

扇叶铁线蕨孢子无菌繁殖技术研究

吴 华, 袁丽萍, 王 洋, 陈龙清*

(华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘 要: 研究了扇叶铁线蕨 (*Adiantum flabellulatum*) 发育过程和不同因素对孢子、原叶体无菌培养的影响。结果表明: 孢子萌发为书带蕨型, 原叶体发育为铁线蕨型; 孢子在无光条件下不能萌发; 适当时间的低温冷藏有利于孢子萌发; 播种 20 d 后, 1/4MS 培养基中孢子萌发率最高, 可达 22.7%; 在培养基中添加 15 ~ 45 g · L⁻¹ 的蔗糖有利于孢子的萌发, 蔗糖有利于分生区的发育和性器官的分化; MS + 30 g · L⁻¹ 蔗糖的培养基中, 原叶体的成苗率可达 48.3%; 外源生长素不利于原叶体的成苗, 但 NAA 0.5 mg · L⁻¹ 促进原叶体的离体增殖; 用无菌沙瓶做试管苗炼苗基质后的移栽成活率可达 90%。

关键词: 扇叶铁线蕨; 孢子; 萌发

中图分类号: S 682.35

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 03-0457-08

Studies on *in Vitro* Culture of *Adiantum flabellulatum* from Spores

WU Hua, YUAN Li-ping, WANG Yang, and CHEN Long-qing*

(College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The development process of spores of *Adiantum flabellulatum* in sterile culture condition and effects of different factors on spore germination and gametophyte development of *A. flabellulatum* were studied. The results showed that the spore germination was of the Vittaria-type and the gametophyte development was of the Adiantum-type. Spore could not geminate in darkness. Proper time of deepfreeze was good for spore germination rate. After 20 days of spore sowing, the maximum germination rate was obtained in 1/4MS medium, which reached 22.7%; additional 15 - 45 g · L⁻¹ sucrose in culture medium were benefit spore germination, and sucrose was beneficial to gametophyte sexual differentiation; the sporophyte formation rate could reached 48.3% in MS + 30 g · L⁻¹ medium; additional auxins were not beneficial to sporophyte formation, but additional NAA 0.5 mg · L⁻¹ could promote gametophyte multiplication; sporophyte accommodation in sterile sand bottles could support a high alive rate about 90%.

Key words: *Adiantum flabellulatum*; spore; germination

观赏蕨类植物是当今世界花卉产业的一个重要组成部分。与世界其他国家相比, 我国花卉市场的观赏蕨类植物品种单一, 主要依靠野外采挖或国外进口。单纯的野外采挖不仅对野生蕨类资源和环境造成严重破坏, 生产成本高, 采集数量有限, 无法满足庞大的市场需求, 而且一味地依靠国外

收稿日期: 2009 - 07 - 02; **修回日期:** 2010 - 03 - 08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771517)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenlq0206@163.com)

进口也不是长久之计。造成该现象的主要原因之一,是国内蕨类植物的繁殖技术不过关,缺乏较为系统的研究和推广。

蕨类植物的传统繁殖方式分为孢子繁殖和分株繁殖两种。孢子繁殖中,孢子易获得,繁殖系数大,是快速繁育种苗的有效途径,但易受环境因子的影响;分株繁殖会受到季节、栽培环境等条件的约束,且分株的数量也有限制(董丽和苏雪痕,1993)。离体培养技术,因具有不受环境、时间等外界因素的影响和高效等特点,而被广泛的运用于植物的再生和繁殖。

扇叶铁线蕨(*Adiantum flabellulatum*)为铁线蕨科(Adiantaceae)铁线蕨属多年生常绿蕨类植物,主要生长于酸性的灰化红壤和红黄壤上,是较好的酸性土指示植物(栗茂腾等,2006)。其全株可入药,具有清热解毒、舒筋活络、利尿和化痰等功效,是一种良好的中药材(丁恒山,1982)。因其具有叶色优雅、株形美观和适应性强等特点,被广泛地用作鲜切花的切叶原料、室内盆栽和庭园景观配置的小型陆生观赏植物,备受广大消费者青睐。

近年来,国内外学者曾对铁线蕨属的一些种进行过孢子形态、孢子繁殖、生物学特性、组织培养及植株再生等方面的研究(刘家熙,1997;徐惠珠和金义兴,1998;曾建红和彭正松,2002;彭晓明和曾宋君,2004;曾宋君等,2005;罗顺元和王任翔,2007),但在扇叶铁线蕨配子体发育和繁殖方面还未见研究。作者针对扇叶铁线蕨的孢子无菌培养、不同生长素对原叶体增殖和不同炼苗方式对孢子体成活的影响进行研究,试图为扇叶铁线蕨的无菌培养奠定理论基础,并为商业化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 孢子的采集

