

## 不同灭菌方法和赤霉素浓度对凤丫蕨幼茎成苗的影响

周丽华 (湖南人文科技学院生命科学系, 湖南娄底 417000)

**摘要** [目的]研究最适合凤丫蕨幼茎直接成苗的灭菌手段和赤霉素浓度,为其大量繁殖提供理论参考。[方法]在不同灭菌方法和赤霉素浓度下,对凤丫蕨进行幼茎成苗研究。[结果]结果显示,酒精和升汞消毒时间越长,灭菌效果越好,但对幼茎的毒害作用也越强,升汞处理时间由8 min改为12 min时,平均毒害率由14.47%上升为25.57%,而愈伤诱导率比其他2种处理要高;在添加赤霉素的培养基上幼茎成苗率明显较高, $t$ 测验差异达到0.05显著水平( $t=3.76 > t_{0.05}=3.18$ )。在一定范围内,随着赤霉素浓度的增加,幼茎成苗率呈现上升趋势;但随着浓度的进一步增大,成苗率反而下降,而愈伤组织的诱导率逐渐上升。[结论]用自来水洗2 h,酒精消毒60 s,升汞消毒10 min对幼茎的灭菌效果好,且对幼茎毒害小;最适合诱导幼茎直接成苗的赤霉素浓度为1.5 mg/L。

**关键词** 凤丫蕨;幼茎;灭菌方法;赤霉素

中图分类号 S682.35 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)31-15222-02

**Impact of Different Sterilization Methods and Concentrations of Gibberellin Acid on Pteridophyte Seedling Growth**

ZHOU Li-hua (Department of Life Sciences, Hunan College of Humanities Science and Technology, Loudi, Hunan 417000)

**Abstract** [Objective] The theoretical reference for the large population of pteridophyte multiplication was provided through the study on the most suitable sterilization method and best concentration of gibberellin acid for its seedling growth. [Method] The pteridophyte seedling growth under different sterilization ways and concentrations of gibberellin acid was studied. [Results] The results showed that the longer the disinfection of alcohol and mercuric chloride was, the better the effect of its sterilization was and the more its poisoning effect on young seedling was. The average poisoning rate was increased from 14.47% to 25.57% when the disinfection time of mercuric chloride was prolonged from 8 minutes to 12 minutes. The rate of callus induction under the treatment of mercuric chloride was higher than that of other two kinds of processing. The rate of pteridophyte seedling formation in the medium added with gibberellin acid was significantly improved after  $t$  test ( $t=3.76 > t_{0.05}=3.18$ ). Within a certain extent, the rate of pteridophyte seedling formation was increased with the increment of GA concentration, and it was decreased if beyond the extent, however, the rate of callus induction was increased gradually. [Conclusion] It can be seen that the best efficiency on pteridophyte seedling growth was from the treatment of the washing with tap water for 2 hours, the disinfectant with alcohol for 60 s, and then with mercuric chloride for 10 minutes. The best concentration of gibberellin acid added in medium for pteridophyte seedling growth was 1.5 mg/L.

**Key words** Pteridophyte; Young seedling; Sterilization method; Gibberellin acid

凤丫蕨是蕨的一种,形态优美,是夏秋季节优良的观赏蕨类种。适宜于盆栽供室内观赏,也适宜于庭园中栽培,经济价值比较高。目前,对观赏蕨类进行组织培养诱导出愈伤组织再成苗的报道较多<sup>[1-5]</sup>,但对直接进行诱导出苗的报道较少。笔者以凤丫蕨幼茎为外植体,在不同灭菌方法和赤霉素浓度条件下,摸索出最适合直接成苗的灭菌手段和赤霉素浓度,以期对凤丫蕨的大量繁殖提供理论参考。

