

肾蕨离体培养技术的研究

司 亮

(黑龙江省农业科学院园艺分院, 黑龙江哈尔滨 150069)

摘要:以肾蕨匍匐茎茎尖为外植体, 对离体再生培养技术进行了研究。结果表明: GGB 的最佳诱导培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹, 诱导率为 95%; GGB 增殖培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹, 增殖系数为 5.3; 孢子体诱导培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹+NAA0.7 mg·L⁻¹, 诱导率可达到 82%; 适合诱导生根培养基为 MS+NAA0.2 mg·L⁻¹+0.1%Ag, 生根率为 100%。

关键词: 肾蕨; 离体培养; 绿色小体(GGB)

中图分类号: S682 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0020-03

Studies on in vitro Culture of *Nephrolepis auriculata*

Si Liang

(Horticultural Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: Using the stem apex of the stolon of *Nephrolepis auriculata* as explants, the study on in vitro culture was conducted. The results showed that the most appropriate induction culture medium of GGB was MS+BA0.7 mg·L⁻¹, the ratio of induction was 95%. The most proper multiplication medium was MS+BA0.7 mg·L⁻¹, multiplication coefficient was to be 5.3; The medium for GGB to shoot was MS+BA0.7 mg·L⁻¹+NAA0.7 mg·L⁻¹, rate of inducement was 82%; The most appropriate roots-planting culture medium was MS+NAA0.2 mg·L⁻¹+0.1%Ag and the rooting rate was up to 100%.

Key words: *Nephrolepis auriculata*; in vitro culture; green globular bodies(GGB)

肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)又名篦子草、蜈蚣草等, 是肾蕨科肾蕨属骨碎补科多年生常绿草本植物, 原产于热带、亚热带地区, 喜温暖湿润的环境^[1]。肾蕨株型直立丛生, 复叶深裂奇特, 叶色浓绿, 常用于客厅、办公室和卧室的美化布置。近年, 由于肾蕨具有旺盛的生命力和保湿性, 在园林中得到了广泛的应用, 它常被栽植在荫蔽的地方或室内, 也可装饰路径, 以及作切叶及配植于专类植物园内^[2]。肾蕨的常规繁殖方式为分株, 其繁殖系数低, 且易造成植株品种退化, 观赏性下

降。利用组织培养技术可极大地提高繁殖系数, 保持品种观赏特性。本研究以肾蕨的匍匐茎茎尖为外植体对其离体培养技术进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

黑龙江省园艺分院智能温室内生长健壮的盆栽肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得 取肾蕨匍匐茎茎尖为外植体。在超净台上于 75%酒精浸泡 30 s, 用无菌水冲洗一次, 再用 0.1%的升汞消毒 5~6 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 无菌滤纸吸干, 在解剖镜下拨取 0.2~0.5 mm 大小茎尖。接种到诱导培养基上。

收稿日期: 2009-06-04

作者简介: 司亮(1980-), 女, 山东维县人, 硕士, 研究实习员, 主要从事组织培养和植物基因工程研究。E-mail: siliang7698192@163.com。

[3] 王朋, 刘丹, 梁文举. 微生物肥料对绿色食品蔬菜品质的影响[J]. 农业环境保护, 2002, 21(6): 562.

[4] 陈华葵. 土壤微生物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981.

[5] 周吉奎, 胡岳华, 邱冠周. 硅酸盐细菌在矿物工程领域应用研究进展[J]. 金属矿山, 2002(1): 26-28.

[6] 李明, 张灼, 樊竹青. 硅酸盐细菌 JF88 菌株选育的研究[J]. 云南师范大学学报, 2001(3): 58-61.

[7] 黄昭贤, 彭盛德, 杨雪梅, 等. 硅酸盐细菌的研究现状及展望[J]. 世界农业, 1998(5): 28-31.

[8] 王平宇, 张树华. 硅酸盐细菌的分离及生理生化特性的鉴定[J]. 南昌航空工业学院学报, 2001(6): 78-82.

