

水毛茛组织培养研究

陈泽英¹, 普晓兰², 林萍¹, 吴荣¹, 陶顺江², 张元伟²

(1. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘要:以水毛茛带腋芽茎段为外植体进行离体培养研究。结果表明:带腋芽茎段在 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 激素配比下能直接诱导出大量生长健壮的丛生芽,诱导率达 66.7%。最佳生根培养基为 1/2MS+IBA 2.0 mg/L,生根率达 72.0%。对培养方式和培养温度研究得出,液体培养比固体培养更有利于丛芽的诱导和生长,较适合的培养温度为 25℃。生根苗练苗 3 d 后,移入自来水中,成活率达 63.3%。

关键词:水毛茛;丛生芽;液体培养;固体培养

中图分类号:S 682.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0161-03

水毛茛(*Batrachium bungei*)又名扇叶水毛茛,为毛茛科(Ranunculaceae)水毛茛属多年生沉水草本^[1],是湿地中常见的主要沉水植物。迄今为止,针对水毛茛的相关研究较少而针对水毛茛人工繁殖的研究尚未

见报。赵晟等在对滇池水生植物种类进行调查时发现,原本 20 世纪 50 年代在滇池分布较多的水毛茛到 20 世纪 70 年代已经绝迹^[2]。由此可见,对湿地植物进行保护性繁殖和恢复研究已经迫在眉睫。胡彦春等研究得出,水毛茛对低浓度生活污水有一定的净化作用^[3]。袁婧等对影响北京水毛茛(*Batrachium pekinense*)生长的环境因子进行研究得出,北京水毛茛对生长环境的水质要求较高,可以作为湿地水体监测的指示植物^[4]。纳帕海是滇西北地区重要的湿地之一^[5],水毛茛是纳帕海湿地重要的沉水植物种类。通过研究

第一作者简介:陈泽英(1985-),女,在读硕士,研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail:chenzeying@yahoo.cn。

责任作者:林萍(1958-),女,教授,硕士生导师,现主要从事花卉学教学与研究工作。

收稿日期:2011-02-14

- [7] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2005:33.
[8] 朴雪梅,全雪丽,严一字,等. 桔梗小孢子发育时期与花器形态相关性研究[J]. 江苏农业科学,2008(6):138-140.
[9] 郝晨,全云,姜金仲,等. 四倍体刺槐大小孢子发育时期与花器形态的相关性[J]. 核农学报,2006,20(4):292-295.
[10] 张绿萍,陈红. 园艺植物花药培养研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(17):5140-5142.
[11] Maria, Antonietta, Germana. Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. through another culture [J]. Plant Science, 2006,171;

718-725.

- [12] WANG Y Y. The induction of the pollen plantlets of tritcale and capsicum annum from anther[J]. Sci. Sinica,1973,16:147-151.
[13] 孟志卿. 草莓花药愈伤组织诱导与分化研究[J]. 江西农业学报,2007,19(9):41-42.
[14] Ciner D O, Tipirdamaz R. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper(*Capsicum annum* L.)[J]. Turk. J. Bot., 2002,26:131-139.

Morphological Study on Anther Development of *Aquilegia oxysepala* Trautv. et C. A. Mey

QUAN Xue-li, ZHANG Mei-shu, LIU Di

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: By the methods of paraffin section method, the anther of *Aquilegia oxysepala* Trautv. et C. A. Mey developmental process was studied. The results showed that each anther had four pollen sac in *Aquilegia oxysepala* Trautv. et C. A. Mey, the microspore mother cells belonged to the tetrahedric spore type in the tetrad. The mature pollens belonged to the two-cell type with three germination apertures. The pollen sac wall was composed of four layers, epidermis, endothelium, middle layer and tapetum. The tapetum belonged to secretory type with multinucleate phenomenon.

