

# 扇蕨绿色小球体的诱导和植株再生

葛佳<sup>1</sup>, 路程<sup>1</sup>, 伍丹丹<sup>1</sup>, 张光飞<sup>1,2</sup>, 苏文华<sup>1,2</sup>

(1. 云南大学 生命科学院生态学系 云南 昆明 650091; 2. 云南大学 生态学与地植物学研究所, 云南 昆明 650091)

**摘要:**以扇蕨(*Neocheiropteris palmatopedata*)茎尖为试验材料,通过组织培养技术,进行了绿色小球(GGB)的诱导和植株再生试验。结果表明: $B_5+6-BA$  1.0 mg/L+ $NAA$  0.5 mg/L(蔗糖2%)适合于诱导绿色小球(GGB);适合于绿色小球的增殖培养基是 $B_5+6-BA$  0.5 mg/L+ $NAA$  0.5 mg/L(蔗糖2%)和 $B_5+6-BA$  0.5 mg/L+ $NAA$  0.2 mg/L(蔗糖2%);适合于芽生长的培养基是 $B_5+NAA$  0.1 mg/L+活性碳 1 g/L(蔗糖2%)和 $B_5+NAA$  0.2 mg/L+活性碳 1 g/L(蔗糖2%); $1/2B_5+NAA$  0.5 mg/L(蔗糖2%)培养基适合于诱导生根,生根率可达100%。

**关键词:**扇蕨;茎尖(shoot tip);绿色小球(GGB);组织培养

**中图分类号:** Q 949. 36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)01—0159—04

扇蕨 [*Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ], 属水龙骨科(Polypodiaceae)扇蕨属(*Neocheiropteris* Christ)草本植物。为中国特产的蕨类植物,仅分布于云南、贵州和四川,通常生长在海拔1 500~2 700 m的密林下、山崖林下。它既可作为观赏植物<sup>[1]</sup>,也是一种常用的中草药,其根状茎有解毒、消肿祛湿之效<sup>[2]</sup>。由于其形态奇特,对蕨类植物系统发育方面的研究有重要价值,在1999年国务院正式公布的“国家重点保护野生植物名录(第1批)”中被列为国家二级保护植物<sup>[3]</sup>。

蕨类植物的繁殖方式主要包括两大类,即有性繁殖和无性繁殖。利用现代生物技术进行组织培养和快速繁殖是目前解决特殊和珍稀濒危蕨类植物种类延续的常用繁殖手段,其方法途径可归纳为3类:利用外植体(茎、叶器官)先诱导出愈伤组织,经过再分化作用,最终获得完整的幼小植物个体;利用外植体(主要是茎)直接诱导培养而获得幼小植物个体;用外植体(茎、叶器官均可)先诱导出绿色小球(gren globular bodies,简称GGB),类似于兰花的圆球茎,绿色小球再经过诱导培养获得完整的幼小植物个体<sup>[4]</sup>。第1类培养途径从愈伤组织再分化成芽较为困难,且繁殖倍率低;第2类培养途径虽

然较易获得新植株,但繁殖倍率低,较难获得大量的新植株;第3类培养途径虽然没有第2类获得新植株快,但是,一旦绿色小球(GGB)诱导获得成功,繁殖倍率就远超前2类培养途径,据研究报道,1个肾蕨根状茎尖经6个月培养可获16万棵试管苗<sup>[5]</sup>,经10个月培养,皱叶肾蕨从1个卷曲叶尖可得到100万株试管苗<sup>[6]</sup>。因此,GGB途径是一种高效率的能真正实现工厂化生产的有效途径。该试验通过扇蕨幼孢子体进行组织培养,直接诱导形成绿色小球(GGB)的快速繁殖途径的成功,对扇蕨的种质资源保护、回归引种和工厂化生产开辟了新的可能途径。为扇蕨的保护及物种繁殖和相关研究提供科学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养材料的获得

