

沉水植物菹草组织培养体系的建立

陈 波¹, 郝文涛²

(1. 广西柳州职业技术学院 广西 柳州 545006 2. 天津大学 环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘 要:以菹草的茎为外植体材料, 探讨了不同采摘季节及灭菌方式对外植体分化的影响, 不同培养基类型对增殖培养的影响, 不同激素组合对增殖培养及生根培养的影响。结果表明: 菹草采摘的最佳季节为每年3月底至4月初, 此时菹草的发芽率高且长出的腋芽强壮, 褐化率低; 外植体最佳的灭菌方式为 3% H_2O_2 (30 min) + 无菌水冲洗 3 次 + 5% 乙醇 + 1.0% NaClO (15 ~ 20 min); 液体培养基比固体培养基更有利于菹草的增殖培养, 最佳组合为: MS + 蔗糖 3% + 6-BA 1.0 mg/L + GA_3 1.0 mg/L; 生根培养的最适培养基为: 母液 25% + IBA 2.0 mg/L + 蔗糖 2%。

关键词: 菹草; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S 682.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)12-0138-03

近年来, 随着园林水景的广泛应用, 水生植物作为一种既有造景作用又具有生态功能的植物材料, 日益受到人们的重视, 水体植物修复就是一个很好的例子。利用水生植物作为绿色植物系统通过转移、降解或固定的方式修复污染的土壤、沉积物、水和空气的原位修复技术, 不仅能吸收水体中过量的氮磷营养物质, 控制水体的富营养化, 而且能够通过同化、代谢、脱毒等作用修复有机污染^[1]。沉水植物是水生植物中比较典型的一种, 是淡水生态系统尤其是浅水湖泊生态系统的主要成员, 但随着水体富营养化程度和范围的不断增大, 沉水植物群落普遍退化或消失, 随之造成淡水生态系统的功能普遍退化或丧失, 引起“水华”频发^[2]。沉水植物在维持水生生态系统的结构和功能以及在生物多样性中的关键作用, 使它们在修复水体和吸收污染物方面发挥着重要的作用。菹草(*Potamogeton crispus* L.)是眼子菜科眼子菜属多年生的沉水植物, 应用它净化水质的研究比较多, 因此, 菹草组织培养体系的建立, 对水生植被的恢复工程以及水生植物修复的研究都有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体材料于3月下旬至4月下旬采摘自生长在天津大学青年湖自然水体中旺盛的菹草植株。用自来水冲洗菹草植株 2 ~ 3 h, 去除叶和根, 取靠顶端的粗壮茎, 用蒸馏水冲洗 2 ~ 3 遍, 置于烧杯中。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体不同灭菌方法的筛选 将已经处理好的外植体置入无菌操作台, 采用不同灭菌剂组合进行灭菌处理。选用的灭菌剂: 3% H_2O_2 、75% 乙醇和 1.0% NaClO ; 其组合为: (1) 3% H_2O_2 , 灭菌时间为 30 min; (2) 3% H_2O_2 (30 min) + 无菌水冲洗 3 次 + 5% 乙醇 + 1.0% NaClO , 1.0% NaClO 灭菌时间设置梯度为: (2.1) 5 ~ 10 min; (2.2) 15 ~ 20 min; (2.3) 20 ~ 30 min。接种前均无菌水冲洗 3 次, 浸泡 5 min。

1.2.2 培养基及培养条件 腋芽萌动及不定芽分化的培养基: MS + 蔗糖 3% + 琼脂 0.8% + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L; 继代增殖培养基: MS + 蔗糖 3% + 6-BA 1.0 mg/L, 选择添加 GA_3 1.0 mg/L, 固体培养基添加 0.8% 琼脂; 固液体培养基的 pH 5.8 ~ 6.0。培养基均置于 100 mL 锥形瓶中, 每个瓶中装 50 mL 培养基。培养温度为 25 °C, 光强约 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间 12 h/d。

1.2.3 生根培养基的筛选 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行实验设计, 研究 MS 培养基大量元素(母液 I)、IBA、6-BA 和蔗糖 4 个因素对菹草不定根生根效果的影响。试验因素水平如表 1 所示。每个处理 3 个水平, 2 周后观测。以生根总数为评价指标, 记录结果, 并计算出生根总数的平均数。

表 1 因素与设置水平

水平	因素			
	母液 / %	IBA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	蔗糖 / %
1	25	0.5	0	0
2	50	1.0	0.2	2
3	100	2.0	0.5	3

