

水浮莲无菌苗的获得及其培养体系的优化

蒋刚强 王 瑜 兰海燕 张富春 马 纪

(新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 为了有效地进行水浮莲 (*Pistia stratiotes*) 的基因工程改造, 达到利用水浮莲进行污染水体的植物修复, 本研究建立了水浮莲无菌苗培养体系。采用二次消毒法获得水浮莲的无菌苗, 并研究了萘乙酸 (NAA)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA)、蔗糖、pH 值对其生长的影响, 确立了水浮莲的优化培养体系为: 1/2 MS+ 6-BA 0.25 mg/L+ NAA 0.3 mg/L+ 蔗糖 20 g/L, pH 6.0。水浮莲在此培养基上可快速扩增和长期继代培养, 无菌生长的水浮莲比温室中自然水浮莲的植株形态小, 易于研究操作。

关键词: 水浮莲; 无菌苗; 培养体系优化

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)05-0615-05

水浮莲 (*Pistia stratiotes* L.), 又称大叶莲、大浮萍、大藻、水葫芦, 属天南星目天南星科大藻属多年浮生草本植物, 它不仅分布广泛, 同时也是世界上最令人头痛的杂草之一^[1,2]。由于生命力极强、繁殖速度极快, 它经常堵塞河道, 而且大量的羽状须根易成为蚊虫滋生的栖息地^[3]。但水浮莲可作为家畜的饲料、肥料等, 有多种用途。它是一种对某些环境胁迫有较强抗性的浮水植物, 对垃圾污水具有较强的净化效果^[4,5], 能够净化水体中的硝态氮^[6], 有效地去除水体的富营养化^[7,8], 并对重金属污染有一定的清除作用^[9], 故作为水环境净化植物而受到广泛的重视。植物修复技术是利用植物根系吸收水分和养分的过程来吸收转化污染体, 如土壤和水中的污染物, 以期达到清除污染、修复或治理的目的, 尤其是利用水生植物净化污水中的重金属、降解有机物、持久性有毒污染物及其他有害污染物的研究国内外已有报道。随着植物修复技术研究的深入及其植物基因工程的发展, 可通过对植物进行遗传工程改造, 在植物自身所具有的抗性基础上进一步提高其耐受力和富集能力, 用于环境污染的生物治理。因此, 水浮莲有可能在利用转基因植物进行水体环境治理方面发挥重要作用, 然而作为植物转基因研究的基础步骤, 有关水浮莲组织培养方面的研究尚未见报道。本文研究了 NAA、6-BA、蔗糖、pH 对无

菌水浮莲生长的影响, 获得了水浮莲相对优化的无菌培养体系, 为进一步开展水浮莲转基因的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验材料为引自乌兹别克斯坦, 在本实验室温室水盆中自然繁殖的水浮莲 (*Pistia stratiotes* L.)。

1.2 消毒方法 由于自然繁殖的水浮莲带有大量的微生物, 通过彻底消毒才能清除微生物进行无菌培养。首先选取成熟的水浮莲, 用蒸馏水洗去碎片及污垢, 移去水浮莲的根和大的叶片, 只保留芽点和未伸展的幼叶。将处理过的水浮莲置于消过毒的器皿里, 用无菌刀片切去顶部和基部进一步减小其形状, 注意不要破坏分裂组织。修整过的水浮莲芽再用两种方法进行消毒, 其一是先用 70% 乙醇处理 30s 后, 置于 10% 次氯酸钠溶液中消毒 15 min; 其二是先用 70% 乙醇处理 30s 后, 置于 0.1% HgCl₂ (w/v) 的溶液中处理 5 min, 最后用无菌水冲洗 4—5 次, 并转移至 S 固体培养平板中 (S 为 1/2 MS+ NAA 1 mg/L+ 6-BA 0.5 mg/L+ 蔗糖 15 g/L+ 琼脂 6 g/L, pH 6.0 MS Murashige and Skoog 基本培养基)。每个处理各 10 个培养皿, 每培养皿含有两个水浮莲外植体。培养温度为 (27 ± 3) °C, 光照 2000 lx, 光照时间 15 h/d。

收稿日期: 2006-07-25 修订日期: 2007-05-14

基金项目: 科技部重大基础研究前期研究专项 (2003CCA01000); 新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题 (XJDX0201-200403) 资助

