

球子蕨孢子的无菌繁殖

张婷婷, 王晓倩, 高凤, 董丽*

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京100083

摘要: 以球子蕨成熟孢子为外植体, 研究了不同激素及浓度对其孢子萌发、愈伤组织诱导、丛生芽分化及生根的影响。结果表明: 孢子萌发最适培养基为1/2MS+2%蔗糖, 20 d后萌发率达55.7%; 诱导愈伤组织的最适培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D, 诱导率达36%, 愈伤组织为绿色颗粒状; 颗粒状愈伤组织在不添加激素的MS培养基中即可生长出大量丛生芽, 转化率可达49.3%; 低浓度(0.2 mg·L⁻¹)的IAA可有效促进幼孢子体苗生根。

关键词: 球子蕨; 孢子; 愈伤组织诱导

In Vitro Culture of *Onoclea sensibilis* L. from Spores

ZHANG Ting-Ting, WANG Xiao-Qian, GAO Feng, DONG Li*

National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: With mature spores of *Onoclea sensibilis* as the explants, the effects of different kinds and concentrations of plant growth regulator combination in MS medium on spore germination, callus induction, bud differentiation and rooting were studied. The results showed that the most suitable medium for spore germination was 1/2MS+2% sucrose, and after 20 days of spore sowing on this medium, the germination rate was 55.7%. The maximum callus induction rate was 36% which obtained from medium of MS+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D. The form of callus was green granular; the induced rate of bud from granular callus was 49% in MS. And IAA can promote rooting rate effectively.

Key words: *Onoclea sensibilis*; spore; callus induction

观赏蕨类叶形奇特多样, 形态优美精致, 已逐渐成为当今世界花卉产业的一个重要组成部分。国内对蕨类繁殖技术的研究起步晚, 园林中应用的部分蕨类多是采用野外采挖和国外进口等方法获得种苗, 因此研究观赏蕨类植物的快速繁殖技术既可满足日益增长的市场需要, 又可有效保护野生植物资源与生态环境。

蕨类植物的组织培养技术可采用孢子或嫩茎尖等材料作为外植体, 由于蕨类孢子的产量高、体积小、易保存、易消毒, 这就为建立一个快捷有效的蕨类无菌繁殖体系提供了基础, 因此使用更为广泛。已有很多研究者以孢子为外植体成功建立了一些蕨类的再生体系, 如假鞭叶铁线蕨(*Adiantum malesianum*) (罗顺元和王任翔2007)、蛇足石杉(*Huperzia serrata*) (包日双等2012)和楔叶铁线蕨(*Adiantum raddianum*) (曾宋军等2005)。

球子蕨是球子蕨科球子蕨属植物, 分布于我国东北、华北地区; 性耐寒, 喜湿润; 生于草甸或湿灌丛中。球子蕨在园林中常用作假山石的

配景植物, 也可配置于建筑物之背阴角隅, 还可盆栽用作室内观叶植物, 观赏价值较高。国内外学者曾对球子蕨孢子形态(李娜和谢寅堂1992)、孢子分裂方式和光质对孢子萌发的影响(Fisher 1979)、二氧化碳对孢子萌发的影响(Edwards 1977)等方面进行过研究。但目前尚未见对于其繁殖技术方面的研究报道。本论文研究了球子蕨孢子的无菌培养和不同生长素对其愈伤组织诱导、丛生芽诱导及生根的影响, 试图建立快速稳定的球子蕨孢子无菌繁殖体系, 为球子蕨规模化生产及其在园林中的广泛应用奠定基础。

材料与amp;方法

1 材料

球子蕨(*Onoclea sensibilis* L.)孢子于2008年采集于吉林省红叶谷内, 收集于硫酸纸袋内并放置

收稿 2012-09-26 修定 2012-11-02

* 通讯作者(E-mail: dongleah@yahoo.com.cn; Tel: 010-82375031)。

于4℃冰箱保存。

2 方法

2.1 孢子的消毒

将孢子置于1.5 mL离心管中, 蒸馏水浸泡1 h, 4000 r·min⁻¹离心5 min, 去上清液; 加入3%的NaClO溶液进行消毒, 4000 r·min⁻¹离心5 min, 去上清液, 无菌水冲洗4~5次后, 加无菌水稀释, 充分振荡得到无菌孢子悬浊液, 溶液中孢子密度约为6 000个·mL⁻¹, 备用。

