



关丽霞,白禹萱,李阳,等. 过山蕨组织培养技术研究[J]. 黑龙江农业科学,2019(7):39-41,42.

# 过山蕨组织培养技术研究

关丽霞,白禹萱,李 阳,蒲东祥

(辽宁农业职业技术学院,辽宁 营口 115009)

**摘要:**为建立过山蕨组培工厂化育苗技术体系,本试验以其可育叶为外植体,以 GGB 途径进行增殖扩繁,开展了组织培养的深入研究。结果表明:过山蕨可育叶诱导形成 GGB 的最佳培养基为  $1/2\text{MS} + \text{琼脂 } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;GGB 增殖的最佳培养基为  $1/2\text{MS} + \text{琼脂 } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;GGB 形成孢子体及完整植株的最佳培养基为  $1/2\text{MS} + \text{琼脂 } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;试管苗移栽 28 d 后,成活率在 98% 以上。

**关键词:**过山蕨;可育叶;组织培养

过山蕨(*Camptosorus sibiricus* Rupr.) 属铁角蕨科植物,又名马蹄草、过桥草、还阳草,主产于东北、华北、西北、内蒙古等地,在辽宁岫岩、千山、凤城、旅顺和沈阳都可见。民间常用过山蕨全草治疗脱疽,神经性皮炎,脑血管栓塞引起的偏瘫症,子宫出血,外伤出血及下肢溃疡等疾病,具有止血消炎,活血散瘀的疗效;此外,过山蕨是观赏蕨类植物中的精品,常用于配置山石盆景及小型盆栽。过山蕨经济价值高,开发前景好,但过山蕨野生资源有限,传统的繁殖方式速度慢,难以满足开发者及市场需求。而组织培养是商业化产苗及培育珍稀、优、新品种的良好途径,可以很大程度上提高种苗的繁殖速度、数量及品质。本研究进行了过山蕨组培育苗的研究,建立了以过山蕨可育叶为外植体材料,以 GGB 增殖途径快繁的组织培养程序,为过山蕨组培工厂化育苗提供了理论支撑和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试过山蕨(*Camptosorus sibiricus* Rupr.) 可育叶,选自旅顺山区野生过山蕨。

### 1.2 方法

1.2.1 材料的选取与处理 先将过山蕨可育叶剪下,用 70% 的酒精棉球轻轻擦拭一遍,流水下冲洗 0.5 h。然后在无菌条件下,先用 70% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 遍,再用 1.3% 的次氯酸钠溶液浸泡 6 min,最后用无菌水冲洗 3 遍,剪下可育叶前端 0.3 cm 长,置于无菌干滤纸上吸干水

分,备用。

1.2.2 不同培养基对过山蕨可育叶初代诱导的影响 将消毒好的备用材料,以平放方式接种到以  $1/2\text{MS} + \text{琼脂 } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  为基本培养基 A(基本培养基通过预试验筛选得出),并添加不同附加物,具体培养基设置详见表 1。每瓶接种 1 个材料,每个处理接种 30 瓶,重复 2 次。45 d 进行观察统计。诱导率(%) = 诱导形成物瓶数/(接种瓶数 - 污染瓶数)  $\times 100$ 。

1.2.3 不同培养基对过山蕨绿色球状体(GGB)增殖的影响 将过山蕨可育叶诱导出的绿色球状体(GGB)团块切割成含 2 个 GGB 的接种块接种到以  $1/2\text{MS} + \text{琼脂 } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  为基本培养基 B,并添加不同附加物的增殖培养基(表 2)上。每瓶接种 1 块材料,每个处理接种 20 块,重复 2 次。40 d 进行观察统计。增殖系数 = 有效增殖个数/接种块数;有效增殖个数:在增殖的 GGB 团块上能分割出的单个 GGB。

1.2.4 不同培养基对过山蕨孢子体形成的影响 将增殖培养的绿色球状体(GGB)团块切割成单个 GGB 接种到以  $1/2\text{MS} + \text{琼脂 } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  为基本培养基 C,并添加不同附加物的孢子体形成培养基(表 3)上。每瓶接种 8 个材料,每个处理接种 80 个,重复 2 次。30 d 进行观察统计。诱导率(%) = 诱导出孢子体的 GGB 个数/接种 GGB 个数  $\times 100$ 。

1.2.5 炼苗及移栽 将试管生根苗置于室温下放置 5~7 d,去盖,用镊子从三角瓶中夹出组培苗,移栽到灭过菌的草炭:珍珠岩 = 1:1 基质中,加盖塑料小拱棚,浇透水,每天喷雾,遮阴。

1.2.6 培养条件 组培室内光照  $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,光照度  $800 \sim 1\,200 \text{ lx}$ ,培养温度  $20 \sim 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。温室拱