扇叶铁线蕨的孢子采自华中农业大学苗圃基地。3—4月份当叶片背面孢子囊群盖变为褐色时,将整片叶片剪下,置于洁净、密封的纸袋内,5~7d后孢子自然散落,收集于干燥离心管中,置4℃冰箱密封保存。

称取适量的孢子于1.5 mL离心管中,加入适量的吐温和蒸馏水,充分振荡,浸泡20 min后快速转移到滤纸上,先用70%酒精处理15 s,再用0.1%升汞处理2~3 min,然后无菌蒸馏水冲洗4次,最后用无菌蒸馏水将灭菌孢子配制成浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浊液。

1.2 孢子的培养

1.2.1 无机盐和蔗糖对孢子无菌培养的影响

以MS为基本培养基,设置1/4MS、1/2MS、MS无机盐3个水平,设置0、15、30、45、 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖浓度5个水平,共15个处理,pH 5.8,琼脂浓 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,灭菌后分装至直径9 cm培养皿中。每皿接1 mL孢子悬浮液,每处理4皿,重复3次。所用孢子为4℃密封冷藏8个月的孢子。培养条件为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度为1 000~1 500 lx,光照周期为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。孢子萌发率在播种20 d后进行统计。

1.2.2 光照对孢子萌发的影响

在前一试验的基础上,将孢子接种于 $1/4\text{MS} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基中,分为光培养(光照强度1 000~1 500 lx)和暗培养(完全遮光)两种处理,每处理20皿。

1.2.3 储藏时间和蔗糖浓度对孢子萌发的影响

以1/4MS为基本培养基,附加不同浓度蔗糖(0、15、30和 $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),其他培养条件同试验1。

将新鲜的和冷藏 6、8、9 个月的孢子接种于上述培养基中, 每处理 4 皿, 重复 3 次。接种 20 d 后统计孢子萌发率。

1.2.4 孢子萌发和原叶体的发育过程观察

从接种 2 d 后开始, 用显微镜定期观察孢子萌发及原叶体发育, 并对其进行拍摄记录。

1.3 生长调节剂对原叶体增殖的影响

将单个成熟原叶体, 接种到分别含有不同浓度 (0、0.5、1、2、3、4 和 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) NAA、IBA 或 2, 4-D 的 MS 培养基中, 每个处理接种 3 瓶, 每瓶接种 4 个原叶体, 重复 3 次。接种 80 d 后, 将原叶体取出称量质量, 记录每瓶的总鲜质量, 然后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱中烘干 6 h, 记录每瓶原叶体的总干质量。

1.4 炼苗方式对试管苗移栽成活的影响

采用两种炼苗方式: (1) 将孢子体 (株高 1~2 cm) 无菌苗清洗干净, 直接接种无菌沙瓶中 (沙子约占培养瓶的 1/4 体积, 表层覆一层无菌泥炭土和腐叶土的对等混合基质, 用塑料膜封口, 膜上保留 3~4 个小孔) 进行炼苗, 每瓶 6 株。10 d 后, 将孢子体移栽到含有含有腐叶土: 泥炭土 = 2: 1 (体积比) 的穴盘, 进行常规管理。(2) 将孢子体的无菌苗连培养瓶一起置于温室内进行为期 10 d 的炼苗, 在此期间逐渐松开并揭去培养瓶的盖子, 而后将孢子体洗净, 移栽到含有腐叶土: 泥炭土 = 2: 1 (体积比) 的穴盘和含沙的穴盘中。移栽后的第一周穴盘上覆有塑料薄膜以保湿, 一周后慢慢揭去。

以上所有培养材料均在温室内进行, 每天观察, 视情况浇水 1 次。30 d 后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 扇叶铁线蕨孢子萌发及原叶体的形态发育

如图 1, A~E 所示: 扇叶铁线蕨成熟孢子具典型的四面体结构, 三裂缝, 浅黄褐色。孢子吸胀后, 进行第一次细胞分裂形成假根, 而后进行第二次细胞分裂形成原叶体母细胞。随原叶体母细胞的持续分化, 逐步形成丝状体、二列丝状体、片状体, 最后形成心形体。

