

蜈蚣草孢子组织培养与快速繁殖研究

石晓云¹, 唐伟斌¹, 石膏凌² (1. 邢台学院生物化学系, 河北邢台 054001; 2. 河北省柏乡县柏乡中学, 河北柏乡 055450)

摘要 [目的]寻找蜈蚣草孢子组织培养的适宜培养基,提高蜈蚣草的繁殖效率。[方法]以蜈蚣草孢子为外植体进行组织培养,找出合适的萌发培养基、诱导培养基、分化培养基、生根培养基。[结果]蜈蚣草孢子在 1/8 MS、1/8 MS+0.2 mg/L 6-BA、knop 3 种萌发培养基中均可长出原叶体,之后接种到 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+20.0 g/L 蔗糖诱导培养基中,30 d 后形成球状体(GGB),将 GGB 接种到 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+20.0 g/L 蔗糖培养基上进行增殖,将 GGB 接种到 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+20.0 g/L 蔗糖分化培养基上,20~30 d 后分化出孢子体,再转入 1/2 MS+0.2 mg/L NAA+20.0 g/L 蔗糖生根培养基,30 d 左右长出细根,缓苗后移栽成活率在 90% 以上。[结论]该研究为蜈蚣草生理生化特性、遗传和基因转化的研究奠定了基础。

关键词 蜈蚣草;孢子;组织培养

中图分类号 S682.35 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)25-10775-01

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Pteris vittata* Conidia

SHI Xiao-yun et al (Department of Biochemistry, Xingtai College, Xingtai, Hebei 054001)

Abstract [Objective] The aim was to find the optimum medium for the tissue culture of *Pteris vittata* conidia and to improve its propagation rate. [Method] With *P. vittata* conidia as explant, the tissue culture was carried out to find out the optimum germinating medium, inducing medium, differentiation medium and rooting medium. [Result] *P. vittata* conidia could grow out prothallium on 3 kinds of germination medium such as 1/8 MS, 1/8 MS+0.2 mg/L 6-BA and knop. After being inoculated on induction medium of 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+20.0 g/L sucrose, after 30 d, the globoid (GGB) were formed, which were inoculated on the medium of 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+20.0 g/L sucrose for propagation and on the differentiation medium of 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+20.0 g/L sucrose for sporophyte differentiation. After 20-30 d, the sporophyte was differentiated and then transferred on the rooting medium of 1/2 MS+0.2 mg/L NAA+20 g/L sucrose, and after 30 d, the rootlet grow out. The survival rate of seedling transplanting was above 90% after seedling recovering. [Conclusion] The study laid a foundation for the investigation on the physiological and biochemical characters, heredity and gene transformation of *P. vittata*.

Key words *Pteris vittata*; Conidia; Tissue culture

蜈蚣草(*Pteris vittata* Linn.)属于凤尾蕨科、凤尾蕨属,多年生草本植物,具有较高的观赏和药用价值。蜈蚣草株型优美可作为观叶植物与插花素材;亦可全草入药,性温,味淡,有解毒、祛风除湿、止血、止泻的功效;一般生长在含钙质较高的土壤上,可作为钙质土和石灰岩的指示植物;另外它还是环保植物,可以吸收土壤中的砷,因此具有广阔的应用前景^[1-2]。笔者通过研究蜈蚣草孢子的组织培养,可以找出有效的人工繁殖手段,创建高效的繁殖体系,也为其研究与应用提供方便途径。

1 材料与方

1.1 材料 蜈蚣草成熟孢子。

1.2 培养基种类 萌发培养基:①1/8 MS;②1/8 MS+0.2 mg/L 6-BA;③knop, 3 种培养基上均不添加蔗糖;诱导培养基:④1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA,加 20.0 g/L 蔗糖;增殖培养基:⑤1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA,加 20.0 g/L 蔗糖;分化培养基:⑥1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,加 20.0 g/L 蔗糖;生根培养基:⑦1/2 MS+0.2 mg/L NAA,加 20.0 g/L 蔗糖;以上培养基均添加琼脂 6.5 g/L, pH 值调为 5.8~6.0。

