

罗汉果组织培养与快繁研究进展

黄春梅^{1,2}, 吴金寿^{2,3}, 赖钟雄^{2,3}

(1. 福建农林大学生命科学学院; 2. 福建农林大学园艺学院; 3. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 本文介绍了罗汉果胚培养、茎尖脱毒培养、茎段培养、叶片培养及其种苗快繁研究进展, 简述了组培苗栽培存在的问题及一些解决措施。

关键词: 罗汉果; 组织培养; 快繁

中图分类号: S567.23*9

文献标识码: A

文章编号: 1673-0925(2006)04-0298-06

Progress in the tissue culture and rapid propagation of *Siraifia grosvenorii*

HUANG Chun-mei^{1,2}, WU Jin-shou^{2,3}, LAI Zhong-xiong^{2,3}

(1. College of Life Science; 2. College of Horticulture; 3. Institute of Bio-engineering of Horticultural Plants, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The current situation of the researches on *Siraifia grosvenorii* embryo culture, shoot tip tissue culture of virus-free, stem culture, leaf culture, and rapid propagation of tissue-cultured seeding were introduced. The problems and some solutions of tissue-cultured seeding cultivation of *Siraifia grosvenorii* were also reviewed.

Key words: *Siraifia grosvenorii*; tissue culture; rapid propagation

罗汉果(*Siraifia grosvenorii* Swingle C. Jeffereg)属葫芦科罗汉果属,是我国特有的药用植物和传统的出口创汇经济作物。罗汉果原产于我国的广西、广东、湖南、江西和贵州等省区的亚热带山区^[1]。罗汉果种苗主要采用块茎和压蔓进行无性繁殖,繁殖系数低。长期采用无性繁殖导致种质退化和病毒积累,产量和品质下降,严重制约了罗汉果产业的发展。利用组织培养进行种苗繁殖是罗汉果良种快繁和控制罗汉果病毒病蔓延的有效途径。20世纪80年代以来,研究者^[2-10]以罗汉果胚轴、茎尖、叶片和茎段等材料为外植体,进行了组织培养研究,现在已能从罗汉果的胚轴、茎尖、茎段、叶片组织培养获得再生植株。林治良等^[11]用热处理和微茎尖进行了脱除花叶病毒培育无病毒种苗的研究,获得罗汉果无花叶病毒苗。近10年来,研究者^[12-15]陆续开展了罗汉果脱毒和快繁研究,采用组织培养方法培育无病毒苗,并取得重大进展。近几年,在罗汉果主产区已进行了工厂化育苗和组培苗产业化生产,日见成效和优势,促进了各项研究更为深入地展开。本文就罗汉果离体培养各方面的研究进展作综合阐述,旨在为罗汉果离体培养繁殖应用研究提供参考。

1 外植体诱导分化研究

以罗汉果种胚、茎尖、茎段和叶片等外植体进行离体培养,通过不同途径建立再生植株体系。种胚培养诱导胚轴愈伤组织,形成不定芽和胚状体;茎尖培养诱导顶芽或侧芽萌发;茎段培养诱导腋芽萌发;叶片培养诱导瘤状愈伤组织,形成不定芽。

1.1 种胚培养研究

林荣等^[2]以罗汉果胚轴、子叶为外植体,进行了初步研究。黄春梅等^[9]探讨了不同培养基对胚轴不定芽再生的影响,并进行了细胞学观察。

1.1.1 不同培养基对胚轴不定芽诱导的影响 林荣等^[2]采用 $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} BA + 0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1} IAA$ 培

收稿日期: 2006-09-25

基金项目: 福建省发改委“6·18”对接项目。

作者简介: 黄春梅(1960-),女,实验师。研究方向: 植物生物技术与结构植物学。

培养基,胚轴、子叶都能诱导出愈伤组织,但生成的愈伤组织进一步分化成芽的能力各异;上胚轴和子叶分化芽的频率较低,而下胚轴形成芽的频率较高,且形成丛生芽。黄春梅等^[9]比较了MS附加 $0-4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA、 $0-1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA和改良MS附加 $1-4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA等6种培养基等组合对罗汉果胚轴诱导不定芽的影响。结果表明,BA和IAA的比值大,胚轴不定芽分化率较高;且改良MS基本培养基中不定芽诱导率比MS中的更高,不定芽分化数平均每瓶高达7.6个;在BA与IAA低比值或低含量甚至无生长调节剂的培养基中,罗汉果种子培养只能单株成苗,而其胚轴部位未能分化不定芽。

