

网络出版时间:2019-09-09 17:25 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.03.014
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190909.1723.028.html>

紫萁孢子叶组织培养技术研究

孙晓丹¹, 李春鹏¹, 董 然^{1,2}, 王克凤², 周 焯¹

(1 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2 长春科技学院 长白山生态资源开发工程研究中心, 吉林 长春 130600)

[摘要] 【目的】建立紫萁(*Osmunda japonica* Thunb.)孢子叶组织培养快繁体系, 筛选其适宜的组织培养条件。【方法】以紫萁孢子叶穗为外植体, 研究乙醇和 HgCl_2 处理不同时间对外植体的消毒效果; 在加入 0.3 mg/L NAA 的 1/4MS 培养基中, 再分别加入 0.5 mg/L 的 2,4-D、IBA 和 KT, 比较各处理对原叶体的诱导效果; 在 1/2MS 基础培养基上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 探讨不同质量浓度 KT、 GA_3 、NAA 和 6-BA 组合对原叶体增殖的影响; 同时, 研究光合酶素稀释 300、500 和 700 倍对紫萁孢子体诱导的影响, 以及 1/2MS 培养基中加入 0.1、0.5、1.0 mg/L IBA 或 NAA 对紫萁组培苗生根的影响。【结果】使用 1 g/L HgCl_2 对紫萁孢子叶穗消毒 8 min 的效果较好, 萌发率为 61.11%; 紫萁原叶体最适宜的诱导培养基为 1/4MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 诱导率为 88.55%; 紫萁原叶体最适宜的增殖培养基为 1/2MS+KT 5 mg/L+ GA_3 3 mg/L+NAA 1 mg/L, 增殖系数为 9.6; 稀释 500 倍的光合酶素对紫萁孢子体苗的转化及生长有促进作用, 孢子体转化率为 57.23%, 孢子体高度为 2.33 cm; 1/2MS 培养基中加入 0.5 mg/L IBA, 紫萁组培苗生根率与长势俱佳, 生根率可达 93.33%。【结论】初步建立了紫萁孢子适宜的组织培养体系, 在相应条件下组培苗长势良好。

[关键词] 紫萁; 组织培养; 孢子繁殖; 激素诱导

[中图分类号] S647.04⁺3

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2020)03-0107-08

Tissue culture of osmunda spore leaves

SUN Xiaodan¹, LI Chunpeng¹, DONG Ran^{1,2}, WANG Kefeng², ZHOU xuan¹

(1 College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Center of the Ecological Recourse Development of Changbai Mountain, Changchun Sci-Tech University, Changchun, Jilin 130600, China)

Abstract: 【Objective】This study aimed to establish a rapid propagation system for tissue culture of osmunda spore leaves and screen suitable conditions. 【Method】The spores of osmunda were used as explants to study the disinfection effect of ethanol and HgCl_2 on explants with different treatment times. In the 1/4 MS culture medium with 0.3 mg/L NAA, 2,4-d, IBA and KT at 0.5 mg/L were added, respectively, and the induction effects on protoplasts were compared. On 1/2MS basal medium, the $L_9(3^4)$ orthogonal design was used to investigate the effects of KT, GA_3 , NAA and 6-BA at different concentrations on proliferation of protoplasts. The effects of 300, 500 and 700 times dilution of photosynthetic enzymes on induction of osmunda sporophyte and the effect of 0.1, 0.5, 1.0 mg/L IBA or NAA on rooting of osmunda tissue culture seedlings in 1/2MS medium were also investigated. 【Result】Sterilization with 1 g/L HgCl_2 for 8 min was better with germination rate of 61.11%. The most suitable induction medium for osmunda protoplasts was 1/4MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L with induction rate of 88.55%. The most suitable proliferation medium for osmunda protoplasts was 1/2MS+KT 5 mg/L+ GA_3 3 mg/L+NAA 1 mg/L with prolifera-

[收稿日期] 2019-02-15

[基金项目] 吉林省科技厅科技支撑计划项目“特殊蔬菜(含山野菜类)品种选育、栽培技术研究”(20180201079NY)

[作者简介] 孙晓丹(1993—), 女(蒙古族), 山东蓬莱人, 在读硕士, 主要从事园林植物种质资源及观赏园艺研究。

E-mail: 362599600@qq.com

[通信作者] 董 然(1966—), 女, 吉林敦化人, 教授, 博士生导师, 主要从事长白山野生植物引种驯化研究。

E-mail: 1836630983@qq.com

tion coefficient of 9.6. The photosynthetic enzyme diluted by 500 times promoted the transformation and growth of osmunda spore seedlings with sporophytic transformation rate of 57.23% and spore body height of 2.33 cm. Adding 0.5 mg/L IBA to 1/2MS medium improved rooting rate and growth of osmunda tissue culture seedlings and the rooting rate reached 93.33%.【Conclusion】A suitable tissue culture system for osmunda spores was initially established, and the tissue culture seedlings grew well under corresponding conditions.

