

狭眼凤尾蕨的形态发生及组织培养

李 静¹ 夏桂春² 龚 慧¹ 曾宪锋^{3*}

1 华南农业大学生命科学学院 广州 510642

2 张家界市永定区农业局粮油站 湖南 张家界 427000

3 韩山师范学院生物系 广东 潮州 521041

摘 要 以大量元素减半的 MS (1/2 MS)+200 mg/L NaH₂PO₄ 为基本培养基, 对狭眼凤尾蕨孢子进行无菌培养。研究发现, 狭眼凤尾蕨形态发生过程可分为 8 个具有显著形态特征的阶段, 即孢子萌发、丝状体、片状体、幼原叶体、原叶体、性器官形成期、合子和胚形成期。进行组织培养的结果表明, 1.0 mg/L 的 BA 浓度最适合原叶体的生长发育, 0.5~1.0 mg/L 的 2,4-D 对诱导原叶体脱分化为愈伤组织最有利, 而高于 0.3 mg/L 的 NAA 浓度对原叶体的发育起抑制作用; 基本培养基中 30 g/L 的蔗糖较适合配子体的发育; 而 15 g/L 的蔗糖最适合愈伤组织的诱导和继代; 孢子体的发育无需任何外源激素的诱导。

关键词 狭眼凤尾蕨 形态发生 组织培养 快速繁殖

中图分类号 Q949.365

蕨类植物以它奇特的株形、飘逸的叶姿快速进入花卉市场, 赢得了消费者的喜爱^[1]。当前, 观赏蕨类已成为国际花卉业的一个新热点。我国的蕨类资源十分丰富, 约有 2 600 多种。开展观赏蕨的快繁研究, 将有效缓解国内国际对观赏蕨类植物的需求, 并为实现工厂化育苗提供技术依据。一般蕨类多以营养繁殖为主, 但是, 传统方法具有一些无法克服的缺点, 如繁殖系数低, 容易受到各种自然环境的影响、周期长、占地广、容易受病虫害侵扰和运输困难等。而采用组织培养的方法具有繁殖系数大, 所需原材料少等优点, 是快速繁育种苗的有效途径^[2,3]。狭眼凤尾蕨(*Pteris biaurita* L.) 属凤尾蕨科, 其叶形幽雅, 株形美观, 极适于室内盆栽观叶, 也可切叶插花, 或配置山石盆景、园林造景, 具有很高的观赏价值。此外, 狭眼凤尾蕨的全草与根茎还可入药^[4]。但是, 目前对其繁殖过程还缺乏了解, 限制了狭眼凤尾蕨资源的开发利用。近年来, 国内外学者曾做过凤尾蕨属的一些种的配子体发育、精子器与颈卵器的显微结构以及幼孢子体发育的研究^[5], 但尚未见狭眼凤尾蕨配子体发育的细胞学观察方面的报道。本文对狭眼凤尾蕨组织培养和孢子体发育过程进行了研究, 以期探索狭眼凤尾蕨的生长发育和建立初步的组织培养体系等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为采自广东潮州凤凰山的狭眼凤尾蕨(*Pteris biaurita* L.)。

1.2 孢子的收集、消毒和萌发

取狭眼凤尾蕨背面有褐色的孢子囊群的成熟叶片, 用报纸包裹, 置于 37 °C 烘箱干燥处理 3 h, 取出后打开报纸, 抖动叶片使孢子自然脱落。用 1.5 mL 离心管收集孢子, 70% 酒精浸泡 30 s, 2% NaClO 处理 15 min, 无菌水漂洗 4 次。每次更换液体时用 5 000 r/min 离心 30 s, 弃上清液。经灭菌和漂洗后, 加少量无菌水悬浮孢子, 用涂布棒将悬浮液均匀涂布于基本培养基上: 1/2 MS(大量元素减半)+NaH₂PO₄ (200 mg/L, pH5.6), 促使孢子体萌发。

李 静 女, 1973 年生, 实验师。研究方向: 植物细胞工程。E-mail: lijing@scau.edu.cn。

* 通讯作者 曾宪锋, E-mail: zengxianfeng0325@163.com。

收稿日期: 2008-01-07 修回日期: 2008-06-26

1.3 原叶体的增殖

为探讨激素对原叶体增殖的影响, 在基本培养基的基础上, 设计不同的 BA 和 NAA 浓度, 配制原叶体增殖培养基。在 NAA 0.3 mg/L 的基础上设计了 6 种 BA 浓度, 分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0 及 3.0 mg/L, 培养基编号为 AB1、AB2、AB3、AB4、AB5 及 AB6; 在 BA 1.0 mg/L 的基础上设计了 4 种 NAA 浓度, 分别为 0、0.3、0.75 及 1.5 mg/L, 培养基编号为 AN1、AN2、AN3 和 AN4。以萌发 15 d 的呈绿色的孢子为材料, 每瓶接种 8~9 团, 每处理 6 个重复; 30 d 继代 1 次, 60 d 后统计重量(每瓶原叶体总重量/接种团数)。得到的原叶体作为细胞学观察和后续组培实验的无菌材料来源。

