

· 技术方法 ·

香鳞毛蕨的组织培养和快速繁殖体系构建

张冬瑞, 卜志刚, 陈玲玲, 常纓*

东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

摘要 香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans*)是一种多年生野生草本蕨类植物, 具有抗氧化、抑菌、抗银屑病和抗肿瘤等多种功效。香鳞毛蕨的野生资源匮乏, 通过组织培养建立其人工再生体系, 是保护香鳞毛蕨资源可持续利用的有效途径。通过对香鳞毛蕨孢子的无菌培养, 比较分析不同因素对原叶体增殖、孢子体诱导、愈伤组织诱导与增殖、丛生芽分化及生根的影响, 建立了快速繁殖体系, 为香鳞毛蕨规模化生产奠定基础。研究表明, 当培养基组分为1/2MS时, 原叶体生长状态较好, 颜色翠绿, 增殖倍数最高可达 5.67 ± 0.59 , 此时有大量幼孢子体产生, 孢子体诱导率为 $(37.50 \pm 2.04)\%$; 愈伤组织诱导最佳培养基为 $1/2MS + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$, 诱导率可达 $(96.67 \pm 5.77)\%$; 愈伤组织增殖最佳培养基为 $1/2MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$, 增殖倍数达13.30; 颗粒状愈伤组织在1/2MS培养基中生长出大量丛生芽, 诱导率为 $(53.33 \pm 3.33)\%$; $1/2MS + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 培养基促进幼孢子体苗生根, 移栽成活率约为60%。

关键词 香鳞毛蕨, 孢子体, 愈伤组织, 再生体系

张冬瑞, 卜志刚, 陈玲玲, 常纓 (2020). 香鳞毛蕨的组织培养和快速繁殖体系构建. 植物学报 55, 760–767.

蕨类植物是药食同源植物(丁恒山, 2010)。从药用蕨类植物体内可提取到类黄酮、萜类、间苯三酚类和甾体等多种有效化学成分, 这些成分具有抗肿瘤、消炎、抗氧化和杀菌等作用(孙莉莉, 2015; 杜文钊等, 2016)。部分蕨类植物可供观赏(邢福武, 2011), 用于室内盆栽或庭院绿化。此外, 蕨类植物对外界环境敏感度高, 可作为土壤理化性质与气候指示植物, 检测土壤酸碱性及寻找矿物资源。随着对蕨类植物各方面价值的发掘, 野生蕨类植物出现供不应求的状况。此外, 环境恶化导致一些蕨类植物面临灭绝的危险。因此, 通过组织培养建立蕨类植物再生体系, 进行快速繁殖迫在眉睫(袁玲, 2007)。近年来, 已建立多种陆生非种子植物的再生及快速繁殖体系(吴小凤等, 2013; 王一诺等, 2016; 王淼等, 2016; 韩喜国等, 2017; 关丽霞等, 2019; 赵怀宝和殷寿延, 2019)。Li等(2017)对铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris*)快速繁殖过程中的胚胎发生相关基因进行了系统发育分析, 为蕨类植物再生提供了新的研究方向。

香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans*)隶属于鳞毛蕨科

(Dryopteridaceae)鳞毛蕨属(*Dryopteris*), 是一种多年生野生草本蕨类植物, 主要分布在中国、朝鲜和蒙古等地。在我国, 香鳞毛蕨以黑龙江省五大连池地区为分布中心(常纓, 2009)。近年来, 国内外学者关于香鳞毛蕨的研究主要集中在化学成分的药理作用、基因功能、代谢组学和基因组学等方面(Gao et al., 2018; Liu et al., 2018; Lu et al., 2018; Zhang et al., 2018; Lin et al., 2019)。随着对香鳞毛蕨药用价值的逐步认识及旅游资源的开发, 人们对野生香鳞毛蕨进行灭绝式采挖, 使其野生资源受到极大破坏。野外香鳞毛蕨的孢子繁殖成功率低, 多为根状茎繁殖。人工组织培养建立香鳞毛蕨再生体系, 是保护香鳞毛蕨资源使其可持续利用的必由之路。目前, 香鳞毛蕨仅有孢子的人工繁殖方法(黄庆阳等, 2007), 该方法不仅周期长, 而且难以获得大量孢子体植株。因此, 香鳞毛蕨快速繁殖体系的构建势在必行。

本研究以香鳞毛蕨成熟孢子为外植体, 筛选适合配子体增殖、孢子体萌发、愈伤组织诱导、丛生芽分化和生根诱导各阶段的最佳培养基, 探索其组织培养

收稿日期: 2020-05-12; 接受日期: 2020-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(No.31870313)