Key words:osmunda;tissue culture;spore reproduction;hormone induced

紫萁(*Osmunda japonica* Thunb.)是紫萁科紫萁属多年生真蕨类植物^[1],别名薇菜,俗称“牛毛广”、“老牛广”^[2],以“采薇而食”的典故而得名,其作为蔬菜食用在我国已有 3000 多年的历史,因含有大量的优质膳食纤维,能促进胃肠蠕动、增加饱腹感而成为瘦身新宠。紫萁野生资源主要分布在中国东北长白山区、华北、华中及西南等地^[3],其富含多种微量元素、粗纤维及尖叶土杉甾酮、促脱皮甾酮、鞣质等有益健康的成分^[4-5]。蜷曲未展开的嫩叶加工成薇菜干,长期出口日本、韩国及东南亚等国家^[6]。此外,紫萁的根状茎入药,具清热、解毒、平肝、镇痛、止血和杀虫的功效^[7]。目前国内外除日本、韩国、中国东北食用外,英国将紫萁属植物作为观赏蕨类在园林中广泛应用,其中包含分株紫萁(*S. cinnamomea*)在内的 3 种紫萁属植物,获得英国皇家园艺学会显异奖(The Award of Garden Merit)^[8]。

我国对紫萁的开发主要停留在野生资源的利用上^[9]。但随着收购价格的逐年提升,盗挖野生资源繁殖的现象在紫萁主产区屡禁不止,加之蕨类植物的生长繁育所需时间漫长,其在自然条件下繁殖系数极低^[10-12],导致野生资源面临着逐步枯竭的威胁。因此,为保护野生蕨类资源的多样性,利用孢子进行人工繁育十分必要^[13-14]。组织培养作为一种快速有效的繁殖方式,已用于蕨类植物生产的研究中^[15]。但目前对于紫萁孢子组织培养的研究尚处于摸索阶段,仍存在孢子萌发率低、孢子体转化困难等问题^[16]。因此,本试验特开展紫萁孢子组织培养研究,不仅可有效保护其野生植物资源、满足市场需求,还可为紫萁的人工繁殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2017 年 5 月中旬,在长白山区吉林敦化市黄泥河镇大川林场(东经 127°14′,北纬 43°55′),从 8 年生紫萁植株上选取深绿色、无病虫害、生长健壮、籽粒饱满的孢子叶穗。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体预处理 筛选出孢子囊饱满、大小基本一致的孢子叶穗,切割成 1 cm×1 cm 大小的块状,在 4℃、100 mg/L 6-BA 溶液中浸泡 6 h 后置于烧杯中,去离子水反复冲洗 8~10 次,用滤纸充分吸干水分后,置于超净工作台备用。

1.2.2 消毒方式 在超净工作台上将外植体置于无菌瓶中,加入体积分数 75%乙醇轻摇烧杯,使乙醇与外植体充分接触,消毒 30 s 后,无菌水反复清洗 5~7 次,再用 1 g/L HgCl₂ 溶液分别消毒 4,6,8 和 10 min,操作方式同上;另设置不使用乙醇,直接用 1 g/L HgCl₂ 溶液分别消毒 4,6,8 和 10 min 的处理,操作方式同上。将消毒后的外植体放置于无菌滤纸上,待水分被吸干后,用灭菌手术刀与镊子接种到不添加植物生长调节剂的 1/4MS 培养基上。每种消毒方式接种 30 瓶,重复 3 次;20 d 后统计污染数,计算污染率,40 d 后统计并计算孢子萌发率。

1.2.3 原叶体诱导培养基的筛选 将萌发后的孢子分别接种在 1/4MS、1/4MS+NAA 0.3 mg/L、1/4MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L、1/4MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L、1/4MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L 5 种诱导培养基中;每处理 10 瓶,重复 3 次。培养 60 d 后,统计并计算诱导率。

原叶体诱导率(%)=(60 d 后诱导数/接种总数)×100%。

1.2.4 原叶体增殖培养基的筛选 利用 L₉(3⁴)正交表,取 KT、GA₃、NAA、6-BA 4 个因子,每个因子设 3 个水平,具体详见表 1。将处理好的原叶体分别接种在设计好的含不同质量浓度植物生长调节剂的 1/2MS 培养基中,每瓶接种 3~5 块原叶体,每个处理 10 瓶,重复 3 次。培养 60 d 后统计并计算增殖系数。

增殖系数=(60 d 后原叶体数-增殖前原叶体数)/增殖前原叶体数;

质量变化=60 d 后原叶体鲜质量-增殖前原叶

体鲜质量。

表 1 紫萁原叶体增殖培养基筛选的正交试验因素及其水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels in the screening of osmunda protoplast proliferation medium				
水平 Level	KT A	GA ₃ B	NAA C	6-BA D
1	3	1	0.5	0
2	5	2	1.0	0.5
3	7	3	1.5	1.0

