

东北对开蕨孢子体诱导技术的研究

王 阳, 董 然, 顾德峰, 刘美彤

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以东北对开蕨孢子为试材,采用无菌培养及常规繁殖的方法,研究了常规条件和无菌条件对孢子体诱导的影响。结果表明:孢子最佳萌发培养基为 1/4MS 无糖培养基;最佳增殖培养基为 MS+15 g/L 蔗糖;最佳孢子体无菌诱导培养基为 MS 培养基;最适宜的常规诱导条件是以草炭为最适宜基质,温度 20~30℃,空气湿度 95%。

关键词:东北对开蕨;孢子体诱导;孢子繁殖

中图分类号:S 682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0093-06

东北对开蕨(*Phyllitis japonica* Kom.)属铁角蕨科(Aspleniaceae)对开蕨属(*Phyllitis*)林下多年生常绿草本植物,又称日本对开蕨、对开蕨,在中国仅一属一种^[1]。它的自然分布范围十分狭窄,仅少量分布于长白山南麓和西部局部地区^[2],对生境要求严格,由于近年来环境破坏严重且人为野外大量采挖,导致其自然储量逐年减少,已经濒临灭绝,是世界稀有物种,属于我国国家二级珍稀濒危保护植物。

近年来,国内外学者就东北对开蕨已开展细胞学、繁殖栽培及生理等方面的研究^[3-18]。该试验应用保存于吉林农业大学苗圃基地内的东北对开蕨组培苗,进行孢子无菌培养,研究其常规转化和无菌转化的技术,以期对东北对开蕨的资源保护和进一步开发利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试东北对开蕨(*Phyllitis japonica* Kom.)孢子采自吉林农业大学苗圃基地内。选取栽培 3~4 a 长势健壮良好的东北对开蕨组培苗,挑选叶片背面孢子囊群成熟且已经变为褐色的叶片,整片剪下,置于洁净的硫酸纸袋中,在 4℃冰箱内密封保存备用。

取东北对开蕨带孢子囊叶片整片,先用蒸馏水浸泡 30 min,再用脱脂棉沾取饱和洗衣粉溶液擦洗叶片,要避免触及孢子囊,然后用蒸馏水再次擦去叶片表面的洗衣

粉溶液。在超净工作台上将叶片顺着孢子囊群生长方向切成 1 cm×1 cm 带孢子囊的小片,用含有吐温-20 的 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 4 min 灭菌,灭菌后用无菌水冲洗 6~8 次,使用无菌滤纸吸干表面分后准备接种。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子的萌发 以 MS 为基本培养基,设置 MS、1/2MS、1/4MS 3 个处理,分别设置 0、15、30 g/L 3 个蔗糖浓度水平,共 9 个处理,pH 5.8,琼脂浓度 7.0 g/L,经过 121℃高压蒸汽灭菌锅灭菌 20 min 后分装至 50 mL 三角瓶中。每瓶接种 1 片带孢子囊小叶片(图 1),每个处理 20 瓶,3 次重复。培养条件为温度(25±2)℃,光照强度 1 000~1 500 lx,光周期 12 h/d。



图 1 孢子无菌接种时的状态

Fig. 1 Vaccination status of spore

1.2.2 原叶体的增殖 在 1.2.1 的基础上,进行原叶体的继代增殖。切取约 0.5 cm×0.5 cm 原叶体团,每瓶接种 10 团,每个处理 5 瓶,3 次重复。采用 MS 为基本培养基,pH 5.8,琼脂 7.0 g/L。设置 MS、1/2MS、1/4MS、N6 4 个处理,分别设置 0、15、30、60 g/L 4 个蔗糖浓度水平,90 d 后将原叶体取出称重,记录每瓶的总鲜重后,设

第一作者简介:王阳(1989-),女,硕士研究生,研究方向为野生植物引种驯化。E-mail:young0608@qq.com.

责任作者:董然(1966-),女,吉林长春人,博士,教授,现主要从事野生植物引种驯化等研究工作。E-mail:dongr999@163.com.