1.1.2 器官发生的细胞学观察 胚轴培养细胞学观察表明,胚轴在改良MS附加 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA培养基中培养时,其表皮细胞恢复分裂能力,进行脱分化,形成瘤状愈伤组织,瘤状愈伤组织表层细胞再分化,形成不定芽原基,不定芽原基进一步发育,形成不定芽。随着不定芽的发生也间接发生体细胞胚,即愈伤组织表皮细胞再分化,经过不等分裂,形成一个柄细胞和一个胚性细胞,胚性细胞经过细胞分裂,形成体细胞胚胎。有些体细胞胚表面又发生次级体胚^[9]。

1.2 茎尖离体培养研究

林荣等^[2]进行了茎尖组织培养的初步研究;林治良等^[11]和杭玲等^[12]以感病株苗通过热处理和微茎尖培养,进行脱除花叶病毒培育无病毒苗的研究。

1.2.1 微茎尖培养脱毒 林治良等^[11]采用基本培养基MS附加 $0.5-1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA和 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ad进行微茎尖培养。结果表明:适宜的茎尖大小为 $0.8-1.0\text{ mm}$,其脱毒率为100%,成活率高,成苗时间短;茎尖越小,成活率越低,培养时间越长,但是脱毒效果越好; 1.0 mm 以上的茎尖成活率达100%,但脱毒效果明显下降。杭玲等^[12]将 1.0 mm 茎尖分生组织,培养在MS+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+0.35%琼脂+3%蔗糖(pH 5.8)培养基中,培养成活率达100%,脱毒率为100%,优化了培养条件,获得了同样的结果。

1.2.2 热处理结合茎尖培养脱毒 用感病株苗作外植体培养的苗经 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1周后,切取 2 mm 的茎尖进行培养,效果最好,不仅成活率高,而且脱毒率达100%;同温度处理超过1周,成活率降低,成苗时间延长,脱毒率达100%; $>2\text{ mm}$ 的茎尖经 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1周后,成活率高,成苗时间缩短,但是脱毒率降低;提高处理温度,成活苗脱毒率达100%,但组织损伤严重,成苗周期延长^[11]。

1.2.3 脱病毒苗检测 目前,用于罗汉果花叶病毒的检测方法有植物形态比较法、指示植物法、电镜观察法和酶联免疫吸附(ELISA)法。(1)植物形态比较法:微茎尖培养获得的小苗与病苗的形态进行比较,有极显著的区别^[11]。(2)指示植物法:以黄瓜作为指示植物,脱病毒处理的试管苗经2个月隔离土培后,将未出现染病症状植株的叶片和已出现染病症状植株的叶片用涂擦法接种于指示植物黄瓜上。3周后,观察无病毒叶接种的黄瓜植株有无花叶病毒症状,从而鉴定试管苗是否脱毒^[11]。(3)电镜观察法:采用浸出法,经负染后,在电子显微镜下观察,可见罗汉果花叶病毒为线状病毒粒子,大小为 $12\text{ nm}\times(800-811)\text{ nm}$ ^[16]。(4)ELISA法:用西葫芦作为罗汉果花叶病毒(WMV-2-Luo)的繁殖寄主,通过差速离心和PEG二次沉淀法得到WMV-2-Luo的提纯液。用该病毒提纯免疫日本大白兔,获得WMV-2-Luo兔抗血清。经ELISA测定,其效价为1/5120。以 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(含1.5% NaDIECA, pH 7.8)作为样品缓冲液,用间接ELISA法检测的灵敏度为1/3200。这种间接ELISA法灵敏度高、特异性强、快速简便,适合大批样品检测,为罗汉果脱毒组培苗提供了可靠的检测手段^[17]。

