

文章编号:1673-1689(2008)04-0103-04

以孢子为外植体的楔叶铁线蕨组织培养

田晓艳¹, 刘延吉^{*2}, 王 姝²

(1. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001; 2. 沈阳农业大学 生物科技学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以孢子为外植体对铁线蕨进行组织培养。在基本培养基中添加不同生长调节物质对孢子萌发和孢子体进行诱导。孢子初代培养阶段,无机盐含量较低的基本培养基适于孢子萌发。孢子体萌发阶段最适培养基组合是:1/2MS 培养基+3.0 mg/L GA+0.3 g/dL 活性炭+30 g/L 蔗糖+0.65 g/dL 琼脂, pH 5.8~6.0;原叶体增殖阶段,最佳培养基组合为:1/3MS 培养基+NAA 2.0 mg/L+30 g/L 蔗糖+0.65 g/dL 琼脂, pH 5.8~6.0;孢子体的诱导采用不完全组织培养,其培养基组合为珍珠岩:蛭石:草炭土(1:1:1)混合的基质。

关键词:铁线蕨;孢子;快繁;组织培养;孢子体诱导

中图分类号:Q 819

文献标识码:A

The Fast Establishment of Micropropagation System on *A. raddianum* using Spore as Explants

TIAN Xiao-yan¹, LIU Yan-ji^{*2}, WANG Shu²

(1. College of Environmental Technology and Biotechnology, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun 113001, China; 2. College of Biotechnology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The manuscript is studying micropropagation system on *A. raddianum* with spore as explants. The spore bourgeon and sporophyte induction through adding different growth material in minimal medium as follows: at spore initial culture stage, minimal medium of lower mineral is suitable to spore bourgeon. The optimum culture medium for spores bourgeon is that: 1/2 MS+3.0 mg/LGA+0.3 g/dL active carbon, 30 g/L sucrose+0.65 g/dL agar, pH 5.8~6.0; The optimum culture medium for prothallus proliferation is that: 1/3 MS+NAA 2.0 mg/L+30 g/L Lsucrose+0.65 g/dL agar, pH 5.8~6.0. Sporophyte induction adopts incomplete tissue culture, mixed culture medium combination is that: perlite: vermiculite: turf(1:1:1).

Key words: *A. raddianum*; spore; explants; tissue culture; transplant; sporophyte induction

收稿日期:2007-09-11.

基金项目:国家 863 计划项目(2004AA247010).

作者简介:田晓艳(1971-),女,辽宁沈阳人,讲师,农学硕士.

* 通讯作者:刘延吉(1959-),男,辽宁大连人,副教授,农学博士,主要从事细胞工程、细胞信号转导方面的研究.

Email:yanjiliu@yahoo.com.cn

铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris*)别名铁线草、美人粉、美人枫,是铁线蕨科铁线蕨属植物。铁线蕨为多年生小型常绿陆生草本,植株矮小,叶绿、密而细小,秀丽清雅,非常适合室内盆栽或制作盆景。

目前对铁线蕨的研究主要集中在对其幼叶、拳卷叶、根状茎组织培养^[1]、活性成分^[2-3]的测定、生理胁迫反应^[4]以及基因组功能^[5]等方面,而以孢子为外植体进行组织培养未见完整报导^[6]。作者以孢子为外植体对楔叶铁线蕨进行组织培养,建立快繁体系,从而为铁线蕨在北方的扩大繁殖及观赏价值的提高提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

楔叶铁线蕨采自于沈阳园林树木研究所。以楔叶铁线蕨的孢子作为外植体。楔叶铁线蕨孢子囊群着生于孢子叶背面的边缘,呈椭圆型。初期产生的孢子为绿色,随着孢子的逐渐成熟,孢子囊呈棕褐色,即标志着孢子已经成熟。将成熟的孢子连同叶片自植物体上一起剪下,放入洁净且密封光滑的纸袋内(如硫酸纸),待干燥后孢子囊自然裂开,孢子散落。孢子置于 4℃ 冰箱中保存,供培养使用。