1.3 培养条件 温度(25±1)℃;光照 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 初代培养 用剪刀将带孢子的叶片剪成 0.5~1.0 cm 长的小段,置于流水下轻轻冲洗 5~6 min,于超净工作台上放入消过毒的小三角瓶中,用 70% 乙醇消毒 30 s,接着用 0.1% 升汞溶液消毒 3~6 min,用无菌水冲洗 4 次,用灭过菌

的解剖刀将孢子从叶片上轻轻刮下来,加少许无菌水,孢子漂浮在无菌水上,孢子密度约 200~300 个/ml,用灭过菌的吸管吸取孢子悬浮液,分别接种到 3 种萌发培养基上,置于光照培养箱中培养。第 40 天左右,培养基上出现白绿色小点,第 48 天左右变为嫩绿色,约 1 mm 大小,逐渐长成叶片形的原叶体,数量每瓶 200 个左右,又经 30 d 的培养,要及时转接到新的培养基上,否则原叶体长到一定程度会在培养基表面连接成片,部分嵌合在一起生长。在 3 种萌发培养基上萌发时间与数量无明显区别。

2.2 诱导培养 将原叶体切分成约 0.5 cm³ 的小块,接种到培养基④。30 d 以后形成绿色紧密的球状体(GGB),约 1 cm³。

2.3 增殖培养 将 GGB 接种到培养基⑤上后观察,其继续长大,一般 30 d 左右长大 2~3 倍,应及时切分成小块转接,可转接到培养基⑤上继续增殖,或接到培养基⑥上促使分化成孢子体。

2.4 分化培养 将 GGB 接种到培养基⑥上,20~30 d 后从 GGB 上开始分化出孢子体,40 d 左右,每个 GGB 约分化出 30 个左右的孢子体;再培养 20 d,孢子体长为 2~3 cm 左右。

2.5 生根培养 从 GGB 上切取下来带 3~4 个孢子体的小块,接到培养基⑦上,30 d 左右长出 2~3 个褐色细根,根长 1.0~1.5 cm。

2.6 移栽 将含有腐殖质的细土进行灭菌,当组培苗根长到 2 cm 左右时,打开组培瓶封口于室温下放置 3~4 d,用镊子从三角瓶中夹出组培苗,移栽到营养钵的细土中,浇透水保持湿度 90%~100%,遮阴,每天喷雾,约 2~3 周后缓苗成功,移栽成活率 90% 以上。

3 结论与讨论

蜈蚣草的繁殖主要用分株法,繁殖系数较低,用孢子繁殖需要较高的环境条件。通过研究蜈蚣草组织培养的过程,

(下转第 10786 页)

作者简介 石晓云(1979-),女,河北柏乡人,硕士,讲师,从事遗传育种学教学与植物生物技术研究工作。

收稿日期 2008-06-13

除 A₃ 培养基上外植体材料略有延迟外,其余处理均在第 5 天就开始形成白色或淡黄色的愈伤组织。由图 1 可知,愈伤组织首先出现在叶片的切口边缘部位(较大叶脉周围出现早),并逐渐扩展到整个外植体表面,部分外植体还出现中部隆起弯曲现象。随着培养时间的增加,绝大多数愈伤组织的颜色逐渐由白色或淡黄色转变为黄绿色或绿色,培养 4 周后 A₂、A₄ 培养基上部分培养物表面开始出现红褐色球形突起,其数目最多可达 4 个。试验结果表明,黄白色愈伤组织能在各试验培养基上成功诱导,诱导率为 100%,各培养基对愈伤组织的诱导未表现出明显差异。该试验结果与杨绪等研究结果^[1]一致。诱导出的愈伤组织在 A₃ 培养基上生长缓慢,而在 A₁、A₂、A₄ 培养基上生长较快且未表现出明显的差异。由此可知,在以雪莲果幼嫩叶片为外植体进行愈伤组织诱导

时,培养基中激素 6-BA 与 NAA 的合适比例应为(1:1)~(2:1),最适宜的诱导培养基是 MS + 6-BA 1.0~1.5 mg/L + NAA 0.5~1.0 mg/L。

表 1 不同消毒时间对外植体的影响

Table 1 Effects of different disinfection time on explants

消毒时间 Disinfection time min	接种外 植体数 Number of inoculated ex- plants//块	污染外 植体数 Number of polluted explants//块	污染率 Pollution rate %	褐化死亡 外植体数 Number of brow- ning and dying explants//块	褐化死亡 率 Rate of browning and dying explants//%
4	40	35	87.50	0	0
6	45	38	84.44	1	2.22
8	55	30	54.55	2	3.64
10	45	13	28.89	19	42.22

