

骨碎补愈伤组织的诱导及无性系建立的研究

文 伟

(铁岭师范高等专科学校, 辽宁 铁岭 112001)

摘要:以骨碎补根茎、叶片、叶柄为外植体,进行了愈伤组织诱导与分化、试管苗的生根、移栽、移植的研究,建立起骨碎补的无性系。结果表明:1/2 MS+NH₄H₂PO₄ 150 mg·L⁻¹+BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.6 mg·L⁻¹+2,4-D 0.6 mg·L⁻¹是诱导根茎形成愈伤组织和愈伤组织继代培养的理想培养基;1/2 MS+BA 0.1 mg·L⁻¹+IAA 0.05~0.1 mg·L⁻¹是诱导骨碎补根茎愈伤组织分化培养的理想培养基;1/2 MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹是骨碎补生根培养的理想培养基;生根试管苗能形成根茎,容易移栽成活。移栽的试管苗保持了骨碎补的所有植物学性状。

关键词:骨碎补;组织培养;无性系

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)02-0003-04

骨碎补(*Davallia marieslii* Moor ex Baker)属于骨碎补科骨碎补属多年生草本植物,附生于海拔500~700 m的岩石上^[1-2],在我国的辽宁、山东、江苏

和台湾有分布。作为中草药使用,具有行血活络、祛风止痛、补肾坚骨等功效,能治跌打损伤、风湿痹疼、肾虚、牙疼、腰疼、久泻等疾病^[3]。虽然骨碎补具有重要的药用价值,但其分布和数量相对较少,加上近年来生态环境的变化和骨碎补的大量被采挖,使该植物的种类和数量越来越少,在辽宁地区骨碎补濒危灭绝,现已成为辽宁省的保护植物^[4]。为了保护

收稿日期:2009-10-14

作者简介:文伟(1960-),男,满族,辽宁鞍山人,副教授,从事生物学教学和组织培养研究。E-mail:wenw60927@sina.com。

- [6] 朱婉华,魏水清,刘崇汉,等.电聚焦电泳技术用于真菌同工酶研究[J].食用菌,1988,10(2):35-36.
- [7] 蔡朝晖,高山林,李萍.组培蒲圻贝母鳞茎形成中的同工酶电泳分析[J].中国中药杂志,1999,24(1):16-18.
- [8] 毛慧玲,樊棠怀.茶薪菇不同发育期酯酶同工酶的研究[J].南

昌大学学报(理科版),2002,26(4):375-376.

- [9] 潘有福,王仑山, Tiwari R K,等.党参的体细胞胚发生及不同发育阶段几种同工酶的分析[J].西北植物学报,2005,25(1):1-7.

Study on the Isozyme Changes of *Fritillaria ussuriensis* during Morphogenesis

SUN Dan¹, PIAO Xuan-chun², DIAO Yan-ling¹, YU Yang³, QIAN Chun-rong³, LIAN Mei-lan²

(1. Grop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules of Yanbian University, Ministry of Education, Yanji, Jilin 133002; 3. Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Taking *Fritillaria ussuriensis* Maxim. as experiment material, the isozyme changes in different stage of tissue culture during culturing of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. were studied. The results showed that enzyme bands of esterase isozyme were abundant and examined 11 bars; Enzyme bands were obviously more than callus and embryoid after forming small bulblet and callus presented differential band at $R_f = 0.708$. Catalase isozyme expressed and had only one bar during calluse, embryoid and small bulblet formation, R_f was 0.042, while the catalase isozyme was not expressed in bulblet expanding.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim.; culture; esterase; catalase

这种野生资源,并满足人们药用栽培对骨碎补种苗的需要,铁岭师范高等专科学校对骨碎补进行了愈伤组织的诱导及无性系建立的研究。虽然目前已多有蕨类植物组织培养研究的报道^[5-14],但迄今未见骨碎补科植物组织培养及无性系研究的报道。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌

将采自大连郊区菜大岭的骨碎补幼嫩根茎、叶片和叶柄用自来水洗涤 10~20 min 后,装到广口瓶中,用安利液洗涤约 10 min,再用无菌水冲洗 2 次,在超净工作台上,用 70%~75% 的酒精灭菌 10~30 s,用无菌水冲洗 2 次后,再用 0.05% 的 HgCl_2 溶液灭菌 2 min,接着用 0.03% 的 HgCl_2 溶液灭菌 14 min,最后用无菌水分 5 次将材料上的 HgCl_2 残留溶液洗涤干净,即获得无菌材料。

