

## 荷叶铁线蕨的组织培养与快速繁殖

黄芳<sup>1,2</sup>, 程治英<sup>1</sup>, 龙春林<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204; <sup>2</sup>云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201

## Tissue Culture and Rapid Propagation of *Adiantum reniforme* L. var. *sinense* Y. X. Lin

HUANG Fang<sup>1,2</sup>, CHENG Zhi-Ying<sup>1</sup>, LONG Chun-Lin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; <sup>2</sup>College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**1 植物名称** 荷叶铁线蕨(*Adiantum reniforme* L. var. *sinense* Y. X. Lin), 又名荷叶金线草。

**2 材料类别** 成熟孢子。

**3 培养条件** 孢子萌发培养基: (1) 1/2MS; (2) 1/MS+0.5 g·L<sup>-1</sup> 活性炭。原叶体增殖培养基: (3) MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> (单位下同)+NAA 0.2; (4) MS+6-BA 1.0+NAA 0.5; (5) MS+KT 1.0+NAA 0.2; (6) MS+KT 1.0+NAA 0.5。绿色小球(GGB)形成培养基: (7) MS+6-BA 2.0+NAA 0.5。GGB 分化增殖培养基: (8) MS+6-BA 1.5+NAA 0.5; (9) MS+KT 1.5+NAA 0.5。愈伤组织形成培养基: (10) MS+6-BA 1.0; (11) MS+KT 1.5。GGB 转化培养基: (12) MS+IBA 0.05; (13) MS+IBA 0.5。孢子体形成培养基: (14) MS+NAA 1.0; (15) MS+ABA 0.5+IBA 0.1。生根培养基: (16) 1/2MS+NAA 0.2+活性炭(AC) 0.5 g·L<sup>-1</sup>; (17) 1/2MS+IBA 0.2+AC 0.5 g·L<sup>-1</sup>。以上培养基均含 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH 5.5~5.8。培养温度(26±2) °C, 连续光照 12 h·d<sup>-1</sup>, 光照强度 20~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

### 4 生长与分化情况

**4.1 无菌材料的获得** 将长有成熟孢子囊的荷叶铁线蕨叶片小心摘下, 正面朝上铺在白纸上, 用台灯光照 1~2 h, 孢子囊自然干燥开裂, 获得成熟孢子。将除去杂质的干净孢子用滤纸包好, 蒸馏水浸泡 2 h。在超净工作台上, 用 75% 酒精灭菌 30 s, 再用 0.1% 升汞浸泡 5 min, 无菌水漂洗 3 次。然后将消过毒的孢子接种于孢子萌发培养基(1)、(2)上。

**4.2 孢子萌发** 经 15~25 d 的培养, 培养基(1)、(2)中能可见到零星的绿色小点, 显微镜检验结果为孢子萌发; 60 d 左右可见原叶体形成。荷叶铁线蕨

的原叶体在孢子萌发培养基上生长良好, 经过一段时间, 原叶体簇生成团状, 其中培养基(2)的萌发速度比(1)快。

**4.3 原叶体的增殖** 将孢子萌发形成的原叶体团分散成小块, 每块约 0.5 cm×0.5 cm, 接种于原叶体增殖培养基(3)~(6)上, 原叶体能快速增殖, 形成球状油绿色紧密簇生的原叶体团。各培养基中的增殖速度为(6)>(4)>(3)>(5)。多次继代后, 能形成大量的原叶体团, 以 2 个月 3~4 倍的速度增长。

**4.4 GGB 的形成** 将增殖迅速的原叶体团接种到 GGB 形成培养基(7)上, 10 d 左右, 绿色原叶体逐渐转浅绿, GGB 形成开始启动; 20 d 左右, 原叶体团顶部形成淡黄晶莹的小颗粒; 30 d 左右, 小颗粒形成类似兰花原球茎的深色 GGB。

**4.5 GGB 的分化与增殖** 将形成的 GGB 与原叶体团转入培养基(8)、(9)中, 10 d 左右, 几乎所有原叶体团转化为松散布于培养基上的 GGB 颗粒。培养基(8)转化速度低于培养基(9), 且 GGB 颜色深绿, 外表密布黄色绒毛; 培养基(9)中的 GGB 颗粒嫩绿而晶莹。

