

文章编号: 1674-7054(2012)04-0384-03

骨碎补繁殖技术研究进展

李 翠, 黄雪彦, 吕惠珍, 黄宝优, 张占江

(广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023)

摘 要: 在系统查阅和整理相关资料的基础上, 对骨碎补的繁育技术进行了综述, 认为组织培养是骨碎补繁育的重要手段。

关键词: 骨碎补; 孢子繁殖; 分株繁殖; 组织培养

中图分类号: S 567.23+9

文献标志码: A

骨碎补, 又称槲蕨(*Drynaria roosii* Nakaike), 为槲蕨科(骨碎补科)(*Drynariaceae*) 槲蕨属(*Drynaria*) 植物。骨碎补科共8属, 约100种, 我国有5属, 约30多种, 分布于热带至大洋洲热带^[1], 在我国主产于浙江、湖北、广东、广西和四川等地^[2]。大部分骨碎补科植物因其体态潇洒, 造型优美, 具有极高的观赏价值^[3]。骨碎补根状茎入药, 富含黄酮、生物碱、酚类等有效成分, 具有散瘀止痛、接骨续筋、治牙疼、腰疼、久泻等功效^[4]。近年来, 由于盲目采挖, 自然资源日渐枯竭, 生态环境破坏严重。2002年, 槲蕨已被建议列入国家濒危保护植物名录。骨碎补科植物多附生在岩石或高大树干上, 对环境条件要求较高, 适生的温度范围、湿度范围和土壤酸碱度范围比较窄, 在引种栽培时较难成活, 给种质保存与利用带来较大的困难^[5]。现有的文献多集中在对骨碎补的鉴定、化学成分、炮制、药理活性、临床应用等方面的报道^[6-13]。目前, 野生槲蕨资源锐减, 人工引种繁殖势在必行。因此, 笔者在系统查阅和整理相关资料的基础上, 对骨碎补科植物的繁殖技术进行了总结, 旨在为骨碎补种质资源的保护和开发利用提供参考。

1 骨碎补科植物的繁殖技术

1.1 分株繁殖 槲蕨植物有肉质、密被鳞片的根状茎。王有为等^[14]将槲蕨根茎切成(10±2) cm的小段, 每段保留3~5个芽点, 3~5片孢子叶, 然后固定在树上或山石上, 覆盖少量苔藓, 加强喷水管理, 约2个月有新的营养叶和根状茎生成。分株法对骨碎补资源保护有一定的意义, 但需就近采挖, 原根系尽可能完整, 最好在原生境状态下种植, 而且繁殖系数低, 不便于运输。

1.2 孢子繁殖 孢子繁殖是扩大蕨类植物繁殖的有效途径之一, 槲蕨属植物孢子囊群着生于叶脉交叉处, 圆形, 不具囊群盖^[15], 自然状况下, 其孢子萌发率低, 配子体发育、性器官发育、受精和孢子体生长对外界环境的要求比较高, 使得槲蕨的自然繁殖困难^[16]。孢子繁殖步骤: 火渣土灭菌, 用pH7.0~7.5的冷开水浸透, 制成火渣土盆土, 采集当年孢子囊, 置于纸袋内, 风干, 制孢子囊悬浊液, 悬浊液喷洒到火渣土盆土表面, 光照培养形成配子体, 配子体经移栽育苗, 受精后形成孢子体, 然后再移栽在树上或山石上^[17]。吴学明和苏旭^[18]认为, 华槲蕨人工孢子繁殖的最适宜孢子数量为10 000~20 000个·mL⁻¹。刘保东等^[19]分别用水培法、土培法对保存2年以上的孢子进行萌发实验, 结果表明, 孢子萌发最经济有效的方法是: 前期水培催萌, 后期土培, 最适合环境条件是(25±2)℃, 每天光照(2 000±300) lx, 14 h, 相对湿度大于90%, 孢子受精率达到75%。

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 广西科技攻关项目(1099063-15)

