

石龙尾(*Limnophila sessiliflora* BI.) 的组织培养与
快速繁殖技术研究

顾福根*, 孙丙耀, 韵宇飞, 练兆云

(苏州大学生命科学学院, 苏州 215123)

摘要: 以石龙尾(*Limnophila sessiliflora* BI.) 沉水枝带节茎段为外植体进行离体培养, 研究外植体灭菌方法以及培养基中不同生长调节剂的浓度对其增殖、生根的影响。结果表明: 以 0.1% 的 HgCl_2 为灭菌剂, 采用 4 min + 4 min、间歇 4 h 的间歇灭菌法, 可以获得成活的无菌外植体 15%; 在 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \sim 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖培养基上培养 35 d, 试管苗的增殖系数可达 30.8 以上; 在 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生根培养基上培养 28 d 后, 可获得具 3 ~ 5 个侧枝的生根苗, 平均每株生根数 4.8 条; 炼苗后移植成活率 100%。

关键词: 石龙尾; 茎段; 组织培养; 快速繁殖; 间歇灭菌

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2008)06-0639-05

Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation Technique of
Limnophila sessiliflora BI.

GU Fu-Gen*, SUN Bing-Yao, YUN Yu-Fei, LIAN Zhao-Yun

(School of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The *in vitro* culture of *Limnophila sessiliflora* was established by using the nodal stem segments from submerged branch as explants. The method of surface sterilization of explants, the effects of different plant growth regulators on the multiplication and rooting were investigated. The results showed that 15% sterile explants could be obtained by twice surface treatment with 0.1% HgCl_2 for 4 min with an interval of 4 h. When cultured on a $1/2 \text{ MS}$ multiplication medium supplemented with $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 6-BA and $0.1 \sim 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of NAA for 35 d, the test-tube seedling exhibited a multiplication coefficient higher than 30.8. For optimal rooting, induction on a $1/2 \text{ MS}$ rooting medium supplemented with $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 6-BA and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of NAA for 28 d could produce rooted plantlets with 3 – 5 lateral shoots, and each plantlet generated 4.8 roots on average. Rooted plantlets were acclimatized and transferred into outdoor aquatic environment with 100% survival ratio.

Key words: *Limnophila sessiliflora* BI.; Stem segment; Tissue culture; Rapid propagation; Intermittent sterilization

石龙尾(*Limnophila sessiliflora* BI.) 又名宝塔草, 为玄参科的一种多年生观赏水草, 沉水叶细裂成丝状, 4 ~ 6 枚轮生, 株型极为美观, 常作为公园水景区栽培的沉水观赏植物以及水簇箱的中、后景装饰植物^[1], 观赏价值较高, 具有良好的市场前景。其常规的扦插繁殖的速度较慢, 扦插 3 个月后, 除了顶芽的继续生长外仅能新增侧枝 3 ~ 5 枝, 增殖率较低, 很难进行大批量生产。利用植物组织培养技术生产观赏植物可以克服常规繁殖方法的局限, 在短

时间内繁殖出大量新个体。石龙尾的组织培养至今未见报道, 本研究采用带节茎段诱导产生丛生芽的方法, 建立了适于石龙尾组织培养和快速繁殖的技术体系, 对石龙尾的工厂化生产具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为水培石龙尾(*Limnophila sessiliflora* BI.), 购于广州花卉市场。以嫩枝作为外植体来源。

收稿日期: 2008-04-18, 修回日期: 2008-07-16。

基金项目: 苏州市农业科技发展计划攻关项目 (SNZ-0403)。

作者简介: 顾福根(1964 -), 男, 江苏苏州人, 硕士, 讲师, 主要从事植物生物学教学与植物组织培养技术研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: gufugen64@163.com)。

1.2 培养条件

以 1/2 MS 培养基为基本培养基,培养基中含蔗糖 20 g·L⁻¹,琼脂粉 6 g·L⁻¹,pH 6.0 ~ 6.1^[2]。培养条件为:温度(25 ± 3)℃,光照时间 12 h·d⁻¹,光照强度 25 ~ 30 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.3 方法

