

变异鳞毛蕨的孢子培养与配子体发育研究

欧阳婵娟^{1,2}, 唐源江¹, 王瑞江^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:应用无菌培养和常规泥土培养两种方法对变异鳞毛蕨(*Dryopteris varia*)孢子进行了比较研究,并在光学显微镜下观察了其配子体的发育过程。结果表明:蔗糖浓度为2%的1/2MS与MS培养基对孢子萌发时间和萌发率影响不大,但前者较适于孢子萌发,而后者则适于孢子体形成;在1/2MS培养基上,1%的蔗糖浓度比其它浓度更适宜于孢子的萌发。以菜园土为培养基质时,变异鳞毛蕨孢子的萌发时间短且萌发率高,但幼孢子体出现的时间明显晚于无菌培养。孢子萌发为书带蕨型,原叶体发育为三叉蕨型,符合鳞毛蕨属配子体发育的特征。

关键词:变异鳞毛蕨; 孢子培养; 配子体发育

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)04-0344-06

Spore Culture and Gametophyte Development of *Dryopteris varia* (L.) Ktunze

OUYANG Chan-juan^{1,2}, TANG Yuan-jiang¹, WANG Rui-jiang^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Two culture methods, sterilized MS medium and garden soil medium, were comparatively studied for spore germination of *Dryopteris varia*, with the observation of its gametophyte development under light microscope. The results revealed that the differences between the sterilized 1/2MS and MS culture media with 2% sucrose were very little in terms of the germination time and germination rate, but the former was much suitable for spore germination and the latter for the formation of sporophyte. The experiment also showed that in the 1/2MS culture medium 1% sucrose content was more appropriate for spore germination than others. Garden soil medium was testified to have shorter germination time and higher germination rate, but the formation of sporophyte on soil was obviously later than those on MS culture media. The process of spore germination in *D. varia* is attributed to *Vittaria*-type, and that of gametophyte development belongs to *Aspidium*-type. This feature is consistent with that in *Dryopteris* Adanson.

Key words: *Dryopteris varia*; Spore culture; Gametophyte development

鳞毛蕨属(*Dryopteris*)是最大的蕨科—鳞毛蕨科(*Dryopteridaceae*)的主干,约有230种,遍布全球,以亚洲大陆为分布中心^[1]。鳞毛蕨属是一个系统发育水平较高的自然分类群,有关该属的形态分类学、细胞学、分子系统学的研究已有较多的资料积

累^[2-6],其中关于鳞毛蕨属的配子体发育及生殖生物学的研究也较多,但相对于该属的种类数量来说,这些研究还显得远远不够^[7-9]。本文以变异鳞毛蕨(*Dryopteris varia*)为对象,初步探讨了该种的孢子萌发条件与配子体发育特点,旨在为鳞毛蕨属

的生殖生物学研究积累资料,也为该种在园艺栽培与繁育方面提供参考。

变异鳞毛蕨为中型草本植物,林下土生,通常高40~80 cm,叶簇生,叶柄基部密被褐色披针形鳞片,二至三回羽状复叶,叶片基部靠近叶轴两侧各有一个小羽片呈燕尾状伸长,株形美观,叶色暗绿,四季常青,具有较高的观赏价值。此外,其根茎可入药,有清热止痛的药效^[10],在我国热带及亚热带地区有广泛分布,具有潜在的市场开发价值。目前关于变异鳞毛蕨的孢子培养及配子体发育的研究报道较少见。

1 材料和方法

试验材料 材料为从广州从化引种到实验温室的变异鳞毛蕨(*Dryopteris Varia*)的成熟孢子。剪取生长良好的带有成熟孢子囊群的叶片,放入干净纸袋中,置于阴凉通风处约5 d,待孢子囊内的孢子自然散落,收集散落的孢子,立即接种或放入冰箱4℃下保存。凭证标本存中国科学院华南植物园标本馆(董仕勇 2103, IBSC)。