作者简介: 李翠(1982-), 女, 黑龙江依安人, 广西壮族自治区药用植物园助理研究员, 硕士。

通信作者: 张占江, Tel: 0771-5603824; E-mail: zzj1811@yahoo.com.cn

1.3 组织培养繁殖 骨碎补组织培养采用的外植体为孢子和孢子体(根状茎、嫩叶等)。

1.3.1 营养体诱导离体繁殖 文伟等^[20]以骨碎补的茎、叶片、叶柄等为外植体,研究了不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响,不同培养基对愈伤组织分化的影响,不同生长素用量对生根的影响,成功诱导出骨碎补的愈伤组织并建立了无性系。结果表明:以块茎为外植体的愈伤组织诱导率为98%;在 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中,愈伤组织分化率为99%; $1/2\text{MS} + \text{NAA } 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基生根效果最好,生根率为99.5%。

1.3.2 孢子的无菌培养 檀龙云等^[21]从配子体的抗逆性、营养繁殖、假根功能及其可能的系统学意义,报道了骨碎补配子体发育在孢子大小、原叶体边缘细胞性状、精子器和颈卵器形态及毛状体产生时间等的异同。徐艳等^[22]通过无机培养基和土壤培养基对比培养,显微观察描述了槲蕨的孢子萌发及配子体形态发育过程,指出在控光控温条件下,配子体受精率达80%,为槲蕨人工繁育奠定了理论基础。吴艳芳等^[23]对影响槲蕨配子体发育的因素进行了研究,结果表明,槲蕨配子体在 $2\ 500 \sim 3\ 500\text{ lx}$ 的光照强度、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}7.0 \sim 7.5$ 的条件下,生长速度较快,发育良好,颜色呈深绿色。激素6-BA和NAA对槲蕨配子体的生长都有促进作用,其质量浓度在 $0.5 \sim 1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最有利于槲蕨配子体的增殖和增长。

组织培养虽然是扩大生产和保持物种的一种有效途径,但在植物组织培养过程中,经常会遇到外植体褐化现象。刘闻川等^[24]通过对不同光照处理的槲蕨外植体氧化酚类的酶活性进行对比,得出槲蕨外植体褐变的直接原因是酚类物质与PPO(多酚氧化酶)的区域化分布被打破,导致PPO催化酚类物质氧化引起褐变的结论。实验证明, $1\ 000\text{ lx}$ 是槲蕨组织培养较适宜的光照条件,外植体总酚的含量积累较少、PPO活性最小。

2 存在问题及展望

目前对骨碎补科植物的组织培养、栽培和繁育保存的研究仍较少。随着人们健康意识的增强及用药量的增加,骨碎补的人工繁殖技术与规模化生产已经成为骨碎补中药生产的瓶颈。组织培养为种质保存提供了最便捷、稳定的手段,同时可以节约大量的人力、物力和场地,便于种质交换和转移,避免有害病菌的人为传播。但对于骨碎补野生资源评价及保护方面还未见有系统的报道,通过对骨碎补的种质资源收集、评价以及发展组培繁育技术,对扩大骨碎补人工种植和保护野生资源均有重要的意义。

参考文献:

- [1] 陆树刚. 蕨类植物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 302.
- [2] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 209.
- [3] 曾宋君, 刑福武. 观赏蕨类[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 241.
- [4] 吴征镒. 新华本草纲要(第3卷)[M]. 上海: 上海科学出版社, 1990: 703-704.
- [5] 吴学明, 苏旭. 华槲蕨孢子人工繁殖的初步研究[J]. 青海科技, 2005(3): 36-38.
- [6] 李军, 贾天柱, 张颖, 等. 骨碎补的研究概况[J]. 中药材, 1999, 22(5): 263-266.
- [7] 徐方铭. 骨碎补及其混淆品的鉴别[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 661.
- [8] 张耀邦, 潘遐. 骨碎补与其伪品中华槲蕨根茎的鉴别[J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 25(6): 46-48.
- [9] 蒋金和, 张云梅, 王利勤, 等. 骨碎补属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 西北植物学报, 2007, 27(5): 1039-1046.
- [10] 朱慧峰, 王唯佳, 王珠美. 骨碎补研究进展[J]. 中国骨伤, 2009, 22(1): 66-68.
- [11] 石丽莉. 骨碎补的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(12): 146-147.
- [12] 李顺祥, 龙勉, 张志光. 骨碎补的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(11): 75-78.
- [13] 常德有, 董福慧. 骨碎补的研究概况[J]. 吉林中医药, 2006, 26(6): 61-62.
- [14] 王有为, 王庆, 吴艳芳, 等. 槲蕨的孢子繁殖方法: 中国 200510018869 [P]. 2006-02-01.
- [15] 徐艳, 石雷, 刘燕, 等. 白玉凤尾蕨孢子繁殖技术的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 658-662.
- [16] 袁艺, 田胜尼, 叶爱华, 等. 紫萁快速繁殖技术的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 247-250.
- [17] 杨斌, 陈功锡, 蒋道松, 等. 国产槲蕨属药用植物研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(1): 1-6.
- [18] 吴学明, 苏旭. 华槲蕨孢子人工繁殖的初步研究[J]. 青海科技, 2005(3): 36-38.
- [19] 刘宝东, 石雷, 连永权. 槲蕨人工繁殖的研究[G]//中国植物学会. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编. 北京:

