

若干理化因子对日本肾蕨绿色球状体分化及生长的影响

程磊, 浦冰洁, 周根余

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 通过对日本肾蕨 (*Nephrolepis cordifolia*) 绿色球状体 (GGB) 的培养实验, 研究了不同物理、化学因子对其分化及生长的影响。结果表明, 辐照度 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 对 GGB 的分化及生长均有明显促进作用。红光照射对 GGB 的分化比白光和蓝光的好。此外, GGB 的分化以 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1 \text{ mg L}^{-1} + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ } 200 \text{ mg L}^{-1}$ 为好。

关键词: 日本肾蕨; 绿色球状体; 分化; 生长

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2001)02-0142-07

THE EFFECTS OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON DIFFERENTIATION AND GROWTH OF GREEN GLOBULAR BODIES OF *NEPHROLEPIS CORDIFOLIA*

CHENG Lei, PU Bing-jie, ZHOU Gen-yu

(Life & Environment Science College, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Green globular bodies (GGB) first obtained from runner tips of *Nephrolepis cordifolia* Presl were cultured on MS medium supplemented with 4 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} IAA at $23 \text{ }^\circ\text{C}$ under continuous fluorescent light at $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 30 days. These GGB were then subcultured on the same medium every month. The differentiation and the growth of GGB subcultured on varies media or with different growth regulators, and various light quality and light intensity were examined and calculated after 70 days. The results showed that stimulating effects on the differentiation and growth were observed at irradiance of $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Red light was better for differentiation of GGB than blue or white light. In addition, MS medium supplemented with 1 mg L^{-1} 6-BA and 200 mg L^{-1} NaH_2PO_4 was best for differentiation of GGB.

Key words: *Nephrolepis cordifolia*; Green globular body; Differentiation; Growth

肾蕨作为一种观叶植物, 以其独特、雅致、多变的叶片和姿态, 越来越受到人们的青睐。传统繁殖通过分株和孢子培养进行^[1], 但常受自然因素影响而夭折, 不能得到大量的植株。Murashige^[2]首先对肾蕨的组培进行了尝试, 此后有关肾蕨组培的研究不断有报道, 涉及到大量元素、植物生长调节剂等其它一些影响因子^[3]。1983年, Guidugli等^[4]在进行“少年特地”肾蕨组培时, 从根状茎离体诱导出一种小球 (Glomerules)。直到1987年, Higuchi等^[5]正

时将这种从肾蕨根状茎尖诱导出的新结构称为绿色的球状体(GGB),其结构与愈伤组织不同,而与兰花的原球茎相似。GGB途径比丛生苗生产途径效率高。此后陆续又报道了几篇有关GGB的研究报告^[6-9]。近几年来国内在肾蕨组培上也取得了一定成果^[10-12]。本文探讨若干物理、化学因子对日本肾蕨GGB分化及生长的影响。

1 材料和方法

材料 以日本肾蕨(*Nephrolepis cordifolia* Presl)实生苗走茎茎尖为外植体,经消毒后接入MS+6-BA 4 mg L⁻¹+IAA 0.1 mg L⁻¹(单位下同)的培养基中,30 d后获得大量GGB。此后这些GGB一直在此培养基上继代培养(继代/月)。本实验所用的材料就是这些继代培养的GGB。

培养基 化学因子研究:不同浓度的基本培养基(MS、1/2MS、1/8MS)、不同浓度的NaH₂PO₄(50、200、400 mg L⁻¹)及不同基本培养基(MS、N6^[13]、CC^[14])分别对GGB分化的影响,不同激素与糖浓度的组合(见文中2.4)对GGB生长的影响。物理因子研究:不同量子辐照度(40、70、100 μmol m⁻²s⁻¹)、不同光质(白光、红光、蓝光)对GGB分化与生长的影响。以上实验每个处理均接入15块GGB(每块约有5-7个GGB积聚在一起),分化培养基及生长培养基中激素分别为6-BA 4、6-BA 4+IAA 0.1, pH5.8,培养条件均为23±2℃,光照12 h d⁻¹,除量子辐照度试验以外,其余量子辐照度均为40 μmol m⁻²s⁻¹,光源为一体化荧光灯(功率为30 W,色温为5400 K),培养70 d后统计结果(其间各处理均在原培养基上继代一次)。