2.2 孢子的萌发培养

设置MS、1/2MS、1/4MS 3种无机盐, 10、20、30 g·L⁻¹ 3个水平蔗糖浓度, 采用双因子交叉分组设计, 共9种培养基, pH调至6.0。灭菌后分装至直径为9 cm的培养皿中。每皿接0.5 mL孢子悬浮液, 每处理重复3次。培养室温度为(23±2)℃, 光照周期为12 h·d⁻¹。在播种20 d后在显微镜下统计孢子萌发率。

2.3 原叶体愈伤组织的诱导

以MS+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂为基本培养基, 加入0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹的KT和0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹的2,4-D, 采用双因子交叉分组设计, 共9种培养基, pH值调至6.1。将单个原叶体接种到以上9种培养基的培养皿中, 每皿接种原叶体6~10个, 每个处理重复3次。接种40 d后统计愈伤组织诱导情况。

2.4 丛生芽的诱导及增殖

以MS+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂为基本培养基, 加入0、0.1、0.5 mg·L⁻¹的6-BA和0、0.1、0.5 mg·L⁻¹的NAA, 采用双因子交叉分组设计, 共9种培养基, pH值调至6.1。将之前诱导出的愈伤组织切割成大小一致(约3 mm×3 mm)的团块接种到9种培养基中, 每瓶接种4块愈伤组织, 重复3次。40 d后统计丛生芽分化情况。

2.5 生根培养

以之前诱导出的丛生芽为基本材料, 继代到3种固体培养基MS、MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA和MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA上, 30 d后统计生根情况。

2.6 炼苗移栽

当孢子体苗根长到约2 cm、茎高约3 cm时, 将封口膜打开, 在通风处炼苗3 d。取出生根苗, 洗去根部培养基, 移栽到经过高温灭菌的草炭和蛭

石(1:1)的混合基质中, 覆盖保鲜膜保持一定湿度, 1周后揭膜, 20 d后统计成活率。

实验结果

1 球子蕨孢子萌发

表1表明, 孢子在培养基1/2MS+20 g·L⁻¹蔗糖中萌发率最高为(55.7±2.1)% (图1-A), 显著高于其它培养基中的孢子萌发率, 其次为培养基1/4MS+20 g·L⁻¹蔗糖和1/2MS+10 g·L⁻¹蔗糖, 均为含较低的无机盐与蔗糖浓度的培养基。高浓度的无机盐与蔗糖明显抑制了孢子的萌发。

表1 不同无机盐和蔗糖浓度下球子蕨孢子的萌发率

Table 1 The spores germination rate of *O. sensibilis* in different inorganic salt and sucrose concentrations

无机盐	蔗糖浓度/g·L ⁻¹	萌发率/%
MS	10	24.3±2.1 ^d
MS	20	25.3±2.5 ^d
MS	30	20.3±4.6 ^d
1/2MS	10	48.0±2.0 ^b
1/2MS	20	55.7±2.1 ^a
1/2MS	30	37.7±2.5 ^c
1/4MS	10	44.7±2.5 ^b
1/4MS	20	49.3±2.5 ^b
1/4MS	30	38.7±4.0 ^c

同一列数字后的不同字母表示0.05水平差异显著; 结果数据=平均值±标准差。下表同此。

2 KT和2,4-D对球子蕨愈伤组织诱导的影响

通过KT和2,4-D两种激素诱导出的愈伤组织形态分为两种, 一种愈伤组织呈黄绿色, 质地松软, 表面白色毛状, 整体为一个团块, 组织含水量大(图1-B); 另一种呈黄绿色至绿色, 表面有很多凸起, 整体呈颗粒状, 颗粒之间松散, 易分散成更小的颗粒团块(图1-C)。在后期的试验中发现, 颗粒状愈伤组织可以在适宜的培养基中继续分化出孢子体苗, 而表面毛状的愈伤组织无法分化出孢子体苗, 只能在表面继续增殖出原叶体。因此认为颗粒状愈伤组织为理想的愈伤组织, 并在后续的试验中使用。

表2可以看出, MS+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D对愈伤组织的诱导效果最好, 愈伤组织呈正常的颗粒状, 诱导率达到36%, 且后期的生长良好。随着激素浓度增高, 愈伤组织诱导率变低, 并出现后期生长不良甚至褐化死亡的现象。