1.3.1 外植体的灭菌处理方法与外植体部位的选择 剪取长 10 cm 左右的石龙尾枝条 80 枝,先用自来水冲洗 10 min,然后用冷开水浸洗 10 min,浸洗时用玻璃棒轻轻搅动,再用 0.1% 的 HgCl₂ 灭菌^[3]。灭菌时将外植体分成 5 组,每组 16 枝,分别给予各组 2、3、4、5、6 min 的灭菌时间。无菌水洗涤 4 ~ 5 次后,各取出 8 枝,每枝切成 5 个茎段,每茎段含 1 ~ 2 个节,接种于 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 的初代培养基上^[4],每瓶接 1 个,每组接种 40 瓶。各组剩余的 8 个枝条浸在灭过菌的 0.1% 蔗糖溶液中片刻,倾去糖液,在培养室放置 4 h 后再给予如前各组的灭菌时间重新灭菌^[5],并按上述方法接种,21 d 后统计外植体的污染与死亡情况,得出石龙尾外植体较有效的灭菌时间与方法。在此基础上,进行石龙尾不同部位作为外植体的灭菌效果试验,并获得石龙尾无菌初代培养物。

1.3.2 丛生芽的诱导 以 1/2 MS 为基本培养基,设计分别含有 6-BA 0.5、1.0、2.0、4.0 mg·L⁻¹ 以及 NAA 0.02、0.05、0.1、0.2 mg·L⁻¹ 的 16 个组合的培养基,将上述初代培养获得的试管苗分割成单节茎段后接种在这 16 个培养基上。每瓶接 2 个,每组处理 20 瓶,经常观察丛生芽的诱导情况,35 d 后统计结果,筛选出较好的丛生芽诱导培养基^[6-8]。

1.3.3 试管苗的生根培养 待丛生芽长至约 2 cm

高的丛苗后,切成单株,转接到分别附加 6-BA 0、0.3 mg·L⁻¹ 以及 NAA 0.1、0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹ 的 8 个组合的培养基上^[9]。每瓶接 3 株,每组处理 10 瓶。观察石龙尾试管苗根的生长情况,28 d 后统计生根数、根长、生根率等,筛选出理想的生根培养基配方。

1.3.4 试管苗的移栽 试管苗根长到 1.0 cm 左右时移栽。移栽前先把培养瓶从培养室移到栽培水缸边炼苗,2 d 后取出试管苗,用清水洗去根部培养基,移栽到水缸底的砂层中,28 d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间与灭菌方法对石龙尾茎段外植体的灭菌效果

根据设计好的方法,用 0.1% HgCl₂ 对石龙尾外植体进行灭菌试验,21 d 后统计,结果见表 1(既污染又死亡的,统计在污染外植体个数中;间歇灭菌的时间记为 x + x 的形式)。

从表 1 可以看出,无论是采用单次灭菌还是采用间歇灭菌,随着灭菌时间的增加,外植体的污染率明显降低,而死亡率明显上升;从单次灭菌和间歇灭菌两种不同处理方法的效果来看,本试验中,单次灭菌的各组共有外植体 200 个,无菌外植体存活数仅 3 个,而 200 个外植体经间歇灭菌后共获得了 11 个存活的无菌外植体,因此,间歇灭菌具有明显的优势;单次灭菌法较为合适的灭菌时间为 5 min,此时存活的无菌外植体获得率为 5%,在灭菌间歇为 4 h 时,较为合适的灭菌时间为 4 min + 4 min,此时存活的无菌外植体获得率为 15%,是单次灭菌 5 min 时的 3 倍,因此我们认为对于石龙尾茎段的灭菌,应采用 4 min + 4 min、间隔 4 h 的间歇灭菌法。

表 1 0.1 % HgCl₂ 不同处理时间与方法对石龙尾外植体污染情况的影响(接种后 21 d)
Table 1 Effects of different sterilization period with 0.1% HgCl₂ on contamination ratio of explants in *Limnophila sessiliflora* (21 d after inoculation)

灭菌时间 (min) Sterilization time	接种外植体数 Number of inoculated explants	污染外植体数 Number of contaminated explants	无菌外植体死亡数 Number of dead sterile explants	无菌外植体存活数 Number of survived sterile explants	无菌外植体存活率 (%) Percentage of sterile explants
2	40	40	0	0	0
3	40	40	0	0	0
4	40	35	5	0	0
5	40	29	9	2	5
6	40	14	25	1	2.5
2 + 2	40	40	0	0	0
3 + 3	40	32	6	2	5
4 + 4	40	25	9	6	15
5 + 5	40	6	31	3	7.5
6 + 6	40	3	37	0	0