* 通讯作者。E-mail: 594006458@qq.com

过程中的关键技术, 并建立了香鳞毛蕨快繁体系, 为该种蕨类植物规模化生产和遗传转化体系构建奠定基础。

1 植物材料

香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans* (L.) Schott)采于黑龙江省五大连池二池(N44°03', E128°57'), 经中国科学院植物研究所张宪春研究员鉴定为鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物香鳞毛蕨。晾干叶片收集孢子, 分装于1.5 mL离心管中, 置于4℃冰箱中保存, 备用。

2 培养基成分与培养条件

2.1 孢子消毒与培养

将香鳞毛蕨孢子置于1.5 mL离心管中, 滴加无菌水后, 在漩涡振荡器上充分振荡, 6 000–8 000 r·min⁻¹离心1–3分钟, 弃上清。滴入约1.0 mL的0.1% HgCl₂溶液消毒2分钟, 用无菌水冲洗4–5次, 获得无菌孢子悬浮液; 接种于改良的Knop's液体培养基中(成分为0.25 g NaH₂PO₄、0.25 g KNO₃、0.25 g MgSO₄和1.0 g Ca(NO₃)₂, 蒸馏水1 000 mL, pH调至5.7–5.8)(包文美等, 1985), 25℃黑暗处理36小时同步萌发后培养。待原叶体长至心形期, 将其接种于固体培养基(1/2MS+3.0%蔗糖+0.7%–0.8%琼脂)中培养。约30天后, 获得试验所需的原叶体(备用)。培养条件: 温度(25±2)℃, 光周期为12小时光照/12小时黑暗, 光照强度为150–180 μmol·m⁻²·s⁻¹(黄庆阳等, 2007)。

2.2 原叶体的增殖培养

选取生长状态良好的原叶体, 接种到预先配制好的MS(蔗糖浓度为3.0%、琼脂浓度为0.7%–0.8%, pH 5.7–5.8)、1/2MS、1/4MS、1/8MS以及改良的Knop's 5种不同的培养基上, 每瓶接种10个, 每组3瓶, 重复4次。培养条件: 温度(25±2)℃, 光周期为16小时光照/8小时黑暗, 光照强度为150–180 μmol·m⁻²·s⁻¹。接种30天后称重, 观察并记录原叶体的生长状态。

2.3 孢子体的诱导

选取长势较好的原叶体, 接种于不同无机盐浓度的

MS培养基及改良的Knop's培养基, 每瓶接种10个, 每组8瓶, 重复4次。待原叶体长出精子器和颈卵器后, 每隔3天向培养基中加入无菌水, 每隔3–5周继代1次。培养条件同2.2节。接种90天后统计诱导率。

2.4 孢子体愈伤组织的诱导

将香鳞毛蕨孢子体茎尖生长点, 接种于含有2,4-D和6-BA的1/2MS培养基上。其中, 2,4-D浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹; 6-BA浓度为1.0、1.5、2.0和3.0 mg·L⁻¹。每个处理每瓶接种10个外植体, 每组3瓶, 重复3次。培养条件同2.2节。接种后, 每2周更换1次培养基。30天后统计愈伤组织的诱导率。

2.5 愈伤组织的增殖分化

将长势良好的愈伤组织在无菌条件下分散成大小约为(0.3 cm)³的小块, 接种到含有不同浓度激素的1/2MS培养基。6-BA设置浓度为1.0、1.5、2.0和3.0 mg·L⁻¹; 2,4-D设置浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹, 共12组处理。每瓶接种10个外植体, 每组3瓶, 重复3次。培养条件同2.2节。接种后, 每2周更换1次培养基。60天后观察愈伤组织的生长情况, 并称量统计。

2.6 丛生芽诱导及增殖

将增殖的愈伤组织分成(0.3 cm)³的小块, 接种于预先配制好的6种培养基: 1/2MS、1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ KT、1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ KT、1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA、1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA和1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ NAA。每瓶接种10个愈伤组织, 重复3次。接种后2–3周继代1次。培养条件同2.2节。60天后观察丛生芽的生长情况并统计诱导率。

2.7 生根培养

香鳞毛蕨芽分化形成的孢子体幼苗生长30天后, 幼叶由蜷缩的团状伸展至长披针形或倒披针形叶片。此时, 将芽分化形成的孢子体幼苗接种到以下4种培养基, 即1/2MS、1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA、1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA和1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ NAA。培养条件同2.2节。在上述培养基中诱导生根, 并比较不同浓度NAA对香鳞毛蕨孢子体幼苗生根的影响。30天后观察并统计生根情况。