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD22B0401);吉林省科技发展计划资助项目(20110262)。

收稿日期:2014-06-10

置 60℃ 恒温烘干 6 h, 记录每瓶总干重。每天观察各处理中原叶体的发育情况。自第 1 片孢子体转化成功开始, 30 d 后进行数据分析。

1.2.3 孢子体的常规转化 基质的筛选: 设腐殖土、草炭、园土、河沙和混合基质(草炭: 腐殖土=1: 1) 5 种基质, 基质分别过 24 目筛, 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min, 置于口径 12 cm 的塑料花盆中, 底部垫少量泡沫防止积水, 放入约 2/3 基质后压实平整, 整盆浸水直至基质表面湿润。切取未经受精的原叶体团 1 cm×1 cm 大小, 每盆均匀栽植 10 块(图 2), 每个处理 5 盆, 3 次重复。放入 GXZ-350D 光照培养箱中, 培养条件为 12 h 周期性光照, 光照强度 2 000 lx, 温度 15/25℃, 加保鲜膜封口保湿, 每 10 d 喷 1 次水。温度的筛选: 以草炭为基质, 基质灭菌方式、装盆和原叶体团的栽植同上, 每个处理 5 盆, 3 次重复。白天设置温度 15、20、25、30、35℃ 5 个梯度, 夜晚温度均为 15℃。放入 GXZ-350D 光照培养箱中, 培养条件为 12 h 周期性光照, 光照强度 2 000 lx, 温度 15/25℃, 加保鲜膜封口保湿, 每 10 d 喷 1 次水。光照的筛选: 以草炭为基质, 基质灭菌方式、装盆和原叶体团的栽植同上, 每个处理 5 盆, 3 次重复。放入 GXZ-350D 光照培养箱中设置温度 15/25℃, 每天 12 h 周期性, 光照强度 1 000、2 000、3 000 lx 3 个光照强度, 加封口膜保湿, 每 10 d 喷 1 次水。相对空气湿度的筛选: 以草炭为基质, 基质灭菌方式、装盆和原叶体团的栽植同上, 每个处理 5 盆, 3 次重复。试验环境条件为温室内搭建有人工生长箱(300 cm×150 cm×100 cm), 加盖遮阳网, 每个生长箱内均装有温湿度传感器, 通过 XMT-9007 温湿度控制仪对湿度进行自动控制, 用超声波加湿器来提高空气湿度。室内温度为白天 22~25℃, 夜间 13~15℃; 光照条件为 0~7 700 lx; 棚内相对湿度设置 95%、85%、75% 3 个湿度梯度; 以温室内 40% 左右的相对湿度作为对照, 每 2 d 喷 1 次水。以上处理自第 1 片孢子体转化成功开始, 记录转换日期, 30 d 后统计其转化率。

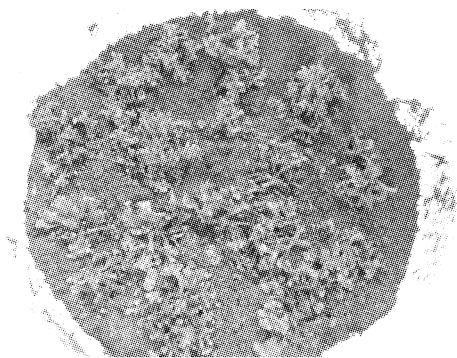


图 2 原叶体常规转化接种时的状态

Fig. 2 Vaccination status of prothallus in conventional induction conditions

1.2.4 孢子体的无菌转化 无机盐浓度与蔗糖浓度的配比: 以 MS 为基本培养基, 设置 MS、1/2MS、1/4MS、N6 4 个处理, 分别设置 0、15、30 g/L 3 个蔗糖浓度, 共 12 个处理, pH 5.8, 琼脂 7.0 g/L。每瓶 30 片原叶体, 每个处理 10 瓶, 3 次重复。培养条件为 (25±2)℃, 光照强度 1 000~1 500 lx, 光周期为 12 h/d, 自第 1 片孢子体转化成功开始, 30 d 后进行数据分析。生长调节剂的配比: 将增殖后的原叶体分成 20 片左右的小块, 接种到分别含有不同浓度(0、5、10、15、20 mg/L)GA₃ 和不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0)NAA 和 6-BA 的 MS 培养基中, 每瓶接种 10 块, 每个处理 5 瓶, 3 次重复。自第 1 片孢子体转化成功开始, 30 d 后统计其转化率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基与不同蔗糖浓度对孢子无菌培养的影响

由表 1 可知, 在 3 种不同培养基中孢子萌发率存在差异, 1/2MS 与 1/4MS 培养基对孢子萌发率有明显的促进作用。而蔗糖浓度对萌发时间也有着较为明显的影响, 随着蔗糖浓度的升高, 3 种培养基下的孢子萌发率呈现下降趋势, 不添加蔗糖的孢子萌发率最高。因此最适宜孢子无菌萌发的培养基为 1/4MS 无蔗糖培养基。