2.2 石龙尾茎段不同部位作为外植体的灭菌效果

剪取长 10 cm 左右的石龙尾枝条 20 枝,每枝平均分割为 3 段,顶端的一段为上段,靠基部的为下段,中间的为中段,形成上段、中段、下段 3 个处理组,用上述 4 min + 4 min、间隔 4 h 的间歇灭菌法进行灭菌处理,切割成单节茎段后接种培养,21 d 后统计,结果见表 2(既污染又死亡的,统计在污染外植体个数中)。

从表 2 可以看出,石龙尾外植体的部位不同,其灭菌效果有明显差异,越靠近枝条的顶端,灭菌效果越好,但死亡率也越高,这可能是由于枝条上段较嫩,容易受到灭菌剂的伤害,而附着在枝条表面的细菌较少,灭菌比较容易。从无菌外植体存活率来看,下部茎段灭菌后的无菌外植体存活率仅为上部茎段灭菌后存活率的一半,因此在条件允许的情况下,应尽量取枝条的顶部作为外植体。

2.3 植物生长调节物质的种类及浓度对石龙尾丛生芽诱导的影响

灭菌试验中存活的无菌外植体在 21 d 时,腋芽

已有萌发,在初代培养基上继续培养至 42 d 时,可长出具 4~6 个节的侧枝。将这些侧枝分割成单节茎段后在初代培养基上继代培养,以获得足够的供试试管苗,将这些试管苗侧枝分割成单节茎段后接种在设计好的 16 个不同培养基上,培养 35 d 后,每种处理随机抽出 9 瓶统计试管苗的增殖系数及丛生苗高度,统计结果见表 3。

从表 3 中统计数据可以看出,当 6-BA 浓度一定时,随着 NAA 浓度的增加,丛生苗的高度呈明显的增高趋势,但对增殖系数无明显影响。从增殖培养的操作过程来看,丛生苗过矮时,节间偏短,不利于继代时的切割操作,因此 NAA 的浓度为 0.02 mg·L⁻¹ 和 0.05 mg·L⁻¹ 时不太合适,应选用 0.10~0.20 mg·L⁻¹;当 NAA 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的增加,丛生苗的增殖系数明显增大,而丛生苗的高度几乎不受影响,但当 6-BA 浓度增大至 4.0 mg·L⁻¹ 时,增殖系数很大,平均数超过 50,与培养基接触的部位长成球形,不利于分割操作,因此 6-BA 的浓度应选用 2.0 mg·L⁻¹ 较好。综上所述,

表 2 间歇灭菌法对石龙尾茎段外植体不同部位的灭菌效果(接种后 21 d)
Table 2 Effects of interval sterilization on explants excised from different stem fragment of *Limnophila sessiliflora* (21 d after inoculation)

外植体部位 Part of explant	接种外植体数 Number of inoculated explant	污染外植体数 Number of contaminated explants	无菌外植体死亡数 Number of dead explants	无菌外植体存活数 Number of survived sterile explants	无菌外植体存活率(%) Percentage of sterile explants
上段	30	7	17	6	20
中段	30	16	10	4	13.3
下段	30	21	6	3	10

表 3 生长调节物的不同浓度及其配比对石龙尾丛生芽诱导的影响(接种后 35 d)
Table 3 Effects of different hormone concentration of 6-BA/NAA on adventitious bud induction of *Limnophila sessiliflora* (35 d after inoculation)

