

金毛狗离体培养及再生植株体系的建立

李 雪^{1,2}, 叶清梅¹, 詹启成¹, 康宝莲¹, 简丽观¹, 黄敏玲²

(1. 泉州市泉美生物科技发展有限公司, 福建 泉州 362012 2. 福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 利用金毛狗孢子进行离体培养及再生植株的研究。结果表明: 孢子采用 2% 次氯酸钠消毒 10~12 min 获得无菌材料最佳。孢子萌发受培养基盐离子影响很小, 其平均萌发率为 91.25%。形成原叶体需 60~90 d。原叶体诱导孢子体最佳培养基为 1/10 MS, 生成孢子体需 80~110 d。原叶体形成孢子体有 3 种方式。孢子体增殖培养基 1/4MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 4.5 g/L, pH 5.8; 生根培养基为 MS+0.1% AC+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 4.5 g/L, pH 5.8; 组培苗移栽成活率达 98.67%。

关键词: 金毛狗; 孢子; 离体培养; 再生植株

中图分类号: S 682.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0152-04

金毛狗(*Cibotium barometz* (L.) J. Sm.), 蚌壳蕨科(Dicksoniaceae)金毛狗属大型树状陆生蕨类。根状茎粗壮肥大, 露出地面部分密被金黄色长茸毛, 似伏地的金毛狗^[1-3]。叶簇生茎顶端, 3 回羽状分裂, 叶柄长达 1 m 以上。金毛狗根状茎富含淀粉, 可食用和酿酒, 具有补肝

肾、除风湿、利尿通淋, 茎上茸毛能止血, 入药时称金毛狗脊^[4]。金毛狗也是大型的室内观赏及庭院植物, 根状茎可制成工艺品。目前其自然生存环境破坏严重, 加之过度采挖, 野生资源日渐枯竭, 已列入我国首批植物保护名单^[5]。通过金毛狗组织培养的研究, 对保护野生资源、扩大该物种分布的数量, 对该物种的开发利用等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

成熟孢子(图 1)于 2002 年 12 月采自泉州市五台山林场。

第一作者简介: 李雪(1968-), 男, 重庆大足人, 硕士, 现从事园艺植物选育和快繁及产业化研究工作。E-mail: Snowthlee@yaho.com.cn.

基金项目: 福建省科技厅科研资助项目(2008N2003)。

收稿日期: 2009-12-25

参考文献

- [1] 顾顺仙, 林爱寿. 花境新优植物应用及养护[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [2] 张金锋. 地被植物在园林绿化中的应用初探[J]. 北方园艺, 2007, 24(4): 158-159.

- [3] 李群, 陈丽萍, 石铁松. 马蹄莲组织培养过程中真菌和细菌污染的消除方法研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2001, 24(6): 607-609.
- [4] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 444-449.

Study on the Sterilization Materials of *Lonicera nitida* 'Maigrun'

WANG Dan, LI Hong-na, LUO Jiang-xia, CHAI Ci-jiang

(Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: The effects of investigated by using *Lonicera nitida* 'Maigrun' as testing material. The results indicated that the most sterilized materials could be obtained, and the explants with lower contaminated rate, higher survival rate, relatively higher germination rate and longer shoot growth were observed when the explant treated with 70% alcohol as surface sterilization for 15 min, then with 2% NaClO for 15 min. Contaminated rate could be declined, while germination and shoot growth were enhanced by keeping explant with parts of leaves before inoculation. Increasing cane sugar in the medium could promote the germination effectively.

Key words: *Lonicera nitida* 'Maigrun'; explant; sterile method; contaminated rate; germination

1.2 试验方法

用镊子将孢子囊取下让其失水收缩,轻压孢子囊取出孢子,过细筛并去掉杂质^[3]收集好孢子。用2%次氯酸钠消毒,无菌水冲洗3~4次,按孢子5~10个/cm²接种在不同培养基上。孢子萌发形成原叶体后,转接到含不同激素、营养成分的孢子体诱导培养基中。经孢子体增殖培养基筛选,再诱导生根,最后组培苗移栽。培养温度24~26℃,光强1500~2500 lx,光照13 h/d。

2 结果与分析

2.1 孢子萌发率

2.1.1 不同消毒时间对孢子萌发率的影响 金毛狗孢子适宜消毒时间10~12 min,时间加长污染下降,但孢子受损越严重,表现为死亡率升高(表1)。35 d观察孢子有零星萌发,呈淡绿色,42 d时大量孢子萌发,60 d时萌发达到高峰,容器布满绿色扁平的似心形3~10 mm原叶体(图2),原叶体腹面长有密集绒毛状的褐色假根,贴着培养基表面生长。孢子萌发持续时间长达2个月,92 d时孢子萌发完毕,萌芽率为91.25%。

