

全缘贯众的组织培养及无性系建立

李世国, 佟少明

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要: 以蕨类植物全缘贯众根茎、叶片和叶柄为外植体诱导愈伤组织, 选取诱导率最高的根茎愈伤组织为材料诱导分化形成幼叶, 继续培养成生根试管苗, 建立起全缘贯众的无性系。结果表明, $1/2$ MS + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 2,4-D ($1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + NAA ($1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 是诱导根茎愈伤组织的最佳培养基; 愈伤组织分化形成幼叶的最佳培养基是 $1/2$ MS + BA ($0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + NAA ($0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 试管苗生根培养的最佳培养基是 $1/3$ MS + IAA ($0.6\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 移栽后根茎上的须根比对照野生苗增加 1.5~2.5 倍。

关键词: 全缘贯众; 组织培养; 无性系

中图分类号: Q943.1

文献标志码: A

文章编号: 1003-4978(2008)02-0181-04

Tissue Culture and Clone Construction of *Cyrtomium falcatum* (L.f) Presl

LI Shi-guo, TONG Shao-ming

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Liaoning Dalian 116029, China)

Abstract: The rhizome, leaf and leafstalk of *Cyrtomium falcatum* (L.f) Presl were used as explants to induce callus. The highest rate was on rhizome. The differentiation of germinal leaf and radication of seedlings was studied. Then the clone of it was established. The results indicated that $1/2$ MS + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 2,4-D ($1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + NAA ($1.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was the perfect medium for inducing callus; the best medium for forming germinal leaf from callus was $1/2$ MS + BA ($0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + NAA ($0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); $1/3$ MS + IAA ($0.6\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was suitable medium for seedlings radication. The number of fibrous root on rhizome was 1.5~2.5 times than that of the wild.

Key words: *Cyrtomium falcatum* (L.f) Presl; tissue culture; clone

0 引言

全缘贯众(*Cyrtomium falcatum* (L.f) Presl), 鳞毛蕨科贯众属多年生草本植物^[1], 辽宁、河北等地有分布, 主要生长于林下、灌丛中或沿海潮线以上的石壁上。全缘贯众的根茎中含有绵马酸类、贯众素等有效成分, 具有清热解毒、凉血止血、驱虫等药效^[2]。近年来受人为采集和生态环境破坏等因素的影响, 使本来分布稀、数量少的种质资源受到了严重破坏, 导致其野生种类分布区域和数量迅速减少、品质下降, 已经成为辽宁地区的濒危物种^[3]。为满足人们的药用需求, 逐渐开始进行人工栽培。由于该物种的孢子在人工条件下很难萌发, 所以只能挖取野生根茎作为人工栽培的种源, 这也加剧了全缘贯众野生资源的破坏。

尽管目前已经有多种蕨类植物组织培养及无性系建立的研究^[4-14], 但只是限于蕨类植物中的一少部分, 且多集中于肾蕨、鹿角蕨、凤尾蕨和一些观赏性种类, 全缘贯众组织培养迄今未见报道。为此, 我们进行了全缘贯众的组织培养和无性系建立的研究, 以期对开发和保护全缘贯众的野生资源提供一定的材料来源和技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌

将采自大连棒锤岛的全缘贯众根茎、叶片和叶柄用清水冲洗约 15 min, 放入 500 mL 的磨口广口瓶中,

收稿日期: 2007-07-02

作者简介: 李世国(1982-), 男, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 从事植物生物技术研究。

用 0.05 % 的安利液振荡洗涤 3 次, 再用无菌水洗涤 2 次, 然后将材料移到超净工作台上. 用无菌的手术刀片将根茎和叶柄切成 1 cm 长的外植体段, 叶片切成 1 cm×0.5 cm 的长方形, 于广口瓶中依次用 75 % 的乙醇灭菌 30 s, 0.05 % 的 HgCl_2 溶液振荡灭菌 2 min, 再用 0.03 % 的 HgCl_2 溶液振荡灭菌 10 min, 最后用无菌水振荡洗涤 5 次即获得无菌材料.