1.2.5 孢子体诱导培养基的筛选 选取增殖培养后鲜绿色或深绿色、质地均匀、片状体肥厚的原叶体团,切割成 2 cm×2 cm 大小,分别接种到添加了稀释 300,500 和 700 倍“光合酵素”(台湾绿宝农业科技有限公司生产,由红糖和大豆蛋白经微生物发酵的小分子有机产物,产品执行标准参照 GB-T17419)的 1/2MS 诱导培养基中(取 3.3 mL“光合酵素”定容至 1 L 培养基中,即为稀释 300 倍;稀释 500 倍和 700 倍同理),以 1/2MS 无任何添加为对照(CK)。每瓶接种 3~5 块原叶体团,每个处理 10 瓶,重复 3 次。自第一片孢子体小叶转化成功开始,60 d 后统计转化率。

孢子体转化率(%)=(60 d 后转化的个数/接种总个数)×100%。

1.2.6 诱导生根培养基的筛选 选择高度 2~3 cm、长势良好的孢子体植株,分别转入 1/2MS+IBA(0.1,0.5,1.0 mg/L)和 1/2MS+NAA(0.1,0.5,1.0 mg/L)的培养基中,进行生根诱导试验,40

d 后统计并计算生根率。

上述试验中各类培养基的 pH 为 5.6~5.8,另含 30 g/L 蔗糖和 6.0 g/L 琼脂粉,培养基于 121 ℃、0.1 MPa 条件下灭菌 20 min。试验过程中培养室昼夜温度控制在 25 ℃/15 ℃,光照时间 12 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx。

1.3 数据分析

使用 Excel 2016 对所得数据进行记录和统计,用 DPSv 7.05 及 SPSS 20.0 软件对数据进行分析,运用 Duncan’s 多重比较法对相关数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 消毒方式对紫萁孢子萌发的影响

由不同消毒剂组合和消毒时间对紫萁孢子污染率、死亡率、萌发率的影响结果(表 2)可知,随着 HgCl₂ 消毒时间由 4 min 增加到 10 min,污染率逐渐下降,死亡率呈上升趋势,最高达 89.29%,萌发率则出现先上升后下降的趋势。紫萁孢子对 1 g/L HgCl₂ 有一定的耐受性,但随着消毒时间延长,消毒剂会对孢子产生一定的毒害作用,增加死亡率。体积分数 75%乙醇与 1 g/L HgCl₂ 组合处理时,污染率虽较 HgCl₂ 单独处理有所下降,但孢子萌发率较低。综合考虑认为,仅使用 1 g/L HgCl₂ 消毒 8 min 为紫萁孢子适宜的消毒方式,消毒效果较好,萌发率最高为 61.11%。

表 2 不同消毒剂组合和消毒时间对紫萁孢子消毒效果的影响

Table 2 Effect of different disinfectant combinations and disinfection time on disinfection effect of osmunda spores						
试验序号 Test No.	消毒剂 Disinfect	HgCl ₂ 消毒 时间/min HgCl ₂ disinfection time	萌发时间/d Germination time	污染率/% Contamination rate	死亡率/% Death rate	萌发率/% Germination rate
1		4	15	37.88±1.45 bc	36.79±1.83 cd	25.33±2.05 cd
2	75%乙醇+1 g/L HgCl ₂ 75% alcohol+1 g/L HgCl ₂	6	20	31.56±2.27 bc	37.82±2.17 cd	30.62±1.29 bc
3		8	25	23.32±0.87 bcd	64.94±0.94 bc	11.74±0.95 e
4		10	—	10.71±2.33 e	89.29±2.04 a	0 f
5	1 g/L HgCl ₂	4	10	67.78±1.17 a	0 e	32.22±0.88 c
6		6	15	46.67±0.33 b	4.44±1.79 e	48.89±0.84 b
7		8	15	35.88±2.17 bc	3.01±2.18 e	61.11±0.39 a
8		10	20	24.44±1.07 bcd	52.23±2.37 bcd	23.33±1.35 cd

注:表中数据为“平均值±标准误”;同列数据后标不同小写字母表示在 P<0.05 水平差异显著。下同。
Note:The data in the table is “mean±standard error”. Difference lowercase letters in same column indicate significant difference at P<0.05. The same below.

2.2 4 种激素对紫萁原叶体诱导的影响

由表 3 可知,激素对紫萁原叶体诱导有促进作用,在未添加激素的对照处理(CK)中,原叶体形成过程缓慢,片状体细长、褶皱、质地不佳,颜色多为浅

绿(图 1-A);在添加 NAA 0.3 mg/L 后,原叶体形成速度明显增快,且片状体有光泽、色泽佳,原叶体诱导率增长明显,从 58.69%提升至 66.18%。处理 3、4、5 则是以 NAA 为基础激素,对 2,4-D、KT 和