2.8 炼苗移栽

当培养基中香鳞毛蕨孢子体长出3–4条根、株高约4–6 cm时,置于自然光照条件下炼苗驯化1周。然后,接种到灭菌的混合营养土(草炭土:蛭石=3:1, v/v)中,(20–25)°C条件下室内培养,并套袋保湿,保持孢子体的相对湿度为75%–90%,每盆接种1个孢子体,每天喷水1次。60天后观察并记录孢子体的生长状态,统计孢子体的成活率。

3 结果与讨论

3.1 原叶体增殖

在1/2MS培养基中,香鳞毛蕨原叶体的增殖倍数最高,为 5.67 ± 0.59 ,且长势好,结构致密,颜色翠绿,有大量的幼孢子体产生(图1A, B; 表1)。1/4MS培养基中,原叶体的增殖倍数为 3.84 ± 0.52 ; 1/8MS培养基中的原叶体长势一般; Knop's培养基中的原叶体长势较差,增殖率低至 1.39 ± 0.42 (图1B)。综上可知,1/2MS培养基为原叶体生长发育的最适培养基。

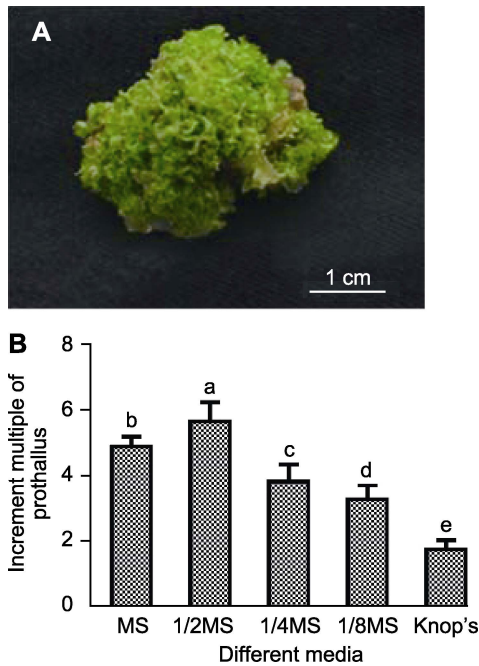


图1 香鳞毛蕨原叶体(A)及其在不同培养基中的增殖情况(B) 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 1 *Dryopteris fragrans* prothallus (A) and its proliferation on different media (B) Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

表1 不同培养基对香鳞毛蕨原叶体增殖的影响

Table 1 The effect of different media on the prothallus of *Dryopteris fragrans*

Media	Prothallus color	Young sporophytes	The growth of prothallus
MS	Verdant	Abundant	+++
1/2MS	Verdant	Massive	++++
1/4MS	Verdant with some pale	A small amount	++
1/8MS	Pale green	A small amount	+
Knop's	Pale green	Few	–

+: 原叶体长势差; ++: 原叶体长势一般; +++: 原叶体长势好; ++++: 原叶体长势特别好; –: 原叶体几乎不生长
+: Poor; ++: General; +++: Good; ++++: Particularly good; –: Almost no

表2 不同培养基对香鳞毛蕨孢子体的诱导

Table 2 The effect of different media on the sporophytes of *Dryopteris fragrans*

Media	The number of inoculation	Cultured days (d)	Sporozoites induction rate (%)
MS	80	90	29.69 ± 3.12 b
1/2MS	80	90	37.50 ± 2.04 a
1/4MS	80	90	14.06 ± 1.88 c
1/8MS	80	90	7.81 ± 2.77 d
Knop's	80	90	1.88 ± 1.25 e

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

3.2 孢子体诱导

不同培养基中香鳞毛蕨孢子体的诱导率差异显著(表2)。MS和1/4MS培养基中孢子体的诱导率分别为(29.69 ± 3.12)%和(14.06 ± 1.88)%; 1/8MS和Knop's培养基中,原叶体诱导孢子体的数量极少;而1/2MS培养基中,孢子体的诱导率最高,为(37.50 ± 2.04)%。

3.3 愈伤组织诱导

选取1/2MS培养基,以香鳞毛蕨孢子体茎尖为外植体进行愈伤组织诱导。结果显示,添加不同浓度6-BA和2,4-D的培养基中诱导率有显著差异;不添加激素的培养基无愈伤组织生长。当6-BA浓度不变,2,4-D浓度为 $0.5\text{--}1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的诱导率随着2,4-D浓度的升高而降低,但褐化率增高;2,4-D浓度不变,6-BA浓度为 $1.0\text{--}2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的诱导率随6-BA浓度的升高而增高,且褐化率降低。经分

析可知, 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D是诱导愈伤组织的最佳培养基, 诱导率为(96.67±5.77)%, 褐化率为(3.33±5.77)%, 且愈伤组织长势良好(表3)。

