

羊齿天门冬组培快繁体系的研究*

杨尧军¹ 马和平² 兰小中³ 李春燕⁴

(1. 平顶山工学院 河南 平顶山 467044; 2. 西藏农牧学院高原生态研究所;
3. 西藏农牧学院动物科学技术学院; 4. 西藏农牧学院资源与环境学院)

[摘要] 在对羊齿天门冬离体组织培养的研究中,探讨了愈伤组织诱导和生根状况及羊齿天门冬组培快速繁殖技术,筛选出适宜的愈伤组织诱导和生根的培养基。结果表明:最适的愈伤组织诱导培养基为1/2MS+NAA1.0 mg/L+KT1.0 mg/L+ZT4.0 mg/L;最适的生根培养基是1/2MS+NAA1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L。

[关键词] 羊齿天门冬 组织培养 愈伤组织 生根

羊齿天门冬(*Asparagus filicinus*)系百合科植物羊齿天门冬(*Asparagus filicinus* Ham. Ex D. Don)的干燥块根,是抗癌药材;叶可配鲜切花。别名蕨叶天门冬、千锤打。本品含粘液质高达60%,并含少量生物碱、挥发油、糖类等成份。具有润肺燥湿、杀虫之功。临床可用于虚弱咳嗽、肺虚久咳、骨蒸潮热、疥癣等症(中国医学科学院药物研究所1981)。然而,由于高原生态环境的破坏、人们多年过度采挖及其生殖机制的限制(MA Shao-bin1997; HUANG Heng-yu2001; MA Shao-bin1996),羊齿天门冬野外分布的地区和数量锐减,资源濒临灭绝,难以满足医药领域的需求(YU Pei-zhong,1999),参照中国珍稀濒危植物等级和贾敏如对珍稀濒危中药物种等级划分标准(傅立国1989;贾敏如1995),结合藏药现状,制定濒危藏药物种保护等级,羊齿天门冬属于二级(濒危)濒临灭绝状态的藏药野生生物种。国内曾有该研究的报道,但其试验

结果不甚理想。有鉴于此,我们进行了更深层次的研究,本研究对羊齿天门冬组培快速繁殖技术进行了研究,旨在为持续开发利用该植物提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本实验于2007年4月15日采用西藏农牧学院园艺场栽种的生长正常健康的羊齿天门冬春季嫩枝为材料进行组织培养。

1.2 消毒方法

将采集的嫩枝先用毛刷蘸洗衣粉溶液轻轻地刷洗,再用自来水冲洗浸泡数分钟,然后切成1~1.5 cm长茎段(含1~2个腋芽)。在超净工作台上用75%酒精消毒10 s后,再用0.1%升汞消毒15 min,最后用无菌水冲洗5次等处理。

2 培养基的配置和培养条件的确定

2.1 培养基的配置

以MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS培养基为基本培养基,加入不同浓度的IAA、

NAA、IBA、6-BA、KT、ZT,每个处理中加蔗糖30g/L,加琼脂5g/L,用NaOH溶液或HCl调整pH值至5.8左右。

2.2 培养条件

温度25±1℃,起始培养和继代培养时光强为1000~16000 lx,生根培养时光强为1600~2000 lx,光照时数16 h/d;采用的培养环境为RXZ型人工气候箱。

3 试验过程与分析

3.1 培养基的筛选

3.1.1 基本培养基的筛选以及对芽生长的影响 为了得到最适宜的培养基,我们进行了不同浓度的盐对外植体腋芽生长影响的对比试验,结果如表1所示。

在附加物(6-BA2.0 mg/L, IBA1.0 mg/L)相同的条件下,MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS的培养基上培养30 d,从苗高及产生不定芽个数看,以MS培养基优于其它培养基,随着盐浓度进一步降低时,茎生长减缓。

3.1.2 植物生长调节剂对初接种外植体生长的影响 在植物组织培养中起重要

表1 培养基对芽生长的影响

编号	培养基	接种外植体个数	萌发30 d的生长量	平均每个外植体分化数	芽生长状况
1	MS	80	5.2	5.1	长势最好
2	1/2MS	80	4.0	3.4	长势较好
3	1/3MS	80	3.3	2.3	前期长势好,后期部分变褐死亡
4	1/4MS	80	1.8	1.5	长势缓慢

