

蜈蚣草快繁及其组培苗对砷的富集研究

王玲仙, 曾民, 陈玲, 付坚, 柯学, 王波, 陈越, 程在全*

(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南昆明 650223)

摘要:【目的】应用不同外植体建立蜈蚣草组织培养快速繁殖的技术体系, 并进行组培苗对砷的富集研究。【方法】以蜈蚣草的孢子、幼芽, 以及无菌苗的幼叶、幼茎和顶芽为外植体, 以不同浓度的蜈蚣草混合匀浆配比不同浓度的植物激素, 优选出蜈蚣草组培快繁的最适条件。【结果】幼叶为最佳外植体, 其次是孢子, 顶芽和茎最差。1/2MS + 2 4-D 2 mg/L + 蜈蚣草茎叶匀浆混合液 (PVCLM) 60 g/L 为最佳的愈伤诱导培养基, 愈伤诱导率可达 100%; 1/2MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L 为最佳分化培养基, 分化率达 98.3%; 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L 为最佳的丛生芽增殖培养基, 增殖系数达 1.1; 1/4MS + NAA 0.2 mg/L 为最佳生根培养基, 生根率 98%, 以上涉及的培养基中琼脂浓度为 7.8 g/L, 蔗糖浓度为 20 g/L, pH 为 5.8~6.0。组培苗移栽至尾矿库栽种, 成熟后检测蜈蚣草中富集的砷的量达到 3318 g/hm²。【结论】摸索出一套适合工厂化的蜈蚣草组培快繁技术体系, 组培苗对砷的富集量较野生型高。

关键词: 蜈蚣草; 植株匀浆液; 组培技术; 砷富集

中图分类号: S567.239 文献标识码: A

Rapid Propagation of *Peris vittata* Linn and Characteristics of Arsenic Accumulation by Tissue Culture Plants

WANG Ling-xian, ZENG Min, CHEN Ling, FU Jian, KE Xue, WANG Bo, CHEN Yue, CHENG Zai-quan*

(Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Kunming 650223, China)

Abstract 【Objective】The objective of the present paper is to establish plant tissue culture and rapid propagation techniques using different explants of *Pteris vittata* Linn. And the arsenic enrichment of plantlet was analyzed. 【Method】The spore, bud and young leaves, caulicle, apical buds of plantlet were used as explants, and the 1/2 MS + sucrose 20 g/L + phytagel 7.8 g/L (pH 5.8-6.0) were used as the basic medium, the phytohormone and homogenate of plant ratio testing were used to screen the medium formula for callus induction and subculture of *P. vittata*. 【Result】The young leaves were the best explants, followed by spores, the caulicle and apical buds were the worst explants. The best medium formula for the callus induced from explants was 1/2MS + 2 4-D 2 mg/L + PVCLM 60 g/L. The best differentiation medium formula for the seedling induced from callus was 1/2MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L. The best adventitious bud multiplication medium formula was 1/2MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L. In addition, the use of 1/4MS + NAA 0.2 mg/L could get a high rooting rate (98%). Therefore, using this tissue culture system, callus reduction and differentiation rate could reach to 100% and 98.3%. Finally, the concentration of arsenic enrichment of plantlet in *P. vittata* was 3318 g/hm² when planted in tailing impoundments. 【Conclusion】A rapid tissue culture technology system was established for *P. vittata*. This technology is suitable for mass production. The plantlet can enrichment more arsenic than wild type.

Key words: *Pteris vittata* Linn.; Plant homogenate; Tissue culture; Arsenic-accumulation

【研究意义】蜈蚣草(*Pteris vittata* Linn.) 属于凤尾蕨科 Pteridaceae、凤尾蕨属 *Pteris*, 蜈蚣草又名长

叶甘草蕨, 广布中国江南各省, 北至陕甘及河南南部也有分布, 主要生于钙质土和石灰岩上, 并具有较高的观赏、药用和环保价值^[1-2]。在观赏价值方面, 由于其羽叶优美, 栽培较为广泛, 并且常用于配置山石盆景; 在药用价值方面, 据植物志记载, 药用可祛风湿、杀虫、治疔疮、止血、止泻等功效^[3-6]; 在环保价值方面, 随着工业和城市化建设发展造成包括汞

收稿日期: 2016-12-12

基金项目: 云南省农产品产地土壤修复示范项目(2130139)