[9] 李凤汀, 郝正然, 杨则璠. 硅酸盐细菌 HM8841 菌株解钾作用的研究[J]. 微生物学报, 1997, 37(1): 79-81.

[10] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 135-136.

1.2.2 不同培养基与不同浓度 BA 对匍匐茎茎尖诱导分化的影响 分别以 MS、1/2MS 和 1/3MS 为基本培养基,其中添加不同浓度的 BA,用以研究不同的培养基与不同浓度 BA 对茎尖诱导分化的影响。蔗糖浓度为 3.0%,琼脂 5.0 g·L⁻¹,pH=5.8,培养温度(24±2)℃,光强 1 500 lx,光照时间 12 h·d⁻¹,每种激素组合接种 5 瓶,每瓶 4 个外植体,定期观察外植体,30 d 后调查外植体的诱导率。

1.2.3 不同配比激素对绿色小体(GGB)增殖和孢子体诱导的影响 将直径约为 0.5 cm 的 GGB 接种到含有不同浓度 BA 和 NAA 的 MS 培养基中,每个组合接种 50 个 GGB,30 d 后调查平均增殖倍数和孢子体分化率,培养条件如 1.2.2。

1.2.4 无菌苗的生根诱导 选取生长健壮,高 3~5 cm 的无菌苗进行生根试验。基本培养基为 MS,添加不同浓度的 NAA 和活性炭,20 d 后对无菌苗根的诱导情况和生长状态进行观察。除蔗糖浓度为 2.0%,其它培养条件如 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 不同培养基与不同浓度 BA 对匍匐茎茎尖诱导分化的影响

将匍匐茎茎尖接种到添加不同浓度 BA 的 MS、1/2MS 和 1/3MS 培养基中,5~9 d 后茎尖开始萌动,15~30 d 后可形成配子体或绿色小体(GGB)。绿色小体是类似兰花圆球茎的绿色球状体(Green Globular Bodies,GGB),是蕨类植物中特有的结构。实验结果显示,不同培养基中,茎尖的分化情况是不同的,添加 BA 的 MS 培养基中茎尖形成绿色小体,在 1/2MS、1/3MS 培养基中,茎尖不经过 GGB 阶段直接分化形成配子体,说明不同的 MS 培养基浓度对茎尖的诱导方向起到重要的作用;BA 可促进茎尖的诱导分化,不同浓度 BA 的诱导率有差异。在 MS+BA0.7 mg·L⁻¹ 培养基中 GGB 的诱导率最高,可达到 95%;在 1/2MS+BA0.7 培养基中配子体的诱导率最高,为 75%(见表 1)。

2.2 不同配比激素对 GGB 增殖和孢子体诱导的影响

将直径约 0.5 cm 的 GGB 接种到不同激素配比的 MS 培养基上。经过 30 d 后观察,结果表明,BA 浓度不变,NAA 的浓度升高,孢子体分化率升高,在 MS+BA0.7 mg·L⁻¹+NAA0.7 mg·L⁻¹ 培养基中分化率达到最大值 82%,继续增加 NAA 浓度,孢子体的分化率反而下降;随着 NAA 浓度增大,GGB 的平均增殖倍数略有减低,同时还观察到在只含有 BA 的 MS 培养基中,GGB 的平均增殖倍数最高,为 5.3,且几乎没有孢子体分化的现象,这说明,BA 在 GGB 的增殖过程中起到关键性作用,适量的 NAA 促进 GGB 孢子体的诱导,

但浓度不易过大,以 NAA 为 0.7 mg·L⁻¹ 时最适宜(见表 2)。所以,适宜 GGB 增殖的培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹,适宜孢子体诱导培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹+NAA0.7 mg·L⁻¹。

