

# 荚果蕨叶柄的组织培养及无性系建立

马鑫鑫 杜滨 赵静 佟少明 姜长阳

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

**摘要:**以荚果蕨叶柄为外植体,以1/2MS、1/3MS为基本培养基,附加不同浓度的BA、2,4-D、IAA、NAA,诱导叶柄形成愈伤组织,并使愈伤组织分化形成幼叶,培养成生根试管苗,建立起荚果蕨无性系。结果表明:1/2MS + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>150 mg · L<sup>-1</sup> + BA0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D1.4 mg · L<sup>-1</sup> + NAA1.4 mg · L<sup>-1</sup>是诱导叶柄形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基;1/2MS + BA0.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA0.1 mg · L<sup>-1</sup>是愈伤组织分化培养的理想培养基;1/3MS + IAA0.9 mg · L<sup>-1</sup>这一培养基是荚果蕨试管苗生根培养的理想培养基;移栽到田间的试管苗长势旺盛、整齐,根茎上的须根比附近的野生植株增加1-1.5倍。

**关键词:**荚果蕨;组织培养;愈伤组织;无性系

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 1007-7731(2007)15-21-03

## Tissue culture and Establishment of Asexual Line of Petiole from *Matteuccia struthiopteris*

Ma XinXin Du Bin Zhao Jing Tong ShaoMing Jiang ChangYang (College of Life Sciences, Liaoning Normal University Liaoning Dalian 116029)

**Abstract:** The petiole was the explants from the *Matteuccia struthiopteris*, taken 1/2MS, 1/3MS as the basic culture medium which were added different concentration of BA, 2,4-D, IAA, NAA for the induction of callus. The young leaves were differentiated from the callus and then rooted and grew a seedling. The results showed that the optimum media which induced callus was 1/2MS + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>150 mg · L<sup>-1</sup> + BA0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D1.4 mg · L<sup>-1</sup> + NAA1.4 mg · L<sup>-1</sup>; 1/2MS + BA0.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA0.1 mg · L<sup>-1</sup> was the optimum for callus differentiation;

**Key words:**

荚果蕨 (*Matteuccia struthiopteris*) 又称黄瓜香、荚果观众,属于球子蕨科荚果蕨属多年生草本蕨类植物,我国在华北、东北、陕西、四川等地有分布,主要生长于林下、山脚下阴湿地和小溪边等<sup>[1]</sup>。荚果蕨含有狗脊蕨酸、麦角甾、芹菜素、核黄素等成分<sup>[2]</sup>,因其具有清热解暑、止血驱虫等药效,近年来辽宁南部地区人们经常采集供药用或观赏栽培,使原本分布数量就较少的荚果蕨野生资源遭到了破坏,导致野生资源分布区域和数量迅速减少。为了满足人们药用的需要,有人开始进行人工栽培。但由于荚果蕨的孢子在人工条件下不易萌发,只能挖取野生植株作为人工栽培的种源,这不仅使已经非常有限的野生资源又遭到了破坏,而且也很难挖到满足人们栽培需要的大量种苗。为此,我们进行了荚果蕨的组织培养和无性系建立的研究,以满足人们的需要。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料及灭菌** 将采自庄河市步云山上生长非常旺盛的荚果蕨植株叶柄、叶片和根茎用清水冲洗30 min左右后,在500 ml的磨口广口瓶中用0.05%的安利液振荡洗涤3次,再用蒸馏水洗涤2次,然后将材料移到超净工作台上,在无菌条件下用75%的乙醇振荡灭菌30s后,用0.05%的HgCl<sub>2</sub>溶液振荡灭菌2min,再用0.03%的HgCl<sub>2</sub>溶液振荡灭菌10min,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

**1.2.1 培养基及培养条件** 以1/2MS为基本培养基,附加不同种类、不同浓度的细胞分裂素和生长素。固体培养基琼脂含量为6g · L<sup>-1</sup>,pH值为5.6-5.8;诱导愈伤组织培养基含蔗糖30g · L<sup>-1</sup>,生根培养基为15g · L<sup>-1</sup>,光照强度2000Lx左右,光照时间12 h/d,培养温度23℃。

