

光亮瘤蕨(*Phynatodes cuspidatus*)离体培养 微繁殖技术研究

管菊¹, 万劲², 陈嘉裔³

(1. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224; 2. 三江学院 建筑学院, 江苏 南京 210012;
3. 东南大学 成贤学院, 江苏 南京 210088)

摘要:为保护光亮瘤蕨野生资源, 并进行合理的开发和利用, 以光亮瘤蕨的孢子为外植体, 建立快繁体系。结果表明:光亮瘤蕨孢子最佳灭菌方式为 HgCl_2 处理 3 min, 最适孢子萌发培养基为 $1/2\text{MS}+1\%$ 蔗糖。增殖期间, 最适增殖培养基为 $1/2\text{MS}+1\%$ 蔗糖。以 $1/2\text{MS}+2\%$ 蔗糖为培养基, 采用转接继代法诱导孢子为最佳孢子体诱导方法。待幼孢子体长至 2~3 cm 时即可出瓶炼苗。

关键词:光亮瘤蕨; 孢子; 离体培养微繁殖

中图分类号:S682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)05-0105-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.05.0105

光亮瘤蕨(*Phynatodes cuspidatus*)是水龙骨科瘤蕨属植物, 为大型附生蕨, 生于海拔 500~2 000 m 的常绿阔叶林下或生岩石上, 常见于石灰岩地区, 分布于我国云南、广西、广东等地, 越南、老挝、缅甸等亦有。光亮瘤蕨集药用及观赏为一身, 具有很高的开发应用价值。在药用方面, 它是一种传统中药材, 其根状茎可入药, 药名“猪毛蕨”, 具有活血止痛、接骨消肿等功效, 主治跌打损伤、骨折、腰腿痛、无名肿毒等病症^[1]。在观赏方面, 其叶片宽大整齐, 根状茎粗壮如指, 既可观叶也可观茎, 又因其具有耐阴性强、相对耐旱以及养护简单的优点, 极适宜于做室内大型绿植盆栽, 亦可庭园景观营造中绑扎作垂直绿化, 别有韵味^[2]。

由于野生资源日益减少, 利用其孢子采用组织培养的方法进行繁殖、建立快繁体系, 不仅对于保护光亮瘤蕨野生资源不受破坏, 合理进行开发、利用光亮瘤蕨有着重要的意义, 同时也对促进可持续发展、保持生物多样性及维护生态平衡具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

光亮瘤蕨孢子采自云南省昆明市金殿蕨类植物园, 采集日期 2013 年 10 月, 采集后放置于 4℃ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 本试验培养基以 MS、 $1/2\text{MS}$ 为基本成分, 分别附加 0.4% 的 $1\,500\text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 强度卡拉胶以及不同浓度的蔗糖, 调整 pH 在 5.8~6.0, 于 121℃ 高压灭菌锅中灭菌 15 min。使用日本三洋 MLR-351H 型人工可控气候箱进行培养, 光照度设定为 3 000 lx, 每日光照时长 18 h, 培养温度恒定 25℃, 培养湿度恒定 80%。

1.2.2 孢子的预处理 为使孢子消毒取得更好效果, 首先对孢子进行预处理, 使孢子被水充分浸润, 并进一步去杂, 具体预处理方法为:称取 1 mg 供试孢子, 置于 5 mL 离心管内, 滴入无菌水, 充分振荡后以 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 弃去上清液, 重复 2 次, 至上清液无肉眼可见杂质后, 再次充分振荡, 得到的即纯度较高的孢子悬浊液, 备用。

1.2.3 孢子的消毒 使用一次性无菌滴管吸取 1 mL 孢子悬浊液, 滴入滤纸叠成的纸包内, 置于 75% 的酒精中浸泡约 15 s, 无菌蒸馏水清洗 2 次, 再用 0.1% 的 HgCl_2 (使用前添加 1~2 滴吐温-80) 或 5% 的 NaClO 浸泡消毒, 设置 30 s 和 1、3、5 min 时长的消毒处理。浸泡消毒后, 用无菌水清洗 5~6 次, 清洗总时长不少于 5 min, 然后用滴管吸取滤纸袋内的孢子悬浊液, 滴于 $1/2\text{MS}+10\%$ 蔗糖培养基中, 轻轻摇晃, 使悬浮液均匀分布于培养基上。试验每个处理接种 6 瓶, 4 次重复。接种后每日取样, 使用显微镜对孢子萌发进行镜检, 使用 Nikon ECLIPSE Ti 倒置显微镜进行拍照记录, 5 d 后对污染率进行调查, 20 d 后统计孢

