李腾敏,刘雯雯,饶倩,等.白桫椤GGB途径快速繁殖与不完全组织培养[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(4):42-50.
Li T M, Liu W W, Rao Q, et al.Rapid proliferation via GGB and partial tissue culture of *Sphaeropteris brunoniana*[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(4):42-50.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202402030

白桫椤GGB途径快速繁殖与不完全组织培养

李腾敏[1],刘雯雯[2],饶倩[3],陈彧[1],韩豫[1],吴二焕[1],饶丹丹[1*]

(1.海南省林业科学研究院/海南省红树林研究院,海南 海口 571100;2.海南大学 热带农林学院,海南 海口 570228;
3.海口市金牛岭公园管理处/海口市园林科学研究所,海南 海口 570206)

摘　要:[目的]优化白桫椤的组织培养技术,可缩短植株繁育周期,进一步提高繁育效率。[方法]本研究以白桫椤的孢子为外植体,研究不同基本培养基对孢子萌发的影响;探讨不同植物生长调节剂对绿色球状体(GGB)诱导和增殖的影响;通过不完全组织培养法,筛选孢子体转化的最佳基质和培养方式。[结果]诱导孢子萌发最佳基质为1/10 MS,萌发率69.55%,10 d可见孢子萌发,在1/2 MS培养基下孢子萌发存在抑制情况;GGB诱导培养基以1/2 MS+NAA 0.2 mg•L^{-1}较适宜,诱导率为92.22%;GGB增殖培养基以1/2 MS+NAA 0.1～0.5 mg•L^{-1}+IBA 0～0.1 mg•L^{-1}较适宜,60 d增殖系数可达6.14;活性炭也有利于GGB增殖,其中1/2 MS+NAA 0.1 mg•L^{-1}+活性炭1.0 g•L^{-1}增殖效果最好,60 d增殖系数可达7.84;因孢子体难以在组培过程中直接获得,通过将GGB团移栽至瓶外基质中能成功诱导出孢子体,最适基质为泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1),移栽90 d转化率为43.33%;Knauss不完全组织培养法在白桫椤离体繁殖中的具有可行性,在基质为泥炭:珍珠岩(1:1)时,32 d即能成功诱导出孢子体,孢子体转化率高达86.67%。[结论]通过GGB途径可以实现白桫椤的快速增殖,不完全组织培养法能有效提高幼孢子体的转化率,为白桫椤规模化生产育苗提供技术支撑。

关键词:白桫椤;绿色球状体;孢子体;不完全组织培养;离体快繁
中图分类号:S722.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)04-0042-09

白桫椤(*Sphaeropteris brunoniana*)隶属桫椤科(Cyatheaceae)白桫椤属(Sphaeropteris),是树形蕨类植物,茎干笔直高大,叶片三回羽状深裂,叶柄禾秆色,常被白粉,每裂片有孢子囊群7～9对,位于叶缘与主脉间,无囊群盖[1]。白桫椤作为国家二级保护植物,主要分布在我国的海南、云南、西藏等地,位于海拔500～1150 m的常绿阔叶林缘及山沟谷底[2]。因其孑遗性物种的地位和叶形奇特、树姿优美的外形特征,具有重要的观赏、科研和保护价值。

作为蕨类植物的白桫椤,其生殖方式较其它陆生植物的重要区别在于具有独立的配子体和孢子体世代。配子体世代即单倍体世代,由孢子发育成初期配子体,配子体继续生长为成熟原叶体且具有精子器和颈卵器,精子和卵细胞会进行受精作用。从受精卵开始进入孢子体世代(二倍体世代),通过有丝分裂从幼孢子体逐步发育为带有孢子囊的成熟孢子体,至此2个世代相互交替组成1个循环体系[3-4]。蕨类植物的配子体微小,精子是单细胞、无保护的游动个体,需在自然水中游动进入颈卵器,因此其生殖过程极易受到环境的影响,孢子从萌发到下一代孢子体长成约需1年,极大程度上影响其分布和种群更新[5]。因此,利用植物组织培养技术进行白桫椤的批量生产成为解决目前种群资源问题的有效途径之一。

关于白桫椤人工繁殖方面的研究仅见于部分报道。蒋胜军等[6]发现赤霉素预处理孢子囊以及添加低浓度萘乙酸(NAA)、激动素、苄氨基腺嘌呤

收稿日期:2024-02-26　　**修回日期**:2024-06-25
基金项目:海南省科研院所技术创新专项(SQKY2022-0027)
作者简介:李腾敏(ORCID:0009-0007-4873-6358),硕士,助理研究员,研究方向:林木培育
*通信作者:饶丹丹(ORCID:0009-0002-1951-9163),林业工程师,研究方向:林木培育,E-mail:raodand@163.com