选取成熟的扇蕨孢子通过组织培养获得幼孢子体<sup>[7]</sup>。在无菌条件下,切去根和叶,留下茎芽备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 绿色小球(GGB)的诱导和继代培养** 不同诱导培养基的处理:将获得的扇蕨幼孢子体作为外植体平均分成4组,在无菌条件下接入(1)  $B_5+2\%$ 蔗糖+0.7%琼脂;(2)  $B_5+6-BA$  0.5 mg/L+ $NAA$  0.5 mg/L+2%蔗糖+0.7%琼脂(单位下同);(3)  $B_5+6-BA$  1.0+ $NAA$  0.5+2%蔗糖+0.7%琼脂;(4)  $B_5+6-BA$  2.0+ $NAA$  0.5+2%蔗糖+0.7%琼脂的诱导培养基中,每组4瓶,每瓶5个茎芽,每瓶为1个重复。绿色小球体(GGB)继代培养基:(2)、(3)、(4)、(5)  $B_5+6-BA$  0.5+ $NAA$  0.2+2%蔗糖+0.7%琼脂。

**1.2.2 丛生苗的诱导培养** 诱导丛生苗的培养基:将诱导出的绿色小球体(GGB)接种在(1);(6)  $B_5+NAA$  0.1+活性碳 1 g/L+2%蔗糖+0.7%琼脂;(7)  $B_5+$

**第一作者简介:** 葛佳(1986-),女,在读本科,研究方向为生态学。E-mail: gejia1225@hotmail.com.  
**通讯作者:** 张光飞(1966-),男,硕士,副教授,现主要从事蕨类植物学及生理生态学研究。E-mail: gzfzhang@ynu.edu.cn.  
**基金项目:** 国家大学生创新性实验计划资助项目(081067302);国家基础科学人才培养基金资助项目(J073652);教育部高等理工教育教学改革与实践项目(239);云南大学生命科学实验教学示范中心创新实验资助项目。  
**收稿日期:** 2009-09-20

NAA 0.2+活性碳 1 g/L+2%蔗糖+0.7%琼脂; (8) B<sub>5</sub>+NAA 0.5+活性碳 1 g/L+2%蔗糖+0.7%琼脂的培养基上。

1.2.3 生根培养 当丛生苗长到 0.8 cm 以上时, 分成小丛分别接种在不同激素浓度的培养基; (9) 1/2B<sub>5</sub>+NAA 0.2+2%蔗糖+0.7%琼脂; (10) 1/2B<sub>5</sub>+NAA 0.5+2%蔗糖+0.7%琼脂; (11) 1/2B<sub>5</sub>+NAA 1.0+2%蔗糖+0.7%琼脂的生根培养基中。(1)~(11)的 11 种培养基, 其 pH 值均为 5.8。

1.2.4 练苗和移栽 当生根培养基数达到一定数量时, 将生根苗从培养基中取出, 洗去根部的培养基, 移植于

人工基质(泥炭 1 份, 珍珠岩 1 份, 腐殖土 1 份)中, 浇透水, 置于空气湿润的塑料小棚内, 并适时喷水, 注意遮荫和保温, 观察其成活率。40~50 d 后, 丛生苗长至 3~5 cm 时, 就可移栽于口径为 10.5 cm 的小盆内, 需定时喷施叶面肥和适时喷水, 观察移栽成活率。

1.3 培养条件

室内培养温度为(25±2)℃, 日光灯光源, 光照强度为 20~30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间为 14 h/d。室外培养温度 12~25℃, 自然光源, 光照强度为 100~200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间为 12 h/d。

表 1 不同激素及其配比对扇蕨茎尖形成绿色小球(GGB)的影响

培养基/mg·L <sup>-1</sup>	培养茎尖数	形成 GGB 的茎尖数	诱导率/%	生长势及附属物
(1)B <sub>5</sub>	20	0	0	产生新芽, 不形成 GGB
(2)B <sub>5</sub> +6 BA 0.5+NAA 0.5	20	17	85	GGB 淡绿色, 蓬松, 有棕黄色绒毛
(3)B <sub>5</sub> +6 BA 1.0+NAA 0.5	20	20	100	GGB 绿色, 蓬松, 有淡棕黄色绒毛
(4)B <sub>5</sub> +6 BA 2.0+NAA 0.5	20	19	95	GGB 棕绿色, 紧密, 有棕黄色绒毛

2 结果与分析

2.1 B<sub>5</sub>培养基中不同激素及其配比对扇蕨茎尖形成绿色小球(GGB)的影响

培养基的激素配比以 B<sub>5</sub>+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的诱导率最高, 茎尖形成绿色小球(GGB)的百分率达 100%, 成绿色小球的生长旺盛, 绿色, 蓬松, 能自然散开成单个成绿色小球, 表面的附属物为淡棕黄色绒毛(见表 1 和图 1)。其次为 B<sub>5</sub>+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 和 B<sub>5</sub>+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 茎尖形成绿色小球(GGB)的百分率分别为 95%和 85%, 虽然前者的诱导率略高, 但是形成的绿色小球较紧密, 不易散开成独立的个体, 附属物均为棕黄色的绒毛。而不加激素的 B<sub>5</sub>培养基不能形成绿色小球(GGB), 但能长出新芽并形成新的幼小植株个体。