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理效果的比较

第一作者简介: 陈波(1976-), 男, 仫佬族, 广西罗城人, 硕士, 讲师, 现主要从事环境分析及环境污染控制工作。

基金项目: 广西教育科学“十一五”规划课题资助项目(2006C95); 柳州职业技术学院立项科研资助项目(2009C01)。

收稿日期: 2010-03-11

菹草属于沉水植物, 其生长环境污染较严重, 其表面残留污染物和病菌都比较多, 同时由于其外表皮薄从而使灭菌剂的通透性强, 灭菌条件不好控制, 鉴于此设计了不同的灭菌处理。通过表 2 可知, 最佳的灭菌方式为 2.2, 即采用 3% H₂O₂ (30 min) + 无菌水冲洗 3 次 + 5% 乙醇 + 1.0% NaClO (15 ~ 20 min), 同时在试验过程中还发现一个现象即染菌率和发芽率呈正相关, 分析原因可能是灭菌时间的长短对菹草组织的破坏程度不同, 从而导致其发芽能力随之改变。通过对照在以后的试验中采用表 2 中 2.2 方式进行灭菌。

表 2 不同灭菌处理效果和发芽率		
灭菌方式	灭菌效果	最大发芽率/ %
1	全部染菌	71.42
2.1	部分染菌	57.14
2.2	不染菌	42.85
2.3	不染菌	14.28

2.2 不同季节菹草发芽效果的比较

在 3 月下旬至 4 月下旬期间每间隔 7 d 左右时间采集 1 次菹草进行发芽试验, 通过比较发现, 3 月底至 4 月初采集的菹草发芽率高并且长出的腋芽也较壮。4 月下旬采集的菹草容易出现褐化现象, 且长出的腋芽发暗, 生长缓慢。因此选择 3 月底至 4 月初采集菹草进行组培试验较佳。

2.3 腋芽萌发及增殖培养结果

选取已经灭菌完成的外植体, 切取茎上端 5 mm 段 (带茎节) 置于诱导腋芽萌动及不定芽分化的培养基中, 每个培养基放置 5 ~ 8 个茎段, 密封, 置于光照培养箱中培养。3 ~ 5 d 后灭菌处理良好的培养基中外植体可不经愈伤组织而直接分化出腋芽。切取带节间的芽接种到增殖培养基中, 培养 3 ~ 5 d 后, 外植体开始分化出新芽, 分化率可达 90% 以上, 新芽不断的长出新的侧芽, 2 周左右即可形成一簇芽, 有些芽也可以形成不定根。通过比较发现, 在菹草幼芽的增殖培养中添加 GA₃ 1.0 mg/L, 可以加快侧芽的生成。

根据表 3 中液体培养基和固体培养基菹草不定芽生长状况发现, 液体培养基有利于增殖培养, 菹草不定芽生长速度大于固体培养基。

表 3 不同培养基菹草不定芽生长状况		
培养基种类	茎伸长率/ %	不定芽分化率/ %
固体培养基	40.15	30.28
液体培养基	60.63	50.45

2.4 生根培养基

应用 L₉ (3⁴) 正交设计表进行实验, 结果见表 4 所示, 9 种组合中除了处理 4.5 外其余均能使菹草生根, 在根数平均上不同组合差异较明显, 对指标进行直观分析, 结果见表 5。

根据 4 种因子对菹草生根根数的影响进行趋势性分析发现, 在试验范围内菹草生根根数随各因子含量不

同而明显发生变动。对于菹草生根根数的最优组合应为母液 25% + IBA 2.0 mg/L + 蔗糖 2%。根据 4 种因子内水平极差分析可见, 参试的 4 个因子对菹草生根根数影响的主次关系为: 蔗糖 > 母液 > 6-BA > IBA, 即蔗糖对于菹草生根根数的增加有着更为重要的作用。

表 4 不同处理的生根数					
编号	母液/ %	IBA / mg · L ⁻¹	6-BA / mg · L ⁻¹	蔗糖/ %	根数平均
处理 1	25	0.5	0	0	39.67
处理 2	25	1.0	0.2	2	77.33
处理 3	25	2.0	0.5	3	70.33
处理 4	50	0.5	0.2	3	—
处理 5	50	1.0	0.5	0	—
处理 6	50	2.0	0	2	66.67
处理 7	100	0.5	0.5	2	82.00
处理 8	100	1.0	0	3	68.00
处理 9	100	2.0	0.2	0	13.33

注: — 表示未生根。

表 5 不同处理对根数平均值影响指数分析					
各因素水平	母液	IBA	6-BA	蔗糖	
I _j	187.33	121.67	174.34	53.00	
II _j	66.67	145.33	90.66	226.00	
III _j	163.33	150.33	152.33	138.33	
k _j	3	3	3	3	
I _j /k _j	62.44	40.56	58.11	17.67	
II _j /k _j	22.22	48.44	30.22	75.33	
III _j /k _j	54.44	50.11	50.78	46.11	
极差(D _j)	40.22	9.55	27.89	57.66	

