

红龙草组织培养及快繁技术

黄海泉¹, 陈晓华¹, 刘齐元², 黄美娟^{1*}

(1. 西南林学院 园林学院, 云南 昆明 650224; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:以红龙草(*Altemanthera ficoidea* cv. 'Ruliginosa') 未木质化茎段为外植体建立无菌体系, 并对其丛芽增殖及生根诱导进行了研究, 结果表明: 红龙草未木质化茎段较好的灭菌方法为: $\varphi = 75\%$ 酒精 30 s + 1 g/L 升汞 5.5 min; 较好的诱导丛芽增殖的培养基为: MS + KT 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖 20 g/L; 较好的诱导生根培养基为: 1/2MS + NAA 0.5 mg/L。

关键词: 红龙草; 组织培养; 快繁

中图分类号: S543⁺.9; S604⁺.3 **文献标识码:** A

Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Altemanthera ficoidea* cv. 'Ruliginosa'

HUANG Hai - quan¹, CHEN Xiao - hua¹,
LIU Qi - yuan², HUANG Mei - juan¹

(1. College of Landscape Architecture, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China; 2. College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: The annual unligified tender stems of *Altemanthera ficoidea* cv. 'Ruliginosa' were used as explants and inoculated into the primary culture medium, which obtained its aseptic plantlets in vitro. Furthermore, its proliferation and rooting culture were studied further. The results indicated that the optimal sterilization method for unligified tender stems of *Altemanthera ficoidea* cv. 'Ruliginosa' was 75% ethanol 30 s + 1 g/L HgCl 5.5 min among all tested ones; that its optimal proliferation culture medium among all tested culture media was MS + KT 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + sucrose 20 g/L; that its best rooting culture medium among all tested ones was 1/2MS + NAA 0.5 mg/L.

Key words: *Altemanthera ficoidea* cv. 'Ruliginosa'; tissue culture; rapid propagation

红龙草(*Altemanthera ficoidea* cv. 'Ruliginosa') 属苋科莲子草属多年生草本观赏植物, 茎、叶致密, 铜红色, 冬季开花, 花乳白色, 小球形, 似天然干燥花, 酷似千日红; 其生性强健, 适应性强。目前, 由于红龙草生长速度较快, 色彩浑红美观, 是我国南方广泛栽培的草本花卉植物, 在我国各地被用作广场、花台绿化、庭园丛植、列植以及在高楼大厦中美化以强调色彩效果^[1,2]。现红龙草综合加工利用潜力大^[3-5], 目前红龙草在市场上种苗需求量大, 但在目前园艺生产中仍主要采用扦插方式繁殖种苗^[1,6], 已无法满足日益增长的市场需求。利用植物组织培养技术可望在短期内为园林绿化提供大量种苗, 以有效满足市场的需求^[7,8]。

收稿日期: 2007 - 11 - 02 修回日期: 2008 - 01 - 16

基金项目: 云南省自然科学基金(2005C0004M) 和云南省高校园林植物与观赏园艺重点实验室项目

作者简介: 黄海泉(1974 -), 男, 博士, 主要从事园林植物基因工程研究; * 通讯作者: 黄美娟, xmhhq2001@163.

1 材料与方法

1.1 材料

以秋季采摘的红龙草嫩稍为外植体。

1.2 操作过程及方法

剪取长约2 cm的嫩稍,除去多余的叶片,然后放于50 g/L洗涤剂中浸泡10 min,用脱脂棉擦洗干净,再用清水冲洗30 min备用。在超净台上先用 $\varphi = 75\%$ 酒精处理30 s,再用1 g/L升汞分别处理2 ~ 7 min(表1),再用无菌水冲洗4 ~ 5次,并剪除部分上、下茎端,接种于培养基MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L中,每瓶2苗。增殖培养:以MS为基本培养基,研究生长调节剂种类、质量浓度、糖浓度及其组合对红龙草增殖的影响,培养基详见表2 ~ 4。生根培养:将增殖培养中生长基本一致的、健壮的长约3 cm的带顶芽茎段接入生根培养基(表5)中。培养基均用琼脂6.5 g/L,蔗糖30 g/L(糖源作为因素的实验除外),pH5.8。