在 MS + 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基中, 第 1 个孢子体产生在孢子播种后的第 95 天。孢子萌发为书带蕨型 (*Vittaria*), 原叶体发育为铁线蕨型 (*Adiantum*)。孢子直径大小为 35~40 μm 。

2.2 无机盐与蔗糖对扇叶铁线蕨孢子萌发的影响

孢子在接种后 10 d 开始萌发, 20 d 后孢子萌发率明显增高。随培养基中无机盐浓度的升高, 孢子萌发率随之下降。1/4 MS 的孢子萌发率显著高于 1/2 MS 和 MS, 达到 22.7% (表 1), 丝状体百分率显著高于 MS (表 2), 片状体百分率显著高于 1/2 MS (表 3)。整体来看, 无机盐浓度较低 (1/4 MS) 有利于孢子的萌发和原叶体的前期生长。

表 1~表 3 还表明: 60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖明显阻碍孢子萌发和原叶体的发育。从原叶体的发育来看, 低浓度的蔗糖 0~15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于原叶体前期生长和发育。

孢子接种 60 d 后, 多数原叶体发育为心形, 具有顶端缺刻, 基部有大量的假根。无蔗糖的处理中, 原叶体未见明显的分生区和性器官的形成与分化 (图 1, F); 添加蔗糖的处理中, 原叶体有明显的分生区和性器官的形成与分化 (图 1, G)。

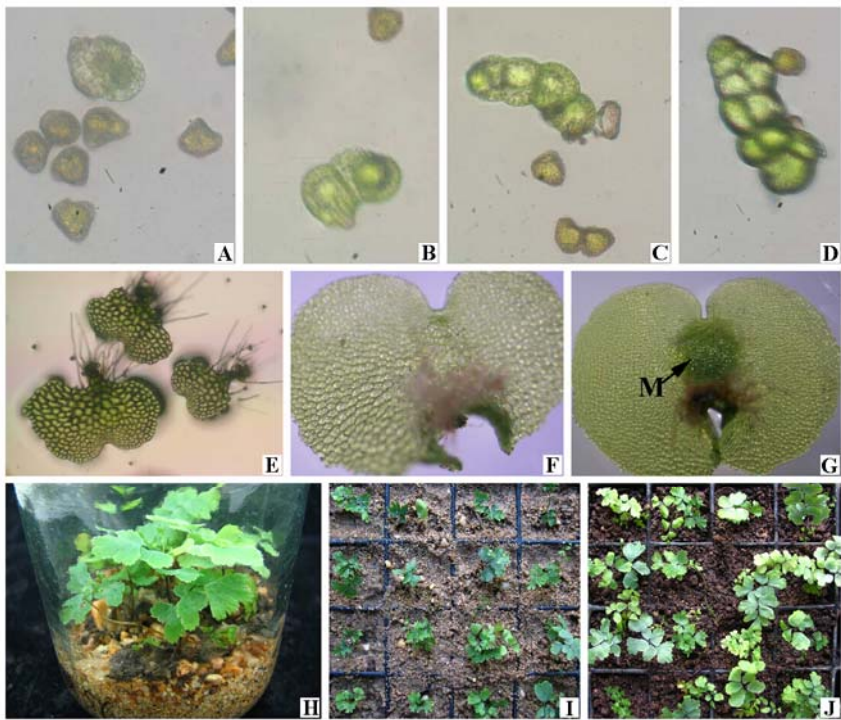


图 1 孢子萌发、原叶体发育及孢子体的诱导和移栽

A. 萌发孢子; B. 分裂为两个细胞; C. 丝状体; D. 片状体; E. 心形体; F. 不添加蔗糖处理的原叶体; G. 添加蔗糖处理的原叶体 (M. 分生区); H. 沙土瓶炼苗; I. 沙基质移栽成活苗; J. 腐叶土: 泥炭土基质移栽苗。

Fig. 1 Spore germination, gametophyte development and sporophytes acclimation and transplant

A. Germinating spore; B. Spore divided into two cells; C. Filamentous shaped; D. Spatulate shaped; E. Heart shaped; F. Gametophyte treated without sucrose; G. Gametophyte treated with sucrose (M. Meristem); H. Acclimated sporophytes in bottle of sand and soil; I. Transplanted sporophytes in substrate of sand; J. Transplanted sporophytes in substrate of the mixture of leaf mold and perlite.