作者简介: 蒋刚强 (1982—), 男, 汉族, 山东省巨野县人; 在读硕士; 主要从事植物基因工程研究。E-mail: jiang480@sina.com

通讯作者: 马纪, Tel: 0991-8583259 E-mail: majiuc@xju.edu.cn

为了进一步清除水浮莲的污染物,将第一次处理得到的水浮莲无菌材料作为起始材料进行第二次消毒处理。将母体上新长出的未接触培养基的幼芽于无菌环境中切下,稍加修整后通过如下步骤处理:

(1) 70% 乙醇处理 30s, 10% 次氯酸钠处理 5min, 无菌水洗 3次; (2) 70% 乙醇处理 2min, 10% 次氯酸钠处理 5min, 无菌水洗 3次; (3) 70% 乙醇处理 30s, 10% 次氯酸钠处理 7min, 无菌水洗 3次; (4) 70% 乙醇处理 30s, 0.1% HgCl₂处理 3min, 无菌水洗 5次; (5) 70% 乙醇处理 30s, 0.1% HgCl₂处理 5min, 无菌水洗 5次。上述处理结束后,将处理好的组织转移到 S培养基 (每个处理各 10个培养皿, 每个培养皿含有两个外植体) 上培养, 培养条件同上。2d和 7d后统计污染率, 20d后统计死亡率。

1.3 培养体系的优化

1.3.1 NAA、6-BA、蔗糖、pH单独对水浮莲生长的影响 将大小一致的水浮莲单株无菌苗接入下列液体培养基中, 每隔 3d统计其新增苗数, 并观察生长状况, 15d后取出置于 - 80℃冰箱, 冻干后称重, 实验重复 3次。NAA: 1/2 MS+ NAA (0.1 0.2 0.3 0.4 0.5) mg/L+ 蔗糖 15g/L, pH 5.8 分别以 CK、N1、N2、N3、N4、N5表示, CK为对照; 6-BA: 1/2 MS+ 6-BA (0.025 0.5 1.0 1.5) mg/L+ 蔗糖 15g/L, pH 5.8 分别以 CK、B1、B2、B3、B4表示, CK为对照; 蔗糖: 1/2 MS+ NAA 0.3mg/L+ 蔗糖 (0.10 20 30 40 60) g/L, pH 5.8, 分别以 S0、S1、S2、S3、S4、S5表示, S0为对照; pH: 1/2 MS+ NAA 0.3mg/L+ 蔗糖 15g/L, pH (4.0 5.0 6.0 7.0), 分别以 P1、P2、P3、P4表示。

1.3.2 NAA、6-BA、蔗糖及 pH的组合对水浮莲生长的影响 在以上基础上对各影响因子采用 L16 (4⁵) 正交设计, 影响因子为 6-BA (0.25 0.5 1.0 1.5mg/L), NAA (0.1 0.2 0.3 0.4mg/L), 蔗糖 (0.10 20 30g/L), pH (4.0 5.0 6.0 7.0)。将大小一致的水浮莲单株无菌苗接入上述培养基中, 观察生长状况, 并统计新增芽数。

2 结果

2.1 消毒效果

第一步处理: 70% 乙醇处理 30s, 10% 次氯酸钠处理 15min 有 4个培养皿污染, 死亡率很高只

有 2个培养皿存活; 70% 乙醇处理 30s, 0.1% HgCl₂溶液处理 5min 有 3个培养皿污染, 5个培养皿存活, 约 18d长出一团小芽。第二步处理: 2d后所有处理无细菌生长; 7d后处理 1有 8个培养皿, 处理 2有 9个培养皿, 所有处理 3处理 4处理 5均为无菌培养物, 10d后也没有观察到微生物的生长。但不同处理的死亡率不同, 处理 1有 6个培养皿存活, 处理 2有 4个培养皿, 处理 3有 4个培养皿, 处理 4处理 5均有 5个培养皿存活。同样将小植株切碎转入培养板中没有检测到内部寄生物, 说明经过两步处理后, 可以有效地获得无菌的水浮莲小苗。但在固体平板培养皿生长的水浮莲小苗生长速度较慢, 形态较小。