(BA)有利于缩短孢子萌发时间。陈贵菊等[7]研究表明,培养于腐殖质土和赤红土基质的配子体的形态发育及有性繁殖存在差异,光照条件差异对配子体形态也存在影响。王紫娟等[8]探究了不同培养基对白栎椤孢子萌发和配子体的发育的影响,认为1/8 MS最有利于孢子萌发和发育,即高盐浓度的培养基不适合白栎椤孢子的人工扩繁。目前,关于白栎椤组织培养仍停留在孢子萌发和配子体发育阶段,对于配子体增殖、孢子体诱导分化研究较为少见。为解决孢子体形成的分化时间长、诱导率低,易污染死亡等问题,Knauss[9]提出不完全组织培养法(partial tissue culture method),通过将原叶体团与1/2 MS液体培养基混合搅切,所得混合液加入固体培养基或直接倒入灭菌后的基质中诱导孢子体形成。此法不仅提高了银粉背蕨(*Cheilanthes argentea*)、瘤蕨(*Phymatosorus scolopendria*)、有柄石韦(*Pyrrosia petiolosa*)、金毛狗脊(*Cibotium barometz*)等蕨类植物的原叶体增殖率,且加速孢子体的驯化,有利于幼孢子体苗的成活,但Kodym等[10]发现食蕨(*Pteridium esculentum*)的配子体匀浆并不能产生孢子体,这可能跟不同蕨类植物的孢子体形成特性有关。由此可知,不完全组织培养在蕨类植物繁殖应用上具有可行性。

本试验以白栎椤为试材,通过孢子无菌培养与孢子体常规诱导相结合的不完全组织培养方式,探究孢子萌发最适培养基、原叶体绿色球状体(GGB)诱导增殖配方、孢子体转化的诱导基质,完善白栎椤快速繁殖体系,为其规模化育苗提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验材料有白栎椤孢子、原叶体、原叶体绿色球状体(GGB)。白栎椤的孢子采集于海南岛吊罗山(18°43′～18°58′ N,109°03′～110°43′ E)。选择成熟但未裂开的孢子囊的叶片,放到干净纸袋中,在自然通风条件下晾干,将孢子囊自然开裂产生的孢子过筛,收集于离心管内,并放于4 ℃冰箱中储存备用。

1.2　试验方法

1.2.1　孢子的消毒处理

于2 mL经高压灭菌的EP离心管中加入0.25 mL左右的白栎椤孢子,加入无菌水,充分振荡,静置3 h;无菌水清洗,离心机4000 r·min^{-1}离心1 min,重复3次;加入75%酒精震荡20 s进行消毒处理,无菌水清洗3次;再加入4%～5% NaClO溶液,震荡加离心4 min,无菌水清洗4次,最后加入无菌水制成孢子悬浊液。

1.2.2　孢子的无菌萌发

设置1/2 MS、1/5 MS、1/10 MS以及WPM共4种培养基,pH5.8,卡拉胶浓度11 g·L^{-1},经121 ℃高压灭菌锅灭菌20 min后分装至直径6 cm培养皿中。用移液枪将经过灭菌处理的孢子悬浊液摇匀后接种在培养皿中,每处理10皿,每皿接种0.2 mL,重复3次,用封口膜封口。先遮光处理24 h,以促进孢子同步萌发。培养条件为(23±2) ℃,光照强度15～20 μmol·m^{-2}·s^{-1},光周期12 h。在日光灯下,以肉眼可见绿色小点时判断为孢子萌发。接种30 d后采用光学显微镜,随机选取10个显微视野,统计孢子总数和萌发的孢子数,接种60 d后观察其生长形态。

$$\text{孢子萌发率}=(\text{视野中萌发孢子数}/\text{视野中孢子总数})\times 100\% \quad (1)$$

1.2.3　GGB诱导

将萌发生长的原叶体转接至GGB诱导培养基上,采用随机区组设计培养基配方,以1/2 MS为基本培养基,添加6-苄氨基嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA),以不添加生长调节剂为对照(CK),设置4种诱导培养基:(1)1/2 MS+6-BA 0 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1};(2)1/2 MS+6-BA 0 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1};(3)1/2 MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1};(4)1/2 MS+6-BA 0.2 mg·L^{-1}+NAA0.3 mg·L^{-1}。各培养基均加蔗糖30 g·L^{-1},卡拉胶11 g·L^{-1},pH 5.8。每瓶接种原叶体8个,每个处理10瓶,重复3次。培养条件同1.2.2。60 d后调查记录GGB诱导情况,计算诱导率并观察生长状态。

$$\text{GGB诱导率}=(\text{已诱导产生GGB的原叶体数}/\text{接种的原叶体数})\times 100\% \quad (2)$$

1.2.4　增殖培养试验

将前期预试验培育的原叶体团转入GGB增殖培养基上,培养基配方设计采用L16(4^3)正交,试验因素和水平见表1,以1/2 MS为基本培养基,考虑6-BA、NAA、吲哚丁酸(IBA)3个试验因素,

每一因素4个水平。各培养基均加蔗糖30 g·L^{-1},卡拉胶11 g·L^{-1},pH 5.8。每瓶接种5块直径为0.7 cm的GGB团,每个处理10瓶,重复3次。培养条件同1.2.2。60 d后测量其面积,计算增殖系数并观察GGB生长状态。

表1 6-BA、NAA和IBA因素水平

Table 1 Levels of 6-BA, NAA, and IBA **单位**:mg·L^{-1}

水平 Level	6-BA	NAA	IBA
1	0	0	0
2	0.05	0.05	0.05
3	0.1	0.1	0.1
4	0.5	0.5	0.5

以增殖获得的GGB为材料,在1/2 MS+0.1 mg·L^{-1} NAA配方基础上,添加不同浓度的活性炭,分别为0、0.05、0.1、0.5 mg·L^{-1},培养条件同1.2.2,60 d后测量并计算增殖系数。

GGB增殖系数=(增殖后原叶体面积/接种时原叶体面积)×100% (3)