Key words: *Aquilegia oxysepala* Trautv. et C. A. Mey; anther; anatomy

建立水毛茛的组培快繁体系,不仅能够为纳帕海湿地植物保护提供有效途径,更能为纳帕海湿地植被恢复工程快速的提供大量种苗。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采自云南省迪钦州香格里拉县纳帕海湿地,以水毛茛茎段为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 取材与消毒 选取水毛茛幼嫩的茎段,剪去根及叶,用自来水冲洗 2 h,用 70%酒精浸泡 30 s 后置于 0.1%升汞溶液中消毒 4 min,之后用无菌水冲洗 3~4 次(每次浸泡 3 min),再剪成 1~2 cm 长的带 1~2 个茎节的茎段,接种到初代固体培养基 MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L 上,培养 40 d 统计数据。

1.2.2 基本培养基和培养条件 以 MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度和配比的激素,卡拉胶 6 g/L,蔗糖 30 g/L, pH 6.0, 121℃ 高压灭菌 15 min。在温度 (25±1)℃、光照 12 h/d、光照强度 2 000 lx 的条件下培养。

1.2.3 增殖培养基的筛选 将初代培养获得的丛生芽分成单个的芽,分别接种于附加不同植物激素的 MS 固体培养基上,每组 30 段,培养 30 d 后统计诱导率,以筛选最佳芽继代增殖培养基。

1.2.4 培养方式和培养温度的筛选 试验材料采自于香格里拉县纳帕海湿地,该地最热月均温为 13.3℃,考虑到原产地气温对植物生长的影响,试验设计分别在 25℃ 和 15℃ 下对芽进行培养。此外,水毛茛是沉水植物,通常全株浸泡于水中生长,试验分别采用 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 的液体培养基和固体培养基对水毛茛进行培养。每组 50 株,培养 30 d 后统计丛生芽生长情况。

1.2.5 生根培养 把高 1.5~2.5 cm 的单芽转接于附加不同浓度 IBA 和 NAA 的 1/2MS 培养基中诱导生根,每组 50 棵,培养 20 d 后统计生根率、生根条数和根长。

1.2.6 练苗移栽 在培养室中将生根苗的瓶盖打开,向瓶内注入 3 cm 深的自来水将苗浸没。2 d 后将瓶苗取出,洗去根部的培养基,分别移栽于以河沙为基质的培养瓶和不用基质的空培养瓶中,再向瓶中加自来水,保持水位为 3 cm,每隔 3 d 换 1 次水,放于培养室中培养^[6-8]。

2 结果与分析

2.1 初代培养

培养 10 d 后,茎段节位上的腋芽开始萌动,长出 1~2 片叶片,叶片展开呈扇形,浅绿色。培养 40 d 后有 54% 的茎段长出较小的团状丛芽,部分茎段节位上长出白色细根。

2.2 增殖培养

由表 1 可知,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,丛生芽诱导率较低,为 43.3%,且丛芽较小,叶片卷缩,可知 6-BA 浓度偏高时不利于丛芽的诱导。当 6-BA 的浓度为 0.5 mg/L 时,丛生芽诱导率最高,为 66.7%,说明浓度为 0.5 mg/L 的 6-BA 对丛生芽的诱导有一定的促进作用。此外,所有加入 6-BA 的试验组丛芽都表现出叶片卷缩,表明 6-BA 的使用对芽的生长不利。单独使用 0.1 mg/L 的 IBA 丛芽诱导率就达到 50.0%,并且芽的叶片展开,表明 0.1 mg/L 的 IBA 不仅对水毛茛丛生芽的诱导有利,还对芽和叶片的生长起到一定的促进作用。④和⑤的丛芽诱导率分别为 26.7% 和 30.0%,说明 0.5 mg/L 的 KT 不论是单独使用,还是与 0.5 mg/L 的 6-BA 一起使用都对丛芽的诱导起到一定的抑制作用。综上所述,从提高芽增殖数量的角度考虑,几种激素配比中 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 是水毛茛最佳的丛生芽诱导培养基。

