GA_3及不同比例MS培养基对蕨菜孢子萌发的影响

翟国燕　边　珂　贾克功　朱立新

摘　要　采用300 mg·L^{-1} GA_3及不同比例的MS培养基对当年和上一年采集的蕨菜孢子进行萌发试验。结果表明,GA_3处理可以促进孢子提早萌发,并且可提高上一年孢子的萌发率,但对提高当年新采集的孢子萌发率作用不明显。全MS培养基对提高孢子萌发量效果最好。

关键词　蕨菜　孢子萌发　GA_3　MS培养基

蕨菜〔*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. var. *latiusculum* (Desv.) Underw.〕为凤尾蕨科蕨属多年生草本植物,富含各种微量元素、氨基酸、维生素、淀粉、生物碱等营养成分[1],是一种兼有食用、药用价值的野生经济作物。幼嫩的叶柄及未开展的羽状复叶可供食用。野生蕨菜可食用部分的采摘期很短,无法满足市场需求,因此,对蕨菜进行人工繁殖和栽培势在必行。

翟国燕,中国农业大学农学与生物技术学院,北京市海淀区圆明园西路2号,100094

边珂,贾克功,朱立新(通讯作者,E-mail:yyzzl@cau.edu.cn),中国农业大学农学与生物技术学院,北京市海淀区圆明园西路2号,100094

收稿日期:2007-01-11;修回日期:2007-04-16

目前关于蕨菜人工繁殖技术,主要有孢子播种繁殖法、根茎繁殖法及组织培养法[2-3]。根茎繁殖法虽然成株率和成活率都较高[3],但繁殖率较低,而且大量挖取根茎易破坏植被,造成水土流失。张金文等[4]将孢子播种在森林土等基质上,得到孢子体幼苗,但仍存在孢子萌发成苗率低等诸多问题,不能满足大量用苗的需要。

在离体条件下进行孢子培养得到孢子体幼苗,可实现批量生产、统一管理,具有成本低、管理方便等优点。该方法在蕨类植物上已有报道[5-9],但缺乏系统性研究和成熟的方法。本试验对离体条件下的蕨菜孢子繁殖方法进行系统研究,以提高蕨菜孢子在人工繁殖条件下的萌发率,为蕨菜的人工栽培和开发提供依据。

The Establishment and Application of Isolated Microspore Culture Technology System in Brassica campestris L. ssp. chinensis var. communis Tsen et Lee

Wang Chaonan, Feng Hui, Jiang Fengying, et al (College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Liaoning 110161)

Abstract　Isolated microspore culture was carried out with ten F_1 hybrids of pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee). The frequency of embryogenesis, embryos germinated seedling, subculture and root-age of regenerated plantlets, uniform identification of horticultural characters from the DH line progenies and hybrid made with DH lines were studied. The results showed that genotypes had remarkable effect on embryoid induction. Using semi-content of macro-elements in NLN - 13 medium increased the embryoid induction and the frequency of embryogenesis reached 100 %. The suitable concentration of 6 - BA and NAA remarkably enhanced the frequency of embryogenesis. MS medium with 1.0 % agar content was optimal for plantlet regeneration, survival rate of embryo was 85.88 %. MS + 3 % sucrose + 0.8 % agar was the optimal medium for subculture and renewal of pakchoi. MS + 3 % sucrose + 0.8 % agar + NAA 0.1 mg·L^{-1} was the suitable medium for rooting. Analysis of horticultural characters indicated that the DH lines and hybrid made with them were uniform.

Key words　Pakchoi, Microspore culture, Embryoid, Double haploid

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验材料为从内蒙古阿尔山市引种的食用蕨类,种植于中国农业大学科学园区。7月初采摘带有棕褐色孢子囊的成熟叶片,存放在干净的硫酸纸袋内,置于阴凉干燥处,待孢子囊自然开裂即得到成熟孢子。

1.2　试验方法

1.2.1　GA_3处理　试验于2005年9～12月进行。以2004年常温(硫酸纸袋封存,置于室内)保存的孢子(上一年孢子)、2005年常温保存及2005年低温(广口瓶封存,放入4 ℃冰箱中)保存的孢子(当年孢子)为试材。将培养皿和滤纸分别用70 %的酒精消毒,用无菌水冲洗3遍后将滤纸铺在培养皿底部。用药匙取少量孢子接种于滤纸上,加300 mg·L^{-1}的GA_3溶液2 mL培养,以润湿滤纸并让孢子均匀散布于滤纸上为准。空白对照加入等量的无菌水。各处理均放置于光照培养室内培养,温度25 ±1 ℃,光照16 h·d^{-1}。1个培养皿为1次重复,每处理4次重复。于接种后隔天观察,每个培养皿取两个不同位置的孢子液各一滴混合后滴于载玻片上,在400倍光学显微镜下观察5个视野,以孢子伸出初生假根为准计算孢子萌发率,以孢子出现绿色丝状体原始细胞为准计算丝状体原始细胞萌发率。