1.2 培养条件

以附加不同种类及浓度的细胞分裂素和生长素的 MS 和 1/2MS 为培养基;固体培养基琼脂含量为 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;诱导外植体形成愈伤组织诱导和愈伤组织分化的培养基蔗糖含量为 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,生根培养基为 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;培养基的 pH 为 5.6~5.7;培养温度 24°C 左右;愈伤组织的诱导在无光条件下进行;其它均在光照条件下进行培养,每天光照 12 h 左右,光照强度约为 2000 lx ;练苗是在日光温室中进行的,光照强度 $3000\sim5000 \text{ lx}$,照射时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,温度 $20\sim28^\circ\text{C}$ 。

1.3 方法

1.3.1 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响 在超净工作台上,用无菌解剖刀将幼嫩的根茎、叶片和叶柄分别切成厚约 0.2 cm 根茎片、0.3~0.4 cm 叶片块和 0.2~0.3 cm 叶柄段后,将材料接种到 $1/2 \text{ MS} + \text{NH}_4 \text{ H}_2 \text{ PO}_4 150.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA} 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基本培养基、附加不同种类不同浓度生长素的培养基上进行无光培养,50 d 后,当材料切口表面开始张裂生长愈伤组织时转到光照下培养,培养 90 d 进行观察统计。试验重复 3 次。每个处理接种 100 个材料。

1.3.2 不同培养基对愈伤组织分化的影响 把继代培养的根茎愈伤组织,接种到以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度 BA、IAA 的培养基上,进行愈伤组织的分化培养。分化培养试验重复 6 次。每个处理接种 100 个材料。

1.3.3 不同浓度生长素对生根的影响 将生长较

为旺盛的分化叶丛从基部切下,接种到以 $1/2 \text{ MS}$ 和 $1/3 \text{ MS}$ 为基本培养基,附加浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 和 IBA 24 种培养基上,进行生根培养。生根试验进行 6 次重复,每次接种 200 个材料。30 d 观察统计长势和生根率。

1.3.4 试管苗的移栽和移植 将生长旺盛、有根茎的试管苗的培养瓶瓶塞打开,放到光照强度约 5000 lx 温室中练苗 4 d 后,用镊子将试管苗取出,马上用 20°C 以上的自来水洗净根部,移栽到上面有一层 6~7 cm 厚河沙、草炭土、炉灰渣或山皮土 4 种不同基质的苗床上。移栽以后前半个月要保持湿度 90% 以上、温度 $20\sim28^\circ\text{C}$ 以上、没有直射光照的环境条件。移栽试验重复 4 次,每种处理移栽 200 株。把在温室中移栽成活的试管苗于 5 月中旬移植到山坡上,并按照野生的生长环境进行管理。移植试验重复 4 次,每次移植 400 株。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,在不添加生长素的培养基上不能诱导形成愈伤组织;在以叶片和叶柄为材料,并添加了不同浓度生长素的培养基上也不能诱导形成愈伤组织;在以根茎为材料、添加不同浓度的生长素的培养基上都能形成愈伤组织。但单独使用 NAA 或 2,4-D 时,其诱导率不及 NAA 和 2,4-D 配合使用。在浓度均为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 和 2,4-D 配合使用的培养基上,接种培养的根茎愈伤组织诱导率达到了 98%。观察表明,在这一培养基上接种培养的根茎,暗培养到 20 d 时,大部分培养材料的切口边缘开始生长形成淡黄色、表面光滑的愈伤组织。随后伴随着愈伤组织的生长,其表面逐渐变为凸凹不平。当这样的愈伤组织转移到光照下进行培养时,不仅愈伤组织不断地生长,而且颜色由淡黄色逐渐变成绿色,凸凹的表面也逐渐变成了大小不等的颗粒状。培养到 90 d 时,平均每个培养材料会诱导形成 45.8 个愈伤组织颗粒。3 次重复试验的结果基本一致。把上述培养的颗粒状愈伤组织分散后,接种到与愈伤组织诱导培养相同的培养基上,进行愈伤组织的增殖继代培养。3 次重复试验,每次重复试验继代培养 5 代的结果证明,50 d 为一个继代培养周期,平均每个愈伤组织颗粒能培养形成 38.2 个、直径在 0.15 cm 左右的愈伤组织颗粒。结果表明,在试验中,浓度均为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 和 2,4-D 配合使用的培养基有利于骨碎补根茎愈伤组织的诱导培养。

