

观赏水草雪花草的离体培养与快速繁殖

徐世强^{1,2}, 李宇峰^{1,2}, 王继华^{1,2}

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004)

摘要:为了促进雪花草的工厂化育苗,以雪花草幼嫩的枝条为外植体,建立了快速无性繁殖体系。结果表明:不定芽诱导增殖培养基最佳配方为改良 MS 培养基+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹+GA 1.5 mg·L⁻¹;生根培养基配方为改良的 MS 培养基+NAA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 0.1 mg·L⁻¹。该离体培养方法能提高雪花草的繁殖系数,有效缓解当前种苗不足和缩短上市时间,满足市场需求。

关键词:雪花草;组织培养;快速繁殖

中图分类号:Q949.71.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)03-0016-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.03.0016

雪花草(*Hottonia inflata*)是属于樱草科的一种重要观赏水草,在水族箱布景中常作为中、后景草,具有 3~7 枚羽状深裂的互生叶片。近年来随着经济水平的提高,人们对生活质量的追求也越来越高。利用水族箱种植观赏水草十分流行,雪花草的叶片在俯视时很像雪花的结晶图案,造型优美,具有较高的观赏价值而深受消费者的喜爱。生产上雪花草的繁殖主要依靠分蘖,繁殖系数低。雪花草不耐高温,在夏季时往往因高温胁迫而生长不良或死亡,导致在夏季市场上供不应求^[1]。与其它种类的观赏水草相比,雪花草的人工种植相对困难,植物组织培养技术能有效缓解当前水草种苗限制的问题^[2],小水榕^[3-4]、剑榕^[5-6]等一大批水草已经建立了组培快繁体系。观赏水草长期生长在水中,内生菌数量和种类繁多,常常给利用组织培养技术快速繁殖水草带来挑战^[7-8]。目前国内专业开展水草组织培养研究和工厂化生产的还不多,工厂化育苗技术体系还有待进一步研究^[9]。目前还没有利用植物组织培养技术开展雪花种苗快速繁殖的报道,本研究通过对影响雪花组织培养及快速繁殖的因素进行了相关探索,以期雪花草的工厂化组培育苗提供技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料

2015 年春季在南宁花鸟市场购买叶色浓绿,

生长健壮的雪花草,培养在亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室玻璃温室。

供试培养基为改良 MS 培养基(MX):用 500 mg·L⁻¹的 Ca(NO₃)₂·4H₂O 代替 MS 培养基中的 CaCl₂·2H₂O,并添加 5 mg·L⁻¹的抗坏血酸;不定芽诱导培养基:在 MX 培养基中添加适量的 6-BA、KT 及 IBA;继代增殖培养基:在 MX 培养基中添加适量的 6-BA、IBA 及 GA;生根培养基:在 MX 培养基中添加适量的 6-BA 及 NAA。所有培养基附加蔗糖 30 g·L⁻¹、琼脂 5.5 g·L⁻¹,pH 调至 5.8±0.2,经 121℃ 高压灭菌 20 min。培养条件:温度(25±3)℃,湿度为 65%,光照度 800 lx,光照时间 14 h·d⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 外植体选取与消毒 选取雪花草幼嫩的枝条作为外植体,用中性洗涤剂洗涤枝条,除去枝条表面的污垢,然后去除多余的叶片,用干净吸水纸吸干枝条表面水分,在超净工作台上先用 70% 酒精浸泡 20 s,将酒精倾去,再用无菌水冲洗 3~5 次,每次 3~5 min,立即转入 0.1% 的升汞溶液中消毒 8~14 min。期间用消毒后的镊子搅动消毒剂和材料,最后将材料用无菌水洗涤 5 次,每次 3 min,得到消毒外植体备用。

消毒好的茎段切除与消毒剂有接触的两端,再切成含有一个茎节的茎段,接种于诱导培养基 MX+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹中,每瓶接种 1 个茎段,接种 30 瓶。15 d 后统计污染率和萌芽率。