孢子的消毒 将收集到的0.13 g孢子用滤纸包好,在超净工作台上用75%的酒精浸泡25~30 s,再放入0.1%的升汞溶液中消毒7~8 min,无菌水漂洗5次,最后放在无菌的培养皿中待用。

孢子的无菌培养 在无菌孢子里加入6 ml无菌水,制成孢子悬浮液,用无菌的移液管将悬浮液分别滴加到MS、1/2MS、1/4MS(以上3种培养基蔗糖浓度为2%,铁盐及有机成分不变)以及6种不同蔗糖浓度的1/2MS(蔗糖浓度分别为0.1%、2%、3%、4%和5%)的培养基上,所有培养基琼脂浓度均为0.7%,pH值为5.7~5.8;接种后置于25℃,光照强度为36~45 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (光源为日光灯),光照时间为12 h d^{-1} 的培养室内培养。以上每种培养基各接种5瓶。

孢子的常规培养 分别以菜园土(潮湿土,采自中国科学院华南植物园菜地,pH值6.4~6.5),混合基质1(花卉土:素沙:菜园土=2:1:1,pH值6.3~6.4),混合基质2(花卉土:素沙=2:1,pH值6.4~6.5)为播种基质。将各基质分别装入花盆中(基质厚度约为花盆深度的3/4),压实,用沸水浇透灭菌,待冷却后即可进行播种。将收集的孢子制成悬浮液,均匀地滴在各培养基上,然后用保鲜袋封住盆口保

湿,以防止其他蕨类植物的孢子、杂草种子或霉菌等的污染。播种后,放置于25~30℃,湿度70%以上的温室内培养,光照强度为36~54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (光源为日光)。以上每种基质各播种3盆。

孢子萌发及配子体发育的观察 定期在常规培养的基质中取样,利用光学显微镜(Nikon Optiphot),观察孢子萌发、配子体发育,直至新一代幼孢子体形成的全过程,用Nikon E4500数码相机拍照记录。数值以随机测得的10个数据表示。孢子萌发率=萌发瓶(盆)数×瓶(盆)中显绿总面积/总基质面积×100%,以孢子接种后90 d统计。

2 结果和分析

2.1 孢子的无菌繁殖

2.1.1 培养基无机盐浓度对孢子萌发及幼孢子体形成的影响

经90 d的培养,接种在MS、1/2MS、1/4MS(以上3种培养基蔗糖浓度为2%,铁盐及有机成分不变)培养基上的基质显绿时间(即孢子萌发产生出绿色丝状体的时间)、孢子萌发率及幼孢子体出现时间不同(表1)。结果表明,变异鳞毛蕨的孢子在MS与1/2MS培养基上显绿的时间相差仅为2 d,并且在1/2MS培养基上孢子的萌发率要比MS培养基上的高5%,因此1/2MS培养基较适于孢子的萌发,而MS培养基则较有利于孢子体形成。在1/4MS培养基上,基质显绿约需34 d,比在1/2MS和MS中分别晚4 d和6 d,而幼孢子体的出现时间则分别晚10 d和15 d。因此,无机盐浓度过低的培养基不利于变异鳞毛蕨孢子的萌发及孢子体形成;在MS培养基上,配子体最先长出幼孢子体,由此可见,较高浓度的无机盐(MS全量无机盐)较有利于孢子体的形成。

2.1.2 蔗糖浓度对孢子萌发的影响

经90 d的培养,孢子接种在蔗糖浓度为0~5%的1/2MS(铁盐及有机成分不变)上,基质显绿时间、孢子萌发率及幼孢子体出现时间也不相同(表2)。从表2中可以看出,当蔗糖浓度分别为0.1%和2%时,孢子萌发率差别并不显著,分别为37%、39%和38%,而基质显绿时间分别为38 d、25 d和30 d。因此,蔗糖浓度为1%的1/2MS培养基较适宜孢子萌发。