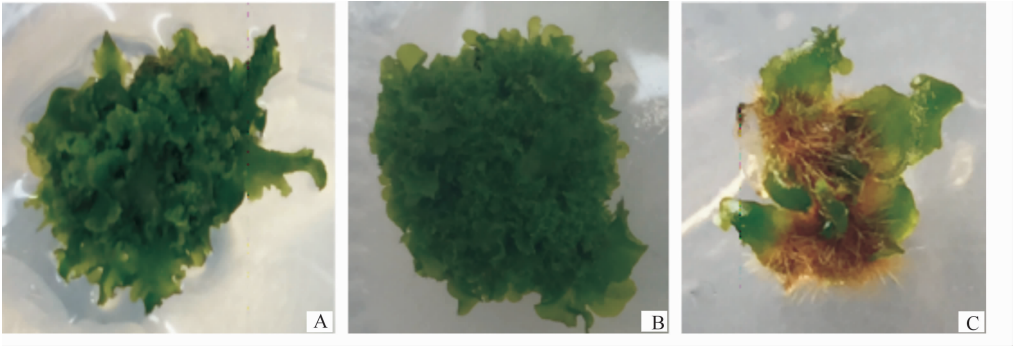
IBA 3 种激素进一步进行筛选,结果表明,KT 对诱导原叶体效果最佳(图 1-B);2,4-D 增殖效果略优于 IBA(表 3);相同质量浓度的 2,4-D、KT、IBA 分别与 NAA 组合应用的效果明显优于单独使用 NAA,且对原叶体的诱导均可起到促进作用,其中以 KT 与 NAA 组合的效果更优。诱导原叶体生长后期,

在 1/4MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L 条件下,原叶体底部有黄褐色绒毛状假根形成(图 1-C),而其他处理则无此现象。因此,在诱导原叶体过程中,IBA 不适宜长时间应用,或可在诱导生根过程中进行试验。紫萁原叶体最佳诱导条件为 1/4MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

表 3 NAA、2,4-D、KT 和 IBA 4 种激素不同组合对紫萁原叶体诱导的影响

Table 3 Effects of different combinations of NAA,2,4-D,KT and IBA on induction of osmunda protoplasts

试验号 Test No.	激素组合 Combination of hormone	原叶体形成时间/d Prothallium development time	诱导率/% Inductivity	原叶体生长状态 Prothallium growth status
1	CK	54	58.69±0.42 c	生长缓慢,片状体细长、多褶皱、密实,浅绿 Slow growth, slender body, wrinkled, dense, light green
2	NAA 0.3 mg/L	41	66.18±1.07 bc	生长较快,片状体肥厚、多平展、蓬松,有光泽、鲜绿 Faster growth, flakes are thick, flat, fluffy, shiny, bright green
3	2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L	34	78.53±0.31 ab	生长较块,片状体细小、蓬松,浅绿 Growing more than a block, the sheet is small, fluffy, light green
4	KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L	30	88.55±0.87 a	生长快,片状体肥厚、心形平展、蓬松,鲜绿 Fast growth, flakes thick, heart-shaped flat, fluffy, bright green
5	IBA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L	46	74.25±1.83 ab	生长较块,片状体碎小、密实,有绒毛状假根,黄绿 Growth is relatively blocky, the flakes are small, dense, with fluffy pseudo roots, yellow-green



A. 对照处理(CK);B. KT 处理;C. IBA 处理

A. Controll (CK);B. KT treatment;C. IBA treatment

图 1 紫萁原叶体在不同激素诱导过程中的生长状态

Fig. 1 Growth state of osmunda protoplasts in different hormone induction processes

2.3 4 种激素对紫萁原叶体增殖的影响

将紫萁孢子萌发后形成的原叶体团接种到 1/2MS增殖培养基中,60 d 后观察原叶体增殖的生长状态。由表 4 可知,供试的几种植物激素均能促进紫萁原叶体的增殖,但不同质量浓度的植物激素及组合对原叶体的增殖存在明显差异。当 KT 质量浓度达到 5 mg/L 时,原叶体增殖系数普遍较高,且生长较快,片状体多肥厚、蓬松,色泽鲜绿且增殖前后质量变化较大。另外,NAA 对原叶体的增殖也存在一定的影响作用,当 NAA 质量浓度较低时,原叶

体生长较为缓慢,片状体多细长、碎小且有假根生成;随着 NAA 质量浓度的增加,增殖系数有所增高,片状体碎小与假根现象明显好转。原叶体在 KT 质量浓度为 5 mg/L、NAA 质量浓度 1.5 mg/L 时,增殖系数最高,品质最好。
由表 5 中 R 值(因素水平极差)可知,原叶体增殖影响因素的主次顺序为 KT、NAA、6-BA、GA₃,各因素最优水平为 A2B3C3D1,即培养基为 1/2MS+KT 5 mg/L+GA₃ 3 mg/L+NAA 1.5 mg/L。