1.2.2 不定芽的诱导与增殖培养 取成活而且不含内生菌的初代材料,接种于新的不定芽诱导

收稿日期:2016-01-28

基金项目:广西大学博士后资助项目

第一作者简介:徐世强(1989-),男,河南省信阳市人,在读博士,从事植物分子生物学研究。E-mail: 1099952969@qq.com。

通讯作者:王继华(1979-),男,湖北省荆门市人,博士,副研究员,从事植物分子生物学研究。E-mail: wang994326@163.com。

培养基:MX+6-BA 2.0 mg•L⁻¹+IBA 0.1 mg•L⁻¹+GA 2 mg•L⁻¹,进行诱导培养 28 d,得到雪花草不定芽。将雪花草不定芽接入含有不同激素浓度的继代增殖培养基,进行继代培养 25 d,比较不同浓度的 6-BA 和 GA 对不定芽增值的效果,激素浓度见表 1。

表 1 不定芽诱导激素配比
Table 1 Hormones combination of adventitious bud induction

编号 No.	6-BA/(mg•L ⁻¹)	GA/(mg•L ⁻¹)	IBA/(mg•L ⁻¹)
1	0.5	1.5	0.1
2	1.0	1.5	0.1
3	2.0	0	0.1
4	2.0	1.5	0.1
5	3.0	1.5	0.1
6	4.0	1.5	0.1

1.2.3 雪花草生根诱导 将雪花草不定芽切成带有一个不定芽的茎段,然后接入生根培养基中,生物学顶端向上。培养基以 MX 为基础,添加不同浓度的 NAA 和 6-BA,浓度见表 2。进行生根培养 15~20 d,记录根的数量和长度。

表 2 根诱导激素配比
Table 2 Hormones combination of rooting induction

编号 No.	NAA/(mg•L ⁻¹)	6-BA/(mg•L ⁻¹)
1	0.5	0
2	0.5	0.1
3	1.0	0
4	1.0	0.1

1.2.4 雪花草的种植 当雪花幼苗生长至根长 1 cm、苗高 3 cm 后,将培养瓶瓶盖打开,室内炼苗培养 5 d,然后洗净根部培养基,移入 64 孔的穴盘,放入经过消毒的水池中;经室内炼苗 7 d 后移栽,将组培苗根部用消毒后的岩棉包裹,植入直径 3 cm 的塑料镂空杯中,放入塑料大棚的水池中,使用遮光率 75% 的遮阳网遮荫,光照控制在 20%,保持湿度 80% 以上,移栽 5~7 d 即可上市。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒

接在初代诱导培养基的茎段上的腋芽在 5 d 腋芽开始萌动,在 20 d 已经有 2~3 个丛芽。采用酒精 HgCl₂ 结合的两步消毒方法对茎段进行消毒,对其污染率、萌芽率和死亡率的影响见表 3。0.1%HgCl₂ 处理时间的长短与外植体的消毒效

果直接相关。雪花草外植体污染主要是由雪花草内生细菌引起,随着处理时间的延长,外植体内的细菌被 HgCl₂ 杀死,污染率逐渐下降,消毒 14 min 的污染率比消毒 10 min 的降低了 31.62%,出现细菌污染的时间也要滞后。随着 0.1%HgCl₂ 消毒时间的增加对外植体的伤害增加,而萌芽率也逐渐降低,在消毒 14 min 时,萌芽率仅为 16.67%,比处理 10 min 的要低 72.22%;随着 0.1%HgCl₂ 消毒时间的增加,死亡率不断上升,消毒 14 min 的死亡率最高,高达 70%,而消毒 8 min 仅为 3.37%。各处理均能得到无菌外植体,结合萌芽率和污染率等综合分析,采用 70%酒精 20 s 和 0.1% HgCl₂ 处理 10~12 min 较为合适雪花草外植体的消毒。