1.2 方法

1.2.1 培养基制作 实验培养基是改变了大量元素含量的 1/2MS、1/3MS 培养基。

1.2.2 孢子消毒 70% 酒精溶液处理 20~30 s, 无菌水漂洗 3~5 次,再在 0.1% 升汞溶液中浸泡 2~3 min, 无菌水漂洗 4~5 次。

1.2.3 初代培养 以孢子为外植体,不同基本培养基(Knop's 低盐培养基、1/2MS 培养基和 MS 培养基)、有无活性炭(Knop's 低盐培养基附加 0% 和 0.15% 的活性炭)及不同赤霉素水平(Knop's 低盐培养基附加 0, 1, 2, 3 mg/L 赤霉素)的单因素试验。以 1/2MS 培养基为基本培养基,设计 3 因素 3 水平的正交实验(GA 质量浓度:0, 3, 5 mg/L; 蔗糖质量浓度:20, 30, 40 g/L; 活性炭质量浓度:0, 0.15, 0.30 g/dL),选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表。每处理 5 瓶,每瓶约 100 个孢子,重复 2 次。孢子的初代培养基确定后,从接种开始每隔 3~5 d 取 2~3 份材料作活体观察,并照相记录。培养条件:将接种后的三角瓶先放入纸盒中,黑暗处理 24 h,以促使孢子同步萌发。再置于光照培养架上,光照强度 1 500~2 000 Lux,光周期 14 h/d,培养室内温度控制在(25±2)℃。

1.2.4 原叶体增殖培养 以 1/2MS、1/3MS、Knop's 为基本培养基与不同质量浓度的 NAA、6-BA 按正交设计表安排各因素和水平,见表 1。每瓶 5 个原叶体堆(直径 3~5 mm),每个处理为 3 瓶,重复 2 次,记录原叶体的质量。原叶体增殖率(%)=(25 天后的鲜重/最初的鲜重)×100。

表 1 原叶体增殖培养阶段的 $L_9(3^4)$ 因素水平表

Tab. 1 $L_9(3^4)$ factors and levels of prothallium germination stage

水平	因素		
	A 培养基	B 6-BA 质量 浓度/(mg/L)	C NAA 质量 浓度/(mg/L)
1	1/3 MS	0.0	0.0
2	1/2 MS	0.5	1.0
3	Knop's	2.0	2.0

1.2.5 孢子体诱导培养

1) 完全组织培养:分为不附加任何激素的 MS、1/2MS 培养基和在原叶体上滴加 10^{-6} mg/L 的 ABA。每处理 10 瓶,每瓶接入约 3 个原叶体堆,重复 3 次,记录孢子体的形成时间和形成率。孢子体形成时间为从接入原叶体开始到孢子体形成为止的这段时间。

孢子体形成率(%)=(产生孢子体的原叶体堆数/总原叶体堆数)×100

2) 不完全组织培养:将增殖的原叶体堆从三角瓶中取出来,平放在经高温灭菌的河沙或珍珠岩、蛭石和草炭土混合(1:1:1)的基质上,每隔 7 d 用无菌水喷浇以保持土壤湿润。每个培养平皿上接种 10~15 个原叶体堆,每次 3 个平皿,重复 3 次,记录孢子体的形成时间和形成率。

1.2.6 移栽 待孢子体长至 3 cm 左右时,根系形成 2~5 cm,直接从培养皿中取出,用椰糠种植。椰糠应事先灭菌,移栽之前先将椰糠用水浸透,小苗种好后再浇透水,10 d 内用薄膜覆盖以保持湿度在 90% 以上,放在阴凉处。

2 结果与分析

2.1 孢子的初代培养

2.1.1 不同培养基对孢子萌发的影响 以孢子为外植体,首先安排 3 种基本培养基:Knop's 低盐培养基、1/2MS 培养基和 MS 培养基,分 5 组,每组 5 个处理,接种 30 d 后记录萌发率,见表 2。

从表 2 可以看出,1/2MS 培养基和 Knop's 低盐培养基对孢子的萌发率差异不显著,表明这 2 种

培养基对楔叶铁线蕨孢子萌发率的影响无差异。而 MS 培养基孢子的萌发率极显著低于上述两培养基。这表明孢子的萌发与无机盐的质量浓度有关,降低培养基中无机盐的质量浓度可促进孢子萌发。

表 2 不同培养基对孢子萌发的影响

Tab. 2 Effect of different media on spore germination

培养基	接种瓶数	平均萌发率/%	平均值±标准差
Knop's 低盐培养基	25	42	42±10.00 ^{aA}
1/2 MS 培养基	25	48	48±8.37 ^{aA}
MS 培养基	25	32	32±7.88 ^{bB}

注:同列肩标小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$),同列肩标大写字母不同者表示差异极显著($P<0.01$)。