表 2 雪莲果叶片愈伤组织诱导情况

Table 2 The callus induction situations in *Smalanthus sonchifolius* leaves

组别 Group	接种外植体数 Number of inoculated explants	污染外 植体数 Number of polluted explants	污染率 Pollution rate//%	褐化外植体数 Number of browning explants	褐化率 Browning rate//%	愈伤组 织块数 Block number of calli	愈伤组织 诱导率 Callus induction rate//%	始愈期 Callus formation stage//d	愈伤组织状态 Callus status
A ₁	40	27	67.50	7	17.50	6	100	5	淡黄色或黄绿色,疏松,块大,中部弯曲隆起
A ₂	50	34	68.00	5	10.00	10	100	5	淡黄色或黄绿色,疏松,块较大,中部弯曲隆起,部分出现红褐色球形突起
A ₃	45	30	66.67	4	8.89	2	100	8	黄绿色,块小,致密
A ₄	50	32	64.00	6	12.00	12	100	5	淡黄色或黄绿色,疏松,块较大,中部弯曲隆起,部分出现红褐色球形突起

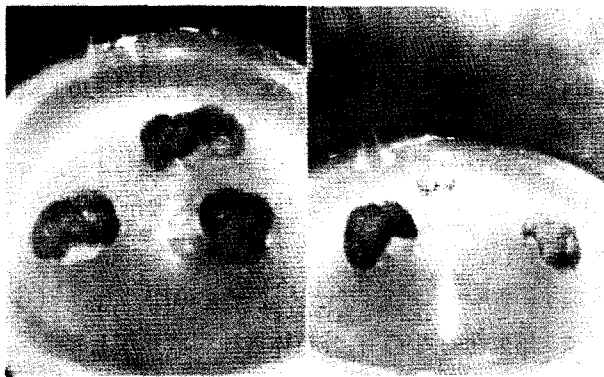


图 1 雪莲果叶片愈伤组织

Fig.1 The calli of *Smalanthus sonchifolius* leaves

3 讨论

在利用雪莲果幼嫩叶片诱导愈伤组织时,用浓度 0.1% 升汞进行外植体消毒的最佳时间为 8 min。消毒时间越长,试验材料受汞离子的毒害程度越大,褐化死亡率越高。试验发

现,有少数外植体被内生菌污染。如何减少或防止该现象的发生有待进一步研究。

该试验以 6-BA 与 NAA 组合诱导愈伤组织,但未见其分化形成不定芽。要获得试管苗,可考虑调整培养基中激素比例配方或选用其他激素组合,进一步进行愈伤组织的分化诱导试验。愈伤组织表面形成的红褐色球形突起是芽原基还是其他结构,有待进一步培养观察。

参考文献

- [1] 杨绪,姜维梅,丁炳扬.菊薯脱毒快繁的研究[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(1):51-55.
- [2] 马挺军,吕飞杰,台建详,等.亚贡叶中营养成分和功能性化学成分分析[J].物质资源与环境学报,2004,13(1):56-57.
- [3] 李卓亚.雪莲果化学成分及药理作用的研究进展[J].食品与药品,2007,9(6):41-43.
- [4] 饶之坤,封良燕,张虽栓,等.雪莲果营养成分分析研究[J].云南化工,2007,34(1):52-54.
- [5] 曾慎.雅根的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(2):212.
- [6] 李广平.影响亚贡组培苗成活的几个因素[J].林业实用技术,2005(6):26.

(上接第 10775 页)

找到适宜的培养基种类及组培条件,可有效提高其繁殖效率,广泛应用于观赏、医药、环保等领域可获得更高的经济价值^[1-2];还可以作为保存蜈蚣草种质资源的手段;另外,通过组织培养对其孢子的发生发展过程进行研究,可为其

生理生化特性、遗传和基因转化等的研究打下基础。

参考文献

- [1] 尹怀约.蜈蚣草叶片愈伤组织的诱导和植株再生[J].植物生理学通讯,1990,26(1):50-51.
- [2] 徐艳,石雷,刘燕,等.神超富集植物——蜈蚣草孢子的无菌培养[J].植物生理学通讯,2004,40(6):713-716.