表 3 0.1% HgCl₂ 不同消毒时间对外植体消毒的效果分析

Table 3 Analysis of sterilization time of 0.1% HgCl ₂ on disinfection effect of explant				
消毒时间/min	接种数/个 Test number	污染率/% Pollution rate	萌芽率/% Germination rate	死亡率/% Mortality rate
8	30	76.67	76.67	3.37
10	30	63.37	60.00	26.67
12	30	56.67	40.00	43.37
14	30	43.33	16.67	70.00

2.2 不定芽诱导和增殖

将带有单芽或双芽的茎段接种到不定芽诱导培养基中培养 5~7 d 后,腋芽开始萌动,经过继续培养 20 d 后,便诱导出丛生芽。丛生芽通过不断继代增殖培养,在短期内可以得到大量的无菌苗。从表 4 可以看出,6-BA 浓度在 0.5~4.0 mg•L⁻¹ 内均能诱导不定芽的增殖,其浓度与不定芽分化数量和质量有密切的关系。浓度过低不利于雪花草不定芽的分化,导致丛芽增殖系数过低,仅为 1.65 倍,随着浓度的增加诱导效率增加,在 2~3 mg•L⁻¹ 时增殖倍数达到 7 倍左右;浓度过高其芽过密集,节间短,叶片小,苗较弱。GA 对雪花草的节间长度有促进作用,能够缓解 6-BA 浓度过高导致苗节间紧密、矮小,和 6-BA 的协同作用提高在生苗的质量。在添加 1.5 mg•L⁻¹ GA 的条件下,比未添加的处理的株高提高了 29.63%,增殖系数相当。改良 MS 培养基中添加 6-BA 2 mg•L⁻¹,GA 1.5 mg•L⁻¹,IBA0.1 mg•L⁻¹ 时,丛生芽数量和质量较好(见图 1),为雪花草不定芽增殖的最适培养基。

表 4 不同激素和浓度对不定芽增殖的效果
Table 4 The effect of different hormone and concentration on adventitious bud multiplication

编号 No.	增殖系数/倍 Multiplication coefficient	株高/cm Plant Height	生长情况 Growing states
1	1.65±0.34	5.78±0.33	芽很少、茎粗长、叶片较大
2	2.78±0.54	5.97±0.54	芽少、茎长、叶片较大
3	6.65±1.12	3.88±0.22	芽少、茎粗短、叶片较大
4	7.09±1.54	5.63±0.57	芽多、茎长、叶片较大
5	8.08±1.08	4.88±0.21	芽多、茎较短、叶片较小
6	8.73±1.89	4.39±0.34	芽多、茎短、叶片小

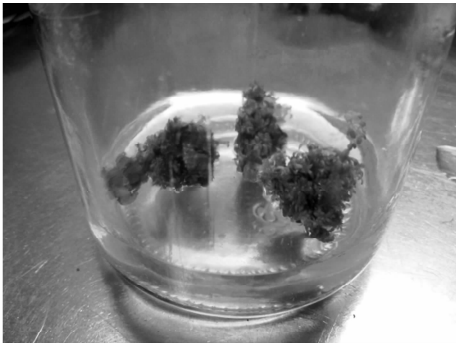


图 1 雪花草的增殖培养

Fig. 1 Multiplication culture of *Hottonia inflata*

2.3 生根培养

将无根苗转入生根培养基,接种 15~20 d 后统计苗生根率及平均生根条数及根的生长情况。0.5 和 1.0 mg·L⁻¹ 的 NAA 都能诱导雪花草生根,其中,在 1.0 mg·L⁻¹ 时根的数量在 5 条左右,较为粗壮,能够满足后期的移栽。但是在成苗阶段其叶片较小,添加 0.1 mg·L⁻¹ 的 6-BA 能促进叶片生长,株型较为正常。MX 培养基+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹ 适合诱导雪花生根。

