

大叶黑桫欏孢子的无菌培养

徐艳^{1,2} 石雷^{1,*} 刘燕² 李东¹

¹中国科学院植物研究所, 北京 100093; ²北京林业大学园林学院, 北京 100083

Spore Sterile Culture in *Alsophila gigantea* var. *gigantea*

XU Yan^{1,2}, SHI Lei^{1,*}, LIU Yan², LI Dong¹

¹Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; ²College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083

1 植物名称 大叶黑桫欏(*Alsophila gigantea* var. *gigantea*)。

2 材料类别 成熟的孢子。

3 培养条件 (1) MS; (2) 1/2MS; (3) 1/5MS; (4) 1/10MS; (5) MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹ (单位下同)+6-BA 0.1+3% 蔗糖+0.7% 活性炭。1/2MS、1/5MS、1/10MS 指大量和微量元素为MS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, 0.5% 琼脂, pH 5.8。培养室温度为25℃; 日光灯光源, 昼夜光照, 光照度2 000~2 300 lx。

4 生长与分化情况

4.1 孢子的灭菌 取成熟的孢子置于1.5 mL离心管内, 滴入无菌水, 充分振荡使成悬浊液, 静置2 h, 4 000 r·min⁻¹离心1 min, 弃去上清液。离心管内再滴入约1.2 mL的5% NaOCl溶液, 灭菌4 min, 无菌水冲洗4~5次, 用上述离心方法获得无菌的孢子悬浊液。

4.2 原叶体的形成及增殖 用滴管将无菌的孢子悬浊液分别接种至培养基(1)~(4)上, 5~7 d后出现肉眼可见的绿色小点, 显示孢子已萌发(孢子壁破裂, 具有1个含叶绿素的绿细胞和1条不含叶绿素的假根)。30~32 d后, 镜检结果表明: 培养基(3)、(4)最适于大叶黑桫欏孢子的萌发, 萌发率达90%以上。此时, 4种培养基上均可见到心形或丝状的原叶体, 但不同培养基中的原叶体长势不一, 以培养基(4)中的长势最好。若将培养基(1)中长出的原叶体转接至培养基(5)中, 可形成类似兰科植物原球茎的绿色小球(green globular bodies, GGB), 球状体大量增殖。如果想得到大量的繁殖材料, 可以在培养基(5)中进行继代培养, 短期内达到很大数量的球状体, 再将球状体诱导形成孢子体。

4.3 孢子体的形成 接种后90~100 d, 培养基(3)、(4)上均有孢子体形成, 形成率可达60%, 幼孢子体苗第一叶始终无拳卷现象, 叶脉呈二叉状分枝。培养基(1)、(2)中未见孢子体形成, 但经长期(120 d左右)培养, 老的原叶体上会形成数量不等的新原叶体, 老原叶体逐渐变褐、死亡。

4.4 孢子体的移栽 孢子体长出2片叶子(叶长约3~4 cm)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。用镊子轻轻夹出试管苗, 洗净培养基, 移栽至经0.1%多菌灵消毒4 h的素砂中, 保持适宜的空气湿度及基质的温度。1个月后可定植到穴盘中(培养基质为草炭土: 松针土: 蛭石: 细砂: 有机肥=4:4:2:2:1)。移栽成活率达80%以上。

5 意义与进展 全世界约有桫欏科植物500种, 我国目前已知的仅有14种和2变种, 均被列为《濒危野生动植物物种国际贸易公约》附录植物。大叶黑桫欏为桫欏科大型树蕨, 其株形美观, 植株高大, 是室内外园林造景的优良植物材料, 在我国主要分布于广东、海南、广西、云南等省区, 海拔130~1 200 m处的山沟林下及溪边灌丛中。由于分布零星, 生境要求较严, 种群一般较小, 又由于观赏价值较高, 人为破坏很大, 资源保存面临很大的危险。目前, 大叶黑桫欏孢子的无菌培养尚未见报道。该种孢子无菌培养的成功, 不仅使桫欏科植物的保护及开发利用成为可能, 还为进一步研究其濒危机制提供了良好的试验体系。

收稿 2003-07-29 修定 2003-11-13

资助 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-3-04)和中国科学院农办项目(NK-十五-C-13)。

* 通讯作者(E-mail: shilei67@263.net, Tel: 010-82593616)。