表 1 不同培养基与 BA 对茎尖诱导分化的影响

培养基 /mg·L ⁻¹	接种外植 体数	萌发时间 /d	诱导 GGB 个数	诱导原 叶体数	诱导率 /%
MS+BA0.3	20	6	14		70
1/2MS+BA0.3	20	5		14	70
1/3MS+BA0.3	20	8		11	55
MS+BA0.7	20	6	19		95
1/2MS+BA0.7	20	6		15	75
1/3MS+BA0.7	20	8		13	65
MS+BA1.0	20	7	16		80
1/2MS+BA1.0	20	7		12	60
1/3MS+BA1.0	20	9		12	60

注:1/2MS、1/3MS 分别为大量、有机、微量和铁盐均减为 1/2 和 1/3。

表 2 不同配比激素对 GGB 增殖和孢子体诱导的影响

培养基 /mg·L ⁻¹	接种 GGB 数	GGB 平均平均增殖 增殖系数	孢子 体数	分化率 /%	
MS+BA0.7	50	267	5.3	0	0
MS+BA0.7+NAA0.1	50	250	5.0	24	48
MS+BA0.7+NAA0.5	50	237	4.7	36	72
MS+BA0.7+NAA0.7	50	222	4.4	41	82
MS+BA0.7+NAA1.0	50	240	4.8	37	74

2.3 无菌苗的生根诱导

选取 3~5 cm 以上健壮的单棵无菌苗进行生根试验,20 d 后对其试验结果进行调查。结果表明,无菌苗在每种培养基中的生根率均可达到 100%,不添加激素的 MS 也可以诱导生根。但在添加了活性炭的培养基中无菌苗和根的生长状态更好。无菌苗在 NAA 为 0.2 mg·L⁻¹ 和 0.5 mg·L⁻¹ 培养基中根的生长状况好,粗、长且根毛多,无菌苗长势佳,易于移栽(见表 4),从成本和生根壮苗效果综合比较,选择 MS+NAA0.2 mg·L⁻¹+0.1%Ac 为无菌苗生根壮苗的适宜培养基。

2.4 无菌苗的移栽

选取根长 3.0~5.0 cm,苗高 4.0~5.0 cm 的健壮无菌苗进行驯化移栽。先将培养瓶在温室内适当遮荫的自然光下炼苗 15 d 后进行移栽。用镊子取出无菌苗,洗去根部粘连的培养基,移入泥炭和蛭石 1:1 的无土栽培基质中,加盖塑料薄膜和遮荫网,使空气湿度维持在 80%以上,并避免直射阳光,30 d 后可移栽上钵,驯化率可达 90%以上。

表3 组培苗的生根诱导

培养基/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	发根率/%	根形态	组培苗长势
MS+NAA0.5+0.1% Ac	100	5~9条,粗、长、根毛多	最好,深绿色
MS+NAA0.2+0.1% Ac	100	5~8条,粗、长、根毛多	最好,深绿色
MS+NAA0.1+0.1% Ac	100	4~7条,粗、长、根毛多	最好,深绿色
MS+NAA0.5	100	5~10条,细、长、根毛少	一般,黄绿色
MS+NAA0.2	100	4~8条,细、长、根毛少	较好,黄绿色
MS+NAA0.1	100	4~6条,细、长、根毛少	较好,黄绿色
MS	100	4~6条,细、长、根毛少	较好,黄绿色

3 讨论

试验中发现在 MS 培养基中只添加 BA, GGB 大量增殖且很少有孢子体产生; BA 和 NAA 配合使用时, 可以对 GGB 的孢子体起到很好的诱导作用, 分化率可达到 82%, 说明 BA 对波斯顿蕨 GGB 的增殖起到了非常关键的作用; NAA 则是孢子体诱导的必要因素, NAA 对波斯顿蕨根的诱导效果颇佳, 无菌苗生长健康, 根系发达。在培养基中添加适量的活性炭则有助于苗的生长, 提高根的质量, 更适合于移栽, 这与林德钦等^[3]的研究是一致的, 但其具体作用机制还有待于进一步研究。