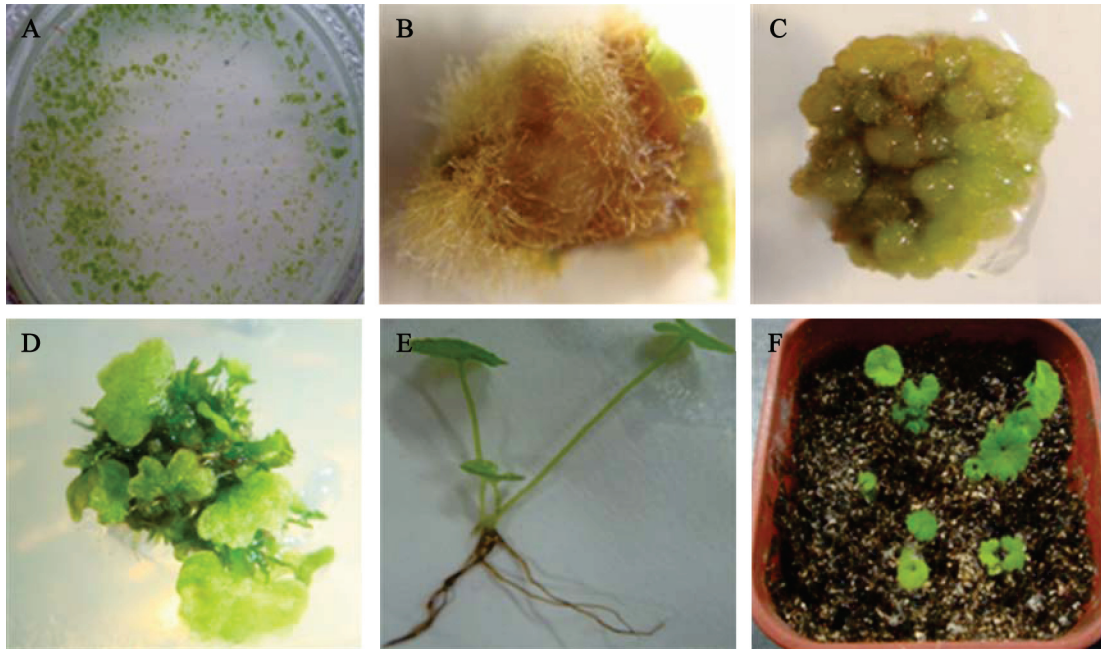


图1 球子蕨的组织培养

Fig.1 The tissue culture of *O. sensibilis*

A: 孢子萌发; B: 毛状愈伤组织; C: 颗粒状的愈伤组织; D: 丛生芽; E: 幼孢子体苗生根; F: 幼苗移栽。

表2 不同浓度KT和2,4-D对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different concentrations of KT and 2,4-D on callus induction

KT浓度/mg·L ⁻¹	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	愈伤诱导率/%	愈伤生长情况
0.1	0.1	0 ^e	几乎无愈伤组织产生
0.1	0.5	21.0±3.6 ^c	愈伤组织浅黄绿色, 表面白色毛状
0.1	1.0	31.0±3.6 ^{ab}	愈伤组织浅黄绿色, 表面白色毛状
0.5	0.1	10.3±2.5 ^d	愈伤组织浅黄绿色, 表面白色毛状
0.5	0.5	36.0±3.6 ^a	愈伤组织绿色, 颗粒状, 生长良好
0.5	1.0	13.3±1.5 ^d	愈伤组织绿色, 颗粒状, 生长缓慢
1.0	0.1	20.3±2.5 ^c	愈伤组织浅黄绿色, 表面白色毛状
1.0	0.5	30.3±2.5 ^b	愈伤组织绿色, 颗粒状, 生长良好
1.0	1.0	19.3±4.0 ^c	愈伤组织深绿色, 褐化严重

3 6-BA和NAA对丛生芽诱导的影响

通过表3的数据可以看出, 不添加任何激素的MS培养基对愈伤组织分化出芽具有较大的优势, 丛生芽诱导率可以达到49.3% (图1-D)。随着激素浓度升高, 丛生芽的诱导率逐渐降低。在愈伤组织分化成芽过程中, 出现部分愈伤组织褐化、新生成的孢子体苗叶片褐化的现象, 此时要及时将愈伤组织颗粒进一步分散, 去掉褐化部分, 将长势良好的孢子体苗置于新MS培养基中, 同时分散的颗粒状愈伤组织也有利于新丛生芽的出现。

