维普资讯 http://www.cqvip.com

4种观赏水草的组织培养试验

王丽卿 季高华 周胜耀 李 燕
(上海水产大学生命科学与技术学院,上海市 200090)

摘 要 对4种观赏水草进行组织培养的试验结果表明:(1)迷你宝塔(*Limnophila glabra*)以茎尖作外植体,芽诱导采用MS + 6-BA 1 mg/L(单位下同) + NAA 0.1的培养基,根诱导采用1/2 MS + IBA 0.1 + BA 0.1的培养基,继代培养采用MS + BA 0.5 + NAA 0.01的培养基,可大批量快速培育出带有根系的完整植株。(2)小对叶(*Bacopa rotundifolia*)、红柳(*Ammannia gracilis*)及大红叶(*Ludwigia perennis*)以茎尖作外植体,芽诱导采用MS + BA 0.5 + NAA 0.01,根诱导采用添加IBA 0.1的1/2 MS,继代培养用MS + BA 0.5 + NAA 0.1,在温度25℃、光照时间10 h/d、光照强度1000 lx的培育条件下,均能培育出完整植株。

关键词 观赏水草 组织培养 迷你宝塔 红柳 小对叶 大红叶

20世纪90年代,观赏鱼广受宠爱;最近几年,观赏水草作为居室、宾馆、写字楼的一道亮丽布景,其家庭人工栽植在城市中悄然兴起,市场需求量呈不断增长之势。目前,我国观赏水草的种苗主要从东南亚及欧洲各国进口。实现观赏水草种苗国产化的关键是解决观赏水草的快速繁殖技术。植物组织培养是从20世纪30年代初期发展起来的一项生物技术,自1960年Morel用兰花茎尖离体培养获得脱病毒植株后,对观赏植物、果树和园艺植物、农林植物等的试管繁殖和脱病毒技术的研究及应用取得了很大的进展[1]。国内有关观赏水草大青叶[2]、皇冠草[3,4]、宽叶血心兰[5]、绿椒[6]、香蕉草[7]、金椒草[8]、红玫瑰[9]、泽泻[10]、小水榕[11]、大宝塔草[12]等的组织培养相继见诸报道。笔者运用植物的组织培养技术对迷你宝塔等4种观赏水草进行了快速繁殖试验,主要探索了宝塔草的最佳组培方案和红柳、小对叶及大红叶的成功组培配方。

1 材料和方法

1.1 材料来源

迷你宝塔(*Limophila glabra*)、红柳(*Ammannia gracilis*)、小对叶(*Bacopa monnieri*)、大红叶(*Ludwigia perennis*)的完整植株购自上海市江浦路花鸟市场,回实验室后均栽培于水温为20~24 ℃、备有循环过滤装置的水族箱内。

1.2 实验方法

1.2.1 宝塔草

1.2.1.1 灭菌 取1 cm长的茎尖作为组织培养材料,分别用(1)2 %的次氯酸钠,10 min;(2)0.1 %的氯化汞,3 min、5 min、7 min;(3)1 %的溴

收稿日期:2005-12-26;修回日期:2006-01-09
作者简介:王丽卿(1970-),女,副教授,主要从事水生生物生态学的研究。
资助项目:国家重点学科水产养殖科研基金项目(03-39)及上海市重点学科建设项目(Y1101)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

水,2 min,进行灭菌,然后用无菌水冲洗5遍,每种方案在10支试管中进行重复试验,以探索外植体的最佳灭菌方案。

1.2.1.2 芽诱导　把已灭菌的茎尖切割成长度为4~6 mm的小段,保持极性,接种到芽诱导培养基上。置于25 ℃恒温光照培养箱中进行培养,筛选最佳芽诱导培养基。光照周期为L:D = 10:14,光强度1000 lx。芽诱导培养基设计了以下几种:

(1)MS + BA 0.5 mg/L(单位下同) + NAA 0.05;

(2)MS + BA 1.0 + NAA 0.05;

(3)MS + BA 2.0 + NAA 0.05;

(4)MS + BA 0.5 + NAA 0.1;

(5)MS + BA 1.0 + NAA 0.1;

(6)MS + BA 2.0 + NAA 0.1;

(7)MS + BA 0.5 + NAA 0.2;