### 2 结果与分析

**2.1 不同培养基对叶柄、叶片与根茎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1/2MS + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>150mg · L<sup>-1</sup>(单位下同略) + BA0.5培养基上暗培养,由于切口损伤部位直接接触到培养基,培养40d左右,切口表面长出松散的愈伤组织。接着继续培养30d观察统计。由表1可见,在不含生长素和生长素的含量低于0.4的培养基上,几乎不能诱导形成愈伤组织;在2,4-D、NAA单独使用,含量在0.6-2.2的范围内,随着生长素含量的增加,愈伤组织的诱导率不断提高。在同时含有2,4-D、NAA的培养基上、且总浓度达到1.2时,随着生长素浓度的增加,愈伤组织的诱导率也随着增加。但当两种生长素配合使用,其浓度超过1.8时,愈伤组织诱导率出现降低的趋势。从3种不同材料的愈伤组织的诱导率看,叶柄的诱导率最高,根茎次之,叶片最差;在以叶柄为

材料,同时含有浓度均为 1.4 的 2,4-D 与 NAA 培养基上,不仅愈伤组织的诱导率达到了 89%,而且愈伤组织生长速度快。观察表明,在这一培养基上诱导生长的愈伤组织初期为略带黄色不规则形,当培养到 70d 时生长为黄色的颗粒状。将在 1/2MS + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>150 + BA0.5 + 2,4-D1.4 + NAA1.4 培养基上诱导培养的叶柄愈伤组织接种到相同的培养基上,转到光照条件下进行继代培养。培养 10d 左右,黄色的颗粒状愈伤组织逐渐变成了浅绿色的颗粒状,并开始迅速生长增殖;当培养到 50d 时,愈伤组织平均生长增殖率为 22 倍,连续继代培养 12 代,愈伤组织的生长增殖速度与外部形态基本保持不变。这种愈伤组织为具有分化能力的愈伤组织<sup>[3,4]</sup>。这说明 1/2MS + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>150 + BA0.5 + 2,4-D1.4 + NAA1.4 这一培养基为诱导荚果蕨根茎形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基。

表 1 不同浓度生长素对愈伤组织诱导的影响

生长素 (mg · L <sup>-1</sup> )		根茎 诱导数	根茎 诱导率 (%)	叶片 诱导数	叶片 诱导率 (%)	叶柄 诱导数	叶柄 诱导率 (%)
NAA, 2,4-D							
0	0	0	0	0	0	0	0
0.2	0	0	0	0	0	0	0
0.6	0	8	8	4	4	11	11
1.0	0	22	22	5	5	18	18
1.4	0	37	37	23	23	34	34
1.8	0	43	43	33	33	58	58
0	0.2	0	0	0	0	0	0
0	0.6	12	12	0	0	14	14
0	1.0	17	17	7	7	24	24
0	1.4	47	47	16	16	51	51
0	1.8	61	61	28	28	59	59
0	2.2	68	68	24	24	77	77
0.2	0.2	0	0	0	0	2	2
0.6	0.6	21	21	32	32	16	20
1.0	1.0	48	48	50	50	67	67
1.4	1.4	66	66	54	54	89	89
1.8	1.8	55	55	28	28	45	45
2.2	2.2	19	19	14	14	22	22

注:接种数量均为 100

**2.2 愈伤组织的继代培养与分化培养** 把经过上述继代培养的浅绿色的颗粒状愈伤组织,接种到以 1/2MS、1/3MS 为基本培养基,附加不同激素浓度 BA、NAA 的分化培养基中进行颗粒状愈伤组织的分化培养。接种后 25d 有的培养基上可见分化出幼叶,随着培养时间的延长,愈伤组织的表面逐渐分化出布满培养基表面的丛生叶。培养到 65d 时进行统计。由表 2 表明,在 BA 含量为 0.2、NAA 的含量分别为 0.1、0.2、0.5、1 的培养基上,以及在 BA 含量为 0.5、NAA 的含量分别为 0.1、0.2、0.5 的培养基上和 BA 含量为 1、NAA 的含量为 0.1 的培养基上,能诱导愈伤组织分化。其中在 1/2MS + BA0.5 + NAA0.1 这一培养基上不仅愈伤组织颗粒分化率达 94%,而且分化的丛生叶长势旺盛。把在这一培养基上分化的丛生叶,切成具有 3-4 个叶、基部具有愈伤组织叶丛,接种到相同培养基上进行分化继代培养。经过 50d 的培养,能分化出生长较为旺盛的丛生嫩叶,平均分化增殖率为 24.5 倍。经过连续 9 次的继代培养,其分