4 激素对幼孢子体苗生根的影响

在不添加激素的MS培养基上培养30 d后, 幼孢子体苗没有生成根, 而在添加了激素的培养基上有根生成(图1-E), 表明NAA与IAA对幼苗的生根具有显著的促进作用, 但两种激素对促进生根的作用差异不显著(表4)。

5 炼苗移栽

健壮的幼苗长到一定程度时便可进行移栽, 移栽前要将根部培养基清洗干净并将基质灭菌, 由于瓶内湿度较高, 因此移栽初期要覆膜并适度

表3 不同浓度6-BA和NAA对诱导丛生芽的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on buds induction

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	丛生芽诱导率/%
0	0	49.3±5.1 ^a
0	0.1	47.7±2.5 ^a
0	0.5	40.0±2.0 ^b
0.1	0	25.7±2.1 ^c
0.1	0.1	41.0±3.6 ^b
0.1	0.5	37.0±3.6 ^b
0.5	0	20.0±2.0 ^d
0.5	0.1	30.3±2.5 ^c
0.5	0.5	20.3±2.5 ^d

表4 NAA与IAA对诱导生根的影响

Table 4 Effects of NAA and IAA on roots induction

NAA浓度/mg·L ⁻¹	IAA浓度/mg·L ⁻¹	生根数/条	生根率/%
0	0	0 ^b	0
0.2	0	3.1±0.5 ^a	72.5
0	0.2	3.3±0.5 ^a	70.0

喷水以保持湿度, 20 d后成活率约为65% (图1-F)。

讨 论

1 无机盐浓度和蔗糖浓度对孢子萌发的影响

蔗糖与无机盐在培养基中既可作为渗透调节剂又可作为营养物质, 是蕨类孢子萌发的关键因素。很多研究表明, 培养基中低浓度的无机盐与蔗糖更利于孢子萌发, 但由于孢子种类不同, 萌发时需要的营养物质与渗透压并不相同, 也有一些种类的孢子萌发需要较高浓度的蔗糖与无机盐。

白玉凤尾蕨(*Pteris cretica*)孢子在蔗糖浓度低于2%的培养基中更易萌发(徐艳等2005), 含1%的蔗糖的培养基更适于变异鳞毛蕨(*Dryopteris varia*)孢子萌发(欧阳婵娟等2008); 而蕨(*Pteridium aquilinum*)孢子在高浓度(5%)蔗糖培养基中的萌发率要高于低浓度(3%)蔗糖时的萌发率(鲍敏等2000)。

变异鳞毛蕨(*D. varia*)在1/2MS培养基上孢子的萌发率要比MS培养基上的高5% (欧阳婵娟等2008)。黑桫欏(*Alsophila podophylla*)孢子集中在1/10MS或1/5MS培养基中的萌发率(约67%), 要高于在MS培养基上的萌发率(约60%) (张银丽等2007)。同样也有一些种类的蕨类孢子萌发需要高

浓度的无机盐含量, 如银粉背蕨(*Aleuritopteris argentea*)孢子MS培养基中萌发率高达53.3%, 而在1/8MS中不萌发(黄笛等2009)。

本文发现, 球子蕨孢子萌发最适无机盐浓度为1/2MS+2%蔗糖, 萌发率高达55.7%。整体来看, 较低浓度的蔗糖与无机盐含量更适于孢子萌发, 孢子在无机盐含量不高于1/2MS、蔗糖浓度不高于2%的培养基中的萌发率均高于40%, 而在MS或含3%蔗糖的培养基中萌发率显著降低。高浓度的无机盐与蔗糖使培养基渗透压增高, 阻碍孢子吸水从而限制了它的萌发。