1.3 培养条件

将接种后材料置于1 500 lx、12 h/d的光照条件下培养,培养温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,观察并记录其生长状况,20 d统计数据并分析。

1.4 评价项目与方法

$$\text{污染率}(\%) = \text{污染瓶数} / \text{接种瓶数} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{成活率}(\%) = \text{成活瓶数} / \text{接种瓶数} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{灭死率}(\%) = \text{灭死瓶数} / \text{接种瓶数} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{增殖系数} = (\text{增殖后瓶数} - \text{增殖前瓶数}) / \text{增殖前瓶数} \quad (4)$$

$$\text{生根率}(\%) = \text{生根苗数} / \text{接种苗数} \times 100 \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理对红龙草外植体的影响

表1 不同处理对红龙草外植体灭菌的影响

Tab.1 Effects of different treatments on sterilization of explants of *Altemanthera ficiode* cv. 'Ruliginosa'

处理	灭菌时间		接种数 /根	污染数 /根	污染率 /%	成活数 /根	成活率 /%	灭死数 /根	灭死率 /%
	75% 酒精/s	1 g/L 升汞/min							
A1	30	2	48	44	91.67	4	8.33	0	0
A2	30	3	48	38	79.17	10	20.83	0	0
A3	30	4	48	30	62.5	18	37.5	0	0
A4	30	4.5	48	16	33.33	32	66.67	0	0
A5	30	5	48	8	16.7	40	83.3	0	0
A6	30	5.5	48	2	4.17	44	91.66	2	4.17
A7	30	6	48	2	4.17	38	79.13	8	16.7
A8	30	7	48	0	0	28	58.33	20	41.67

由表1可以看出,红龙草进瓶污染率随着升汞灭菌时间的增加而降低,其中灭菌2 min的污染率高达91.67%。灭菌4.5 min以上污染率明显下降,5.5 min时污染率较低但已出现灭死现象,灭死率为4.17%;至7 min时污染率为0。从成活率来看,进瓶成活率随灭菌时间增加先上升后降低。灭菌5.5 min时成活率高达91.66%,其后成活率逐渐下降,但灭菌7 min成活率仍比2 min和3 min高很多,但灭死率也已高达41.67%。由上述结果可以看出,灭菌时间长短与灭菌效果关系密切。随着灭菌时间增加,污染率降低。但灭菌时间过长,其灭死率也随着增加。综合污染率、成活率及灭死率可以看出升汞灭菌5.5 min效果较好,成活率最高,而其污染率和灭死率都较低(图1-1)。因此,红龙草未木质化茎段较好的灭菌时间组合为: $\varphi = 75\%$ 酒精30 s + 1 g/L HgCl 5.5 min。

2.2 不同生长调节剂及其组合对红龙草茎段增殖效果的影响

由表2可以看出,在相同质量浓度6-BA条件下,使用NAA的增殖系数比IBA更大;同时发现,无

论使用 IBA 或 NAA, 增殖系数均随着 6-BA 质量浓度的增加而增加, 其中以 E4 增殖系数最大(9.03)。据观察, 在添加 IBA 培养基中苗茎段纤细, 叶片较小, 刚长出不久的叶片就开始黄化或玻璃化, 而且玻璃化现象严重; 而在添加 NAA 培养基中苗生长较粗壮, 叶片较大, 无玻璃化现象。因此, 较好的增殖组合为 E4: MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L。

表 2 不同生长调节剂及其组合对红龙草茎段增殖效果的影响

Tab. 2 Effects of different growth regulators and their combination on proliferation of stems of *Altemanthera ficiode* cv. 'Ruliginosa'