1.2 培养条件

以 1/2 MS、1/3 MS 为基本培养基, 附加不同种类及浓度的细胞分裂素和生长素; 固体培养基琼脂含量为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 愈伤组织诱导和分化幼芽的培养基含蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根培养基为 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 5.6~5.8; 培养温度 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$; 愈伤组织在培养基上暗培养; 芽和根的诱导均于光照条件下进行, 光照时间 12 h/d, 光照强度 2 000 lx 左右; 炼苗于温室大棚中进行, 光照强度 4 000 lx 左右, 时间 12 h/d, 温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

2 结果分析

2.1 不同培养基对全缘贯众愈伤组织诱导的影响

将材料接种在附加不同浓度生长素配比的 1/2 MS+ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (单位下同略)+BA (0.5) 培养基上暗培养, 切口损伤部位直接接触培养基. 培养 40 d 左右, 切口表面张裂, 长出较为松散的愈伤组织. 继续培养到 80 d 观察统计, 结果见表 1. 在添加生长素的培养基上几乎都能形成愈伤组织. 单独使用某种生长素时, 其浓度不同对愈伤组织的诱导率不同, 一般情况下诱导率随着浓度的提高而增大; 但当两种生长素配合使用且浓度同时超过 1.2 时, 愈伤组织诱导率有降低的趋势. 可见高浓度生长素抑制了愈伤组织的生长. 从三种材料的诱导率看, 根茎的诱导率最高, 叶片次之, 叶柄最差. 以根茎为材料, 在 2,4-D 与 NAA 的浓度为 1.2 的培养基上, 愈伤组织的诱导率达到了 95.00 %, 生长速度也较快. 观察发现, 该培养基上诱导生长的愈伤组织初期为略带黄色的不规则形状, 80 d 后成为黄色颗粒状, 这种愈伤组织具有分化能力^[15,16]. 上述结果表明, 在本研究所设计的培养基中, 1/2 MS+ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (100)+BA (0.5)+2,4-D (1.2)+NAA (1.2) 对诱导全缘贯众根茎形成具有分化能力的愈伤组织效果最佳.

表 1 不同浓度生长素对全缘贯众愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 The effects of different concentrations of auxins on callus induction

生长素浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		叶片诱导结果		根茎诱导结果		叶柄诱导结果	
NAA	2,4-D	诱导数/颗	诱导率/%	诱导数/颗	诱导率/%	诱导数/颗	诱导率/%
0	0	0	0	0	0	0	0
0.4	0	0	0	5	6.25	0	0
0.8	0	9	11.25	14	17.50	0	0
1.2	0	12	15.00	25	31.25	8	10.00
1.6	0	17	21.25	33	41.25	14	17.50
2.0	0	23	28.75	46	57.50	18	22.50
0	0.4	17	21.25	12	15.00	2	2.50
0	0.8	27	33.75	38	47.50	12	15.00
0	1.2	47	58.75	56	70.00	21	26.25
0	1.6	63	78.75	72	90.00	26	32.50
0	2.0	58	72.50	74	92.50	28	35.00
0.4	0.4	21	26.25	32	40.00	16	20.00
0.8	0.8	47	58.75	53	66.25	29	36.25
1.2	1.2	66	82.50	76	95.00	49	61.25
1.6	1.6	55	68.75	68	85.00	36	45.00
2.0	2.0	57	71.25	64	80.00	32	40.00

注: 接种数量均为 80 颗

2.2 愈伤组织的继代与幼芽分化培养

将在 1/2 MS+ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (100)+BA (0.5)+2,4-D (1.2)+NAA (1.2) 培养基上诱导出的根茎愈伤组织接种到相同培养基上, 转到光照条件下进行继代培养. 培养 7 d 左右, 愈伤组织逐渐变成绿色, 并开始迅速生长增殖; 当培养到 50 d 时, 愈伤组织平均生长增殖率为 32 倍, 连续继代培养 9 代, 其生长增殖速度与外部

形态基本保持不变.把继代培养的愈伤组织接种到如表 2 的培养基中进行分化培养.接种后 20 d,培养基上可见分化出幼叶,且随着培养时间的延长逐渐形成布满培养基表面的丛生叶.45 d 时进行统计,结果如表 2 所示,可以看出只有部分培养基能诱导愈伤组织分化.其中在 1/2 MS+BA(0.2)+NAA(0.1)培养基上分化率达 99.0 %,分化的丛生叶长势较旺盛.把该丛生叶切成基部具有 3~5 个叶的愈伤组织叶丛,接种到相同培养基上分化继代培养,45 d 后仍会分化出生长较旺盛的丛生嫩叶,平均分化增殖率为 20.6 倍.经过连续 11 次的继代培养,其分化率和长势基本保持不变,由此可知该实验中全缘贯众根茎愈伤组织幼芽分化的最佳培养基为 1/2 MS+BA (0.2)+NAA (0.1).