**4.6 愈伤组织的诱导** 将原叶体团接种到培养基(10)、(11)中, 持续生长 3 个月, 在原叶体边缘形成大量浅绿色的愈伤组织。

**4.7 GGB 的转化** 将 GGB 团接种到 GGB 转化培养基(12)、(13), 经 10 d 左右, 颗粒又逐渐转化成新绿紧密簇生的原叶体小丛。

**4.8 孢子体的形成** 不断继代增殖的培养基上经 3

收稿 2008-01-28 修定 2008-03-19

资助 科技部国家科技基础条件平台项目(2005DKA21006)。

\* 通讯作者(E-mail: long@mail.kib.ac.cn; Tel: 0871-5223233)。

个月也很难长出孢子体; 但将成熟原叶体团接种于孢子体形成培养基(14)、(15)上, 约60 d后长出幼嫩孢子体(图1)。培养基(15)上孢子体形成速度最快, 20 d左右, 20%~30%的原叶体团形成孢子体; 但培养基(15)上原叶体不再增殖, 孢子体很快就长出小圆叶和成熟的黑色叶柄。培养基(14)上, 60 d左右, 原叶体团上方抽苔出幼嫩孢子叶, 同时原叶体仍能继续增殖; 90 d左右, 全部长成孢子体, 绿色幼嫩叶柄才成熟变黑。



图1 荷叶铁线蕨的孢子体

**4.9 生根与移栽** 将已分化出茎、叶的丛生小苗分成小团转入生根培养基(16)、(17)中, 30~40 d可生根(图2)出瓶, 生根率达100%。当培养瓶内所有原叶体几乎都长出高约5 cm的孢子体时, 打开瓶盖, 放于温暖、湿润、通风的环境中炼苗15~20 d。植株叶片伸展, 将生根苗小心取出, 洗去根部琼脂, 移栽在温暖且不蓄水的消毒水苔或珍珠岩中(图3), 盖塑料膜保湿, 保持环境温度约25℃。定植初期应注意喷雾保湿和保温, 4周后小苗可定植生长, 成活率可达90%。2周后可浇0.05%尿素水肥, 每周1次。4个月后再分株上盆种植, 3~4株一盆(图4)。

**5 意义与进展** 荷叶铁线蕨为铁线蕨科铁线蕨属的多年生常绿草本状蕨类植物, 仅分布于我国长江



图2 荷叶铁线蕨的生根苗



图3 荷叶铁线蕨的移栽苗



图4 荷叶铁线蕨的分株小苗

三峡一带(万县、石柱), 海拔高度200~400 m, 是国家二级保护植物(王诗云等1995; 许天全等1987)。其根状茎短而直立, 单叶簇生, 叶片圆肾型, 叶柄亮黑, 小巧别致, 可供观赏; 还具有重要的药用价值, 对黄疸肝炎、泌尿系统感染、中耳炎等疾病有较好疗效(谢宗强1993)。然而荷叶铁线蕨自然繁殖能力弱, 数量稀少。三峡工程建成之后, 其原来的生境受到破坏, 有关部门已采取措施进行异地保护, 但通过无性繁殖扩大其个体数量、确保该濒危物种长期保存, 仍是十分必要和及时的, 对于该植物的回归引种尤其重要(谢宗强1993)。采用无菌播种和组织培养快速繁殖技术, 可极大提高其繁殖系数, 并保持该种的特性。目前同属其他种植物的组织培养已有报道(曾宋君等2005; 罗顺元和王任翔2007), 但荷叶铁线蕨的组织培养和快速繁殖的报道迄今未见。

#### 参考文献

- 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
- 王诗云, 赵子恩, 彭辅松, 蒋祖德编著(1995). 华中珍稀濒危植物及其保存(第一册). 北京: 科学出版社, 14~15
- 谢宗强(1993). 三峡工程对库区特有濒危植物荷叶铁线蕨的影响与对策. 生物多样性, 1 (1): 16~18
- 许天全, 郑重, 金义兴(1987). 论荷叶铁线蕨的分布特点. 武汉植物学研究, 5 (3): 247~252
- 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): 499