

邓 坦,周 逊,张 念. 不同培养条件对紫萁原叶体发育的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(4):113-115.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.04.028

# 不同培养条件对紫萁原叶体发育的影响

邓 坦<sup>1,2</sup>, 周 逊<sup>1</sup>, 张 念<sup>1</sup>

(1. 遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州遵义 563006; 2. 贵州省赤水河流域植物资源保护与应用研究特色重点实验室, 贵州遵义 563006)

**摘要:**研究不同碳源浓度、不同激素水平、不同孢子成熟度等条件对紫萁(*Osmunda japonica* Thund.)原叶体萌发的影响。结果表明,蔗糖浓度为2%的培养基有利于孢子的萌发和原叶体的形成;随着无机盐浓度的降低,孢子萌发率上升,以1/4MS浓度最佳;1.0 mg/L 6-BA更有利于原叶体的发育;0.01 mg/L NAA上的原叶体长势较好;0.1~1.0 mg/L 2,4-D均有利于原叶体的发育,以0.5 mg/L为最佳浓度;还未完全成熟的孢子的萌发率较高,最高达50%以上。培养基配方为2%蔗糖+1/4MS+1 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D和孢子未完全成熟等条件更有利于紫萁原叶体的发育。

**关键词:**紫萁;培养条件;原叶体;发育

**中图分类号:** Q94-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)04-0113-03

紫萁(*Osmunda japonica* Thunb)属蕨类植物门真蕨类原始厚囊蕨纲紫萁目紫萁科紫萁属的一种多年生草本植物,既是一种山野菜又是一种名贵中药材<sup>[1]</sup>。其拳卷幼叶经过干制处理,称为薇菜,是出口日、韩的名贵山野菜。紫萁根茎入药,具有一定的应用价值,很多研究表明,薇菜含有钙(Ca)、铁(Fe)、锌(Zn)等元素和多种氨基酸,具有较高的营养成分<sup>[2-3]</sup>,但其自然繁殖能力弱,不利于种群的扩大和人工栽培。目前,中国产的薇菜均为采自山区的野生紫萁,质优,无污染。近年来,由于滥采,其野生资源日渐枯竭,产品供不应求,为合理开发这一珍稀资源,提高其品率,满足市场需求,进行人工规模栽培势在必行,而人工栽培的关键是解决紫萁成苗问题,对其孢子萌发条件的研究是解决其有性生殖问题的重要条件之一。

国内外对紫萁孢子的人工繁殖已有研究<sup>[1,4-11]</sup>,但对一些控制紫萁孢子萌发和原叶体发育的因素还有待更深入的研究。本试验就不同碳源浓度、不同激素水平、不同成熟度的紫萁孢子这几个因素对紫萁原叶体发育的影响进行探究。

收稿日期:2016-09-21

基金项目:贵州省遵义市科技计划(编号:遵市科合社字[2009]25);贵州省科技创新人才团队建设项目[编号:黔科合人才团队(2012)4004];贵州省“125计划”重大科技专项(编号:黔教合重大专项字[2014]036)。

作者简介:邓 坦(1972—),男,贵州湄潭人,硕士,高级实验师,主要从事植物资源学方向的研究。E-mail:gzzydeng@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

紫萁孢子体材料于2013年4月中旬采自贵州遵义大板水国家级森林公园,所采集的试验材料由遵义师范学院生命科学学院植物资源实验室鉴定,并保存标本。采集不同成熟度的孢子叶穗,放入洁净的密封袋中,置于5℃冰箱中保存供使用。

### 1.2 不同培养基的配制

无机培养基采用MS、1/2MS、1/4MS(1/2MS、1/4MS培养基的大量元素含量分别为MS培养基全量的1/2、1/4,铁盐和有机物的含量与MS培养基相同),pH值为6.0,培养基配制好后分装到培养瓶中,培养基于121℃高压灭菌120 min。

### 1.3 消毒方式

取适量不同成熟度的孢子体,先用适量洗衣粉洗10 min,洗去表面杂质,然后用自来水冲洗30 min,再然后用75%乙醇处理1 min后用无菌水清洗3~4次,再用0.1%氯化汞处理8 min,最后用无菌水清洗3~4次后就可进行接种。

### 1.4 正交试验

本试验分3个组合:组合1以MS、1/2MS、1/4MS为基本培养基,附加不同浓度的蔗糖,pH值6.0,培养不同成熟度的外植体;组合2以MS、1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA和NAA,pH值6.0,培养不同成熟度的外植体;组合3以MS、1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA、2,4-D,pH值6.0,培养未完全成熟的外植体。

[11]黄家林,胡 虹,李树云. 云南独蒜兰的种子无菌萌发研究[J]. 园艺学报,2005,32(2):313-313.

