

# 蜈蚣草组织培养与自然播种繁殖的比较研究

孙静贤, 高云涛, 张继, 王忠诚, 杨红梅, 杜刚

(民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500)

**摘要:**以蜈蚣草(*Pteris vittata* L.)孢子为外植体,研究了蜈蚣草无性系快繁体系技术,比较分析了蜈蚣草组织培养和自然播种繁殖的效果。结果表明:蜈蚣草孢子萌发条件并不苛刻,无论在培养基中,还是普通基质中都能萌发,且萌发率都在90%以上,分化率也较高。故而,可以创造适合孢子萌发的人工条件,通过自然播种,低成本地获得大量蜈蚣草种苗;同时可以通过组织培养快速繁殖优良的蜈蚣草株系,并在相对干净的背景下研究微生物与蜈蚣草对砷吸收的相互作用。

**关键词:**蜈蚣草;孢子;组织培养;自然播种;比较

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0091-03

蜈蚣草(*Pteris vittata* L.)属凤尾蕨科凤尾蕨属多年生草本植物。它不但具有观赏和药用价值,还是一种砷的超富集植物。砷是砒霜的主要成分,有致畸致癌致突变性,长期饮用被砷污染的水,对人体危害极大。蜈蚣草对砷的耐性和富集能力极强,且能将吸收的砷转移到地上部;同时它还具有生长快、生物量大、地理分布广和适应性强等特点,故而在砷污染土壤和水源的修复中具有重要价值<sup>[1]</sup>。随着人们对蜈蚣草价值的认识越来越多,对其人工繁殖的研究也逐渐展开。国内以孢子为外植体对蜈蚣草进行组培的报道较多见。徐艳等<sup>[2]</sup>在不使用激素的情况下,用不同浓度MS培养基成功培养出完整植株;而有些研究表明,在加激素的MS培养基上也可获得蜈蚣草完整植株<sup>[3-6]</sup>。除组织培养外,还可在温室土壤内播种孢子得到蜈蚣草苗<sup>[7]</sup>。可见,对蜈蚣草进行人工繁殖可以使用不同方法,但至今还鲜见报道来比较这些方法哪种更经济,更有效。

现以蜈蚣草孢子为外植体进行组织培养研究,以期建立蜈蚣草无性系,为研究蜈蚣草与微生物对砷吸收的相互作用奠定基础,同时比较组织培养与自然播种对蜈蚣草快速繁育的影响,为蜈蚣草在土壤修复中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

蜈蚣草孢子叶采自云南昆明云南铝厂外土壤污

染区。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 蜈蚣草的组织培养** 蜈蚣草孢子无菌萌发:将蜈蚣草孢子叶剪成1 cm<sup>2</sup>的小片,在无菌水中浸泡5 min,酒精浸泡10 s,无菌水清洗1次,升汞灭菌5 min,用手术刀刮下孢子叶上的孢子接种于培养基上。培养条件:25℃,光照强度2 000 lx,光照培养时间12 h/d。继代培养:对不同浓度MS培养基和6-BA、NAA、IAA、2,4-D、GA<sub>3</sub>等激素进行单因子试验,每种激素分别做0.2和1.0 mg/L 2个水平。将萌发孢子转接后培养,观察统计原叶体增殖和分化情况。绿色小球诱导:用3个组合激素培养基(MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA;MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IAA;MS+4.0 mg/L IAA)对原叶体进行绿色小球诱导试验。生根培养:在MS培养基上萌发的孢子未经继代培养即长出原叶体,且有部分分化出绿色小球,并长出芽。将芽取下接于生根培养基(1/8MS+0.2 mg/L NAA)上进行生根培养试验。练苗移栽:将原叶体移栽至草炭土中,用保鲜膜覆盖20 d,并保持湿润,2个月后统计成活率。

**1.2.2 蜈蚣草的自然播种繁殖** 自然萌发:在培养皿中放入3张与皿底等大的圆形滤纸片,加入适量无糖MS液体培养基使滤纸保持湿润,将蜈蚣草孢子均匀分散在滤纸表面,置于25℃,光照强度2 000 lx,光照时间12 h/d培养。直接播种于腐质土基质:将蜈蚣草孢子均匀播种到草炭土基质,用保鲜膜覆盖40 d,并保持湿润,2个月后观察其萌发及生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜈蚣草的组织培养

**2.1.1 蜈蚣草孢子无菌萌发** 培养50 d后,绝大多数培养基及基质上都长出原叶体,继续培养60 d后,统计

**第一作者简介:**孙静贤(1978-),女,硕士,讲师,研究方向为生物技术。E-mail:kmsjx@163.com

**基金项目:**云南省本科教学实验生物技术示范中心资助项目(0205-2001015209)。

**收稿日期:**2012-11-07

分化情况。从表 1 可以看出,试验设计的培养基上蜈蚣草孢子都能萌发并长出原叶体(图 1、2),不过萌发效果有所不同。1/8MS 培养基上萌发情况最好,但经长时间培养后原叶体出现褐化现象;MS 培养基上原叶体增殖较快,且颜色翠绿;而河沙上的萌发情况最差,可能是由于河沙透气性较差的原因。经过约 110 d 的培养,未继代的原叶体有部分分化出孢子体(图 3)。MS 和

