

# 薇菜组织培养技术

张 敏

(湖北三峡职业技术学院 生物工程系组培中心,湖北 宜昌 443000)

**摘要:**试验以薇菜穗状孢子段为接种材料,重点研究了影响薇菜孢子萌发、原叶体增殖的各项因素,以及原叶体孢子苗的分化状况和孢子体试管苗练苗成活技术。结果表明:在温度 25℃,光照 12 h/d,光照强度 2 000 lx,培养基中加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L、pH 5.8 培养条件下,孢子萌发最适宜的培养基为 1/4 MS,原叶体增殖的最适合培养基是 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L+活性炭 0.5%;孢子体苗分化最适合的原叶体具有质地疏松、片状体大、肉质厚等性状;在温度 20~30℃,湿度 90%以上,散射光下,选取椰茸作基质练苗,成活率高达 94%。

**关键词:**薇菜;组织培养;原叶体;增殖;孢子体苗;练苗

**中图分类号:**S 647.03.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)02-0206-03

薇菜<sup>[1]</sup>是用一种叫紫萁(*Osmunda japonic* Thumb)的植物或其近缘种分株紫萁(*Osmunda cinnamomea*)的嫩叶加工而成的山野菜。其营养丰富,含有多种人体必需的氨基酸、维生素及微量元素,同时其味道鲜美,无公害,无污染,近年来深受国内外消费者的喜爱。目前国际市场上薇菜供不应求,收购价逐年提高。我国目前的薇菜开发主要停留在野生资源的利用上。由于采收强度大,致使品质逐年退化,野生资源也逐步枯竭。因此,培育优质种苗,进行人工规模化生产具有重要的意义。

试验对薇菜的组织培养技术作了初步探讨,旨在为当地的薇菜大规模栽培和开发提供新技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

薇菜绿色穗状孢子采自湖北省夷陵区殷家坪乡。

### 1.2 试验方法

试验于 2001 年 7 月~2006 年 12 月在湖北三峡职业技术学院组培中心进行。试验分 4 个阶段:①诱导孢子萌发和原叶体形成:将绿色穗状孢子剪下,用 0.1%洗衣粉水浸泡 3 min,自来水冲洗 10 min, HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min, 无菌水冲洗 4~5 次,吸水纸吸干水分,将穗状孢子切成 0.5 cm 的小段,接种于 1/4 MS、1/2 MS、MS 培养基中。每瓶接种 10 段,9 次重复。培养条件:温度 25℃光照 12 h/d,光照强度 2 000 lx,培养基中加蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L, pH 5.8 观察孢子萌发情况;②原叶体的增殖效果试验:将 D 0.5 cm 原叶体小球接种到不同无机盐浓度、

不同 KT 浓度、不同附加物的 3 组培养基进行培养,培养条件同①,观察培养物分化状况;将 D 0.5 cm 原叶体小球接种到 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L+活性炭 0.5%培养基上,放置于不同温度条件下进行培养,其它培养条件同①。以上每处理接种 10 块,9 次重复。观察培养物分化状况。③孢子体苗的分化与生长试验:将 D 1.0 cm、不同生长状况的原叶体接种于 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L+活性炭 0.5%培养基上培养,培养条件同①,每处理接种 10 块,9 次重复。观察孢子体苗分化情况。④孢子体试管苗的练苗:当孢子体试管苗长至 2~4 片叶、3~4 条根、株高 3~4 cm 时,打开瓶盖,在实验室内练苗 3 d 后,用镊子轻轻夹出,洗净根部的培养基,移栽到消毒的椰茸基质上,练苗基数 500 株。注意遮荫保湿,温度保持 20~30℃,湿度保持 90%以上,每隔 2 d 喷 1 次 1/2 MS 大量元素营养液。试验在三峡职业技术学院园艺实训基地进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导薇菜的孢子萌发及原叶体形成

薇菜孢子接种于 1/4 MS、1/2 MS、MS 的培养基<sup>[2-3]</sup>上,1 周后显微镜下可观察到孢子大量萌发,并在以后逐渐形成丝状体和片状体,1 个月后可形成 D 0.2 cm 左右的原叶体。

