

银粉背蕨组织培养及无性系建立的研究

王 琳, 王晓麟, 蔺博超, 孙慧超, 姜长阳
(辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029)

摘要 以银粉背蕨叶柄为材料,成功地诱导了愈伤组织,建立起无性系。结果表明:1/2 MS+NH₄H₂PO₄200 mg·L⁻¹+BA 0.3 mg·L⁻¹+IBA 0.4 mg·L⁻¹是诱导叶柄形成愈伤组织的理想培养基;1/2 MS 是颗粒状愈伤组织分化的理想培养基;1/3 MS+ IAA 0.4 mg·L⁻¹是试管苗生根培养的理想培养基;炉灰渣是试管苗移栽的理想基质;移植后的试管苗生长旺盛、根系发达,秋末收获单株干草重量比野生植株增加14.6%。
关键词: 银粉背蕨; 组织培养; 无性系
中图分类号: Q813.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1002-2767(2008)03-0008-03

Tissue Culture and Clone Construction of *Aleuritopteris argentea* var. *argentea*

WANG Lin, WANG Xiao-lin, LIN Bo-chao, SUN Hui-chao, JIANG Chang-yang
(Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract: Callus induction and plant regeneration from the petiole in *Aleuritopteris argentea* var. *argentea* were reported in this research. The results showed that the medium 1/2 MS+NH₄H₂PO₄200 mg·L⁻¹+BA 0.3 mg·L⁻¹+IBA 0.4 mg·L⁻¹ was the best for inducing callus, medium 1/2 MS was the most suitable for bud differentiation, medium 1/3 MS+ IAA 0.4 mg·L⁻¹ was the optimum for rooting. The ideal transplantation matrix for tube plantlets was the furnace ashes. The transplanted plantlets in the field grew vigorously and had a well developed root system. The hay weight of the single plant was 14.6% more than that of the wild plant.
Key words: *Aleuritopteris argentea* var. *argentea*; tissue culture; clone

银粉背蕨 (*Aleuritopteris argentea* var. *argentea*) 又称通经草, 属中国蕨科粉背蕨属粉背蕨的原变种植物^[1-2]。全草含粉背蕨酸及黄酮类化合物等有效成分。全草药用具有调经活血、解毒消毒、补虚止咳、止血祛湿等功效, 能治月经不调、结核咳嗽、肺炎吐血、赤白带下、天花、麻疹等疾病^[2-3]。因银粉背蕨具有重要的药用价值, 近年来许多人进行广泛的采集作为药材出售, 这使本来就分布稀、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且品质下降。为满足人们的药用需求, 已开始进行人工栽培。但由于该植物的孢子难以收集, 并且在人工条件下很难萌发, 所以只能挖取野生植株作为人工栽培的种源, 这也加剧了银粉背蕨野生资源的破坏。

尽管目前已经有多种蕨类植物组织培养及无性系建立研究的报道^[4-14], 但只局限于蕨类植物中的

一少部分, 且多集中于肾蕨、鹿角蕨、凤尾蕨等食用观赏性种类, 银粉背蕨的组织培养迄今未见报道。为此, 我们进行了银粉背蕨的组织培养和无性系建立的研究, 以期开发和保护银粉背蕨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

将采自大连金州区的银粉背蕨叶柄用清水冲洗约 30 min 后, 放入 250 mL 的磨口广口瓶中, 用 0.05% 的安利液振荡洗涤 3~5 次, 再用无菌水洗涤 4 次, 然后将材料移到超净工作台上, 用 75% 的乙醇灭菌 30 s 后, 迅速用无菌水振荡洗涤 3 次, 接着用 0.05% 的 HgCl₂ 溶液振荡灭菌 2 min, 再用 0.03% 的 HgCl₂ 溶液振荡灭菌 15 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, 附加不同浓度的 BA、NAA、IAA、IBA 四种植物生长调节剂; 固体培养基琼脂胨力强度为 180 g·cm⁻²[15]; 愈伤组织诱导和分化的培养基含蔗糖 30 g·L⁻¹; 生根培养基

收稿日期: 2007-12-18
第一作者简介: 王琳(1986-), 女, 辽宁沈阳人, 辽宁师范大学生命科学学院本科在读。Tel: 13842696809。
通讯作者: 姜长阳, E-mail: changyangjiang@126.com。

为 15 g · L⁻¹; 培养基 pH 5.6 ~ 5.8; 培养温度 (24 ± 1) °C; 愈伤组织在培养基上暗培养; 其他培养均于光照条件下进行, 光照时间 12 h · d⁻¹, 光照强度 3 000 lx 左右; 炼苗于温室大棚中进行, 光照强度 5 000 lx 左右, 温度 (18 ± 8) °C; 试管苗移栽除了不进行直射光照外, 其他环境条件与移栽相同。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对银粉背蕨愈伤组织诱导的影响

