

睡菜的离体培养与植株再生研究

李文洁¹, 普晓兰², 陈泽英³

(1. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学 生命科学学院, 云南 昆明 650224;

3. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224)

摘要:以不带节的睡菜茎段为外植体, 研究其离体再生体系。结果表明: 将茎段接种到 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L 培养基上 10 d 可以诱导产生愈伤组织, 然后转接至 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+KT 0.05 mg/L 培养基上 15 d 可使愈伤组织分化为幼苗; 将带节的睡菜茎段接种到 MS+IBA 0.1~0.2 mg/L 培养基上 7 d 可使其腋芽萌发为幼苗; 将幼苗接种到 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 培养基上 3~5 d 可生根, 实现植株再生。

关键词:睡菜; 愈伤组织; 幼苗; 植株再生

中图分类号:S 682.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0122-03

纳帕海是云南省海拔最高和纬度最低的高原喀斯特湿地类型之一, 也是云南高原沼泽面积最大和最具代表性的湿地类型之一^[1]。睡菜(*Menyanthes trifoliata* L.) 为龙胆科(或睡菜科)(*Menyanthaceae*)睡菜属多年沼生草本植物^[2], 又名蜈蚣菜、醉草, 是纳帕海湿地重要的水生植物。近年来, 由于环境胁迫等原因, 特别是人为活动干扰的加剧, 纳帕海湿地遭到严重破坏, 湿地植被类群改变, 睡菜的分布面积也日渐萎缩。为了改变湿地植被恢复时拆东墙, 补西墙, 破坏一片, 恢复一片的困境, 该研究旨在通过组织培养途径, 实现睡菜植株再生, 为睡菜的人工繁殖提供一种有效的方法, 也为湿地植被的恢复提供新的苗木来源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试睡菜于 2011 年 5 月采自云南省香格里拉纳帕海湿地。

1.2 试验方法

试验于 2011 年 6 月至 2012 年 4 月在西南林业大学组培室进行。

1.2.1 消毒方法的优化和无菌外植体的获得 水生植物带菌多, 尤其大多带有内生菌, 消毒困难。为了获得进行组织培养的无菌外植体, 现对消毒方法^[3]进行如下试验: 从睡菜母株上剪取幼嫩茎段(带节的或不带节的), 每个茎段长约 3~4 cm。将经过初步清洗的睡菜茎段分别放入浓度为 1、2、3、4 g/L 的多菌灵悬浊液中浸泡 12、24、36、48 h, 然后在自来水下冲洗 45~60 min, 用蒸馏水清洗外植体后放入 70% 酒精中浸蘸 10 s, 立即取出分别放入 0.1% 升汞溶液(每 100 mL 升汞溶液加约 1 滴吐温)中消毒 4、6、8、10 min, 用无菌水清洗 5 次, 最后用滤纸吸干水后切成约 1 cm 长的小段备用。外植体在超净工作台上接种^[4], 20 d 后观察并统计其污染率。

1.2.2 培养基的筛选及接种方法 以 MS 培养基为基本培养基, 加入 0.05% 内生菌型抑菌剂后, 根据不同外植体和不同培养阶段, 添加不同浓度和配比的细胞分裂素 6-BA(6-苄氨基嘌呤)、KT(激动素)、生长素 IBA(吲哚丁酸)、NAA(α -萘乙酸), 并附加 30 g/L 蔗糖和 5.5 g/L 卡拉胶, pH 5.8, 在 121℃ 高温下灭菌 15 min。将带节或不带节的睡菜茎段接种到 MS 与不同浓度的 6-BA 和 IBA 配比的初代培养基上培养, 筛选出诱导愈伤组织或腋芽萌发的最佳培养基; 变换 6-BA、NAA、KT 的不同配比浓度^[5], 筛选出将睡菜愈伤组织分化为幼苗的最适培养基和生根培养基; 培养基共 3 组(表 1)。培养温度为 (20±2)℃, 光照时间为 10~12 h/d, 光照强度约 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2.3 生根及试管苗移栽试验 在生根培养基中加入活性炭^[6], 观察活性炭对睡菜生根的影响。选择不同气温的时间对睡菜幼苗进行移栽, 统计其移栽成活率。