过氧化物酶同工酶分析 不同波长中培养的GGB进行过氧化物酶同工酶分析^[15]。分别取1 g材料,加重蒸水1 ml后在冰浴上研磨提取。匀浆经2400×g冰冻离心20 min,上清液用于电泳。用垂直平板电泳槽进行电泳,聚丙烯酰胺浓度7% (w/v),凝胶缓冲液为1 mol/L Tris-HCl, pH8.8。加样20 μl后在20 mA电流下电泳4 h。同工酶鉴定用联苯胺愈创木酚染色法,在37℃染液中保温30 min,取出漂洗后,于7%醋酸中保存。

2 结果和分析

2.1 化学因子对GGB分化和生长的影响

2.1.1 不同浓度基本培养基的影响

GGB接入23 d,1/2MS中有2块GGB开始分化且一直保持较好的长势;1/8MS中有1块GGB开始分化,但在培养50 d后分化出的小叶死亡,且GGB呈暗绿色长势较弱;MS中起初只见GGB球体的增大而未见分化,直到第58 d时才开始分化。

从图1可以看出,无论是分化率还是分化叶片数,均是1/2MS最好,MS次之,无机盐浓度过低时(1/8MS),GGB没有分化,且长势也减弱。

2.1.2 不同浓度NaH₂PO₄的影响

从图2可以看出,对日本肾蕨来说,NaH₂PO₄最佳浓度为200 mg L⁻¹,此时的分化率和叶片数均最好;对照与NaP盐浓度为50 mg L⁻¹的分化率虽然一样,但分化的叶片数却是后者的2.5倍;NaP盐浓度为400 mg L⁻¹的分化率很低,只有10%。

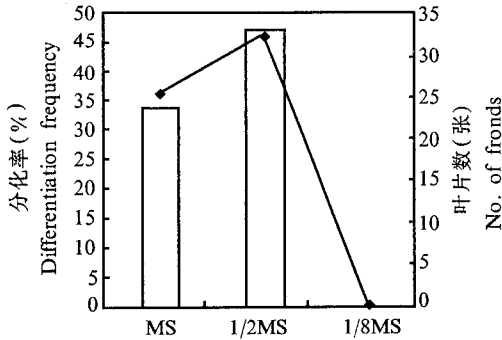


图 1 基本培养基对 GGB 分化的影响

Fig. 1 Effect of MS, 1/2MS and 1/8MS on differentiation of GGB

□ 分化率 Differentiation frequency; ● 叶片数 Number of fronds

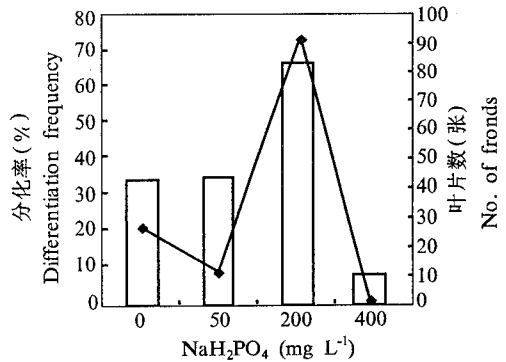


图 2 NaH₂PO₄ 对 GGB 分化的影响

Fig. 2 Effect of NaH₂PO₄ on differentiation of GGB

2.1.3 不同基本培养基的影响

MS, N6^[13], CC^[14] 是三种不同的基本培养基, 它们的区别在于离子浓度及总氮量不同, MS > N6 > CC.

由表 1 数据可知, N6 培养基中未见有 GGB 分化, CC 培养基中的 GGB 在培养 45 d 后即变黑死亡, 三种基本培养基中 MS 适合于日本肾蕨 GGB 的分化。

表 1 不同基本培养基对 GGB 分化的影响

Table 1 Effects of basal media on differentiation of GGB

基本培养基 Basal medium	No. of GGB piece	分化情况 Differentiation*	分化率 (%) Frequency	叶片数 No. of fronds
MS (control)	15	5	33.33	25
N6	15	0	0	0
CC	15	Died**		

*No. of differentiated GGB; **Died after 45 days of culture.