1.2.5 孢子体的诱导

基质的常规诱导:设泥炭、河沙、椰糠、混合基质(1泥炭:1珍珠岩)、混合基质(2泥炭:1珍珠岩:1椰糠)5种基质,基质分别过30目筛,121 ℃高压蒸汽灭菌30 min。选用72格规格为4 cm×4 cm的种植盘,用5% NaClO溶液消毒,填装基质至穴孔高度2/3,纯净水浇透。将增殖后的GGB清洗基部后种植于穴盘,每个处理移栽10团1 cm^{2}绿色团状小球,3次重复,放入培养室,培养条件为12 h周期性光照,光照强度15~20 μmol·m^{-2}·s^{-1},温度15/25 ℃。每2 d喷1次超纯水,保持土壤湿润。记录每种处理第一片孢子小叶片转化的日期,即成功诱导日期,90 d后统计其转化率。

孢子体转化率=(转化孢子体团数/接种团数)×100% (4)

不完全组织培养:基于Knauss不完全组织培养法(原叶体团搅切法),先量取10 cm^{2}增殖后的绿色团状小球,切碎至直径大小为0.3~0.5 cm,与1/2 MS液体培养基以1:20比例混合,将含原叶体碎片的混合液均匀播于装有灭菌的泥炭:珍珠岩(1:1)基质的种植盘上,每个处理10格,3次重复。播种后,定期喷洒超纯水,统计时间同上。

孢子体转化率=(转化孢子体格数/总接种格数)×100% (5)

1.2.6 孢子体移栽

待孢子体生长出2~3片小叶后,移栽至泥炭:珍珠岩(2:1)的基质中,每天喷雾并遮阴,观察记录存活情况。

1.2.7 数据统计与分析方法

本文采用单因子试验和多因子正交试验设计。数据记录、统计和绘图采用Excel 2015,使用SPSS 22.0软件对结果进行数据统计、差异显著性检验、方差分析及多重比较(LSD法)。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对白栾椤孢子萌发的影响

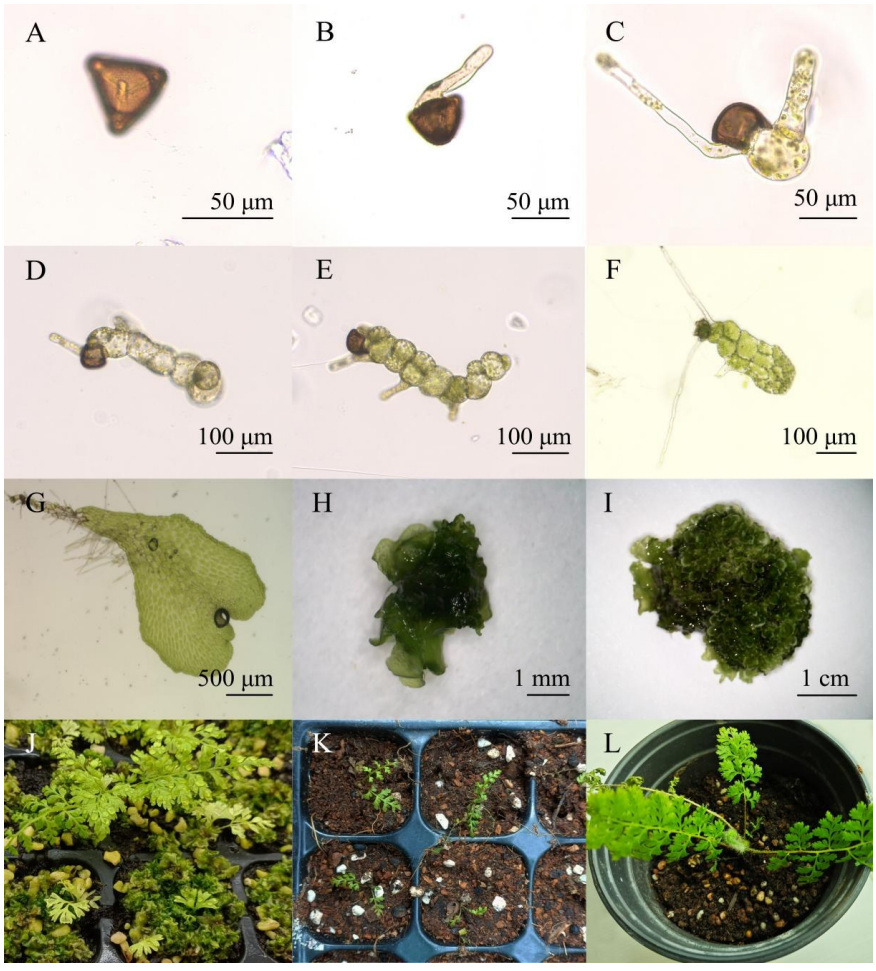
从表2可知,4个处理均可观测到白栾椤孢子萌发现象,各处理间萌发率差异显著。其中1/10 MS培养基萌发最早,萌发时间为12 d,平均萌发率也最高,为69.55%,与其它培养基差异显著,而在1/2 MS培养基上孢子萌发时间最长(15 d),萌发率最低(23.67%)。60 d后均可观测到孢子萌发后配子体发育的不同形态阶段(图1A~图1G),在1/10 MS培养基上仍保持在丝状体阶段(图1D~图1E),1/5 MS和WPM培养基则为片状体(图1F),只1/2 MS生长到心形原叶体(图1G)。通常情况下,1/2 MS、1/5 MS、1/10 MS培养基分别代表MS培养基无机盐水平为1/2、1/5和1/10,说明低浓度的无机盐更利于白栾椤孢子的萌发,高浓度无机盐则更促进原叶体生长。