2.1.2 添加活性炭对孢子萌发的影响 以 Knop's 低盐培养基为基本培养基,附加 0 g/dL 和 0.15 g/dL 的活性炭,记录孢子的萌发时间和萌发率。分 5 组,每组 5 个处理。孢子萌发时间以从孢子接入培养基开始到肉眼能观察到绿点为止的这段时间,接种 30 d 后记录萌发率,见表 3。

表 3 活性炭对孢子萌发的影响

Tab. 3 Effect of the activated charcoal on spore germination

培养基	接种瓶数	萌发时间/d	平均值±标准差	平均萌发率/%	平均值±标准差
活性炭 0.15 g/dL	25	12	12±0.7071 ^{bB}	80	80±7.07 ^{aA}
无活性炭	25	26	26±0.7071 ^{aA}	42	42±8.37 ^{bB}

注:同列肩标小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$),同列肩标大写字母不同者表示差异极显著($P<0.01$)。

在未加活性炭的培养基上,孢子萌发需要 26 d 的培养,萌发率相对较低,只有 42%;在有活性炭的培养基上,萌发时间短,仅需 12 d,且萌发率达 80%。方差分析表明,有活性炭的培养基与无活性炭的培养基在孢子萌发时间和孢子萌发率上都达到极显著差异。活性炭能促进孢子的萌发并提高孢子萌发率。

2.1.3 不同赤霉素水平对孢子萌发的影响 以 Knop's 低盐培养基为基本培养基,附加 0,1,2,3 mg/L 的赤霉素 GA,分 5 组,每组 5 个处理,接种 30 d 后记录萌发率。

表 4 列出了不同 GA 质量浓度对孢子萌发率的方差分析结果。可以看出,不同质量浓度的 GA 对楔叶铁线蕨孢子萌发率的差异性。无 GA 与有 GA 的培养基对孢子萌发差异显著;赤霉素质量浓度在

1, 2 mg/L 间对孢子萌发无差异;3 mg/L GA 与其它质量浓度处理间有极显著差异,并以 3 mg/L 质量浓度 GA 的培养基孢子萌发率最大。

表 4 不同质量浓度赤霉素对孢子萌发的影响

Tab. 4 Effect of different content of GA on spore germination

GA 质量浓度/(mg/L)	接种瓶数	平均萌发率/%	平均值±标准差
0	25	42	42±8.37 ^{aA}
1	25	52	52±8.37 ^{bB}
2	25	58	58±8.37 ^{bB}
3	25	80	80±7.07 ^{cC}

注:同列肩标小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$),同列肩标大写字母不同者表示差异极显著($P<0.01$)。

2.1.4 初代培养基的确定 在 3 个因素中,活性炭的 R 值最大,为主要因素,其次是蔗糖质量浓度,最后是 GA 的质量浓度。再根据试验各因子的总计数或平均数进行水平优选与组合优选,赤霉素 GA 的质量浓度 3.0 mg/L,蔗糖质量浓度 30 mg/L,活性炭质量浓度 0.3 g/dL。由此可知,楔叶铁线蕨孢子初代培养选取的最佳培养基组合为 A₂B₂D₃,即:1/2MS 培养基+3.0 mg/L GA+0.3 g/dL 活性炭+30 g/L 蔗糖+0.65 g/dL 琼脂,pH 5.8~6.0。

2.2 原叶体增殖培养

试验结果表明,NAA 的质量浓度是主要因素,其次是基本培养基种类,再次是 6-BA 的质量浓度;再依据试验中各因素的总计数或平均数进行水平优选与组合优选。结果为:基本培养基选 1/3MS 培养基,NAA 质量浓度选 2 mg/L,6-BA 质量浓度选 0 mg/L,由此可知,楔叶铁线蕨原叶体增殖培养选取的最佳培养基组合为 A₁B₁C₃,即:1/3MS 培养基+NAA 2.0 mg/L+30 g/L 蔗糖+0.65 g/dL 琼脂,pH 5.8~6.0。

接种 10 d 后原叶体开始恢复生长,逐渐增大并不断增殖,在其周围不断形成新的原叶体。有的原叶体长出肉眼观察到的大量黄色针毛,随后针毛减少,原叶体增大,且原叶体保持绿色,生长良好。

2.3 孢子体诱导培养

试验设计了 2 种不同类型的培养基进行完全组织培养,诱导孢子体产生,但两种方式的培养基上原叶体都只是成团的增殖,没有由原叶体阶段向孢子体阶段诱导发育的趋势,添加激素 ABA 的培养基也并没有对孢子体的形成起诱导作用。3 个月后即继代 3~4 次后,培养基上的原叶体仍处于原叶体阶段,孢子体形成率为 0。