2.1.4 激素和糖的影响

表 2 显示, 横向比较所试验的 4 种激素组合, 仅就蔗糖浓度而言, 5% 的蔗糖的生长率总体来说低于 3% 的 (仅最后一种例外), 表明蔗糖浓度高会抑制 GGB 的生长。蔗糖浓度为 5% 时, 6-BA 5 或 6-BA 4 的生长率一样, 而在 3% 时, 前者的生长率是后者的 1.76 倍, 这可能是因为蔗糖浓度掩盖了激素的作用。从激素方面来说 (仅比较蔗糖浓度为 3%), 单用 6-BA 时, 6-BA 5 比 6-BA 4 的生长率高, 这表明激素浓度高有利于 GGB 生长, 这在大多数实验中均得到证实^[3], 而当 6-BA 与 IAA 组合后 (IAA 均为 0.1 mg L⁻¹), 6-BA/IAA 比值作用明显, 比值为 40 时生长率是比值为 50 时的 2.91 倍, 说明比值小能显著促进 GGB 生长。另外, 6-BA 4+IAA 0.1 组合的效果要明显好于只用 6-BA 4, 前者是后者的 1.82 倍, 但和 6-BA 5 却没有明显差异, 表明在日本肾蕨离体培养的激素调控中, 细胞分裂素起比较重要的作用。

表 2 不同激素与糖浓度的组合对 GGB 生长的影响

Table 2 Effects of growth regulators and sucrose on the growth of GGB

激素 (mg L ⁻¹)		3% 蔗糖 3% sucrose			5% 蔗糖 5% sucrose		
Growth regulators		初重 (g)	末重 (g)	生长率 (%)	初重 (g)	末重 (g)	生长率 (%)
6-BA	IAA	Initial weight	Final weight	Growth rate	Initial weight	Final weight	Growth rate
4	0	0.1320	0.3750	281	0.0746	0.1880	252
5	0	0.0976	0.4840	496	0.1309	0.3300	252
4	0.1	0.0768	0.3935	512	0.0944	0.3113	330
5	0.1	0.1299	0.2290	176	0.0692	0.2716	392

2.2 物理因子对分化及生长的影响

2.2.1 量子辐照度的影响

与对照组相比采用 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的辐照度对 GGB 的分化及生长均最好, 分化率为 100%, 叶片数远远多于其余两个设置, 生长率分别是对照和 $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的 3.56 倍和 1.78 倍 (表 3)。蕨类植物虽然生长在阴湿条件下, 但在组织培养中量子辐照度的增强对于日本肾蕨 GGB 的分化及生长却都是有利的。

表 3 不同量子辐照度对 GGB 分化及生长的影响

Table 3 Effect of irradiance on differentiation and growth of GGB

量子辐照度 Irradiance ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	No. of GGB piece	分化率 (%) Differentiation frequency	叶片数 No. of fronds	初重 (g) Initial weight	末重 (g) Final weight	生长率 (%) Growth rate
40 (control)	15	33.33	25	0.0768	0.3935	512
70	15	93.33	105	0.1074	1.0995	1024
100	15	100	975	0.1030	1.8760	1821

2.2.2 不同光质的影响

由表 4 可见, 对 GGB 的分化, 红光最高, 蓝光次之, 叶片数的情况一样; 而对于 GGB 的生长来说, 红光最大, 白光次之, 蓝光最低。

此外, 将分别培养在白光、红光、蓝光条件下的 GGB 进行过氧化物酶同工酶分析, 结果见图 3。

表 4 不同光质对 GGB 分化及生长的影响

Table 4 Effects of light quality on differentiation and growth of GGB

光质 Light quality	No. of GGB piece	分化率 (%) Differentiation frequency	叶片数 No. of fronds	初重 (g) Initial weight	末重 (g) Final weight	生长率 (%) Growth rate
白光 White	15	33.33	25	0.0768	0.3935	512
红光 Red	15	93.33	88	0.1103	0.6224	564
蓝光 Blue	15	60	52	0.0572	0.2892	506

从图3可见, 无论是分化还是生长, 且不论何种光质, 酶谱的条带数量均未发生任何变化, 都是8条带, 且酶带的Rf值也都相同, 所不同的只是酶的含量。分化中白光处理(W1)的酶含量最多, 而其相应的分化率却最低, 红光处理(R1)的酶含量最少, 其相应的分化率最高, 蓝光处理(B1)介于三者之中, 不同光质中的分化结果与各自的POD酶含量是反向平行的; 生长中红光处理(R2)的酶含量最多, 白光处理(W2)的酶含量次之, 蓝光处理(B1)的酶含量最少, 这与所得生长率成正向平行关系。

