

水芹的组织培养及快速繁殖研究

许文一, 高洋, 马依妮, 孙慧超, 姜长阳* (辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116021)

摘要 [目的] 更好保护野生植物资源水芹, 并为其人工栽培提供依据。[方法] 以水芹嫩茎为外植体, 研究水芹愈伤组织的诱导和分化及试管苗生根、移栽、扦插的条件。[结果] MS+BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L 是诱导水芹嫩茎形成具有分化能力愈伤组织的最佳培养基。MS+AgNO₃ 0.4 mg/L+BA 0.2 mg/L 是诱导水芹愈伤组织和不定芽分化的最佳培养基。1/3 MS+IAA 0.6 mg/L 是水芹不定芽生根培养和生根继代培养的最佳培养基。以炉灰渣为试管苗的移栽扦插基质, 移栽成活率为 99%, 扦插成活率为 94%。移栽和扦插的水芹试管苗具有生长快和长势旺的特点, 90 d 收获的鲜食茎叶比野生水芹增产 15%, 根系为野生植株的 2 倍。[结论] 在生产上, 应采用试管苗生根继代培养的方法进行水芹的快速繁殖。

关键词 水芹; 愈伤组织; 无性系; 快速繁殖

中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)14-05761-02

Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation of *Oenanthe javanica* (Blume) DC.

XU Wen-yi et al (College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116021)

Abstract [Objective] The research aimed to protect wild plant resource *Oenanthe javanica* (Blume) DC. better and provide basis for its artificial planting. [Method] With the tender stem of *O. javanica* as explant, the conditions of the callus induction and differentiation, the rooting, transplanting and cutting of test-tube seedling in *O. javanica* were studied. [Result] The optimum medium for inducing the tender stem of *O. javanica* to form the tissue with the differentiation ability was MS+BA 0.5 mg/L+NAA 1mg/L. The optimum medium for inducing the differentiation of the callus and adventitious buds in *O. javanica* was MS+AgNO₃ 0.4 mg/L+BA 0.2 mg/L. The optimum medium for the rooting culture of the adventitious buds and the rooting subculture in *O. javanica* was 1/3 MS+IAA 0.6 mg/L. When the stove ash and slag were taken as the transplanting and cutting matrix of test-tube seedling, the transplanting survival rate was 99% and the cutting survival rate was 94%. The transplanted and cut test-tube seedling of *O. javanica* had the characteristics of fast growth and good growth vigour. The fresh-eating stems and leaves harvested on the 90th d were increased 15% than wild *O. javanica* and the root was twice as wild plants. [Conclusion] In the production, the rapid propagation of *O. javanica* should be made by using the rooting subculture method of test-tube seedlings.

Key words *Oenanthe javanica* (Blume) DC.; Callus; Clone; Rapid propagation

水芹(*Oenanthe javanica*)属于伞形科水芹属多年生湿地草本植物^[1-2], 全株含有多种营养成分, 被作为常见的野菜食用; 并且水芹全草具有清热解毒、凉血降压、明目利水等药用功效, 能治多种疾病^[2-3]。因此, 近年来辽宁南部地区人们对其进行了广泛的采收, 导致野生水芹很难形成种子, 难以进行繁殖, 致使水芹的分布区域及数量越来越少。辽宁南部山区的农民虽已试图种植水芹, 但因难以采集到种子, 而只能挖取野生植株作为种苗。这不仅无法满足人们栽培的需要, 还使这种植物的野生资源遭到了严重破坏。因此, 笔者对水芹进行了组织培养及无性系建立的研究, 以期对这种具有重要价值的野生植物进行保护, 并为满足人们栽培的需要提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料 野生水芹植株; 吲哚乙酸(IAA)、苄氨基嘌呤(BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、 α -萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)等激素; 蛋白胨, 蔗糖等。