表 1 在 2% 蔗糖浓度下不同 MS 培养基对变异鳞毛蕨的孢子萌发及孢子体形成的影响

Table 1 Effect of different MS culture media with 2% sucrose content on spore germination and sporophyte development of *D. varia*

培养基 Medium	基质显绿时间(d) Days of the appearance of green surface in medium	萌发率(%) Germination rate	幼孢子体出现时间(d) Days of the appearance of young sporophyte
MS	28	33	105
1/2MS	30	38	110
1/4MS	34	<5.0	120

表 2 在 1/2MS 培养基上不同蔗糖浓度对变异鳞毛蕨孢子萌发的影响

Table 2 Effect of different sucrose content in 1/2MS culture media on spore germination of *D. varia*

蔗糖 (%) Sucrose content	基质显绿的时间(d) Days of the appearance of green surface in medium	萌发率(%) Germination rate
0	38	37
1	25	39
2	30	38
3	40	<5
4	45	<5
5	38	<1

2.1.3 幼孢子体继代培养及移栽

将刚萌发出的幼孢子体接种在 MS 培养基上继代培养, 壮苗生根, 为移栽做准备。待幼孢子体分裂出 2~3 个羽片时, 将培养瓶从组培室拿出, 放至温室大棚, 在自然状态下培养, 一周后出瓶移栽至穴盘中, 培养基质为用 1% 高锰酸钾溶液消毒过的素沙, 温室内湿度保持在 70% 以上。移栽时, 将根部上的琼脂洗净, 尽量避免损伤根部。注意喷水, 遮阴。一个月左右, 待幼孢子体长势良好后, 可将其移栽到混合土(菜园土:花卉土 = 1:1)中培养,

此后每天定时喷水, 每周施薄肥一次。幼孢子体移栽成活率可达 70% 以上。

2.2 孢子常规培养

播种到菜园土、混合基质 1 和混合基质 2 中的孢子均能部分萌发、发育且产生新一代的孢子体, 但繁殖的快慢有所差异(表 3)。由表 3 可以看出, 不同的基质对变异鳞毛蕨孢子的萌发时间及萌发率影响不大, 因此, 从幼孢子体的出现时间来考虑, 菜园土为变异鳞毛蕨孢子常规培养的较优基质。

表 3 变异鳞毛蕨孢子在泥土基质上的培养情况

Table 3 Spores germination of *D. varia* cultivated on soil media

基质 Medium	基质显绿时间(d) Days of the appearance of green surface in medium	萌发率(%) Germination rate	幼孢子体出现时间(d) Days of the appearance of young sporophyte
菜园土 Garden soil	10	>90	135
混合基质 1 Mixture medium 1	110	>90	150
混合基质 2 Mixture medium 2	212	>90	160

孢子萌发形成心形配子体后, 每隔 2 d 向盆中喷水一次, 增加盆中湿度, 以利于配子体的受精。培养过程中, 盆口一直用保鲜袋覆盖, 既可保持盆内湿度, 也可防止其他蕨类的孢子、杂草种子或霉菌等的污染。孢子播种密度过大时, 会影响配子体

发育形成孢子体, 如果配子体过于密集, 可将培养基分成若干小块, 分开培养, 以利于孢子体的形成。

幼孢子体长出 2~3 个羽片后, 将其移栽到穴盘中, 置于温室中培养, 培养基质采用混合土(菜园土:花卉土 = 1:1), 每天早晚喷水 2 次, 每周施薄肥

一次。温室温度 25 ~ 30℃,湿度保持 70% 以上。幼孢子体移栽成活率达到 90% 以上。

2.3 配子体的发育过程

2.3.1 孢子囊及孢子

变异鳞毛蕨孢子囊的侧面观为圆形,环带纵行,通常由 16 个加厚的细胞组成(图版 I:2)。孢子棕褐色,赤道面观为肾形(图版 I:3),赤道轴长 55 ~ 65 μm ,极面观为椭圆形(图版 I:4),极轴长 50 ~ 60 μm ;单裂缝,表面具疣状突起。