收稿日期:2019-01-26

第一作者简介:关丽霞(1978-),女,学士,实验师,从事花卉、树木的组织培养研究。E-mail:674401702@qq.com。

棚内,湿度 85%~95%,温度 18~23 ℃,光照度 800~2000 lx。

1.2.7 数据分析 采用 Microsoft Excel 2003 对数据进行基本统计计算和作图处理。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对过山蕨可育叶初代诱导的影响

材料接种 20 d 后,前端稍膨大,继续培养,有的分化出叶,形成孢子体(图 1A);有的逐渐分化形成小的绿色球状体 GGB(图 1B),45 d 时观察,统计结果见表 1。增殖系数=有效增殖个数/接种块数;有效增殖个数:在增殖的 GGB 团块上能分割出的单个 GGB。

由表 1 可得,过山蕨可育叶在不同培养基上

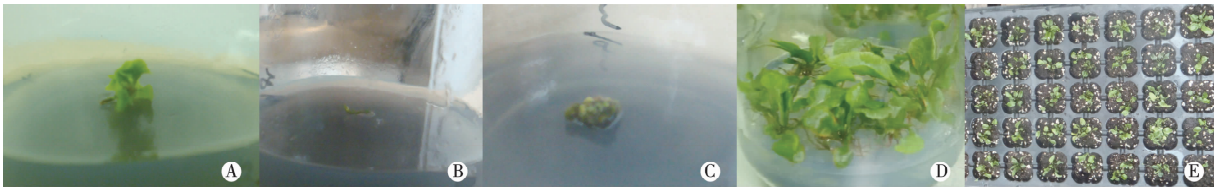
其培养结果不同,在培养基 A1~A3 上可以诱导分化形成孢子体,在培养基 A2 上孢子体分化最早,并生长势壮;在培养基 A3~A5 上诱导形成绿色球状体 GGB,培养基 A4 上,GGB 形成早,诱导率最高,为其最佳诱导培养基。

过山蕨可育叶初代诱导的孢子体,以丛生芽方式增殖途径最佳;可育叶初代诱导的 GGB 以 GGB 增殖途径最佳,而 GGB 的结构与愈伤组织不同,而与兰花原球茎类似,通过 GGB 阶段,蕨类植物的生产效率比经过丛生芽阶段效率更高<sup>[1]</sup>。因此本试验选择孢子诱导形成绿色球状体(GGB)途径,且后面的试验也是以此为基础。故而,培养基 A4 为过山蕨可育叶初代诱导的最佳培养基。

表 1 不同培养基对过山蕨可育叶初代诱导的影响

Table 1 Effects of different medium on the induction of *Camptosorus sibiricus* Rupr. during early generation

序号 No.	培养基 Medium	接种瓶数 Number of inoculated bottles	污染瓶数 Number of contaminated bottles	诱导形成物/瓶数 Inducedformation/ bottle number	诱导率 Induction rate/%	生长状况 Growth condition
A1	A	30	2	孢子体/27	93.0	分化孢子体晚,壮
A2	A+AC 0.5 g·L <sup>-1</sup>	30	1	孢子体/27	93.0	分化孢子体早,较壮
A3	A+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> +NAA 0.1 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.5 g·L <sup>-1</sup>	30	1	孢子体/3;GGB/1	10.0、 0.3	分化孢子体、GGB 晚
A4	A+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> +NAA 0.5 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.5 g·L <sup>-1</sup>	30	1	GGB/26	89.7	分化 GGB 早,GGB 小米粒大小
A5	A+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> +NAA 1.0 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.5 g·L <sup>-1</sup>	30	2	GGB/4	13.3	分化较晚,多数死亡



A:可育叶分化的孢子体;B:可育叶分化的 GGB;C:增殖的 GGB 的团块;D:GGB 形成的孢子体;E:移栽成活的过山蕨孢子体。  
A: Spore bodies differentiated from fertile leaves; B: GGB differentiated from fertile leaves; C: Spore bodies formed by proliferating GGB mass; D:Spore bodies formed by GGB; E:Sporophyte of transplanted surviving pteridophyte.