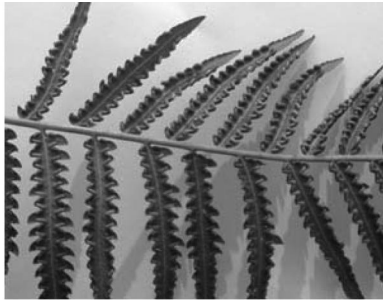


图1 叶片上成熟孢子



图2 孢子萌发

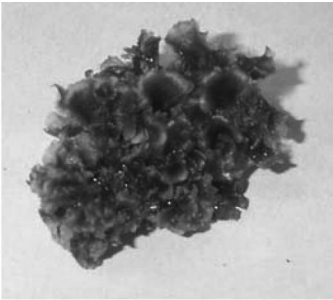


图3 原叶体从



图4 原叶体形成孢子体

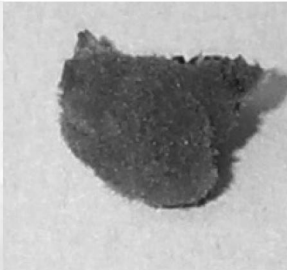


图5 原丝状组织

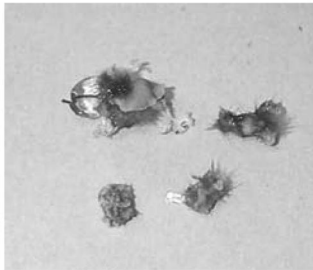


图6 原叶体死亡



图7 GGB长出孢子体



图8 孢子体增殖



图9 原叶体死亡

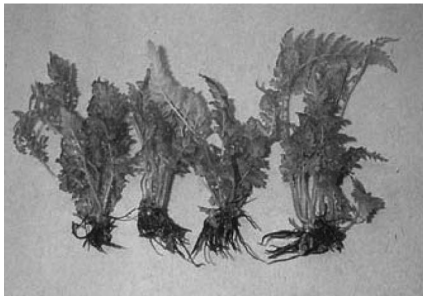


图10 组培商品苗(42 d)



图11 2个月筛苗



图12 种植12个月盆苗

表1 不同消毒时间对孢子萌发率的影响

消毒时间	接种孢子数	真菌感染率	细菌感染率	死亡率	成活率
/ min	粒	/ %	/ %	/ %	/ %
6	280	65. 55	18. 32	1. 00	15. 00
10	276	14. 55	13. 25	0. 00	72. 00
12	286	9. 25	7. 25	5. 00	78. 55
15	281	4. 75	1. 55	29. 00	63. 75

2.1.2 不同培养基对孢子萌发率的影响 由表2可知, 盐子浓度对孢子萌芽率及原叶体形成的影响小, 孢子萌发所需的营养成分不十分严格, 在未加任何盐离子(O₂S)中也能萌发。KT、GA₃ 对金毛狗萌发率未有任何影响。

表2 不同培养基对孢子萌芽率的影响

萌发培养基	接种孢子数量/ 粒	最初萌发时间/ d	萌芽率/ %
MS	100	35. 00	94. 00
1/2MS	140	36. 00	94. 29
1/8MS	140	31. 00	95. 00
O ₂ S *	140	32. 00	94. 29
1/8MS+KT 0. 01 mg/ L	140	35. 00	90. 00
1/8MS+GA ₃ 0. 01 mg/ L	120	35. 00	92. 50

注: 蔗糖 30 g/ L, 琼脂 6. 0~10 g/ L, pH 5. 8 下同。* 仅蔗糖、琼脂。

2.2 原叶体诱导成孢子体

孢子体诱导率受培养基中盐离子浓度、不同生长调节剂种类配比影响(见表3)。低盐离子浓度有利于孢子体的诱导, 1/10MS 孢子体诱导最高达 28. 30%, 1/4MS 为 20. 83%, MS 为 4. 08%。加少量的KT、NAA, 有利于孢子体的形成; 未加任何生长调节剂, 配子体也能分化出孢子体, 但分化率最低。加入 0. 1 mg/ L 的 KT、NAA 的1/2MS培养基上孢子体诱导率较 MS 培养基上诱导率高。MS、1/2MS培养基仅加入 0. 1 mg/ L BA 对形成孢子体无明显效果, 0. 1 mg/ L KT 比 NAA 的诱导孢子体的效果更好。无任何激素的培养基中孢子体形成时间最短在 85~86 d, 加入 BA 或 KT, 孢子体形成的时间较未加任何激素的培养基长 1 周左右, 加入 NAA 则介于 2 者之间。原叶体诱导培养 3 个月形成含 1~2 片幼叶的孢子体。