处理	培养基 /mg · L ⁻¹	增殖系数	生长状况
E1	MS + 6-BA 0.5 + IBA 0.01	4.06	生长一般, 有些苗叶尖呈干枯状, 基部较严重玻璃化
E2	MS + 6-BA 1.0 + IBA 0.01	6.46	产生芽数较多, 但苗稍有些玻璃化和黄化
E3	MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.01	6.08	生长较好, 无玻璃化等现象
E4	MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.01	9.03	苗比较粗壮, 无玻璃化等现象, 叶片大而厚

2.3 不同种类细胞分裂素及其质量浓度对红龙草茎段增殖效果的影响

由表 3 可以看出, 相同浓度条件下, 使用 KT 的增殖系数比 6-BA 大。随着 6-BA 和 KT 质量浓度的增加, 增殖系数呈现先增加后降低的变化规律, 且均在质量浓度为 1.0 mg/L 时增殖系数最大。但 KT 和 6-BA 同时使用时增殖效果却很差, 苗发芽少, 叶严重玻璃化; 而且随着浓度的增加, 增殖效果更差, 苗长势更弱。同时发现, 在添加 6-BA 的培养基中苗茎段粗壮度一般, 叶片较小, 叶色部分失绿变黄; 而使用 KT 培养基中苗茎段粗壮, 叶片大而肥厚, 颜色嫩绿, 无玻璃化或黄化现象。因此, 较好的增殖组合为 F6: MS + KT 1.0 mg/L + NAA 0.01 g/L。

表 3 不同种类细胞分裂素及其浓度对红龙草茎段增殖效果的影响

Tab. 3 Effects of different cytokinins and their concentration on proliferation of stems of *Altemanthera ficiode* cv. 'Ruliginosa'

处理	培养基 /mg · L ⁻¹	增殖系数	生长状况
F1	MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.01	6.26	生长较好, 部分黄化, 基部部分玻璃化, 全部生根
F2	MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.01	9.3	产生芽数较多, 但部分苗玻璃化黄化, 全部生根
F3	MS + 6-BA 2.0 + NAA 0.01	5.74	生长一般, 基部玻璃化较严重, 大部分黄化, 部分生根
F4	MS + 6-BA 3.0 + NAA 0.01	4.62	苗长势较弱, 纤细, 严重玻璃化, 部分生根
F5	MS + KT 0.5 + NAA 0.01	9.48	生长较好, 产生芽数较多, 全部生根, 无玻璃化现象。
F6	MS + KT 1.0 + NAA 0.01	9.92	生长良好, 产生芽数很多, 苗粗壮, 全部生根, 无玻化
F7	MS + KT 2.0 + NAA 0.01	9.22	生长较好, 产生芽数较多, 全部生根, 无玻璃化等现象
F8	MS + KT 3.0 + NAA 0.01	7.74	生长较好, 苗较粗壮, 产生芽数较多, 全部生根, 无玻璃化
F9	MS + 6-BA 0.5 + KT 0.5 + NAA 0.01	2.48	生长弱, 新增芽数少, 基部严重玻璃化
F10	MS + 6-BA 1.0 + KT 1.0 + NAA 0.01	1.50	几乎不生长不增殖, 严重玻璃化

2.4 不同生长调节剂种类、浓度及糖浓度对红龙草茎段增殖效果的影响

在上述增殖试验的基础上进行了正交试验。由表 4 可知, 从对红龙草无菌苗增殖效果的极差来看, 其作用大小依次为: 蔗糖、NAA、KT。KT 浓度由 1.0 mg/L 增加到 1.5 mg/L 时, 增殖系数增加幅度较大; 而从 0.5 mg/L 到 1.0 mg/L 时变化不明显, 结合前述单因子试验, KT 2.0 mg/L 时增殖系数反而下降, 说明 KT 的最适范围为 1.0 ~ 1.5 mg/L。KT 浓度过低则诱导率低, 过高则抑制芽的分化。