将无菌叶柄切成长厚 0.2 cm 左右的片状, 接种在附加不同浓度生长素配比的 1/2 MS + NH₄H₂PO₄ 200 mg · L⁻¹ + BA 0.3 mg · L⁻¹ 培养基上暗培养, 接种时要使一侧切口直接接触培养基; 每种培养基接种 200 个材料。培养 30 d 左右, 切口开始长出较为松散的黄色愈伤组织。继续培养到 70 d 观察统计 (见表 1)。在添加不同浓度生长素 IAA 和同时添加不同浓度 IAA、IBA 的培养基上难以形成愈伤组织。在添加不同浓度的生长素 IBA 时, 均可诱导叶柄切片形成愈伤组织, 但不同浓度的 IBA, 愈伤组织的诱导率不同。其中在 IBA 的浓度为 0.4 mg · L⁻¹ 的培养基上, 不仅愈伤组织的诱导率达到了 98.0%, 而且生长速度也较快。观察还发现, 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, 培养到 70 d 时, 所愈伤组织生长变化成具有分化能力的黄色颗粒状^[16]。把在这一培养基上诱导生长的愈伤组织, 接种到相同的培养基上进行愈伤组织的继代培养, 经过 3 次重复、9 代试验证明, 继代培养除了培养周期缩短为 60 d 外, 愈伤组织增殖系数为 42.6, 其他外部性状保持不变。这表明, 在本研究所设计的培养基中, 1/2 MS + NH₄H₂PO₄ 200 mg · L⁻¹ + BA 0.3 mg · L⁻¹ + IBA 0.4 mg · L⁻¹ 是诱导银粉背蕨叶柄形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基。

表 1 不同浓度生长素对银粉背蕨叶柄愈伤组织诱导的影响

| 生长素浓度/ mg · L ⁻¹ | | 叶 柄 | |
|-----------------------------|-----|--------|--------|
| IBA | IAA | 诱导数/ 颗 | 诱导率/ % |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.4 | 0 | 196 | 98.0 |
| 1.2 | 0 | 169 | 84.5 |
| 2.0 | 0 | 72 | 36.0 |
| 2.8 | 0 | 17 | 8.5 |
| 3.6 | 0 | 13 | 6.5 |
| 0 | 0.4 | 1 | 0.5 |
| 0 | 1.2 | 3 | 1.5 |
| 0 | 2.0 | 0 | 0 |
| 0 | 2.8 | 0 | 0 |
| 0 | 3.6 | 0 | 0 |
| 0.4 | 0.4 | 2 | 1.0 |
| 1.2 | 1.2 | 1 | 0.5 |
| 2.0 | 2.0 | 0 | 0 |
| 2.8 | 2.8 | 0 | 0 |
| 3.6 | 3.6 | 0 | 0 |

2.2 不同培养基对愈伤组织和不定芽分化培养

把在 1/2 MS + NH₄H₂PO₄ 200 mg · L⁻¹ + BA 0.3 mg · L⁻¹ + IBA 0.4 mg · L⁻¹ 培养基上培养的叶

柄黄色颗粒状愈伤组织, 接种到含有不同浓度 BA、IAA 的 1/2 MS 和 1/3 MS 培养基上, 在光照条件下进行愈伤组织的分化培养。接种 25 d 左右, 在有的培养基上可见分化出幼叶。培养到 50 d 时进行统计。由表 2 可见, 在培养基中只加不同浓度 BA、同时加入不同浓度的 BA 和 IAA 时, 愈伤组织不分化; 在不加任何激素培养基中和只加入不同浓度的 IAA 时愈伤组织能够分化, 但不加激素的培养基上分化率高于加激素的培养基, 而 1/2 MS 和 1/3 MS 的分化率差异不明显。但观察表明, 在 1/2 MS 培养基上进行培养的愈伤组织颗粒, 不仅分化率达 99.0%, 而且分化的丛生叶长势远较 1/3MS 培养基旺盛。经过 12 次重复试验证明, 在 1/2 MS 培养基上对颗粒状愈伤组织分化培养, 不仅分化率高, 而且分化叶长势旺盛。这说明 1/2 MS 是银粉背蕨颗粒状愈伤组织分化培养的理想培养基。

表 2 不同培养基对银粉背蕨愈伤组织分化的影响

| 植物生长物 质浓度/ mg · L ⁻¹ | | 1/2MS | | | 1/3MS | | |
|------------------------------------|-----|------------|------------|-----|------------|------------|----|
| BA | IAA | 分化数 / 颗 | 分化率 / % | 长势 | 分化数 / 颗 | 分化率 / % | 长势 |
| 0 | 0 | 198 | 99.0 | +++ | 196 | 98.0 | ++ |
| 0 | 0.1 | 194 | 97.0 | +++ | 195 | 97.5 | ++ |
| 0 | 0.2 | 154 | 77.0 | ++ | 159 | 79.5 | + |
| 0 | 0.5 | 36 | 18.0 | + | 48 | 24.0 | + |
| 0 | 1.0 | 10 | 5.0 | + | 3 | 1.5 | + |
| 0.2 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.2 | 0.1 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.2 | 0.2 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.2 | 0.5 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.2 | 1.0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.4 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.4 | 0.1 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.4 | 0.2 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.4 | 0.5 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| 0.4 | 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 不同浓度生长素对生根的影响