植物学会 2003: 488.

[20] 文伟. 骨碎补愈伤组织的诱导及无性系建立的研究[J]. 黑龙江农业科学 2010(2): 3-6.

[21] 檀龙云, 刘宝东, 张凌献. 骨碎补科两种植物配子体发育的研究[J]. 武汉植物学研究 2008 26(3): 219-223.

[22] 徐艳, 李扬, 李东, 等. 槲蕨配子体形态发育研究[J]. 热带亚热带植物学报 2009 17(1): 12-16.

[23] 吴艳芳, 尤敏, 王新胜, 等. 槲蕨配子体发育影响因素的初步研究[J]. 武汉植物学研究 2005 23(5): 461-463.

[24] 刘闻川, 俞慧娜, 戎华磊, 等. 不同光照条件对槲蕨组织培养外植体褐化的影响[J]. 广东农业科学 2008(8): 22-25.

Research Advances on Propagation of *Drynaria fortunei*

LI Cui, HUANG Xue-yan, LV Hui-zhen, HUANG Bao-you, ZHANG Zhan-jiang

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory for Conservation and Genetic Improvement of Medicinal Plant Resources, Nanning 530023, China)

Abstract: *Drynaria fortunei*, a medicinal fern, is used as a kind of medicine to improve bone cell activities, prevent the toxic, reduce blood lipid and so on. The researches on *D. fortunei* were mainly focused on the herbals, pharmacological action, chemical constituents, physiology and artificial propagation. In recent years wild *D. fortunei* resources have sharply decreased as their living environment has been damaged due to their excessive collection driven by market demand. For conservation and sustainable utilization of the wild resources the methods for propagation of *D. fortunei* were reviewed based on available literature. Clearly, the tissue culture is the best way to propagate *D. fortunei* in the future and problems arising from *D. fortunei* propagation are pointed out.

Key words: *Drynaria fortunei*; sporogony; rhizome division; tissue culture

(上接第 383 页)

Extraction of Genomic DNA of *Neottopteris nidus* and Optimization of the RAPD Reaction System

WANG Xue-bing^{1,4}, YU Xu-dong^{1,3}, ZHU Hui-jun^{1,2}, WU Fan-hua¹, HUANG Xiao-feng⁴, HU Xin-wen¹

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Research and Development Center for Fine Chemicals/ State Key Laboratory Breeding Base for Green Pesticide and Agricultural Bioengineering/ Ministry of Education Key Laboratory, Guiyang, Guizhou 550000, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Crops Germplasm Resources, Haikou 570228, China; 4. Dongguan Botanic Garden, Dongguan, Guangdong 523086, China)

Abstract: In order to study the genitic diversity and genetic structure of Bird's nest fern (*Neottopteris nidus*) populations, fresh tender fronds of the Bird's nest fern were collected and resorted to genomic DNA extraction through optimized RAPD reaction system by using different concentrations of CTAB and NaCl, different volumes of template DNA and primer. The improved CTAB DNA extraction method was the best to extract the genomic DNA of the fronds of the Bird's nest fern. The optimum reaction system (25 μ L) for RAPD amplification of the Bird's nest fern DNA was listed as follows: The template DNA (50 mg $\cdot$ L⁻¹) 1.5 μ L; the primer (1 mmol $\cdot$ L⁻¹) 1.5 μ L; 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMiX 12.5 μ L.

Key words: Bird's nest fern; *Neottopteris nidus*; *Asplenium nidus*; extration of genomic DNA; RAPD; molecular marker