生长调节物浓度(mg·L ⁻¹) Concentration of growth regulators		接种个体数 Number of inoculation	统计数 Number of the observed	增殖系数(平均每个培养物丛芽数) Multiplication coefficient (average number of adventitious buds per culture)	丛苗平均高度(cm) The average height of adventitious shoots
6-BA	NAA				
0.5	0.02	40	18	9.2±2.2	3.3±0.81
0.5	0.05	40	18	10.1±2.4	4.5±0.74
0.5	0.10	40	18	9.2±2.4	6.1±0.95
0.5	0.20	40	18	13.3±3.5	6.4±1.01
1.0	0.02	40	18	17.7±4.7	3.3±0.59
1.0	0.05	40	18	16.2±4.2	4.4±0.64
1.0	0.10	40	18	16.9±4.2	5.7±0.87
1.0	0.20	40	18	17.9±4.6	6.3±0.93
2.0	0.02	40	18	28.1±7.8	2.6±0.53
2.0	0.05	40	18	27.5±9.0	3.8±0.52
2.0	0.10	40	18	31.3±8.6	4.9±0.71
2.0	0.20	40	18	30.8±9.3	5.5±0.85
4.0	0.02	40	18	>50,基部成球状	2.3±0.44
4.0	0.05	40	18	>50,基部成球状	3.3±0.48
4.0	0.10	40	18	>50,基部成球状	4.0±0.57
4.0	0.20	40	18	>50,基部成球状	4.8±0.60

石龙尾的增殖培养基应选择 1/2 MS + 6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.10\sim0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 35 d 后, 丛苗平均高度达 4.9 cm 以上, 增殖系数达 30.8 以上。

2.4 不同浓度的 6-BA 和 NAA 对石龙尾试管苗生根的影响

将上述获得的丛生苗壮苗切下, 接种于生根培养基中进行生根培养。因石龙尾的不定根均从节部生出, 为保证统计数据的准确, 接种时每株有一个节插入培养基。每天对根、苗的生长情况进行观察, 28 d 后统计, 结果见表 4。

接种 10 d 后可见插入到培养基中的节部生长出白色的根尖, 15 d 后根可长至 1 cm 左右。从表 4 可见, NAA 浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2 个组, 虽然平均每株生根数较多, 但根的长势较差, 平均根长明显低于其它组, 可能是 NAA 浓度过高, 对根的生长产生不利影响; 当 NAA 从 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 苗的长势和根的长势均表现良好, 平均根长和平均每株生根数也随着增加, 因此, 在生根培养时, 培养基中加入 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 较为合适; 在加入 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的培养基中, 生根苗能同时长出 3~6 个侧枝, 而不加 6-BA 的培养基中, 生根苗只能长出 0~2 个侧枝。市场上, 石龙尾均以 3~5 个生根枝条扎在一起出售, 水簇箱栽种情况也是如此, 而具有 3~6 个侧枝的生根苗正好符合商品苗的要求, 因此, 1/2 MS + 6-BA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是较为合适的生根培养基。

2.5 移栽试管苗的生长情况

移栽前, 在玻璃缸底部先铺上约 5 cm 厚的细砂, 加适量的水, 将已炼苗 2~3 d 的生根试管苗移栽到玻璃缸中, 然后加满水, 按缸中水的体积多少, 加入一定量的 CuSO_4 ^[10,11] 使其最终浓度为

$0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 20 d 后移栽苗开始长出新叶, 30 d 后统计, 成活率达 100%。

3 讨论

3.1 关于石龙尾外植体的间歇灭菌

水生植物的组织培养, 目前有报道的不多, 其主要原因是无菌外植体的获得很困难^[12]。石龙尾的沉水枝比较幼嫩, 在预试验中曾注意到用 0.1% HgCl_2 灭菌时, 外植体半致死灭菌时间为 5 min, 灭菌 8 min 以上可导致外植体全部死亡, 而灭菌 3 min 以下外植体全部污染, 试验中无菌外植体存活率很低。因此, 本研究将微生物学中常用的间歇灭菌法应用于石龙尾外植体的灭菌, 大大提高了石龙尾无菌外植体的存活率。间歇灭菌能够取得较好效果的原因可能是间歇前灭菌能把正常生长的菌类杀灭, 而一些处在休眠状态的孢子在短时间内不能被灭菌剂灭杀, 但可在灭菌间歇期被诱导萌发, 在间歇后灭菌中被灭杀, 从而提高灭菌效果。间歇灭菌法效果较好的另一个原因可能是间歇灭菌法把一个较长灭菌时间取得的灭菌效果分为两个较短灭菌时间所得效果的叠加, 缩短了灭菌剂对外植体的持续作用时间, 从而降低了外植体的死亡率。本研究采用灭菌时间为 4 min + 4 min、间歇 4 h 的方法, 对石龙尾的沉水枝进行间歇灭菌, 效果较好, 但最适灭菌间歇时间以及灭菌时间在灭菌间歇前后的分配有待进一步的优化试验。