表 1 不同无机盐浓度下孢子萌发情况

培养基	1 周后显微镜下观察萌发情况	2 周后肉眼观察萌发情况
1/4 MS	大量萌发	孢子段上绿色的绒状体较多
1/2 MS	少量萌发	可见一些绿色绒状体
MS	极少量萌发	没有绿色绒状体

由表 1 可知,薇菜孢子萌发与无机盐浓度高低有

作者简介:张敏(1966-),女,本科,讲师,主要从事植物组织培养的教学和科研工作。E-mail:zhangmin@tcg.edu.cn.

收稿日期:2007-09-01

关,浓度高时抑制孢子萌发,而浓度低时促进孢子萌发,说明低无机盐浓度的培养基有利于孢子的萌发。

## 2.2 原叶体的增殖效果试验

将原叶体分切成 D 0.5 cm 的原叶体小球接种到下列培养基中,2 个月后统计增殖情况。

2.2.1 不同浓度 KT 对原叶体的增殖效果 从表 2 可看出,不同浓度的激素对原叶体的增殖及生长状况有较

表 2

不同浓度 KT 下原叶体的生长情况

培养基	原叶体直径平均数/cm	原叶体生长状况
1/2 MS+KT 0.5 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	0.76	丝状体明显,片状体极少,原叶体质地紧密
1/2 MS+KT 2.0 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	1.09	片状体明显,丝状体极少,原叶体质地紧密
1/2 MS+KT 5.0 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	1.21	片状体大而明显,质地疏松
1/2 MS+KT 8.0 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	1.12	片状体多而碎小,原叶体质地紧密

2.2.2 不同无机盐浓度对原叶体的增殖效果 从表 3 看出,不同无机盐浓度都适合于原叶体生长,对原叶体的生长分化影响不大。

表 3 不同无机盐浓度下原叶体的生长情况

培养基	原叶体直径平均数/cm	原叶体生长状况
1/4 MS+KT 5.0 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	1.19	片状体大而明显,质地疏松
1/2 MS+KT 5.0 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	1.21	片状体大而明显,质地疏松
MS+KT 5.0 mg · L <sup>-1</sup> +IBA 1.0 mg · L <sup>-1</sup>	1.18	片状体大而明显,质地疏松

2.2.3 不同培养温度对原叶体的增殖效果 原叶体接种于 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L+活性碳 0.5%培养基上后,放置于不同温度条件下进行培养,生长状况见表 4。从表 4 可以看出,不同温度对原叶体的生长有较大影响:较低温度条件下,不利于原叶体的增殖培养,而且低温下丝状体生长旺盛,片状体生长缓慢;较高温度也不利于原叶体的增殖和生长。试验表明,25℃的温度较适合原叶体的生长。

表 4 不同培养温度下原叶体的生长情况

培养温度/℃	原叶体直径平均数/cm	原叶体生长情况
18	0.94	丝状体明显,颜色金黄,质地紧密
25	1.21	片状体大则明显,颜色浓绿,质地疏松
28	1.06	片状体多则碎小,颜色黄绿,质地较紧密

表 5 不同附加物下原叶体的生长情况

附加物	原叶体直径平均数/cm	原叶体生长状况
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 200 mg · L <sup>-1</sup>	1.28	片状体生长特别旺盛,质地疏松
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 200 mg · L <sup>-1</sup> +活性碳 0.5%	1.32	片状体生长特别旺盛,质地疏松
CK	1.21	片状体生长旺盛,质地疏松

2.2.4 不同附加物对原叶体的增殖效果 在 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L 的基本培养基上,添加不同的附加物,对原叶体的增殖和生长的效果见表 5。从表 5 中看出,培养基中添加一定的附加物,对原叶体的生长具有一定的促进作用,其原因可能是原叶体生长过程中对 P、K 元素的需求量较大,活性碳在试管内可以吸附原叶体生长过程中产生的一些有害物质,从而更有利于原叶体的生长。