表2 植物激素对腋芽增殖生长的影响

编号	激素水平				处理数	20 d后平均苗高/cm	平均每个腋芽萌发不定芽数/个
	6-BA	KT	NAA	IBA	/个		
1	2.0			0.2	80	3.0	2.1
2	1.0			0.5	80	3.5	2.9
3		1.0	0.2		80	4.1	3.5
4	0.5			1.0	80	5.2	3.9
5	1.0		0.2		80	1.7	1.8

* 资助基金:国家自然科学基金(30640030),西藏自治区科技厅重点科研项目。

作者简介:杨尧军(1978—),男,汉族,硕士,甘肃临洮人,主要从事林木遗传育种的研究。Email: yangyaojun @ hncj. edu. cn, Tel: 15937580573。

作用的激素主要是生长素和细胞分裂素,初培养使用较高浓度的生长素,以诱导脱分化和促进愈伤组织。高水平的细胞分裂素倾向于诱导不定芽的形成,也使侧芽增生加速,结果形成过于细密的不定芽;同时嫩芽的质量下降,不利于下一步的生根和种植到介质中。因此,在力求提高嫩茎质量有较多数量的情况下,必须减少细胞分裂素的用量(韦三立 2000)。

高等植物每个叶腋中都有隐芽存在,在一定条件下可使其萌发形成丛芽,从而达到快繁的目的。把经过初代培养的羊齿天门冬新枝剪下来,插在新配制的以MS基本培养基,附加不同浓度6-BA、IBA、NAA、KT进行最佳组合、筛选。培养30 d后,对萌发率、长势、愈伤组织诱导、芽增殖情况进行调查,发现不同浓度的组合,对芽增殖效果有显著差异(表2)。

在MS+6-BA1.0~2.0 mg/L+IBA0.2 mg/L培养基中,芽生长快,但分枝少,繁殖系数低,芽增殖效果较差;在MS+KT1.0 mg/L+NAA0.2 mg/L中,多为单茎生长,增殖效果不明显;在MS+6-BA0.5~1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L中,苗长势快,产生小分枝多,繁殖系数较高;当6-BA浓度高于1.0 mg/L时,外植体上易形成愈伤组织。由此可见,腋芽增殖阶段的最适宜培养基为MS+6-BA0.5~1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L。

3.1.3 植物生长调节剂对愈伤组织诱导分化的影响 通常情况下,若生长素浓度过低,则表现为组织块不能生长,颜色逐渐变淡,时间过长,植物组织会死亡;若生长素浓度过高,则表现为愈伤组织生长旺盛,细胞团松散,几乎不可能分化出苗。把经过继代培养的新生枝条(外植体),分别放在附加不同植物生长调节剂的培养基上,同时观察并统计愈伤组织诱导情况

及诱导率(范国强等 2004;李尚中等 2004)(愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织外植体的数量/放置外植体的数量%)。在试验中发现,由于所附加的激素浓度不同,愈伤组织的生长发育状况也不尽相同(见表3)。

实验表明,用继代培养的羊齿天门冬新枝完全可以诱导愈伤组织。在1号培养基中,第28天枝条基部边缘有少量黄绿色愈伤组织产生,但生长速度缓慢。2号培养基产生愈伤组织也较迟,在第25天开始出现,但颜色发黄,有褐化现象,生长缓慢。3号培养基的诱导率较好。4号培养基中,第25天枝条基部边缘有大量黄绿色愈伤组织出现,生长速度很快,34 d愈伤组织块表面有颗粒状的凸起,出现大量球形,棒状胚状体。5号较差且颜色发黄,有褐化现象,生长缓慢。通过比较不同培养基上的愈伤组织诱导情况可以看出,在1/2MS+NAA1.0 mg/L+KT1.0 mg/L+ZT4.0 mg/L,培养基中诱导率可达89%,死亡率低,生长速度快。所以愈伤组织诱导分化最适培养基为1/2MS+NAA1.0 mg/L+KT1.0 mg/L+ZT4.0 mg/L。