表 5 不同激素对雪花草根诱导的效果
Table 5 The effect of different hormones on roots induction of *Hottonia inflata*

编号 No.	根数 Root number	根长/cm Root length	叶片质量 Leaf quality
1	3.53±0.45	1.03±0.22	较小
2	3.04±0.91	1.11±0.35	大
3	5.67±0.82	1.35±0.24	小
4	6.44±0.74	1.57±0.33	大

2.4 炼苗及移栽

对雪花草进行两步炼苗再移栽。当雪花草幼苗生长至根长 1 cm、苗高 3 cm 后,首先打开培养瓶盖进行室内炼苗 5 d,然后洗净根部培养基,移入 64 孔的穴盘,放入经过消毒的水池中再次进行室内炼苗;7 d 后将组培苗根部用消毒后的岩

棉包裹,植入直径 3 cm 的塑料镂空杯中,放入塑料大棚的水池中,使用遮光率 75% 的遮阳网遮荫,光照控制在 20%,保持湿度 80% 以上,移栽 5~7 d 即可上市。结合雪花草的特性进行管理,可明显提高成活率,成活率在 90% 以上。

3 结论与讨论

观赏水草是水族箱的重要组成部分,市场需求量大,有良好的经济价值^[10]。水草品种大部分都是通过引种,种苗数量十分有限。雪花草造型优美,深受水族爱好者的喜爱,但是,雪花草不耐热,在夏季的时候,市场上稀少,效益极高。雪花组织培养快速繁殖的关键技术在于无菌外植体的获得和适合的激素配比。本研究结果表明,雪花草中内生菌较多,选择合适消毒剂 and 消毒时间尤为重要。在植物组织培养研究中 HgCl₂ 消毒效果最好,在消毒时间上要严格控制,时间过短消毒不彻底,容易污染;时间过长,雪花草会被杀死,都不能成功得到无菌外植体^[11]。植物组织培养快速繁殖技术非常成熟,在激素方面有较多文献可以参考,减少试验过程中的浓度梯度,降低工作量^[3-4]。本研究在前人基础上设计较少的激素组合,获得了雪花草的快繁技术,能够满足生产上对组培苗的需求。组培苗从室内到室外,环境变化非常大,必须经过炼苗阶段,才能提高移栽成活率。炼苗阶段是组培苗全过程中的一个重要环节,期间结合雪花生态习性进行管理即可,可以明显提高成活率。通过和组织培养技术结合,不仅能在短期内大量提供雪花草的种苗,而且克服雪花草在夏季种植过程中由于高温难生长的困境。

参考文献:

[1] 张金锋. 观赏水草的分类与繁殖方法[J]. 现代农业科技, 2009(3): 82-83.
[2] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
[3] 彭军, 黄茂, 胡景荣. 两种名贵观赏水草的组织培养技术研究[J]. 水产科技情报, 2010(3): 146-149.
[4] 李洪波, 丰锋, 李映志, 等. 榕类水草的组织培养与快速繁殖[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2011(3): 112-118.
[5] 黄春华, 叶秀舜, 陈国华, 等. 观赏用水草剑榕的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010(1): 61-62.
[6] 王丽卿, 李高华, 周胜耀, 等. 4 种观赏水草的组织培养试验[J]. 水产科技情报, 2006(2): 84-86.
[7] 王继华, 罗梦晓, 马综艺, 等. 小水榕茎部内生菌的分离及鉴定[J]. 热带农业科学, 2015, 35(5): 38-44.
[8] 王继华, 马宗艺, 罗梦晓, 等. 小水榕组织培养中的细菌污染及鉴定[J]. 广东农业科学, 2015, 42(13): 60-64.
[9] 孙玉刚, 吴丽英, 王晓萍. 两种观赏水草的离体培养[J]. 中国农学通报, 2009(5): 195-199.
[10] 王成豹. 观赏水草的分类和生产[J]. 现代农业科技, 2005(1): 14-14.
[11] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992.