图 1 过山蕨组织培养快速繁殖过程

Fig. 1 Rapid propagation process of *Camptosorus sibiricus* Rupr. tissue culture

2.2 不同培养基对过山蕨绿色球状体(GGB)增殖的影响

材料接种 7 d 后,在接种团块周围开始分化,随时间的延长,不断分化、增长,40 d 时,接种团块分化出多个绿色小米粒大小的 GGB(图 1C),此时进行统计,结果见表 2,GGB 在增殖培养基 B1~B5 中,以培养基 B1 为最佳,增殖系数最高,长势最快、最壮,易分割,有利于再次接种操作。

因此,培养基 B1 为 GGB 增殖培养的最佳培养基。

2.3 不同培养基对过山蕨孢子体诱导形成的影响

GGB 接种到孢子体形成培养基上培养,7 d 后开始长出孢子叶,15 d 左右形成孢子体,并形成根原基,随时间的延长,逐渐长大,30 d 时孢子体高 0.5~3.0 cm,根褐色、根长 0.3 cm 以上,从

而形成完整植株(图 1D),此时统计结果见表 3。

由表 3 可得,GGB 在含外源激素相对较高的 C5 培养基上诱导形成孢子体率最低,而在无激素或外源激素相对较低的 C1~C4 培养基上诱导率

较高,均在 95%以上;培养基 C1~C5 中,在添加了生长素 IBA 和活性炭(AC)的培养基中,孢子体的根较长,叶片浓绿,诱导率高,生长快。因此 C4 培养基为过山蕨孢子体形成的最佳培养基。

表 2 不同培养基对过山蕨绿色球状体(GGB)增殖的影响

Table 2 Effects of different medium on proliferation of green bulbous body(GGB) of *Camptosorus sibiricus* Rupr.

序号 No.	培养基 Medium	接种块数 Inoculation number	有效增殖个数 Number of effective multiplication	增殖系数 Multiplication coefficient	生长状况 Growth condition
B1	B+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> + NAA 0.3 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.3 g·L <sup>-1</sup>	20	200	10.0	GGB 长势较快,较壮,易分割
B2	B+BA 0.3 g·L <sup>-1</sup> + NAA 0.3 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.3 g·L <sup>-1</sup>	20	176	8.8	GGB 长势快,壮,不易分割
B3	B+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> + NAA 0.3 g·L <sup>-1</sup>	20	148	7.4	GGB 长势快,壮,易分割
B4	B+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> + NAA 0.5 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.5 g·L <sup>-1</sup>	20	86	4.3	GGB 长势快,壮,不易分割
B5	B+BA 0.1 g·L <sup>-1</sup> + NAA 0.7 g·L <sup>-1</sup> + AC 0.5 g·L <sup>-1</sup>	20	26	1.3	GGB 长势慢,壮,不易分割

表 3 不同培养基对过山蕨孢子体诱导形成的影响

Table 3 Effects of different medium on the induced formation of *Camptosorus sibiricus* Rupr. sporophyte

序号 No.	培养基 Medium	接种 GGB 个数 Number of inoculated GGB	诱导孢子体的 GGB 个数 Number of GGB induced sporophytes	诱导率 Induction rate/%	生长状况 Growth condition
C1	C	80	76	95	孢子体高 0.5~1.0 cm、根长 0.3 cm 以上,叶浅黄绿色
C2	C+ AC 0.3 g·L <sup>-1</sup>	80	80	100	孢子体高 0.5~2.0 cm,根长 0.3 cm 以上,叶深绿色
C3	C+ IBA 0.05 g·L <sup>-1</sup>	80	80	100	孢子体高 0.5~2.0 cm,根长 0.3 cm 以上,叶浅绿色
C4	C+IBA 0.05 g·L <sup>-1</sup> +AC 0.3 g·L <sup>-1</sup>	80	80	100	孢子体高 0.5~3.0 cm,根长 0.5 cm 以上,叶深绿色
C5	C + BA 0.05 g·L <sup>-1</sup> + IBA 0.05 g·L <sup>-1</sup> +AC 0.3 g·L <sup>-1</sup>	80	40	50	孢子体高 0.5~1.0 cm,根长 0.3 cm 以上,叶浅绿色

2.4 炼苗及移栽

组培苗移栽后,控制好温、光、湿等条件,适时通风换气,精心管理,28 d 后根尖即可向前生长,新叶随之生出,代表成活(图 1E),成活率在 98% 以上。

3 结论

受大连某合作社委托,进行过山蕨组织培养育苗开发研究,以过山蕨的可育叶为外植体获得了孢子体和绿色球状体(GGB)。由于 GGB 的结构与愈伤组织不同,而与兰花原球茎类似,通过 GGB 阶段,蕨类植物的生产效率比经过丛生芽阶

段效率更高。因此本试验选择以可育叶为外植体诱导形成类似兰花原球茎的绿色球状体(GGB),通过其增殖及最后诱导分化形成孢子体这一途径,进行了过山蕨组培快速育苗的深入研究。

本文以过山蕨可育叶为外植体进行了组织培养研究,从而得出,GGB 增殖的最佳培养基为 1/2MS+琼脂 6 g·L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup> + BA 0.1 g·L<sup>-1</sup> + NAA 0.3 g·L<sup>-1</sup> + AC 0.3 g·L<sup>-1</sup>; GGB 形成孢子体及完整植株的最佳培养基为 1/2MS+琼脂 6 g·L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup> + IBA 0.05 g·L<sup>-1</sup> + AC 0.3 g·L<sup>-1</sup>。



蔡红丹,王碧盈,肖翠红,等.解磷、溶磷菌对水稻种子萌发的影响[J].黑龙江农业科学,2019(7):42-45.