[12]于晓娟,纳海燕,胡晓丽,等. 毛唇独蒜兰的离体快速繁殖研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2007,44(4):891-894.

[13]于晓娟. 独蒜兰组织培养及其生物多样性的ISSR分析[D]. 成都:四川大学,2007.

[14]涂艺声,刘如龙,黄文敏. 井冈山独蒜兰再生体系构建研究[J].

安徽农业科学,2009,37(9):3931-3932.

[15]陈之林,叶秀麟,梁承邨,等. 白花独蒜兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学报,2004,40(4):455-455.

[16]易 瑾,龙春林,程治英. 疣鞘独蒜兰和岩生独蒜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2008,44(3):533-534.

[17]卓孝康,兰思仁,彭东辉,等. 台湾独蒜兰无菌萌发与植株再生研究[C]//中国观赏园艺研究进展. 2015.

将各个处理置于光照时间 12 h/d、光照度 2 000 lx、温度 25 ℃ 的条件下培养,定期观察其生长情况,3 d 后观察孢子的萌发情况,定期记录孢子颜色的变化,25 ~ 30 d 后分别对每个处理在显微镜下观察原叶体的形态结构,并统计每种处理条件下的孢子萌发率。

2 结果与分析

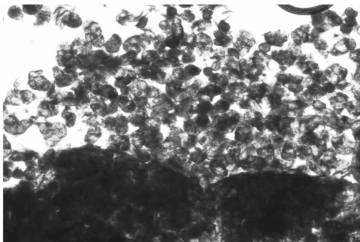
2.1 不同蔗糖和无机盐浓度对紫萁孢子萌发和原叶体发育的影响

由表 1 可以看出,不同蔗糖浓度和无机盐浓度能影响紫萁孢子的萌发和原叶体的发育。蔗糖浓度为 2% 的培养基比含量为 3% 的培养基更有利于孢子的萌发和原叶体的发育(图 1-A)。1 周后孢子开始萌发,表面开始分化出一些绿色小点,这与张敏等对紫萁的组织培养而得出的结论<sup>[5]</sup>相符合。在没有添加任何植物激素的条件下培养紫萁孢子,成熟度为 3 的紫萁孢子的萌发率为 0,成熟度为 1 的紫萁孢子的萌发率最高,最高达 66.67%(表 1)。

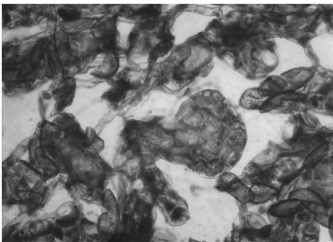
表 1 不同蔗糖和无机盐浓度对紫萁孢子萌发和原叶体发育的影响

蔗糖浓度(%)	培养基	孢子体成熟度	萌发时间(d)	萌发率(%)	原叶体发育情况
2	MS	1	10 ~ 13	60.00	+++
2	MS	2	13 ~ 15	13.33	+
2	MS	3	-	0.00	-
2	1/2MS	1	10 ~ 13	46.67	++
2	1/2MS	2	13 ~ 16	6.67	+
2	1/2MS	3	-	0.00	-
2	1/4MS	1	10 ~ 13	66.67	++
2	1/4MS	2	-	0.00	-
2	1/4MS	3	-	0.00	-
3	MS	1	13 ~ 15	13.33	+
3	MS	2	10 ~ 13	6.67	+
3	MS	3	-	0.00	-
3	1/2MS	1	13 ~ 15	33.33	++
3	1/2MS	2	-	0.00	-
3	1/2MS	3	-	0.00	-
3	1/4MS	1	13 ~ 15	33.33	++
3	1/4MS	2	-	0.00	-
3	1/4MS	3	-	0.00	-

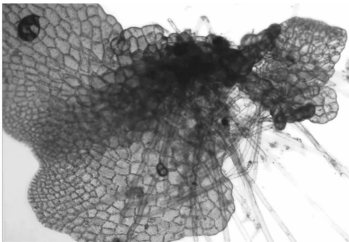
注:成熟度为 1 表示还未完全成熟的紫萁孢子,孢子还略显绿色;成熟度为 2 表示刚成熟的紫萁孢子;成熟度为 3 表示已成熟了一段时间的紫萁孢子。萌发时间为“-”表示未萌发。原叶体发育情况为“-”表示无原叶体出现,“+”表示出现原丝体,“++”表示出现片状体和幼原叶体,“+++”表示出现心形原叶体。下表同。