1.3 茎段离体培养研究

林荣等^[4]以长滩果、拉江果和青皮果带腋芽茎段为材料,诱导茎段形成幼芽,诱导生根,获得完整植株,并探讨了细胞分裂素、不同激素组合、糖分含量、琼脂质量对器官形成的影响。周琦丽等^[7]以长滩果带节茎段为材料,进行了愈伤组织和腋生枝形成研究。苏明申等^[8]以青皮果秋季雌株茎段、叶片和叶柄为材料,进行了诱导、分化的比较研究。

1.3.1 植物激素对器官形成的影响 MS基本培养基附加细胞分裂素BA,可促进罗汉果茎段芽的形成和增殖;而KT则抑制芽的增殖; $0.5-2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA配合使用,对茎段形成芽具有增效作用^[4]。

1.3.2 糖分含量对器官形成的影响 培养基的渗透压对于诱导细胞分裂、增殖有重要作用。糖分含量对器官形成的影响可能与改变培养基的渗透压有关。罗汉果带腋芽茎段培养,诱导芽和梢,在适宜的培养基中糖分含量以2%为宜^[4]。

1.3.3 器官发生途径 罗汉果茎段比较容易诱导愈伤组织,但较难形成芽,不仅分化频率低,而且形成的芽生长慢。从无病株苗上剪取带腋芽茎段在适宜的培养条件下,形成一至数条丛生的腋生枝。从不同性别的植株上采取的带腋芽茎段进行组织培养,没有发生变异现象,可作为良种快速繁殖的有效途径^[4,6]。

1.4 叶片离体培养研究

林荣等^[3,6]对叶片组织培养进行了较系统的研究。桂耀林等^[5]对叶片组织培养中的器官发生进行了研究。苏明申等^[8]探讨了叶片不同部位和老嫩程度与诱导愈伤组织能力的关系。黄春梅等^[10]探讨了不同基本培养基、不同培养方式、不同植物生长调节剂对不定芽分化的影响,并对不定芽的形成进行了组织细胞学观察。

1.4.1 培养基对叶片培养再生植株的影响 改良 MS 与 MS 比较试验结果表明,基本培养基以改良 MS 较为适合,在附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 的固体培养基培养中,叶片切口形成愈伤组织,平均每块愈伤组织再生芽高达 5.6 个。改良 MS 较 MS 增加了一些无机盐,说明愈伤组织的发生和芽的分化与基本营养元素有密切相关^[10]。

1.4.2 细胞分裂素与生长素不同组合对芽形成的影响 BA 与 KT 均能诱导叶片产生愈伤组织,但在愈伤组织分化生成芽的过程中 BA 是必需的。MS 附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 效果最好,形成芽的频率达到 92%,生成丛生芽的数目较多^[3]。

1.4.3 接种方式对叶片不定芽分化的影响 叶片在培养基上的接种方式对不定芽的分化有明显的影响。叶片背面接触培养基培养,其分化率仅有 40.0%;而叶片正面接触培养基分化率达 90.3%,这可能与叶片结构有关。反置时,维管束韧皮部朝上,木质部朝下,在分生细胞团形成后有利于不定芽的分化;正置时,维管束韧皮部朝下,木质部朝上,而韧皮部朝下可能不利于不定芽的分化,还有待进一步探讨^[10]。

1.4.4 叶的部位与老嫩程度对诱导愈伤组织的影响 叶柄诱导的愈伤组织率较高,叶片诱导愈伤组织的能力较弱,其中幼叶较老叶诱导愈伤组织的能力强,老叶很难诱导愈伤组织^[8]。叶片培养以种苗叶龄 15–20 d 培养为宜^[5],以成熟平展叶培养为宜^[10]。