对于 NAA 而言, 随其浓度增加增殖系数呈现先增加后降低的变化规律, 其中 NAA 0.01 mg/L 时增殖效果最好; 而且发现蔗糖 20 g/L 时增殖系数最大, 从 25 g/L 到 30 g/L 时增殖系数相反均有所下降。因此, 较好的增殖配方为 A₃B₂C₁, 即处理 G8: MS + KT 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖 20 g/L (图 1-2)。

2.5 不同培养基对红龙草带芽茎段的生根诱导效果

经观察发现, 在 H1 中红龙草茎段很少产生愈伤组织, 且完全不生根; 在培养基 H2、H3 及 H4 中, 红

龙草茎段基部约2~4 d后便产生浅绿色愈伤组织,3~5 d后产生白色的细根,培养20 d后植株高可达4~5 cm,根白色、细而纤弱。而接入H5中的茎段约3 d后从基部产生浅绿色愈伤组织,5 d后产生白色细根;在H6中约1 d后从基部产生浅绿色愈伤组织,2 d后产生白色细根;H7、H8第2天就能看到白色的根;培养20 d后植株高可达6~7 cm,根长、粗壮并具有分枝,可长达5 cm。由表5可以看出,无论用MS或1/2MS为基本培养基,生根率均随着NAA浓度的升高而增加;与MS为基本培养基相比,1/2MS为基本培养基更有利于红龙草茎段生根,表现为在相同浓度的NAA条件下其生根率均有所增加,而且根生长及质量也更好。因此,红龙草带芽茎段在1/2MS + NAA 0.5 mg/L培养基中的生根效果最好,生根率达100%(图1-3)。

表4 不同生长调节剂种类、浓度及糖浓度对红龙草茎段增殖效果的影响

Tab.4 Effects of different growth regulators, their concentration and sugar concentration on proliferation of stems of *Altemanthera ficiode* cv. 'Ruliginosa'

处理	KT/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	蔗糖/g · L ⁻¹	增殖系数	长势	粗壮度
G1	0.5(1)	0.005(1)	20(1)	8.62	好	较粗壮
G2	0.5(1)	0.01(2)	25(2)	11.0	很好	很粗壮
G3	0.5(1)	0.015(3)	30(3)	6.6	较好	较粗壮
G4	1.0(2)	0.005(1)	25(2)	8.86	很好	较粗壮
G5	1.0(2)	0.01(2)	30(3)	6.89	较好	较粗壮
G6	1.0(2)	0.015(3)	20(1)	10.07	很好	很粗壮
G7	1.5(3)	0.005(1)	30(3)	9.23	很好	较粗壮
G8	1.5(3)	0.01(2)	20(1)	11.3	很好	最粗壮
G9	1.5(3)	0.015(3)	25(2)	9.05	很好	较粗壮
K1	26.707	25.82	29.58			
K2	26.167	29.59	25.72			
K3	29.987	29.31	22.72			
K1	8.607	8.902	9.997			
K2	8.722	9.863	9.77			
K3	9.86	8.573	7.573			
R	1.253	1.29	2.424			

注:正交试验设计采用L₉(3⁴)^[9]。

表5 不同培养基对红龙草带芽茎段的生根诱导效果

Tab.5 Effects of different culture media on rooting induction of stems of *Altemanthera ficiode* cv. 'Ruliginosa'

处理	培养基/mg · L ⁻¹	接种苗数/根	生根率/%	根数量	根质量
H1	MS	48	0		
H2	MS + NAA0.1	48	37.5	很少	短、纤细
H3	MS + NAA0.2	48	50	少	短、较纤细
H4	MS + NAA0.5	48	87.5	较多	较长、粗壮
H5	1/2MS	48	25	少	较长、较粗壮
H6	1/2MS + NAA0.1	48	75	较多	较长、较粗壮
H7	1/2MS + NAA0.2	48	75	较多	较长、较粗壮
H8	1/2MS + NAA0.5	48	100	很多	很长、很粗壮