表 4 KT、GA₃、NAA 和 6-BA 对紫萁原叶体增殖影响的正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results of KT,GA ₃ ,NAA and 6-BA on proliferation of protoplasts							
试验号 Test No.	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Hormone concentration				增殖系数 Proliferation coefficient	质量变化/g Quality change	生长状态 Growth state
	KT	GA ₃	NAA	6-BA			
1	3	1	0.5	0	4.44±0.59 cd	5.57±0.42	生长缓慢,片状体细长、多平展、密实、深绿 Slow growth,slender body,more flat,dense,dark green
2	3	2	1	0.5	5.72±1.51 bcd	3.51±0.98	生长较慢,片状体碎小、密实,鲜绿 Slow growth,the flakes are small,dense,and bright green
3	3	3	1.5	1	6.17±1.14 bcd	5.15±0.69	生长较快,片状体大、蓬松,少量假根,鲜绿 Fast growth,large flakes,fluffy,a small amount of pseudo roots,bright green
4	5	1	1	1	8.64±2.10 ab	6.29±0.47	生长较块,片状体肥厚细长、平展、稍密实,鲜绿 Growth is relatively blocky,the flakes are thick and slender,flat,less dense,and bright green
5	5	2	1.5	0	9.60±1.98 a	6.14±0.68	生长较快,片状体肥厚、平展、蓬松,鲜绿 Faster growth,flakes are thick,flat,fluffy,bright green
6	5	3	0.5	0.5	7.70±1.15 abc	5.30±0.05	生长缓慢,片状体肥厚细长、蓬松,少量假根,黄绿 Slow growth,flakes are thick and slender,fluffy,a small amount of pseudo roots,yellow-green
7	7	1	1.5	0.5	5.76±0.79 bcd	5.93±0.34	生长较慢,片状体肥厚、椭圆平展,黄绿 Slow growth,flaky body hypertrophy,elliptical flat,yellow-green
8	7	2	0.5	1	3.99±0.39 d	4.90±0.62	生长缓慢,片状体碎小,大量假根,浅绿 Slow growth,small pieces,a lot of fake roots,light green
9	7	3	1	0	6.07±0.42 bcd	3.57±0.47	生长较慢,片状体小、多平展、密实,少量假根,黄绿 Slow growth,small,flat,dense,a small number of pseudo roots,yellow-green

表 5 紫萁原叶体增殖影响因素正交试验结果的极差分析

Table 5 Range analysis on orthogonal test results of influential factors of osmunda protoplast proliferation				
极差 Variance	KT A	GA ₃ B	NAA C	6-BA D
K ₁	5.440	6.282	5.376	6.703
K ₂	8.648	6.435	6.813	6.394
K ₃	5.276	6.647	7.175	6.266
R	3.373	0.366	1.799	0.437

注:K_i(i=1,2,3)为同一因素各水平所对应的试验指标和,R 为对应因素的极差。
Note:K_i(i=1,2,3)is the sum of the test indicators corresponding to each level of same factor,and R is the range of the corresponding factors.

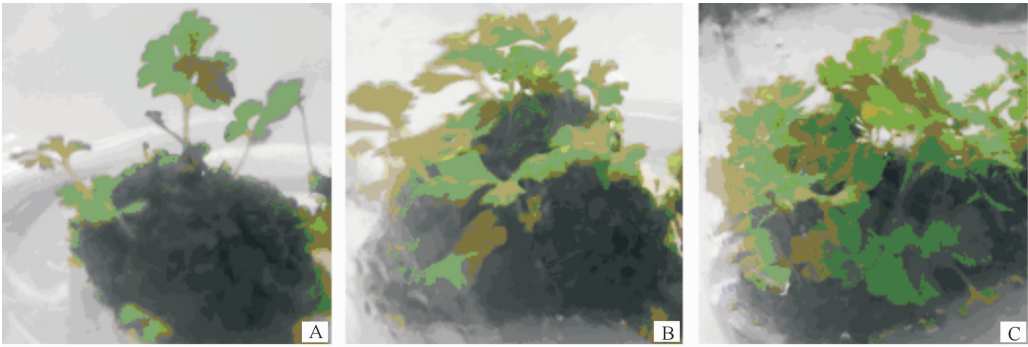
2.4 光合酵素对紫萁孢子体苗诱导的影响

由表 6 可知,光合酵素对紫萁孢子体苗的诱导具有明显的促进作用,随其稀释倍数由 0(CK,图 2-A)增加至 700 倍,孢子体转化率明显上升,但长势由强转弱,孢子体高度先升高后降低,单瓶苗数减少,色泽变浅(图 2-B);当稀释倍数为 500 倍时,孢

子体苗生长健壮,色泽浓绿,孢子体转化率较高,且孢子体高度高于其他处理,效果较好(图 2-C)。诱导过程中应注重孢子体长势,只有长势良好,在后期进行诱导生根及移栽驯化时才能有较高的成功率,因此认为添加 500 倍光合酵素稀释液更有利于紫萁孢子体的诱导及生长。

表 6 光合酵素用量对紫萁孢子体转化的影响

Table 6 Effect of photosynthetic enzyme dosage on transformation of osmunda sporophyte					
光合酵素 稀释倍数 Dilution ratio of photosynthetic enzyme	接种原叶体数 Inoculation of protoplasts	孢子体数 Number of sporozoites	孢子体转化率/% Sporophyte conversion rate	孢子体高度/cm Sporophyte height	孢子体长势 Sporophyte growth
0	61	9	15.24±0.38 c	1.55±0.60	叶片较小,茎细,浅绿 Small leaves,thin stems,light green
300	62	30	48.74±0.79 b	1.94±0.44	叶片较大,茎粗,浓绿 Large leaves,thick stems,thick green
500	66	38	57.23±0.24 ab	2.33±0.41	叶片大,茎粗,浓绿 Large leaves,thick stems,thick green
700	67	44	65.39±1.11 a	1.82±0.50	叶片较大,茎细,浅绿 Large leaves,thin stems,light green