表 1 不同无机盐浓度与蔗糖浓度下扇叶铁线蕨孢子萌发率 (20 d)

Table 1 The spores germination rate of *Adiantum flabellulatum* in different inorganic salt and sucrose concentrations (20 d) /%

无机盐浓度 Inorganic salt concentration	蔗糖浓度/(g · L ⁻¹) Sucrose concentrations					平均值 Mean
	0	15	30	45	60	
1/4MS	22.0 ± 0.11	18.8 ± 0.13	29.4 ± 0.05	28.4 ± 0.17	18.6 ± 0.04	22.7 ± 0.64 a
1/2MS	18.7 ± 0.03	19.2 ± 0.01	20.7 ± 0.05	21.2 ± 0.03	7.6 ± 0.02	16.9 ± 0.73 b
MS	17.9 ± 0.06	18.4 ± 0.04	16.8 ± 0.03	14.8 ± 0.04	11.3 ± 0.04	15.4 ± 0.27 b
平均值 Mean	18.9 ± 0.12 a	18.8 ± 0.06 a	22.1 ± 0.50 a	20.5 ± 1.08 a	11.6 ± 0.72 b	

注: 同一列 (或同一行) 平均值具有相同字母的数值之间没有显著差异 ($\alpha = 0.05$)。下同。
Note: Means with the same letter within column(row) are not significantly different ($\alpha = 0.05$). The same below.

表 2 不同无机盐浓度与蔗糖浓度下扇叶铁线蕨丝状体形成的百分率 (20 d)

Table 2 The percentage of filamentous shaped of *Adiantum flabellulatum* in different inorganic salt and sucrose concentrations (20 d) /%

无机盐浓度 Inorganic salt concentration	蔗糖浓度/(g · L ⁻¹) Sucrose concentrations					平均值 Mean
	0	15	30	45	60	
1/4MS	12.0 ± 0.04	11.4 ± 0.08	21.0 ± 0.06	28.4 ± 0.17	18.6 ± 0.04	17.2 ± 1.03a
1/2MS	11.6 ± 0.03	16.7 ± 0.02	20.6 ± 0.04	21.5 ± 0.04	7.4 ± 0.02	15.0 ± 0.79ab
MS	13.1 ± 0.04	11.0 ± 0.04	15.4 ± 0.04	9.9 ± 0.03	10.3 ± 0.04	11.8 ± 0.19b
平均值 Mean	12.2 ± 0.05c	12.8 ± 0.33bc	18.8 ± 0.27a	18.2 ± 1.68ab	11.6 ± 0.72c	

表 3 不同无机盐浓度与蔗糖浓度下扇叶铁线蕨片状体形成的百分率（20 d）
Table 3 The percentage of spatulate shaped of *Adiantum flabellulatum* in different inorganic salt and sucrose concentrations (20 d)

无机盐浓度 Inorganic salt concentration	蔗糖浓度/(g · L ⁻¹) Sucrose concentrations					平均值 Mean
	0	15	30	45	60	
1/4MS	9.4 ± 0.07	7.4 ± 0.06	8.2 ± 0.02	1.1 ± 0.01	0	3.8 ± 1.73a
1/2MS	6.4 ± 0.01	2.4 ± 0.01	0.6 ± 0.00	0.7 ± 0.00	0	1.3 ± 0.82c
MS	4.5 ± 0.03	7.6 ± 0.04	1.1 ± 0.01	4.9 ± 0.04	0	2.6 ± 1.24b
平均值 Mean	6.6 ± 0.23a	5.3 ± 0.60a	2.3 ± 1.25b	1.9 ± 0.48b	0c	

2.3 光照对孢子萌发的影响

孢子接种 10 d，在显微镜下观察发现，置于光照下培养的所有培养皿中的孢子均有 1~2 个开始萌发；而在黑暗条件下孢子不萌发。培养 1 个月后，黑暗条件下的孢子仍不萌发。这表明扇叶铁线蕨孢子萌发需光。

2.4 储藏时间和蔗糖浓度对孢子萌发的影响

不同储藏时间对孢子萌发作用极显著，但蔗糖浓度对孢子萌发作用不显著，两者的交互作用亦不显著（表 4）。0 ~ 8 个月，随着储藏时间的增加孢子萌发率逐渐提高，储藏 8 个月的孢子萌发率平均到达 24.1%，极显著地高于其他储藏时间；储藏 9 个月的孢子萌发率迅速下降至 4.5%。表明适当低温储藏有助于孢子萌发率的提高，而过长的低温储藏时间则会降低孢子的萌发率。