(8)MS + BA 1.0 + NAA 0.2;

(9)MS + BA 2.0 + NAA 0.2;

1.2.1.3 继代培养　分离出诱导产生的不定芽,将其接种在BA 0.5 + NAA 0.01 + MS的培养基上进行继代培养。培养条件同芽诱导。

1.2.1.4 根诱导　将嫩茎转接到生根培养基(BA 0.1 + IBA 0.1 + 1/2 MS的培养基),培养条件同芽诱导。

1.2.1.5 移栽　用两种方法移栽带根系的植株:(1)放入锥形瓶中,加水培养3 d后,冲净所附琼脂,将植株移栽到水族箱中。(2)冲掉琼脂后直接放入水族箱中培养。

水族箱培养条件:温度25 ℃,光照1000 lx,基质为直径1~2 mm的砂粒混上细沙,每隔2周追施少量液体肥料。

1.2.2 红柳、小对叶、大红叶

这3种水草都以茎尖作外植体,用加有0.5%吐温80的0.1%氯化汞溶液消毒5 min,然后将经灭菌的茎尖切割成5~6 mm长的小段,保持极性,接种到芽诱导培养基上进行培养。

所用培养基为:

(1)芽诱导—— BA 0.5 + NAA 0.01 + MS的培养基;

(2)继代培养—— BA 0.5 + NAA 0.1 + MS的培养基。

(3)根诱导—— IBA 0.1 + 1/2MS的培养基;

所有培养基加蔗糖30 g/L、琼脂6 g/L;培养基的pH为5.6~6.0。

2 结果和讨论

2.1 宝塔草

2.1.1 最佳灭菌方案的筛选

从表1可以看出,采用0.1%的氯化汞溶液消毒5 min效果较好。但是用氯化汞(升汞)消毒时,由于其毒性较大,所以要用无菌水冲洗多次,洗去残留的汞。用次氯酸钠消毒,效果也较好,但不及氯化汞。消毒时有时加入吐温80,目的是使药剂更易于布展,更容易浸润到要灭菌的材料表面,但对材料的伤害也增加。可能是因为溴水的腐蚀性太大,将植物细胞破坏致死,所以成活率为零。

表1　不同灭菌剂、不同灭菌时间的效果比较

灭菌剂	2%的次氯酸钠	0.1%的氯化汞			1%的溴水
灭菌时间(min)	10	3	5	7	2
成活率(%)	90	90	95	70	0
污染率(%)	30	35	10	0	0

2.1.2 芽诱导培养基筛选　外植体在9种培养基上,经过14 d左右长出芽体,芽体出现时间大致相同。不同质量分数的激素对芽的诱导效果见表2。

表2　不同质量分数的激素对芽诱导的影响

6-BA(mg/L)	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
NAA(mg/L)	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
18 d后诱导芽的个数	10	20	19	17	25	26	23	24	27

由表2可以看出,当激素用量为BA 1.0 + NAA 0.1时,诱导芽的个数为25,当BA的质量分数增加1倍,NAA质量分数保持不变时,诱导芽只增加1个;BA、NAA各增加1倍时,诱导芽只增加2个,激素的质量分数对诱导芽的培养效果没有明显的影响。综合培养效果和经济成本,建议采用MS培养基 + BA 1.0 + NAA 0.1进行迷你宝塔的芽诱导培养。

2.1.3 继代培养　分离出诱导产生的不定芽,将其接种在BA 0.5 + NAA 0.01 + MS的培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

基上继代培养。约经2周左右,有大量嫩茎形成。

2.1.4 根诱导和移栽　将嫩茎转接到生根培养基(BA 0.1 + IBA 0.1 + 1/2 MS 的培养基)上,经过10 d左右的培养,形成茎长4~7 cm、根系较发达的再生植株。

带根系的再生植株用1.2.1.5中方法(1)和(2)进行移栽,一般都能正常成活,成活率为100%。可见通过组织培养获得的种苗,环境适应力较强,可直接去掉琼脂,放在水族箱中栽养。