**1 材料与方****1.1 材料** 凤丫蕨,采自大熊山国家森林公园。

**1.2 方法** 以凤丫蕨幼茎为材料,首先对幼茎进行3种前期处理:自来水洗0.5 h、自来水洗1.0 h、自来水洗2.0 h,继而用70%酒精和0.1%升汞进行不同的时间组合进行消毒处理。随后接种在大量元素用量各不相同的3种MS培养基上(表1)。

在适合幼茎生长的最佳培养基中添加不同浓度赤霉素( $GA_3$ ), $GA_3$ 设0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L共6个浓度梯度。

采用透明玻璃锥形瓶培养,每瓶含培养基约25 ml,培养温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照强度为 $30 \sim 40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,每日10 h光照,14 h黑暗。培养基和接种所需器皿均经高压消毒灭菌。接种25 d后统计成苗率和污染率,并进行分析。统计方法参照文献[6]中的方法,数据分析以SAS软件进行。

**2 结果与分析****2.1 离体幼茎无菌培养体系的建立** 不同的消毒时间和消

毒方法对幼茎消毒效果不同(表2)。酒精和升汞消毒时间越长,灭菌效果越好,但对幼茎的毒害作用也越强,升汞处理时间由8 min改为12 min时,平均毒害率由14.47%上升为25.57%,而愈伤诱导率比其他2种处理要高。灭菌之前自来水洗0.5 h,污染率明显较高,平均达39.00%。对各处理的成苗率进行 $F$ 值测定表明,各处理间差异达极显著水平( $F=6.43, F_{0.99}=5.47$ ),以第9号处理效果最好,即在灭菌之前用自来水洗2.0 h,然后用酒精消毒60 s,升汞消毒10 min灭菌效果最好,且对幼茎毒害较小。幼茎生长的基本培养基以1/2MS培养基较为合适。

表1 幼茎不同处理方法正交设计 $L_9(3^4)$ Table 1  $L_9(3^4)$  Orthogonal design of young stem by different treatment methods

处理号 No. of treatments	自来水洗 时间//h Washing time with tap water	酒精消毒 时间//s Disinfection time with alcohol	升汞消毒 时间//min Disinfection time with mercuric chloride	培养基(MS) Culture medium
1	0.5	30	8	1/2
2	0.5	45	10	1
3	0.5	60	12	3/2
4	1.0	30	10	3/2
5	1.0	45	12	1/2
6	1.0	60	8	1
7	2.0	30	12	1
8	2.0	45	8	3/2
9	2.0	60	10	1/2

注:1/2MS与3/2MS分别表示大量元素分别为MS的1/2和3/2,其他营养元素不变。

Note:1/2 MS and 3/2 MS indicated that macro-elements are 1/2 and 3/2 of MS medium. The other nutrient elements are not changed.

**2.2 幼茎的快繁** 幼茎成苗有2种生长方式,即经过愈伤

基金项目 娄底市科技计划项目。

作者简介 周丽华(1970-),女,湖南新化人,副教授,从事植物发育生物学的教学和研究。

收稿日期 2009-07-09

分化成苗与直接发育成苗。接种 25 d 后观察发现,部分幼茎子叶基部产生少量愈伤组织,呈团状,生长致密,浅黄色,随后有少量芽的分化。少部分幼茎直接产生幼苗,幼苗单生。

**2.3 赤霉素处理对幼茎成苗的影响** 由表 3 可知,接种 25 d 后,在没有添加赤霉素的培养基上,幼茎成苗率明显较低,仅为 53.30%;在添加赤霉素的培养基上,幼茎成苗率明显较

高, $t$  测验差异达到 0.05 显著水平( $t = 3.76 > t_{0.05} = 3.18$ )。在一定范围内随着赤霉素浓度的增加,幼茎成苗率呈现上升趋势;但随着浓度的进一步增大,成苗率反而下降,而愈伤组织的诱导率逐渐上升。由此得知,促进幼茎直接成苗的最适赤霉素浓度为 1.5 mg/L 左右。

表 2 不同灭菌方法正交试验的直观分析

Table 2 Intuitive analysis of different sterilization methods by orthogonal experiment