3.2 关于石龙尾试管苗的生根培养

石龙尾在水簇箱栽培时, 以含 5~6 个枝条的丛生状态达到的景观效果最佳, 因此, 市场上一般以 3~5 枝扦插枝合并成一束出售。石龙尾的常规扦插繁殖不仅速度慢, 而且形成的分枝较少, 在石龙尾生根培养时, 可以从增殖培养的组培苗上切取含有 5~6 个芽的侧枝接种到 1/2 MS + $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA

表 4 不同 6-BA 和 NAA 浓度对试管苗生根培养的影响(接种后 28 d)
Table 4 Effects of different concentrations of 6-BA/NAA on rooting of plantlet (28 d after inoculation)

生长调节物浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration of growth regulators		接种苗数 Total number of inoculated shoot	平均根长 (cm) Average root length	平均每株生根数 Average number of rooting	生根率 (%) Rate of rooting	平均每株新增侧枝数 Average number of regenerated branching
6-BA	NAA					
0	0.1	30	2.5 ± 0.60	2.0 ± 1.01	100	1.3 ± 0.95
0	0.2	30	2.8 ± 0.62	3.9 ± 0.89	100	1.2 ± 0.79
0	0.5	30	3.5 ± 0.71	5.1 ± 0.82	100	0.8 ± 0.78
0	1.0	30	1.9 ± 0.45	6.6 ± 1.13	100	1.0 ± 0.82
0.3	0.1	30	2.7 ± 0.66	2.2 ± 1.15	92	5.8 ± 1.21
0.3	0.2	30	2.8 ± 0.58	3.4 ± 0.57	100	4.8 ± 1.05
0.3	0.5	30	3.3 ± 0.64	4.8 ± 0.76	100	4.5 ± 0.77
0.3	1.0	30	2.5 ± 0.41	4.9 ± 0.92	100	3.9 ± 0.84

的培养基上生根,也可以切取单芽枝条接种到 $1/2\text{ MS}+6\text{-BA }0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA }0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上生根,从而获得具5~6个枝条的成品生根苗。

3.3 关于培养基形式

在石龙尾的组织培养过程中采用了常用的固体培养基,在研究中也曾尝试使用液体培养基,以与石龙尾的水生习性相适应,但在培养过程中遇到组培苗横卧、所生不定根方向与茎成直角、发生污染不易觉察等难题,因此认为在进行水生植物组织培养时,不一定要用液体培养基。

参考文献:

- [1] 喻勋林,曹铁如.水生观赏植物[M].北京:中国建筑工业出版社,2004:62.
- [2] 占家智,羊茜,明宝红,崔景琳.观赏水草的栽培与饰景[M].合肥:安徽科学技术出版社,2004:202.
- [3] 彭静,柯卫东,黄新芳.莲藕的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2001,37(1):38.
- [4] 顾福根,万志刚,颜顺意.轮叶狐尾藻的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,42(3):470.
- [5] 何天霖.常压间歇灭菌法的应用[J].浙江食品工业,1991,3(1):19-20.
- [6] 尹佳蕾,赵惠恩.黄花小山菊的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,42(5):907.
- [7] 杨银萍,史益敏,陶懿伟.虎耳兰的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(4):462.
- [8] 顾亨森,高翠华.植物激素对水仙鳞茎切块愈伤组织的诱导、保持和器官分化的影响[J].园艺学报,1987,14(1):53-56.
- [9] 高健,杨勋.沉水植物菹草的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,42(2):251.
- [10] 刘畅,傅金祥,薛飞,赵玉华,朱志峰.硫酸铜灭藻影响因素的试验研究[J].当代化工,2007,36(5):488-491.
- [11] 韩铁军,曾卓,崔绘.景观水灭藻处理的研究[J].环境与健康杂志,2007,24(1):34-36.
- [12] 孙月芳,陆瑞菊,周润梅,王亦菲.观赏水草的离体培养[J].上海农业学报,2004,20(2):17-19.