表 1 不同培养基与不同蔗糖浓度对孢子无菌培养的影响

培养基 Culture media	蔗糖浓度 Sucrose concentration (g·L ⁻¹)	萌发时间 Germination time/d	心形原叶体出现时间 Days of gametophytes appearance/d	萌发率 Germination rate/%
MS	0	65	80	37.6
	15	90	105	33.4
	30	120	130	16.3
1/2MS	0	60	80	42.9
	15	85	95	40.5
	30	105	115	34.6
1/4MS	0	60	70	76.2
	15	70	80	72.7
	30	100	115	55.6

2.2 不同培养基与不同蔗糖浓度对原叶体增殖的影响

表 2 表明, 虽然在 N6 培养基中, 对开蕨增殖系数最好, 但原叶体结团生长, 不利于进一步增殖和转化; 在 1/2MS、1/4MS 培养基又均出现褐化现象, 因此最适宜的增殖基本培养基为 MS 培养基, 原叶体为深绿色, 生长平展较大(图 3)。

在研究了培养基与蔗糖浓度对对开蕨孢子萌发的影响后, 接种于不同蔗糖浓度的 MS 培养基的原叶体团, 10 d 后即可长出新的原叶体, 以 30 d 为 1 个继代周期, 由表 3 可知, 蔗糖浓度为 15 g/L 的增殖系数最好, 且原叶体团始终保持翠绿色且生长良好(图 3)。

表 2 不同培养基对原叶体增殖的影响

Table 2 Effect of different culture medias to the prothallus proliferation of *Phyllitis japonica*

培养基 Culture media	鲜质量 Fresh weight/g	干质量 Dry weight/g	增殖系数 Proliferation coefficient	生长状态 Growth state
MS	12.38±2.84b	1.28±0.27b	3.40	平展较大
1/2MS	12.30±2.15b	1.57±0.13b	5.88	少量褐化
1/4MS	11.90±4.94b	0.85±0.23b	3.29	多褐化
N6	26.10±3.52a	4.81±2.73a	6.87	结团,生长慢

注:同一行(或同一列)不同字母的数值之间有显著差异($\alpha=0.05$)。下同。

Note: The same letters within same column(row) show significant difference ($\alpha=0.05$). The same below.



图 3 原叶体增殖接种时的状态

Fig. 3 Vaccination status of prothallus proliferation

表 3 蔗糖浓度对原叶体增殖的影响

Table 3 Effect of different sucrose concentrations to the prothallus proliferation of *Phyllitis japonica*

蔗糖浓度 Sucrose concentration/(g·L ⁻¹)	鲜质量 Fresh weight/g	干质量 Dry weight/g	增殖系数 Proliferation coefficient	生长状态 Growth state
0	13.87±2.30a	4.81±2.73a	4.99	翠绿色、一般
15	15.41±1.77a	1.18±0.13b	7.61	翠绿色、良好
30	12.38±2.84a	1.28±0.27b	3.40	深绿色、好
60	9.19±1.11b	1.13±0.18b	2.94	暗绿色、一般

2.3 不同基质对孢子体转化的影响

由表 4 可知,在河沙基质上的转化试验原叶体生长缓慢,后期无法正常进行受精作用,孢子体无法生长;园土完成转化的时间最长;混合基质和腐殖土作为基质相对于园土和草炭的转化率均不高;从转化时间和转化率两方面考虑,最适宜东北对开蕨原叶体转化的基质为草炭。

2.4 白天温度对孢子体转化的影响

从表 5 可以看出,在变温变光的试验条件下,原叶体在不同白天温度条件下的发育状况存在明显差异。25℃白天温度下原叶体受精成苗率最高,孢子体转化率最高,孢子叶出现时间也较早;而在温度偏低和偏高的 15℃和 35℃条件下,虽然也有转化但孢子体出现时间晚

表 4 不同基质对孢子体转化的影响

Table 4 Effect of different culture mediums to the sporophyte induce of *Phyllitis japonica*

基质 Culture medium	第 1 株孢子体出现时间 First sporophyte appearance time/d	孢子体转化率 The rate of transform to sporophyte/%
腐殖土 Humus soil	90	47.5
园土 Soil	95	80.5
草炭 Turf	75	84.2
河沙 Sand	—	—
混合基质 Mix storage period	85	60.2

注:“—”表示 150 d 后仍然没有出现孢子体转化。

Note: “—” shows there is no sporophyte induce after 150 days.