2.2 生长曲线

NAA对水浮莲生长的影响 由图 1可看出, 与对照组相比, 不同浓度的 NAA 均能有效地促进水浮莲的快速增殖。第 3天时, N1至 N5的新增芽数稍高于对照组; 第 6天时 N1、N2与对照组相似, 但 N3、N4、N5表现出快速生长的趋势; 9d以后 N1、N2的增长趋势明显高于对照组, N3、N4、N5的增长趋势明显高于 N1、N2。单因素方差分析表明, 6d前 N1至 N5与对照组差异不显著; 9d后, N1、N2与对照组差异不显著, 但 N3、N4、N5与对照组相比, 均达到显著水平。从生物量的增加而言, 也以 N3、N4、N5增长最快 (表 1)。所以 NAA 的浓度在 0.3—0.5mg/L 之间对水浮莲生长的促进作用最大。在含有不同浓度 NAA 的培养液中生长的水浮莲外部形态正常, 个体大小与对照组相似, 但均比自然生长的要小。

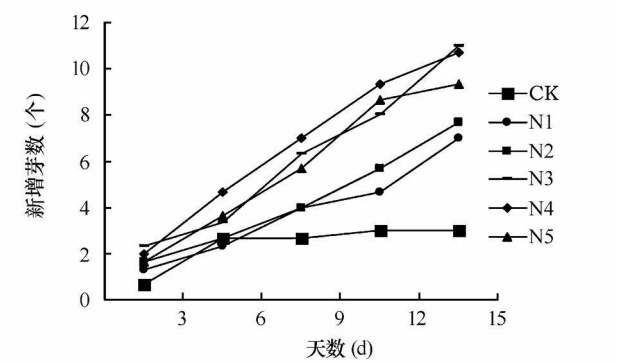


图 1 不同浓度 NAA 对水浮莲生长的影响

Fig 1 The effects of NAA on the growth of *Pistia stratiotes*

表 1 不同条件处理植株的生物量变化

不同条件		NAA						6-BA				
植株重量 (g)		N0	N1	N2	N3	N4	N5	B0	B1	B2	B3	B4
初重 (0d)		0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120
末重 (15d)		0.873	1.673	2.380	2.640	2.620	2.550	0.873	0.980	0.966	1.092	1.210

不同条件		蔗糖						pH			
植株重量 (g)		S0	S1	S2	S3	S4	S5	P1	P2	P3	P4
初重 (0d)		0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120
末重 (15d)		0.560	2.720	2.592	1.392	0.820	0.860	2.580	2.612	2.740	2.630

6-BA 对水浮莲生长的影响 图 2 表明不同浓度的 6-BA 亦能有效地促进水浮莲的增殖。第 3 天时, B1 至 B3 的新增芽数稍高于对照组, 但 B4 的增殖芽数远高于对照组; 第 6 天时, B1 至 B5 以及对照组都有较大幅度增长, 6d 后各组增长幅度缓慢。纵观全图而言: B1 与对照组相似; B2 与 B3 增长幅度相似, 均高于 B1 与对照组; B4 的增长幅度显著高于其他组。单因素方差分析表明, B4 与对照组差异显著, 表明 6-BA 浓度的增加能明显促进芽的增殖, 但生物量的增加差异不大。