图1 红龙草进瓶诱导、增殖及生根培养

Fig.1 Inoculation, proliferation and rooting culture of *Altemanthera ficiode* cv. 'Ruliginosa'

(注:1-1 红龙草进瓶诱导;1-2 红龙草增殖培养;1-3 红龙草生根培养) (下转第256页)

- [6]刘俊,吕波,徐朗莱.植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J].生物化学与生物物理进展,2000,27(5):548-551.
- [7]曹锡清.脂质过氧化对细胞与机体的作用[J].生物化学与生物物理学进展,1986(2):17-14.
- [8]姚明华,徐跃进,李晓丽.茄子耐冷性生理生化指标的研究[J].园艺学报,2001,28(6):527-531.
- [9]易金鑫,陈静华,杨起英.茄子苗期耐低温性鉴定方法初步研究[J].江苏农业科学,1998(5):51-53.
- [10]曾韶西,王以柔,刘鸿先.低温光照下与黄瓜子叶叶绿素降低有关的酶促反应[J].植物生理学报,1991,17(2):177-182.
- [11]周艳虹,喻景权,钱琼秋,等.低温弱光对黄瓜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J].应用生态学报,2003,14(6):921-924.
- [12]石雪晖,陈祖玉,杨会卿,等.低温胁迫对柑桔离体叶片中SOD及其同工酶活性的影响[J].园艺学报,1996,23(4):384-386.
- [13]左宝峰,姚延涛,刘文.自然降温对雪松叶片中SOD活性及MDA含量的影响[J].辽宁林业科技,2005(1):12-14.
- [14]蔡志全,曹坤芳.遮荫下2种热带树苗叶片光合特性和抗氧化酶系统对自然降温的响应[J].林业科学,2004,40(1):47-51.
- [15]巫光宏,詹福建,黄卓烈,等.低温胁迫对马占相思树代谢的影响研究[J].林业科学研究,2001,14(6):633-640.

(上接第238页)

3 结论与讨论

目前国内外有关红龙草组织培养的报道较少。权宏(2004)对红龙草的组织培养及遗传转化进行了相关研究^[2]。权宏等(2005)报道了红龙草叶片的组织培养及其植株再生^[1];而本文以带芽茎段为外植体,经历过程为芽-芽-植株。同时,在增殖培养过程中,发现使用KT的效果要明显好于6-BA,与权宏等(2005)报道的结果有所差异。目前关于采用红龙草茎段进行快繁尚未见相关报道。本文以红龙草茎段为外植体进行了一系列组培快繁研究并获得初步成效,这将为红龙草及该科属其他植物相关研究提供了一定的参考价值。

参考文献:

- [1]权宏,施和平.红龙草叶片的组织培养及其植株再生[J].园艺学报,2005,32(4):735-737.
- [2]权宏.红龙草的组织培养及发根农杆菌对红龙草的遗传转化研究[D].广州:华南师范大学,2004.
- [3]刘月秀.几种可开发利用的苋科—野菜资源[J].资源节约和综合利用,1993,3(1):46-47.
- [4]柏玉萍.苋科花卉与园林绿化[J].辽宁师专学报,1993,1(3):105-108.
- [5]熊丽,吴丽芳.美国籽粒苋的繁殖与大规模生产[M].北京:化学工业出版社,2003:47-56.
- [6]周云龙.广州市流溪河森林公园植物区系的初步研究[J].热带亚热带植物学报,1994(2):13-15.
- [7]谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,2001.
- [8]顾淑荣.园艺植物组织培养和应用[M].北京:北京科学技术出版社,1989.
- [9]中国科学院数学研究所数理统计组.正交试验法[M].北京:人民教育出版社,1975.