

黑桫欏孢子的无菌栽培

张银丽^{1,2}, 李杨^{2,3}, 季梦成¹, 李东², 石雷^{2,*}

¹浙江林学院园林学院, 浙江临安 311300; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093; ³中国科学院研究生院, 北京 100039

Spore Sterile Culture in *Alsophila podophylla* Hook.

ZHANG Yin-Li^{1,2}, LI Yang^{2,3}, JI Meng-Cheng¹, LI Dong², SHI Lei^{2,*}

¹Landscape Architecture School, Zhejiang Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

1 植物名称 黑桫欏(*Alsophila podophylla* Hook.)。

2 材料类别 成熟的孢子。

3 培养条件 培养基:(1) MS;(2) 1/2MS;(3) 1/5MS;(4) 1/10MS (1/2MS、1/5MS、1/10MS指大量和微量元素分别为MS基本培养基全量的1/2、1/5、1/10)。上述培养基均使用MS培养基全量的铁盐和有机成分,及附加琼脂0.7%,pH 5.8。培养室温度为(25±2),光照强度30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹(光源为荧光灯),光照时间12 h·d⁻¹。

4 生长与分化情况

4.1 孢子的灭菌 取5 mg成熟孢子置于10 mL离心管中,加入3 mL无菌水,充分振荡使成为悬浊液,7 g离心1 min,弃去上清液;加入3 mL的5% NaOCl溶液,灭菌5 min,然后用无菌水冲洗4~5次,最后加入3 mL无菌水,充分振荡得到无菌孢子悬浊液。

4.2 孢子的接种及配子体发育 用滴管将无菌孢子悬浊液分别接种到培养基(1)~(4)上,自接种2 d后定期观察孢子萌发及配子体发育过程,直至形成幼孢子体,用TS20/30体视显微镜观察孢子的生长发育情况,并用Nikon ECLIPSE E600照相。以孢子壁破裂,具有含一个叶绿素的绿色细胞和一条不含叶绿素的假根时,定为孢子萌发(图1-a)。记录萌发时间和各个处理下的孢子萌发率,以及配子体大量出现时间和孢子体出现时间。镜检结果显示,黑桫欏孢子在本实验采用的培养基中都能萌发(图1-b、c),萌发时间:1/10MS为15 d,1/5MS为15 d,1/2MS为17 d,MS为19 d;萌发率:1/10MS为67.5%,1/5MS为66.9%,1/2MS为60.2%,MS为58.7%。由此可见培养基(3)、(4)较(1)、(2)更适合,萌发提早2~3 d,且

萌发率高10%左右。各培养基对配子体发育的影响不同。形成配子体时间:1/10MS为33 d,1/5MS为31 d,1/2MS为28 d,MS为30 d。说明较高无机盐浓度的培养基更适合于配子体发育,在培养基(1)、(2)中,配子体颜色浓绿,生长迅速,80 d左右形成成熟的原叶体(图1-d)。而培养基(4)中配子体呈黄绿色,生长缓慢甚至停滞。这可能是由于无机盐浓度低,不能满足配子体的生长发育需要,或者是较高的萌发率造成个体之间的竞争,影响配子体的发育。

4.3 孢子体的形成 待配子体布满培养皿时,将配子体分为1~2 cm的小丛,转接到有相同培养基的三角瓶中继续生长,并经常滴加无菌水促进受精,提高孢子体形成率。在培养基(1)、(2)中,接种后120 d左右有孢子体形成(图1-e)。

4.4 孢子体的移栽 待孢子体长到约5 cm高时,将三角瓶放在自然光照下炼苗7 d,再打开瓶盖炼苗7 d后,用镊子轻轻夹出小苗,洗净培养基,移栽到经高压灭菌的混合土中(草炭土:素沙=1:1),保持适宜的空气湿度和温度,移栽成活率可达70%以上。