1/2 MS+ BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.6 mg·L⁻¹+2,4-D 0.6 mg·L⁻¹+NH₄ H₂ PO₄ 150.0 mg·L⁻¹的培养基是诱导骨碎补根茎形成愈伤组织和愈伤组织继代培养的理想培养基。

表 1 不同浓度生长素对愈伤组织诱导的影响

生长素浓度 /mg·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/个	诱导率 /%	诱导数/个	诱导率 /%	诱导数/个	诱导率 /%
0	0	0	0	0	0	0	0
0.3	0	0	0	35	35	0	0
0.6	0	0	0	41	41	0	0
0.9	0	0	0	52	52	0	0
1.2	0	0	0	76	76	0	0
1.5	0	0	0	79	79	0	0
0	0.3	0	0	47	47	0	0
0	0.6	0	0	53	53	0	0
0	0.9	0	0	65	65	0	0
0	1.2	0	0	88	88	0	0
0	1.5	0	0	74	74	0	0
0.3	0.3	0	0	46	46	0	0
0.6	0.6	0	0	98	98	0	0
0.9	0.9	0	0	86	86	0	0
1.2	1.2	0	0	66	66	0	0
1.5	1.5	0	0	41	41	0	0

2.2 不同培养基对愈伤组织分化的影响

培养 15 d 左右,有的培养基上可长出幼叶。培养到 50 d 时进行统计(见表 2)表明,在培养基中不

表 2 不同的激素对愈伤组织分化的影响

激素浓度 /mg·L ⁻¹		1/2 MS			MS		
BA	IAA	分化数 /个	分化率 /%	长势	分化数 /个	分化率 /%	长势
0	0	0	0	—	0	0	++
0	0.05	0	0	—	0	0	++
0	0.10	0	0	—	0	0	+
0	0.20	0	0	—	0	0	+
0	0.30	0	0	—	0	0	+
0	0.40	0	0	—	0	0	
0	0.50	0	0	—	0	0	
0.1	0	0	0	—	0	0	
0.1	0.05	98	98	++	71	71	+
0.1	0.10	99	99	++	76	76	+
0.1	0.20	82	82	+	34	34	+
0.1	0.30	80	80	+	41	41	+
0.1	0.40	74	74	+	17	17	+
0.1	0.50	57	57	+	13	13	+
0.3	0	0	0	—	0	0	—
0.3	0.05	31	31	++	31	31	+
0.3	0.10	45	45	+	23	23	+
0.3	0.20	18	18	+	9	9	+
0.3	0.30	20	20	+	8	8	+
0.3	0.40	9	9	+	5	5	+
0.3	0.50	12	12	+	0	0	—

注:++为长势好;+为长势一般;-为不生长。

加激素或只加不同浓度 BA 或 IAA,愈伤组织也不能分化,在 BA 的浓度为 0.3 mg·L⁻¹与不同浓度的 NAA 配合使用时,愈伤组织也难以分化。在以 1/2 MS 为基本培养基、BA 的浓度为 0.1 mg·L⁻¹与不同浓度的 NAA 配合使用时,愈伤组织的分化效果较好。其中在 IAA 0.05~0.10 mg·L⁻¹和 BA 的浓度为 0.1 mg·L⁻¹的 2 种培养基上,分化率为 98%、99%。观察表明,在这 2 种培养基上,培养 20 d 时大部分培养的愈伤组织颗粒均已分化出幼叶。随后,伴随着分化数量的增加,已分化的幼叶不断生长,在幼叶基部又会分化出 3~7 个幼叶,从而出现了 1 个分化培养的愈伤组织颗粒能分化出一个叶丛的现象,并且组成叶丛的幼叶生长旺盛。6 次重复试验,培养到 50 d 时统计证明:1 个培养的愈伤组织颗粒平均会分化形成高 2.7 cm、有 5.2 个幼叶的叶丛。结果表明,1/2 MS+ BA 0.10 mg·L⁻¹+IAA 0.05~0.10 mg·L⁻¹是诱导骨碎补根茎愈伤组织分化培养的理想培养基。