化率和长势基本不变。这说明 1/2MS + BA0.5 + NAA0.1 这一培养基是荚果蕨愈伤组织分化和丛生叶分化培养的理想培养基。

表 2 不同激素配比对颗粒愈伤组织分化的影响

激素 (mg · L <sup>-1</sup> )		分化颗 粒数	1/2MS 分化率 (%)	长势	分化颗 粒数	1/3MS 分化率 (%)	长势
BA	NAA						
0.0	0.0	0	0		0	0.0	0
0.2	0.1	112	56	+++	104	52.0	+++
0.2	0.2	128	64	++	70	35.0	++
0.2	0.5	86	43	+	16	8.0	+
0.2	1.0	37	18.5		13	6.5	
0.5	0.0	0	0		0.0	0	
0.5	0.1	188	94	+++	56	28.0	++
0.5	0.2	77	35.5	++	42	21.0	+
0.5	0.5	47	23.5		6	3.0	
0.5	1.0	0	0		0.0	0	
1.0	0.0	0	0		0.0	0	
1.0	0.1	28	14	+	36	18.0	+
1.0	0.2	0	0		0.0	0	
1.0	0.5	0	0		0.0	0	
1.0	1.0	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 不同浓度激素对生根培养的影响** 将在分化培养基上继代分化培养生长较为旺盛的分化叶丛,切成基部由愈伤组织块连接的 3-5 个分化叶后,接种到附加不同浓度 IAA、NAA 的 1/3MS 为基本培养基的培养基上,进行生根培养。接种 7-10d 后,在有的培养基上培养的材料能形成可见根原基,30d 时观察统计。由表 3 可见,在附加不同浓度 IAA 或 NAA 的 1/3MS 生根培养基上,除了 NAA 的含量为 1.5 的培养基外,其他均可诱导生根。但是,在附加不同浓度 NAA 的生根培养基上,不仅诱导生根率较低、生根数较少,而且所生出的根多数是由基部愈伤组织发出的,在移栽中这样的根都属于无效根<sup>[5]</sup>。而在附加不同浓度 IAA 的生根培养基上,不仅诱导生根率较高、生根数较多,而且所生出的根多数是由分化叶叶柄基部发出的。尤其是在 IAA 浓度为 0.9 的生根培养基上,不仅接种材料的生根率达到了 93%,平均生根数为 7.8 条,而且生根苗生长较为旺盛。把在这一培养基上培养的生根试管苗继续培养 30d,约 80% 生根试管苗可以长出长 0.3 cm 左右的直立根茎。上述说明 1/3MS + IAA0.9 这一培养基是荚果蕨试管苗生根培养的理想培养基。

**2.4 试管苗的移栽** 选择根数多、有根茎、试管苗生长较为旺盛的培养瓶,打开瓶塞,放到强度为 4000Lx 左右的光照下炼苗 3-4d 后,将试管苗从培养瓶中取出,立刻用净水洗去基部的培养基,然后移栽到铺有约 10 cm 厚河沙、珍珠岩、炉灰渣或肥沃园土 4 种不同基质的温室苗床上。在保持温度 18℃-28℃、湿度 90% 左右、没有直射光照的条件下,移栽后 15d 成活,25d 左右开始正常生长。30d 时观察统计证明,移栽到于炉灰渣为基质的苗床上,不仅移栽成活率都在 91% 以上,而且试管苗生长旺盛整齐,根系较发达。

表3 不同浓度激素对生根的影响

激素 (mg · L <sup>-1</sup> )		根数	生根率(%)	平均生根 条数/叶丛
BA	NAA			
0.0	0.0	0	0	0.0
0.3	0.0	27	27	2.6
0.6	0.0	69	69	4.2
0.9	0.0	93	93	7.8
1.2	0.0	37	37	3.5
1.5	0.0	11	11	2.3
0.0	0.3	8	8	2.8
0.0	0.6	35	35	4.4
0.0	0.9	26	26	3.0
0.0	1.2	9	9	4.3
0.0	1.5	0	0	0.0

注:接种数量均为100。

5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,试管苗长势旺盛、整齐,根茎上的须根比附近的野生植株增加1-1.5倍。