A. 对照(CK);B. 光合酵素稀释 700 倍;C. 光合酵素稀释 500 倍
A. Control (CK);B. 700 times photosynthetic;C. 500 times photosynthetic

图 2 紫萁孢子体经不同用量光合酵素诱导 60 d 后的生长情况

Fig. 2 Growth of osmunda sporophyte 60 days after induction by different amounts of photosynthetic enzymes

2.5 IBA 和 NAA 对紫萁组培苗诱导生根的影响

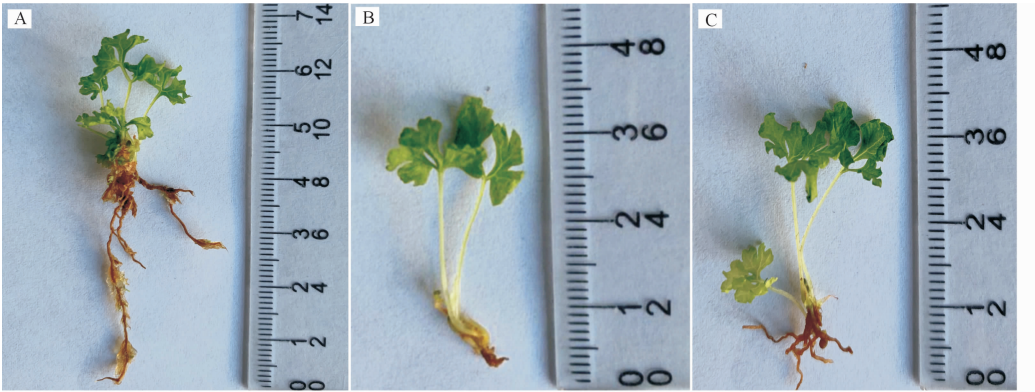
由表 7 可知,不使用激素进行生根培养时,幼苗也可生根,但生根率低,单株根数量少,长势弱;将幼苗接入以 IBA 为主要生根剂的培养基中,前 20 d 时

培养基中没有明显变化,大约 30 d 时,幼苗基部开始产生浅黄褐色短状根系,并且有新生幼茎,老茎不断增长;40 d 左右时,根系逐渐延展伸长,数量增加。

表 7 不同质量浓度 NAA 和 IBA 对紫萁组培苗生根的影响

Table 7 Effects of NAA and IBA at different mass concentrations on rooting of osmunda tissue culture seedlings

试验号 Test No.	NAA/ (mg · L ⁻¹)	IBA/ (mg · L ⁻¹)	生根率/% Rooting rate	根系生长状况 Root growth condition
1	0	0	14.34±0.77 d	根系短小,数量少,长势弱 The root system is short,the number is small,and the growth is weak
2	0	0.1	52.72±1.57 bc	根系较长,数量较多,长势一般 The root system is long,the number is large,and the growth is general
3	0	0.5	93.33±0.58 a	根系长,数量多,长势良好 The root system is long,the number is large,and the growth is good
4	0	1.0	71.11±2.20 ab	根系长,数量较多,长势良好 The root system is long,the number is large,and the growth is good
5	0.1	0	42.22±1.64 bcd	根系较长,数量较多,长势良好 The root system is long,the number is large,and the growth is good
6	0.5	0	32.23±1.68 cd	根系较短,数量较多,长势一般 The root system is short,the number is large,and the growth is general
7	1.0	0	25.56±2.41 cd	根系短小,数量较少,长势弱 The root system is short,the number is small,and the growth is weak.



A. 0.5 mg/L IBA;B. 1 mg/L NAA;C. 0.1 mg/L NAA

图 3 不同质量浓度 IBA 和 NAA 诱导下紫萁组培苗的生根情况

Fig. 3 Rooting of osmunda tissue culture seedlings induced by IBA and NAA at different mass concentrations

由表7可知,在添加IBA的培养基中,随着IBA质量浓度的提高,生根率呈现先上升后下降的趋势,在IBA质量浓度为0.5 mg/L时生根率最高,达93.33%,此时幼苗根系长、数量多,植株生长旺盛(图3-A)。

由表7可知,将幼苗接入以NAA为主要生根剂的培养基时,发现根原基的形成时间与在IBA培养基上相近;随着NAA质量浓度的增加,生根率呈下降趋势,当NAA质量浓度达到1.0 mg/L时,根系短小,数量少,叶片边缘有萎蔫现象,且没有新生茎形成,长势弱(图3-B);NAA质量浓度为0.1 mg/L时,生根率最高,为42.22%,此时幼苗根系较长,数量较多,长势良好(图3-C)。与IBA相比,NAA对紫萁丛生芽的诱导生根率较低。