作者简介: 王玲仙(1963-), 女, 云南昆明人, 大专, 高级实验师, 主要从事植物组织培养技术研究, E-mail: wanglingxian2001@aliyun.com.cn * 为通讯作者, E-mail: czquan-99@163.com。

(Hg)、镉(Cd)、铅(Pb)、铬(Cr)和砷(As)的土壤重金属污染问题日益严重^[7-8]。【前人研究进展】近年来,As污染成为中国非常突出且亟需解决的环境问题^[9],自2001年韦朝阳等^[10]以及Ma等^[11]报道发现蜈蚣草对重金属砷具有较强的富集作用以来,一直是国内外学者的研究热点,陈同斌等^[12]进一步研究了蜈蚣草对砷富集的作用,随着对蜈蚣草富集重金属砷研究的深入,越来越多的学者发现蜈蚣草在重金属污染的土壤和水源修复中的重要作用^[13-18]。蕨类植物孢子多,繁殖系数高。由于近些年生态环境变化大,对其繁殖限制因素多,繁殖效率往往不理想。蜈蚣草一般有成熟孢子繁殖、分株法繁殖和组织培养繁殖等3种繁殖方法^[19]。成熟孢子繁殖和分株法繁殖效率不高,耗时长,目前蜈蚣草的繁殖多集中在利用组织培养方法上。现有的蜈蚣草组织培养技术,多采用蜈蚣草的孢子萌发成配子体,再用配子体诱导愈伤组织,最终获得组培苗。蜈蚣草野外收集孢子和室内孢子无菌处理较难,孢子轻、易漂浮,处理过程繁琐,不易操作,为克服传统的孢子繁殖带来的一系列问题,罗丽琼等^[19]以野生蜈蚣草叶芽尖为外植体,通过激素配比试验,成功地筛选出蜈蚣草愈伤组织诱导和继代培养的培养基配方,简化了组织培养的步骤,能够在2个月内培育出蜈蚣草幼苗,但未介绍蜈蚣草的成苗率。【本研究切入点】以上介绍蜈蚣草组织培养的方法共性还在于,相关培养基的配制只是调整植物激素和大量元素、微量元素、有机碳源的比例来完成。笔者通过相关文献介绍的培养基组合,经过多次试验,成苗率很低甚至无法成苗。早在20世纪就有人针对难培养的材料,在培养基中附加天然提取物(如椰乳、玉米胚乳、香蕉汁等),得到了很好的培养效果,尤其在提高分化率和防止褐化效果方面较为显著。蜈蚣草在培养过程中,褐化较为严重,现有的培养方法是在整个培养过程中添加防止褐化的物质,如活性炭和PVP,增加了过程的繁琐,也造成相关试剂的浪费。【拟解决的关键问题】目前为止,应用天然提取物进行蜈蚣草快繁的方法还未见报道,故本研究应用蜈蚣草茎叶的混合匀浆进行组织培养,创建了一种极为高效高分化率的快速繁殖体系,解决了蜈蚣草难分化,分化率低、成苗率更低的困难,为获得优质壮苗提供重要人工繁殖途径,形成批量生产蜈蚣草的组织培养方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以蜈蚣草的幼芽和孢子为基本材料,采自于云

南省蒙自市野外正常生长的植株,即将每年3月刚长出的距地面6cm的幼芽和每年7-8月背面附着深棕色孢子的叶片剪下,用浸湿的吸水纸包好,放入自封袋中,带回实验室备用。

1.2 培养基

除预培养以MS为基本培养基外,其余的培养基还添加不同种类和浓度水平的植物生长物质、不同浓度的蜈蚣草茎叶混合匀浆液、蔗糖20g/L及琼脂糖7.8g/L。各培养基pH值均调至5.8~6.0,培养基在121℃下高压蒸汽灭菌20min。

1.3 试验方法

1.3.1 基本实验材料无菌处理 幼芽无菌处理:将幼芽用自来水冲洗,用3%的洗衣粉充分溶解,浸泡后,再用流动的自来水冲洗,用吸水纸吸干多余水分,置于超净台上。用70%~75%的酒精表面灭活30s,再用0.1%氯化汞消毒6~8min,无菌水冲洗5~6次,用无菌滤纸吸干多余水分,待用。

孢子无菌处理:将附着深棕色孢子的叶片用自来水冲洗,置于超净台上用70%~75%的酒精表面灭活1min,将孢子刮入培养皿中,再转入2mL的离心管中,用0.1%氯化汞消毒15min,3000r/min离心5min,弃上清,无菌水反复洗5~6次,用无菌滤纸吸干多余水分,待用。