### 3 讨论

尽管目前已经多有蕨类植物组织培养及无性系建立的报道<sup>[5-11]</sup>,但迄今未见荚果蕨组织培养的报道。

本研究以荚果蕨的叶柄为材料,进行了组织培养研究,成功地诱导了愈伤组织,建立起荚果蕨的无性系,不仅可以提供长势旺盛、整齐的荚果蕨种苗,而且为荚果蕨的种质保存提供了可能。由此还能证明,荚果蕨非分生组织和细胞也具有全能性。

荚果蕨叶柄诱导的颗粒状愈伤组织,在继代培养50d可增殖24.5倍,这说明通过这种人工方法,荚果蕨可以繁殖出大量无性系后代,从而满足了生产上对大量种苗的需求,而且也可以把这种愈伤组织作为转基因研究材料,对荚果蕨进行基因工程的研究。

在进行愈伤组织的诱导中,接种的3种非分生材料,

(上接27页)有的性状就是系统外性状。

从中可以得知,生物系统外系性状让某个生物系统所具备、表达的并不多,否则,生物就不能称其为生物了。

从近年来人类的科学实践和研究中可以看到,凡是生物系统内性状,对于这些目的性状基因,欲要得到理想的预期的转基因生物的确很难,至今,取得成功的事例不多。为什么呢?前文已提到,属于系统内性状的外源基因,一旦转入受体植物,那对原生态的原生命系统是无端的介入和干预,整个生命系统要重新调整,因为介入的性状与原系统的性状相同或相似,一个成分的多、少都影响了原生命系统的平衡和稳定。由于受到基因互作,基因多效性等因素的影响,很难精确地预测外源基因在新的遗传背景中可能产生的表型效应和副作用,也不了解它们对人类健康和环境产生何种影响。

### 外文字母的大小写

1. 中国人名用汉语拼音拼写时,姓和名的第一个字母均大写;若是双名,第二个名字小写,双名连写,中间不加连线,如

叶柄的诱导率最高,这种结果一方面说明荚果蕨叶柄的分生力较强,另一方面也可能与叶柄较大,在灭菌中受到的损伤较小有关。

移栽到田间的试管苗长势旺盛、整齐,根茎上的须根比附近的野生植株增加1-1.5倍,一方面与在培养过程中使用生长素,移栽到田间后,生长素仍在发挥后效作用有关,另一方面也可能与研究所用的材料具有生长旺盛的遗传性有关。

### 参考文献

- [1]中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1972.220
- [2]杨岚,王满元,赵玉英,屠呦呦. 荚果蕨化学成分的研究[M]. 西安:西安交通大学出版社,2004:35-40
- [3]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,1996,67-72
- [4]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
- [5]李文安等. 狼尾蕨的离体培养[J]. 上海:植物生理学通讯,1993,29(3):44
- [6]尹怀约. 贯众叶片愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 上海:植物生理学通讯,1989,(4):39-45
- [7]郑若仙. 彩叶凤尾蕨孢子离体繁殖与组织培养[J]. 上海:植物杂志,1992,28(2):8
- [8]金建平. 皱叶肾蕨卷曲叶尖的离体培养[J]. 上海:植物生理学通讯,1992,28(5):359-360
- [9]黄韶玲等. 鹿角蕨的组织培养[J]. 上海: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]. 上海: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]. 上海:植物生理学通讯,2004,40(5):575 (胡克玲编,张琪琪校)

如果转基因生物的目标是针对生物系统内性状(期望在新的转基因品种中提升该性状值),其实,我们也可以通过物种性状的多态性或生物的多样性来解决同样问题。如果人类专门为了获取某些特定的生化产物而采用转基因手段,目标和方向完全变了,这是转基因手段另外性质的应用。

### 3 转基因生物的前景展望

实践表明,转基因生物较成功的是能充分转入受体生物“生物系统外”性状。因此,人们最好不要把希望放在转基因这条途径来改变生物固有的性状,如农作物的产量、品质等,效果不理想。转基因作物所能完成的只是适应或表达人为造成的少许生物系统外的性状,其种类很有限,而且发展面积也是有限的,过量发展,肯定会破坏生物多样性及生态平衡。(张琪琪编,魏凤校)

Zou Shuming. 2. 国家、国际组织、国际会议、条约、文件等用大写开头(缩写亦然)。3. 书名、期刊名、作品等英文除前置词、虚词以外,每个词均大写开头;俄文则只是第一个词大写开头。