2.2 生长调节剂对白栾椤GGB诱导的影响

在对照及4个处理的培养基上可见心形原叶体由浅绿转深绿产生类似兰花原球茎的绿色球状体GGB(图1H)。由表3可知,各处理间GGB诱导差异显著,其中处理1的GGB诱导率显著高于其它处理,为92.22%,为其最佳诱导培养基。

2.3 生长调节剂对白栾椤GGB增殖的影响

GGB增殖培养60 d时统计其增殖系数,结果见表4、图2和表5。表4结果表明,因素A、B、C不同水平处理结果存在显著性差异。由图2可见,在同因素不同水平增殖倍数对比中,因素A(6-BA



A:孢子;B:初生假根;C:孢子萌发;D~E:丝状体;F:片状体;G:心形原叶体;H:配子体诱导产生GGB;I:GGB转化原叶体团;J:原叶体分化;K:孢子体;L:幼苗移栽

A: Spores; B: Primary rhizoid; C: Spore germination; D~E: Protomema; F: Plate; G: Heart-shaped protophytes; H: Gametophyte-induced GGB; I: Protophyll of GGB transformation; J: Prothallus differentiation; K: Sporophyte; L: Seedling transplanting

图1　白栎椤孢子不完全组织培养过程

Fig.1　Partial tissue culture process of *S. brunoniana* spore

表2　不同基本培养基下白栎椤孢子萌发情况

Table 2　Germination of spore of *S. brunoniana* in different basic medium

培养基 Medium	萌发率/% Germination rate	萌发时间/d Germination time
1/2MS	23.67±1.80c	15
1/5MS	49.93±3.95b	12
1/10MS	69.55±3.55a	10
WPM	42.56±5.28b	12

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$)

浓度)为0 mg·L^{-1}时GGB平均增殖倍数同组最高且与其它水平差异性显著;因素B(NAA浓度)的GGB平均增殖倍数会随着水平浓度的升高呈现先升高后降低的趋势,以浓度达到0.1 mg·L^{-1}为最高,0.5 mg·L^{-1}次之,二者皆显著高于0 mg·L^{-1}浓度水平的增殖倍数;因素C(IBA浓度)浓度水平为0.05 mg·L^{-1}时GGB平均增殖倍数最高,且处理浓度在0~0.1 mg·L^{-1}间差异不显著。

根据极差分析中R值可知(表5),不同因素对GGB增殖影响的主次关系排序为A>B>C,说明6-BA是影响GGB增殖的主要因子,其次是NAA,而IBA对增殖的影响较小。综上分析可得,GGB增殖的最佳配方为1/2 MS+NAA 0.1~0.5 mg·L^{-1}+IBA 0~0.1 mg·L^{-1},平均增殖系数可达6.14。

2.4　活性炭对白栎椤GGB增殖的影响

从表6可知,不同水平浓度活性炭处理间的GGB

表3 不同培养基下诱导白栎楔配子体产生GGB情况

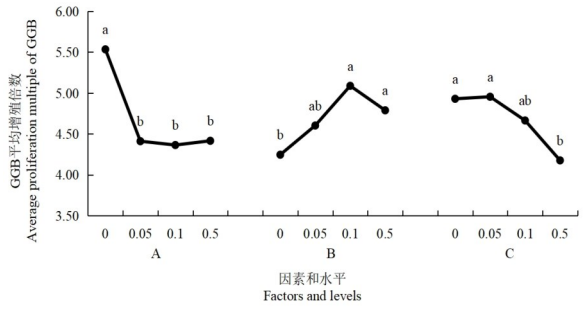
Table 3 GGB induced by the gametophytes of *S. brunoniana* in different media

处理 Treatment	培养基 Medium	诱导率/% Induction rate
CK	1/2 MS	31.27±2.56e
1	1/2 MS+6-BA 0 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1}	92.22±3.47a
2	1/2 MS+6-BA 0 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1}	70.00±3.33c
3	1/2 MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1}	78.89±1.92b
4	1/2 MS+6-BA 0.2 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1}	50.00±3.33d

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$)

增殖差异性显著。在1/2 MS+NAA 0.1 mg·L^{-1}的



不同小写字母表示同因素处理间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters indicated significant differences between treatments of the same factor ($P<0.05$)

图2 同因素不同水平GGB增殖对比

Fig.2 Comparison of GGB proliferation at different levels of the same factor

基础上,随着活性炭浓度的升高,GGB平均增殖系数呈先逐渐上升的变化趋势,当活性炭浓度为1 g·L^{-1}时达到最高(7.84),较其它处理存在显著性差异,说明活性炭的添加对于白栎楔GGB增殖的作用明显。

2.5 不同基质对白栎楔孢子体转化的影响

结果显示,基质对孢子体诱导有显著影响(表7)。以泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1)基质上孢子体形成时间最早,为42 d;椰糠和泥炭:珍珠岩(1:1)基质次之,分别为55 d和57 d;泥炭基质的孢子体形成时间最晚,为64 d;而河沙基质无孢子体形成且移栽的绿色团状小球皆死亡(图3B)。此外,不同基质处理的孢子体转化率有显著差异。泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1)基质的孢子体转化率最高,达43.33%,显著高于泥炭和泥炭:珍珠岩(1:1)基质;椰糠基质的孢子体转化率次之(36.67%),且与泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1)基质不存在显著性差异。由上可知,GGB移栽的最佳诱导基质为泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1)。