1/8MS 培养基上分化较明显,MS 培养基上分化的孢子体生根较晚,而 1/8MS 培养基上分化的孢子体根和叶片几乎同时长出。在河沙和腐殖土上萌发出的原叶体加水后也可分化出孢子体(图 4)。由表 1 可以看出,凡是萌发较好的分化率均较高。而无糖 MS 培养基上原叶体生长缓慢,颜色翠绿不分化。

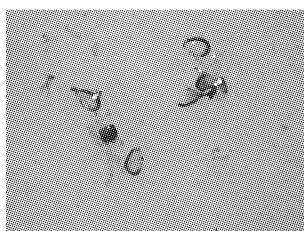


图 1 孢子萌发



图 2 原叶体

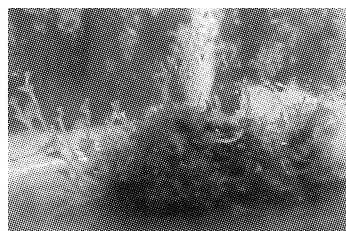


图 3 原叶体分化出的孢子体

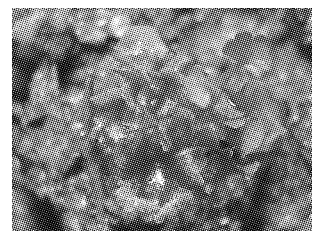


图 4 浇水后长出的孢子体

表 1 无菌条件下孢子萌发及孢子体分化结果

编号	培养基	萌发情况	分化率/%
A	MS+30 g/L 糖	+++	40
B	1/2MS+30 g/L 糖	++	20
C	1/4MS+30 g/L 糖	++	30
D	1/8MS+30 g/L 糖	++++	60
E	MS 不加糖	++	不分化
F	河沙	+	20
G	腐殖土	++	30

注:表中“+”表示萌发效果,“+”越多表示萌发效果越好。

2.1.2 继代后原叶体增殖分化结果 采用不同浓度的 MS 培养基和无糖 MS 培养基继代培养后,1/4MS 和 1/8MS 培养基上原叶体出现褐化现象,其它试验组颜色翠绿。另外,MS 和 1/2MS 上原叶体增殖倍数较高,30 d 可增殖约 5 倍;而无糖培养基上增殖倍数最低。这与未继代培养的结果相似。但在不加激素的培养基上,原叶体分化并不显著。不同激素对原叶体增殖和分化的影响各异。从表 2 可以看出,MS+1.0 mg/L 6-BA 培养基对原叶体增殖和分化作用均最明显;而 MS+1.0 mg/L 2,4-D 对原叶体的增殖作用最小,并出现严重枯死现象,且对原叶体分化也无作用。由此可见 1.0 mg/L 6-BA 最适于诱导蜈蚣草孢子体分化,而 2,4-D 不利分化,浓度

表 2 激素对原叶体增殖和分化的影响

培养基	增殖倍数	分化效果
MS+0.2 mg/L 6-BA	8	++
MS+1.0 mg/L 6-BA	10	+++
MS+0.2 mg/L NAA	6	+
MS+1.0 mg/L NAA	6	++
MS+0.2 mg/L IAA	5	+
MS+1.0 mg/L IAA	6	++
MS+0.2 mg/L 2,4-D	5	++
MS+1.0 mg/L 2,4-D	2	无分化
MS+0.2 mg/L GA <sub>3</sub>	5	+
MS+1.0 mg/L GA <sub>3</sub>	5	+

注:“+”表示分化效果,表示有孢子体(芽)长出,越多表示分化效果越好。

越高越抑制分化。

2.1.3 绿色小球(GGB)诱导和增殖 将培养 90 d 的原叶体转接到 MS+4.0 mg/L IAA 培养基后,可诱导出大量米粒大小的绿色小球(GGB)(图 5),进一步分化出孢子体(图 6),可见高浓度 IAA 可以诱导出绿色小球并使其分化形成孢子体。诱导出的绿色小球在含有 6-BA 的培养基上增殖十分明显,且能分化出大量的芽(图 7)。因此可以尝试通过大量增殖绿色小球来达到组培快繁的目的。

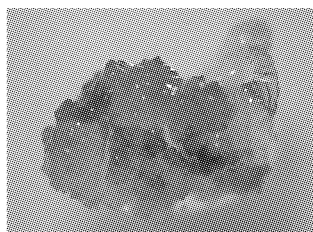


图 5 绿色小球

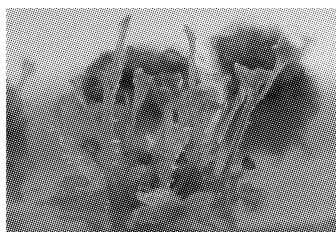


图 6 绿色小球分化产生孢子体



图 7 绿色小球分化产生大量芽



图 8 草炭土中的孢子体

2.1.4 生根培养 将继代培养基上长出的已经发芽的绿色小球转接到 1/8MS+0.2 mg/L NAA 培养基上,3 周后基本都能生根,因此用低浓度的培养基和 NAA 诱导生根是可行的。