3.4 愈伤组织的增殖

6-BA浓度恒定不变时, 随着2,4-D浓度的升高, 香鳞毛蕨愈伤组织的增殖倍数逐渐下降, 2,4-D浓度为0.5 mg·L⁻¹时的愈伤组织增殖倍数最高; 6-BA浓度升高至3.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织的增殖系数显著降低, 增殖倍数约为3.35 (表3—表5)。此时, 愈伤组织虽能进行增殖, 但在增殖过程中出现大量的褐化死亡现象, 说明激素浓度过高不适合香鳞毛蕨愈伤组织增殖(表4)。

在添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D的培养基中, 增殖的愈伤组织生长旺盛, 且质地较为疏松, 易分离和分化(图2A, B), 增殖系数达13.30, 因此确定愈伤组织增殖的最佳培养基为1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+3.0%蔗糖+0.7%—0.8%琼脂。

3.5 丛生芽诱导

不添加激素的1/2MS培养基可诱导芽的形成, 且诱导率最高, 为(53.33±3.33)%, 说明丛生芽不需要激素诱导即可形成; 添加NAA也可使芽分化(表5)。培养过

程中发现, 15—20天, 愈伤组织表面开始密被绒毛, 30—45天愈伤组织长出深绿色凸起(图2C), 约60天时在不添加激素的1/2MS培养基上深绿色凸起分化为幼孢子体叶(图2D—H)。

3.6 幼孢子体生根的诱导

将芽分化出的幼孢子体材料转移至生根培养基(表6)中, 幼孢子体苗均能生根, 30天后香鳞毛蕨孢子体的生根率达100%。此外, 研究发现NAA在一定浓度范围内促进香鳞毛蕨孢子体生根, 浓度过高则抑制生根。当NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 生根效果最佳, 平均根数为(5.33±0.57)条。

3.7 孢子体的驯化培养

驯化移栽的3次试验中, 孢子体的成活率达60%, 且生长状态良好, 长出了新的孢子叶(图2I)。经驯化移栽后的孢子体苗可去掉遮盖物, 在温度为(20—25)°C的培养室中生长。

3.8 讨论

3.8.1 培养基组分对香鳞毛蕨原叶体增殖的影响

多齿蹄盖蕨(*Athyrium multidentatum*)在1/4MS培养基中的孢子萌发率最高(徐文杰, 2007)。银粉背蕨

表3 不同激素浓度对香鳞毛蕨茎尖生长点愈伤组织诱导的影响

Table 3 Callus induction of *Dryopteris fragrans* with various concentrations of hormones from the shoot tip apex

Treatments	6-BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	Induction period (d)	Induction rate (%)	Browning rate (%)	Callus growth
1	0	0	30	0	0	
2	3.0	0.5	30	43.33±3.33	38.61±2.98	++
3	3.0	1.0	30	33.33±3.33	36.94±7.24	++
4	3.0	1.5	30	17.78±1.92	68.89±10.18	+
5	2.0	0.5	30	96.67±5.77	3.33±5.77	++++
6	2.0	1.0	30	81.11±1.92	28.67±6.35	+++
7	2.0	1.5	30	76.67±5.77	48.21±9.94	++
8	1.5	0.5	30	83.33±5.77	31.94±6.36	+++
9	1.5	1.0	30	80.00±0.00	45.83±7.22	++
10	1.5	1.5	30	76.67±5.77	52.38±4.12	++
11	1.0	0.5	30	86.67±5.77	54.17±9.11	++
12	1.0	1.0	30	86.67±5.77	57.87±4.01	++
13	1.0	1.5	30	73.33±5.77	58.92±3.09	++