收稿日期:2017-03-11

基金项目:西南林业大学科技创新资助项目(C16051)

第一作者简介:管菊(1991-), 女, 云南省宣威市人, 在读硕士, 从事观赏植物繁殖与栽培研究。E-mail: 630958865@qq.com。

子萌发率。

孢子萌发率检测方法为随机镜检,随机抽取处理组中 4 瓶,以 100 倍的放大倍数,在每瓶内随机选择 4 个视野进行观察,对视野内孢子进行萌发率统计,以出现绿色配子体细胞作为萌发标准。

1.2.4 孢子萌发培养 将孢子悬浊液按先前得出的最适消毒方法进行处理,处理后分别接种于不同培养基基础成分以及不同蔗糖含量的培养基中,培养条件同上,每个处理 20 瓶,3 次重复。

接种 7 d 后,每隔 2 d 观察和记录配子体的生长发育状况情况,30 d 后结束调查。

1.2.5 增殖培养 将原叶体充分分散成单个个体,挑选出其中长势良好、大小相近的原叶体个体,分别接种于不同培养基中进行增殖培养。使用不同培养基成分、不同蔗糖含量、不同 pH 的组合对原叶体进行增殖培养,试验采用 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计。每瓶培养基接原叶体 10 棵,每种培养基接 20 瓶,重复 3 次,为方便数据统计,在接种时原叶体个体之间均需保留一定距离,均匀分布于培养基上。

接种 7 d 后开始观察并记录生长状况,观察记录原叶体长势、增殖状况,60 d 后对原叶体长势、增殖倍数进行统计分析。

表 1 不同消毒方法、消毒时间对光亮瘤蕨孢子成活率的影响

Table 1 Effect of different time of disinfection method and time on spore survival rate of *Phyatodes cuspidatus*

试验号 No.	消毒方式 Disinfection method	使用浓度/% Use concentration	消毒时间/min Disinfection time	污染率/% Contamination rate	萌发率/% Germinationrate
1	HgCl ₂	0.1	1	100.00	0
2	HgCl ₂	0.1	3	37.50	73.58
3	HgCl ₂	0.1	5	8.33	13.52
4	HgCl ₂	0.1	8	4.17	0
5	NaClO	5	1	100.00	0
6	NaClO	5	3	41.67	80.58
7	NaClO	5	5	20.83	74.52
8	NaClO	5	8	12.50	55.43

但本试验在后续培养中,发现经次氯酸钠灭菌的光亮瘤蕨试验组均存在原叶体被藻类、苔藓污染的现象,而升汞灭菌处理的光亮瘤蕨试验组相比此类污染现象发生率则小很多。由于藻类、苔藓生长迅速,且附着于原叶体或原叶体的假根之上,在继代过程中无法彻底清除,致使经常出现继代后藻类、苔藓的爆发性繁殖,原叶体成批死

1.2.6 幼孢子体诱导 根据已有文献报道,光亮瘤蕨配子体增殖过程中会出现原叶体不断增殖,但无法产生孢子体的现象^[3],故本试验中采用:1)喷洒无菌水、振荡培养诱导孢子体;2)使用增殖培养基配方,每隔 45 d 持续不断继代培养诱导孢子体自然生成,两种不同手段对孢子体进行诱导。

1.2.7 炼苗与移栽 当幼孢子体长至 2~3 cm 生长健壮时进行驯化移栽。首先在培养室半开瓶盖放置 3 d,然后用镊子从瓶内取出植株,用自来水冲洗净附着在根部的培养基,移栽到基质中,置于光照培养箱中培养,设定培养温度 25 ℃,光照 12 h,湿度 90%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对外植体成活率的影响

由表 1 可知,随着 HgCl₂、NaClO 消毒时间的增加,污染率均大幅降低,说明 HgCl₂、NaClO 对于孢子表面所携带的细菌、真菌等具有较好的灭杀效果。但随着消毒时间的延长,孢子的萌发活性也会受到影响,尤其是 HgCl₂处理组,处理时间超过 3 min 后,孢子萌发率就大幅度下降。根据试验数据可得,75%的酒精处理 15 s 后,再用 5% NaClO 处理 3 min,污染率最低、孢子萌发率最高。