3 讨论与结论

紫萁孢子从萌发、原叶体形成与增殖到最终完成孢子体的转化等过程,均受到诸多环境因素的影响,只有各个因子处于最佳状态时,才有利于组培苗的分化和生长^[17]。蕨类植物因生长环境潮湿,并且外植体采摘后多保存在低温条件下,以致孢子多带有细菌、真菌及内生菌,故对外植体消毒方法进行系统研究非常必要。本试验发现,体积分数75%乙醇和HgCl₂配合使用虽可使外植体污染率降低在40%以下,但对紫萁孢子的毒害作用也较明显,可能是因为乙醇渗透作用较强,对孢子内部孢子粉的毒害作用较大,使得萌发率较低,此结论与王阳^[18]在东北对开蕨孢子繁殖技术研究中的结论一致。本试验最佳消毒方式为1 g/L HgCl₂消毒8 min,此条件下紫萁孢子萌发率最高,达61.11%。但HgCl₂属重金属污染物,今后可尝试使用NaClO进行消毒,以期在消毒的同时达到保护环境的效果。

植物激素是诱导与增殖试验的关键因素之一,对植物体的生长状况、器官分化等起着重要作用^[19-20]。本试验在诱导紫萁原叶体过程中,2,4-D、KT、IBA分别与NAA组合应用较单独使用NAA效果更好,其中KT和NAA组合应用的诱导率(88.55%)及原叶体质地俱佳;IBA长时间使用易导致假根形成,不利于后期增殖培养。KT和NAA在原叶体增殖过程中作用明显,最佳配比为KT 5 mg/L+NAA 1.5 mg/L,这与闫海川^[21]在桂皮紫萁离体快繁试验中的结果一致,也与Dykeman^[22]、Harper^[23]在荚果蕨和薄囊蕨培养研究中的结果相似,但与王洋^[24]和Chen^[25]在扇叶铁线蕨中的研究

结果不同,可能与植物种类、试验方法、地理位置、气候环境或内源激素种类及浓度、植物内部渗透压等因素有关。

蕨类植物孢子体的转化,是组织培养的重要环节。本试验发现,在无任何添加的条件下,孢子体仍可以进行转化,但转化率及长势较差,将光合酶素稀释500倍时,孢子体转化率及生长状态皆较好。在组培苗生根过程中,NAA与IBA较为常用且生根效果明显^[26],本试验分别以这2种激素进行生根诱导,最终认为IBA 0.5 mg/L为生根最适条件,生根率高达93.33%,这与闫海川^[21]、张敏等^[9]的研究结论相似,但与庄春慧等^[27]的研究结果不同,可能与生根培养时无机盐浓度及植物累积激素种类等因素不同有关。从紫萁组培苗整个生根诱导过程来看,培养基中添加0.5 mg/L IBA生根率较高,生根效果较好,若对光照、温度及其他基础因素等进一步研究,有望达到100%生根率。

[参考文献]

- [1] 高美玲,袁成志,杨俊玲.无公害富硒薇菜套种栽培技术[J].北方园艺,2008(12):94.
Gao M L, Yuan C Z, Yang J L. Cultivation techniques of pollution-free selenium-enriched Weicai [J]. Northern Horticulture, 2008(12):94.
- [2] 孙晓彤.富硒发酵薇菜的工艺技术研究及应用[D].武汉:武汉轻工大学,2014.
Sun X T. Research and application of process technology for selenium-fed fermented osmunda [D]. Wuhan: Wuhan University of Light Industry, 2014.
- [3] 严仲恺,李万林.中国长白山药用植物彩色图志[M].北京:人民卫生出版社,1996.
Yan Z K, Li W L. Color map of medicinal plants in Changbai Mountain, China [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.
- [4] 李道新,许慎东,陈金良,等.森林薇菜大田生产技术研究[J].湖北大学学报(自然科学版),2017,39(2):199-205.
Li D X, Xu S D, Chen J L, et al. Research on high yield technology in field of *Osmunda japonica* Thunb [J]. Journal of Hubei University (Natural Science Edition), 2017, 39(2):199-205.
- [5] 徐伟君,张九东,陶贵荣.九中秦岭野菜营养成分研究[J].北方园艺,2015(7):38-40.
Xu W J, Zhang J D, Tao G R. Study on nutrient composition of wild vegetables in Jiuzhong Qinling [J]. Northern Horticulture, 2015(7):38-40.
- [6] 杨春梅,张含生,张健全,等.薇菜孢子苗规模化繁育与林下栽培技术[J].北方园艺,2017(3):67-68.
Yang C M, Zhang H S, Zhang J Q, et al. Large-scale breeding of seedlings of *Osmunda chinensis* and cultivation techniques under the forest [J]. Northern Horticulture, 2017(3):67-68.

