

## 革叶蕨的离体培养研究

李 慧<sup>1,2</sup>, 房伟民<sup>1</sup>, 吴 松<sup>2</sup>, 孙其文<sup>2</sup>, 马承忠<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏联合职业技术学院淮安生物工程分院, 江苏淮安 223200)

**摘要:** 以革叶蕨的幼嫩根茎(母株新发生的匍匐茎)、幼嫩叶柄、幼叶作为外植体, 诱导产生愈伤组织。研究表明, 茎段用  $\text{HgCl}_2$  溶液浸泡 10 min、叶片和叶柄用  $\text{HgCl}_2$  溶液浸泡 3 min 灭菌效果较好;  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg/L IAA} + 0.1 \text{ mg/L NAA}$  最适合诱导形成愈伤组织和幼芽分化; 茎段尤其是走茎茎尖是诱导愈伤组织分化为幼苗的最适外植体材料; 最佳生根培养基为  $1/2\text{MS} + 0.1 \text{ mg/L NAA}$ 。

**关键词:** 革叶蕨; 组织培养; 外植体

**中图分类号:** S682.350.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)01-0103-03

革叶蕨 (*Rumohra adiantiformis*), 别名铁羊齿、丽莎蕨, 为三叉蕨科革叶蕨属, 多年生草本植物。羽状复叶大, 翠绿色, 边缘有锯齿, 最下面的羽片最长,

往上渐缩, 外形略成三角状, 整体散透皮革般的光泽。叶片采后生活时间长, 插在水中可以存活一个月左右, 是插花行业中最受欢迎的切叶材料, 目前已成为世界范围内首选的切叶植物。革叶蕨是近年从国外新引进开发的园艺品种, 目前处于种苗繁育阶段, 仅有少量种苗供应市场, 还远远不能满足插花业对革叶蕨切叶的需求。有关蕨类植物的组织培养已有报道<sup>[1]</sup>, 但革叶蕨的组织培养还未见报道。因

收稿日期: 2005-07-21

基金项目: 江苏省淮安市科技发展计划项目(编号: SN0521)。

作者简介: 李 慧(1971—), 女, 江苏宿迁人, 在读硕士研究生, 讲师, 主要从事园艺作物的组织培养研究。Tel: (0517) 5981683; E-mail: lihui710623@163.com。

(上接第 102 页)



芽的诱导分化



芽的增殖



小鳞茎的诱导



小鳞茎的增殖



试管鳞茎形成的苗



试管鳞茎苗长大成植株

图1 卷丹试管鳞茎组织培养过程

此,本试验利用草叶蕨幼嫩根茎、叶柄和叶片诱导愈伤组织,以期获得诱导愈伤组织的最佳培养基配方、最佳外植体及外植体的最佳消毒方法,为草叶蕨工厂化育苗提供技术参数。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料 试验采用的外植体为草叶蕨幼嫩根茎(母株新发生的匍匐茎)、幼嫩叶柄和幼叶,草叶蕨引自常州绿杨园艺有限公司,栽植于南京农业大学花卉园艺中心温室中。试验前一周不浇水。

1.1.2 试剂 MS培养基所用卡拉胶、蔗糖和激素NAA、IAA、IBA均购于南京鹏程化玻有限公司,试剂纯度为分析纯。

1.1.3 培养基 基本培养基为MS培养基,其中卡拉胶5 g/L,蔗糖30 g/L,pH值5.8,并配合加不同组合的NAA、IAA等激素。

### 1.2 方法

从温室内培养的草叶蕨植株上选取萌生的幼嫩根茎和幼叶,用清水冲洗泥沙,去除根茎表面的须根和鳞片,在洗衣粉水中轻轻擦洗,然后用自来水冲洗2 h。在无菌条件下<sup>[2,3]</sup>,先用75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3~4次,再转入0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液,加2滴吐温-80,根茎分别浸泡15 min、10 min、5 min,叶分别浸泡5 min、3 min、1 min,无菌水冲洗7~8次。在以上过程中不断摇动,以去除附在外植体表面的气泡。用消毒滤纸吸干水珠后,将根茎切成0.3 cm长的茎段,叶柄和幼叶切成0.5 cm长的小段接种在诱导培养基上。