表 5 不同白天温度对孢子体转化的影响

Table 5 Effect of different day-temperatures to the sporophyte induce of *Phyllitis japonica*

白天温度 Temperature/℃	第 1 株孢子体出现时间 First sporophyte appearance time/d	孢子体转化率 The rate of transform to sporophyte/%
15	120	45.0
20	85	82.6
25	75	84.2
30	80	80.2
35	95	62.5

且转化率也并不理想。因此最适宜的转化环境温度应控制在 20~30℃,最适宜的白天温度为 25℃。

2.5 光照强度对孢子体转化的影响

由表 6 可知,在以荧光源为主要光源的变温变光条件下,各个光照强度下对开蕨原叶体转化为孢子体的转化时间和转化率差异均不大,转化率均能达到 80% 以上。

表 6 光照强度对孢子体转化的影响

Table 6 Effect of intensity of illumination to the sporophyte induce of *Phyllitis japonica*

光照强度 Intensity of illumination/lx	第 1 株孢子体出现时间 First sporophyte appearance time/d	孢子体转化百分率 The rate of transform to sporophyte/%
1 000	75	80.5
2 000	75	84.2
3 000	80	80.2

2.6 相对空气湿度对孢子体转化的影响

从表 7 可以看出,湿度在东北对开蕨原叶体受精作用和孢子体生长中起到了决定性的作用,随着湿度的升高转换率明显提升,在相对湿度达到 95% 左右,转化率可以达到 87.6%(图 4);转化时间也相对上述试验有所缩短,70 d 第 1 株孢子体就出现了。

2.7 不同培养基与不同蔗糖浓度对孢子体诱导的影响

将增殖后的原叶体分成 20 片左右的小块,将原叶体团接种到不同培养基与不同蔗糖浓度培养基中,培养 90 d 后开始有孢子体出现,120 d 后开始有大量孢子体出现,从表 8 可以看出,转化率最高的组合为 1/4MS 无

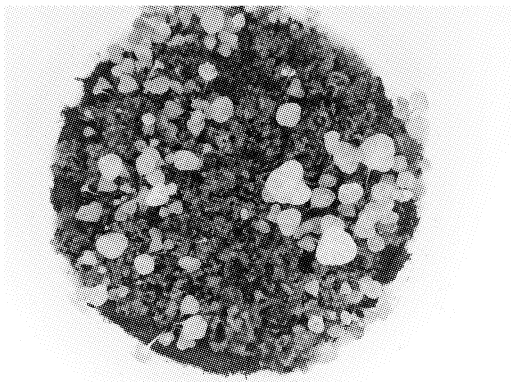


图4 原叶体常规转化 30 d 后的状态

Fig. 4 Vaccination status of prothallus in conventional induction conditions after 30 days

表7 相对空气湿度对孢子体转化的影响

Table 7 Effect of air humidity to the sporophyte induce of *Phyllitis japonica*

空气湿度 Air humidity/%	第1株孢子体出现时间 First sporophyte appearance time/d	孢子体转化率 The rate of transform to sporophyte/%
40(CK)	120	32.7
75	80	78.5
85	70	87.3
95	70	87.6

糖培养基,但生长过程中原叶体团出现大量褐化,长势不良,因此最适宜基础培养基为 MS 无蔗糖培养基(图5)。



图5 接种 90 d 后孢子体转化的状态

Fig. 5 Transformation status of sporophyte after 90 days

2.8 生长调节剂对孢子体诱导的影响

将原叶体团接种到添加不同的生长调节剂的 MS 无蔗糖培养基,培养 90 d 后开始有孢子体出现,120 d 后开始有大量孢子体出现,由表 9 可知,仅添加 5 mg/L 和 10 mg/L 赤霉素诱导产生少量孢子体,添加 NAA 和 6-BA 均没有孢子体产生。

表8 不同培养基与不同蔗糖浓度对孢子体诱导的影响

Table 8 Effect of different inorganic salts and different sucrose concentrations to sporogonium the induction of *Phyllitis japonica*