1.3.2 蜈蚣草茎叶匀浆混合液(简称为PVCLM)处理 取新鲜的蜈蚣草茎和叶(质量比1:1)用清水清洗后,滤掉水分,按所需要的质量体积比打成匀浆,分装成小瓶,-20℃保存备用。用时无菌过滤。

1.3.3 预培养及愈伤组织诱导 幼芽处理方法:无菌处理好的幼芽切下褐化部分,余3cm幼芽,接入1/2MS培养基中预培养,待幼嫩叶片展开后,将幼叶、幼茎和顶芽分别切成1cm左右,接入诱导培养基,诱导培养基共设8个处理,分别是处理1:1/2MS+2.0mg/L A-D;处理2:1/2MS+PVCLM 50g/L;处理3:1/2MS+2.0mg/L A-D+PVCLM 50g/L;处理4:1/2MS+2.0mg/L A-D+PVCLM 60g/L;处理5:1/2MS+2.0mg/L A-D+PVCLM 70g/L;处理6:1/2MS+2.0mg/L A-D+PVCLM 80g/L;处理7:1/2MS+2.0mg/L A-D+PVLM 90g/L;处理8:1/2MS+2.0mg/L A-D+PVLM 100g/L上,每皿接种6~10个不同外植体,每种处理5个重复。

孢子处理方法:将孢子分别接入8个诱导培养基处理上,每皿接种60~80个孢子,每种培养基5个重复。

将接种处理好的4种外植体,置于温度(25±2)℃,湿度60%~70%的培养箱中暗培养7d后

转到温度和湿度与暗培养相同,光照 2000 lx,光照时间 12 h/d 的光照培养箱中继续培养。待愈伤组织长出,观察记录结果。

1.3.4 分化为丛生芽的培养 将愈伤切成直径约为 0.3~0.5 cm 的小团,接入分化培养基,分化培养基共设 10 个处理,分别是处理 1: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L; 处理 2: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 30 g/L; 处理 3: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 60 g/L; 处理 4: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 80 g/L; 处理 5: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 100 g/L; 处理 6: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 120 g/L; 处理 7: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 150 g/L; 处理 8: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L; 处理 9: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 240 g/L; 处理 10: 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 280 g/L。每瓶接种 20 个,每处理 5 个重复,置于温度(25 ± 2) °C,湿度 50%~60%,光照强度 3000 lx,光照时间 12 h/d 的光照培养箱中培养,7 d 后将光照调至 4000 lx,继续分化培养,待出现浅绿色芽点并分化出纤细小苗,即形成丛生芽。

1.3.5 丛生芽继代分化为丛生苗的培养 将长出的丛生芽接入不同处理的 10 个分化培养基上继续分化,每瓶接种 20 个,每种培养基 5 个重复,培养条件与分化培养一致,待丛生芽长成独立小苗(丛生苗同时长出)时,记录结果。

1.3.6 生根培养 将 3~4 cm 绿而壮的小苗接入装有生根培养基的玻璃瓶中,生根培养基共设 9 个处理,处理 1: 1/4 MS + NAA 0.2 mg/L; 处理 2: 1/4 MS + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 30 g/L; 处理 3: 1/4 MS + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 50 g/L; 处理 4: 1/4 MS + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 100 g/L; 处理 5: 1/4 MS + IAA 0.5 mg/L; 处理 6: 1/4 MS + IAA 0.5 mg/L + PVCLM 30 g/L; 处理 7: 1/4 MS + IAA 0.5 mg/L + PVCLM 50 g/L; 处理 8: 1/4 MS + IAA 0.5 mg/L + PVCLM 100 g/L; 处理 9: 1/4 MS + IAA 0.5 mg/L + PVCLM 150 g/L。生根培养每瓶接种 20 个,每种培养基 5 个重复,置于温度(25 ± 2) °C,湿度 50%~60%,光照强度 3000 lx,光照时间 12 h/d 的培养箱中培养,待根芽长出,主根长至 2 cm 时生根苗即能假植,记录结果。

1.3.7 炼苗与移栽 将主根长至 2 cm 的生根苗置

于温室苗床上,保持环境温度 20~25 °C,湿度 50%~80%,自然光照进行炼苗,增强幼苗对环境的适应能力。14 d 后将附在生根苗上的培养基冲洗掉,置于大口瓶中,加水将小苗根部淹没,盖上透气膜,3 d 后掀膜开口炼苗,每天换水,待苗缓活后移栽至温室,并记录成活率。