2.3.2 孢子萌发成丝状体

播种后约 7 d,孢子开始萌发。孢子首先平行于赤道面分裂形成两个大小不等的细胞,较大的细胞垂直于赤道面分裂成两个细胞,其中一个成为原叶体原始细胞,原叶体原始细胞经连续横向分裂,形成 4 ~ 10 个细胞的单列丝状体(图版 I:5),孢子萌发为书带蕨型(*Vittaria-type*)^[11]。

2.3.3 片状体

丝状体的顶端细胞纵向分裂,逐渐形成片状。片状体的形状不规则,初期由 3 ~ 4 列细胞组成,边缘细胞具毛状体,基部长出数根透明的假根。播种后约 30 d,片状体开始向心形配子体阶段过渡,顶部数个细胞仍处于活跃的细胞分裂状态,细胞体积小并排列紧密,包含较多叶绿体,顶部两侧的细胞停止分裂,其体积则逐渐增大(图版 I:6)。

2.3.4 原叶体

播种后约 45 d,原叶体逐渐成熟,呈对称的心形(图版 I:7)。成熟原叶体表面及边缘具大量毛状体,毛状体呈短棒状(图版 I:8);原叶体的基部密生假根,假根由最初的无色透明逐渐变为浅黄褐色。原叶体发育为三叉蕨型(*Aspidium-type*)^[11]。

2.3.5 性器官

播种后约 50 d,在原叶体上出现性器官。精子器(图版 I:9)主要分布于原叶体基部假根丛中,边缘也有分布,近球形,由 3 个细胞构成(盖细胞,环细胞及基细胞),直径 50 ~ 52 μm ,精子器成熟时,盖细胞破裂,大量精子溢出。颈卵器分布于原叶体中部靠近生长点处,圆柱形,高 185 ~ 205 μm 。精子借助原叶体表面的水游入颈卵器中,完成受精,受精后,颈卵器由无色变为褐色(图版 I:10,11)。

2.3.6 幼孢子体

播种后约 90 d,幼孢子体(图版 I:12)从配子体的先端凹陷处长出,此时原叶体不会立即死亡,仍能继续生长一段时间。待长出 4 ~ 5 片孢子叶后,

原叶体逐渐枯萎死亡,幼孢子体数月后成熟,最终长成较大的植株(图版 I:1)。

3 讨论

3.1 无菌培养中无机盐及蔗糖浓度对孢子发育的影响

本研究结果表明变异鳞毛蕨孢子在全量 MS 和 1/2MS 培养基中均有较高的萌发率,但 1/2MS 培养基较有利于孢子萌发,而 MS 培养基则更有利于孢子体形成。较低无机盐浓度的培养基(1/4MS)不利于其萌发,说明较高盐浓度的培养基更适宜于变异鳞毛蕨孢子萌发及孢子体形成。蕨类孢子萌发培养基一般采用 MS 为基本培养基,但有些种类在全量 MS 中不能萌发,只在稀释的 MS、Knudson、Knop 等低盐培养基中才可以萌发^[12]。徐艳等^[13]在对白玉凤尾蕨(*Pteris cretica* 'Albo-Lineata')孢子繁殖的研究中报道,蕨类植物的孢子类似种子植物的种子,其体内贮存的营养物质可以满足孢子早期生长发育的需要,故在孢子发育初期低无机盐浓度的 MS 培养基更利于孢子萌发。因此,从目前的研究看来,蕨类植物孢子的萌发对无机盐浓度的要求没有必然的规律。