表 1 不同激素对比对芽增殖的影响

组号	激素配比 /mg·L ⁻¹	丛生芽 诱导率/%	丛生芽生长情况
①	MS+6-BA 0.5+IBA 0.1	66.7	丛芽较大,叶片卷缩
②	MS+6-BA 1.0+IBA 0.1	43.3	丛芽较小,叶片卷缩
③	MS+IBA 0.1	50.0	丛芽较小,叶片展开
④	MS+KT 0.5+IBA 0.1	26.7	丛芽较小,叶片卷缩
⑤	MS+6-BA 0.5+KT 0.5+IBA 0.1	30.0	丛芽较小,叶片卷缩

2.3 培养温度和培养方式对丛生芽诱导的影响

由表 2 可知,培养温度对水毛茛的丛生芽诱导率影响不大,但对苗的生长状态有一定影响,在 25℃ 下培养的丛生芽叶片更绿,苗更加健壮。其次,液体培养基中的丛生芽诱导率明显高于固体培养基中,而且在液体培养基中的芽叶片展开、节间伸长,苗生长健壮,苗的生长状态明显好于固体培养中的芽,原因可能是水毛茛是沉水植物,对液体培养基更加适应。综上所述,25℃ 较 15℃ 更有利于丛生芽的诱导,液体培养较固体培养更适于水毛茛的丛生芽的生长和诱导培养。

表 2 不同培养温度和培养方式对丛生芽诱导的影响

培养温度 /℃	培养方式	丛生芽诱导率 /%	丛生芽生长情况
25	液体培养	76.0	叶片深绿色,展开,节间伸长
25	固体培养	66.0	叶片深绿色,卷曲,节间不伸长,丛芽呈簇状
15	液体培养	72.0	叶片浅绿色,展开,节间伸长
15	固体培养	60.0	叶片浅绿色,卷曲,节间不伸长,丛芽呈簇状

2.4 生根培养

培养 4 d 后,观察到各组中的苗均开始长出根,根长达到 1.0 cm。培养 20 d 后,根为浅绿色或白色,无根毛。从表 3 可知,IBA 的浓度为 2.0 mg/L 时,诱导根的效果最好,生根率达到 72%,平均生根数 4.71 条。当 IBA 的浓度在 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 5 个水平变化时,生根率和生根数先升高再降低,但根长变化不显著,可见

IBA 的浓度过高和过低都不利于根的诱导,但 IBA 的浓度变化对根长没有显著影响。当 NAA 浓度在 0.1、0.5、2.0 mg/L 3 个水平变化时生根率和生根条数都呈先升高再降低的趋势,根长的变化不大,说明低浓度的 NAA 有利于水毛茛根的诱导,高浓度 NAA 不利于水毛茛根的诱导。在同一浓度水平下比较 IBA 和 NAA 诱导根的作用,在生根率上,IBA 和 NAA 的诱导生根率相差不大,而在根数和根长上比较,加入 IBA 试验组的诱导效果都明显优于加入 NAA 的试验组,由此可知,NAA 诱导根的效果明显不及 IBA。因此,在几个激素浓度中附加 2.0 mg/L IBA 的培养基最适于水毛茛的生根培养。

表 3 不同浓度 IBA 和 NAA 对生根的影响

组别	IBA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	生根率 /%	平均根数 /条	平均根长 /cm
1	0.1	0	34.0	3.24	2.85
2	0.5	0	54.0	3.93	2.37
3	1.0	0	66.7	3.43	2.47
4	2.0	0	72.0	4.71	2.50
5	3.0	0	35.0	2.87	2.36
6	0	0.1	48.0	2.3	1.63
7	0	0.5	52.0	2.35	1.69
8	0	2.0	28.0	1.71	1.79