## 2 结果与分析

### 2.1 灭菌处理结果

由于升汞是一种剧毒物质,在升汞处理完后,即使用无菌水冲洗7~8次,仍然有少量残留在外植体

上,导致外植体死亡。升汞浸泡灭菌结果见表1。用升汞浸泡茎段15 min、浸泡叶片和叶柄5 min,外植体染菌率虽然很低,但是死亡率过高;浸泡茎段5 min、浸泡叶片和叶柄1 min,外植体死亡率大大降低,但染菌率却很高,因此,草叶蕨茎段灭菌宜用升汞浸泡10 min,叶片和叶柄灭菌宜用升汞浸泡3 min。

表1 升汞浸泡时间对草叶蕨的伤害和染菌情况

浸泡时间 (min)	茎段(个)			叶片和叶柄(个)		
	接入外 植体数	染菌数	死亡数	接入外 植体数	染菌数	死亡数
15	42	0	40			
10	45	2	13			
5	44	15	3	36	0	30
3				34	1	6
1				34	9	0

### 2.2 外植体分化

草叶蕨茎段、叶片和叶柄接种在附加不同浓度IAA和NAA的MS培养基上后,均可不同程度地分化出芽(表2)。在4组激素浓度中,以2号培养基MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L NAA的诱导效果最好,30 d后愈伤组织诱导率达100%,50 d后愈伤组织直接分化成苗率85%。3号和4号培养基对愈伤组织有一定的诱导作用,但作用十分缓慢,而1号高IAA浓度的培养基则对成芽起抑制作用,出现分化停滞现象,最后逐渐发黑趋于死亡。

### 2.3 3种不同外植体脱分化程度的比较

3种外植体接种在上述最优培养基MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L NAA中,茎尖接种后20d左右顶端膨大,逐渐产生一团GGB(即绿色球状物),其上有针尖状的小突起,以后逐渐长成小芽,培养60 d后产生丛生苗。叶柄和叶片出芽慢,且较高频率地出现根状结构,培养30 d后切口处先形成少量瘤状结构,40d后形成簇生芽,其中叶片在与叶柄

表2 不同激素浓度对草叶蕨茎段、叶片和叶柄分化能力的影响

培养基	激素(mg/L)		茎段			叶柄			叶片		
	IAA	NAA	培养外 植体数 (个)	成芽率(%)		培养外 植体数 (个)	成芽率(%)		培养外 植体数 (个)	成芽率(%)	
				45 d	60 d		45 d	60 d		45 d	60 d
1号	1.0	0.1	38	50	82	42	52	80	40	46	84
2号	0.5	0.1	32	55	100	37	53	100	36	43	100
3号	0.1	0.1	36	50	94	42	53	92	42	50	86
4号	0.05	0.1	40	45	90	38	39	85	40	35	85

相连的切口处更易于长芽,而较细小的上部或边缘叶片接种后大多褐化,诱导能力弱(表3)。从总体上讲,离体组织在此条件下器官分化能力的强弱顺序为:茎尖>茎段>叶柄>叶片,这与肾蕨的研究结果<sup>[4]</sup>相似。

表3 3种不同外植体脱分化程度的比较

外植体种类	接入外植体数(个)	诱导出愈伤组织个数(个)	诱导出愈伤组织的时间(d)	诱导率(%)
茎尖	12	12	20	100
叶柄	15	15	35	100
叶片	12	10	38	83