亡,这对于离体培养微繁殖来说,问题是极为严重的。所以,一方面,说明今后在取孢子材料时,需要尽可能选择周边无苔藓、藻类生长的植株叶片,以减少藻类、苔藓污染的问题出现。另一方面,也说明在本试验灭菌过程中若使用次氯酸钠则较难在不损伤试验材料的同时对其它生物体完全有效灭杀。

综合试验数据以及以上存在的问题来看,75%的酒精处理 15 s 后,HgCl₂灭菌 3 min 相比 NaClO 灭菌 3 min 虽然孢子萌发率相比较低,但是可以更加有效地杀灭藻类、苔藓等其它生物体,取得更为满意的消毒效果,故为光亮瘤蕨孢子的最佳消毒方法。

2.2 不同浓度无机盐及糖浓度对孢子萌发及原叶体形成的影响

7 d 后显微镜下即可观察到孢子大量萌发,并逐渐形成丝状体和片状体,30 d 后可形成直径 0.2 cm 左右的原叶体,具体萌发率见表 2,萌发率与 MS 盐浓度及蔗糖浓度的相关系数见表 3。

表 2 不同无机盐浓度及蔗糖浓度下的孢子萌发情况

Table 2 The spore germination under different concentration of inorganic salt and sucrose of *Phyatodes cuspidatus*

试验号 No.	培养基成分 Medium composition	萌发率/% Germination rate	配子体生长情况 Growth of the gametophyte
1	MS+0%蔗糖	65.72	绿色绒状体+
2	1/2MS+0%蔗糖	73.53	绿色绒状体+
3	MS+1%蔗糖	65.93	绿色绒状体++
4	1/2MS+1%蔗糖	73.48	绿色绒状体++++
5	MS+2%蔗糖	66.01	绿色绒状体+++
6	1/2MS+2%蔗糖	73.33	绿色绒状体++++
7	MS+3%蔗糖	65.85	绿色绒状体++
8	1/2MS+3%蔗糖	72.98	绿色绒状体+++

+号代表配子体生长量,数量越多表示生长量越大。
+ represents the amount of gametophyte growth,the greater the number of growth.

表 3 光亮瘤蕨萌发率与 MS 盐浓度及蔗糖浓度的相关系数

Table 3 Correlation coefficient of germination rate to MS salt concentration and sucrose of *Phyatodes cuspidatus*

项目 Items	MS 盐浓度 MS concentration	蔗糖浓度 Sucrose concentration
萌发率 Germinationrate	-0.999**	-0.020

**表示在 0.01 水平上极显著相关
** indicates extremelysignificant difference at the 0.01 level

在本试验梯度下,经数据分析可知,光亮瘤蕨孢子萌发主要与无机盐浓度高低有关,而与糖浓度基本没有关联,较低的无机盐水平有利于孢子的萌发,1/2MS 培养基为孢子萌发最适培养基。光亮瘤蕨孢子萌发后,糖浓度与无机盐浓度均对其生长均有一定影响,萌发后的孢子在不加糖的培养基上难以生长或生长近于停滞,1/2MS+1%蔗糖培养基培养下绿色绒状体数量最多,最适于孢子萌发生长。

2.3 不同浓度无机盐、糖浓度及 pH 对原叶体增殖的影响

不同浓度无机盐及糖浓度下原叶体增殖的具体情况见表 4。在原叶体增殖阶段,低盐分、低浓度蔗糖更加适宜原叶体的增殖生长。原叶体在高糖环境下,虽然增殖倍数也较高,但自身体积变小,且出现团块状生长、相互之间无法分离,这对于今后原叶体的转接扩增、幼孢子体的形成都是极为不利的。1/2MS+1%蔗糖的 4 号培养基为原叶体增殖最适培养基,在该配方下,原叶体无性增殖数量多,且原叶体个体形态较大、相互间质地疏松可分开,有利于原叶体的转接扩增以及幼孢子体的诱导。不同培养基成分、蔗糖浓度、pH 与增殖倍数相关系数见表 5,由表可知,培养基基本成分与增殖倍数成极显著相关、糖浓度关联度次之,而在本试验设置的 pH 区间内原叶体的增殖几乎不受其影响。