表 4 孢子储藏时间与蔗糖浓度对扇叶铁线蕨孢子萌发率的影响（20 d）
Table 4 Effect of storage periods and sucrose concentrations on spores germination rate of *Adiantum flabellulatum* (20 d)

储藏月数 Months	蔗糖浓度/(g · L ⁻¹) Sucrose concentrations				平均值 Mean
	0	15	30	45	
0	0.5 ± 0.17	2.9 ± 0.66	1.2 ± 0.37	0.9 ± 0.03	1.4 ± 0.99c
5	4.2 ± 2.01	5.6 ± 1.43	7.3 ± 2.50	5.2 ± 1.27	5.6 ± 1.87b
8	21.4 ± 2.76	18.7 ± 2.93	29.2 ± 1.38	26.9 ± 4.93	24.1 ± 7.39a
9	4.9 ± 0.67	5.0 ± 0.12	4.5 ± 0.05	3.7 ± 0.14	4.5 ± 0.61b
平均值 Mean	5.9 ± 8.7a	7.1 ± 6.8a	8.3 ± 11.8a	6.8 ± 12.4a	

2.5 外源生长素对原叶体增殖培养的影响

单个成熟原叶体在无激素的 MS 培养基上培养 80 d 后，有孢子体形成，而在添加了外源生长素的培养基上无孢子体产生。这表明无激素的 MS 培养基有利于孢子体的形成。

NAA 浓度大于 0.5 mg · L⁻¹ 时，原叶体的鲜质量和干质量随 NAA 浓度升高而下降，表明低浓度的 NAA 有利于扇叶铁线蕨原叶体的增殖；在无 IBA 的培养基上的原叶体鲜质量和干质量最高，高浓度的 IBA 易使原叶体褐化，表明 IBA 对扇叶铁线蕨的增殖有抑制作用；2, 4-D 浓度 0 ~ 0.5 mg · L⁻¹ 的处理原叶体鲜质量和干质量没有显著差异，且当 2, 4-D 浓度大于 1.0 mg · L⁻¹ 时，原叶体质量有下降趋势，表明 2, 4-D 不利于扇叶铁线蕨增殖（表 5）。可见，上述 3 种外源生长素对扇叶铁线蕨的原叶体无菌培养增殖效果不但不显著，而且当其浓度过高时还会抑制原叶体的增殖。

表 5 NAA、IBA、2, 4-D 对扇叶铁线蕨原叶体增殖的影响 (80 d)
Table 5 Effect of NAA, IBA and 2, 4-D on prothallus proliferation of *Adiantum flabellulatum* after 80 d

NAA/ (mg · L ⁻¹)	鲜质量/g Fresh weight	干质量/g Dry weight	IBA/ (mg · L ⁻¹)	鲜质量/g Fresh weight	干质量/g Dry weight	2, 4-D/ (mg · L ⁻¹)	鲜质量/g Fresh weight	干质量/g Dry weight
0	1.20 ± 0.30ab	0.13 ± 0.04b	0	1.88 ± 0.13a	0.23 ± 0.01a	0	1.82 ± 0.58ab	0.22 ± 0.06a
0.5	1.94 ± 0.92a	0.25 ± 0.12a	0.5	1.01 ± 0.25c	0.17 ± 0.01bc	0.5	2.08 ± 0.66a	0.23 ± 0.06a
1	1.73 ± 0.81a	0.18 ± 0.07ab	1	1.38 ± 0.15b	0.20 ± 0.02ab	1	1.56 ± 0.59abc	0.18 ± 0.09ab
2	1.32 ± 0.27ab	0.16 ± 0.01ab	2	0.83 ± 0.37c	0.15 ± 0.03c	2	1.05 ± 0.41bc	0.13 ± 0.03bc
3	0.88 ± 0.12b	0.11 ± 0.02b	3	0.90 ± 0.27c	0.19 ± 0.04ab	3	1.20 ± 0.57bc	0.14 ± 0.09bc
4	0.90 ± 0.12b	0.11 ± 0.01b	4	0.70 ± 0.25c	0.14 ± 0.04c	4	0.98 ± 0.29bc	0.13 ± 0.03bc
5	0.91 ± 0.14b	0.11 ± 0.02b	5	0.93 ± 0.26c	0.19 ± 0.03ab	5	0.77 ± 0.21c	0.09 ± 0.02c