+: 愈伤组织长势差; ++: 愈伤组织长势一般; +++: 愈伤组织长势好; ++++: 愈伤组织长势特别好

+: Poor; ++: General; +++: Good; ++++: Particularly good

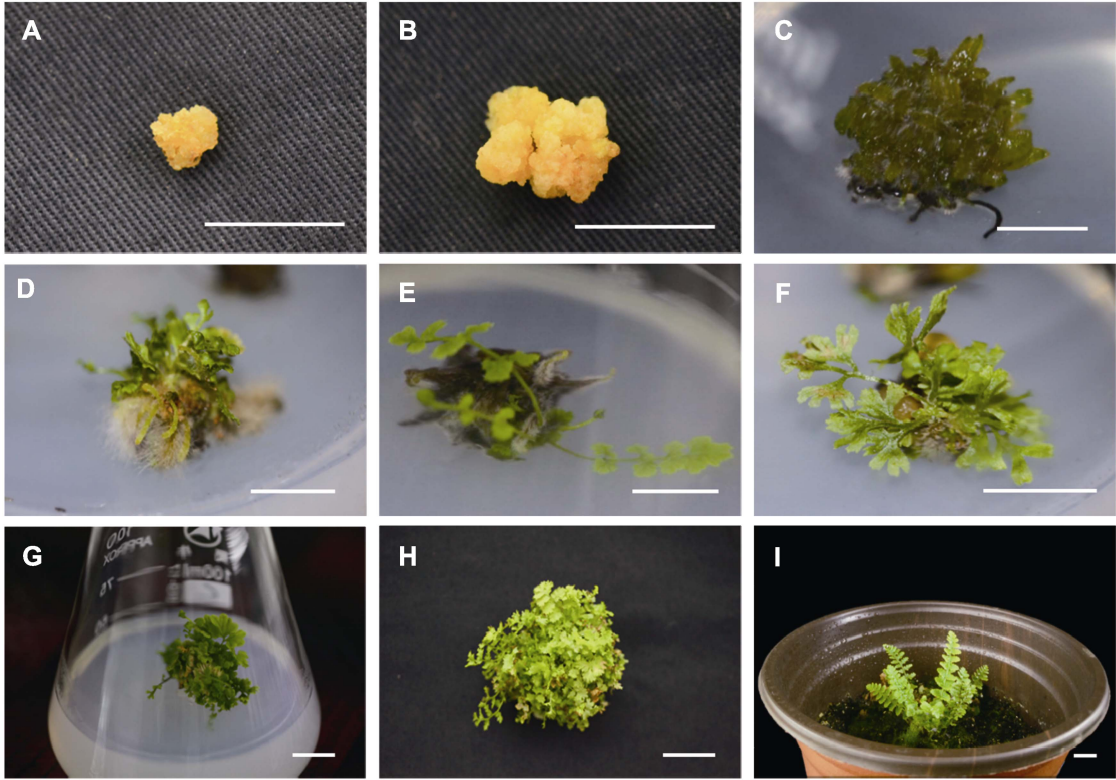


图2 香鳞毛蕨愈伤组织的增殖、分化及移栽
(A) 增殖前的愈伤组织; (B) 增殖60天后的愈伤组织; (C) 愈伤组织分化成芽; (D)–(H) 芽分化形成香鳞毛蕨孢子体; (I) 驯化后的香鳞毛蕨孢子体。Bars=1 cm

Figure 2 Proliferation, differentiation and transplanting of *Dryopteris fragrans* callus

(A) Callus of *Dryopteris fragrans* before proliferation; (B) Callus of *D. fragrans* after 60 d of proliferation; (C) Differentiation of callus and formation of bud of *D. fragrans*; (D)–(H) Spore body of *D. fragrans* with bud differentiation; (I) The sporophyte of *D. fragrans* after domestication. Bars=1 cm

表4 不同激素对香鳞毛蕨愈伤组织增殖的影响

Table 4 The effect of different hormones on *Dryopteris fragrans* callus proliferation

Treatments	6-BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	Proliferation days (d)	Proliferation rate (%)
1	3.0	0.5	60	3.71
2	3.0	1.0	60	3.19
3	3.0	1.5	60	3.16
4	2.0	0.5	60	11.50
5	2.0	1.0	60	7.59
6	2.0	1.5	60	5.92
7	1.5	0.5	60	10.37
8	1.5	1.0	60	6.41
9	1.5	1.5	60	6.07
10	1.0	0.5	60	13.30
11	1.0	1.0	60	9.75
12	1.0	1.5	60	4.97

表5 激素对香鳞毛蕨芽分化的影响

Table 5 The effects of hormones on buds' differentiation of *Dryopteris fragrans*

Treat- ments	Media	KT (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Induction period (d)	Buds induction rate (%)
1	1/2MS	0	0	60	53.33±3.33 a
2	1/2MS	0.2	0	60	43.33±6.67 b
3	1/2MS	0.5	0	60	33.33±5.77 bc
4	1/2MS	0	0.2	60	26.67±6.67 c
5	1/2MS	0	0.5	60	30.00±8.82 bc
6	1/2MS	0	1.0	60	11.11±5.09 d

不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

(*Aleuritopteris argentea*)在MS培养基中可获得最大孢子萌发率(53.3%), 且能有效促进原叶体增殖(黄笛

表6 不同生根培养基对香鳞毛蕨诱导生根的影响

Table 6 The effects of different media on rooting of *Dryopteris fragrans*

Treatments	Media	NAA (mg·L ⁻¹)	Induction period (d)	Number of roots
1	1/2MS	0	30	3.33±0.57 b
2	1/2MS	0.2	30	5.33±0.57 a
3	1/2MS	0.5	30	3.67±1.53 ab
4	1/2MS	1.0	30	2.67±1.15 b