2 结果与分析

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对外植体成活的影响

由表 2 可知, 用多菌灵对睡菜外植体进行消毒, 多菌灵的浓度越高, 浸泡时间越长, 污染率越低, 可以由 50.7% 下降到 15.2%。但处理浓度和时间的增加, 将导

第一作者简介:李文洁(1982-), 女, 云南人, 在读硕士, 研究方向为植物生物技术。E-mail:cmhm920@163.com.

责任作者:普晓兰(1956-), 女, 云南人, 博士, 教授, 现主要从事植物生物学和植物生理学方面的研究工作。

基金项目:云南省重点资助项目(2008CA006)。

收稿日期:2012-08-20

表 1 睡菜组织培养中的培养基组合

Table 1 Four kinds of mediums in tissue culture of *Menyanthes trifoliata* L

培养基	编号	培养基 Medium/mg · L ⁻¹
愈伤组织诱导培养基	A1	MS
	A2	MS+6-BA 0.5
	A3	MS+IBA 0.5
	A4	MS+6-BA 0.5+IBA 0.5
	A5	MS+6-BA 1.0+IBA 0.5
	A6	MS+6-BA 1.5+IBA 0.5
	A7	MS+6-BA 0.5+IBA 1.0
	A8	MS+6-BA 1.0+IBA 1.0
	A9	MS+6-BA 1.5+IBA 1.0
愈伤组织分化培养基	B1	MS+6-BA 2.0
	B2	MS+NAA 0.1
	B3	MS+6-BA 2.0+NAA 0.1
	B4	MS+6-BA 2.0+NAA 0.1+KT 0.05
	B5	MS+6-BA 2.5+NAA 0.2+KT 0.05
腋芽萌发诱导培养基	C1	MS
	C2	MS+6-BA 0.1
	C3	MS+6-BA 0.2
	C4	MS+IBA 0.1
	C5	MS+IBA 0.2
	C6	MS+IBA 0.3
生根培养基	D	1/2MS+IBA 0.5

表 2 不同消毒方法对外植体污染和成活的影响

Table 2 Effects of different sterilization ways on the pollution and survival rate of *Menyanthes trifoliata* L

时间 Time/h	指标 Indexes	多菌灵浓度 Concentration of MBC/g · L ⁻¹	1	2	3	4
12	污染率 Pollution rate/%	50.7	42.3	21.8	19.4	
	成活率 Survival rate/%	35.6	40.7	53.5	51.2	
24	污染率 Pollution rate/%	48.3	36.5	16.7	15.6	
	成活率 Survival rate/%	39.5	51.4	60.9	52.6	
36	污染率 Pollution rate/%	47.8	39.3	17.2	15.1	
	成活率 Survival rate/%	33.6	34.7	36.6	32.9	
48	污染率 Pollution rate/%	45.1	38.8	16.7	15.2	
	成活率 Survival rate/%	32.7	33.3	31.5	28.3	

致外植体成活率下降。试验表明,当多菌灵浓度为 3 g/L,浸泡 24 h 时,外植体成活率最高,为 60.9%,而此时污染率相对较低,为 16.7%。

用 0.1% 升汞溶液对其消毒时间的长短,对污染率和成活率也会产生影响。消毒时间越长,污染率越低,成活率随着污染率的下降而提高,消毒 8 min,污染率 26.4%,成活率可达 61.9%。但是,消毒的时间太长,会对植物组织造成过度伤害,造成成活率下降,不利于培养。