2.6 炼苗与移栽

不同炼苗方式对扇叶铁线蕨幼苗的成活率影响明显。经过沙瓶炼苗 10 d 的扇叶铁线蕨未见枯叶或死亡现象, 30 d 后移栽成活率高达 90.0%。而在培养瓶中炼苗 10 d 的扇叶铁线蕨, 大部分出现叶色发黄, 枯叶及培养基污染的现象。在移栽到含不同基质的穴盘 30 d 后, 在腐叶土: 泥炭土 = 2: 1 的基质与全沙的穴盘中的移栽成活率分别为 56.0%和 46.0% (图 1, H ~ J)。

3 讨论

3.1 扇叶铁线蕨孢子萌发

扇叶铁线蕨的孢子类似于种子植物的种子, 储藏了充足的营养以供其在适宜的条件下萌发。在萌发的前期, 孢子的内含营养物质能够支持其正常萌发。因而其前期的生长和发育无需丰富的外源营养, 后期则需要大量的营养物质。

既可作为营养物质又可作为渗透势调节剂的蔗糖和无机盐, 在扇叶铁线蕨孢子萌发前期的主要功能和作用是作渗透压的调节剂。因而较低浓度的无机盐和蔗糖浓度, 有利于孢子从外界吸收水分而开始萌发。而后, 随着孢子母细胞的分化, 内含的营养消耗, 原叶体的叶绿体和假根开始从外界吸取营养以供后续的生长发育, 此时无机盐和蔗糖的功能和作用转变成了以营养物质为主, 渗透调节为辅。因而相对较高的浓度更适于原叶体的生长发育, 但过高的浓度会因渗透调节的抑制而阻碍其正常的发育。此形式完全符合正常植物的生长发育的规律, 同时也被较多的研究所证明。程冶英和张凤蕾 (1991) 还发现桫欏的孢子播种在高盐培养基 (1/2MS ~ MS) 上不萌发, 在 1/5MS 上 28 d 萌发, 而在 1/8 MS 上, 快的仅需 40 d 即萌发。Teng (1997) 也发现一般以高盐浓度为基础配制的培养基往往抑制孢子萌发。Camloh 等 (1999) 报道了蕨类植物的孢子萌发, 一般在无糖培养基上萌发快, 加入高浓度的糖会抑制孢子萌发, 但是加入适量的糖会有利于萌发孢子原叶体的进一步生长发育。袁艺等 (2002) 发现紫萁 (*Osmunda japonica* Thunb.) 孢子的萌发对糖浓度要求严格, 在 20 ~ 30 g · L⁻¹ 时较适宜, 低于 20 g · L⁻¹ 或高于 30 g · L⁻¹ 时, 孢子萌发率明显降低。

由此可见, 在扇叶铁线蕨孢子萌发和后期原叶体的生长发育的不同阶段, 应根据不同时期对营养的需求来适当调整培养基的配方, 这会更有利于扇叶铁线蕨的孢子萌发和原叶体的生长发育。

Amoroso 等 (1998) 和 Perez 等 (1994) 研究表明蕨类孢子萌发一般需要光, 光强通常在 500 ~ 2 000 lx 之间, 光照时间为 10 ~ 16 h · d⁻¹; 在无光的培养条件下, 孢子不能萌发。本试验结果与之相符。

二叉鹿角蕨 (*Platyserium bifurcatum*), 在经过表面消毒的孢子在储藏 2 ~ 3 个月后萌发率最高;

以后随孢子储藏时间的增加, 孢子的萌发率和假根的首次发生率都将会下降 (Haupt et al., 1998)。本文中的孢子萌发率为播种 20 d 后观察统计所得, 冷藏 8 个月的扇叶铁线蕨孢子萌发率显著的高于其他冷藏时间处理, 而冷藏 9 个月的孢子萌发率显著降低。可能是因为扇叶铁线蕨孢子具有一定的休眠期, 适当的低温可打破其休眠, 使其提早萌发。但若低温冷藏的时间过长, 会对孢子造成伤害, 使其生活力降低, 从而导致萌发率也随之降低。

3.2 原叶体增殖

本研究结果表明: 扇叶铁线蕨原叶体在添加生长素的条件下, 只进行营养增殖, 未见有性生殖。这与 Suzanne (1997) 的研究报道相符: 蕨类植物的原叶体通常在没有外源植物生长调节剂干扰的情况下能够顺利分化出孢子体。在外源植物生长调节剂的调控下原叶体可能不会朝着分化孢子体的方向发育, 而是进一步增殖、形成原叶体或愈伤组织。