1.3.8 田间种植与管理 将温室定植苗移栽至矿区尾矿库,移栽前将地翻犁,地按一垄一垄整理好,每垄间隔 40 cm,种植株距 20 cm,苗种下后,上面覆盖植物秸秆,将水浇透,常规水肥管理,待苗长至 1~1.2 m,并且成蓬生长,枝叶茂盛时,采样用于分析检测其中砷富集含量,检测样送云南省农业科学院质量标准研究所进行检测。

2 结果与分析

2.1 幼芽预培养

为研究蜈蚣草的幼叶、幼茎和顶芽愈伤组织诱导情况,将无菌处理好的幼芽接种于 1/2 MS 培养基中进行预培养,7 d 后大部分幼芽的幼嫩叶片展开(图 1-A),形成了幼叶、幼茎和顶芽,这 3 个外植体可直接用于愈伤组织的诱导。

2.2 愈伤组织诱导培养

将幼叶、幼茎、顶芽和孢子 4 种外植体接种于愈伤组织诱导培养基上,5 d 后愈伤组织萌发,统计所有处理的愈伤诱导率,结果见表 1 和图 1-B。顶芽和茎在 8 种培养基中均未诱导出愈伤组织,孢子在处理 2 中未出现萌动的迹象,在其余 7 种培养基都有萌动迹象,在处理 6 中萌动效果最好,但愈伤诱导率只能达到 1%。叶片在处理 2 中未出现萌动的迹象,在其余 7 种处理都有萌动迹象,在处理 4 中萌动效果最好,愈伤组织诱导率达到 100%。所以,结果表明 4 种外植体中,最适合愈伤组织诱导的外植体为幼叶,其次是孢子,顶芽和茎最差。最佳愈伤组织诱导培养基为处理 4 的培养基,即 1/2 MS + 2.0 mg/L + PVCLM 60 g/L + 琼脂粉 7.8 g/L + 蔗糖 20 g/L, pH 5.8~6.0。

2.3 愈伤分化为丛生芽的培养

将成团的愈伤切成直径为 0.3~0.5 cm 的小团,接入 10 个不同处理的分化培养基中,每培养 2 d 观察 1 次,5 d 后大部分组合培养基上有大量丛生芽时(图 1-C),统计分化率,从表 2 可看出,处理 8 是最佳的分化培养基,分化率达 98.3%。由此可见,愈伤分化为丛生芽的最适培养基为 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L + 琼脂粉 7.8 g/L + 蔗糖 20 g/L, pH 5.8~6.0。

表 1 蜈蚣草愈伤诱导培养

Table 1 Callus induction of *Pteris vittata*

培养基处理 Medium treatments	接种数 Inoculation number				诱导率(%) Induction rate				愈伤诱导萌发情况 Callus induction
	孢子	顶芽	茎	叶	孢子	顶芽	茎	叶	
1	300	15	30	30	0.3	0	0	1.2	孢子 21 d 萌动, 叶片 25 d 萌动
2	380	30	49	45	0	0	0	0	未出现萌动
3	360	15	35	30	0.6	0	0	66.6	孢子萌动同时出现, 叶片萌动分先后
4	370	15	28	38	0.9	0	0	100	孢子愈伤浅绿晶莹剔透, 叶片愈伤深绿
5	380	15	19	35	0.7	0	0	97	孢子愈伤形成速度快, 叶片慢
6	330	15	20	30	1	0	0	88	孢子愈伤有效性低, 叶片愈伤有效性高
7	400	15	25	30	0.4	0	0	93	蜈蚣草茎叶匀浆混合液浓度增高, 愈伤诱导率降低
8	380	15	19	38	0.3	0	0	97.3	孢子愈伤底部褐化重, 易碎。叶片愈伤紧实

表 2 蜈蚣草愈伤分化为丛生芽的培养

Table 2 The adventitious bud multiplication of *Pteris vittata*

培养基处理 Medium treatments	接种数 Inoculation number	丛生芽 Clump shoot	分化率(%) Differentiation rate	丛生芽生长情况 Shoot growth
1	100	2	2.0	芽点 1~2 个
2	120	44	36.6	形成丛生芽
3	103	52	50.4	丛生芽点变白
4	110	65	59.0	丛生芽及丛生芽点渐多
5	101	83	82.1	丛生芽点渐绿
6	110	100	90.9	丛生芽点变长,
7	90	88	97.7	丛生芽点深绿、多、粗壮
8	61	60	98.3	丛生芽点较多、紧实、粗, 有效性高
9	52	23	44.2	丛生芽点渐少
10	110	19	17.3	丛生芽变黄