2.5 练苗移栽

移栽 20 d 后,以河沙为基质的水毛茛成活率达到 60.0%,部分苗出现叶片腐烂现象,且苗生长较细弱,无新叶和根长出。在移栽过程中细沙中的细小颗粒会把苗包裹起来,妨碍叶片的生长。而在不用基质的自来水中水毛茛的成活率不仅达到 63.3%,还有叶片和新根长出。所以,以不用基质的自来水培养为最佳的移栽方式。

3 结论与讨论

水毛茛茎段经消毒处理后培养 40 d,丛芽诱导率达到 54%,表明以水毛茛带腋芽茎段为外植体易于诱导获得丛生芽。在增殖培养中,通过在 MS 培养基中添加 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.1 mg/L 的 IBA 可以直接由腋芽诱导获得大量丛生芽,再对芽进行生根培养,可以快速

获得大量完整植株。

水毛茛在液体培养基中的生长状态和丛芽诱导率明显优于固体培养基中。有相关研究也表明,在液态培养基和固液结合培养基中,沉水植物的增殖和生长更加良好,生根率更高。可能原因是沉水植物长期生长于水环境中,对湿度的要求较高,而且沉水植物的茎和叶纤细易失水,在固态的琼脂培养基中,瓶内湿度较低,组织失水过快,会很快枯萎。另一方面,沉水植物通常具有比较发达的通气组织,在液体培养基和固液培养基中也能正常的进行光合作用和呼吸作用。在菹草(*Potamogeton crispus*)^[9]和香蕉草(*Nymphoides aquatica*)^[10]的组培研究中液体培养都明显优于固体培养,而且有利于组培苗的生根和壮苗。所以与液体培养基相比,固体培养基更适于沉水植物的组织培养。

参考文献

- [1] 颜素珠,中国水生高等植物图说[M]. 北京:科学出版社,1983:98-99.
- [2] 赵晨,吴学灿,夏峰.滇池水生植物研究概述[J]. 云南环境科学,1999,18(3):5-9.
- [3] 胡彦春,魏铮,洪剑明.低温下几种沉水植物对生活污水深度处理效果的研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(4):1573-1575.
- [4] 袁婧,崔国发,雷霆.影响北京地区湿地沉水植物群落组成的主要水环境因子[J]. 生态学杂志,2009,28(11):2189-2196.
- [5] 肖德荣,田昆,张利权.滇西北高原纳帕海湿地植物多样性与土壤肥力的关系[J]. 生态学报,2008,28(7):3116-3123.
- [6] 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[J]. 植物生理学通讯,2004,40(2):204.
- [7] 孙月芳,陆瑞菊,周润梅,等.观赏水草的离体培养[J]. 上海农业学报,2004,20(2):17-19.
- [8] 韦三立,韩碧文.大宝塔草的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):332.
- [9] 高健.沉水植物繁殖生理与组培快繁研究[D]. 武汉:华中师范大学,2006.
- [10] 饶秋容,张芬,古志渊.香蕉草的固体培养和液体培养[J]. 植物生理学通讯,2003,39(2):143.

Study on Tissue Culture of *Batrachium bungei*

CHEN Ze-ying¹, PU Xiao-lan², LIN Ping¹, WU Rong¹, TAO Shun-jiang², ZHANG Yuan-wei²

(1. College of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. College of Natural Resources, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: Taking stem segments with axillary buds of *Batrachium bungei* as explants, by the method of isolated culture was studied. The cluster buds was induced by stem with auxiliary bud in the medium of MS with 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L IBA, and the induction rate reached 66.7%. The optimal culture medium for rooting was 1/2MS with 2.0 mg/L IBA, and the induction rate reached 72.0%. Studied culture methods and culture temperature, Results showed that liquid culture was more conducive than solid culture to the induction and growth of buds. The fit culture temperature was 25℃. After culture-bottle seedlings hardened for 3 d, they were transplanted into Running water. Their survival rate was 63.3%.

Key words: *Batrachium bungei*; buds; liquid culture; solid culture