诱导孢子体过程中原叶体发生 5 种变化。一是原叶体继续生长, 形成浅裂具有分枝的相互交织连在一起大小为 1~2 cm 的原叶体丛(图 3)。二是从原叶体中部长出 1~2 片呈拳状幼叶, 密被金黄色绒毛, 基部带丝状的须根, 形成独立的孢子体小苗(图 4)。三是原叶体边缘变厚, 慢慢生成细小球形的胚状体 GGB(Green Global Body), GGB 会分化小芽, 形成多个孢子体(图 6)。四是原叶体形成密集的绿色原丝体组织, 丝状组织形成孢子体、或原叶体、或 GGB、或丝状体(图 4)。五是原叶体出现黄化, 周围出现褐色物质, 最后死亡(图 5)。形成孢子体可由原叶体变化的二、三、四途径 3 种方式, 形成孢子体所需 80~110 d, 途径二原叶体直接形成孢子体最短为

80 d 左右, 途径四形成孢子体需要最长约 110 d。

表3 植物激素 NAA、KT、BA 及无机盐浓度对孢子体诱导影响

培养基	接种原叶体数	孢子体诱导时间	孢子体分化率
/ mg · L ⁻¹	/ 个	/ d	/ 团%
MS	49	85	4. 08
MS+ NAA 0. 1	51	89	6. 12
MS+ BA 0. 1	50	94	4. 00
MS+ KT 0. 1	52	93	7. 69
1/2MS+ NAA 0. 1	51	86	11. 76
1/2MS+ BA 0. 1	50	95	10. 00
1/2MS+ KT 0. 1	50	96	21. 56
1/4MS	48	86	20. 83
1/10MS	53	85	28. 30

2.3 孢子体增殖

1/4MS 较1/2MS、MS 培养基更有利于孢子体增殖(见表 4)。孢子体增殖大部份是以 GGB 途径不断产生丛生幼芽。在相同离子浓度的培养基中, KT 对孢子体的增殖较 NAA 更有利, BA 对其增殖效果不明显。未加激素的 MS 中, 孢子体增殖率 1. 2, 长出新芽极为缓慢。1/10MS 培养基中, 虽然加有相关激素, 但孢子体培养 30 d 时叶片开始枯黄, 45 d 整个团块表现淡黄, 大部份叶片枯死, 偶有个别新叶长出, 但培养 90 d 后芽团枯死。增殖培养基以 1/4MS+KT 2 mg/ L+NAA 0. 1 mg/ L 最佳, 新长丛生芽多、叶片生长整齐。经过 6 周的培养增殖率 5. 6(图 8), 完全可满足商业生产要求。

表4 植物激素 NAA、KT、BA 及无机盐浓度对孢子体增殖的影响

培养基	生长调节剂/ mg · L ⁻¹			孢子接种数	增殖率(PC)
	NAA	BA	KT		
MS	0. 00	0. 00	0. 50	20	1. 2
MS	0. 01	0. 10	2. 00	21	1. 8
1/2MS	0. 01	0. 10	0. 50	22	2. 6
1/2MS	0. 05	0. 00	0. 50	20	4. 0
1/4MS	0. 05	0. 00	0. 50	20	3. 1
1/4MS	0. 05	0. 00	2. 00	23	5. 6
1/10MS	0. 05	0. 10	0. 50	22	*
1/10MS	0. 05	0. 10	2. 00	23	*

注: *材料最后死亡。

2.4 孢子体不定根诱导

将含有 3~5 片幼叶的孢子体, 幼叶高度 5 mm 时转入诱导生根培养基。10 d 后幼叶开始迅速生长, 不定根从基部茎上陆续长出。诱导根的速度受激素的种类和培养基盐离子浓度的影响不明显(表 5)。6 周统计结果表明, 所有孢子体生根率均为 100%, 每团生根的数量达 10 条以上, 植株叶片达到 50~80 mm。

表5 不同 NAA、IBA、AC 浓度对金毛狗生根影响

培养基	生长激素/ mg · L ⁻¹		活性炭 AC/g · L ⁻¹	生根率/ %
	IBA	NAA		
MS	0.00	0.00	1.0	100
MS	0.05	1.00	0.0	100
MS	0.10	1.00	0.0	100
1/2MS	0.00	0.00	1.0	100
1/2MS	0.05	1.00	0.0	100
1/2MS	0.10	1.00	0.0	100