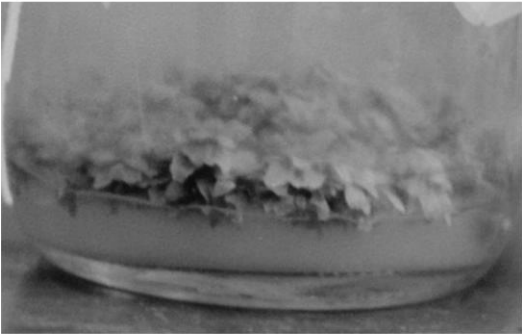


图 2 从绿色小球诱导出的丛生苗

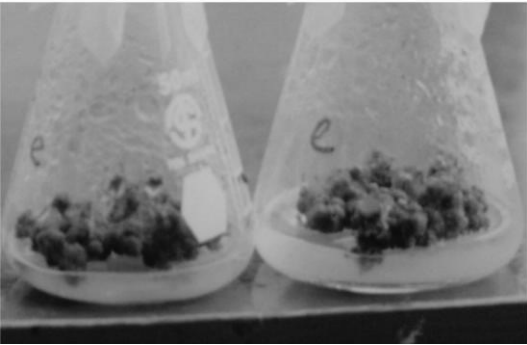


图 1 扇蕨绿色小球(GGB)

将获得的绿色小球(GGB)接种在继代培养基(2)、(3)、(4)和(5)上继代培养, 20 d 后又可获得大量的绿色小球。长势以(2)和(5)培养基为最好, 颜色深绿, 蓬松。

2.2 不同激素浓度对扇蕨丛生苗的影响

将绿色小球接种在(1)、(6)、(7)、(8)培养基上, 20~25 d 后开始长出小叶, 虽然在 4 种培养基上都能长出小叶(图 2), 但从表 2 中可以看出, 激素浓度是影响丛生苗长高的关键因素, 以处理(6)和(7)丛生苗平均高度最高, 远高于其它 2 个处理, 且植株健壮, 颜色翠绿, 处理(8)丛生苗较矮, 处理(1)最差, 其丛生苗矮小, 颜色淡绿, 生长势差, 无根产生。说明扇蕨绿色小球诱导丛生苗需要适量的生长素, 没有或过高均不利于丛生苗的诱导。

2.3 不同激素浓度对扇蕨丛生苗生根的影响

待丛生苗长到 0.8 cm 以上时, 分成小丛接种于生根培养基(9)、(10)、(11)上, 从表 3 可以看出, 激素浓度是影响丛生苗生根时间和生根数量的重要因素, 以处理(10)的生根时间最早, 生根数量最多, 且整齐, 植株健壮, 长势好(见图 3), 处理(11)次之, 处理(9)最差, 生根时间晚, 根的数量少, 呈黄棕色, 长势弱。可见, 扇蕨丛生苗诱导生根需要适量的生长素, 过低或过高均不利于丛生苗生根的诱导。

表 2 不同激素对扇蕨绿色小球 (GGB)形成丛生苗的影响

培养基/ mg ° L <sup>-1</sup>	接种数	成苗率/ %	幼苗平均高/ cm	生长势
(1)B <sub>5</sub>	100	100	0. 4	丛生苗淡绿色 矮小 无根
(6)B <sub>5</sub> + NAA 0. 1+活性碳 1. 0	100	100	1. 2	丛生苗深绿色, 个体高且壮 有少量根产生
(7)B <sub>5</sub> + NAA 0. 2+活性碳 1. 0	100	100	1. 3	丛生苗深绿色, 个体高且壮 有少量根产生
(8)B <sub>5</sub> + NAA 0. 5+活性碳 1. 0	100	100	0. 8	丛生苗绿色, 中等, 产生根