另外,通过原叶体碎片与无机盐溶液的混合播种,碎片在基质上能成功再生成完整的心形原叶体并进行快速的增殖,在播种后第32 d成功诱导出第一株孢子体,继续培养58 d统计孢子体的转化率,可达86.67%。

2.6 炼苗及移栽

将白栎楔幼孢子体从穴盘中移出,栽至装有泥炭:珍珠岩(2:1)的基质中(图1K)。移栽过后30 d,通过观察,发现孢子体小叶能够继续生长,并且伴随新叶生出,即代表植株成活,最终统计成活率在95%,并于60 d后将长成的幼苗植株移栽成盆苗(图1L)。

3 讨论

蕨类孢子拥有低成本、繁殖系数大和繁殖力强等优点,因此常作为组织培养的外植体材料[11-12]。此外,作为目前使用最普遍的培养基MS培养基,其配方包含大量元素、微量元素、铁盐和有机成分,特点是含有较高的无机盐与离子浓度,从MS~1/10 MS指大量元素含量为MS培养基全

表4 生长调节剂对白栎楔GGB增殖影响的方差分析

Table 4 Variance analysis of the effects of growth regulators on GGB proliferation of *S. brunoniana*

因素 Factor	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	H统计量 H statistic	*P*值 *P* value
A(6-BA)	11.647	3	3.882	10.980	0.000
B(NAA)	4.476	3	1.492	4.220	0.011
C(IBA)	4.685	3	1.562	4.416	0.009
误差	13.437	38	0.354		

表5　生长调节剂对白栾椤GGB增殖影响的极差分析

Table 5　Range analysis of the effects of growth regulators on GGB proliferation of *S. brunoniana*

处理 Treatment	因素 Factor			平均增殖系数 Average proliferation coefficient
	A: 6-BA/(mg·L^{-1})	B: NAA/(mg·L^{-1})	C: IBA/(mg·L^{-1})	
1	0	0	0	4.89±0.15
2	0	0.05	0.05	5.66±0.19
3	0	0.1	0.1	6.14±0.15
4	0	0.5	0.5	5.45±0.75
5	0.05	0	0.05	4.62±0.67
6	0.05	0.05	0	4.74±0.54
7	0.05	0.1	0.5	3.48±0.12
8	0.05	0.5	0.1	4.81±0.64
9	0.1	0	0.1	3.81±0.26
10	0.1	0.05	0.5	4.12±0.35
11	0.1	0.1	0	5.36±0.50
12	0.1	0.5	0.05	4.17±0.41
13	0.5	0	0.5	3.66±0.04
14	0.5	0.05	0.1	3.90±0.27
15	0.5	0.1	0.05	5.38±0.74
16	0.5	0.5	0	4.73±0.64
K1	5.534	4.247	4.930	
K2	4.412	4.603	4.955	
K3	4.365	5.088	4.665	
K4	4.417	4.789	4.178	
R	1.169	0.842	0.778	
顺序	A>B>C			

表6　活性炭浓度对白栾椤GGB增殖的影响

Table 6　Effects of activated charcoal concentration on GGB proliferation of *S. brunoniana*

活性炭浓度/(g·L^{-1}) Concentration of activated carbon	平均增殖系数 Average proliferation coefficient	生长状况 Growth status
0	4.57±0.37c	翠绿,紧密簇生
0.5	6.65±0.48b	翠绿,疏松膨大
1	7.84±0.42a	翠绿,疏松膨大

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$)

量的1~1/10,是无机盐浓度水平的体现。鉴于前人研究可知,不同蕨类植物孢子萌发所需的MS培养基无机盐浓度不同,王阳等[13]研究发现东北对开蕨(*Phyllitis japonica*)孢子在培养基为1/4 MS

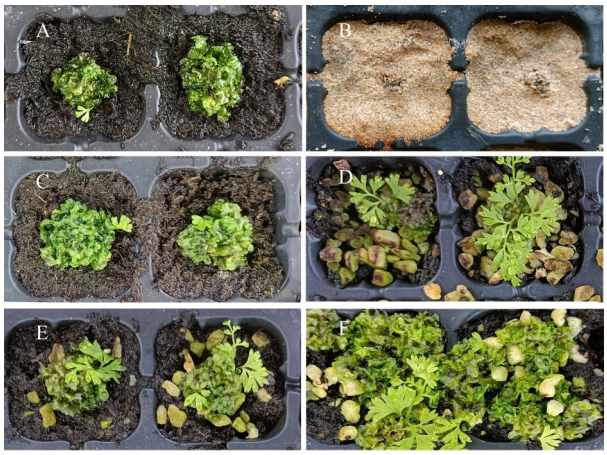
表7　不同基质对孢子体转化的影响

Table 7　Effects of different substrates on sporophyte transformation

	基质 Substrate	第一株孢子体出现时间/d The appearance time of the first sporophyte	孢子体转化率/% Spore conversion rate
常规诱导	泥炭	64	13.33±5.77c
	河沙	—	0.00±0.00d
	椰糠	57	36.67±5.77ab
	泥炭:珍珠岩(1:1)	55	26.67±5.77b
	泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1)	42	43.33±5.77a
不完全组织培养	泥炭:珍珠岩(1:1)	32	86.67±11.55