2 激素对愈伤组织诱导的影响

不同的激素对蕨类植物的分化具有不同作用, 愈伤组织的诱导一般需要细胞分裂素与生长素的共同作用, 细胞分裂素类物质对诱导外植体的分化具有很关键的作用。KT与2,4-D或NAA的适当比例能促进很多种蕨类产生愈伤组织。Yoshihara等(2005)用KT与2,4-D成功诱导出禾秆蹄盖蕨(*Athyrium yokoscense*)愈伤组织。但不同的激素及浓度会明显影响诱导物的形态, Kwa1等(1997)以鹿角蕨(*Platyserium coronarium*)配子体为材料, 用高浓度的BA或KT分别诱导了2种颜色不同的愈伤组织, 一种暗绿, 另一种黄绿。在MS基本培养基上, 暗绿的愈伤组织会分化出配子体, 黄绿的愈伤组织会分化出孢子体。本试验中KT与2,4-D不同浓度的组合也诱导出了两种形态的愈伤, 一种颗粒状愈伤组织, 可以分化出孢子体, 另一种表面被毛的膨大愈伤组织只能继续增殖原叶体。在诱导愈伤组织过程中, 激素种类及浓度的选择使用极为关键。

3 激素对丛生芽分化的影响

本试验中, 颗粒状愈伤组织的再生芽诱导以无激素培养的诱导率最高, 高浓度的激素反而使诱导率降低。李静等(2008)在对狭眼凤尾蕨(*Pteris baurita*)的组培研究中也发现, 在诱导出狭眼凤尾蕨愈伤组织后, 仅调控培养基中的蔗糖浓度, 而不添加任何激素即可使愈伤组织分化出幼孢子体苗。蕨菜(*Pteridium aquilinum*)诱导愈伤组织芽分化的最适培养基为1/2MS, 芽分化率可达100% (姜长阳等2003)。

本试验通过对球子蕨孢子的无菌培养, 研究

了不同因素对孢子萌发、原叶体愈伤组织诱导、丛生芽分化及生根的影响,建立了快速繁殖的组培体系,为球子蕨的规模化生产提供了理论基础。

参考文献

- 鲍敏, 吴学明, 丁莉(2000). 蔗糖和生长辅助物质对蕨孢子人工繁殖的影响. 青海师范大学学报, 4: 39~43
- 包日双, 尹培培, 郭斌, 尉亚辉(2012). 蛇足石杉原叶体的培养及孢子体的诱导. 植物生理学报, 43 (4): 393~396
- 黄笛, 冯玉兰, 董丽(2009). 银粉背蕨的配子体发育及孢子繁殖技术的研究. 园艺学报, 36 (9): 1345~1352
- 姜长阳, 宁淑香, 于淼, 王宇, 宋立秀(2003). 蕨类愈伤组织高效再生体系的建立. 园艺学报, 30 (3): 343~345
- 李静, 夏桂春, 龚慧, 曾宪锋(2008). 狭眼凤尾蕨的形态发生及组织培养. 热带作物学报, 29 (5): 626~631
- 李娜, 谢寅堂(1992). 中国球子蕨科植物孢子形态研究. 西北植物学报, 12 (2): 154~157
- 罗顺元, 王任翔(2007). 假鞭叶铁线蕨孢子的组织培养. 植物生理学通讯, 43 (1): 131~132
- 欧阳婵娟, 唐源江, 王瑞江(2008). 变异鳞毛蕨的孢子培养与配子体发育研究. 热带亚热带植物学报, 16 (4): 344~349
- 徐艳, 石雷, 刘燕, 李东(2005). 白玉凤尾蕨孢子繁殖技术的研究. 园艺学报, 32 (4): 658~662
- 曾宋君, 陈之林, 段俊(2005). 楔叶铁线蕨的离体快繁. 植物生理学通讯, 41 (4): 499
- 张银丽, 李杨, 季梦成, 李东, 石雷(2007). 黑桫椤孢子的无菌栽培. 植物生理学通讯, 43 (6): 1139~1140
- Edwards ME (1977). Carbon dioxide and ethylene control of spore germination in *Onoclea sensibilis* L. *Plant Physiol*, 59 (4): 756~758
- Fisher RW (1979). Reversal by light of ethylene-induced inhibition of spore germination in the sensitive fern *Onoclea sensibilis*: an action spectrum. *Plant Physiol*, 63 (6): 984~988
- Kwa SH, Wee YC, Lim TM, Kumar PP (1997). Morphogenetic plasticity of callus reinitiated from cell suspension cultures of the fern *Platyserium coronarium*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 48: 37~44
- Yoshihara T, Tsunokawa K, Miyano Y, Arashima Y, Hodoshima H, Shoji K, Shimada H, Goto F (2005). Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation of its cadmium tolerance and accumulation capacity. *Plant Cell Rep*, 23 (8): 579~585