1.4.5 叶片诱导分化不定芽的组织学观察 (1)叶片切块培养。将叶片切成小块,接种在 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 培养基上,培养 7 d 后,切口附近表皮细胞下的叶肉细胞活跃分裂并形成明显的分生组织细胞团,细胞团进一步形成纵向伸长的叶状体组织。在结构上,叶状体外层细胞排列紧密组成表皮状,叶状体内则常有维管束组织贯穿其中。如果在外植体切口端附近正好有维管束存在时,则在维管束周围将形成分化区而产生明显的愈伤组织。培养 21 d 后,沿叶状体边缘或基部的表层部分又形成零星分布的分生中心,进而从这些细胞团再分化形成芽^[5]。(2)整片叶培养。将完整叶接种于改良 MS + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 组合培养基中培养,培养 10 d 后,位于叶缘处小脉末梢的管胞周围的薄壁细胞脱分化,进行分裂,形成分生组织细胞团。培养 10–20 d 后,分生组织细胞团分化一些管状细胞,这些管状细胞进一步形成维管组织,邻近的维管组织相互连接。分生组织在形成维管组织的同时,产生分生组织结节。培养 20–30 d 后,分生组织形成愈伤组织,在愈伤组织近表层产生新的细胞团。愈伤化的叶缘组织表面形成瘤状愈伤组织,靠近表层形成分生组织细胞团,形成不定芽原基。培养 30–40 d,不定芽原基分化不定芽^[10]。

2 离体快速繁殖研究

罗汉果器官离体培养再生植株体系的完善建立,促进了罗汉果种苗工厂化生产的顺利进行,并逐渐应用于广大生产产区^[4,6,12–15],取得了明显的效果。

2.1 建立无菌培养系

取健壮、无病虫害的罗汉果嫩梢,用自来水冲洗干净,再用 70% 乙醇漂洗 5 s,然后在 0.1% 升汞中浸泡 8–10 min,再用无菌水冲洗 3–5 次,沥干水分。茎尖、茎段均切成 0.5 cm 带腋芽小段,接种于 $\text{MS} + 0.5$

-1.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IAA + 0.6% 琼脂 + 3% 白糖培养基中, 15 d 诱导出芽苗^[13]。

2.2 繁殖体增殖

被诱导出的罗汉果腋芽在继代培养中能否被重新诱导生长和增殖, 与培养基中生长素种类和含量有很大关系。蔡时可等^[14]将罗汉果芽苗切成带一个节的茎段, 分别接种在不同激素含量培养基中, 结果表明: 在继代培养中, 添加 0.2 mg · L⁻¹ IBA 有利于腋芽的重新诱导和生长; 添加 0.2 mg · L⁻¹ NAA 则不能重新诱导腋芽产生和生长, 却有利于愈伤组织形成。生产实际调查表明, 利用诱导腋芽增殖方式生产出的罗汉果组培苗植株结果率为 100%。单株结果比扦插苗增加 50% 左右, 因此, 诱导腋芽增殖方法更适合应用于罗汉果种苗的快繁生产。

黄燕芬等^[13]将 6-8 cm 高、带多个腋芽的罗汉果芽苗切割成长 0.5 cm、带一个腋芽的小段, 转移至不同激素含量的增殖培养基中, 每 20 天继代 1 次。结果表明, 于 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IAA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 0.6% 琼脂 + 3% 蔗糖增殖培养基培养, 平均增殖倍数最大, 达 8.5。且在此激素水平上连续培养多代, 其分化增殖能力比较恒定。

付长亮等^[15]筛选适宜的罗汉果脱毒苗茎段增殖培养基, 研究培养温度与光照对茎段增殖培养的影响。采用正交试验设计和完全随机试验设计筛选脱毒苗茎段的增殖培养基。通过对正交试验结果的极差分析及方差分析表明, 在 BA、NAA、IBA 和蔗糖 4 个因子中, 对茎段增殖系数影响最大的是 BA, 其次是蔗糖和 NAA, IBA 的影响最小。新复极差检验结果表明, 当前研究得到的罗汉果离体茎段的最佳增殖培养基为 MS + 0.5 mg · L⁻¹ BA + 0.01 mg · L⁻¹ NAA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 40 g · L⁻¹ 蔗糖, 茎段在此培养基上培养 30 d 后增殖系数为 13.13。不同含量 BA 和蔗糖对茎段培养的研究结果表明, 1.0 mg · L⁻¹ BA 处理的增殖系数最大。考虑到保持试管苗的遗传稳定性, BA 含量以 0.5 mg · L⁻¹ 为宜。增殖培养基中的蔗糖适宜含量为 4.0%。茎段培养适宜条件为: 培养温度 25 ℃, 培养光强 1000-3000 lx。