2.1.5 练苗移栽 移栽的原叶体在潮湿的草炭土上能成活,长出根的幼苗移栽成活率约为 90%。

## 2.2 自然播种繁殖

2.2.1 播种于滤纸上 自然萌发培养皿中的滤纸上接种的蜈蚣草孢子在第 7 天开始萌发,萌发率为 95%。在做萌发率统计试验时,由于孢子萌发较快,可在滤纸上长出大量微生物前完成萌发率统计,因此在滤纸上进行萌发率检验是比较合适的。

2.2.2 播种于草炭土上 蜈蚣草孢子直接播种到草炭土中,并保持湿润,20 d 左右可以看到原叶体。自然播种形成的孢子体长势比较健壮(图 8),移栽到花盆 2 个月统计成活率为 96%。表明自然播种的蜈蚣草种苗更容量成活。

## 3 结论与讨论

在无菌萌发试验中 1/8MS 培养基上分化的孢子体根和叶片几乎同时长出,萌发率及分化率都是最高的,而无糖 MS 培养基上原叶体生长缓慢,颜色翠绿不分化,表明蜈蚣草孢子萌发需要一定的有机养分。在继代培养中,MS+1.0 mg/L 6-BA 培养基对原叶体增殖和分化作用均最明显,加入细胞分裂激素更能促进原叶体分化产生孢子体。试验还发现将培养 90 d 的原叶体转接到 MS+4.0 mg/L IAA 培养基后,可诱导出大量米粒大小的绿色小球(GGB),进一步分化出孢子体,可见高浓

度 IAA 可以诱导出绿色小球并使其分化形成孢子体。此外,诱导出的绿色小球在含有 6-BA 的培养基上增殖十分明显,且绿色小球能分化出大量的芽。通过比较试验发现,蜈蚣草孢子萌发条件并不苛刻,无论在培养基中,还是普通基质中都能萌发,且萌发率都在 90%以上,分化率也较高。野外蜈蚣草孢子萌发率很低,可能是由于自然条件下湿度不够。因为蜈蚣草是蕨类植物,孢子很丰富,所以可以创造适合孢子萌发的人工条件,通过自然播种其孢子低成本地得到大量蜈蚣草种苗。同时可以通过组织培养快速繁殖优良的蜈蚣草株系,并在相对干净的背景下研究微生物与蜈蚣草对砷吸收的相互作用。

## 参考文献

- [1] 陈同斌,韦朝阳,黄泽春,等. 砷超富集植物蜈蚣草吸收砷及其对砷的富集特征[J]. 科学通报,2002,47(3):207-210.
- [2] 徐艳,石雷,刘燕,等. 砷超富集植物——蜈蚣草孢子的无菌培养[J]. 植物生理学通讯,2004,40(6):713.
- [3] 石晓云,唐伟斌,石霄凌. 蜈蚣草孢子组织培养与快繁研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(25):10775.
- [4] 尹怀约. 蜈蚣草的组织培养[J]. 四川师范学院学报,1991,12(1):20-22.
- [5] 罗利琼,张军,罗旭. 凤尾蕨科植物蜈蚣草的组织培养[J]. 安徽农业科学,2011,39(29):17802.
- [6] 罗利琼,张军,罗旭,等. Rapid propagation of *Pteris vittata* L. via tissue culture[J]. Agricultural Science and Technology,2012,13(1):68-70.
- [7] 许建华,肖艳平,尹睿,等. 蜈蚣草繁殖技术研究[J]. 上海农业科技,2010(6):23-24.
- [8] 蒋盛军,宋希强,王胜培,等. 蕨类植物组织培养研究进展[J]. 园艺学报,2002,29(增刊):651-656.

## Comparison of *Pteris vittata* L. Propagation Between Tissue Culture and Natural Sowing

SUN Jing-xian,GAO Yun-tao,ZHANG Ji,WANG Zhong-cheng,YANG Hong-mei,DU Gang

(Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500)

**Abstract:** Taking spore of *Pteris vittata* L. as material, its rapid propagation with clone system were studied, and the propagation of tissue culture and natural sowing of *Pteris vittata* L. were compared. The results showed that the sprouting condition of its spores was not rigorous. They could sprout both in medium and normal matrix. The germination rate could reach more than 90%, and the differentiation rate was also high. Therefore, low-cost seedlings could be obtained cheaply through natural sowing with spores under artificial conditions. In the other hand, the screened strains of *Pteris vittata* L. plantlet could be reproduced by tissue culture. Consequently the interaction between microbe and *Pteris vittata* L. on the absorption of arsenic could be studied under a relatively clean background.

**Key words:** *Pteris vittata* L.; spore; tissue culture; natural sowing; compare