1.2 方法

1.2.1 材料灭菌。 将从大连郊区河边采回的生长非常旺盛的水芹嫩茎剪下, 放到 500 ml 的广口瓶中, 流水冲洗 20 min 左右, 用浓度 0.05% 安利洗涤液振荡洗涤约 10 min, 移至超净工作台上, 用无菌水洗涤 2 次, 倒入浓度 75% 乙醇灭菌约 10 s 后, 迅速用无菌水洗涤 1 次, 再用浓度 0.05% HgCl₂ 溶液振荡灭菌 12 min, 接着用无菌水洗涤 5 次, 再将无菌嫩茎切成长约 0.3 cm 的茎段, 接种到相应的固体培养基上, 进行培养观察。

1.2.2 培养条件设置。 以 MS 和 1/3 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。以 MS 为基本培养基时, 加蔗糖 30 g/L; 以 1/3 MS 为基本培养基时, 加蔗糖 10 g/L; 培养基基力强度为 180 g/cm²⁴⁹, pH 值 5.8~6.0, 培养温度 18~26 °C, 光照 12 h/d, 光照度 3 000 Lx 左右。

1.2.3 试验流程。

(1) 诱导愈伤组织。将无菌茎段接种到以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 BA、2,4-D、IAA 和 NAA 的培养基上, 进行愈伤组织的诱导, 每种培养基接种 40 个茎段。接种培养 60 d 观察统计。

(2) 愈伤组织的分化。把上述继代培养的颗粒状愈伤组织分成直径约为 0.2 cm 块状后, 接种到以 MS+AgNO₃ 0.4 mg/L 为基本培养基, 附加不同浓度的 BA、IBA、IAA 的培养基上进行分化培养, 每种培养基接种 100 块愈伤组织, 培养 20 d 左右, 在有的培养基上可见分化出不定芽。培养 60 d 时观察统计。

(3) 不定芽的生根培养和继代快速繁殖。把愈伤组织培养分化的不定芽从基部剪下, 接种到 1/3 MS+IAA 0.6 mg/L 的培养基上进行生根培养。把生根培养的试管苗剪成具有一个腋芽的茎段(平均每棵试管苗可剪成 4.2 个茎段), 继续进行生根继代培养, 在进行剪段生根继代培养时, 将生根试管苗基部保留一个腋芽继续培养。

(4) 试管苗的移栽和扦插。①移栽。打开生根试管苗培养瓶的瓶塞, 置于 4 000 Lx 左右的光照下炼苗 3~4 d 后, 将试管苗从培养瓶中取出, 剪下上半段, 洗净基部的培养基, 把具有根的试管苗移栽到表层约为 6 cm 厚的炉灰渣、下层为肥沃园土的温室苗床上。弥雾浇透水, 保持湿度在 95% 以上, 温度 18~28 °C, 在无直射光照的条件下培养。②扦插。将

作者简介 许文一(1987-), 男, 辽宁大连人, 本科生, 专业: 生物科学。

* 通讯作者。

收稿日期 2008-02-18

移栽试管苗上半段和没有经过炼苗的生根试管苗的茎剪下取出后,剪成具有 2 个生长点、长 1.5 cm 以上的茎段,将下部剪口放到 40 mg/L 的 NAA 溶液中处理 3 min 左右,扦插到已经浇透水并打上了深约 1 cm 小孔的与移栽相同的温室苗床的炉灰渣上,随即弥雾喷浇清水淤闭插孔后,再按照与移栽试管苗相同的条件进行管理。③移植。从 4 月下旬到 5 月上旬,将在温室中移栽成活的试管苗移植到生长着野生水芹的河边。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导结果 表 1 表明,在不用激素 NAA 的培养基上不能诱导茎段形成愈伤组织;而浓度分别为 0.0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 的 BA 与浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 的 NAA 配合使用时,大多数茎段能诱导形成愈伤组织,但诱导的愈伤组织生长速度及外部形态差异较大。其中浓度 0.5 mg/L 的 BA 与浓度 1.0 mg/L 的 NAA 配合使用时,不仅愈伤组织的诱导率达到了 100%,而且愈伤组织的生长速度快,外观呈绿色的颗粒状,质地疏松。一般认为,这种愈伤组织为具有分化能力的愈伤组织^[9]。在这种培养基上诱导的愈伤组织,经同一培养基上连续继代培养 7 代,不仅所形成的愈伤组织仍具有分化能力,而且愈伤组织培养周期缩短为 50 d,每个继代周期繁殖系数为 44.6。这说明 MS+BA0.5 mg/L+NAA1 mg/L 是诱导水芹嫩茎形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基。

