

## 扇蕨孢子的组织培养

张光飞<sup>1,\*</sup>, 翟书华<sup>2</sup>, 苏文华<sup>1</sup>

<sup>1</sup>云南大学生态学与地植物学研究所, 昆明 650091; <sup>2</sup>昆明师范高等专科学校生物系, 昆明 650031

## Tissue Culture of Spores of *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ

ZHANG Guang-Fei<sup>1,\*</sup>, ZHAI Shu-Hua<sup>2</sup>, SU Wen-Hua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China; <sup>2</sup>Department of Biology, Kunming Higher Teachers College, Kunming 650031, China

1 植物名称 扇蕨[*Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ]。

2 材料类别 成熟孢子。

3 培养条件 孢子萌发培养基: (1) B<sub>5</sub>+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖。原叶体增殖培养基: (1) B<sub>5</sub>+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (2) 1/2 B<sub>5</sub>+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (3) 1/4 B<sub>5</sub>+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (4) 1/8 B<sub>5</sub>+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (5) B<sub>5</sub>; (6) B<sub>5</sub>+10 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (7) B<sub>5</sub>+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (8) B<sub>5</sub>+40 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (9) B<sub>5</sub>+50 g·L<sup>-1</sup>蔗糖; (10) B<sub>5</sub>+60 g·L<sup>-1</sup>蔗糖。所用培养基均添加 7 g·L<sup>-1</sup>琼脂, pH 5.8。培养温度为(25±2) °C, 日光灯光源, 光照强度为 20~30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间为 14 h·d<sup>-1</sup>。

4 生长与分化情况

4.1 无菌材料的获得 选择植株长势好带成熟孢子的叶片, 先用剪刀去除没有孢子的部分叶片, 再用洗衣粉水洗去叶片表面的小鳞片和杂物, 并用自来水冲洗 20 min, 在无菌条件下, 用 0.1% 的升汞溶液灭菌 7 min, 无菌水冲洗 6~7 次(每次 1 min), 无菌吸水纸吸去表面的水份, 切成 0.5 mm 长的小块备用。

4.2 孢子萌发 把上述小块作为外植体, 在无菌条件下接种在孢子萌发培养基(1)上, 8 d 左右, 带孢子的外植体上可见到零星的绿色小点, 显微镜检验结果为孢子萌发。60 d 左右可见原叶体形成。扇蕨的配子体在孢子萌发培养基上生长良好, 到原叶体阶段后, 原叶体彼此相联, 簇状, 很少见到单个的原叶体。

4.3 原叶体的增殖 将原叶体转接到原叶体增殖培养基(1)~(4)上, 结果发现, 在培养基(1)和(2)上生长最好, 在(3)上次之, (4)上最差, 呈现出随着盐浓度的降低, 原叶体长势依次变弱。说明 B<sub>5</sub> 培养基的大量元素对原叶体的增殖有影响, 增殖培养基应以全量或半量 B<sub>5</sub> 大量元素为宜。在此基础上, 再测试蔗糖浓度对扇蕨原叶体增殖的影响。在培养基

(1)和(5)~(10)上, 以(1)增殖速度最快, 长势最好, 增殖倍率最高; 培养基(5)上生长缓慢; 培养基(6)、(7)、(8)、(9)、(10)上长势依次变差, 其中(10)上几乎停止生长。说明适宜的蔗糖浓度能够很好的促进其原叶体增殖, 过高或过低都不利于生长。结果表明, 影响原叶体增殖的主要因素是合适的炭氮浓度比, 较合适的原叶体增殖培养基是(1)。

4.4 孢子体的诱导

4.4.1 组织培养无菌诱导 将原叶体接种于培养基(1)~(10)上, 2 个月后所有培养基上均有孢子体长出, 但以(1)和(2)诱导率最好, 约 30%, 其次依次较好的是(3)、(6)、(4)、(7)、(5)、(8)、(9)、(10)。说明扇蕨的配子体在试管内能够诱导出孢子体(图 1), 但是受到培养基盐浓度和蔗糖浓度的影响, 以全量和半量的 B<sub>5</sub>+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖最为适宜。

4.4.2 常规诱导 取玻璃培养皿, 内装河沙或珍珠岩, 加水润湿到倾斜能有水流出状态。取原叶体, 用蒸



图 1 扇蕨配子体增殖及孢子体诱导

收稿 2008-04-28 修定 2008-05-15

资助 国家自然科学基金(30760043)。

\* E-mail: gfzhang@ynu.edu.cn; Tel: 0871-5033535

馏水洗掉培养基后置于培养皿内, 加盖, 放于培养箱内培养。40 d 就能见到幼孢子体长出(图2), 诱导率比无菌诱导的高, 可达60%以上。

**4.5 移栽** 培养皿内所有原叶体几乎都长出孢子体时, 打开培养皿盖, 炼苗, 注意加水保持沙盘湿润。幼苗长到2~3 cm高、根系1~2 cm长时, 移栽入由泥炭土:珍珠岩:河沙(1:1:1)混合成的基质中, 注意喷水、遮荫和保温, 成活率可达90%以上。

**5 意义与进展** 扇蕨属于水龙骨科(Polypodiaceae)



图2 扇蕨幼孢子体

扇蕨属草本植物, 为我国特产的蕨类植物, 仅分布于云南、贵州和四川, 通常生长在海拔1 500~2 700 m的密林下或山崖林下。它是一种观赏植物, 也是一种常用的中草药, 其根状茎有解毒、消肿祛湿之效(宋朝枢等1989)。由于其形态奇特, 在蕨类植物系统发育研究中有一定的意义, 已被列为国家二级重点保护植物(于永福1999)。蕨类植物从孢子到孢子体的发育过程中, 孢子萌发到成熟的配子体尤为关键, 用常规方法较难获得成功, 且生长缓慢, 增殖倍率极低, 由于孢子个体较小, 获得无菌孢子也较为困难。本文结果比常规的孢子萌发方法, 操作简单, 极易得到无菌材料, 配子体的增殖倍率较高, 对未来扇蕨工厂化生产应用以及开展其保护生物学研究可能有一定的参考价值。扇蕨的组织培养未见报道。

#### 参考文献

- 宋朝枢, 徐荣章, 张清华(1989). 中国珍稀濒危保护植物. 北京: 中国林业出版社, 19~20
- 于永福(1999). 中国野生植物保护工程的里程碑——国家重点保护野生植物名录(第一批)出台. 植物杂志, (5): 3~4