### 2.3 生根培养

从丛生芽上切取单芽接种于含有不同生长素的1/2MS培养基中,25 d后在芽的基部长出不定根。观察根的生长情况(表4),1/2MS+0.1 mg/L NAA的生根率最高,为96%,且愈伤组织少,所生根是从芽、茎基部切口处直接产生,这种根移栽成活率高。由表5可知,随着NAA浓度的增加,芽苗的生根率提高,单株生根条数增多。但是当NAA浓度达到0.5 mg/L时,生根后的试管苗不生长,基部愈伤组织增大变硬,根自愈伤组织上长出,体内没有形成完善的输导组织,这种苗不管根量多少,移栽成活率均较低。

表4 不同生长素对革叶蕨试管苗生根的影响

生长素	浓度(mg/L)	接种苗数(个)	生根苗数(个)	生根率(%)	生根情况
NAA	0.1	50	48	96	有少量愈伤组织,根粗且多
IBA	0.1	50	41	82	有少量愈伤组织,根细长
IAA	0.1	50	37	74	有少量愈伤组织,根细长

表5 NAA浓度对革叶蕨试管苗生根的影响

NAA浓度(mg/L)	接种苗数(个)	生根苗数(个)	生根率(%)	根数(条/株)	生长情况
0	30	0	0	0	生长缓慢
0.05	50	42	84	2.1	生长正常
0.1	50	48	96	2.6	生长正常
0.2	50	50	100	3.0	生根后生长缓慢
0.5	30	30	100	3.4	生根后叶老化,停止生长

### 2.4 炼苗及移栽

当试管苗的不定根长1~2 cm时,即可炼苗。将培养瓶移出培养室,在室内去掉培养瓶盖,喷洒少量清水,1 d后将生根苗从培养瓶中取出,洗净根上

附着的培养基,按5~10 cm的株行距栽于穴盘或苗床中,浇透水。炼苗基质为珍珠岩:蛭石=1:1,苗床外架塑料拱棚,棚上覆盖黑色遮阳网,使苗处于半荫环境中。棚内温度保持在25~30℃,湿度85%~90%。20~30 d后,拱棚两头开始通风,苗长出6~7片叶时,移栽到苗圃中。经过多次移栽试验,发现保持小苗周围空气湿润、栽培基质湿润、通风良好和适宜温度是试管苗移栽成功的关键。

### 3 讨论

试验结果表明,以幼嫩根茎为外植体诱导出芽能力和抗升汞能力均强于幼叶,诱导时间也比叶片短,且愈伤组织生长速率快,分化率高。其中走茎茎尖是诱导愈伤组织分化为幼苗的最适外植体材料。同时这些结果也表明,植物某些器官在发育过程中,器官或组织与整体分离得越早,再生的可能性越高<sup>[5]</sup>。

任何一种植物对激素都有一个最适浓度,当培养基中的激素浓度超过最适浓度时,则会对培养物起抑制作用,生长和分化缓慢,浓度过高时甚至会导致培养物停止生长。低于最适浓度时,则起不到完全诱导作用,生长和分化同样缓慢<sup>[6]</sup>。适合于革叶蕨组织培养的最佳诱导和分化培养基是MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L NAA,愈伤组织诱导率达100%,50 d后愈伤组织直接分化成苗率85%。最佳生根培养基为1/2MS+0.1 mg/L NAA,生根率为96%。

### 参考文献:

- [1]刘瑞林,王凤彬,任如意. 蕨类植物组织培养研究现状[J]. 中国林副特产,2003,(2):16~17.
- [2]朱广廉. 植物组织培养中外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯,1996,32(6):444~449.
- [3]朱广廉. 植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J]. 植物生理学通讯,1995,31(5):375~384.
- [4]程磊,浦冰洁,周根余. 若干理化因子对日本肾蕨绿色球状体分化及生长的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2001,9(2):142~148.
- [5]谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991.
- [6]潘瑞琪. 植物组织培养(第2版)[M]. 广州:广东高等教育出版社,2001.