A. 3 ~ 5 个细胞的丝状体



B. 片状体



C. 心形原叶体

图 1 发育中的原丝体和原叶体

2.2 不同浓度无机盐、6-BA、NAA 对紫萁孢子萌发和原叶体发育的影响

由表 2 可以看出,不同浓度无机盐、6-BA、NAA 均影响紫萁原叶体的发育,无论什么样的浓度配比,成熟度为 1 的孢子体萌发率都要高于成熟度为 2 和 3 的萌发率,成熟度为 3 的孢子体在 1/2MS、1.0 mg/L 6-BA、0.01 mg/L NAA 条件下有幼原叶体和片状体的发育。

在 MS + 0.1 mg/L 6-BA + 成熟度 1 和 1/2MS + 0.1 mg/L 6-BA + 成熟度 1 条件下紫萁原叶体发育最好(图 1-C)。在 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 成熟度 1 和 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 成熟度 1 条件下还是片状体(图 1-B),在 1/2MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 成熟度 3 的条件下处于 2 ~ 6 个细胞的丝状体(图 1-A),在 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 成熟度 1 和 1/2MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 成熟度 1 条件下的原叶体发育较好(图 1-C)。

2.3 不同浓度无机盐、6-BA、2,4-D 对紫萁孢子萌发和原叶体发育的影响

由表 3 可以看出,不同无机盐、6-BA、2,4-D 浓度能影响紫萁原叶体的发育,0.1、0.5、1.0 mg/L 2,4-D 都有利于紫萁原叶体的发育,0.5 mg/L 为最佳浓度。在不同浓度外源激素条件下紫萁原叶体发育不同,在 MS + 0.1 mg/L 2,4-D (无 6-BA)与 MS + 0.5 mg/L 2,4-D (无 6-BA)和 1/2MS + 0.5 mg/L 2,4-D (无 6-BA)的条件下,发育为心形原叶体的时间较快(图 1-C),在 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D 条件下为片状体(图 1-B)。

3 讨论

在外植体的选择上,笔者所在课题组选取了 3 种不同成熟度的穗状孢子体:成熟度为 1,孢子体颜色为青绿色;成熟度为 2,孢子体刚由青色转黄色;成熟度为 3,孢子体由黄色转褐色。无论是在何种条件的处理下,成熟度为 1 的孢子体萌发要好于成熟度为 2、3 的孢子体,究其原因,成熟度为 1 的孢子体未成熟,细胞还未分化完成,在适度培养条件的刺激下,更能激发细胞的全能性。

在无机盐浓度的选择上,笔者所在课题组选择了 3 种浓度,分别是 1MS、1/2MS、1/4MS。由结果看出,在低浓度无机盐条件下,孢子萌发率较高,这在实际生产过程中对于控制成本是有益的。

在碳源浓度选择上,笔者所在课题组选择了 2 种浓度进行比较,分别是 3%、2% 蔗糖。由结果看出,在 2% 的低碳源

表 2 不同浓度无机盐、6-BA、NAA 对紫萁孢子萌发和原叶体发育的影响

培养基	6-BA 含量 (mg/L)	NAA 含量 (mg/L)	孢子体 成熟度	萌发时间 (d)	萌发率 (%)	原叶体 发育情况
MS	0.1	0.01	1	7~10	46.67	+++
MS	0.1	0.01	2	-	0.00	-
MS	0.1	0.01	3	-	0.00	-
MS	0.1	0.05	1	7~10	33.33	+++
MS	0.1	0.05	2	-	0.00	-
MS	0.1	0.05	3	-	0.00	-
MS	0.5	0.01	1	10~12	26.67	++
MS	0.5	0.01	2	13~16	6.67	+
MS	0.5	0.01	3	-	0.00	-
MS	0.5	0.05	1	10~13	46.67	++
MS	0.5	0.05	2	-	0.00	-
MS	0.5	0.05	3	-	0.00	-
MS	1.0	0.01	1	10~13	60.00	++
MS	1.0	0.01	2	13~15	6.67	+
MS	1.0	0.01	3	-	0.00	-
MS	1.0	0.05	1	10~13	46.67	++
MS	1.0	0.05	2	-	0.00	-
MS	1.0	0.05	3	-	0.00	-
1/2MS	0.1	0.01	1	10~12	60.00	++
1/2MS	0.1	0.01	2	7~9	13.33	+++
1/2MS	0.1	0.01	3	-	0.00	-
1/2MS	0.1	0.05	1	7~10	33.33	+++
1/2MS	0.1	0.05	2	10~13	13.33	++
1/2MS	0.1	0.05	3	-	0.00	-
1/2MS	0.5	0.01	1	7~10	20.00	+++
1/2MS	0.5	0.01	2	-	0.00	-
1/2MS	0.5	0.01	3	13~15	6.67	+
1/2MS	0.5	0.05	1	7~9	53.33	+++
1/2MS	0.5	0.05	2	10~12	13.33	++
1/2MS	0.5	0.05	3	10~12	26.67	++
1/2MS	1.0	0.01	1	7~10	40.00	+++
1/2MS	1.0	0.01	2	13~18	13.33	+
1/2MS	1.0	0.01	3	10~13	26.67	++
1/2MS	1.0	0.05	1	10~12	20.00	++
1/2MS	1.0	0.05	2	-	0.00	-
1/2MS	1.0	0.05	3	10~13	6.67	++