2.3 芽苗生根

罗汉果继代芽苗长到 5 cm 时, 转入 MS + 0.1 mg · L⁻¹ NAA + 0.6% 琼脂 + 3% 白糖的培养基中, 培养 10 d, 基部长出愈伤组织, 继续培养 5 d 陆续长根^[13]。将 3-5 cm 高的腋芽接种在 MS + 0.2 g · L⁻¹ IBA 生根培养基中, 培养 10 d 后, 开始诱导出根系^[14]。将单芽茎段接种在 1/2MS + 0.2 mg · L⁻¹ NAA + 0.5 mg · L⁻¹ IBA + 0.55% 琼脂粉 + 2% 白糖组合培养基(pH 5.8)培养, 先促根生长再长芽成苗, 极大地提高育苗效率^[9]。

2.4 试管苗移栽驯化

罗汉果芽苗生根后, 再继续培养 20 d, 揭膜炼苗, 然后移栽到蛭石: 珍珠岩: 熟土 = 2: 1: 1 的基质中假植。温度保持在 25-30 ℃, 保持适宜湿度, 移植 30 d 统计, 成活率可达 90% 以上^[13]。诱导出根的小苗经过 20 d 的培养和散射光炼苗后, 长成健壮小苗。清洗消毒后, 种植在装有 50% 泥土 + 30% 椰糠 + 20% 珍珠岩的营养杯中, 放置在 50% 透光率的大棚内(温度 25-32 ℃, 湿度 95%)培养, 移植 30 d 后调查, 小苗成活率达 90% 以上^[14]。用多菌灵消毒过的泥炭土移植瓶苗, 在温度 25-30 ℃、湿度约 90%、日照时数 6 h 的条件下, 小苗成活率也达到 90% 以上。

2.5 组培快繁产业化生产

近 10 年来, 随着罗汉果组织培养研究的深入, 罗汉果脱毒培养和病毒检测技术以及脱毒苗快速繁殖技术研究取得了重要进展。自 2001 年以来, 在罗汉果主产区已进行了工厂化生产组培苗, 并应用于生产栽培, 改变了罗汉果产量低的历史^[18]。罗汉果脱毒苗具有种苗不带病毒、繁殖系数高、根系发达、生长旺盛、抗性较强、当年挂果、结果多和产量高等优势^[19-20], 但在栽培中也出现一些问题。

3 组培苗生产中存在的问题及解决措施

3.1 组培苗生产存在的主要问题

目前罗汉果组培苗生产存在的主要问题是: 易感染花叶病毒病, 种植成活率低, 结果迟、不结果或结果小, 种薯腐烂严重, 遗传性状不稳定, 栽培技术不完善等^[18-20]。

3.1.1 感染花叶病毒病 据调查, 罗汉果组培苗病毒病株率平均为 13.9%, 第 2 年留种薯种植的病株率

超过 93.0%。发病原因^[18]是:(1)继代增殖前没有经过严格的病毒检测致使种苗带毒;(2)种苗出圃时未经检疫或育苗过程中昆虫传播致使罗汉果组培苗带病毒;(3)种植过程中人为(抹芽、授粉等)传染病毒;(4)果园周围种植花叶病毒寄主植物,昆虫与人为传播病毒;(5)主栽品种(青皮果)容易感染病毒。

3.1.2 种植成活率低 据调查,罗汉果组培苗种植成活率一般为 70% - 80%,有的仅为 50% 左右。造成罗汉果组培苗死亡的主要原因是:(1)种苗质量差。苗弱、根系少,根部带成团愈伤组织,有的苗玻璃化,炼苗不够或尚未炼苗^[18]。(2)生长环境不适应。幼苗出圃、定植山地时,遇春季低温阴雨,营养状况和大气温度与出圃前差距很大,弱小幼苗难以适应环境而死亡^[20]。(3)种植管理不当。施肥浓度过高、施肥过早或害虫为害^[18]。

3.1.3 结果迟、结果小或不结果 主要原因是:(1)组培苗培育过程中使用激素不当及继代次数高^[18];(2)生长前期缓慢,长势差,上棚晚,导致结果时间延迟,果实生长时间不足,后期结的果由于天气变差,生长受影响,使得整个果园的小果数量比例增多^[18,20];(3)施用过量氮肥,缺少磷钾肥,没有进行疏花疏果等^[18]。