表 3 不同激素对扇蕨丛生苗生根的影响

培养基/ mg ° L <sup>-1</sup>	接种数	生根苗数/ 个	生根天数/ d	平均生根数/ 个	表现
(9)1/ 2B <sub>5</sub> + NAA 0. 2	100	100	17	3. 2	少, 黄棕色
(10)1/ 2B <sub>5</sub> + NAA 0. 5	100	100	15	5. 6	多, 呈放射状, 整齐, 棕色
(11)1/ 2B <sub>5</sub> + NAA 1. 0	100	100	16	4. 3	多, 呈放射状, 不整齐, 棕色

2.4 练苗和移栽

将生根苗从培养基中取出, 洗去根部的培养基, 移植于人工基质(泥炭 1 份, 珍珠岩 1 份, 腐殖土 1 份)中, 浇透水, 置于空气湿润的塑料小棚内, 并适时喷水, 注意遮荫和保温, 成活率可达 90%以上。40~50 d 后, 丛生苗长至 3~5 cm 时, 就可移栽于口径为 10. 5 cm 的小盆内, 此时若能定时喷施叶面肥和适时喷水, 小苗生长迅速, 移栽成活率可达 95%以上。



图 3 扇蕨的生根苗

3 讨论

蕨类植物的不同器官通过不同激素的培养基诱导, 能产生一些蓬松的绿色球状小体, 表面还有淡棕黄色的绒毛。这些球状小体的结构与愈伤组织不同, 类似于兰花的圆球茎, 它们可以发育出茎叶, 国外称之为 Green Globular Body (简写成 GGB)<sup>[5 8-10]</sup>, 国内翻译成“绿色小球”<sup>[9]</sup>。GGB 途径是一种高效率的能真正实现工厂化生产的有效途径。

不同激素配比扇蕨茎尖诱导分化绿色小球 (GGB) 的能力有不同的影响, 生长素和细胞分裂素以 6-BA 与 NAA 配合较好。细胞分裂素影响细胞分裂、顶端优势的变化和茎的分化等。试验结果表明, 6-BA 是诱导绿色小球的关键激素, 固定 NAA, 随着 6-BA 浓度的增加, 绿

色小球的诱导率呈不断增加的趋势。但是, 当 6-BA 浓度增加到一定浓度时, 诱导率反而下降, 说明过高的 6-BA 浓度也不利于扇蕨绿色小球的诱导。当然, 也许调整 NAA 的浓度又会有所改变, 还需进一步研究。

一定浓度范围内, NAA 对诱导扇蕨从绿色小球 (GGB)形成丛生苗和丛生苗生根具有促进作用。但 NAA 浓度不能太高, 在诱导从绿色小球 (GGB)到丛生苗的 NAA 浓度达到 0. 5 mg/L 时, 苗高受到抑制; 丛生苗诱导生根的 NAA 浓度达到 1. 0 mg/L 时, 虽然生根率没有下降, 但生根时间推迟, 生根数量减少, 且不整齐。结果表明, 扇蕨从绿色小球 (GGB)形成丛生苗和丛生苗生根需要适量的生长素, 没有、过低或过高均不利于丛生苗和生根苗的诱导。以 B<sub>5</sub>+NAA 0. 1 mg/L+活性碳 1 g/L 和 B<sub>5</sub>+NAA 0. 2 mg/L+活性碳 1 g/L 是较为理想的从扇蕨绿色小球 (GGB)诱导形成丛生苗的激素浓度; 1/ 2B<sub>5</sub>+NAA 0. 5 g/L 是扇蕨丛生苗诱导生根的理想激素浓度。

参考文献

[ 1 ] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[ M] . 6 卷 2 分册. 北京: 科学出版社, 2000: 32-35.

[ 2 ] 宋朝樞 徐荣章, 张清华. 中国珍稀濒危保护植物[ M] . 北京: 中国林业出版社, 1989: 19-20.

[ 3 ] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑《国家重点保护野生植物名录》(第 1 批)出台[ J] . 植物杂志, 1999(5): 3-4.

[ 4 ] 陆树刚 张光飞, 苏文华 等. 蕨类植物学[ M] . 北京: 高等教育出版社, 2007: 33-37.

[ 5 ] Higuchi H, Amaki W, Suzuki S. In vitro propagation of *Nephrolepis cordifolia* Presl[ J] . Scientia Hort., 1987, 32: 105-113.

[ 6 ] 金建平, 兰涛, 顾渊. 皱叶肾蕨卷曲叶尖的离体培养[ J] . 植物生理学通讯, 1992 28(5): 359-360.