- [7] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编:上册 [M]. 北京:人民卫生出版社,1983:847.
National Chinese Herbal Medicine Compilation Group. National Chinese herbal medicine compilation: The first volume [M]. Beijing:People's Medical Publishing House,1983:847.
- [8] 克里斯托弗·布里克尔. 世界园林植物与花卉百科全书 [M]. 杨秋生,李振宇,译. 郑州:河南科学技术出版社,2005.
Brickell C. World encyclopedia of garden plants and flowers [M]. Yang Q S,Li Z Y,translation. Zhengzhou:Henan Science and Technology Press,2005.
- [9] 张敏,张旭光,孙红绪. 紫萁(蕨菜)的组织培养 [J]. 植物生理学通讯,2004,40(2):149.
Zhang M,Zhang X G,Sun H X. Study on tissue culture of aster (Weicai) [J]. Plant Physiology Communications,2004,40(2):149.
- [10] 陈磊夫,郭凤领,吴金平,等. 高山蕨菜漂浮式孢子育苗生态基质研究 [J]. 湖北农业科学,2017,56(24):4796-4798.
Chen L F,Guo F L,Wu J P,et al. Study on ecological substrate of floating spore seedlings of alpine radicans [J]. Hubei Agricultural Sciences,2017,56(24):4796-4798.
- [11] 郭红娟. 几种药用蕨类植物孢子繁殖和配子体发育及叶表皮研究 [D]. 广西桂林:广西师范大学,2010.
Guo H J. Spore propagation and gametophytic development and leaf epidermis of several medicinal ferns [D]. Guilin, Guangxi:Guangxi Normal University,2010.
- [12] 王谋强,张朝君. 我国南方蕨菜的研究现状及其发展对策 [J]. 贵州农业科学,2006,34(4):135-136.
Wang M Q,Zhang C J. Research status and development countermeasures of osmunda in South China [J]. Guizhou Agricultural Sciences,2006,34(4):135-136.
- [13] 刘欣,薛萌,许亮,等. 中药用蕨类植物孢子繁殖技术研究进展 [J]. 亚太传统医药,2018,14(6):80-83.
Liu X,Xue M,Xu L,et al. Research progress on spore propagation technology of Chinese medicinal ferns [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine,2018,14(6):80-83.
- [14] 张军,潘炉台,赵俊华,等. 贵州药食两用蕨类植物资源调查 [J]. 贵州农业科学,2013,41(3):7-19.
Zhang J,Pan L T,Zhao J H,et al. Study on the fern resources of edible and edible dual-use plants in Guizhou [J]. Guizhou Agricultural Sciences,2013,41(3):7-19.
- [15] 李杨,余蓉培,李慧,等. 观赏蕨类植物组织培养研究进展 [J]. 园艺学报,2012,39(9):1839-1848.
Li Y,Yu R P,Li H,et al. Research progress in tissue culture of ornamental ferns [J]. Journal of Horticulture,2012,39(9):1839-1848.
- [16] 马玉心,赵宏. 分株紫萁的生物学特性及组织培养技术 [J]. 中国林副特产,2004(1):16-17.
Ma Y X,Zhao H. Biological characteristics and tissue culture techniques of *Schistosoma japonicus* [J]. Chinese Journal of Forest Products,2004(1):16-17.
- [17] 张敏. 蕨菜组织培养技术 [J]. 北方园艺,2008(2):206-208.
Zhang M. Tissue culture technique of *Osmanthus fragrans* [J]. Northern Horticulture,2008(2):206-208.
- [18] 王阳. 东北对开蕨孢子繁殖及孢子体转化技术的研究 [D]. 吉林:吉林农业大学,2015.
Wang Y. Study on the propagation of spores and sporophytic transformation technology in Northeast China [D]. Jilin:Jilin Agricultural University,2015.
- [19] 王金刚,张兴. 园林植物组织培养技术 [J]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008.
Wang J G,Zhang X. Garden plant tissue culture technology [M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Publishing House,2008.
- [20] 李春鹏,孙晓丹,董然,等. 朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导及分化 [J]. 东北农业大学学报,2018,46(9):35-40.
Li C P,Sun X D,Dong R,et al. Callus induction and differentiation of *Epimedium koreanum* [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2018,46(9):35-40.
- [21] 闫海川. 桂皮紫萁离体快繁及试管苗生产的研究 [D]. 吉林:吉林农业大学,2011.
Yan H C. Study on in vitro rapid propagation and test tube seedling production of *Cinnamomum edulis* [D]. Jilin:Jilin Agricultural University,2011.
- [22] Dykeman B W. *In vitro* propagation of the Ostrich Fern (*Matteuccia struthiopteris*) [J]. Can J Plant Sci,1985,65:1025-1032.
- [23] Harper K L. A sexual multiplication of leptosporangiate ferns through tissue culture [D]. California:University of California,1976.
- [24] 王洋. 扇叶铁线蕨孢子离体培养及其快繁体系的建立 [D]. 武汉:华中农业大学,2008.
Wang Y. *In vitro* culture and rapid propagation system of *A. sylvestris* [D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University,2008.
- [25] Chen C. Tissue culture and regeneration of *Adiantum flabel-lulatum* [J]. Journal of Fujian Forestry Science & Technology,2011,38(4):65-68.
- [26] 尹双双,高文远,王娟,等. 药用植物不定根培养的影响因素 [J]. 中国中药杂志,2012,37(24):3691-3694.
Yin S S,Gao W Y,Wang J,et al. Influencing factors of adventitious root culture in medicinal plants [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine,2012,37(24):3691-3694.
- [27] 庄春慧,陈荀,付尧,等. 玉蝉花种胚的丛生芽诱导和植株再生技术 [J]. 草业科学,2014,31(9):1712-1717.
Zhuang C H,Chen X,Fu Y,et al. Study on shoot induction and plant regeneration of maize embryos [J]. Grass Science,2014,31(9):1712-1717.