表 1 不同浓度激素对水芹嫩茎愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different hormone concentrations on the callus induction of *Oenanthe javanica* young stem

BA mg/L	2,4-D mg/L	NAA mg/L	IAA mg/L	诱导愈伤组织数 Number of induced callus	愈伤组织诱导率 Induction rate of callus/%	长势
0	0	0	0	0	0	
0.5	0	0	0	0	0	
1.0	0	0	0	0	0	
1.5	0	0	0	0	0	
2.0	0	0	0	0	0	
0	0.5	0	0	0	0	
0.5	1.0	0	0	0	0	
1.0	1.5	0	0	0	0	
1.5	2.0	0	0	0	0	
2.0	2.5	0	0	0	0	
0	0	0.5	0	32	80	+
0.5	0	1.0	0	40	100	++
1.0	0	1.5	0	40	100	+
1.5	0	2.0	0	28	70	+
2.0	0	2.5	0	26	60	+
0	0	0	0.5	0	0	
0.5	0	0	1.0	0	0	
1.0	0	0	1.5	0	0	
1.5	0	0	2.0	0	0	
2.0	0	0	2.5	0	0	

注:++为长势好;+为长势一般。下表同。
Note: ++ stands for good growth vigor; + stands for general growth vigor.
The same as follows.

2.2 愈伤组织的分化结果 表 2 表明,在 BA 单独使用和不含任何激素的培养基上愈伤组织可分化。但从愈伤组织的分化率及分化不定芽的长势来看,在 MS+ AgNO₃ 0.4 mg/L+BA 0.2 mg/L 的培养基上,不仅颗粒状愈伤组织分化率达到了 98%,而且平均每块愈伤组织的分化不定芽数为 12.5 个。将在这一培养基上分化培养的不定芽从基部切下,接种到相同的培养基上进行不定芽的分化继代培养,经过 9 代的继代培养证明,每个继代培养周期为 50 d,每个不定芽平均能分化出 10.4 个不定芽,分化芽呈嫩绿色丛生状,高多在

表 2 不同浓度激素对水芹嫩茎愈伤组织分化的影响
Table 2 Effects of different hormone concentrations on the callus differentiation of *Oenanthe javanica* young stem

BA mg/L	IBA mg/L	IAA mg/L	分化数 Differen- tiation number	分化率 Differen- tiation rate %	每块平均分化 芽数 Number of average differentiated buds per piece	分化苗长势 Growth vigor of differentiated seedlings
0	0	0	76	76	6.8	++
0	0.6	0	0	0	0	
0	1.2	0	0	0	0	
0	0	0.6	0	0	0	
0	0	1.2	0	0	0	
0.2	0	0	98	98	12.5	++
0.2	0.6	0	0	0	0	
0.2	1.2	0	0	0	0	
0.2	0	0.6	13	0	0	
0.2	0	1.2	9	0	0	
0.6	0	0	17	28	3.1	+
0.6	0.6	0	0	0	0	
0.6	1.2	0	0	0	0	
0.6	0	0.6	0	0	0	
0.6	0	1.2	0	0	0	