大影响,当 KT 浓度在 0.5~5.0 mg/L 范围内时,随 KT 浓度的增高,原叶体的生长速度加快,片状体生长明显;而当 KT 浓度在 5.0~8.0 mg/L 的范围时,随 KT 浓度增高,原叶体生长速度减慢。说明当 KT 为 5.0 mg/L 时最有利于原叶体的增殖培养。试验还表明,当 KT 浓度低于 IBA 浓度时,有利于丝状体的生长,当 KT 浓度高于 IBA 浓度时,有利于片状体的生长。

## 2.3 孢子体苗的分化

将 D 1.0 cm 不同分化状况的原叶体接种于 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L+活性碳 0.5%的培养基上,4 个月后统计的分化情况见表 6。从表 6 可以看出,原叶体质地对孢子体苗分化有较大影响:丝状体明显,片状体极少的原叶体不利于孢子体苗的分化,而质地疏松、片状体块大、肉质厚的原叶体分化出的孢子体数量和质量都较好。这可能是由于片状体多,原叶体中产生的精卵器较多,它们受精形成合子的机会越多,因而分化的孢子体苗数越多;同时片状体肥大的原叶体中贮藏的营养更丰富,从而更有利于孢子体苗的生长。

将这些孢子体苗转入 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 2%的培养基上,约经过 1 个月的培养,当孢子体苗长大到 3 cm 左右,3~4 片叶时,根系变得较粗壮,即可移到试验地进行练苗。

表 6 不同质地的原叶体分化孢子体苗的情况

原叶体质地分化	孢子体苗数*	孢子体苗的长势
质地紧密,丝状体明显,片状体极少	2.5	色黄绿,叶片小,茎细,根系细小,平均苗高 1.5 cm,根长 1.0 cm
质地紧密,丝状体极少,片状体多而碎小	9.5	色绿,叶片小,茎细,根系细小,平均苗高 1.6 cm,根长 1.1 cm
质地疏松,片状体块大,肉质厚	10	色浓绿,叶片大,茎较粗壮,平均苗高 1.6 cm,根长 1.2 cm

注:\*指 D 1.0 cm 的原叶体上的平均数。

## 2.4 孢子体试管苗的练苗

将生根后的试管苗在实验室内打开瓶盖练苗 3 d 后,洗净根部的培养基,移栽到消毒的椰茸基质上。注意遮荫保湿,温度保持 20~30℃,湿度保持 90%以上,散射光照,每隔 2 d 喷 1 次 1/2 MS 大量元素营养液。20 d 后,练苗成活率达 94%,成活后即可移入大田种植。

## 3 结果与讨论

薇菜孢子萌发、原叶体形成与增殖、孢子体苗分化等各个环节对培养基成份和培养条件都有严格要求,只

# 提高芦荟繁殖系数的四种方法

任如意<sup>1</sup>, 司徒琳莉<sup>1</sup>, 纪萍<sup>2</sup>

(1. 牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157012; 2. 中国林副特产, 黑龙江 牡丹江 157011)

中图分类号: S 682.33 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2008)02-0208-02

芦荟 (Aloe) 为百合科芦荟属多年生肉质常绿草本植物, 原产于非洲东南和阿拉伯半岛等热带地区<sup>[1]</sup>, 全世界约 450 种, 芦荟在医药和化妆品工业中倍受国内外欢迎, 芦荟产业发展很快, 其中又以种植业发展势头迅猛, 芦荟的自然繁殖周期长, 雌雄花开的时间不同, 形成的种子小而少。因此, 用种子育苗很困难。传统上多用分株法繁殖, 但是繁殖系数较低, 为了满足大规模生产育苗的需要, 以及加快优良品种的推广, 组织培养方法已经成为快速生产种苗的有力手段。在芦荟的组织培养中, 芦荟的繁殖率直接影响芦荟组培苗的产量, 因此, 在芦荟的组织培养中, 培养基的成分、培养基中琼脂的含量、光照和培养器皿的选择均影响芦荟苗的繁殖率, 研究将从四方面阐述。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