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$)



A:泥炭;B:河沙;C:椰糠;D:泥炭:珍珠岩(1:1);E:泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1);F:泥炭:珍珠岩(1:1)

A: Peat; B: River sand; C: Coconut bran; D: Peat:perlite (1:1); E: Peat:perlite:coconut bran (2:1:1); F: Peat:perlite (1:1)

图3　不同基质孢子体的形成情况

Fig. 3　Formation of sporophytes in different matrixes

时萌发率最高,王晓倩等[14]发现阔鳞鳞毛蕨(*Dryopteris championii*)孢子萌发最适培养基为1/2 MS,杜金子等[15]研究表明在不含蔗糖的1/8 MS培养基上最有利于石韦(*Pyrrosia lingua*)孢子萌发。本研究显示,白栾椤孢子萌发率会随着无机盐浓度降低而上升,高浓度无机盐会抑制孢子的萌发。这与黑栾椤(*Gymnosphaera podophylla*)、栾椤(*Alsophila spinulosa*)、阴生栾椤(*Alsophila*

latebrosa)等[12, 16-17]桫椤科植物实验现象一致,即1/10 MS培养基是最有利于孢子萌发的培养基。本研究发现培养基中大量元素的含量较小即低盐浓度时更加利于白桫椤孢子萌发,推测是因加入无机盐使培养基的渗透势较高,抑制了孢子外壁破裂以及假根和原叶体细胞的发育[18]。

培养基是植物组织培养的主要营养来源,而植物生长调节剂对植物细胞的生长、分化和发育等一系列的生理变化和形态建成起着控制作用[19]。研究发现,蕨类植物发育过程中,通过调节生长调节剂可使原叶体增殖形成一种类似兰花原球茎的特殊繁殖体——GGB,GGB可继续增殖出新的团状小球,亦可发育成多个心形成熟原叶体,进而形成孢子体或完整植株[20],是重要的扩繁材料。而研究学者也进行了一系列对GGB途径的组培研究,例如鹿角蕨(*Platycerium wallichii*)、巢蕨(*Asplenium nidus*)和金毛狗脊(*Cibotium Barometz*)等蕨类植物都能成功诱导出GGB并进行组培快繁[19, 21-22]。本研究结果表明,在GGB增殖正交设计试验中,6-BA浓度是影响GGB增殖效率的主要因子,6-BA浓度越高越抑制GGB增殖,而NAA、IBA浓度次之,适宜浓度的NAA、IBA对GGB增殖起到良好的促进作用,即以1/2 MS为基本培养基,NAA适宜浓度为0.1~0.5 mg·L^{-1},IBA适宜浓度为0~0.1 mg·L^{-1},说明高浓度的生长调节剂会抑制白桫椤原叶体细胞分裂,低浓度生长调节剂有利于GGB增殖。这与波士顿蕨(*Nephrolepis exaltata*)和鹿角蕨(*Platycerium wallichii*)在诱导GGB时的结果类似,处于低激素浓度的绿色原球茎长势旺盛,而高浓度情况下小球长势较差且布满绒毛[23-24]。此外,活性炭浓度在组织培养中具有促进生长发育、抑制褐化、提升瓶苗品质的作用[25]。本研究中随着活性炭浓度的增加,GGB的增殖作用越明显,当活性炭浓度为1.0 g·L^{-1}时,GGB增殖系数最大,表明活性炭能够显著提升植物组织的生命力,在一定程度上调节植物细胞生长与分化[26]。

将配子体转化成孢子体是蕨类植物繁殖技术的关键,水分、光照和基质等因素都会影响孢子体的形成[22]。白桫椤幼孢子体生成是有性繁殖过程,精子需以水为载体,才能结合卵子形成孢子体,因此保持基质潮湿和水分供给十分重要。本研究将GGB团转移至瓶外基质培养,其中泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1)混合基质的孢子体转化率最高,达43.33%,这是因为珍珠岩能提高土壤的透气性和透水性,椰糠基质疏松,泥炭土拥有一定的贮水性,能够较早诱导出孢子体,促进幼孢子苗生长[27]。而河沙基质上GGB团生长情况最差,说明河沙水流动性过强,不能供给GGB团正常生长所需水分。另外,采用Knauss不完全组织培养法能够成功转化出白桫椤孢子体幼苗,且第一株转化时间较常规基质诱导提早了10 d,孢子体转化率达到86.67%,说明了Knauss不完全组织培养法在白桫椤离体繁殖中的可行性,且1/2 MS的添加能够有力促进破碎原叶体的再生以及增殖发育。

4 结论

针对白桫椤的繁殖技术,本研究初步建立其不完全组织培养快速繁殖体系。白桫椤孢子诱导萌发最佳基质为1/10 MS,GGB增殖培养基以1/2 MS+NAA 0.1~0.5 mg·L^{-1}+IBA 0~0.1 mg·L^{-1}较适宜,此外,添加活性炭也有利于GGB增殖,其中1/2 MS+0.1 mg·L^{-1}NAA+1.0 g·L^{-1}活性炭增殖效果最好。因孢子体难以在组培过程中直接获得,通过将GGB团移栽至瓶外基质中能成功诱导出孢子体,最适基质为泥炭:珍珠岩:椰糠(2:1:1);Knauss不完全组织培养法在白桫椤离体繁殖中的具有可行性,32 d即能成功诱导出孢子体,孢子体转化率高达86.67%。即本研究通过GGB途径的高效增殖,结合孢子体转化的设施栽培技术,有助于解决瓶内孢子体诱导率低下的问题,从而快速获得大量的幼苗,为白桫椤规范化生产奠定基础。

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-第六卷-桫椤科[M]. 北京:科学出版社,2004:249-274.
Chinese Academy of Sciences editorial board of Flora of China. Flora of China-Volume 6-Alsophilaceae[M]. Beijing: Science press,2004:249-274.