试验结果也表明,当培养基中蔗糖浓度为 0 ~ 2% 时,即无蔗糖或低蔗糖浓度有利于变异鳞毛蕨的孢子萌发,较高蔗糖浓度(>2%)抑制其孢子萌发,蔗糖浓度为 1% 时萌发较快且萌发率高。培养基中不添加蔗糖,虽不影响孢子萌发率,但孢子萌发时间明显延长,故低蔗糖浓度培养基(1% ~ 2%)较适宜于变异鳞毛蕨孢子萌发。徐艳等^[14]研究也发现培养基中不添加或添加低浓度(<2%)的蔗糖有利于白玉凤尾蕨孢子萌发,当蔗糖浓度高于 3% 时,孢子的萌发率下降。不过,Sheffield 等^[14]研究报告,欧洲蕨(*Pteridium aquilinum*)等 4 种蕨类植物的孢子萌发率随着蔗糖浓度的提高而提高。总的来说,蔗糖对孢子萌发的影响颇大,有待更深入的研究。

3.2 配子体发育特点

变异鳞毛蕨孢子萌发为书带蕨型(*Vittaria-type*):孢子细胞平行于赤道面第一次分裂形成两个大小不等的细胞,较大的细胞为原叶体原始细胞,较小的细胞形成假根;原叶体原始细胞垂直于赤道面分裂成两个细胞,其中一个细胞形成丝状

体^[1]。原叶体发育为三叉蕨型(*Aspidium-type*):原叶体由丝状体顶端早期形成的顶端细胞分裂产生,只具有顶端生长,而顶端细胞侧生出的细胞不再分裂;丝状体顶端细胞早期即形成毛状体,发育的配子体前端形成不规则的片状结构;顶端细胞不断分裂,最终形成心形配子体,同时由原叶体边缘和表面细胞形成了更多的毛状体^[1]。这与王全喜等^[7]报道的粗茎鳞毛蕨(*Dryopteris crassirhizoma*)、华北鳞毛蕨(*D. goeringiana*)及远东鳞毛蕨(*D. sichotensis*) 3种鳞毛蕨属植物,张开梅等^[8]报道的三角鳞毛蕨(*D. subtriangularis*)以及黄庆阳等^[9]报道的香鳞毛蕨(*D. fragrans*)的配子体发育方式一致,说明变异鳞毛蕨的配子体发育符合鳞毛蕨属的特征,也支持了曾汉元和丁炳扬^[15]关于“书带蕨型孢子萌发方式”和“三叉蕨型原叶体发育方式”在鳞毛蕨科的配子体发育中可能具有普遍性的说法。

3.3 孢子无菌培养与常规培养的比较

本研究结果显示,无菌培养基质的显绿时间比常规泥土培养的多 15~30 d,可能原因是无菌培养时对孢子的消毒导致孢子活力降低,萌发时间延长;不过,无菌培养中幼孢子体出现的时间却比常规泥土培养中提前了约 30 d,同时还观察到在无菌培养基中,原叶体中脉与顶端显著加厚,且大多数不为心形,明显区别于常规培养中的原叶体,这些现象说明变异鳞毛蕨孢子无菌培养与常规培养中幼孢子体的形成方式可能不一样,具体情况还有待进一步观察研究。

变异鳞毛蕨孢子无菌培养和孢子常规泥土培养相比,常规培养的成本低,操作简单,繁殖量大,而无菌繁殖的出苗快,培养条件更易控制。如果将萌发出的无菌配子体进行增殖培养,将大大增加繁殖率,得到更多的幼孢子体。因此,应用到实际生产时,应该综合考虑各种因素对生产成本的影响,选用较佳途径。

变异鳞毛蕨药用价值和观赏价值俱佳,是一种极具开发潜力的野生经济植物,本研究对变异鳞毛蕨的快速高效繁殖所进行的实验,为将来建立变异鳞毛蕨人工繁殖基地,并为其进行大规模商业化生产提供了重要参考。