2.3 不同浓度生长素对生根的影响

6 次重复的统计结果证明:接种在附加浓度为 0.1 mg·L⁻¹NAA 的 1/2 MS 生根培养基上材料均生根率为 99.5%,生根试管苗叶片伸展、生长旺盛,平均每株试管苗生出 9.1 条根。观察还表明,接种在附加浓度为 0.1 mg·L⁻¹NAA 的 1/2 MS 生根培养基上的材料,培养 8 d 时部分材料的基部能形成可见根原基,培养 16 d 时大部分材料的基部能生长出数量不等的可见根。培养 30 d 时,转移到光照 3 000~4 000 lx 的条件下继续培养 20 d,89%试管苗的根部会生长出 1~2 条、长 1.0~2.2 cm 的根茎。一旦生长出了根茎,不仅生根试管苗会快速而旺盛的生长,而且还会在根茎上长出排列紧密的、伸展而旺盛的叶片。结果说明,1/2 MS+ NAA 0.1 mg·L⁻¹培养基是骨碎补生根培养的理想培养基。

2.4 试管苗的移栽和移植

移栽后 30 d 时观察统计证明,在以炉灰渣为基质试管苗成活率为 97%,成活的试管苗根系发达、生长旺盛。观察表明,移栽成活的试管苗,移栽后 20 d 左右大部分开始正常生长。具有长 1 cm 以上根茎的试管苗,移栽后即使原来叶片全部死亡,过 7 d 左右还会在根茎上发出新叶片,从而保证了试管苗的移栽成活。

移植的试管苗成活率接近 100%。移植后前 60 d 左右生长较慢、植株较小。2 个月 after 开始快速生长。到秋天时,与野生植株相比,移植的试管苗具有

叶色浓绿、叶片较大、根系增加了约 1 倍等特点。当年移植的试管苗可形成孢子囊和成熟的孢子。连续 3 a 的观察都表明,移栽到山坡上的试管苗除了具有生长旺盛的特点外,其它所有植物学性状与野生植株一致。

3 讨论

以骨碎补的根茎为材料,成功地进行了愈伤组织的诱导和分化,试管苗的生根与移栽、移植的研究,建立起无性系。说明,采用组织培养的方法,可以完成骨碎补的人工繁殖,为保护这种濒危植物提供新技术。同时,该技术的建立也将对利用愈伤组织进行基因水平的研究、建立其资源信息库起到重要的影响。

骨碎补根茎诱导的颗粒状愈伤组织,继代培养 50 d,平均每个愈伤组织颗粒能培养形成 38.2 个愈伤组织颗粒。按照这个速度,每年可繁殖出 $38.2^{7.3}$ 个后代。这种繁殖速度完全可以满足人们保护该植物的栽培和药用栽培对种苗的需求。同时,该技术的建立也将对利用愈伤组织进行基因水平的研究、建立其资源信息库起到深远的影响。

生根培养中,在延长培养时间、增加光照强度的条件下,试管苗出现了根茎,这种结果与姜长阳等^[15]对蕨菜结果研究一致。而在移栽试验中,具有根茎的试管苗,移栽后即使原来的叶片全部死亡,还会在根茎上发出新叶片,使其成为移栽成活的试管苗。这不仅说明具有根茎的试管苗容易移栽成活,而且也表明试管苗的根茎具有较多的分生细胞。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1972:144.
- [2] 韩全忠,王正兴. 大连地区植物志(上册)[M]. 大连:大连理工大学出版社,1993:27.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2762.
- [4] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1992:1176.
- [5] 鲁雪华,郭文杰,刘润东,等. 华南鳞盖蕨的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005,41(4):495.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [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,宁淑香,于淼,等. 蕨菜愈伤组织高效再生体系的建立[J]. 园艺学报,2003,30(3):343-345.

Research on the Callus Induction and Establishing the Clone of *Davallia marieslii* Moor ex Baker

WEN Wei

(Tieling Teachers College, Tieling, Liaoning 112001)

Abstract: The rhizome, leaf, petiole were used as explants to research on callus induction and differentiation, the test-tube taking roots, transplanting, cutting. The clone of *Davallia marieslii* Moor ex Baker was established successfully. The results indicated that $1/2$ MS+ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA 0.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D 0.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the optimum medium for inducing callus of stem and roots and also the subculture of callus, $1/2$ MS+BA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA 0.05~0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the optimum medium for differentiation, $1/2$ MS+NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the optimum medium for taking roots. It could be more easily survived when the rhizome formed. The test-tube plantlets also kept the completely botanical characters of *Davallia marieslii* Moor ex Baker.

Key words: *Davallia marieslii* Moor ex Baker; tissue culture; clone