2.2 愈伤组织的诱导和分化

将不带节的茎段分别接种到培养基 A1~A9 中,培养 10 d 左右,外植体其茎段膨大,均有不同程度的脱分化。尤其在 A5 培养基中,外植体维管束环内外侧薄壁组织气腔壁处长出圆球形的愈伤组织细胞,25 d 后,愈伤组织大量生长,逐渐撑破茎段表皮(图 1)。由表 3 可

见,在不添加任何激素的 MS 培养基和只添加生长素或细胞分裂素的培养基中(A1~A2),都没有愈伤组织生成。说明睡菜外植体对外源激素的反应明显,单一的细胞分裂素或生长素对诱导睡菜的愈伤组织效果有限,生长调节剂浓度太低不足以诱导细胞脱分化,太高也可能抑制细胞分裂。在 A5 培养基中,诱导愈伤组织的效果最佳(表 4)。

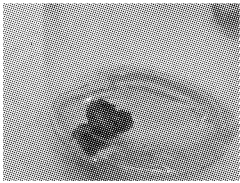


图 1 睡菜的愈伤组织

Fig. 1 Callus of *Menyanthes trifoliata*

表 3 不同消毒(0.1% HgCl₂) 时间对睡菜成活的影响

Table 3 Effects of different sterilization time of HgCl₂ (0.1%) on the pollution and survival rate

指标 Indexes	4	6	8	10
污染率 Pollution rate/%	40.5	32.7	26.4	20.1
成活率 Survival rate/%	50.8	56.3	61.9	55.2

表 4 不同培养基对诱导睡菜愈伤组织的影响

Table 4 Effects of different mediums on inducing wounded tissue

编号	愈伤组织诱导情况 Callus induction situation
A1	无愈伤组织生成
A2	无愈伤组织生成
A3	茎段略有膨胀,但无愈伤组织生成
A4	茎段膨胀开裂,有极少的愈伤组织生成
A5	茎段膨胀开裂,有愈伤组织生成,且生长较快
A6	茎段膨胀开裂,有少量愈伤生成
A7	茎段膨胀开裂,有少量愈伤生成
A8	茎段膨胀开裂,有少量愈伤生成
A9	茎段膨胀开裂,有少量愈伤生成,部分褐化

选取细胞较大、嫩绿色的愈伤组织接种于培养基 B1~B5 中,培养约 15 d 后,愈伤组织分化情况见表 5。结果表明,在加入 6-BA 和 NAA 的培养基中均未见芽的分化(B1~B3),当培养基加入 KT 后(B4~B5),愈伤组织可分化成芽(图 2),说明 KT 对睡菜愈伤组织的分化有显著的促进作用。

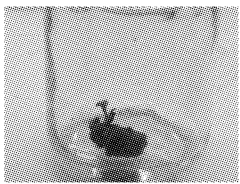


图 2 睡菜愈伤组织分化长出幼苗

Fig. 2 Seedlings differentiated from callus of *Menyanthes trifoliata*

表 5 不同培养基对睡菜愈伤组织分化成苗的影响

Table 5 Effects of different mediums on wounded tissue differentiation

编号	分化情况 Differentiation
B1	愈伤组织不断增殖,不分化
B2	愈伤组织由黄绿色逐渐变为绿色,不分化
B3	愈伤组织不断增殖,颜色由黄绿色变为绿色,不分化
B4	20 d 后愈伤组织可分化成芽
B5	15 d 后愈伤组织可分化成芽

2.3 芽的诱导

将带节的茎段接种到培养基 C1~C5 中,培养 7 d 后,观察结果见表 6。在不加激素的 MS 培养基或加入细胞分裂素 6-BA 的 MS 培养基中,均不能诱导睡菜腋芽萌发。在 MS 培养基中加入 0.1~0.2 mg/L 的生长素 IBA(C4~C5)后,可诱导腋芽萌发,15 d 后长出新叶(图 3)。结果表明,一定浓度的生长素 IBA 有利于打破睡菜腋芽的休眠,促进萌发,但过高的浓度反而有抑制作用。