3.1.4 培养基中糖对试管苗增殖和生长的影响 将试管丛生苗接种于改良1/2MS基本培养基上,附加不同植物生长调节剂做如下处理,培养基中加3%和5%蔗糖和去糖为一对照,并于接种后30 d进行统计,试验连续重复3次。

通过试验可看出,试管丛生苗在没有糖的培养基中生长不良,到第二代即出现死亡现象。这是由于组织培养材料,因一般没有叶绿体或只有发育不好的叶绿素,在人工培养条件下,逐渐丧失了进行光合作用的能力,从自养型转为异养方式,培养基中没有提供碳水化合物的糖,试管苗

就难以适应这种不良条件而出现死亡现象。由此可见,培养基中糖是一种不可缺少的成分,不能减少,但也不能过量。

3.1.5 羊齿天门冬组培苗生根的诱导 从前面的试验中发现,当培养基中只有生长素的情况下容易生根。选取2种生长素四水平进行正交试验。30 d后统计生根率(有生根现象的茎段数/原接种的茎段数)和生根系数(生根系数/有生根系数的茎段数%)。

结果表明IBA不同浓度对生根率和生根系数的影响与NAA浓度密切相关。当NAA浓度在0.2 mg/L时,IBA在0.2 mg/L时部分生根,茎基无愈伤组织形成;当NAA为0.5 mg/L及IBA为0.2~0.5 mg/L时,生根系数与生根率相对较高,且茎基生成愈伤组织;当NAA为1.0 mg/L IBA为1.0 mg/L时,生根率和生根系数均达最高,根长,有愈伤组织产生,有利于移栽后的成活。因此生根培养基的最适配方为:1/2MS+NAA1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L。

4 结果与讨论

羊齿天门冬属于二级(濒危)濒临灭绝状态的藏药野生物种,为了持续开发利用该植物,很有必要对其进行组织培养的研究。植物生长调节剂是影响组培快繁的重要因素(李浚明 2001;刘云龙王本昌 1999)。本试验通过对植物生长调节剂的筛选,结果表明:(1)初接种最佳培养基为MS+6-BA2.0 mg/L+IBA1.0 mg/L;(2)腋芽增殖阶段的最适宜培养基为MS+6-BA0.5~1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L;(3)愈伤组织分化培养基为1/2MS+NAA1.0 mg/L+KT1.0 mg/L+ZT4.0 mg/L;(4)最适生根培养基为1/2MS+NAA1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L。

糖是植物生长不可缺少的成分。试管丛生苗在没有糖的培养基中生长不良,到第二代即出现死亡现象。这是由于组织培养的材料,因一般没有叶绿体或只有发育不好的叶绿素,在人工培养条件下,逐渐丧失了进行光合作用的能力,从自养型转为异养方式,培养基中没有提供碳水化合物的糖,试管苗就难以适应这种不良条件而出现死亡现象。由此可见,培养基中糖是一种不可缺少的成分,不能减少。

表3 不同激素对愈伤组织分化的影响

培养基	激素水平				外植体数/个	诱导率/%	死亡率/%	愈伤组织生长发育状况
	IBA	NAA	ZT	KT				
1	0.2	0	2.0	0	30	54	20	增长分化缓慢
2	0	0.1	3.0	0.2	17	65	15	增长分化缓慢
3	0.5	0.5	0	0.5	30	75	10	增长分化较快
4	1.0	1.0	4.0	1.0	35	89	8	增长分化最快
5	2.0	1.5	5.0	1.0	20	62	16	后期易褐化死亡

不同覆盖方式对刺槐直播造林出苗率的影响*

刘艳¹ 邢尚军² 侯栋¹ 马风云^{1*} 陈怀梁¹ 侯龙鱼³

(1. 山东农业大学林学院 271018 山东 泰安; 2. 山东省林业科学研究院;

3. 中国科学院植物研究所)