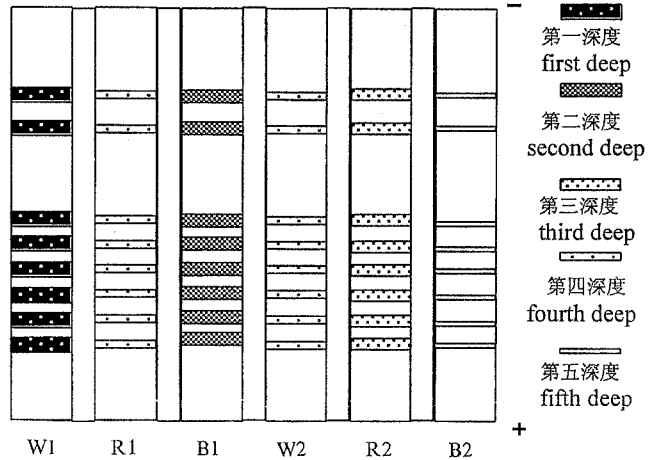


图3 不同光质下培养的GGB的过氧化物酶酶谱

Fig. 3 Peroxidase bands of GGB under different light quality. W, R and B分别代表白光、红光和蓝光; 颜色深度表示酶带深度; 1代表分化, 2代表生长。W, R and B represent white, red and blue lights, respectively; depth represent color depth of bands; 1=differentiation; 2=growth.

3 讨论

3.1 不同培养基对肾蕨 GGB 分化和生长的影响

Leffring^[6]等对波士顿蕨的5个园艺品种进行了研究, 在24个无机盐浓度组合中, 1/2MS最佳; 而Borgen等指出, 1/2MS无机盐浓度对波士顿蕨并不适合, MS无机盐浓度有利于生长^[9]。我们的实验结果显示, 1/2MS对日本蕨较为适宜。可见, 不同园艺品种最适的无机盐浓度不尽相同。

Paek等的研究表明, MS + NaH₂PO₄ 200 mg L⁻¹有利于两种肾蕨丛生苗的发生; Borgen等发现, 在培养基中添加NaP盐, 有助于波士顿蕨试管苗的生长, 试管苗质量也佳^[9]。总体而言, P元素对肾蕨, 尤其是波士顿蕨(肾蕨的一个变种)的组织培养有良好的作用^[9]。我们的实验也证实日本肾蕨在200 mg L⁻¹ NaH₂PO₄下利于GGB的分化。

Hvoslef-Eide^[17]在波斯顿蕨的组培中发现培养基中高氮元素的使用能极大提高离体培养下芽的增殖率, 且明显提高了植株体内的氮含量, 叶色也随之加深。本实验比较了MS、N6及CC三种培养基, 结果只有MS中有GGB分化, N6中没有分化, 而在CC中的GGB全都变黑死亡。N6中的总氮量是MS中的58.34%, CC只有MS的46.63%, 但仅从总氮量方面来分析, 就和2.1节的结论相矛盾了, 所以我们认为三种培养基中NO₃/NH⁴⁺比值也起到一定的作用, MS为1.90, N6为4.00, CC为2.50, 这个比值在组培中的影响目前只在很少植物中研究过^[18-22]。Chun^[19]等的实验发现将MS中的NH₄NO₃降至206.25 mg L⁻¹有利于促进安祖花(*Anthurium* spp.)芽的分化。我们的实验结果表明NO₃/NH⁴⁺比值高也可能是日本肾蕨组培中的不利因素之一。

3.2 光质对分化和生长的影响

光质作为一种物理因子已广泛用于植物组培中的形态发生、生长控制、光形态建成及其各种反应机理的研究^[23-28]。大量研究表明,光质对植物的愈伤组织培养、器官培养、细胞及原生质体培养中生长、分化、代谢及基因表达都有一定程度的影响^[29]。另一方面,植物细胞、组织及器官分化中分化标志酶作用的研究也有诸多报道,过氧化物酶是公认的一种分化标志酶^[30-32]。本实验将分别培养在白光、红光及蓝光下的GGB进行过氧化物同工酶分析,结果表明光质对培养物生长发育的影响,只是数量上的差异,并不能引起质的变化。日本肾蕨GGB在不同光质中的分化结果与各自的POD酶含量成反向平行,而与所得生长率成正向平行关系,显示出POD酶含量与细胞的旺盛分裂、迅速生长成正相关,而且和分化密切相关。归根结底,光只是一种诱导因子,既不能引起苗的形态发生途径产生差异,也不会影响器官发生的有无,它们只能影响培养物的生物量,器官发生的先后和多寡,而形态发生途径以及器官发生只能受激素的调控。