致谢 本研究在实验过程中得到了中国科学院华南植物园马国华研究员以及胡玉姬女士的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Xie Y T(谢寅堂), Wu S G(武素功), Lu S G(陆树刚). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 5(1) [M]. Beijing: Science Press, 2000: 103.(in Chinese)
- [2] Fernández H, Bertrand A M, Sánchez-Tamés R. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 56: 211–214.
- [3] Menéndez V, Villacorta N F, Revilla M A, et al. Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins sp. *affinis* [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25: 85–91.
- [4] Li C X, Lu S G. Phylogenetics of Chinese *Dryopteris* (Dryopteridaceae) based on the chloroplast *rps4-trnS* sequence data [J]. J Plant Res, 2006, 119: 589–598.
- [5] Xiang J Y(向建英), Cheng X(成晓), Wu S G(武素功). Chromosome numbers of 13 species in the genus *Dryopteris* (Dryopteridaceae) from Yunnan, China [J]. Acta Phytotax Sin(植物分类学报), 2006, 44: 304–319.(in Chinese)
- [6] Wang X H(王秀华). A study on the leaf comparative anatomy of Dryopteridaceae in Northeast of China [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2001, 21(2): 202–206.(in Chinese)
- [7] Wang Q X(王全喜), Shao W C(邵文成), Cao J G(曹建国), et al. Studies on the development of gametophyte of ferns from north-eastern China XI. Dryopteridaceae [J]. J Haerbin Norm Univ (Nat Sci)(哈尔滨师范大学学报:自然科学版), 1995, 11(4): 83–89.(in Chinese)
- [8] Zhang K M(张开梅), Shi L(石雷), Zhang X C(张宪春). Observation on the gametophyte development of *Dryopteris subtriangularis* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2005, 23(3): 276–279.(in Chinese)
- [9] Huang Q Y(黄庆阳), Xiao Z T(肖自添), Chang Y(常纓). The development of gametophytes of *Dryopteris fragrans* [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2006, 26: 266–269.(in Chinese).
- [10] Ding H S(丁恒山). The Official Cryptogam in China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1982: 197–198.(in Chinese)
- [11] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. Bot Rev, 1971, 37: 295–396.
- [12] Miller J H. Fern gametophytes as experimental material [J]. Bot Rev, 1968, 34: 361–370.
- [13] Xu Y(徐艳), Shi L(石雷), Liu Y(刘燕), et al. Studies on spore propagation of *Pteris cretica* ‘Albo-Lineata’ [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32: 658–662.(in Chinese)
- [14] Sheffield E, Douglas G E, Hearne S J. Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media [J]. Amer Fern J, 2001, 91(4): 179–186.
- [15] Zeng H Y(曾汉元), Ding B Y(丁炳扬). Studies on the gametophytes development in ferns [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2003, 23: 154–158.(in Chinese)