2.4 丛生芽继分化为丛生苗的培养

将长出的丛生芽接入 10 个不同处理的分化培养基上继续分化, 每培养 2 d 观察 1 次, 出现丛生苗

时, 统计丛生苗形成情况, 5 d 后大部分组合培养基上有大量丛生苗时(图 1-D), 统计增殖系数, 从表 3 可看出, 处理 8 是最佳的继代分化培养基, 增殖系

表 3 蜈蚣草丛生芽继分化为丛生苗的培养

Table 3 The seedling induction of *Pteris vittata*

培养基处理 Medium treatments	接种数 Inoculation number	丛生苗数 Number of clusters	增殖系数(%) Multiplication factor	丛生苗生长情况 Growing situation of cluster seedlings
1	100	10	0.1	小苗纤细, 苗弱
2	100	30	0.3	苗微粗, 苗长
3	100	45	0.45	苗微粗, 苗由长渐短
4	100	60	0.6	苗渐粗, 叶片曲卷
5	100	70	0.7	苗粗, 叶片浅绿
6	100	70	0.7	苗粗, 苗渐绿
7	100	85	0.85	苗壮深绿色,
8	100	110	1.1	苗壮深绿色, 叶片展开
9	100	45	0.45	苗淡黄, 苗弱
10	75	35	0.46	苗蜡黄, 整株植株萎焉, 腐烂形成

表 4 蜈蚣草的生根培养

Table 4 The rooting culture of *Pteris vittata*

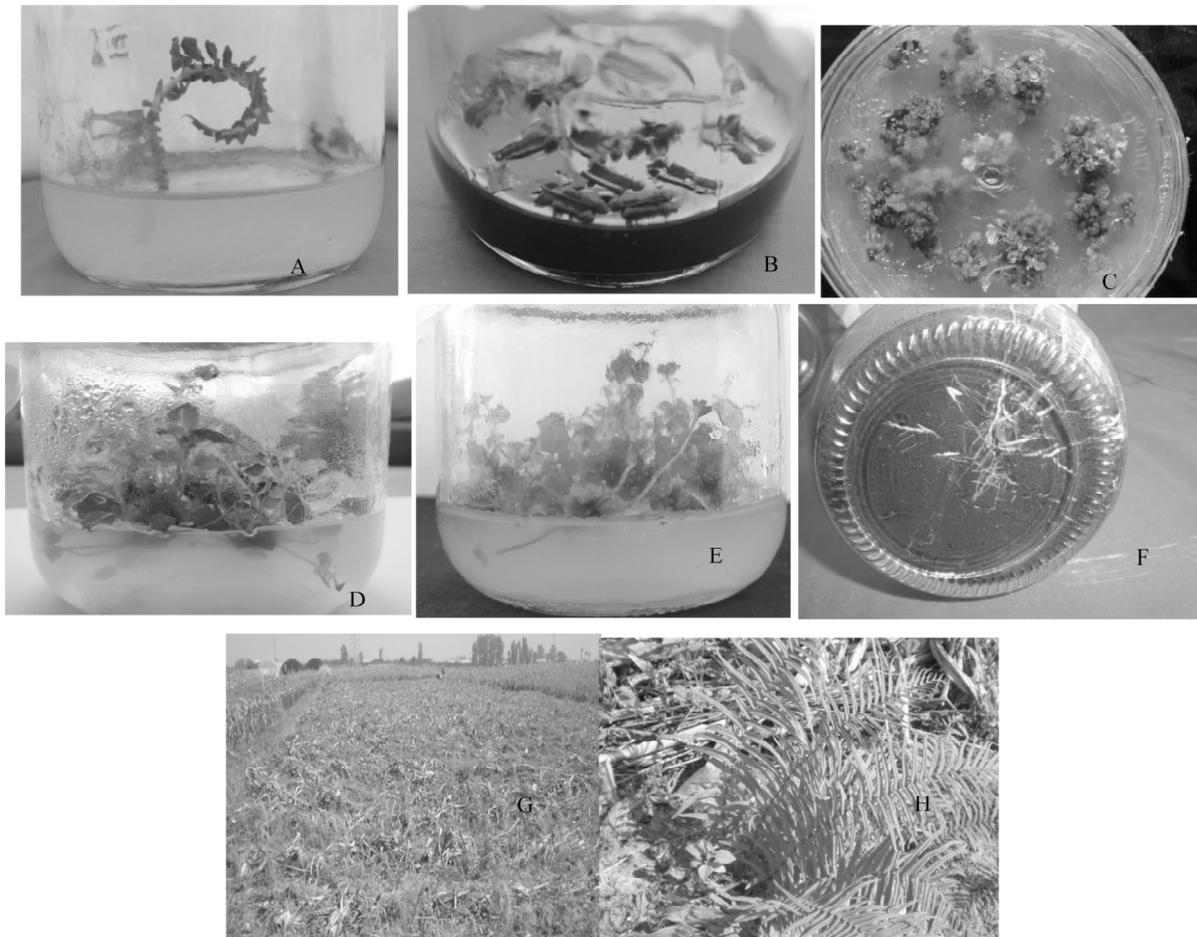
培养基处理 Medium treatments	生根率(%) The rooting percentage	平均主根长(cm) The average root length	平均根直径(cm) Average root diameter	须根数量(条) The number of roots	生长情况 Growth situation
1	98	2.5	0.10	21	根芽多 根较长 绒须根
2	90	2.05	0.11	22	根芽、根长下降 须根
3	60	1.4	0.11	23	根芽、根长下降 须根渐增
4	45	0.5	0.16	25	须根增多
5	98	2.22	0.10	23	根芽多 根较长 绒须根
6	90	1.74	0.12	25	根芽、根长下降 形成须根
7	90	1.35	0.12	27	须根增多
8	80	0.36	0.17	29	须根增多 较粗
9	40	0.2	0.18	31	须根最多 主须根粗