0.5 cm 以上,且长势好。这说明 MS+AgNO₃ 0.4 mg/L+BA 0.2 mg/L 是诱导水芹愈伤组织和不定芽分化的理想培养基。

2.3 不定芽的生根培养和继代快速繁殖结果 试验结果表明,生根培养接种后 10 d 左右可见形成根原基,随后根系和植株迅速生长。当培养至 25 d 时,96%不定苗可以长出 3~7 条根,形成的试管苗高 5 cm 左右,根系呈绿色,每株试管苗可以长出 4~7 个叶片,长势旺盛粗壮。而生根继代培养 25 d 时又能长成一株高 5 cm 左右的旺盛生根试管苗。这样经过 9 次生根继代培养的试管苗,其生根和长势始终不变。继续培养生根试管苗基部保留的腋芽,20 d 左右又可以生成一株高 5 cm 左右的旺盛试管苗。利用这种方法,只要控制污染,一次接种的生根培养,可以连续培养 3 代迅速生长的生根试管苗,直到培养基完全耗尽为止。在生根培养基基本耗尽时,如果仍然没有污染,再向培养瓶中加入 30~50 ml 已经灭菌不含琼脂的液体生根培养基,又会长出 2 代正常的试管苗。这说明 1/3 MS+IAA 0.6 mg/L 是水芹不定芽生根培养和生根继代培养的理想培养基。

2.4 试管苗的移栽和扦插结果 试验结果表明,在试验条件下试管苗移栽 14 d 后成活,并长出新叶,成活率为 99%。而在试验条件下试管苗扦插后 14 d 成活并正常生长,成活率为 94%。扦插的试管苗前期生长较慢、植株较小,40 d 后开始旺盛生长,但外观长势难与移栽苗基本一致。

2.5 试管苗的移植成活情况及长势 试验结果表明,移栽后成活的试管苗其移植成活率近 100%。移植 2 个月后的试管苗与当年春天萌发生长的野生植株相比,移栽和扦插的水芹试管苗具有生长速度快、长势旺的特点,90 d 时收获的鲜食茎叶比野生水芹增产 15%,根系相当于野生植株的 2 倍。

3 讨论

(1)目前国内外已多有伞形科植物组织培养及无性系建立的报道^[6-13],但还未见水芹组织培养和快速繁殖的报道。该研究以水芹的嫩茎为外植体诱导形成的愈伤组织,能以较高的分化率分化出不定芽,不仅证明水芹的非分生组织细胞也具有较强的全能性,而且建立起了水芹嫩茎的无性系。

(2)水芹嫩茎诱导和继代培养的愈伤组织 50 d 时芽分化数为 10.4,则按照这个速率计算,水芹愈伤组织分化培养

其提早结果。王圣梅等^[31-32]采用温室钵播猕猴桃种间杂交种子,提早育苗,并利用农业技术措施,使幼树提早成形,第2年就出现开花植株,从播种到开花仅用了1.5年,说明采用农业技术措施使多年生作物提早结果是可行的。②扩大和深化果实、种子特异表达启动子效应的研究,对农作物特别是对园艺作物尤为重要。