培养基 Culture media	蔗糖浓度 Sucrose concentration /(g · L ⁻¹)	栽植原叶体数 The number of gametophytes /个	孢子体数 The number of sporophyte /个	孢子体诱导率 The rate of transform to sporophyte/%
MS	0	200	40	20.0
	15	200	15	7.5
	30	200	15	7.5
1/2MS	0	200	45	22.5
	15	200	25	12.5
	30	200	25	12.5
1/4MS	0	200	85	42.5
	15	200	60	30.0
	30	200	40	20.0
N6	0	200	0	0
	15	200	0	0
	30	200	0	0

表9 GA₃、NAA 和 6-BA 对孢子体诱导的影响

Table 9 Effect of GA₃,NAA and 6-BA on sporogonium the induction of *Phyllitis japonica*

激素类型 Hormone type	浓度 Concentration /(mg · L ⁻¹)	栽植原叶体数 The number of gametophytes/个	孢子体数 The number of sporophyte/个	孢子体诱导率 The rate of transform to sporophyte/%
GA ₃	0	200	0	0
	5	200	25	12.5
	10	200	45	22.5
	15	200	0	0
	20	200	0	0
NAA	0	200	0	0
	0.5	200	0	0
	1.0	200	0	0
	1.5	200	0	0
	2.0	200	0	0
6-BA	0	200	0	0
	0.5	200	0	0
	1.0	200	0	0
	1.5	200	0	0
	2.0	200	0	0

3 结论与讨论

3.1 无机盐和蔗糖浓度对孢子萌发和原叶体增殖的影响

Camloh 等^[19]研究表明,在蕨类植物孢子的无菌培养中,不含糖的基础培养基能促进孢子的萌发,适量加入蔗糖利于原叶体的生长发育。该试验结果表明,东北对开蕨的孢子在低无机盐、低蔗糖浓度的条件下萌发最好,但萌发长出的原叶体则需要无机盐充足,并加入适量蔗糖的条件下才能继续增殖生长。蕨类植物的孢子与种子植物的种子生长发育过程相似,其生长发育过程都是一种有性繁殖过程。孢子萌发的前期,其孢子内储藏的营养足够支撑其正常萌发,因此无机盐和蔗糖主要作为调节剂来调节孢子所处环境的渗透压,主要目的是要利于孢子从外界吸收水分进而萌发。在孢子萌发的后期,随着孢子母细胞吸收水分并不断分化,其孢子

内原有的内含物不断消耗,新生的原叶体就需要从外部环境吸收营养以供其继续生长发育,此时无机盐和蔗糖则作为主要营养物质,因此后期提高无机盐与蔗糖浓度则会更适合于原叶体的增殖和生长。Melan 等^[20]在研究蕨类植物的组织培养过程中认为,蕨类植物孢子的生长需要含氮量高的培养基,铵态氮则是氮源补给的最有效形式,具体为 MS 培养基;Helena^[21]则认为培养基中过量的氮会造成植物氮毒害,紫萁的配子体在 MS、1/2MS、KP 培养基中会停止生长;Dyer^[22]研究表明蔗糖在蕨类组织培养中是最有效和最广泛应用的碳源,1%以下的蔗糖有利于原叶体的形成和增殖;吴华等^[23]在对扇叶铁线蕨的组织培养研究中和程治英等^[24]在研究桫欏的组织培养上也得出同样的结论;该试验结果与此相一致。

3.2 常规条件下对孢子体诱导的影响

该试验结果表明,主要决定东北对开蕨孢子体转化的因素是水分,因为东北对开蕨的原生环境为林下,性喜阴凉湿润,要求有较高的相对空气湿度和充足的营养物质^[2]。在基质试验中,草炭、园土和腐殖土都能够提供充足的营养,但园土相对粘重,结构紧实;腐殖土性质疏松,不能有效的持水;这 2 种基质所提供的空气湿度均没有草炭的高;河沙营养物质较少,无法满足原叶体的生长发育。在相对空气湿度试验中,相对空气湿度最大的 95% 的处理可以将转化率提高到 87.6%,也符合这一结论。东北对开蕨最适宜的生长温度为 18~25℃^[2],该试验中由于加盖了塑料膜进行保湿,适当的提高环境温度,加快了水分的蒸发,提高了相对空气湿度,因此最适温度为 20~30℃。移栽后小苗健壮长势良好(图 6)。