数可达 1.1 % ,同时又长出新的丛生芽和新的愈伤组织。由此可见,丛生芽继分化为丛生苗的最适培养基为 1/2 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L + 琼脂粉 7.8 g/L + 蔗糖 20 g/L pH

5.8 ~ 6.0。

2.5 生根培养

将丛生苗切成独立苗接种于 9 组生根培养基中,每培养 2 d 观察 1 次,开始生根时,统计生根形



A: 幼嫩叶片预培养; B: 叶片诱导愈伤; C: 丛生芽形成; D: 丛生苗培养; E: 生根培养; F: 主根 须根培养; G: 田间种植蜈蚣草; H: 待收割蜈蚣草
A: Young leaf preculture; B: Callus induction; C: Cluster buds; D: Adventitious bud multiplication; E: Rooting culture; F: Taproot and fibrous root culture; G: The seedlings in field; H: Mature plants

图 1 蜈蚣草的丛生芽诱导和植株再生

Fig. 1 Bud induction and plantlet regeneration of *Pteris vittata*

成情况,培养 15 d 后,大部分组合培养基上都已生根时(图 1-E),统计生根率、平均主根长、平均根粗和须根数量(图 1-F),从表 4 可看出,处理 1 和处理 5 中的生根率都比其它组合都高,但处理 1 的主根比处理 5 的长,所以综合考虑,处理 1 是最佳的生根培养基,即 1/4 MS + NAA 0.2 mg/L + 琼脂粉 7.8 g/L + 蔗糖 20 g/L pH 5.8 ~ 6.0。

2.6 炼苗与移栽

出瓶的生根苗,在温度 20 ~ 25 °C、湿度 50 % ~ 80 %、自然光照的温室环境下,7 d 时大部分苗开始长出新根,苗已开始缓活,10 d 后大部分苗已存活,统计成活率,成活率可达 98 %,此时即可植入大田备用或直接应用于目的地。

2.7 蜈蚣草田间生长及产量

从图 1-G 可以看出,大面积种植蜈蚣草,整地按垄有利于根的生长,土壤不易板结,又有利保水。株距保持一定宽度也有利于后期植株的蓬勃生长。覆盖植物秸秆不仅起到遮阴保湿的作用,还能利用秸秆腐化过程不断提供有机肥料。当蜈蚣草叶片枯萎时,进行统一收割(图 1-H)。对蜈蚣草地上部分进行砷含量检测为 830 mg/kg,干重达到 3996.5 kg/hm²,则第一季蜈蚣草可从尾矿库中提取砷 3318 g/hm²。第二年春天蜈蚣草又会萌发新芽长成植株,重新对尾矿库土壤进行修复。