# 解磷、溶磷菌对水稻种子萌发的影响

蔡红丹,王碧盈,肖翠红,刘振华,刘昕旸,孙冬梅

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163319)

**摘要:**为明确解磷、溶磷菌对水稻种子萌发的影响,以龙粳 22 号水稻种子,解磷菌  $P_1$ 、 $P_2$ ,溶磷菌  $P_3$ 、 $P_4$  为材料,通过将不同菌株的发酵液随机组合,制成不同混合菌剂。采用培养皿滤纸培养法,每次喷洒 2 mL 的不同菌剂,以清水作为对照,通过测定培养 2~3 d 及 5~6 d 的各组水稻种子芽长和根长的变化,研究不同解磷、溶磷菌株及不同菌株之间混合对水稻种子萌发的影响。结果表明:不同单菌制备的菌剂中解磷菌  $P_2$  和溶磷菌  $P_4$  对芽的促生长效果最佳,解磷菌  $P_2$  对根的促生长效果最佳;不同混合菌剂中  $P_2P_4$  对芽的促生长效果最佳,  $P_1P_3$  对根的促生长效果最佳。

**关键词:**解磷菌;溶磷菌;水稻;种子萌发

在土壤中,微生物在磷的循环中起着十分重要的作用,一方面它可以通过生物固定作用,固定一部分有效磷,而这部分被固定的磷随着微生物的死亡可重新释放出来,转变为植物可利用的磷;

另一方面,由于微生物的活动,土壤有机质或动植物残体中的磷转化成有效磷,供植物吸收利用。经过国内外长期的实验研究表明,解磷菌或溶磷菌(phosphate-solubilizing microorganisms)是一种对自然土壤里存在的和附着在植物根际上能使难溶性、不溶性的磷转化成容易被植物所吸收和利用的可溶性磷的微生物。在农业生态系统中,溶磷菌是土壤中一类不可或缺的微生物。1962 年 Kobus 在报道中提出,土壤的物理结构、有机物质含量的多少、土壤肥力的强弱及类型、耕作的方

收稿日期:2019-01-17

基金项目:黑龙江农垦总局项目(HNK135-02-06-04);大庆市指导项目(zd-2017-63)。

第一作者简介:蔡红丹(1991-),女,在读硕士,从事微生物学研究。E-mail:393077995@qq.com。

通讯作者:孙冬梅(1970-),博士,教授,从事应用微生物研究。E-mail:sdmlzw@126.com。

## 参考文献:

- [1] 黄秀曼,杜钢军,孙婷,等.过山蕨总黄酮对肝损伤的保护作用[J].中草药,2012(12):2458-2463.
- [2] 梁大连,程艳玲,董世波,等.过山蕨总黄酮对大鼠血栓闭塞性脉管炎的改善作用[J].现代药物与临床,2011,26(6):481-484.
- [3] 刘迎辉,戚笑笑,李红,等.过山蕨总黄酮抗肺癌作用及其对

赖氨酸氧化酶抑制活性[J].中草药,2014,45(24):3573-3578.

- [4] 杨鑫宝,刘建勋,杨秀伟.过山蕨化学成分及药理活性研究进展[J].中国现代中药,2012(5):18-22.

- [5] 金水虎.观赏蕨类的引种驯化和商品化繁殖技术研究[D].杭州:浙江大学,2003.

## Study on Tissue Culture Technology of *Camptosorus sibiricus* Rupr.

GUAN Li-xia, BAI Yu-xuan, LI Yang, PU Dong-xiang

(Liaoning Agricultural Vocation-technical College, Yingkou 115009, China)

**Abstract:** In order to establish the technical system of transplanting plant seedlings in *Camptosorus sibiricus* Rupr., this experiment carried out an in-depth study on tissue culture with its fertile leaves and GGB method. The results showed that *Camptosorus sibiricus* Rupr. spores form the best medium for GGB was  $1/2MS + \text{agar } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{sucrose } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Proliferation of GGB best medium was  $1/2MS + \text{agar } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{sucrose } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; GGB form young sporophyte complete plant the best medium was  $1/2MS + \text{agar } 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{sucrose } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; and after 28 days of transplanting of test tube seedlings, the survival rate was more than 98%.

**Keywords:** *Camptosorus sibiricus* Rupr.; fertile leaves; tissue culture