参考文献

- [1] 侯丙凯,夏光敏,陈正华.植物基因工程表达载体的改进和优化策略[J].遗传,2001,23(5):492-497.
- [2] 王惠,赵德刚,韩玉珍.植物中的异戊烯基转移酶[J].植物生理学通讯,2005,41(5):684-690.
- [3] PANDE P C, SHUKLA S D, KUMAR R. Some consequences of the manipulation of growth in wheat and triticale[J]. Annals of Agricultural Research, 1987, 8(1): 41-46.
- [4] 罗正荣.新植物生长调节剂 CPPU 及其在果实和蔬菜上的应用[J].植物生理学通讯,1993,29(1):297-299.
- [5] 方金豹,黄海,周润生,等. CPPU 对促进猕猴桃增大的研究[J].果树科学,1996,13(S):37-41.
- [6] AKIYOSHI D E, KLEE H, AMASINO R M, et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 5994-5998.
- [7] 张春晓,王文棋,蒋湘宁,等.植物基因启动子研究进展[J].遗传学报,2004,31(12):1455-1464.
- [8] GAN S, AMASINO R M. Inhibition of leaf senescence by auto regulated production of cytokinin [J]. Science, 1995, 270: 1986-1988.
- [9] 付永彩,刘新仿,曹守云,等.水稻中抑制衰老的嵌合基因的基因枪转化和表达分析[J].农业生物技术学报,1997,7(1):17-22.
- [10] 张赛群,叶志彪,吴昌银,等.异戊烯基转移酶基因导入番茄及转基因植株再生[J].园艺学报,1999,26(6):376-379.
- [11] 王亚琴,梁承邨.转 *PSAG12-ipt* 基因水稻耐盐性能的初步研究[J].广西植物,2004,24(6):540-543.
- [12] 王亚琴,梁承邨.转 *PSAG12-ipt* 基因水稻植株的获得及其耐盐性的初步研究[J].高技术通讯,2006,16(11):1176-1180.
- [13] 奚亚军,马晓妮,刘曙东,等.转 *PSAG12-ipt* 基因小麦安全性的初步研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(12):18-22.
- [14] 张治礼,郑学勤,吕应堂. *PSAG12-ipt* 嵌合基因转化樱桃番茄的研究[J].西北植物学报,2005,25(5):864-869.
- [15] 张家长,孙振元,李召虎,等.转 *PSAG12-ipt* 基因结缕草的获得及其衰老特性分析[J].自然科学进展,2005,15(7):818-823.
- [16] 李静,沈法富,于东海,等.转基因抗早衰棉的获得[J].西北植物学报,2004,24(8):1419-1423.
- [17] LAI Q X, BAO Z Y, ZHU Z J, et al. Effects of osmotic stress on antioxidant enzymes activities in leaf discs of *PSAG12-ipt* modified gerbera[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2007, 8(7):458-464.
- [18] 耿颀,麻密,李国凤,等. *ipt* 基因定位表达对转基因烟草育性的影响[J].植物学报,2000,42(2):217-220.
- [19] 毛自朝,于秋菊,甄伟,等.果实专一性启动子驱动 *ipt* 基因在番茄中的表达及其对番茄果实发育的影响[J].科学通报,2002,47(6):444-448.
- [20] 于晓红,朱勇清,陈晓亚,等.种子特异表达 *ipt* 转基因棉花根和纤维的改变[J].植物学报,2000,42(1):59-63.
- [21] 申佩弘,乔越美,武波.水稻醇溶蛋白启动子驱动下的 *ipt* 基因表达及对烟草种子 iPA 含量和种子重量的影响[J].中国农业科学,2004,37(12):1938-1941.
- [22] 张红心,李晓星,苏勇波,等. RP26 启动子连接的 *IPT* 基因的双元载体构建[J].厦门大学学报:自然科学版,2006,45(3):432-435.
- [23] DASKALOVA S, MCCORMAC A, SCOTT N, et al. Effect of seed-specific expression of the *ipt* Gene on *Nicotiana tabacum* L. seed composition[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 51(3):217-229.
- [24] SNOWDEN K C, GARDNER R C. Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):66-84.
- [25] LIN E, BURNS D J W, GARDNER R C. Fruit developmental regulation of the kiwifruit actinidin promoter is conserved in transgenic petunia plants[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 23(3):489-499.
- [26] 朱道圩,王静毅,苗红梅,等.猕猴桃果实特异表达 *ipt* 基因的构建[J].河南农业大学学报,2004,38(2):174-178.
- [27] 王静毅,朱道圩.猕猴桃果实特异表达异戊烯基转移酶基因植物表达载体的构建[J].安徽农业科学,2007,35(16):4773-4774,4788.
- [28] NICHOLAS B D, WILLIAM R F. Hsp70 heat shock protein cognate is expressed and stored in developing tomato pollen[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(4):1031-1039.
- [29] 彭向雷,钟瑾,梁斌,等.用于植物的铜诱导基因表达系统的改进[J].植物学报,2003,45(11):1307-1311.
- [30] KHODAKOVSKAYA M, ZHAO D C, SMITH W, et al. Expression of *ipt* gene controlled by an ethylene and auxin responsive fragment of the LEACO1 promoter increases flower number in transgenic *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(11):1181-1192.
- [31] 王圣梅,武显维,黄仁煌.猕猴桃种间杂交结果初报[J].武汉植物学研究,1989,7(4):399-402.
- [32] 王圣梅,黄仁煌,武显维,等.观赏猕猴桃新品种选育[J].果树科学,1993,10(2):116-118.

