

菜蕨的组织培养与植株再生

郭治友^{1*}, 俞筱桢², 罗应¹, 钱绍方³

黔南民族师范学院¹生命科学系, ²历史与社会文化系, 贵州都匀 558000; ³昆明理工大学生物技术研究中心, 昆明 650224

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Callipteris esculenta* (Retz.) J. Sm. ex Moore et Houlst.

GUO Zhi-You^{1*}, YU Xiao-Ya², LUO Ying¹, QIAN Shao-Fang³

¹Department of Life Science, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000 China; ²Department of History and Social Culture, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000 China; ³Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224 China

1 植物名称 菜蕨[*Callipteris esculenta* (Retz.) J. Sm. ex Moore et Houlst.], 又名水蕨菜、猫菜、过沟菜蕨、青蕨、蕨猫、蕨儿菜、山凤尾等。

2 材料类别 成熟孢子。

3 培养条件 孢子萌发培养基: (1) Knop's; (2) 1/2MS+30 g·L⁻¹ 蔗糖; (3) 细净河砂(采自都匀剑江河畔); (4) 1/2MS+(GA₃ 20.0 mg·L⁻¹ 预处理孢子 1 h)。原叶体增殖培养基: (5) 1/2MS; (6) MS; (7) MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹ (单位下同)+NAA 0.5; (8) MS+6-BA 1.0+NAA 0.2。孢子体形成和丛生芽增殖培养基: (9) MS; (10) MS+NAA 0.05; (11) MS+KT 0.0125+NAA 0.05; (12) MS+KT 0.025+NAA 0.50; (13) MS+KT 0.05+NAA 0.05。生根培养基: (14) 1/2MS+NAA 0.1+AC 2.0 g·L⁻¹; (15) 1/2MS+IBA 1.0+AC 2.0 g·L⁻¹; (16) MS+NAA 0.1+AC 2.0 g·L⁻¹; (17) MS+IBA 1.0+AC 2.0 g·L⁻¹。以上培养基除(3)外均添加 7.5 g·L⁻¹ 琼脂条, pH 5.8~7.0。培养温度为 24~26 °C, 日光灯光源, 光照强度约 40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间 12 h·d⁻¹。

4 生长与分化情况

4.1 无菌材料的获得 采集带成熟孢子囊的菜蕨叶片装入硫酸纸袋中, 放置通风干燥处约 1 周, 收集自然散落的孢子备用。孢子用滤纸包好, 蒸馏水浸泡 2 h, 75% 酒精灭菌 10 s, 无菌水漂洗 1 次, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 5 min, 无菌水漂洗 3 次。然后孢子接种到培养基(1)~(4)上, 放置培养室内培养(图 1)。

4.2 孢子萌发 50 d 后在培养基(1)~(4)上均见到极少量的孢子能发育出现绿色斑点, 进一步培养约 60 d 肉眼能清晰见到对称心形的原叶体(图 2)。菜蕨

的孢子萌发率极低, 在孢子消毒过程中改用 5% NaClO 溶液代替 0.1% HgCl₂ 溶液处理 15 min (但此法污染较高), 或在培养基上添加不同的营养物、打破孢子休眠的物质 GA₃ 以及砂培处理方法, 都没有显著增加萌发率, 所以这很可能是其孢子容易失活而导致萌发率极低的原因。

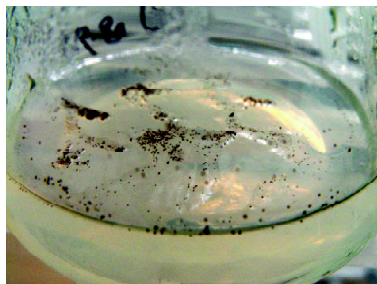


图1 菜蕨的孢子接种

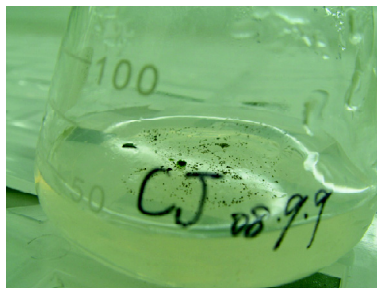


图2 菜蕨的孢子萌发

收稿 2009-11-18 修定 2009-12-18
资助 贵州省科技厅自然科学基金(黔科合J字[2008]2102)
* 通讯作者(E-mail: guozhiyou8888@126.com; Tel: 0854-8992012)。