3.1.4 种薯腐烂严重 据调查,罗汉果组培苗种植后第 2 年块茎出现腐烂现象,腐烂率达 50% 以上^[18,20]。罗汉果定植后,前期生长缓慢,中后期生长十分旺盛,当年形成种薯过程的时间短,积累物质少,水分多,种薯表皮薄、嫩,冬季割蔓后,引起水分蒸腾,形成伤流,病菌易侵染等,较容易造成种薯腐烂^[18]。

3.1.5 遗传性状不稳定 主要原因是:外植体选择不当、继代次数太多或使用激素不当导致组培苗遗传性发生变异,没有用同品种花粉授粉等。

3.1.6 栽培技术不完善 罗汉果组培苗是近几年才在生产中逐步推广应用的,因其生物学特性与传统种薯苗有显著差异,生长发育规律不十分清楚,栽培技术还不完善^[21]。

3.2 技术措施

组培苗栽培中存在的问题,归结起来主要是组培苗的质量不过关和栽培技术没跟上。解决这些问题,主要从提高组培苗的质量和完善栽培技术 2 个方面采取措施。

3.2.1 组培苗繁殖生产技术措施 (1)选择早熟优良品种。应尽量选择早熟品种及抗逆性和适应性强、高产、稳产、优质的优良品种^[21]。(2)选择优良单株。从健壮的无病毒植株上剪取嫩梢,以茎尖或茎段作为外植体,诱导顶芽和腋芽萌发,采取茎尖结合热处理技术培育脱毒苗^[11-12]。(3)限制继代次数。以茎尖和带腋芽茎段诱导分化成苗,并进行继代培养,一般当年取材培养成苗,继代 10 次左右,结合 PCR 遗传图谱的定期检查,确定无变异株系,方可增殖以保持遗传稳定性,对生理和形态异常苗要及时剔除^[22]。(4)控制生长调节剂的使用。在初代培养、继代培养和生根培养基中,采用适当的生长调节剂和较低的含量,减少或不使用易引起诱变的物质。(5)培育壮苗。在生根培养中,采用健壮芽苗诱导根系或将高芽苗切成多个单芽茎段进行促根培育,先培养茂密根系,后抽芽成苗^[9]。在组培苗的移栽驯化阶段,加强光照和水肥管理,炼苗要足够。(6)严格病毒检测。采用 ELISA^[17]和指示植物法^[11]相结合,严格检测病毒。病毒检测从母本抓起,并在诱导分化的植株无病毒携带症状时方可大量限代繁殖,种苗出圃前再随机检测,确保出厂组培苗无病毒。(7)无土栽培无病毒瓶苗。培育无病毒块茎,以块茎(种薯)作为种苗^[23-25],可以克服瓶苗种植因技术原因导致成活率低^[18]的现象。可以建立种苗生产中心或基地来培育种苗,为果农提供优质种苗(种薯)。

3.2.2 组培苗栽培技术措施 (1)早定植。气温在 15℃ 以上即可大田定植^[19],早期要保温。罗汉果组培苗早定植,能早上棚,提早开花和提高授粉座果率,达到早实丰产的目的^[26]。(2)前期精细管理。定植前施足基肥(腐熟农家肥、氮磷钾复合肥、钙肥),组培苗早定植后,要保持根部湿润,适量追肥,多施氮肥,促进小苗生长^[18-21]。上棚后,及时追施腐熟农家肥、过磷酸钙、硫酸钾、硅钙肥,不施氮肥,防止跑苗^[18-21]。(3)及时抹芽摘心。幼苗在生长早期注意选择 1 个主芽,将其培养为主蔓并及时抹去其他侧芽。留一根主蔓上棚,主蔓上棚后,长到 8 - 10 叶时摘心,通过对主蔓摘心,控制植株徒长,促进侧蔓分生。每一级侧蔓长 8 - 10 叶时摘心,形成三级侧蔓,每株留结果蔓 16 根左右^[19,21,26-27]。(4)疏花疏果。适时适量疏花疏果,保持树势,提高果品品质和产量^[18]。(5)秋冬季管理。在能保留薯块的地段,秋季进行松土晒薯,消毒薯块,冬季施好冬肥,适时割苗壅茏。保护种薯安全过冬,保证第 2 年种薯顺利出苗^[18-19]。