3 讨论

3.1 外植体的选择

外植体是指植物组织培养中的各种接种材料。从理论上讲,植物细胞都具有全能性,能够再生新植株,任何器官、任何组织、单个细胞和原生质体都可以作为外植体。但实际上,不同品种、不同器官之间的分化能力有巨大差异,培养的难易程度不同。为保证植物组织培养获得成功,选择合适的外植体是非常重要的。

采用蜈蚣草的不同外植体进行组织培养,已有相关研究,尹怀约^[20]直接应用蜈蚣草的叶片和叶柄进行离体培养,成功获得完整植株;石晓云等^[21]、孙静贤等^[22]和周向军^[23]利用孢子进行蜈蚣草组织培养,成功建立了蜈蚣草的组培体系;罗利琼等^[19]应用叶芽尖为外植体,建立了一种方便快捷的蜈蚣草组培方法。但何种外植体组织培养效果最好,未见相关研究报道,本研究将幼叶、幼茎、顶芽和孢子作为外植体,比较这 4 种外植体组织培养效果,在本研究中幼叶、幼茎和顶芽这 3 种外植体不是直接采集于野外生长的植株,而是首先将野外采集的幼芽进行预培养,获得幼叶、幼茎和顶芽,这样既减少污染,

也简化了实验步骤。从研究结果可看出,蜈蚣草的幼叶是最佳诱导愈伤组织的外植体,其次为孢子,幼茎和顶芽基本诱导不出愈伤组织。综合研究结果可见,在选择蜈蚣草的外植体材料时,以选择幼叶为最佳,幼叶不仅诱导率高,获取途径也方便,来源受季节变化影响不大,可在春季采集幼芽进行预培养,将幼叶剪去备用,再将顶芽转接入新的培养基进行无限保存。

3.2 组培中天然提取物的应用

在长期的组织培养实践中,人们发现在培养基内加入某些天然有机添加物,能够增强培养物的生长、分化效应,促进培养物更好地存活、发育。由于添加天然有机物的培养基容易配制,成本低廉,对器官分化、细胞增殖有明显的促进作用,植物及微生物在其中生长良好,所以适于在生产中广泛应用^[24]。对于蜈蚣草的组织培养,添加常规的植物激素,组培效果较差,分化效率较低。鉴于天然提取物的有益效果,本研究将蜈蚣草的茎和叶按质量比 1:1 打成混合匀浆,进行灭菌处理,应用于蜈蚣草的组织培养,研究结果显示,蜈蚣草的茎和叶混合匀浆不仅很好的防止了褐化,并且大大提高了分化率。

组织培养中常用的天然有机物包括椰乳、香蕉汁、苹果汁、番茄汁、胡萝卜汁、马铃薯汁等,并且这些天然有机物被广泛地应用于不同物种的组培,应用于兰科植物研究的较多^[25]。这些天然提取物是否也可以很好的应用于蜈蚣草的组织培养,有待后续试验研究。

3.3 蜈蚣草组培苗对砷的富集应用

依靠自然条件在较短时间内繁殖稀有植物和经济价值较高的植物,受到地理环境和季节的限制,很难达到快速、高效的目的;特别对于在短时期内需要达到一定数量,才能创造应有价值的植物,时间就是效益,只有通过组织培养的方法才能满足这一要求。由于组织培养法繁殖植物的优势在于快速,每年可以数以百倍速度繁殖,因此对一些繁殖系数低,不能用种子繁殖的名特优植物品种的繁殖,意义尤为重大。由于蜈蚣草为孢子植物,在自然界中发芽率极低,而且竞争力极弱,仅靠传统的孢子繁殖要获得大量的种苗耗时长。蜈蚣草在砷污染土壤或水体的治理中有巨大的应用前景。本实验,通过研究蜈蚣草的组培的关键技术,摸索出一套可进行组培快繁工厂化生产的技术体系,并且将组培苗应用于田间对砷的富集,第一季蜈蚣草从尾矿库中提取砷 3318 g/hm²。研究发现^[11]蜈蚣草的羽叶含砷量最高,人工栽培会使蜈蚣草羽叶含砷量增加,且随着种植时间的延长而增加,这研究结果表明,可通过组织培养快