[2]严岳鸿,张宪春,马克平. 中国蕨类植物多样性与地理分布[M]. 北京:科学出版社,2013:76-147.
Yan Y H, Zhang X C, Ma K P. Pteridophytes in China diversity and distribution[M]. Beijing: Science press, 2013: 76-147.

[3]Cao J G, Dai X L, Wang Q X. Ultrastructural and cytochemical studies on oogenesis of the fern *Pteridium aquilinum*[J]. Sexual Plant Reproduction, 2012, 25(2):

147-156.

[4]Ranker T A, Haufler C H. Biology and evolution of ferns and lycophytes [M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2008:107-171, 201-294, 417-448.

[5]黄健民,王官成,张光飞,等. 桫椤[M]. 北京:中国环境科学出版社,2004:6-14.
Huang J M, Wang G C, Zhang G F, et al. Alsophila spinulosa [M]. Beijing:China Environmental Press, 2004:6-14.

[6]蒋胜军,曾霞,王胜培,等. 海南白桫椤孢子组织培养的研究[J]. 热带农业科学,2002,22(6):9-12.
Jiang S J, Zeng X, Wang S P, et al. Study of tissue culture of *Sphaeropteris hainanensis* [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2002, 22(6):9-12.

[7]陈贵菊,成晓,刘保东,等. 四种培养条件下白桫椤配子体的形态发育[J]. 云南植物研究,2008,30(4):430-432.
Chen G J, Cheng X, Liu B D, et al. Gametophyte morphological variations of *Sphaeropteris brunoniana* (Cyatheaceae) under four culture conditions[J]. Acta Botanica Yunnanica, 2008, 30(4):430-432.

[8]王紫娟,张武,蔡菲菲. 不同培养基培养对白桫椤孢子萌发及其配子体生长发育的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2016,31(5):839-843.
Wang Z J, Zhang W, Cai F F. Effects of four different media on spore germination and gametophyte development of *Sphaeropteris brunoniana*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2016, 31(5):839-843.

[9]Knauss J F. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores[J]. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 1976, 89:363 - 365.

[10]Kodym A, Lang M, Delpratt J. Propagation by partial tissue culture of Austral Bracken (*Pteridium esculentum*) for revegetation [J]. Ecological Management & Restoration, 2016, 17(2):159-163.

[11]王一诺,韦莹,李翠,等. 植物生长调节素对西南凤尾蕨组织培养的影响[J]. 湖北农业科学,2016,55(8):2117-2119.
Wang Y N, Wei Y, Li C, et al. Effects of plant growth regulators on tissue culture of *Pteris wallichianain*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(8):2117-2119.

[12]郎月婷,马长旺,于靖,等. 两种桫椤属植物组培快繁技术研究[J]. 热带作物学报,2021,42(6):1579-1588.
Lang Y T, Ma C W, Yu J, et al. Technology for rapid propagation *in vitro* of two *Alsophila* species [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(6):1579-1588.

[13]王阳,董然,顾德峰,等. 东北对开蕨孢子体诱导技术的研究[J]. 北方园艺,2014(19):93-98.
Wang Y, Dong R, Gu D F, et al. Study on sporophytic induction technology of *Phyllitis* japonica [J]. Northern Horticulture, 2014(19):93-98.

[14]王晓倩,张婷婷,孟卓,等. 阔鳞鳞毛蕨孢子的无菌繁殖[J]. 植物生理学报,2014,50(2):159-163.
Wang X Q, Zhang T T, Meng Z, et al. *In vitro* culture of *Dryopteris championii* (Benth.) C. Chr. from spores [J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(2):159-163.

[15]杜金子,李良活,李雁群,等. 不同因素对石韦孢子萌发及生长的影响[J]. 广西农业科学,2009(2):120-123.
Du J Z, Li L H, Li Y Q, et al. Effects of different factors on the germination and growth of *Pyrrosia* Lingua spores [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2009(2):120-123.

[16]张银丽,李杨,季梦成,等. 黑桫椤孢子的无菌栽培[J]. 植物生理学通讯,2007,43(6):1139-1140.
Zhang Y L, Li Y, Ji M C, et al. Spore sterile culture in *Alsophila podophylla* hook [J]. Plant Physiology Communications, 2007, 43(6):1139-1140.

[17]杨姣,杨卫诚,吴高殷,等. 基于PGGB途径优化桫椤组织培养繁殖体系研究[J]. 西北植物学报,2023,43(9):1488-1498.
Yang J, Yang W C, Wu G Y, et al. Optimization of tissue culture and propagation system of *Alsophila spinulosa* based on PGGB pathway [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2023, 43(9):1488-1498.

[18]Raghavan V. Cytology, physiology, and biochemistry of germination of fern spores [M]. International Review of Cytology. Amsterdam:Elsevier, 1980:69-118.