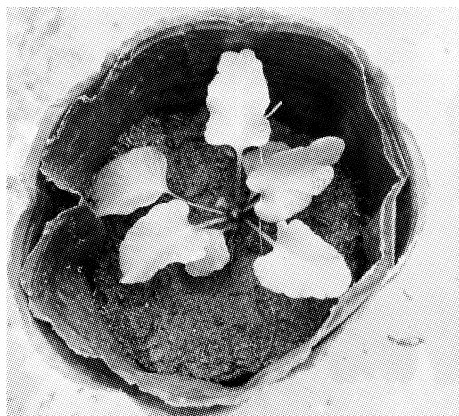


图 6 移栽后小苗的生长状态

Fig. 6 The growth of seedlings after transplant

3.3 无菌条件下对孢子体诱导的影响

该试验结果所得到的无菌条件下的孢子体诱导率都不如常规条件下的转化率高,而培养瓶内的无菌环境与常规条件盆中的最大差别就是湿度;加盖棉花胶塞的培养瓶内湿度不可能很大,而覆盖有塑料膜保湿的花盆

基质相对空气湿度是非常大的,每次打开塑料膜检查都可见水汽从膜上滴下,这也能够证明主要决定东北对开蕨原叶体转化的因素是水分这一结论。另外,添加生长调节剂后的转化率并没有提高,这与吴华等^[23]在研究扇叶铁线蕨无菌繁殖中得到的结论一致。Suzanne 等^[25]也认为,蕨类植物的原叶体通常在没有外源植物生长调节剂干扰的情况下能够顺利分化出孢子体。在外源植物生长调节剂的调控下原叶体可能不会朝着分化孢子体的方向发育,而是进一步增殖、形成原叶体或愈伤组织。

东北对开蕨作为一种集室内外绿化观赏价值与药用价值于一身的珍稀濒危的长白山特色中草药^[2],是北方地区一种孑遗植物,是研究生物进化和植物系统发育理论的材料之一。它自然繁殖力极弱,而现在的生态环境也受到了严重破坏,种群面临灭绝的危险,对其保护和繁殖刻不容缓。该研究通过无菌孢子萌发和增殖,以及对原叶体转化这一关键技术的研究,为东北对开蕨的保护和繁殖提供必要的技术手段。

参考文献

- [1] 钱家驹. 对开蕨首次在我国发现[J]. 植物分类学报, 1980, 18(4): 482-483.
- [2] 刘保东, 时述武. 长白山的珍稀观赏植物——对开蕨[J]. 中国野生植物, 1991(4): 37-38.
- [3] 吴兆洪. 中国铁角蕨科资料(二)[J]. 广西植物, 1989, 9(4): 259-292.
- [4] 田洪. 东北对开蕨的栽培[J]. 人参研究, 1997(2): 16-17.
- [5] 刘保东. 对开蕨孢子育苗[J]. 生命世界, 1993(3): 27.
- [6] 张玉翠. 观赏蕨类的无性繁殖[J]. 中国种业, 2006(12): 53-54.
- [7] 岳晓晶, 岳桦. 对开蕨在哈尔滨地区的繁殖技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2010(7): 81-83.
- [8] 顾德峰, 李东升, 王蕾, 等. 东亚对开蕨离体快繁的研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1373-1376.
- [9] 王蕾, 顾德峰, 王海峰. 东北对开蕨两种繁殖技术的研究[J]. 中国园艺文摘, 2009(6): 16-18.
- [10] 岳桦, 孙笑从. PEG 渗透胁迫对对开蕨生理特性影响[J]. 北方园艺, 2011(1): 91-94.
- [11] 岳桦, 吴妍, 姜丽颖. 不同栽培基质对对开蕨的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2011(2): 66-68.
- [12] 古安根, 刘仪娴. 对开蕨属导管的发现[J]. 植物学报, 1957, 29(4): 377-378.
- [13] 古安根, 汪矛. 对开蕨属次生维管组织的发现[J]. 植物研究, 1989, 9(4): 87-88.
- [14] 王立军, 张友民, 钟岩. 东北对开蕨的解剖研究[J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(增刊): 1-2.
- [15] Andrea P, Blendi D, Gjystina G, et al. Traditional phytotherapy of the Albanians of Lepushe [J]. Northern Albanian Alps, Fitoterapia, 2005, 76: 379-399.
- [16] Istvan P, Freek B, John B, et al. Phylogenetic and biosystematic relationship in four highly disjunct polyploid complexes in the subgenera Ceterach and Phyllitis in Asplenium (Aspleniaceae) [J]. Urban and Fischer Verlag, 2002 (2): 299-311.
- [17] Emilia P, Stuart L, Adrian D. Spore germination and gametophyte development in three species of Asplenium [J]. Annals of Botany, 1994(6): 587-593.