将上述分化培养的丛生叶切成基部连着少许愈伤组织的 2~3 个叶块, 接种到含有不同浓度 IAA、NAA 的 1/3 MS 生根培养基上进行生根培养。接种 8 d 后, 在部分培养基上能形成可见的根原基, 35 d 时观察统计。由表 3 可见, 在不加任何生长素, 附加不同浓度 NAA 的 1/3 MS 生根培养基上不能诱导生根; 而在含有不同浓度 IAA 的培养基上, 均可诱导生根。其中在附加浓度为 0.4 mg · L⁻¹ 的 IAA 培养基上, 不仅生根率达到了 100%, 而且生根试管苗长势旺盛。观察还表明, 在这一培养基上生根培养 45 d, 伴随着试管苗的旺盛生长, 在叶柄基部还会长出 0.2~0.4 cm 根茎, 并且根茎上会生长出 15~26 条须根。在相同的培养基上进行了 9 次生根试验, 试管苗的生根率、长势及根茎的形成等性状保持不变。上述结果说明, 1/3 MS + IAA 0.4 mg ·

L⁻¹是银粉背蕨生根培养的理想培养基。

表3 不同浓度生长素对银粉背蕨分化叶生根的影响

| 植物生长物质浓度/ mg ° L ⁻¹ | | 接种组织 | 生根组织 | 生根率 | 长势 |
|--------------------------------|-----|-------|-------|-----|-----|
| NAA | IAA | 块数/ 颗 | 块数/ 颗 | / % | |
| 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | |
| 0.2 | 0 | 100 | 0 | 0 | |
| 0.4 | 0 | 100 | 0 | 0 | |
| 0.6 | 0 | 100 | 0 | 0 | |
| 0.8 | 0 | 100 | 0 | 0 | |
| 1.0 | 0 | 100 | 0 | 0 | |
| 0 | 0.2 | 100 | 88 | 88 | ++ |
| 0 | 0.4 | 100 | 100 | 100 | +++ |
| 0 | 0.6 | 100 | 76 | 76 | ++ |
| 0 | 0.8 | 100 | 39 | 39 | ++ |
| 0 | 1.0 | 100 | 21 | 21 | + |

注: +++ 为长势好; ++ 为长势较好; + 为长势一般。

2.4 试管苗的移栽

选择根系生长较为旺盛的试管苗培养瓶, 打开瓶塞, 于温室中炼苗 3 d 左右, 取出试管苗, 立刻用清水洗去基部的培养基, 移栽到分别铺有约 6 cm 厚河沙、炉灰渣、蛭石和肥沃园土四种不同基质的温室苗床上。在温度 18~27 °C、湿度 90% 以上、无直射光照的条件下, 20 d 左右开始正常生长。30 d 时观察统计表明, 以炉灰渣为移栽基质不仅试管苗成活率为 96.5%, 而且成活试管苗生长旺盛; 在相同移栽基质上, 经过 6 次移栽重复试验, 试管苗的成活率与长势基本保持不变。这说明炉灰渣是银粉背蕨试管苗移栽的理想基质。

4 月下旬至 5 月上旬, 把在温室中移栽成活的试管苗小批量地移植到山坡上, 移植成活率几近 100%。移植后一个月左右开始迅速生长。9、10 月份多次观察统计表明, 与在相同生境条件下野生植株相比, 移植的试管苗长势非常旺盛, 根系增加 2 倍左右。秋末收获可供药用的干草, 平均单株重量比野生植株增加 14.6%。

3 讨论

本研究以银粉背蕨叶柄为材料, 成功地诱导了愈伤组织, 建立起无性系。这证明银粉背蕨的非分生组织也具有全能性。

银粉背蕨叶柄诱导的颗粒状愈伤组织, 继代培养 60 d 愈伤组织增殖系数为 42.6, 并且这种愈伤组织在分化培养基上愈伤组织颗粒分化率达 99.0%, 可见通过这种人工方法在短时间内可以繁殖出大量的无性系后代。这除了可以为银粉背蕨的栽培提供优质高效的种苗外, 而且这种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, 改善品质将具有深远的影响。这种

方法也为银粉背蕨的种质保存、防止其灭绝提供了可行的技术途径。

银粉背蕨的颗粒状愈伤组织, 在不加任何激素的 1/2 MS0 培养基上以 99% 分化率进行分化的结果, 表面上看是这种愈伤组织的分化不需要激素, 而实际并非如此。因为在这种愈伤组织诱导和继代中, 使用了较高浓度的激素, 使用于分化培养的颗粒状愈伤组织中已经含有较高浓度的激素; 另外, 在光照的条件下进行分化培养, 愈伤组织自身也能合成一些生长素。上述两种来源的激素, 使进行分化培养的愈伤组织已经达到了分化培养所需要激素的浓度; 如果再在培养基中加入激素, 就会因为激素水平高而抑制分化。这也证明银粉背蕨的分化需要较低浓度的激素水平。

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[第三卷(第一分册)] [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 154-155.

[2] 李书心. 辽宁植物志(上册) [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1988: 39-40.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.

[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, 25(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, Natoniel 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 Platycerium 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] 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.

[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.