对上述两种不同培养方式培养了3个月的原叶体进行不完全组织培养,20 d后就可出现孢子体,30 d后孢子体诱导率达到90%以上。在保留下来的1/2MS培养基上又经过35 d左右,即完全组织培养4个月左右,可见到有孢子体产生,但孢子体诱导率在5%以下。

将增殖继代2次的原叶体直接进行不完全组织培养,结果是在经高温灭菌的河沙上,原叶体在30~35 d开始形成孢子体,15 d内达到100%;珍珠岩、蛭石和草炭土混合(1:1:1)的基质上原叶体形成孢子体的时间较短,为20~25 d,10 d内达到100%。比较来看,珍珠岩、蛭石和草炭土的混合基质孢子体形成时间短,诱导效果好于河沙。

3 结 语

楔叶铁线蕨孢子的萌发与无机盐的质量浓度有关,MS与1/2MS培养基和Knop's低盐培养基相比,孢子萌发率显著偏低,而后两者之间对楔叶铁线蕨孢子的萌发率无显著差异。

GA对蕨菜孢子的萌发具有明显的促进作用^[1]。本研究证明了赤霉素有促进楔叶铁线蕨孢子萌发的效果,在单因素的孢子萌发试验中以3

mg/L赤霉素效果最好。在正交试验赤霉素与活性炭共同作用时,5 mg/L质量浓度没有3 mg/L赤霉素促进孢子萌发效果好。在培养基中加入活性炭可以缩短孢子萌发时间,提高孢子萌发率。因加入活性炭使培养基变黑,所以要在加入前调好培养基的pH值。为防止活性炭沉淀,通常在琼脂将要凝固之前轻轻摇动培养瓶。

有机成分蔗糖在蕨类植物孢子萌发中也很重要,要在组织培养中解决培养基的渗透压问题,加入蔗糖最适宜。本试验楔叶铁线蕨孢子培养的最适蔗糖质量浓度为30 mg/L,质量浓度过高或过低都会引起萌发率的下降。蔗糖不仅提供有机营养,更重要的是在于调节培养基的渗透压。赤霉素和活性炭的使用都有促进楔叶铁线蕨孢子萌发的作用。经正交试验得到的孢子萌发最适培养基组合是:1/2MS培养基+3.0 mg/L GA+0.3 g/dL活性炭+30 g/L蔗糖+0.65 g/dL琼脂,pH 5.8~6.0。

选取的最佳培养基组合为:1/3MS培养基+NAA 2.0 mg/L+30 g/L蔗糖+0.65 g/dL琼脂。

孢子体的诱导采用不完全组织培养,珍珠岩、蛭石和草炭土(1:1:1)混合的基质。

参考文献(References):

- [1] Kuriyama A, Kobayashi T, Hayashi S, et al. Medium composition for the production of sporophytes of the fern *Adiantum capillus-veneris*[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2004, 73(6): 580-582.
- [2] Victor B, Maridass M, Ramesh U, et al. Antibacterial activity of essential oils from the leaves of *Adiantum capillus-veneris* Linn[J]. *Malaysian Journal of Science Faculty of Science*, 2003, 22(1): 65-66.
- [3] Piyali G M, Gupta K. Antifungal activity of the crude extracts and extracted phenols from gametophytes and sporophytes of two species of *Adiantum*[J]. *Journal of Taiwan National Taiwan University*, 2005, 50(4): 272-283.
- [4] 刘延吉, 田晓艳, 王姝. 水杨酸预处理提高铁线蕨冷胁迫的渗透调节反应[J]. *沈阳农业大学学报*, 2007, 38(3): 413-415.
LIU Yan-ji, TIAN Xiao-yan, WANG Shu. Improvement of osmosis modulation under low temperature stress on *Adiantum capillus-veneris* via salicylic acid pretreatment[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2007, 38(3): 413-415. (in Chinese)
- [5] Demaggio A E. Ferns as a model system for studying polyploidy and gene dosage effects[J]. *Bioscience*, 1971, 21: 313-316.
- [6] 张丽, 李玉峰, 代娟. 苦瓜愈伤组织的诱导及培养条件优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(3): 116-120.
ZHANG Li, LI Yu-feng, DAI Juan. Study on the inducing callus of *Momordica charantia* L and optimizing the culture conditions[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(3): 116-120. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)