参考文献:

- [1] Briggs G B. Indoor Plants [M]. Wiley, New York, 1987, 343.
- [2] Murashige T. Plant tissue culture and its biotechnological application [M]. Berlin: Springer Verlag, 1977, 392.
- [3] 金建平, 兰涛. 观赏蕨的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(1):71-73.
- [4] Guidugli R, Tesi R. *In vitro* propagation of *Nephrolepis exaltata* cultivar Teddy Junior [J]. Horticultural Abstracts, 1985, 55:909.
- [5] Higuchi H, Amaki W, Suzuki S. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Presl [J]. Sci Hort, 1987, 32:105-113.
- [6] Higuchi H, Amaki W. Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation [J]. Sci Hort, 1989, 37:351-359.
- [7] Amaki W, Higuchi H. A possible propagation system of *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum* and *Rumohra* through tissue culture [J]. Acta Horticulturae, 1991, 300:237-243.
- [8] Fernandez H, Bertrand A M, Sanchez-Tams R. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 44:261-265.
- [9] Bertrand A M, Albuerne M A, et al. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 57:65-69.
- [10] 金建平, 兰涛, 顾渊. 皱叶肾蕨卷曲叶尖的离体培养 [J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(5):359-360.
- [11] 曾宋君, 关丽. 波斯顿蕨的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(3):198-200.
- [12] 王彭伟. 肾蕨组培快速繁殖的研究 [J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2):107-109.
- [13] Chu C C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops [A]. Proc Symp. Plant Tissue Culture [C]. Peking: Science Press, 1978, 43-50.
- [14] Potrykus I, Harms C T, Lörz H. Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1979, 54:209-214.
- [15] 胡能书, 万贤固. 同工酶技术及其应用 [M]. 湖南:长沙湖南科学技术出版社, 100, 104-110.
- [16] Fujiwara A. Plant Tissue Culture (Proc 5th Int Congress Plant Tissue & Cell Culture) [C]. Maruzen, Tokyo, 1982,

499.

- [17] Hvoslef-Eide A K. Influence of nitrogen fertilization to mother plants and the subsequent growth of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott [J]. Gartenbauwissenschaft, 1992, 57(6):292-297.
- [18] 李志芳, 叶秦, 赵贵林, 等. 花烛的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(3):197-201.
- [19] Chun I H, Min B Y, Chung H J. Callus induction and shoot differentiation by *in vitro* culture in *Anthurium* spp. [J] J Kor Soc Hort Sci, 1993, 34(5):384-393.
- [20] 阙国宁. 西洋杜鹃试管嫩梢繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 1985, 4:39.
- [21] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 1996, 150.
- [22] 颜昌敬. 农作物组织培养 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991, 22.
- [23] Hvoslef-Eide A K. The effect of irradiance and temperature on *in vitro* cultures of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. [J] Gartenbauwissenschaft, 1990, 55(6):259-264.
- [24] Seibert M, Kadkade P G. Environmental factor. A. Light [A]. In: Staba F J. Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals [M]. CRC Press, Florida, 1980, 123-141.
- [25] 倪德祥, 蔡同润, 张丕方, 等. 光质对花叶芋组织培养形态发生的影响 [J]. 园艺学报, 1987, 14(4):271-275.
- [26] 倪德祥, 陈刚, 张丕方, 等. 锦葵愈伤组织培养中光质对其过氧化物同工酶和发根的效应 [J]. 复旦学报(自然科学版), 1986, 25(2):157-162.
- [27] 熊丽, 周吉源, 殷荣华. 光质对石刁柏愈伤组织培养中生长和过氧化物酶的影响 [J]. 武汉植物学研究, 1995, 13(3): 253-257.
- [28] 王维荣, 王咏冬, 欧阳光察, 等. 光质对黄瓜及番茄愈伤组织培养中分化和有关酶的影响 [J]. 植物生理学报, 1991, 17(2): 118-124.
- [29] 倪德祥. 光在植物组织培养中的调控作用 [J]. 自然杂志, 1986, 9(3):193-198.
- [30] Fukuda H, Komaine A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans* [J]. Planta, 1982, 155:423-430.
- [31] Yamada Y, Kuboi T, Sato E. Cell differentiation [A]. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture [C]. Peking: Science Press, 1982.
- [32] Karl E W, John C G. Peroxidases as indicator of growth and differentiation in aspen callus cultures [J]. Plant Physiol, 1975, 33:219-223.