此外, 本研究结果表明: IBA 不适合扇叶铁线蕨原叶体离体培养增殖, 高浓度会对原叶体产生毒害作用, 导致其褐化死亡。NAA 与 2, 4-D 虽然不会对原叶体的离体培养产生毒害作用, 但对原叶体增殖效果也不明显, 仅有 NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对原叶体增殖有一定的促进作用。由此可以推论, 扇叶铁线蕨原叶体对这 3 种常规的外源植物生长调节剂作用不敏感, 其具体机理还不明确。为了扩大和加快原叶体的增殖效果, 这方面的研究还有待于深入。

3.3 不同的炼苗方式对孢子体成活的影响

试管苗前期一直半自养式的生活在人工控制的环境条件下, 有充足的养分、最佳的温度、湿度和光照。因而其叶表保护组织如角质、蜡质层等都不发达或没有, 叶组织间隙大, 气孔开度大, 易失水; 而组培条件下生成的根系幼嫩, 含水量高, 功能性不全。移栽是将试管苗从无菌的优厚条件下, 转种到自然的环境条件下, 使试管苗从半自养型转换到自养型。前后的环境变化较大, 对于幼嫩的试管苗的成活造成了较大的障碍。因而适当的炼苗, 即通过一定的过度培养方式, 使试管苗逐步适应自然环境, 从而能正常的生长和发育成为了必不可少的步骤。

通过传统的炼苗移栽也可以获得较高的成活率, 但管理流程繁琐耗时, 需要管理人员投入较多的关注。使用本试验提供的沙瓶过度法来进行炼苗移栽, 不仅步骤简单易行, 管理方便, 而且还保证了高效的炼苗效果和较高的移栽成活率。其原因为: (1) 沙瓶中的内含物经过灭菌后, 有较高的湿度和充足的营养, 这与试管苗的前期培养环境接近; (2) 沙瓶封口膜上的小孔随炼苗过程逐渐增多, 使得试管苗可以逐渐的适应自然环境。

本试验通过对扇叶铁线蕨孢子离体培养, 完成了孢子萌发和原叶体发育过程的观察, 探讨了不同生长调节剂对原叶体增殖的影响, 研究了不同的移栽方式对扇叶铁线蕨试管苗移栽的影响。为扇叶铁线蕨无菌培养打下了良好的基础。同时为种质资源的保存提供了必要的技术支持, 此外还为扇叶铁线蕨的规模化生产提供基础。

References

- Amoroso C B, Amoroso V B, Drew R A. 1998. Spore culture studies on some economic ferns of Mindanao Philippines. *Acta Horticulturae*, 461: 231 - 235.
- Camloh M, Gogala N. 1992. *In vitro* culture of *Platyserium bifurcatum* gametophytes. *Scientia Horticulturae*, 51: 343 - 346.
- Camloh M, Vilhar B, Ravnikar M. 1999. Jasmonic acid stimulates development of rhizoids and shoots in fern leaf culture. *Journal of Plant Physiology*, 155 (6): 798 - 801.
- Cheng Ye-ying, Zhang Feng-lei. 1991. Propagation and conservation of *Alsophila spinulosa* Hook. *Acta Botanica Yunnanica*, 13 (2): 181 - 188. (in Chinese)