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

等, 2009)。MS培养基适于桫欏(*Alsophila spinulosa*)原叶体增殖, 增殖率为20.31% (王辉等, 2013)。蛇足石杉(*Huperzia serrata*)原叶体适宜在MS培养基中增殖, 增殖倍数最高可达131.1 (包日双等, 2012)。

本研究采用5种不同浓度的培养基对香鳞毛蕨原叶体进行增殖培养(表1)。结果表明, 在1/2MS培养基中培养时, 香鳞毛蕨原叶体颜色翠绿, 且结构较为致密, 产生大量幼孢子体, 增殖倍数最高可达 5.67 ± 0.59 。在MS培养基中原叶体的增殖倍数低于1/2MS培养基, 幼孢子体的产量也明显少于1/2MS培养基, 原因可能是盐浓度较高影响了性器官的形成, 对原叶体增殖产生了抑制作用; 而在1/4MS、1/8MS及Knop's培养基中的香鳞毛蕨原叶体颜色发白, 结构疏松, 褐化现象明显, 增殖不明显, 幼孢子体产生少, 其原因可能是培养基中营养成分不足, 不能维持原叶体的正常发育。因此, 适宜香鳞毛蕨原叶体增殖及孢子体产生的培养基组分为1/2MS。

3.8.2 外源激素对愈伤组织诱导及增殖的影响

激素及其种类组合在愈伤组织诱导过程中起至关重要的作用。诱导铁线蕨愈伤组织时, 只有添加了6-BA才能诱导愈伤组织的形成(彭晓明和曾宋君, 2004)。此外, 低浓度的2,4-D可成功诱导狭叶凤尾蕨(*Pteris henryi*)原叶体愈伤组织的形成, 高浓度2,4-D虽能成功诱导愈伤组织, 但后期褐化严重(李静等, 2008)。韦莹等(2013)以槲蕨(*Drynaria roosii*)的茎段和叶片为外植体, 使用2,4-D诱导愈伤组织, 诱导率最高可达53.3%, 且愈伤组织颜色嫩绿, 长势较好。王晓倩等(2014)在进行阔鳞毛蕨(*D. championii*)的组织培养时, 发现蕨类植物愈伤组织的诱导主要受细胞分裂素

的影响, 适当比例的细胞分裂素与生长素组合能够诱导不同形态的愈伤组织。

本研究采用香鳞毛蕨孢子体茎尖生长点诱导愈伤组织时, 发现不同浓度的6-BA与2,4-D组合均能成功诱导愈伤组织的形成, 但不同组合诱导率及褐化率不同。当6-BA浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,4-D浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织的诱导率最高, 褐化率最低, 但是不适合于长期增殖培养。将愈伤组织接种到含有 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的基本培养基中, 可以继续增殖并维持生长活力, 且长势良好。可见, 适当浓度的2,4-D和6-BA配比对香鳞毛蕨愈伤组织的诱导起促进作用, 且能够有效降低褐化率。

3.8.3 外源激素对香鳞毛蕨丛生芽分化的影响

Fernández和Revilla (2003)研究表明, 愈伤组织在基础培养基上就可分化出芽, 添加低浓度激素有利于芽的形成。姜长阳等(2003)对蕨菜(*Pteridium aquilinum*)芽分化的研究表明, 1/2MS培养基最适合芽分化, 且分化率达100%。王晓倩等(2014)使用KT、NAA和不添加激素的培养基对阔鳞毛蕨进行丛生芽诱导, 结果发现不需要添加激素, 丛生芽的诱导率就可达 $(65.7\pm6.2)\%$, 且在基本培养基上可进行芽分化。

本研究结果表明, 含有激素KT或NAA的培养基均可促进香鳞毛蕨愈伤组织芽的形成; 但随着KT浓度的升高, 芽分化效果明显降低, 说明高浓度KT不利于芽的形成, NAA的作用明显弱于KT。此外, 不添加激素的1/2MS培养基的愈伤组织诱导率最高, 芽诱导率可达 $(53.33\pm3.33)\%$ (表3—表6), 说明激素浓度过高不利于愈伤组织分化。因此, 香鳞毛蕨愈伤组织最适合在不添加任何激素的培养基中进行丛生芽诱导。

3.8.4 外源激素对香鳞毛蕨幼孢子体生根的影响

研究表明, 在基本培养基中即可完成根的发生, 添加激素NAA可明显促进根的形成, 并可缩短根形成时间(黄执纓, 2004; 彭晓明和曾宋君, 2004)。黄执纓(2004)对二歧鹿角蕨(*Platyserium bifurcatum*)进行组织培养时, 发现随着NAA浓度的升高, 生根率不断增加, 当NAA浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生根率最高。彭晓明和曾宋君(2004)对铁线蕨进行组织培养时, 发现NAA浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 30天即可成功诱导根的生成,