3 结论

沉水植物作为水生生态系统的初级生产者, 对整个水体生态系统的结构与功能及系统稳定性有决定性的影响^[3]。对水生生态进行修复必须以沉水植物所产生的水质效应为依据, 沉水植物所发挥的水质效应, 必然对生态系统的修复产生影响^[4]。菹草作为常见的多年生沉水植物, 有恢复健康水生生态系统的自净能力, 从而在长期稳定地解决水污染问题过程中起着重要的作用。通过试验可知菹草组培最佳的灭菌方式为 3% H₂O₂ (30 min) + 无菌水冲洗 3 次 + 5% 乙醇 + 1.0% NaClO (15 ~ 20 min); 菹草生根培养的最适培养基为: 母液 25% + IBA 2.0 mg/L + 蔗糖 2%。另外试验结果还表明, 选择 3 月底至 4 月初采集菹草进行组培试验较佳, 而液体培养基有利于增殖培养, 菹草不定芽生长速度大于固体培养基。试验可以提高菹草组织培养和快速繁殖的成功率, 为菹草的快速繁殖奠定良好的基础。

参考文献

[1] 吴万秀. 沉水植物与酚酸酯类化合物间相互作用研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
[2] 成小英, 王国祥, 濮培民, 等. 冬季富营养化湖泊中水生植物的恢复及净化作用[J]. 湖泊科学, 2002, 14(2): 139-144.
[3] Ellen V D, Wouter J B. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto2 and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms[J]. Aquatic Botany, 2002, 72: 261-274.
[4] 陈清锦. 沉水植物对污染水体的水质改善效应研究[D]. 南京: 河海大学, 2005.

利用 SSR 技术对黄瓜新品种津优 35 号进行种子纯度鉴定

张桂华, 李家旺, 张文珠, 李愚鹤

(天津科润农业科技股份有限公司 黄瓜研究所 天津 300192)

摘 要:利用天津科润公司建立并优化了的黄瓜种子纯度鉴定技术体系,筛选黄瓜新品种津优 35 号特异分子标记。试验选用 80 多对 SSR 引物中,有 2 对引物(85 号和 212 号)在杂交种和亲本间表现多态性,杂交种条带为父母本的互补型,且特异性强,适合做杂交种纯度鉴定。用这 2 对引物对津优 35 号 50 粒种子进行了 SSR 鉴定。结果表明:这 2 对引物鉴定结果相同,且与田间鉴定结果吻合率高达 96% 以上,表明所筛选到的 2 个 SSR 标记可以作为津优 35 的特异分子标记用于其种子纯度的鉴定。

关键词:津优 35 号;纯度;SSR

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)12-0140-02

种子纯度鉴定是保证种子质量的关键环节。田间纯度鉴定一直是各育种单位采用的方法,但是田间种子纯度鉴定需要等到结瓜期才能看到结果,周期长、工作量大;易受环境因素影响,导致表型特征会有一定程度偏差;或者由于不可抗拒的自然因素,如连阴雨或冰雹等恶劣天气,导致观察不到结果。以上种种不足都直接影响到了种子的及时推广和销售,造成种子积压。

分子标记技术的快速发展为种子的纯度鉴定提供

了一种更为快速、高效的方法^[1-4]。天津科润公司近几年来一直致力于建立利用分子标记技术进行种子纯度鉴定的技术体系研究,现取得了很好的效果^[5]。自 2007 年开始,利用成熟的分子标记技术对大量的不同黄瓜品种进行了纯度检测,纯度检测结果与田间纯度鉴定的结果吻合率高达 90% 以上,为新品种的及时推广与销售赢得了时间,提高了效率。试验以天津科润农业科技股份有限公司黄瓜研究所培育的黄瓜新品种津优 35 号及其亲本为试材,进行特异引物的筛选研究,以期对津优 35 号新品种种子纯度的鉴定提供快速高效的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜新品种“津优 35”及其亲本。

1.2 种子基因组 DNA 提取

第一作者简介:张桂华(1972-),女,博士,现从事黄瓜分子标记辅助育种研究工作。

基金项目:天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0802160);天津市应用基础研究计划资助项目(07JCYBJC12200)。

收稿日期:2010-04-16

The Establishment of Tissue Culture of Submerged Plant *Potamogeton Crispus* L.

CHEN Bo¹, HAO Wen-tao²

(1. Liuzhou Vocational Technical College, Liuzhou, Guangxi 545006; 2. School of Environment Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: It is very important to restoration and phytoremediation of aquatic plants that tissue culture of *Potamogeton Crispus* L. was established. The experimental results showed that the optimal way to sterilization for tissue culture of *Potamogeton Crispus* L. was 3% H₂O₂ (30 min) with sterile water washing 3 times, 5% ethanol and 1.0% NaClO (15 ~ 20 min), and the optimal medium was mother liquor I 25%, IBA 2.0 mg/L and Sucrose 2%. The experiments also showed the results that liquid medium was advantageous to proliferation culture, and the growth speed of adventitious bud of *Potamogeton Crispus* L. was faster than that of solid medium.

Key words: *Potamogeton Crispus* L.; tissue culture; system