2.4 孢子体诱导

2.4.1 滴加无菌水、振荡培养对孢子体诱导的影响 由表 6 可以看出,各处理组均无幼孢子体产生,说明滴加无菌水、振荡培养在短期内对孢子体的诱导也没有显著作用。滴加无菌水、振荡培养可以确保精子游动并进行受精作用,在此条件下光亮瘤蕨孢子体仍未发生,说明其孢子体诱导困难可能并非是培养环境没有流动的水造成的。

2.4.2 转接继代诱导法对孢子体诱导的影响 使用转接继代法在经过 11 个月、7 次转接继代后,第一株孢子体出现,说明通过不断转接继代可以诱导出孢子体,此时再将原叶体转接于不同培养基内进行边增殖边诱导的培养。由表 7 可以看出,由于孢子体诱导受原叶体增殖数量、孢子体诱导率等多方面原因影响,单一统计某一数据无法

表 4 60 d 后不同无机盐浓度及糖浓度下原叶体增殖生长情况

Table 4 The proliferation growth under different concentration of inorganic salt and sugar of *Phynatodes cuspidatus* after 60 days

试验号 No.	试验方案 Test scheme	原叶体状态 Prothallium state	原叶体之间相互关系 Relation between prothallium	原叶体增殖系数 Multiplication coefficient
1	MS,1%蔗糖,pH5.8	颜色墨绿,质地偏厚	散状向四周生长,可相互分开	15.58
2	MS,2%蔗糖,pH6.0	颜色墨绿,质地偏厚	有团块状生长趋势,相互松散,可分开	16.02
3	MS,3%蔗糖,pH6.2	颜色墨绿,质地偏厚	团块状生长,相互紧密,无法分开	16.12
4	1/2MS,1%蔗糖,pH6.0	颜色鲜绿,质地正常	散状向四周生长,可相互分开	21.32
5	1/2MS,2%蔗糖,pH6.2	颜色鲜绿,质地正常	有团块状生长趋势,相互松散,可分开	26.54
6	1/2MS,3%蔗糖,pH5.8	颜色鲜绿,质地正常	团块状生长,相互紧密,无法分开	27.55
7	1/4MS,1%蔗糖,pH6.2	颜色泛黄,质地薄软	散状向四周生长,可相互分开	4.02
8	1/4MS,2%蔗糖,pH5.8	颜色泛黄,质地薄软	散状向四周生长,可相互分开	4.68
9	1/4MS,3%蔗糖,pH6.0	颜色泛黄,质地薄软	散状向四周生长,可相互分开	4.75

表 5 光亮瘤蕨增殖倍数与 MS 盐浓度及蔗糖浓度的相关系数

Table 5 Correlation coefficient of germination rate to MS salt concentration and sucrose of *Phynatodes cuspidatus*

分析项目 Analysis project	MS 盐浓度 MS concentration	蔗糖浓度 Sucrose concentration	pH
增殖倍数 Proliferation multiple	0.681*	0.058	-0.021

* 表示在 0.05 水平上显著相关

* indicates an extremely significant correlation at the 0.05 level

表 6 不同无菌水添加量、培养方式下 45 d 孢子体诱导情况

Table 6 The sporophyte induction under the different concentration of sterile water and cultivating way after 45 days

试验号 No.	无菌水滴加量/mL Water content	培养方式 Training mode	孢子体诱导数量 Spore induction
1	0	静置培养	0
2	0	振荡培养	0
3	5	静置培养	0
4	5	振荡培养	0
5	10	静置培养	0
6	10	振荡培养	0

反映实际生长情况,故统计采用粗略的观测法进行。原叶体在不加糖的培养基中生长停滞并逐步枯萎死亡;1/2MS+1%糖培养基中虽然原叶体增殖速度较快,但孢子体诱导量并不高;3%培养基内由于原叶体出现团块状生长,致使原叶体数量较少,孢子体诱导数量也相应较少;1/2MS+2%蔗糖的培养基中孢子体诱导数量最多且孢子体长势较好。

表 7 不同糖浓度下孢子体诱导情况

Table 7 The sporophyte induction under the different concentration of sucrose

试验号 No.	培养基成分 Medium composition	孢子体诱导数量 Spore induction	孢子体长势 Spore growth
1	1/2MS+0%蔗糖	无	-
2	1/2MS+1%蔗糖	+	长势弱,叶片发黄
3	1/2MS+2%蔗糖	++	长势旺盛
4	1/2MS+3%蔗糖	+	长势旺盛

+代表孢子体数量多少。

+ represents the number of sporophyte.