速繁殖优良的蜈蚣草株系, 种植于砷污染的土壤, 并且每年进行地上部分的修剪可大大提高蜈蚣草对砷污染的修复能力。

4 结 论

通过试验表明, 蜈蚣草幼叶为组培的最佳外植体, 其次是孢子, 顶芽和茎最差。1/2MS + 2, 4-D 2 mg/L + PVCLM 60 g/L 为最佳的愈伤诱导培养基, 愈伤诱导率可达 100%; 1/2MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L 为最佳分化培养基, 分化率达 98.3%; 1/2MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVCLM 200 g/L 为最佳的丛生芽增殖培养基, 增殖系数达 1.1; 1/4MS + NAA 0.2 mg/L 为最佳生根培养基, 生根率 98%, 以上涉及的培养基中琼脂浓度为 7.8 g/L, 蔗糖浓度为 20 g/L, pH 为 5.8~6.0。组培苗移栽至尾矿库栽种, 成熟后检测蜈蚣草中富集的砷的量达到 3318 g/hm²。本研究摸索出一套适合工厂化的蜈蚣草组培快繁技术体系, 解决了蜈蚣草难分化、分化率低, 成苗率更低的困难, 为获得优质壮苗提供了重要的人工繁殖途径。

参考文献:

- [1] 浙江植物志编委会. 浙江植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993.
- [2] 安徽经济植物志编写组. 安徽经济植物志[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1990.
- [3] 福建科学技术委员会福建植物志编写组. 福建植物志(第1卷)[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1982.
- [4] 安徽植物志协作组. 安徽植物志(第1卷)[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1984.
- [5] 丁宝章, 王遂义, 高增义. 河南植物志(第一册)[M]. 郑州: 河南人民出版社, 1988.
- [6] 浙江植物志编委会. 浙江植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993.
- [7] 宋伟, 陈百明, 刘琳. 中国耕地土壤重金属污染概况[J]. 水土保持研究, 2013, 20(2): 293-298.
- [8] 张东, 张楚儿. 北河流域土壤重金属污染风险评价及影响因素分析[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2187-2193.
- [9] 申红玲, 何振艳, 麻密. 蜈蚣草砷超富集机制及其在砷污染修

复中的应用[J]. 植物生理学报, 2014, 50(5): 591-598.

- [10] 韦朝阳, 陈同斌. 重金属超富集植物及植物修复技术研究进展[J]. 生态学报, 2001, 21(7): 1196-1203.
- [11] Ma L Q, Komar K M, Tu C, et al. A fern that hyperaccumulates arsenic[J]. Nature, 2001, 409: 579.
- [12] 陈同斌, 韦朝阳, 黄泽春, 等. 砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征[J]. 科学通报, 2002, 47(3): 207-210.
- [13] Campos V, Aparecida M, Pires F. Phytoremoval of arsenic from soil[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2004, 35(15-16): 2137-2146.
- [14] Caille N, Zhao F J, McGrath S P. Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the nonhyperaccumulator *Pteris tremula*[J]. New Phytologist, 2005, 165: 755-761.
- [15] Zhao F J, Wang J R, Barker J H A, et al. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. New Phytologist, 2003, 159(2): 403-410.
- [16] Fayiga A O, Ma L Q, Cao X D, et al. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.[J]. Environmental Pollution, 2004, 132(2): 289-296.
- [17] 安志装, 陈同斌, 雷梅, 等. 蜈蚣草耐铅、铜、锌毒性和修复能力的研究[J]. 生态学报, 2003, 23(12): 2594-2598.
- [18] 陈晓清, 苏育才. 蜈蚣草的应用研究进展[J]. 生物学教学, 2013, 38(2): 7-9.
- [19] 罗利琼, 张军, 罗旭, 等. 凤尾蕨科植物蜈蚣草的组织培养[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(29): 17802-17803, 17864.
- [20] 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.
- [21] 石晓云, 唐伟斌, 石肖凌. 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.
- [22] 孙静贤, 高云涛, 张继, 等. 蜈蚣草组织培养与自然播种繁殖的比较研究[J]. 北方园艺, 2013(5): 91-93.
- [23] 周向军. 砷超富集植物蜈蚣草的离体培养及植株再生[J]. 资源开发与市场, 2010, 26(8): 676-678.
- [24] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996.
- [25] 李亮, 张冬敏, 雷华辉, 等. 植物组织培养中有机添加剂应用研究[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(2): 28-30, 34.

(责任编辑 王家银)