[ 7 ] 张光飞 翟书华, 苏文华. 扇蕨孢子的组织培养[ J] . 植物生理学通讯, 2008, 44(4): 745-746.

[ 8 ] Higuchi H, Amaki W. Effects of 6-Benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through in vitro propagation[ J] . Scientia Hort., 1989, 37: 351-359.

[ 9 ] Hvorslef Fide A K. The effect of temperature, daylength and irradiance on the growth of mother plants of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and on the subsequent growth in vitro of runner tip explants[ J] . Scientia Hort., 1991, 47: 137-147.

[ 10 ] Femtidez H, Bertrand A, Sanchez-Tames R. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizome[ J] . Scientia Hort., 1997, 68: 243-247.

# 激素对菊花愈伤组织诱导和丛生芽分化的影响

袁成志<sup>1</sup>, 李 波<sup>1</sup>, 杨蔚然<sup>1</sup>, 朱崇梅<sup>2</sup>

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 克东县农业技术推广中心, 黑龙江 克东 164800)

**摘 要:** 利用菊花的叶片为外植体, 在附加不同激素浓度的 MS 培养基上诱导愈伤组织。通过对 6-BA 和 NAA 在菊花愈伤组织诱导和丛生芽作用的研究, 筛选合适的激素配比。结果表明: 愈伤组织诱导的最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 丛生芽诱导的最适培养基为 MS+6-BA 2.0~3.0 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L, 可获得较高的分化率。丛生芽继代培养基为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 试管苗在 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+20 g/L 蔗糖的生根培养基上均可生根。

**关键词:** 菊花; 激素; 愈伤组织; 丛生芽

**中图分类号:** S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0162-03

菊花是北方地区深受人们喜爱的花卉品种, 它色泽鲜艳生长周期长, 适合在北方地区的环境下生长, 室内观赏、室外园林绿化都具有很高的使用价值。目前我国菊花种苗生产尚未广泛采用“组培苗”, 菊花的一些名贵品种和新品种, 或因其扦插难以生根, 或因母株稀少, 用扦插繁殖的方法难以迅速扩大群体<sup>[1]</sup>。该试验对菊花叶片进行愈伤组织诱导、丛生芽分化和继代培养等的研究, 进而为利用组织培养技术快速繁殖菊花提供有效的途径。

**第一作者简介:** 袁成志(1975-), 男, 硕士, 讲师, 现从事园艺作物科研及教学等工作。E-mail: gaomeiling0539@163.com。

**收稿日期:** 2009-10-10

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选择的试验材料是菊花品种国华鸟越城, 由齐齐哈尔市龙沙公园提供, 选择其无病虫害的叶片为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌外植体的获得** 将选取菊花的叶片, 在自来水冲洗 2~3 h, 用 70%酒精消毒 30 s, 用无菌水冲洗后再用 0.1%汞消毒 5~7 min, 无菌水冲洗 4~5 次。

**1.2.2 培养基的筛选** 选用 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA 和 NAA, 6-BA 的浓度设置 5 个梯度, 分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L; NAA 的浓度设置 3 个梯度, 分别为 0.1、0.5、1.0 mg/L, 共组成 15 种不同激素浓度配比的培养基<sup>[2]</sup> (表 1)。

## Green Globular Body (GGB) Induction and Plantlet Regeneration of *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ

GE Jia<sup>1</sup>, LU Cheng<sup>1</sup>, WU Dan-dan<sup>1</sup>, ZHANG Guang-fei<sup>1,2</sup>, SU Wen-hua<sup>1,2</sup>

(1. Department of Ecology, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091; 2. Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091)

**Abstract:** With shoot tip of *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ as the study materials, through tissue culture technology, for the Green Globular Body (GGB) induction and plantlet regeneration of *Neocheiropteris palmatopedata* were studied. This experiment showed that the most proper medium for inducing green globular bodies (GGB) was B5+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L (sucrose 2%), the medium for multiplying GGB was B5+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L (sucrose 2%) and B5+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L (sucrose 2%), the medium for GGB to shoot was B5+NAA 0.1 mg/L (activated carbon 0.1%+sucrose 2%) and B5+NAA 0.2 mg/L (activated carbon 0.1%+sucrose 2%), 1/2B5+NAA 0.5 mg/L (sucrose 2%) was good for rooting, the rooting rate was 100%.

**Key words:** *neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ; shoot tip; green globular body; tissue culture