品种: 木立芦荟, 中国芦荟, 木锉芦荟。

材料类别: 植株的幼嫩叶片、叶鞘, 带腋芽茎段。

### 1.2 方 法

取木立芦荟, 中国芦荟, 木锉芦荟幼苗, 除去多余的叶和根, 浸泡于适当浓度的洗衣粉水中 15 min, 然后用清水冲洗 1 h 以上, 在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 30 s 左右, 再用 0.2% HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒 15~20 min, 并用无菌水冲洗 5~6 次, 冲洗 5 次左右, 洗去植物表面的 HgCl<sub>2</sub>

残液。将消毒后材料的茎、叶鞘分别接种于不同的培养基中, 培养温度 25℃, 光照强度为 1 800~2 000 lx, 光照时间为 12 h/d。以 MS 培养基添加琼脂, 蔗糖 30%, pH 5.6~5.8 为基本培养基, 附加各种不同浓度的生长调节物质, 高压灭菌。

### 1.3 培养条件

(1) 培养基的编号及激素组成和浓度: ①KT 3 mg/L (单位下同)+IBA 1; ②KT 2+IBA 2; ③ZT 0.1~0.7+IBA 1; (2) 培养基中琼脂的含量 0.7%~0.9%; (3) 光照条件 1 800~2 000 lx; (4) 三角瓶培养, 罐头瓶培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基成分对 3 种芦荟组培苗繁殖系数的影响

木锉芦荟组培苗的诱导: 灭菌后的木锉芦荟的叶片、叶鞘, 接种在愈伤组织诱导与分化培养基上①、②, 植物组织在第 1 次分化时, 时间较长, 约经 2 个月的表面停滞期, 才开始出现淡黄色或透明的愈伤组织。用分化过的材料再进行诱导则快得多, 10~20 d 即开始出现愈伤组织。继代到新鲜的培养基后, 愈伤组织即开始长出绿色的芽点, 芽点继续长大, 形成众多的丛生小芽。形成丛生芽的数目与外植体的来源有关, 概因其遗传特性的差异造成的。②号培养基中的出芽率高于①号培养基<sup>[2]</sup>。

3 种芦荟腋芽的诱导: 中国芦荟、木立芦荟和木锉芦荟的茎段, 灭菌后接种在③号培养基上。15~20 d, 腋芽开始萌动。细胞分裂素的浓度在 0.4~0.7 mg/L 的范围内<sup>[3]</sup>。

随着细胞分裂素浓度的升高, 芽的繁殖率也不断升

第一作者简介: 任如意(1968-), 女, 副教授, 主要从事植物基因工程方面的研究工作。

收稿日期: 2007-09-25

有在各因子处于最佳状态时, 才有利于薇菜试管苗的快速分化和生长。试验结果表明: 孢子萌发较适宜的培养基为 1/4 MS; 原叶体增殖较适宜的培养基为 1/2 MS+KT 5.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L+活性碳 0.5%, 经过 2 个月的培养原叶体直径由 0.5 cm 增至 1.32 cm, 体积增大近 7 倍; 直径 1.0 cm 大小、质地疏松、片状体块大且肉质厚的原叶体上分化出孢子苗数平均可达 10 株; 壮苗培养较适宜的培养基为 1/2 MS+IBA

0.5 mg/L; 选取椰茸基质练苗, 散射光照, 空气湿度 90% 以上, 温度 20~30℃ 练苗成活率达 94%, 练苗成活的试管苗经约 1 个月生长即可移入苗床进行大苗培养, 约 1 a 后即可移入大田种植。

### 参考文献

- [1] 南京农学院, 华南农学院. 植物学[M]. 上海: 科学技术出版社, 1980: 211-232.
- [2] 苏建宁, 王俊. 蕨的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1996(5): 361.
- [3] 赵玉芬. 大叶凤尾蕨的离体培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2001(8): 308.