蕨类植物的离体培养技术已有了很多研究报告^[3-5], 肾蕨离体培养技术也有了一些报道^[6-7], 研究多用孢子进行无菌繁殖。本试验以匍匐茎茎尖为外植体具有易于取材, 不伤母株, 不影响其观赏性等优点。植物组织培养过程中, 培养基和激素浓度配比的筛选是非常重要的, 植物组织细胞脱分化与分化是一个很复杂的生理生化过程。培养基的浓度和激素的种类、比

例及它们之间的相互作用会直接影响到外植体的脱分化和分化过程, 本研究通过试验筛选确立了适于肾蕨离体再生的培养基和激素配比, 建立了一套比较完善的肾蕨离体培养体系, 以期 为肾蕨的规模化生产提供一定的理论依据。

参考文献:

[1] 吴北洪, 秦仁昌. 中国蕨类植物科属志[M]. 北京: 科学技术出版社, 1991: 4-7.

[2] 邵莉楣. 观赏蕨类的栽培与用途[M]. 北京: 金盾出版社, 1994.

[3] 林德钦, 张文珠, 郑国华. 铁线蕨的离体快速繁殖[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(增刊): 99-101.

[4] 彭晓明, 曾宋君. 铁线蕨的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 575.

[5] 曾宋君, 关丽. 波士顿蕨的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(3): 198-200.

[6] 程磊, 浦冰洁, 周根余. 若干理化因子对日本肾蕨绿色球状体分化及生长的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2001, 9(2): 142-148.

[7] 金建平, 兰涛, 顾嫒等. 皱叶肾蕨卷曲叶尖的离体培养[J]. 植物生理学通讯, 1992(5): 359-360.

欢迎订阅《甘肃农业科技》

《甘肃农业科技》是甘肃省农业科学院和甘肃省农学会共同主办, 面向国内外公开发行的综合性农业科技期刊。1989 年起被《中文科技期刊数据库》收录, 1996 年起被《中国学术期刊》(光盘版)全文收录, 2000 年被《中国核心期刊(遴选)数据库》收录, 2003 年入选《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》统计源期刊和《中国期刊全文数据库(CJFD)》全文收录期刊。1989、1996 年分别获中国农口学会首届、第二届优秀期刊奖, 1997 年获第二届全国优秀科技期刊评比三等奖, 2002 年获第三届全国优秀农业期刊二等奖, 2004 年获第四届全国优秀农业期刊二等奖, 2008 年被评为甘肃省优秀期刊。本刊主要报道农作物遗传育种、耕作栽培、旱地农业、园艺、土壤肥料、植物保护、畜牧养殖、农产品贮藏加工等学科的新成果、学术论文、实用新技术、国内外农业科技信息等。本刊立足甘肃, 面向全国, 以促进科技进步、服务科教兴农为宗旨, 坚持理论与实际结合、学术与技术并重、普及与提高兼顾的办刊方针, 突出西北地方特色和报道的科学性、先进性、实用性、知识性及可读性, 给广大读者奉献上最新农业科研成果、现代农业科学技术和经济技术信息, 适宜农业科研工作者、农技推广人员、农业管理干部、农业院校师生、农村科技骨干和农民技术员阅读参考。

本刊为月刊, 每月 20 日出版, A4 标准开本, 64 页, 胶版印刷, 彩色四封, 2010 年每期定价 4.00 元, 全年 48.00 元, 邮发代号 54-8。2010 年征订工作已经开始, 欢迎新老读者在当地邮局(邮电所)订阅, 也可汇款到《甘肃农业科技》编辑部订阅。

地 址: 兰州市安宁区农科院新村 1 号《甘肃农业科技》编辑部

联系电话: (0931)7614739, 7414994

E-mail: gsbianjibu@163.com, gsbianjibu@126.com

邮政编码: 730070

传真: (0931)7611630