2.5 组培苗移栽

生根好的植株经 5~7 d 练苗后, 洗净培养基, 移栽于 72 目穴盘, 基质为泥炭 : 珍珠岩 : 河沙 : 苔藓 (4 : 1 : 1 : 1), 湿度 80%~95%, 光强 1 000~2 000 lx, 温度 22~28℃, 6 周调查苗成活率 98.67%, 2 个月后筛苗可长满穴盘(图 11)。组培苗种植的整齐度好、凑丛生强、株形叶片紧, 叶色更浓绿, 7~10 个月可种植成观赏性极高的盆苗(图 12)。目前该课题组通过以上方法已大批量生产并投入国内外市场。

3 讨论

外植体采用孢子体, 取材通常有茎段、茎尖、嫩叶或叶原基, 因幼嫩位含大量的绒毛, 获得无菌外植体较难^[9]。采用孢子, 外植体易获得, 解决了外植体高污染及容易褐化死亡问题, 对野生资源也不会破坏。

原叶体边缘变厚诱导出 GGB, GGB 形成多个孢子体植株, 表明金毛狗已进行了无配子体生殖直接由配子体产生了孢子体, 这可能受植物激素、盐离子成份或培养条件影响正常的世代交替。原叶体大量增殖形成一原叶体体团, 最终不能形成孢子体, 可能配子体发育不全, 引起受精率低^[7], 具体原因还需要进一步的探讨。

增殖培养基以 1/4MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L

最佳, 新长丛生芽多、叶片生长整齐。经过 6 周的培养增殖率 5.6, 完全可满足商业生产要求。

生根最好的是 IBA 与 NAA 搭配使用, 10 d 就开始生根; 生根苗最理想的是培养基是 MS+AC 1.0 g/L, 孢子体生长整齐好, 叶色浓绿, 有利于后期苗的种植。经过 42 d 的生根培养, 均形成了 5~9 片叶组培苗(图 8、图 9)。

4 结论

孢子采用 2%次氯酸钠消毒 10~12 min 获得无菌材料最佳, 孢子萌发受培养基盐离子影响很小, 其平均萌发率为 91.25%; 形成原叶体需 60~90 d; 原叶体诱导孢子体最佳培养基为 1/10MS, 生成孢子体需 80~110 d; 孢子体增殖培养基 1/4MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+30 g/L 蔗糖+卡拉胶 4.5 g/L, pH5.8; 生根培养基为 MS+0.1% AC+30 g/L 蔗糖+卡拉胶 4.5 g/L, pH5.8; 组培苗移栽成活率达 98.67%。

参考文献

[1] 曾宋君, 邢福武. 观赏蕨类[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 114-116.
[2] 石雷. 观赏蕨类[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 85-86.
[3] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第一册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 138.
[4] 蒋盛军, 宋希强, 王胜培等. 蕨类植物组织培养研究进展[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 651-656.
[5] 董丽, 苏雪痕. 英果蕨 *Matteucia struthiopteis* Todaro 孢子繁殖的研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 274-278.
[6] Michael J B, James D. Caponetti The Effects of Kinetin and Naphthaleneacetic Acid on In Vitro[J]. Shoot Multiplication and Rooting in the Fishtail fern *Amer*, 1983, 70(1): 1-7.
[7] Suzanne M, Dethier Rogers Sharon Banister. Micropropagation of *Notholaena* 'Sun-Tuff' Fern[J]. HortScience, 1992, 27(11): 1124-1125.

In Vitro Culture and Plant Regeneration of *Cibotium barometz* (L.) J.Sm.

LI Xue^{1,2}, YE Qing-mei¹, ZHAN Qi-cheng¹, KANG Bao-lian¹, JIAN Li-guan¹, HUANG Min-ling²

(1. Sunshine Horticulture CO, LTD, Quanzhou, Fujian 362012; 2 Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou, Fujian 350013)

Abstract: Using spores of *Cibotium barometz* (L.) J.Sm as explant, we studied In Vitro culture and plant regeneration. The results showed that the best effects of aseptic spores were gained by pretreatment with NaClO 2% for 10 to 12 minutes. Spores had no dormancy and theirs average germination rate was 91.25%. Spores germinated and formed prothallus were not influenced by the inorganic salts. The best medium for inducement of the sporophyte was 1/10 strength MS without any hormone. That sporophytes induced from the prothallus need 80 to 110 days and was influenced by the concentration of plant regulators and inorganic salts. There were there kinds of paths to form sporophytes. The medium for sporophyte multiplication was 1/4 strength MS with KT 2 mg/L and NAA 0.1 mg/L containing 30 g sucrose, pH5.8. Adding 1 g/L active carbon was benefit for sporophytes rooting. The rate of survival for it tissue culture plant growth was 98.67 percent.

Key words: *Cibotium barometz* (L.) J.Sm.; spore; in vitro culture; plant regeneration