香鳞毛蕨 *psbA* 基因的克隆与序列分析

高 睿¹, 梁彦涛², 常 缨¹

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 大庆师范学院 生命科学学院, 黑龙江 大庆 163712)

摘 要:以提取的香鳞毛蕨总 RNA 为试材, 采用 RACE 方法得到香鳞毛蕨 *psbA* 基因全长, 研究其序列的生物信息学特征并提交序列至 GeneBank。结果表明: 克隆的基因全长 1 425 bp, 开放阅读框为 1 062 bp, 编码 353 个氨基酸, 与其它植物相比具有很高的同源性, 基因命名为 *DfpsbA*, GeneBank 登录号为 KJ728648。该研究结果可为进一步阐明香鳞毛蕨光合作用机理、基因表达与调控奠定基础, 同时也为植物分类与进化提供依据。

关键词:香鳞毛蕨; *psbA*; RACE; 基因克隆

中图分类号:S 682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0098-05

香鳞毛蕨 [*Dryopteris fragrans* (L.) Schott] 属鳞毛蕨科 (Dryopteridaceae) 鳞毛蕨属 (*Dryopteris*) 多年生草本植物, 主要分布于远东高寒地区, 能够生长在滑石坡及火山熔岩表面, 具有多种生理活性^[1-6]。大多数蕨类植物都是阴生植物, 喜生于散射光下。而香鳞毛蕨则能在岩石表面阳光的直射下存活, 这反映出香鳞毛蕨必有

与一般蕨类植物不同的光合作用机制以抵御阳光直射与紫外线的照射。因此, 对其光合作用的研究有着特殊的意义。

在高等植物的叶绿体中, *psbA* 基因是一个重要光调控基因, 编码分子量为 32 ku 的 D1 类囊体膜蛋白是光系统 II 反应中心的 2 个核心亚基之一, 在光合作用中主要涉及光能的转换、电子和质子的产生以及分子氧的释放^[7]。*psbA* 基因的启动子具有光诱导性和高效活性, 其基因的转录、翻译、降解和修复等过程受光照、氧化压力、UV 辐射等环境因素的影响, 是研究光饱和、光抑制

第一作者简介:高睿(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为资源植物学与植物分子生物学。E-mail: gaoruineau@163.com.

收稿日期:2014-04-21

[18] Lawrence P A, Ashenden T W. Effects of acidic gases and mists on the reproductive capability of three fern species [M]. Environmental Pollution, 1993.

[19] Camloh M, Vilhar B, Ravnikar M. Jasmonic acid stimulates development of rhizoids and shoots in fern leaf culture [J]. Journal of Plant Physiology, 1999, 155(6): 798-801.

[20] Melan M A, Whittier D P. Effects of inorganic nitrogen sources on spore germination and gametophyte growth in *Botrychium dissectum* [J]. Plant Cell Environ, 1990, 13: 477-482.

[21] Helena F B. Germination in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*

[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(5): 358-362.

[22] Dyer A F. The culture of fern gametophytes for experimental investigation [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1979, 57: 65-69.

[23] 吴华, 袁丽萍, 王洋, 等. 扇叶铁线蕨孢子无菌繁殖技术研究 [J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 457-464.

[24] 程冶英, 张风雷. 桫欏的快速繁殖与种质保存技术的研究 [J]. 云南植物研究, 1991, 13(2): 181-188.

[25] Suzanne M, Rogers D, Banister S. Micropropagation of *Notholaena* 'Sun-Tuff' fern [J]. Hort Science, 1997, 27(1): 1224-1225.

Study on Sporophytic Induction Technology of *Phyllitis japonica*

WANG Yang, DONG Ran, GU De-feng, LIU Mei-tong

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking spore of *Phyllitis japonica* as experimental material, the effect of general conditions and sterile conditions on the sporophyte induce of *Phyllitis japonica* were studied by using normal condition and isolated culture of breeding methods. The results showed that the best germination medium was 1/4MS sugar-free culture medium. The best multiplying culture was MS+15 g/L sucrose. The best sporophyte inductive medium was MS. The best conventional induction conditions was turf, the temperature was 20~30℃ and the air humidity was 95%.

Keywords: *Phyllitis japonica*; sporophytic induction; spore multiply