图 3 睡菜茎段腋芽萌发

Fig. 3 Axillary buds of *Menyanthes trifoliata* germinated from stem

表 6 不同培养基对诱导睡菜腋芽萌发的影响

Table 6 Effects of different mediums on inducing axillary bud

编号	腋芽萌发情况 Axillary bud
C1	茎段逐渐失绿,茎节处无腋芽萌发
C2	茎段绿色,茎节处无腋芽萌发
C3	茎段绿色,茎节处无腋芽萌发
C4	茎段绿色,茎节处腋芽萌发
C5	茎段绿色,茎节处多个腋芽萌发
C6	茎段绿色,茎节处无腋芽萌发

2.4 植株再生与移栽

将分化出的幼苗切取,转接入生根培养基 D 中 3 d 左右就开始生根。如果在培养基中加入适量 AC(活性炭),可以使生根时间提前 2~3 d(表 7)。不论是否在培

养基中加入 AC,20 d 时统计生根率均达 100%。再生苗生根后可以不需练苗直接移栽,移栽时需要有基质(泥土)固定其根部,在水分充足的条件下,成活率可达 100%。选择在气温较低的阴雨天移栽,其长势较好。

表 7 活性炭对睡菜幼苗生根的影响

Table 7 Influence of adding AC or not on

taking roots of *Menyanthes trifoliata* L

平均	生根时间		根长/mm			生根率 /%
	/d	2 d	4 d	7 d		
添加 AC	2.8	1.30	3.91	8.32		100
不加 AC	4.7	1.28	3.66	8.17		100

3 讨论

睡菜是沼生植物,利用组织培养使其再生时,外植体的消毒是一个难题。在降低污染率的同时,又要保证较高的成活率^[7]。这就要综合考虑消毒药剂浓度和消毒时间的影响。该研究以睡菜的茎段为外植体,在组织培养的过程中,内生菌会从茎段溢出,因此在培养基中加入内生菌抑制剂可取得较好效果。

该试验结果表明,无论从愈伤组织诱导和分化途径,还是从诱导腋芽萌发的方式均可实现睡菜的植株再生,并且再生芽苗的生根和移栽容易,这将有利于对睡菜进行规模化繁殖,实现睡菜的工厂化育苗,满足湿地恢复的苗木需求。

参考文献

- [1] 田昆,陆梅,常凤来,等. 云南纳帕海岩溶湿地生态环境变化及驱动机制[J]. 湖泊科学,2004,16(1):35-41.
- [2] 孙祥钟. 中国植物志[M]. 62 卷. 北京:科学出版社,1991:412.
- [3] 李群,杜文平,王米力,等. 植物组织培养中控制污染技术研究[J]. 四川林业科技,1999,20(4):24.
- [4] 彭星元. 植物组织培养技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006:39.
- [5] 柯学莎,李伟. 激素对水生植物生理生态的影响及其应用[J]. 生态学报,2006,26(5):248-255.
- [6] 沈逢源,李高燕,刘思琪,等. 植物组织培养过程中的影响因素[J]. 现代园艺,2011(4):21.
- [7] 李智辉. 苜蓿离体快繁技术的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2007,38(4):609-611.

Study on *in vitro* Culture and Plant Regeneration of *Menyanthes trifoliata*

LI Wen-jie¹, PU Xiao-lan², CHEN Ze-ying³

(1. Department of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Department of Biological Science, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 3. Department of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: Taking the stems without axillary bud of *Menyanthes trifoliata* as explants, its *in vitro* culture and regeneration were studied. The results showed that putting the stem on the medium MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L for 10 d could produce callus, then put them on MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+KT 0.05 mg/L for 15 days, it could differentiate into seedlings without root; taking the stems with bud on MS+IBA 0.1~0.2 mg/L for 7 days, axillary bud could germinate and then be seedling without root. Put the seedling on 1/2MS+IBA 0.5 mg/L for 3~5 d, it could rooting.

Key words: *Menyanthes trifoliata* L; callus; seedling; plant regeneration