-BA 0.5。研究表明, TDZ 具有生长素和细胞分裂素双重作用, 在植物组织培养中比其它的生长素诱导出愈伤组织的效果好, 且诱导不定芽的效率比 BA 高。这在一些植物上已得到了证实, 在木本植物上的效果是最佳的^[9], 但还未见应用在虎舌红上的报道, 可以作一下尝试。另外, 一定浓度范围的乙烯抑制剂 AgNO₃ 在前人的报道中表现出了对叶片不定梢发生的促进作用^[10], 但在虎舌红上的应用还未见报道。虎舌红组织培养所采用的材料及培养基见表 1。

表 1		虎舌红组织培养报道一览				mg/L
材料	愈伤组织诱导培养基	分化培养基	增殖培养基	生根培养基	生根率/%	作者
茎尖	MS+2, 4-D 0.7+6-BA 0.2	MS+NAA 0.2+ CPPU 0.4+AgNO ₃ 4.0	同分化培养基	1/2MS+NAA 0.4+IBA 0.3	93	杜敏华
茎段		1/2MS+BA 0.3+NAA 0.1	MS+6-BA 2.0+KT 1.0+IBA 0.5	1/2MS+IBA 1.0	90	张月娇
茎段		MS+6-BA 5+NAA 1	MS+KT 5	MS+KT 0.2+NAA 1	80	罗吉凤
茎段		MS+6-BA 2+IBA 0.5	MS+6-BA 2+IBA 0.5	MS+IBA 0.5~1.0		江香梅
茎段		1/2MS+6-BA+NAA 0.01	1/2MS+6-BA 1+NAA 0.01	B5+IBA 0.1+NAA 0.02	生根数量少	卢其能

2 虎舌红离体培养的影响因素

2.1 碳源

蔗糖是常用碳源, 蔗糖除起维持渗透压和提供碳源的作用外, 其浓度对离体培养过程中器官的发生也有影响。杜敏华^[3,8]试验发现, 蔗糖对虎舌红再生体系的构建有一定的影响。分化培养和增殖培养中常用的浓度为 3% 左右, 生根培养时所用的浓度要求低一些, 为 2%~2.5%。蔗糖有时能影响丛生芽发生频率。

2.2 外界因素

虎舌红离体培养还受温度、光照及 pH 等因素的影响, 在茎段、芽、茎尖的培养中, 比较适宜的培养温度为

(26±2)℃, pH 5.8, 光照强度及光照时间分别为 1 500~2 000 lx, 10~12 h。

让接种后的材料先进行 1~2 周的暗培养再转入光照条件下, 能有效的抑制褐化并能促进芽的分化^[1,3]。

在虎舌红叶片培养中, 通常采用的是先将叶片接入培养基, 暗处理 2 周左右, 再转入光下培养的方法进行培养, 能有效的促进不定芽的发生。

2.3 离体试管苗诱导生根的条件

目前报道的适宜虎舌红离体培养的生根培养基是 1/2MS 和 MS。1/2MS 不论从生根效果方面还是从成本方面都比 MS 更适合。张月娇^[1]以 1/2MS 为生根的

基本培养基配合 IBA 1.0 能使生根率达到 90%，杜敏华^[3,4]以 1/2MS+NAA 0.4 mg/L+IBA 0.3 mg/L+蔗糖 26 g/L+琼脂 5.0 g/L 作为生根培养基，生根率为 93%。江香梅也认为 1/2MS 比 MS 有利于生根^[2]。杨妙贤^[7]以 MS+IBA 0.5 mg/L 为生根培养基，15 d 后，无根小苗的基部开始长出 4~5 条小根，形成完整植株。卢其能^[6]在试验中用 B5 和 white 作为生根培养基但生根效果不好。

2.4 影响移栽成活的因子

为了提高组培苗移栽成活率，移栽前必须练苗，以增强苗的抗性和适应性，打开生根培养瓶的封口膜，在自然光下练苗 1 周左右，小心取出，洗掉根部附着的培养基，移栽到盛有腐殖土和珍珠岩 3:1 的营养杯或营养盆中，注意遮荫，保温，移栽成活率可达 90%。

3 存在的问题及前景展望

虎舌红是一种珍稀的观赏与药用植物，主要以野生状态在自然界存在，数量不多且繁殖难，如果不加以保护，将难以避免绝种的厄运。从 2 000 年至今，虎舌红的组织培养技术已取得了一定的成就，如初步确定了适宜虎舌红组织培养的外植体和影响外植体组培的主要因素。但组培中还存在以下的问题：培养过程中污染率较高，没有形成一套完整的组织培养技术体系，已有研究的分化率、生根率和移栽成活率都有待进一步提高。

未来的研究应注重以下几点：一是完善外植体的消

毒措施，降低培养过程中的污染率；二是完善组织培养技术体系，尤其在激素种类和浓度方面；三是建立高效稳定的外植体离体再生体系和转化体系，为开展利用转基因技术改良虎舌红品质；如果对虎舌红进行深入研究，形成一套完整的组织培养技术体系，在现代化城市园林方面和医疗保健方面将有很大的应用前景。

参考文献

[1] 张月娇. 虎舌红组织培养的试验研究[J]. 林业科技开发, 2003, 17(S): 10-11.
[2] 江香梅 邓小梅. 虎舌红的组织培养和植株再生[J]. 江西林业科技 2001(6): 3-11.
[3] 杜敏华 李玉英, 田龙, 等. 虎舌红茎尖高频再生体系的建立[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(3): 21-22.
[4] 康美玲. 虎舌红组织培养技术体系研究[D]. 四川大学硕士学位论文, 2003.
[5] 罗吉凤 程治英, 龙春林. 虎舌红的组织培养[J]. 植物生理学通讯 2004, 40(8): 465.
[6] 卢其能. 虎舌红的生物学特性与组织培养研究[J]. 江西林业科技 2002(1): 5-6.
[7] 杨妙贤. 虎舌红野生资源的开发利用[J]. 中国野生植物资源 2004 23(6): 27-32.
[8] 杜敏华 张乃群, 田龙, 等. 正交试验优化虎舌红茎尖离体培养条件[J]. 安徽农业科学 2006 34(19): 4865-4866.
[9] 徐晓峰 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报 2003, 20(2): 227-237.
[10] 周瑞金. AgNO₃ 对枣叶片再生不定梢的促进作用[J]. 河南科技学院学报 2008 36(2): 24-25.

Advances in Study of Research on *Ardisia mamillata* Hance Tissue Culture

ZENG Yun-ying

(College of Civil Engineering and Urban Studies, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332005, China)

Abstract: The review focused on recent advances in tissue culture of *Ardisia mamillata* Hance and methods of culture; shoot culture, shoot-tip culture, leaf cultur, it analyzed the problems raised in the tissue culture. Moreover, work of this research in the future was discussed.

Key words: *Ardisia mamillata* Hance; Tissue culture; Advances

鸡腿菇腐烂病防治措施

腐烂病是由细菌引起的常见病害,危害较重。染病子实体初为褐色,后菌盖变黑腐烂,最终只残留菌柄。高温高湿、通风不良时易诱发此病,夏季反季节栽培时发病率高。无公害防

治:投料前用石灰水、烧碱等对菇棚进行消毒;空气湿度及覆土含水量要稍低;发病初期可用农用链霉素(浓度 100~200 mg/1000 mL)防治;及时拔除病菇,以防传染。