处理号 No. of treatments	接种//个 Inoculation	成苗//个 Seedlings	成苗率//% Seedling rate	污染//个 Pollution	污染率//% Pollution rate	毒害//个 Damage	毒害率//% Damaged rate	愈伤//个 Callus	愈伤率//% Callus rate
1	60	24	40.00	14	23.30	10	16.70	12	20.00
2	60	27	45.00	11	18.30	14	23.30	8	13.30
3	60	24	40.00	9	15.00	18	30.00	9	15.00
4	60	21	35.00	21	35.00	11	18.30	7	11.70
5	60	22	36.70	17	28.30	13	21.70	8	13.30
6	60	19	31.70	26	43.30	9	15.00	6	10.00
7	60	32	53.30	6	10.00	15	25.00	7	11.70
8	60	33	55.00	11	18.30	7	11.70	9	15.00
9	60	35	58.30	9	15.00	10	16.70	6	10.00

表 3 不同浓度的赤霉素对幼茎直接成苗和产生愈伤组织的影响

Table 3 Effects of different concentrations of GA<sub>3</sub> on the young stem maturing and callus induction formation

处理号 No. of treatments	GA <sub>3</sub> //mg/L	接种//个 Inoculation	成苗//个 Seedlings	成苗率//% Seedling rate	愈伤//个 Callus	愈伤率//% Callus rate	死亡//个 Mortality	死亡率//% Mortality rate
1	0	60	32	53.30	7	11.70	21	35.00
2	0.5	60	38	63.30	9	15.00	13	21.70
3	1.0	60	39	65.00	14	23.30	7	11.70
4	1.5	60	45	75.00	13	21.70	2	3.33
5	2.0	60	40	66.70	17	28.30	3	5.00
6	2.5	60	36	60.00	15	25.00	9	15.00

### 3 结论与讨论

研究表明,凤丫蕨前期用自来水冲洗 2.0 h,再用酒精消毒 60 s,升汞消毒 10 min 灭菌效果最好;用 1.5 mg/L 的赤霉素对幼茎进行预处理,可以促进幼茎的无菌萌发,许传俊等认为,这可能与 GA 通过影响生长素合成和运输,也影响乙烯的合成和反应,从而促进根的形成和细胞的生长有关<sup>[7]</sup>。

自然条件下,蕨类植物通过孢子进行繁衍,或通过根、根状茎、叶等部位产生芽孢和顶端分生组织产生新植株。然而,自然繁殖的蕨类植物远远不能满足人类的需求,有些蕨类植物也因生境的恶化而日益减少。组织培养作为快繁手段运用于蕨类植物生产中,可以在短期内形成规模,对蕨类

植物的商品化生产具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] 及华,赵玉芬. 大叶凤尾蕨的离体培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯,2001,37(4):308.
- [2] 韦景枫,匡世秀,程友忠,等. 贵州六种野生观赏蕨的组织培养初报[J]. 贵州林业科技,2007,35(1):55-57.
- [3] 刘瑞林,王凤彬. 蕨类植物组织培养研究现状[J]. 中国林副特产,2003(2):16-17.
- [4] 黄誉江,彭军东. 观赏蕨类的栽培及应用研究[J]. 中国林副特产,1998(3):20-21.
- [5] 韦景枫,匡世秀,陶文丞,等. 凤丫蕨组培快繁技术初报[J]. 贵州林业科技,2004,32(3):32-34.
- [6] 盖钧益. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:278-294.
- [7] 许传俊,李玲. GA 信号转导[J]. 植物生理学通讯,2006,42(5):961-966.
- [25] 熊大胜,熊英,邓武军,等. 三叶木通茎藤及果实采收加工技术研究[J]. 中药材,2008,31(8):1116-1119.

(上接第 15219 页)

[24] 刘艳莉,何玲,陈明月,等. 三叶木通混浊果汁饮料关键技术研究[J]. 试验报告与理论研究,2009,12(1):35-37.