(上接第5762页)

年增殖数为10.4⁷³;用生根继代培养的方法进行增殖,按照25 d 增殖4.2倍的增殖率进行计算,年增殖倍数为4.2¹⁴⁶,加上移栽时还可以将移栽苗的上半段剪下来扦插,这样又将繁殖系数提高了1倍,成本不到0.01元/株。这说明不论采用上述哪种方法进行快速繁殖,一年都能繁殖出数百万株水芹试管苗,达到快速繁殖、工厂化育苗的目的,满足生产上需要。在所研究的几种快速繁殖方法中,生根继代培养的快速繁殖方法具有试管苗生长旺盛,几乎没有无效苗的特点。因此在生产上应采用生根试管苗继代培养的快繁方法。

(3)移栽和扦插的水芹试管苗之所以生长旺盛,主要是与试管苗的根系非常发达有关。而试管苗的根系发达除了与自身的遗传因素有关外(所用材料是河边生长非常旺盛的植株),还与在培养过程中使用了生长素有关。生长素的后效作用会使移栽和扦插的试管苗根系细胞产生很强的分生作用,促使扦插和移栽的试管苗形成发达的根系,从而吸收更多的营养,促进试管苗的生长,提高鲜茎叶的收获量。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第五十五卷(第二

分册)[M].北京:科学出版社,1992:202.

- [2] 李书心.辽宁植物志(上册)[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1988:1326-1327.
- [3] 郑汉臣.中国食用本草(植物卷)[M].上海:上海辞书出版社,2003:251-252.
- [4] 姜长阳.培养基琼脂用量计算的商榷[J].植物生理学通讯,1992,28(2):155.
- [5] 安利佳,姜长阳.植物组织培养导论[M].大连:辽宁师范大学出版社,1996:55-72.
- [6] 马骥,乔琦,肖娅萍,等.防风组织培养中畸形胚状体的发生和控制[J].西北植物学报,2005,25(3):552-556.
- [7] 郝建平,周小梅.茴香组织培养中体细胞胚胎发生的组织细胞学研究[J].实验生物学报,1995,28(3):339-347.
- [8] 付扬,陈凤清,孙冬雪,等.大叶柴胡愈伤组织继代培养及其 RAPD 分析[J].长春:东北师范大学学报:自然科学版,2005,37(2):90-92.
- [9] 雒晓芳,杨宁,陈学林,等.当归水培苗组织培养[J].西北师范大学学报:自然科学版,2004,40(4):77-79.
- [10] 杨宁,马瑞君,赵庆芳,等.当归愈伤组织的增殖与分化培养[J].中草药,2005,36(11):1716-1718.
- [11] 郝建平,李宝平.蛇床幼茎培养中体细胞胚胎形成的观察[J].武汉植物研究,1994,12(3):247-250.
- [12] 谭兴,杨军,陈德山,等.白亮独活组织培养和植株再生研究[J].安徽农业科学,2006,34(20):5182-5183,5222.
- [13] 郑世学,董五辈,李学宝.芹菜愈伤组织转化的初步研究[J].华中师范大学学报,1996,30(3):327-329.