2.2 红柳、小对叶及大红叶的组织培养

这3种水草按1.2.2所述方法都能获得完整的植株。其中经过芽诱导培养基培养2周后,外植体上开始形成愈伤组织,并长出不定芽。将不定芽切割后用继代培养基BA 0.5 + NAA 0.01 + MS培养4周后,有大量的嫩茎形成。选择2~3 cm的长茎,将其剪下,转接到生根培养基上,经过2周后,有丛生的根长出。

2.3 技术关键和难点

2.3.1 外植体的选取　一般认为,诱导愈伤组织成败的关键不在于植物材料的来源,而在于培养条件[13]。本试验涉及的4种茎生草,以茎尖作为外植体均获得成功,组培条件的不同只是影响了无性繁殖的速度。笔者同时进行了丛生观赏水草,如日本荷根(*Nuphar japonicum*)的组培试验,选取叶片、叶柄作为外植体,均未能有效地产生愈伤组织,可见不同生活类型的观赏水草,其外植体的选取至关重要。

2.3.2 植物生长调节剂　植物生长调节剂是诱导愈伤组织极为重要的因子。要使植物组织分化出苗并使苗快速增殖,选择植物激素的种类以及调节细胞分裂素与生长素的用量比例是最重要的一环[14]。细胞分裂素与生长素的比例决定形态的发生方向:比例高时,诱导芽的发生;比例低时,诱导根的形成。本试验迷你宝塔芽诱导培养基中生长素的量为NAA 0.1,细胞分裂素用量为BA 1.0,而根诱导培养基细胞分裂素的用量是BA 0.1,生长素用量IBA 0.1。确定生长素和细胞分裂素的种类及用量需要很长的时间,本试验中迷你宝塔、大红叶、小对叶及红柳很容易获得愈伤组织,而另外一些种类如日本荷根、皇冠属(*Echinodorus*)等,选用相同的植物生长调节剂很难获得愈伤组织。

3 结论

3.1 迷你宝塔以茎尖作外植体,芽诱导采用MS + BA 1.0 + NAA 0.1,根诱导采用1/2 MS + IBA 0.1 + BA 0.1,继代培养采用MS + BA 0.5 + NAA 0.01,可大量培育出带根系的完整植株。

3.2 小对叶、红柳及大红叶以茎尖作外植体,芽诱导采用MS + BA 0.5 + NAA 0.01,根诱导采用1/2 MS + IBA 0.1,继代培养采用MS + BA 0.5 + NAA 0.1,可培育出完整植株。

3.3 迷你宝塔、小对叶、红柳、大红叶均为茎生观赏水草,其组培技术的成功,为目前在水环境生态修复过程中占重要地位的水草种类如轮叶黑藻、伊乐藻等的工程苗获得有很好的借鉴作用。

参考文献

1 潘瑞炽主编. 植物组织培养. 广州:广东高等教育出版社,2000.

2 高　颖. 观赏水草大青叶 *Heteranthera zosterifolia* 的组织培养. 植物生理通讯,2000,36(8):30.

3 邢登辉. 皇冠草 *Echinodorus osiris* 叶片外植体的体胚发生和植株再生. 植物生理通讯,1995(10):129~130.

4 张红梅,及　华,肖小琴等. 红蛋的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯,2003,39(4):338.

5 贺　蓉,郑曙明. 宽叶血心兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯,2001,37(3):231.

6 莫肖蓉,蒋琴素. 热带水草绿椒的组培快繁. 植物生理学通讯,2002,38(1):41.

7 饶秋容,张　芬,古志渊. 香蕉草的固体培养和液体培养. 植物生理学通讯,2003,39(2):143.

8 张红梅,及　华,肖小琴等. 金椒草的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯,2003,39(1):37.

9 黄伟如,谢映忠,梁张慧等. 热带观赏水草--红玫瑰的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯,2004,40(2):204.

10 陈菁瑛,张丽梅,胡明华等. 泽泻的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯,2004,40(3):334.

11 蔡时可,钟　明,苏　海. 小水榕的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯,2005,41(1):60.

12 韦三立,韩碧文. 大宝塔草的组织培养. 植物生理学通讯,2005,41(3):332.

13 谭文澄,戴策刚主编. 观赏植物组织培养技术. 北京:中国林业出版社,1991.

14 王冬梅,黄学林等. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制. 植物生理通讯,1996,32(5):373~377.