- 程冶英, 张风雷. 1991. 桫欏的快速繁殖与种质保存技术的研究. 云南植物研究, 13 (2): 181 - 188.
- Ding Heng-shan. 1982. Medicinal cryptogams in China. Shanghai: Shanghai Science Technology Press. (in Chinese)
- 丁恒山. 1982. 中国药用孢子植物. 上海: 上海科学技术出版社.
- Dong Li, Shu Xue-hen. 1993. Studies on spore propagation of *Matteuccia struthiopteris* Todaro. Acta Horticultural Sinica, 20 (3): 274 - 278. (in Chinese)
- 董 丽, 苏雪痕. 1993. 桫欏 (*Matteuccia struthiopteris* Todaro) 孢子繁殖的研究. 园艺学报, 20 (3): 274 - 278.
- Haupt W, Leopold K, Scheuerlein R. 1998. Light-induced fern spore germination - Effect of spore age on responsiveness to light. Journal of Photochemistry and Photobiology, 1 (4): 415 - 427.
- Li Mao-teng, Yu Long-jiang, Li Wei, Li Qiang, Li Tao, Miao Ying-jie, Liu Jian-min. 2006. Ecological adaptation of *Adiantum flabellulatum* leaf in Karst areas. Chinese Bulletin of Botany, 23 (6): 691 - 697. (in Chinese)
- 栗茂腾, 余龙江, 李 为, 李 强, 李 涛, 苗英杰, 刘建民. 2006. 扇叶铁线蕨叶片对岩溶环境的生态适应. 植物学通报, 23 (6): 691 - 697.
- Liu Jia-xi. 1997. Studies on the morphology of the spore of *Adiantum* in Beijing. Bulletin of Botanical Research, 17 (4): 377 - 379. (in Chinese)
- 刘家熙. 1997. 北京铁线蕨属孢子形态的研究. 植物研究, 17 (4): 377 - 379.
- Lou Yuan-shun, Wang Ren-xiang. 2007. Tissue culture of spores of *Adiantum malesianum* Ghatak. Plant Physiology Communications, 43 (1): 131 - 132. (in Chinese)
- 罗顺元, 王任翔. 2007. 假鞭叶铁线蕨孢子的组织培养. 植物生理学通讯, 43 (1): 131 - 132.
- Peng Xiao-ming, Zeng Song-jun. 2004. Tissue culture and plantlet regeneration of *Adiantum capillus-veneris*. Plant Physiology Communications, 40 (5): 575. (in Chinese)
- 彭晓明, 曾宋君. 2004. 铁线蕨的组织培养及植株再生. 植物生理学通讯, 40 (5): 575.
- Perez G, Orozco S, Riba R. 1994. The effects of white fluorescent light, far-red light, darkness, and moisture on spore germination of *Lygodium heterodoxum* (Schizaceae). American Journal of Botany, 81: 1367 - 1369.
- Suzanne M, Rogers D, Banister S. 1997. Micropropagation of *Notholaena* 'Sun-Tuff' fern. HortScience, 27 (1): 1224 - 1225.
- Teng W T. 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platyserium bifurcarum*. Plant Cell Reports, 17: 777 - 783.
- Wang Ren-xiang, Lu Shu-gang, Deng Xi-chao, Li Hong, Zhang Zheng-yi. 2006. Spore morphology of three species of *Adiantum* L. from Guangxi, China. Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition, 24 (1): 79 - 82. (in Chinese)
- 王任翔, 陆树刚, 邓晰朝, 谢 强, 李 红, 张义正. 2006. 广西 3 种铁线蕨属植物孢子形态的扫描电镜观察. 广西师范大学学报: 自然科学版, 24 (1): 79 - 82.
- Xu Hui-zhu, Jin You-xing. 1998. Spore propagation of *Adiantum reniforme* var. *sinense* endemic to Three-Gorge Reservoir Region. Resource and Environment in the Yangtze Basin, 7: 237 - 241. (in Chinese)
- 徐惠珠, 金义兴. 1998. 三峡库区珍稀特有植物荷叶铁线蕨孢子繁殖. 长江流域资源与环境, 7: 237-241.
- Yuan Yi, Tian Sheng-ni, Ye Ai-hua. 2002. Studies on the rapid propagation of the *Osmunda japonica* Thund. Acta Horticultural Sinica, 29 (3): 247 - 250. (in Chinese)
- 袁 艺, 田胜尼, 叶爱华. 2002. 紫萁快速繁殖技术研究. 园艺学报, 29 (3): 247 - 250.
- Zeng Song-jun, Chen Zhi-lin, Duan Jun. 2005. *In vitro* propagation of *Adiantum raddianum* Presl. Plant Physiology Communications, 41 (4): 91. (in Chinese)
- 曾宋君, 陈之林, 段 俊. 2005. 楔叶铁线蕨的离体快繁. 植物生理学通讯, 41 (4): 91.
- Zeng Jian-hong, Peng Zheng-song. 2002. Biological features and conservation of *Adiantum reniforme* L. var. *sinense* endemic to Three-Gorge reservoir Region. Chinese Wild Plant Resources, 21 (5): 34 - 36. (in Chinese)
- 曾建红, 彭正松. 2002. 三峡库区珍稀濒危植物荷叶铁线蕨的生物学特性及保护对策. 中国野生植物资源, 21 (5): 34 - 36.
- Zhang Kai-mei, Shi Lei, Li Dong, Zhang Xian-chun. 2008. Development process and spore sterile culture of *Pteris wallichiana* Agardh. Acta Horticulturae Sinica, 35 (1): 94 - 98. (in Chinese)
- 张开梅, 石 雷, 李 东, 张宪春. 2008. 西南凤尾蕨发育过程及其孢子的无菌繁殖. 园艺学报, 35 (1): 94 - 98.