(6)防治病害。主要采取铲除花叶病毒、根结线虫病、胞叶病毒、芽枯病、白粉病等病害毒源,消灭传播病毒介体等措施。虫害主要防治红蜘蛛、果实蝇、蜡蛾、黄守瓜、蟋蟀、蜗牛等^[18-21]。

参考文献:

- [1] 张碧玉,周良才.罗汉果[M].福州:福建科学技术出版社,1987:3.
- [2] 林荣,王润珍.罗汉果组织培养获得完整植株[J].广西植物,1980(1):11.
- [3] 林荣,王秀琴.罗汉果叶组织培养的研究[J].广西植物,1981,1(1):18-24.
- [4] 林荣,王秀琴,王润珍,等.罗汉果茎段离体培养研究[J].广西植物,1985,5(3):273-277.
- [5] 桂耀林,顾淑荣,徐廷玉,等.罗汉果叶组织培养中的器官发生[J].植物学报,1984,26(2):120-125.
- [6] 林荣,王秀琴,王润珍,等.罗汉果组织培养育苗及栽培技术[M]//罗士韦,许智宏.经济植物组织培养.北京:科学出版社,1988:180-185.
- [7] 周琦丽,林荣.罗汉果组织培养中的愈伤组织和腋生枝的形成研究[J].广西植物,1989,9(2):103.
- [8] 苏明申,林顺权,陈振光,等.罗汉果的组织培养[J].中国南方果树,2002,31(3):43.
- [9] 黄春梅,吴金寿,曾黎辉,等.罗汉果胚轴培养再生植株及其细胞学观察[J].福建农林大学学报:自然科学版,2005,34(4):454-457.
- [10] 黄春梅,曾黎辉,吴金寿,等.罗汉果叶片培养及其不定芽形成的细胞学观察[J].吉林农业大学学报,2005,27(6):639-642.
- [11] 林治良,陈振光.罗汉果无花叶病苗的培育[J].福建农业大学学报,1995,24(2):162-166.
- [12] 杭玲,陈丽娟,陈少珍,等.罗汉果茎尖脱毒快繁技术[J].西南农业学报,1999,12(3):125-127.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 陈振光,林治良.罗汉果花叶病病原的电镜观察[J].福建农业大学学报,1995,24(2):247.
- [17] 秦碧霞,蔡健和,刘志明,等.罗汉果花叶病毒(WMV-2-Luo)抗血清制备及ELISA检测技术研究[J].西南农业学报,2001,14(4):14-16.
- [18] 林纬,黎起秦,彭好文,等.罗汉果组培苗种植存在问题及解决措施[J].广西农业科学,2003(4):74-75.
- [19] 李土生.罗汉果组培苗种植技术[J].农业科技通讯,2004(9):33.
- [20] 韦芝霖,蒋纪森.永福县罗汉果组培苗生产应用现状及发展对策[J].广西园艺,2003(3):14-15.
- [21] 白隆华,蒲瑞翎.罗汉果组培苗栽培技术特点及存在的问题[J].中国医学生物技术应用杂志,2004(1):63-66.
- [22] 付长亮,马小军,白隆华,等.罗汉果组织培养研究进展[J].中国中药杂志,2005,30(5):325-328.
- [23] 黄春梅,吴金寿,赖钟雄,等.无土培育罗汉果种薯初探[J].武夷科学,2005,21:52-55.
- [24] 吴金寿,刘月学,赖钟雄,等.应用生物技术发展罗汉果产业化的探讨[J].厦门大学学报:自然科学版,2001,40(增刊2):220-224.
- [25] 吴金寿,曾黎辉,黄春梅,等.罗汉果生产技术研究思路与发展对策[J].福建果树,2005,132(1):42-43.
- [26] 李锋,蒋汉明,江新能,等.罗汉果组培苗的栽培研究[J].广西植物,1990,10(4):359-363.
- [27] 周良才.罗汉果栽培技术[J].广西植物,1983,3(2):117-120.