浓度下,孢子萌发较好,这在大规模的实际生产过程中,对于控制成本也是有益的。

不同无机盐浓度、6-BA 浓度、NAA 浓度均影响紫萁原叶体的发育。由结果可以看出,无论什么样的浓度配比,成熟度为 1 的孢子体萌发率都要高于成熟度为 2、3 的,成熟度为 3 的孢子体在 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA 培养条件下有丝状体和片状体的发育。

不同浓度无机盐、6-BA 和 2,4-D 的配比试验表明,0.1、0.5、1.0 mg/L 2,4-D 都有利于紫萁原叶体的发育,0.5 mg/L 为 2,4-D 最佳浓度。

在控制条件下,碳源浓度为 2% 的培养基有利于孢子的萌发和原叶体的形成;随着无机盐浓度的降低,孢子萌发率上

表 3 不同浓度无机盐、6-BA、2,4-D 对紫萁孢子萌发和原叶体发育的影响

培养基	6-BA 含 量(mg/L)	2,4-D 含 量(mg/L)	孢子体 成熟度	萌发时间 (d)	萌发率 (%)	原叶体 发育情况
MS	0	0.1	1	7~9	86.67	+++
MS	0	0.5	1	7~10	60.00	+++
MS	0	1.0	1	7~9	53.33	+++
MS	0.1	0.1	1	10~12	33.33	++
MS	0.1	0.5	1	7~10	40.00	+++
MS	0.1	1.0	1	7~10	46.67	+++
MS	0.5	0.1	1	10~13	53.33	++
MS	0.5	0.5	1	10~12	46.67	++
MS	0.5	1.0	1	10~12	33.33	++
1/2MS	0	0.1	1	7~9	46.67	+++
1/2MS	0	0.5	1	7~10	26.67	+++
1/2MS	0	1.0	1	10~12	20.00	++
1/2MS	0.1	0.1	1	10~13	26.67	++
1/2MS	0.1	0.5	1	10~13	66.67	++
1/2MS	0.1	1.0	1	10~12	40.00	++
1/2MS	0.5	0.1	1	10~12	46.67	++
1/2MS	0.5	0.5	1	10~13	60.00	++
1/2MS	0.5	1.0	1	10~12	53.33	++

升,以 1/4MS 最佳;1 mg/L 6-BA 更有利于紫萁原叶体的发育;NAA 浓度为 0.01 mg/L,原叶体长势较好;0.1~1 mg/L 2,4-D 均有利于紫萁原叶体的发育,其中 0.5 mg/L 为最佳浓度;还未完全成熟的孢子体的萌发率较高,最高达 50% 以上。在 2% 蔗糖+1/4MS+1 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D 和孢子体未完全成熟的条件下,更有利于紫萁原叶体的发育。

参考文献:

[1]何义发. 经济蕨类植物紫萁的研究进展与展望[J]. 湖北农业科学,2002(6):101-103.

[2]王谋强,励启腾. 薇菜干的营养品质分析[J]. 植物资源与环境,1995,4(2):63-64.

[3]张 钟,史竹兰. 三种薇菜产品营养成分的分析与比较[J]. 中国林副特产,2007,86(1):1-4.

[4]张 敏. 薇菜组织培养技术[J]. 北方园艺,2008(2):206-208.

[5]张 敏,张曙光,孙红绪. 紫萁(薇菜)的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2004,40(2):194-194.

[6]何义发. 紫萁孢子萌发与孢子体形成进程的调控[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2003,21(1):65-67.

[7]何义发,罗世家,王柏泉. 薇菜孢子繁殖“三段式”育苗培茔技术研究[J]. 湖北农业科学,2001(2):53-55.

[8]袁 艺,田胜尼,叶爱华,等. 紫萁快速繁殖技术的研究[J]. 园艺学报,2002,29(3):247-250.

[9]张泽宏,何义发,周吉源,等. 紫萁组织培养的探究[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),2008(4):108-112.

[10]姜述君,冯延江,黎玉梅,等. 薇菜孢子人工繁殖的环境条件[J]. 中国蔬菜,2001(5):11-13.

[11]韩见宇,懂 艳,孙 超,等. 桂皮紫萁的孢子繁殖[J]. 贵州科学,1998,16(1):69-72.