4.3 原叶体的增殖 由于孢子萌发率低, 培养出的材料比较少, 培养约 60 d 后, 当原叶体增长至玉米粒大小(图 3), 再将原叶体转接到培养基(5)~(8)上。结果在培养基(6)上的原叶体长势较好, 大又多, 色深绿(图 4)。在添加外源生长调节物质的培养基上, 原叶体由对称心形发育成长片状心形, 原叶体边缘的营养繁殖能力增强, 出现许多逆向发育细胞, 进一步发育为新的原叶体, 其中在培养基(7)的比(8)变形更为突出, 增长快, 约 20 d 可增殖 1 倍, 可见与 NAA 浓度有关。原叶体增殖过程中培养基(5)和(6)中能形成幼孢子体, 但在(7)和(8)中未见到孢子体。

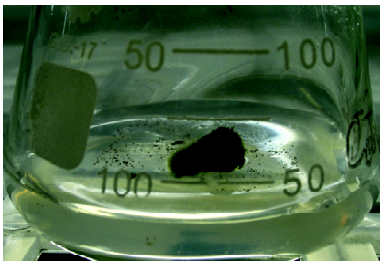


图 3 菜蕨的继续原叶体培养



图 4 菜蕨原叶体的增殖

4.4 孢子体的形成与增殖 将原叶体接种于培养基(9)~(13)上, 培养基表面保持有水滴(利于受精), 约 30 d 后, 培养基上均出现幼孢子体, 但在培养基(9)上的幼孢子体较少, 在(10)~(13)上幼孢子较多, 其中(11)~(13)上叶片数较多。较适于幼孢子体培养的是培养基(12) (图 5), 叶片多, 且长势较好, 但长时间培养有的小羽片会变黄衰老, 说明适宜浓度的 KT 利于孢子体增殖。在(12)上继续培养或采用分株的繁殖方式将孢子体进行扩增, 可快速增殖大量的无菌幼孢子体。



图 5 菜蕨幼孢子体的诱导培养

4.5 生根与移栽 将已分化出苗的孢子体接种到生根培养基(14)~(17)上, 20 d 培养基(14)~(15)的长出根, 生根率均可达 82%, 32 d 后(16)~(17)上生根才出现, 说明较低的大量元素也有利于生根。继续培养 90 d, (14)~(15)幼孢子体每株高达 12~18 cm, 短茎有 0.5 cm 长, 叶达 5~8 片, 根数达 6 条以上。移栽前将瓶盖打开, 在通风处炼苗 7 d, 取出生根苗, 洗去根部附着的培养基, 移栽到用 1% 高锰酸钾溶液消毒过的蛭石和石灰岩腐殖质(1:1)混合土中, 盆栽湿度保持 100%, 盆上覆盖膜 7 d 后再逐渐打开, 成活率达 75% 以上。

5 意义与进展 菜蕨是蹄盖蕨科菜蕨属多年生蕨类植物。分布于亚洲热带和亚热带以及热带的波利尼西亚, 生长在山谷林下湿地、河沟边以及洞口处。在我国江西、安徽、浙江、福建、广东、台湾、广西、云南、贵州和四川等地均有分布(中国科学院植物研究所 1999)。其嫩叶可食用, 风味独特, 营养丰富。菜蕨对锰元素具有较强的富集能力, 可作为重金属锰污染的土壤环境治理。在园林中可栽培于阴湿处造景(曾宋君和刑福武 2002)。本文结果对未来菜蕨的保护性开发利用, 商业化生产种苗可能有一定的参考价值(罗顺元和王任翔 2007; 黄芳等 2008; 郭治友等 2009), 菜蕨的组织培养和快繁尚未见报道。

参考文献

- 郭治友, 钱绍方, 罗应(2009). 海金沙的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 45 (10): 1005~1006
- 黄芳, 程治英, 龙春林(2008). 荷叶铁线蕨的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 44 (2): 307~308
- 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
- 曾宋君, 刑福武(2002). 观赏蕨类. 北京: 中国林业出版社, 172~173
- 中国科学院植物研究所(1999). 中国植物志. 第 3 卷第 2 分册. 北京: 科学出版社, 475~479