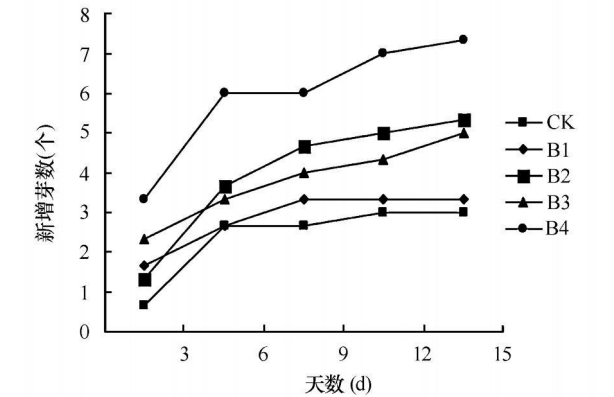


图 2 不同浓度 6-BA 对水浮莲生长的影响

Fig 2 The effects of 6-BA on the growth of *Pistia stratiotes*

蔗糖对水浮莲生长的影响 当蔗糖浓度为 10g/L 和 20g/L 时, 水浮莲芽数的增长很快, 显著高于其他组 (图 3)。单因素方差分析表明 S1 与 S2 差异不显著, 但与对照比均达到显著水平, 从生物量增加而言 S1 与 S2 同样优于其他组 (表 1), 说明蔗糖的最适浓度可能在 10—20g/L 之间。不加蔗糖时增长速度最慢, 形态还算正常。但蔗糖浓度一旦超过 30g/L, 就明显抑制其增殖。当升至 40—60g/L 时, 其新增芽数不但少, 且植株形态极不正常, 植株形态变小且叶片发黄。

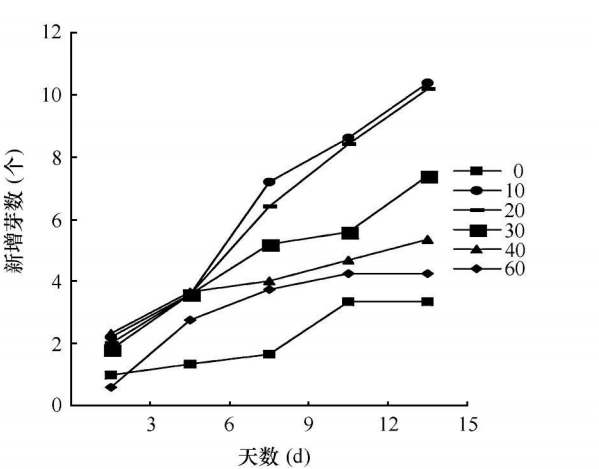


图 3 不同浓度蔗糖对水浮莲生长的影响

Fig 3 The effects of sucrose on the growth of *Pistia stratiotes*

pH 对水浮莲生长的影响 从图 4 可以看出 4 组的生长趋势差异不大, 单因素方差分析表明 4 组差异不显著, 另外从生物量角度分析差异也不大 (表 1), 表明 pH 值对增长的影响不是太大。其生长状态正常。

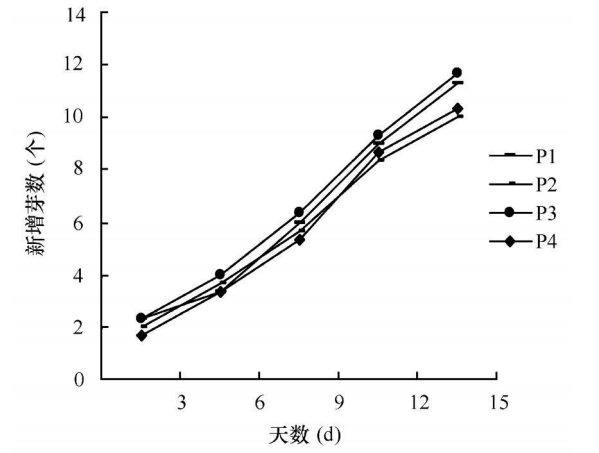


图 4 不同 pH 对水浮莲生长的影响

Fig 4 The effects of pH on the growth of *Pistia stratiotes*

最佳优化条件 对各处理梯度的新增芽数及生长状况统计分析结果(表 2), 处理 3 为最优组合, 由此得到无菌条件下相对优化的培养体系为: 1/2MS+

6-BA 0.25mg/L+ NAA 0.3mg/L+ 蔗糖 20g/L, pH 6.0 水浮莲在此梯度中, 繁殖速度快, 形态正常, 且形状大小较为一致。

表 2 不同因子组合对水浮莲生长的影响
Tab. 2 Effects of various factors ration on the growth of *Pistia stratiotes*