5 意义与进展 全世界有500多种桫欏科植物,我国目前已知的有14种和2变种(夏群1989)。长期以来由于孢子萌发和配子体发育对环境要求严格,生态环境的破坏以及人为因素的影响,桫欏所有种全部被列为国家二级保护植物(国家林业局农业

收稿 2007-09-11 修定 2007-10-30

资助 中国科学院重要方向性项目(KZCX2-YW-414)和国家科技部项目(2005DKA21006)。

* 通讯作者(E-mail: shilei67@263.net; Tel: 010-62836270)。

部 1999), 在濒危野生植物种国际贸易公约附录中全部列为附录 物种; 在新的森林法中全部列为限制出口的树种。黑桫欏是桫欏科的大型树蕨类植物, 植株高 1~3 m、长 2~3 m 的羽状叶片着生于树干顶部, 叶柄红棕色, 略光亮, 具有较高的观赏价值, 是园林造景的好材料。同属的大

叶黑桫欏(*Alsophila gigantea* var. *gigantea*)孢子无菌培养已有过报道(徐艳等 2004), 而本文中的黑桫欏(*Alsophila podophylla*)孢子无菌培养的报道未见。本文中此种孢子无菌培养的成功为种质资源的保护和濒危植物的抢救提供了一条值得考虑的途径。

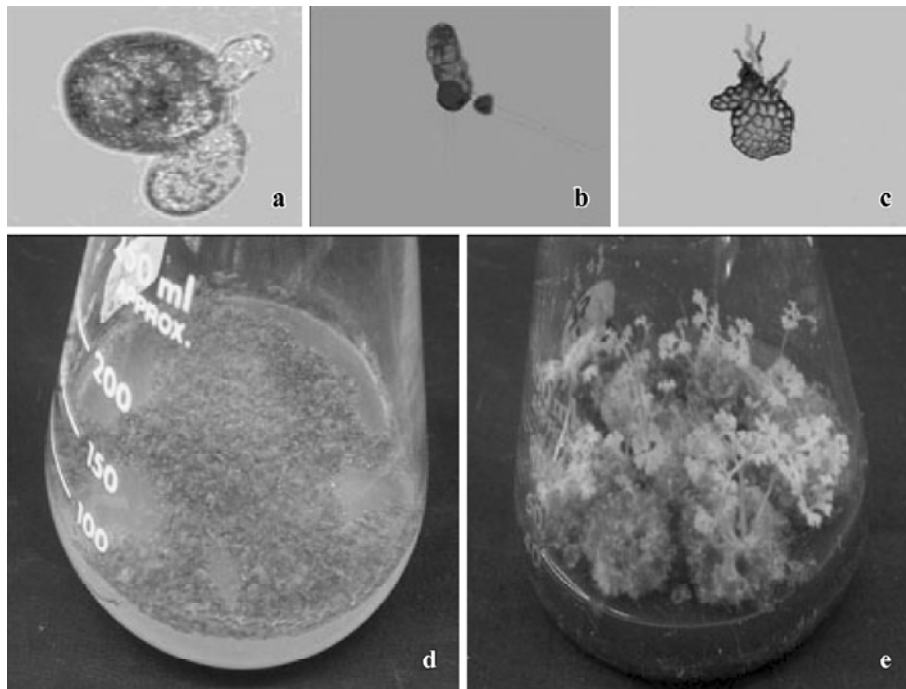


图1 黑桫欏孢子的无菌栽培

a : 孢子萌发 ; b : 丝状体 ; c : 片状体 ; d : 配子体在三角瓶中的生长情况 ; e : 孢子体幼苗。

参考文献

国家林业局业部(1999). 国家重点保护野生植物名录(第1批)

夏群(1989). 中国桫欏科植物的分类. 植物分类学报, 27 (1): 1~16
徐艳, 石雷, 刘燕, 李东(2004). 大叶黑桫欏孢子的无菌培养. 植物生理学通讯, 40 (1): 72