1.2.2　不同比例MS培养基处理　不同比例的MS培养基是指含MS全量Fe盐及有机成分相同,仅改变大量元素及微量元素的配比[2]。试验设MS、4/5 MS、3/5 MS、1/2 MS、1/5 MS、1/10 MS共6个处理。培养基配好后用NaOH调节pH至5.6～5.8,121 ℃下20 min高压灭菌。按每个培养瓶30 mL分装后备用。

孢子消毒及接种:用药匙量取孢子约0.3 g放入小烧杯中,加5 % NaClO消毒4 min,用无菌水冲洗烧杯若干次并在小漏斗中过滤,待NaClO充分漂洗干净后加入无菌水配成一定孢子浓度(约1 ×10^6个·mL^{-1})的悬浊液,用滴管吸取接种于培养基上。每个处理6次重复,1个培养瓶为1次重复。分别于接种后5、10、15、20 d统计培养基表面的孢子萌发量(以出现绿色丝状体原始细胞为准)。观察方法同GA_3处理。数据方差分析、多重比较采用STK法。

2　结果与分析

2.1　GA_3处理对不同年份和不同保存方式的蕨菜孢子萌发的影响

孢子的萌发过程是先吸胀变亮,伸出无色突起,而后逐渐伸长为初生假根,假根内无叶绿体;随后从孢子壁开裂处长出一个绿色细胞,该细胞为丝状体原始细胞,方向与初生假根伸长方向相反;之后绿色细胞体积增大,并进行分裂,逐步进入丝状体、片状体时期,而后形成肉眼可见的成熟原叶体,呈宽圆状心脏形。丝状体原始细胞是进行后期生长的前提[10],因此,统计丝状体原始细胞的萌发率,可以作为孢子生命力测定的指标之一。

由表1可知,当年孢子的萌发率明显高于上一年孢子的萌发率,而当年低温保存的孢子萌发率和常温保存的差异不大。当年低温保存的孢子经无菌水处理11 d后萌发率达31.00 %,常温保存为20.49 %,而上一年常温保存的孢子萌发率只有4.68 %。从萌发时间看,接种3 d后,两种保存方式的当年孢子全部开始萌发,而上一年孢子未经GA_3处理的则在接种7 d后才开始萌发。说明采用孢子繁殖时以当年采集的孢子为好;且低温贮藏有利于孢子的萌发。GA_3处理可促进上一年常温保存的孢子提早萌发,并可提高孢子的萌发率;而对当年孢子来说,GA_3处理有促进孢子提早萌发的作用,但不能提高孢子的萌发率。

表1　GA_3处理后不同年份和不同保存方式的蕨菜孢子萌发率和丝状体原始细胞萌发率

孢子	处理	孢子萌发率/%					丝状体原始细胞萌发率/%				
		3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
当年孢子低温保存	GA_3	20.41	17.36	21.28	24.91	23.52	9.30	19.77	19.89	23.91	23.36
	无菌水(CK)	15.14	14.93	20.03	21.89	31.00	4.54	12.28	19.35	20.37	30.99
当年孢子常温保存	GA_3	9.59	9.84	12.30	16.66	21.83	0	3.55	10.58	15.93	20.83
	无菌水(CK)	4.05	12.66	18.63	18.94	20.49	0	8.96	17.78	18.94	19.91
上一年孢子常温保存	GA_3	10	4.58	9.79	7.01	7.01	0	3.83	5.90	3.79	3.79
	无菌水(CK)	10	10	5.88	4.68	4.68	0	0	6.02	2.43	2.43

注:表中萌发率小于前一次调查,可能是由于每次观察的视野不同所致。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由表 1可见,当年低温保存的孢子接种 3 d后即出现丝状体原始细胞,当年常温保存的孢子于接种 5 d后出现;上一年常温保存的孢子未经 GA_3 处理的则在接种 7 d后才出现。同时还可看出,GA_3 处理对丝状体原始细胞的出现无明显促进作用,这可能与 GA_3 仅促进细胞分裂,而非促进叶绿体的形成有关。