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	蔗糖 (g/L)	pH	新增芽数 (个)	生长状态
1	0.25	0.1	0	4.0	4.3	弱小
2	0.25	0.2	10	5.0	9.6	正常
3	0.25	0.3	20	6.0	13.5	正常
4	0.25	0.4	30	7.0	11.3	畸形
5	0.5	0.1	10	6.0	8.1	正常
6	0.5	0.2	0	7.0	4.6	弱小
7	0.5	0.3	30	4.0	11.6	畸形
8	0.5	0.4	20	5.0	12.1	正常
9	1.0	0.1	20	7.0	7.4	正常
10	1.0	0.2	30	6.0	8.7	畸形
11	1.0	0.3	0	5.0	4.2	弱小
12	1.0	0.4	10	4.0	9.9	正常
13	1.5	0.1	30	5.0	10.3	畸形
14	1.5	0.2	20	4.0	9.4	畸形
15	1.5	0.3	10	7.0	8.7	畸形
16	1.5	0.4	0	6.0	5.1	弱小

形态及解剖学研究 除了形状变小外, 形态上与自然生长的大体一致, Sculthorpe^[1]所描述的形态学特点主要指轮生叶、大量的须根、匍匐茎繁殖等。无菌苗在培养瓶中生长良好, 产生足够的叶、大量的根及一定数量的通过匍匐茎繁殖的植株。通过徒手切片观察, 叶的厚度有所减小, 但解剖学结构并未发生变化。

3 讨论

获得无菌材料时, 外植体消毒的基本要求是既要杀死表面的全部微生物, 使污染率降到最低, 又要使外植体保持活力。因此, 应当正确选择消毒剂的浓度和处理时间, 以尽量减少组织的死亡。水浮莲密被纤毛且有大量须根, 带有大量的微生物, 很难彻底消毒。另外灭菌时极易在纤毛和溶液之间形成微小气泡而致使灭菌失败, 应用镊子轻轻摇动外植体, 以赶走附在其表面的小气泡。Nathan *et al.* 采用 70% 乙醇处理 5min 然后 10% 次氯酸钠处理 20min 对水浮莲进行消毒^[10]。但我们采用上述消毒方法后外植体全部死亡, 故实验中将 70% 乙醇处理时间减少为 30s, 10% 次氯酸钠处理时间减少为 15min, 提高了水浮莲材料存活率。0.1% HgCl₂ 是较强的杀菌剂, 用它来消毒也取得不错的效果, 但 Hg²⁺ 的残留对外植体的毒害较大, 因此必须用无菌水彻底

涮洗灭菌后的水浮莲外植体, 把残留量降低到最低限度。本研究表明对水浮莲外植体先用 70% 乙醇浸泡 30s 再以 10% 次氯酸钠处理 15min 或 0.1% HgCl₂ 处理 5min 能够取得较理想的无菌效果。

通过 NAA、6-BA 对其生长影响的比较发现 NAA 对其生长的促进作用最大, 6-BA 次之。在培养中尝试用 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D), 研究发现当 2,4-D 浓度超过 0.4mg/L 时, 不利于水浮莲的生长, 叶片发黄, 根变粗呈竹节状, 故液体培养时不宜采用。蔗糖浓度以 10—20g/L 为宜, 浓度太低生长速度慢是因为没有充足的碳源来满足其快速生长的需要; 浓度太高则影响了培养液渗透势, 给细胞造成水分胁迫, 干扰了正常的生理代谢过程。水浮莲在固体培养基上生长不良, 形态较小。推测是由于其自然生长在液体环境中, 充足的水分是其生长所必需的, 而在固体培养基中水分被琼脂所束缚, 没有足够的水分满足其代谢的需要。所以无论给它添加多少激素或营养元素, 也只是在初期诱导芽的数量上有所不同, 但在后期的生长状况上没有太大的区别, 植株形态无一例外的非常小, 且都不正常。

Chadwick Obeid 及 Pieterse *et al.* 的研究表明光照强度、光照时间、温度、有机或无机营养元素水平等因素存在复杂的交互作用, 在水浮莲的无菌培

养中不应忽视^[11, 12]。确立水浮莲的无菌培养的最优生长条件,有待于深入的探索。

水浮莲是不耐低温的植物,在广大寒温带地区,当秋冬气候渐冷时,水浮莲即逐渐停止生长乃至死亡,其对水体污染的净化修复作用随之降低甚至丧失,这也是水浮莲作为水生植物净化修复系统的限制因素之一。利用抗冻蛋白基因转化水浮莲,提高其对低温的耐受能力,不仅可以用于检测抗冻蛋白的功能,也可扩大水浮莲的地区分布范围,具有重要的理论和应用价值。

参考文献:

- [1] Sculthorpe C D. The biology of aquatic vascular plants [M]. London Edward Arnold 1967
- [2] Hohn L G, Plucknett D L, Pancho J V, *et al*. The world's worst weeds [M]. Hawaii Honolulu Univ Press 1977
- [3] Kengne IM, Brissaud F, Akoa A, *et al*. Mosquito development in a macrophyte-based wastewater treatment plant in Cameroon (Central Africa) [J]. *Ecological Engineering*, 2003, **21**: 53—61
- [4] Erkin R, Abdurkin R, Ghupur M, *et al*. Study on purification of ephedrine factory's sewage by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) in medium scale experiment [J]. *China Environmental Science*, 2000, **20**(5): 409—413 [艾尔肯·热合曼, 阿不都克力木·热合曼, 吾甫尔·米吉提, 等. 利用水浮莲净化麻黄素厂污水的中试研究. 中国环境科学, 2000, **20**(5): 409—413]
- [5] Gofur M, Erkin R, Sultan A, *et al*. Practice of purifying city wastewater by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) [J]. *China Environmental Science*, 2002, **22**(3): 268—271 [吾甫尔·米吉提, 艾尔肯·热合曼, 苏里坦·阿巴拜克力, 等. 利用水浮莲(*Pistia stratiotes* L.)净化城市污水的实践. 中国环境科学, 2002, **22**(3): 268—271]
- [6] Lin Y F, Jing S R, Wang T W, *et al*. Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands [J]. *Environmental Pollution*, 2002, **119**: 413—420
- [7] Sooknah R D, Wilkie A C. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater [J]. *Ecological Engineering*, 2004, **22**: 27—42
- [8] Shao L G. Experiment Research in Purification on Nutrient Lakes by means of *Pistia Stratiotes* [J]. *Environment and Exploitation*, 2001, **16**(2): 28—30 [邵林广. 水浮莲净化富营养化湖泊试验研究. 环境与开发, 2001, **16**(2): 28—30]
- [9] Maine M A, Sune N L, Lager S C. Chromium bioaccumulation comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes [J]. *Water Research*, 2004, **38**: 1494—1501
- [10] Nathan M T, Todd A K, Paula N, *et al*. Axenic culture of *Pistia stratiotes* for use in plant biochemical studies [J]. *Aquatic Botany*, 1998, **60**: 161—168
- [11] Pieterse A H, Lange I, Verhagen L A. A study on certain aspects of seed germination and growth of *Pistia stratiotes* L. [J]. *Acta Botanica Neerlandica*, 1981, **30**: 47—57
- [12] Chadwick M J, Obeid M. A comparative study of the growth of *Eichhornia crassipes* Solms and *Pistia stratiotes* L. in water culture [J]. *Ecology*, 1966, **54**: 563—575

ESTABLISHING OF OPTIMIZED SYSTEM FOR THE AXENIC CULTURE OF *PISTIA STRATIOTES*

JIANG Gang-Qiang WANG Yu LAN Ha-Yan ZHANG Fu-Chun and MA Ji

(Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University,

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046)

Abstract Plants have many endogenous genetic, biochemical and physiological properties that make them ideal tools for soil and water remediation. The genetic engineering plants open up the new possibilities for the phytoremediation. *Pistia stratiotes* may be a useful plant in remediation of water pollutants by transgenic engineering.

Pistia stratiotes is a widely distributed free-floating perennial hydrophyte. Because a large number of organisms are associated with non-axenic *Pistia stratiotes*, it is important to obtain the axenic culture materials of *Pistia stratiotes*. Some have developed axenic *Pistia* cultural system and studied the effects of phytohormone, sucrose and pH on its growth. The results showed that both phytohormone and sucrose have significant effects on the growth of cultured *Pistia stratiotes*, while pH has little effect. The optimized culture system was determined as following: 1/2MS + 6-BA 0.25mg/L + NAA 0.3mg/L + sugar 20g/L and pH 6.0. The axenic *Pistia stratiotes* was comparable to the greenhouse-grown plants except for the smaller size. These results will provide a useful basis for genetic transformation of *Pistia stratiotes* for the remediation of water pollutants.

Key words *Pistia stratiotes*; Axenic culture; Optimized system