且生根率达100%。另外,吴芹(2007)研究表明,不同浓度NAA对中华短肠蕨(*Allantodia chinensis*)根系的生长有较大影响,随着NAA浓度的升高,生根数量和根长均有所增加,但当NAA浓度高于 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,虽根长有所增加,但根比较细弱且多为侧根,适合中华短肠蕨生根的NAA最佳浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

本研究中香鳞毛蕨幼孢子体在不同浓度NAA的生根培养基中均能生根,且生根率达100%。NAA对香鳞毛蕨诱导生根具有促进作用,随着NAA浓度的升高,生根数先上升后下降,说明激素浓度过高抑制生根。NAA浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,生根效果最佳,平均根数为 (5.33 ± 0.57) 条。

黄庆阳等(2007)研究表明,香鳞毛蕨从孢子播种到获得第1株幼孢子体需要3个月,期间要对精子器和颈卵器的发育进行鉴定,并在器官发育成熟后定期浇水促进受精;然而此方法难以获得大量孢子体,一般1瓶培养基中的配子体(图1)能获得5–8株孢子体幼苗。本研究用激素将香鳞毛蕨孢子体幼苗诱导为愈伤组织需要30天,此愈伤组织经过再分化形成完整植株需要60–75天,所用时间比孢子播种获得孢子体的方法略长;但诱导的愈伤组织可在香鳞毛蕨愈伤增殖培养基中继代培养,获得大量愈伤组织,连续继代1年的愈伤组织也可分化成苗, $(0.3\text{ cm})^3$ 大小的愈伤组织经过分化可形成15–20株孢子体幼苗,因此可在较短的时间内获得大量孢子体植株。

我们通过对香鳞毛蕨孢子的无菌培养,探索了不同因素对原叶体增殖、孢子体诱导、愈伤组织诱导、丛生芽分化及生根的影响,建立了香鳞毛蕨快速繁殖体系,为其规模化生产及未来转基因研究奠定基础。

参考文献

包日双,尹培培,郭斌,尉亚辉 (2012). 蛇足石杉原叶体的培养及孢子体的诱导. 植物生理学报 **48**, 393–396.

包文美,敖志文,陈发生 (1985). 东北蕨类植物配子体发育的研究. I. 水龙骨科. 植物研究 **5**(4), 101–114.

常纁 (2009). 香鳞毛蕨国内外研究进展. 北方园艺 **(4)**, 113–115.

丁恒山 (2010). 中外药用孢子植物资源志要. 贵州: 贵州科技出版社. pp. 1–3.

杜文钊,宋国强,刘海燕,冯淡开,沈志滨 (2016). 香鳞毛蕨中间苯三酚类化合物的研究. 广东药学院学报 **32**, 22–24.

关丽霞,白禹萱,李阳,蒲东祥 (2019). 过山蕨组织培养技术研究. 黑龙江农业科学 **(7)**, 39–42.

韩喜国,任英,聂振波,高静,王庆军,王晓慧 (2017). 蕨菜组织培养技术研究现状及发展趋势. 长江蔬菜 **(16)**, 30–33.

黄笛,冯玉兰,董丽 (2009). 银粉背蕨的配子体发育及孢子繁殖技术的研究. 园艺学报 **36**, 1345–1352.

黄庆阳,樊锐锋,袁强,常纁 (2007). 香鳞毛蕨配子体发育及快速繁殖的研究. 中草药 **38**, 1573–1576.

黄执纁 (2004). 二歧鹿角蕨组织培养的研究. 生物学杂志 **21**(5), 22–24.

姜长阳,宁淑香,于森,王宇,宋立秀 (2003). 蕨菜愈伤组织高效再生体系的建立. 园艺学报 **30**, 343–345.

李静,夏桂春,龚慧,曾宪锋 (2008). 狭眼凤尾蕨的形态发生及组织培养. 热带作物学报 **29**, 626–631.

彭晓明,曾宋君 (2004). 铁线蕨的组织培养及植株再生. 植物生理学通讯 **40**, 575.

孙莉莉 (2015). 香鳞毛蕨中黄酮代谢途径关键酶基因的克隆与功能验证. 博士论文. 哈尔滨: 东北农业大学. pp. 1–128.

王辉,秦建蓉,植爽,田娜,肖小君 (2013). 桫欏原叶体增殖及幼孢子体形成试验. 林业科技开发 **27**(5), 86–88.

王淼,孙丽娜,吴春华,石元亮 (2016). 东北蕨菜的GGB组培移栽技术及驯化. 园艺与种苗 **(1)**, 27–29.

王晓倩,张婷婷,孟卓,董丽 (2014). 阔鳞毛蕨孢子的无菌繁殖. 植物生理学报 **50**, 159–163.