[19]叶秀仙,陈艺荃,方能炎,等. 鹿角蕨孢子萌发与快速繁殖技术研究[J]. 南方农业学报,2020,51(11):2773-2780.
Ye X X, Chen Y Q, Fang N Y, et al. Spore germination and rapid propagation of *Platycerium wallichii* Hook[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(11):2773-2780.

[20]张港隆,朱恩永,刘丽婷,等. 芒萁组培技术体系的优化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2023,47(2):107-114.
Zhang G L, Zhu E Y, Liu L T, et al. Optimization of the tissue culture technology system of *Dicranopteris pedata*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2023, 47(2):107-114.

[21]段杰秋,孙大宽,向建英,等. 巢蕨组培快繁技术研究[J]. 种子,2021,40(5):84-90.
Duan J Q, Sun D K, Xiang J Y, et al. Study on tissue culture and rapid propagation technology of *Asplenium nidus* [J]. Seed, 2021, 40(5):84-90.

[22]胡斌盛,徐丹,郑健云,等. 金毛狗脊不完全组织培养与快速繁殖研究[J/OL]. 分子植物育种,2023:1-17.(2023-08-15)[2024-06-25]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230815.1339.006.html.
Hu B S, Xu D, Zheng J Y, et al. Partial tissue culture and rapid propagation of *Cibotium barometz*[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2023: 1-17. (2023-08-15) [2024-06-25]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230815.1339.006.html.

[23]Loescher W H, Albrecht C N. Development *in vitro* of *Nephrolepis exaltata* cv. bostoniensis runner tissues [J]. Physiologia Plantarum, 1979, 47(4):250-254.

[24]黄韶玲,张洁莲. 鹿角蕨的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1993(1):46-47.
Huang S L, Zhang J L. Tissue culture of *Platycerium bifurcatum*[J]. Plant Physiology Communications, 1993(1):46-47.

[25]陈芳,覃顺旺,王跃华,等. 杜鹃兰类原球茎快速增殖研究[J]. 种子,2021,40(6):141-145.
Chen F, Qin S W, Wang Y H, et al. Study on rapid proliferation of protocorm-like bodies in *Cremastra appendiculata*[J]. Seed, 2021, 40(6):141-145.
[26]胡漪,王子怡,王依嘉,等. 活性炭颗粒对黄芩组织培养快速繁殖的影响[J]. 北京农学院学报,2022,37(3):14-19.
Hu Y, Wang Z Y, Wang Y J, et al. Effects of activated carbon granule on rapid propagation of *Scutellaria baicalensis* Georgi. by tissue culture[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2022, 37(3):14-19.
[27]宁珊,吴飘,李良波,等. 有柄石韦的不完全组织培养与快速繁殖[J]. 分子植物育种,2022,20(18):6121-6126.
Ning S, Wu P, Li L B, et al. Partial tissue culture and rapid propagation of *Pyrrosia petiolosa* [J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(18):6121-6126.

Rapid proliferation via GGB and partial tissue culture of *Sphaeropteris brunoniana*

Li Tengmin[1], Liu Wenwen[2], Rao Qian[3], Chen Yu[1], Han Yu[1], Wu Erhuan[1], Rao Dandan[1*]

(*1.Hainan Academy of Forestry /Hainan Academy of Mangrove, , Haikou 571100, China; 2.College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 3.Haikou Jinniuling Park Management Office /Haikou Municipal Institute of Landscape Architecture Science, Haikou 570206, China*)

Abstract: [Objective] The aim of current study was to optimize tissue culture techniques of *Sphaeropteris brunoniana*, and to shorten the plant breeding cycle and further improve breeding efficiency. [Method] In this study, the spores of *S. brunoniana* were used as explants to investigate the effects of different basic media on spore germination, to explore the effects of different plant growth regulators on the induction and proliferation of green globules (GGB), and to identify the optimal substrate and cultivation method for sporophyte transformation through the partial tissue culture method. [Result] The optimal substrate for inducing spore germination was 1/10 MS, with a germination rate of 69.55% and visible spore germination within 10 days. Spore germination was inhibited in 1/2 MS medium. The suitable medium for GGB induction was 1/2 MS + NAA 0.2 mg·L^{-1}, with an induction rate of 92.22 %. The optimal medium for GGB proliferation was 1/2 MS + NAA 0.1~0.5 mg·L^{-1}+IBA 0~0.1 mg·L^{-1}, achieving a proliferation coefficient of 6.14 in 60 days. Activated charcoal also favored GGB proliferation, with the best proliferation effect seen in 1/2MS+NAA 0.1 mg·L^{-1}+activated charcoal 1.0 g·L^{-1}, reaching a proliferation coefficient of 7.84 in 60 days. Due to the difficulty of directly obtaining sporophytes during tissue culture, transplanting GGB clusters to ex-vitro substrates successfully induced sporophytes. The optimal substrate was peat:perlite:coconut bran at 2:1:1, with a conversion rate of 43.33 % after 90 days of transplanting. The Knauss partial tissue culture method proved feasible for the in vitro propagation of *S. brunoniana*. Using a matrix of peat : perlite at 1:1, sporophytes were successfully induced within 32 days, with a conversion rate of 86.67%. [Conclusion] The GGB pathway enabled rapid proliferation of *S. brunoniana*. The partial tissue culture method effectively improved the conversion rate of young sporophytes and provided technical support for the large-scale production of *S. brunoniana* seedlings.

Keywords: *S. brunoniana*, green globular body, sporophyte, partial tissue culture, in vitro rapid propagation

(编辑:吕俊俐)