表 2 不同植物生长物质浓度对比对全缘贯众根茎愈伤组织幼芽分化的影响

Tab.2 The effects of different concentrations of plant growth substances on callus differentiation

植物生长物质浓度/(mg·L ⁻¹)		1/2 MS			1/3 MS		
BA	NAA	分化数/颗	分化率/%	长势	分化数/颗	分化率/%	长势
0	0	0	0		0	0	
0.2	0	121	60.5		24	12.0	+
0.2	0.1	198	99.0	+++	124	62.0	++
0.2	0.2	164	82.0	++	69	34.5	+
0.2	0.5	86	43.0	+	8	4.0	
0.2	1.0	0	0		0	0	
0.5	0	0	0		0	0	
0.5	0.1	78	39.0	+	56	28.0	+
0.5	0.2	27	13.5	+	42	21.0	+
0.5	0.5	0	0		0	0	
0.5	1.0	0	0		0	0	
1.0	0	0	0		0	0	
1.0	0.1	0	0		0	0	
1.0	0.2	0	0		0	0	
1.0	0.5	0	0		0	0	
1.0	1.0	0	0		0	0	

注:接种颗粒数均为 200;+++为长势好;++为长势较好;+为长势一般.

2.3 不同浓度植物生长物质对分化叶诱导生根的影响

将生长较为旺盛的分化叶丛切成含 3~5 个分化叶且基部连接的愈伤组织块,接种到生根培养基上.7~10 d后部分培养基能形成可见的根原基,30 d 时观察统计,结果如表 3 所示.可以看出在附加不同浓度 IAA 或 NAA 的 1/3 MS 生根培养基上均可诱导生根.但是,随着培养基中 NAA 含量的增加,诱导生根率降低、生根数减少,而且所生出的根多数由基部愈伤组织发出,在移栽中这样的根属于无效根.而在含有 IAA 的培养基上,诱导生根率较高、生根数较多,所生出的根多数由分化叶叶柄基部发出,适于移栽观察.尤其当

表 3 不同浓度植物生长物质对全缘贯众分化叶生根的影响

Tab.3 The effects of different concentrations of plant growth substances on root generation

植物生长物质浓度/(mg·L ⁻¹)		接种组织块数/颗	生根组织块数/颗	生根率/%	平均生根数/(条每叶片)
IAA	NAA				
0	0	100	0	0	0
0.2	0	100	28	28	3.5
0.4	0	100	59	59	6.2
0.6	0	100	96	96	8.5
0.8	0	100	67	67	6.8
1.0	0	100	41	41	3.7
0	0.2	100	48	48	4.3
0	0.4	100	55	55	5.4
0	0.6	100	36	36	3.6
0	0.8	100	9	9	2.8
0	1.0	100	11	11	3.4

IAA 浓度为 0.6 时, 生根率达到了 96 %, 平均每片叶子可以生根 8.5 条, 生根苗生长旺盛. 将该培养基上培养的生根试管苗继续培养 30 d, 约 80 % 的幼苗可以长出长 0.5 cm 左右的根茎. 由上述结果可以看出 1/3 MS + IAA(0.6) 是实验设计中全缘贯众幼苗生根培养的最佳培养基.

2.4 试管苗的移栽

选择根数多、有根茎、生长旺盛的试管苗培养瓶, 将其瓶塞打开, 于温室中炼苗 3~4 d 后取出试管苗, 立刻用清水洗去基部的培养基, 移栽到分别铺有 6~8 cm 厚河沙、草炭土、炉灰渣和肥沃园土等四种不同基质的温室苗床上. 在温度 20~28 °C、湿度 90 % 以上、无直射光照的条件下, 25 d 左右开始正常生长. 30 d 时观察统计发现, 以炉灰渣和河沙为基质的苗床上试管苗成活率达 93 % 以上, 且生长旺盛、整齐、根系发达.