[摘要] 为了使山东石质山地直播造林有较高的出苗率和成活率,我们研究了不同覆盖方式对刺槐直播造林的影响,结果表明:地膜覆盖有效地增加了土壤各层温度;提高了0~30 cm土壤的水分含量,给刺槐生长造就了良好的水分环境;提高了出苗率和苗高,确保了干旱土地上幼苗发芽出土,且苗全苗壮。覆草的各层地温比露地的低,但温度相对稳定,变幅小;提高了0~20 cm土壤的水分含量;覆草的出苗率虽然较露地的低,但苗高比露地的高,可以晚些去草,以提高出苗率。

[关键词] 覆膜 覆草 露地 刺槐 直播造林

直播造林,与植苗造林相比,尽管见效慢,但具有苗木根系完整、适应性强、施工简单、节约开支等优点。随着造林绿化工作的不断深入,深山、远山、贫瘠山区已成为造林绿化工作的重点和难点,简单易

行、省工省力、节约资金、宜大面积工程造林的直播造林将是未来我国山地造林绿化的重点应用技术。

通过多年直播造林与植苗造林的对比试验表明:直播造林比植苗造林省时、省工、省钱,成活率较高^[1],是一项适合大面积无水源的山地造林^[2],适合石灰岩瘠薄山地造林^[3]的有效技术措施,且在植苗造林受到制约的地方,可用直播造林代替,并且效果很好^[4]。而且当恢复退化土地的植被时,进行土壤改良并采用播种恢复技术,将是成功恢复植被、形成稳定的森林群落的重要和必要的积极措施^[5]。

山东很多地方春季干旱多风,温度变化不稳定且较大,为了提高直播造林苗木出苗和成活率,我们在昌乐、历城、徂徕山等地区进行了刺槐直播造林试点试验。为了提高刺槐的出苗率、增加苗高,本试验定量研究了不同覆盖方式对刺槐直播造林的影响,以从理论和技术上规范直播造林,为山东省石质山地直播造林提供技术支持,并为其它地

区直播造林提供依据。

1 试验材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于山东省泰安市天外村附近较荒芜的山上,海拔200 m。泰山位于山东省中部,地处东经117°06′、北纬36°16′,属于暖温带半湿润季风气候,水热资源丰富,具有明显的高山气候特征。年平均气温5.3℃,7月气温最高,平均20.6℃,1月最低,平均-11.6℃,四季分明。年平均降水量1 132.0 mm。山顶气温一般比山下常年低7~8℃,雨热同季。春季较干多风,夏季高温多雨,秋季天高气爽,冬季冷而少雪。试验地土壤是酸性棕壤,土层厚度大约30 cm,含碎石块较多。

1.2 试验设计

刺槐种子由山东省林业科学研究院提供。种子含水量6.5%,千粒质量20.11±0.18 g,发芽率85%。播种前,用始温90℃水浸种24 h。试验分覆膜、覆草(厚度5 cm左右)和不覆盖3种模式,采用沟播法,播

* 山东省林业局项目:宜林瘠薄山地直播造林技术与示范。

作者简介:刘艳(1982-),女,硕士研究生,主要从事森林植被恢复与生态重建研究,Email: holylyan@yahoo. cn.

** 通讯作者

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志(第二册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1981, 269-272.
- [2] Ma Shao-bin. A contribution to the geographical distribution and phylogeny of podophylloideace[J]. Acta botanica Yunnanica, 1997, 9(1): 48-56.
- [3] Huang Heng-yu. The Genesis of microspore and the formation of mail gametophyte in *Dysosma versipellis* (hance) M. Cheng[J]. Bulletin of Botanical Reserrch, 2001, 21(4): 562-566.
- [4] Ma Shao-bin. A karyotypic study on podophylloideae(Berberidaceae)[J]. Acta botanica Yunnanica, 1996, 18(3): 325-330.
- [5] Yu Pei-zhong. Separation and determination of podophyllotoxin in *Diphylleia sinensis* L[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 1999, 19(1): 35-37.
- [6] 傅立国. 中国珍稀濒危植物[M]. 上海:上海教育出版社,1989. (7~12本刊略)★