图版说明

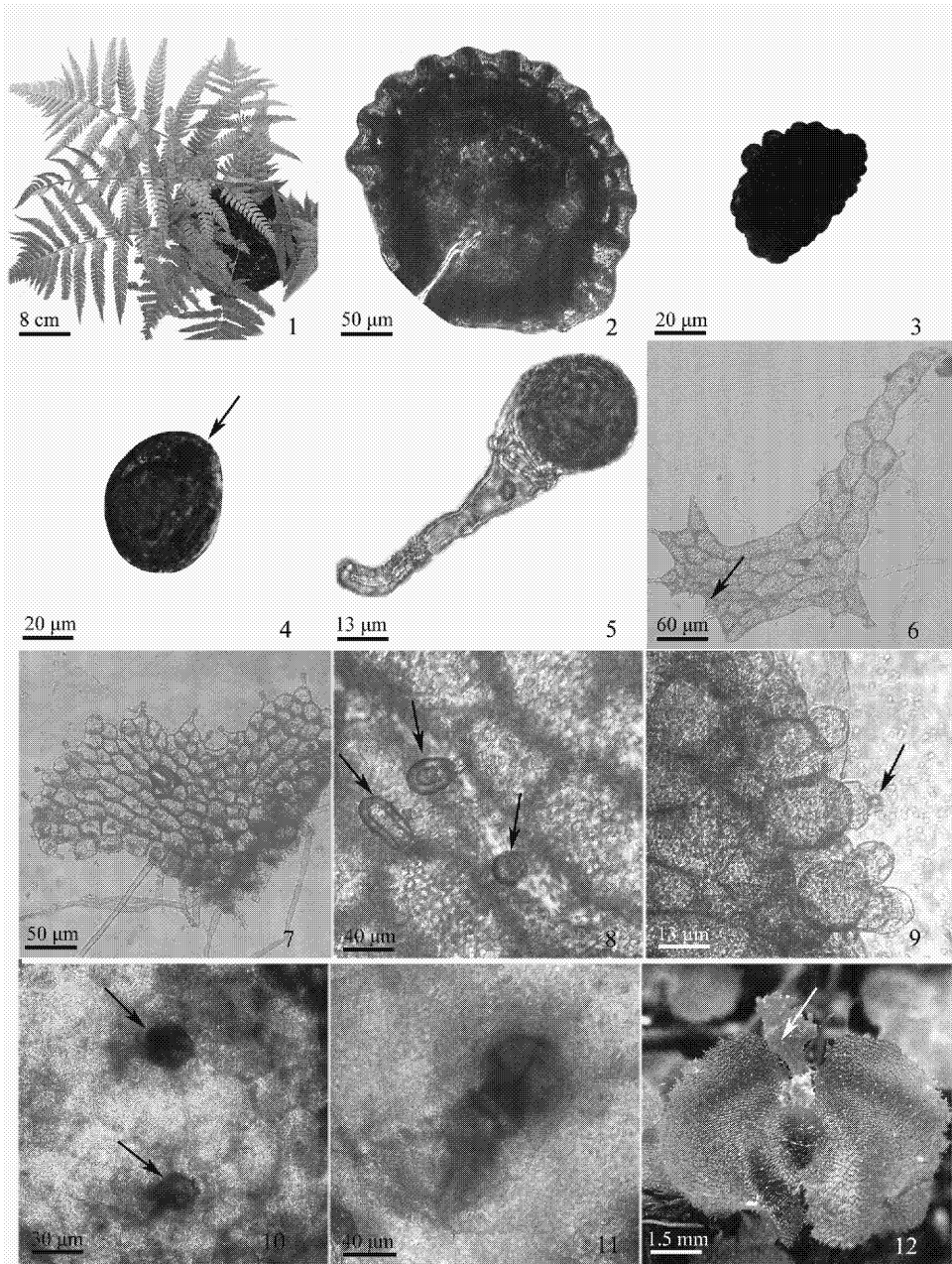
图版 I

1. 孢子体; 2. 孢子囊; 3. 孢子赤道面观; 4. 孢子极面观, 单裂缝(箭头示); 5. 丝状体; 6. 片状体, 顶端分生组织(箭头示); 7. 原叶体; 8. 原叶体表面的毛状体(箭头示); 9. 精子器群, 精子溢出(箭头示); 10. 受精后的颈卵器顶面观(箭头示); 11. 受精后的颈卵器侧面观; 12. 幼孢子体从配子体上长出(箭头示)。

Explanation of plate

Plate I

1. Sporophyte; 2. Sporangium; 3. Spore in equatorial view; 4. Spore in polar view, monolet (arrow); 5. Filament; 6. Prothallial plate, apical meristem (arrow); 7. Prothallus; 8. Trichomes at the surface of prothallus (arrows); 9. Group of antheridia, the sperm overflowed (arrow); 10. The apical view of fertilized archegonia (arrows); 11. The lateral view of fertilized archegonium; 12. Young sporophyte generated from the gametophyte (arrow).



欧阳婵娟等:图版 I

OUYANG Chan-juan et al.: Plate I