五月中旬把在温室中移栽成活的试管苗移栽到田间, 到 10 月下旬, 其长势强劲, 根茎上的须根是相同生境条件下野生植株的 1.5~2.5 倍.

3 讨论

本研究以全缘贯众的根茎、叶片和叶柄为材料, 成功地诱导了愈伤组织, 建立起无性系. 接种的三种器官在愈伤组织的诱导过程中, 根茎的诱导率最高, 该结果与姜长阳等对蕨类的研究报道一致^[17]. 究其原因一方面全缘贯众根茎的分生力较强, 另外可能与根茎较大, 在灭菌中受到的损伤较小有关. 在诱导生根时, NAA 含量的增加会导致愈伤组织产生无效根, 移栽后难以成活. IAA 能够诱导不定根的形成, 加快营养繁殖速度, 根系呈白色, 随着培养时间的延长, 根逐渐伸长, 颜色变黄, 移栽后成活率高. 炉灰渣和河沙混合的基质透气性好, 杂菌较少, 温度和营养保持度高, 因此直接影响了根系的发达程度, 决定植株长势.

全缘贯众根茎诱导的颗粒状愈伤组织, 继代培养 50 d 时仍增殖 32 倍, 并且最高愈伤组织颗粒分化率达 99.0 %, 可见通过人工方法可以繁殖出大量的无性系后代. 这不仅可以为全缘贯众栽培提供优质高效的种苗, 而且高效分化的愈伤组织又为该植物转基因研究提供了理想的材料. 利用愈伤组织进行基因水平的研究, 建立其资源信息库, 对筛选优良性状, 改善品质将起到深远的影响, 同时也为全缘贯众的种质保存、防止其灭绝提供了可行的技术途径.

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴, 第 1 册 [M]. 北京: 科学出版社, 1972: 229.
- [2] 张丽军, 田少库, 吴建华. 贯众的研究进展 [J]. 陕西中医, 2002, 23(8): 748-749.
- [3] 李书心. 辽宁植物志(下册) [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991: 1176.
- [4] 李文安, 王玉琴. 狼尾蕨的离体培养 [J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(3): 44.
- [5] 尹怀约. 贯众叶片愈伤组织的诱导和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 1989(4): 39-45.
- [6] 郑若仙. 彩叶凤尾蕨孢子离体繁殖与组织培养 [J]. 植物杂志, 1992, 28(2): 8.
- [7] 金建平, 兰涛. 皱叶肾蕨卷曲叶尖的离体培养 [J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(5): 359-360.
- [8] Matsumoto Sadamu. Species ecological study on reproductive systems and speciation of *Cyrtomium falcatum* complex (Dryopteridaceae) in Japanese archipelago [J]. Annals of the Tsukuba Botanical Garden, 2003(22): 1-24.
- [9] 黄韶玲, 张洁莲. 鹿角蕨的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(1): 25.
- [10] 秦廷豪, 邹宗兰. 鸟巢蕨的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 349.
- [11] 彭晓明, 曾宋君. 铁线蕨的组织培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 575.
- [12] Ambrosio, Sandra Tereza, Nataniel Franklin de Melo. Interaction between sucrose and pH during *in vitro* culture of *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott (Pteridophyta) [J]. Acta Bot Bra, 2004, 18(4): 809-813.
- [13] Camloha M, Gogala N, Rode J. Plant regeneration from leaf explants of the *Platyserium bifurcatum in vitro* [J]. Scientia Horticulture, 1994(56): 257-266.
- [14] 韦景枫, 匡世秀, 程友忠, 等. 贵州六种观赏蕨的组织培养初报 [J]. 贵州林业科技, 2007, 35(1): 55-57.
- [15] 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: 68-72.
- [16] 胡尚连, 王丹. 植物生物技术 [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2004: 35-40.
- [17] 姜长阳, 宁淑香, 于森, 等. 蕨类愈伤组织高效再生体系的建立 [J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 343-345.