2.5 炼苗与移栽

如图 1 所示,待幼孢子体长至 2~3 cm 时开始进行出瓶炼苗。由于出瓶时孢子体已有根系长出,植株具备了完整的根、茎、叶结构,炼苗较为容易,期间注意喷水、遮荫和保温即可。



图 1 光亮瘤蕨生长过程
Fig. 1 *Phynatodes cuspidatus* growth process

3 结论与讨论

本试验在诱导孢子体过程中通过转接继代法成功诱导法出光亮瘤蕨孢子体,与郭红娟^[3]此前认为的光亮瘤蕨无法诱导孢子体观点不一致。但是,本试验中光亮瘤蕨孢子体的诱导起步时间长达 11 个月,这明显长于常规蕨类植物^[4-6]的诱导时间,且试验中已尝试了在短期内通过滴加无菌水、振荡培养等促进诱导手段,均收效甚微,这具体是什么因素造成的,还有待深入研究。

在蕨类植物微繁殖增殖手法方面,根据文献报道以及前期的试验工作发现,由于不同的蕨类在微繁殖过程中状况差异很大,故需视情况决定具体增殖手法,如采用配子体增殖^[7]、采用诱导愈伤分化丛生芽^[8]、采用诱导 GGB 分化丛生芽^[9-10]等。而本试验中的光亮瘤蕨,属于配子体可增殖、孢子体较难瓶内诱导的蕨类,同时又具有自第一株孢子体产生后,其它孢子体相继不断产生,且孢子体产生同时配子体仍在不断增殖的独特现象,故在操作时采用了边增殖边诱导、边炼苗边继代的方法,将发育较好的幼孢子体取出炼苗,其它部分继续转接,即取得良好增殖效果。而光亮瘤蕨

繁殖过程中是否也可以通过添加 NAA、BA 等外源激素于培养基内,诱导产生愈伤、GGB 等组织来进行扩繁,这一途径是否会优于目前增殖手法,也有待做进一步的研究。

参考文献:

[1] 丁恒山. 中国药用孢子植物[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982.

[2] 石雷. 观赏蕨类[M]. 北京:中国林业出版社,2002.

[3] 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]. 桂林:广西师范大学,2010.

[4] 刘功梅. 团叶鳞始蕨繁殖技术研究[D]. 北京:中国农业科学院,2009.

[5] 吴芹. 几种观赏蕨类植物的繁殖技术研究[D]. 南京:南京林业大学,2007.

[6] 徐艳,石雷,刘艳,等. 白玉凤尾蕨孢子繁殖技术的研究[J]. 园艺学报,2005,32(4): 658-662.

[7] 刘瑞林,佟立君,王绪,等. 蕨类原叶体组织培养及植株再生[J]. 中国林副特产,2006(3):12.

[8] 耿明清. 兔脚蕨组织培养[J]. 辽宁师专学报,2011,13(4): 101-102.

[9] 潘晓韵,沈晓岚,朱开元,等. 鸟巢蕨的组培快繁技术[J]. 浙江农业科学,2014(7): 1049-1050,1053.

[10] 王森,孙丽娜,吴春华,等. 东北蕨菜的 GGB 组培移栽技术及驯化[J]. 园艺与种苗,2016(1): 27-29.

Research on Micropropagation of *Phynatodes cuspidatus*

GUAN Ju¹, WAN Jin², CHEN Jia-yi³

(1. Faculty of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Faculty of Architectural, Sanjiang University, Nanjing, Jiangsu 210012; 3. Chengxian College of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210088)

Abstract: In order to protect the fern wild resources of *Phynatodes cuspidatus*, and to make reasonable development and use, taking the spores of *Phynatodes cuspidatus* as explants, the rapid propagation system was established. The results showed that the best sterilization time of the spores of *Phynatodes cuspidatus* for HgCl₂ was 3 min, the optimum spore germination medium was 1/2MS+1% sucrose. During the proliferation period, the optimal proliferation medium was 1/2MS+1% sucrose. During the induction period, 1/2MS+2% sucrose was the most suitable sporophytic induction medium, transfer subculture was the best way. When the young sporophytes grew to 2~3 cm, it was training seedling.

Keywords: *Phynatodes cuspidatus*; spore; in vitro micropropagation