综合表 1可以看出,初生假根的萌发与丝状体原始细胞的出现基本趋势一致。上一年常温保存的孢子丝状体原始细胞萌发率明显低于初生假根萌发率,表明孢子生命力已大大下降,仅能萌发,而很难进一步分化形成原叶体。

2.2 不同比例 MS培养基对蕨菜孢子萌发的影响

表 2表明,全 MS培养基的孢子初期萌发量及后期萌发量明显高于其他处理,处理后 20 d,全 MS培养基上的孢子萌发量显著高于其他处理。随培养基营养成分的降低,孢子萌发量呈递减的趋势。因此认为,全 MS培养基对提高孢子的萌发量效果最佳。

表 2 不同比例 MS培养基上的蕨菜孢子萌发量

处理	孢子萌发量/个			
	5 d	10 d	15 d	20 d
MS	3 a	44 bB	49 bB	51 bA
4/5 MS	0 a	28 bAB	35 abA	35 aA
3/5 MS	0 a	27 bAB	40 bA	43 aA
1/2 MS	1 a	14 aA	24 aA	33 aA
1/5 MS	0 a	18 aA	25 aA	28 aA
1/10 MS	1 a	14 aA	16 aA	21 aA

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($\alpha = 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($\alpha = 0.01$)。

3 结论与讨论

蕨菜采用孢子人工繁殖时,以当年采集的孢子为好,萌发率较高,且以低温保存效果最好,萌发率高于常温保存。上一年采集的孢子萌发率较低,经 GA_3 处理后也仅有 7.01 %,且其中又有近 50 %的孢子不能萌发出绿色丝状体原始细胞。GA_3 处理可以促进孢子提早萌发,并且可提高上一年孢子的萌发率,但对提高当年新采集的孢子萌发率作用不明显。

全 MS培养基接种的孢子萌发量最高,随培养基营养成分的降低,孢子萌发量递减。因此,蕨菜孢子前期萌发以全 MS培养基效果最好。

参考文献

[1] 郝丽珍,赵富宝,马立国,王萍,张受远,张焕莲. 蕨菜植物学特征及孢子繁殖技术[J]. 内蒙古农业科技,1994(5):27.

[2] 贾探民,杜双田. 蕨菜的孢子繁殖技术[J]. 中国蔬菜,1999(8):37-38.

[3] 滕瑶,王晓花,王德斌,王瑞明,朴楚炳. 蕨菜的栽培技术[J]. 延边大学农学学报,2002,24(4):279-281.

[4] 张金文,牛俊义. 培养基质、赤霉素和硼对蕨菜孢子萌发成苗影响的研究[J]. 草业学报,1999,8(1):62-67.

[5] 徐艳,石雷,刘燕,李东. 大叶黑秕椤孢子的无菌培养[J]. 植物生理学通讯,2004,40(1):72.

[6] 徐艳,石雷,刘燕,刘保东,李东. 江南星蕨配子体形态发育的研究[J]. 植物学通报,2004,21(6):660-666.

[7] 徐艳,石雷,刘保东,李东. 阔鳞瘤蕨(水龙骨科)配子体形态发育的研究[J]. 植物研究,2005,25(1):34-37.

[8] Douglas G E, Sheffield E. A new technique for the culture of fern gametophytes[J]. Plant Cell Reports, 1990, 8(10): 632-634.

[9] Melan M A, Whittier D P. Effects of inorganic nitrogen sources on spore germination and gametophyte growth in *Botrychium dissectum*[J]. Plant Cell and Environment, 1990, 13(50): 477-482.

[10] 陈维伦,郭东红,石雷,朱至清. 蕨类植物的离体种质保存[C]//纪念秦仁昌论文集. 北京:中国林业出版社,1999:412-416.

Effect of GA_3 and MS Medium Ratio Treatments on Spore Germination of Wild Brake

Zhai Guoyan, Bian Ke, Jia Kegong, et al (College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract In order to study the effect on spore germination of wild brake [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn], GA_3 300 mg·L^{-1} and different MS medium ratios treatments were set. The results showed that GA_3 300 mg·L^{-1} could promote the spore germination earlier and could increase the germination rate of spore which was collected in the last year, but there was no visible impact on the germination rate of spore which was collected in the current year. The complete MS medium was optimal for spore germination.

Key words *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, Spore germination, GA_3, MS medium

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net