王一诺,韦莹,李翠,李林轩,肖冬,王晓峰,韦坤华 (2016). 植物生长调节素对西南凤尾蕨组织培养的影响. 湖北农业科学 **55**, 2117–2119.

韦莹,张占江,李翠,黄宝优,韦坤华,黄雪彦 (2013). 植物生长调节剂对蕨离体培养的效应. 湖北农业科学 **52**, 5909–5911.

吴芹 (2007). 几种观赏蕨类植物的繁殖技术研究. 硕士论文. 南京: 南京林业大学. pp. 71.

吴小凤,胡若洋,李学东 (2013). 仙鹤藓的孢子萌发及愈伤组织诱导. 植物学报 **48**, 651–657.

邢福武 (2011). 无花之美——蕨类植物在园林造景中的应用. 中国花卉园艺 **(3)**, 14–15.

徐文杰 (2007). 北京地区蕨类植物引种、栽培及繁殖技术的研究. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 1–77.

袁玲 (2007). 两种观赏蕨类植物离体快繁体系的建立. 硕士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 1–53.

赵怀宝,殷寿延 (2019). 红树植物卤蕨的组织培养. 海南热带

海洋学院学报 26(5), 34–39.

Fernández H, Revilla MA (2003). *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **73**, 1–13.

Gao R, Wang WZ, Huang QY, Fan RF, Wang X, Feng P, Zhao GM, Bian S, Ren HL, Chang Y (2018). Complete chloroplast genome sequence of *Dryopteris fragrans* (L.) Schott and the repeat structures against the thermal environment. *Sci Rep* **8**, 16635.

Li X, Han JD, Fang YH, Bai SN, Rao GY (2017). Expression analyses of embryogenesis-associated genes during somatic embryogenesis of *Adiantum capillus-veneris* L. *in vitro*: new insights into the evolution of reproductive organs in land plants. *Front Plant Sci* **8**, 658.

Lin HQ, Liu XP, Shen ZB, Cheng WQ, Zeng ZJ, Chen YF, Tang CP, Jiang T (2019). The effect of isoflavaspodic acid

PB extracted from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott on planktonic and biofilm growth of dermatophytes and the possible mechanism of antibiofilm. *J Ethnopharmacol* **241**, 111956.

Liu ZD, Zhao DD, Jiang S, Xue B, Zhang YL, Yan XF (2018). Anticancer phenolics from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. *Molecules* **23**, 680.

Lu Z, Huang QY, Zhang T, Hu BZ, Chang Y (2018). Global transcriptome analysis and characterization of *Dryopteris fragrans* (L.) Schott sporangium in different developmental stages. *BMC Genomics* **19**, 471.

Zhang T, Wang L, Duan DH, Zhang YH, Huang SX, Chang Y (2018). Cytotoxicity-guided isolation of two new phenolic derivatives from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. *Molecules* **23**, 1652.

Establishment of a Tissue Culture and Rapid Propagation System of *Dryopteris fragrans*

Dongrui Zhang, Zhigang Bu, Lingling Chen, Ying Chang*

School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract *Dryopteris fragrans* is a perennial herb fern with medical and economical values, such as anti-oxidation, bacteriostasis, anti-psoriasis, and anti-tumor. The wild resources of *D. fragrans* are scarce. Establishing a regeneration system for *D. fragrans* through tissue culture is needed to enable a sustainable use of this valuable resource. In this experiment, through sterile culture of spores of *D. fragrans*, the effects of different factors on prothallium proliferation, sporophyte induction, callus induction and proliferation, cluster bud differentiation, and rooting were compared and analyzed to establish a rapid propagation system, which laid the foundation for large-scale production of *D. fragrans*. The results showed that 1/2MS medium provided optimal growth with green color and a multiplication factor up to 5.67 ± 0.59 . The obtained plants have numerous young spores, and the spore induction rate was $(37.50 \pm 2.04)\%$. The most efficient callus induction medium contains 1/2MS media supplied with $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, which reached an induction rate up to $(96.67 \pm 5.77)\%$. The optimal callus proliferation medium we obtained was 1/2MS media supplied with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, which reached a proliferation factor of 13.30. The obtained granular callus produced a large number of cluster buds $(53.33 \pm 3.33)\%$ in 1/2MS medium, and 1/2MS media supplied with $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA medium promoted rooting, resulting in a transplanting survival rate of ~60%.

Key words *Dryopteris fragrans*, sporophyte, Callus, regeneration system

Zhang DR, Bu ZG, Chen LL, Chang Y (2020). Establishment of a tissue culture and rapid propagation system of *Dryopteris fragrans*. *Chin Bull Bot* **55**, 760–767.

* Author for correspondence. E-mail: 594006458@qq.com

(责任编辑: 孙冬花)