1.4 愈伤组织的诱导和分化

在基本培养基的基础上, 设计不同的 2,4-D 和蔗糖浓度, 分别配制愈伤组织诱导和分化培养基。2,4-D 浓度为 0、0.5、1.0 及 2.0 mg/L, 培养基编号为 AD1、AD2、AD3 和 AD4; 蔗糖浓度为 5、15、30 及 45 mg/L, 培养基编号为 AS1、AS2、AS3 和 AS4。将培养 15 d 的原叶体接种到愈伤组织诱导增殖培养基上, 约 3 周继代 1 次。选取鲜黄色愈伤组织接种于分化培养基上, 10 d 后可见孢子体小叶片产生, 再转入生根培养。

1.5 孢子体的分化

以萌发 15 d 的原叶体为外植体进行孢子体的分化, 在基本培养基基础上, 设计不同的蔗糖浓度, 分别为 5、15、30 及 45 g/L, 不添加任何激素, 培养基编号为 MS1、MS2、MS3 和 MS4。

1.6 配子体发育的细胞学观察

孢子萌发后, 从培养瓶中取出各不同发育时期的配子体, 在解剖镜下进行观察, 记录配子体各发育阶段的特点, 并拍照。

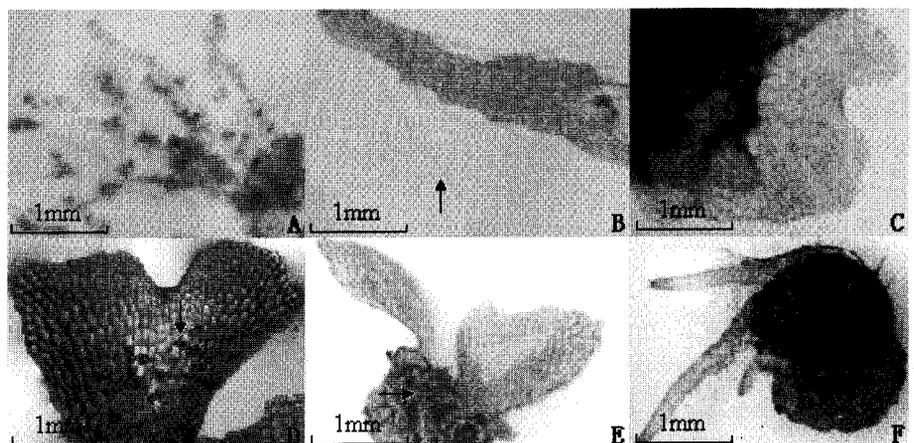
2 结果与分析

2.1 配子体发育的细胞学观察

无菌培养 7 d 后, 孢子吸胀变绿, 萌发后的孢子分裂形成 2~5 个细胞的丝状体(图 1-A), 颜色呈鲜绿色。丝状体继续发育为有 3~5 列细胞的片状体(图 1-B)。片状体中央的分生组织(一列小型长细胞)随后进行不对称分裂, 形成幼原叶体(图 1-C)。幼原叶体逐渐发育为对称的心脏型, 即为成熟原叶体(图 1-D)。原叶体中部有突起的绿色团块, 若干精子器和颈卵器混生其中。原叶体上可见晶亮如水珠状的结构(图 1-D 箭头所示), 可作为精子器成熟的标志。颈卵器受精后由无色逐渐变为褐色(图 1-E 箭头所示), 可作为判断受精与否的标志^[9]。受精后幼胚(孢子体)开始发育, 长出无卷曲的幼叶及带有根毛的真根, 原叶体心型叶片逐渐萎缩直至消失(图 1-F)。此外, 在孢子萌发、丝状体及原叶体阶段都观察到假根(图 1-B 箭头所示)。假根粗细均匀, 孢子萌发时只有 1~2 条, 随着配子体的发育而变长、变多, 成熟原叶体基部假根的数量可达上百条。

2.2 组织培养条件的优化

2.2.1 BA 对原叶体发育的



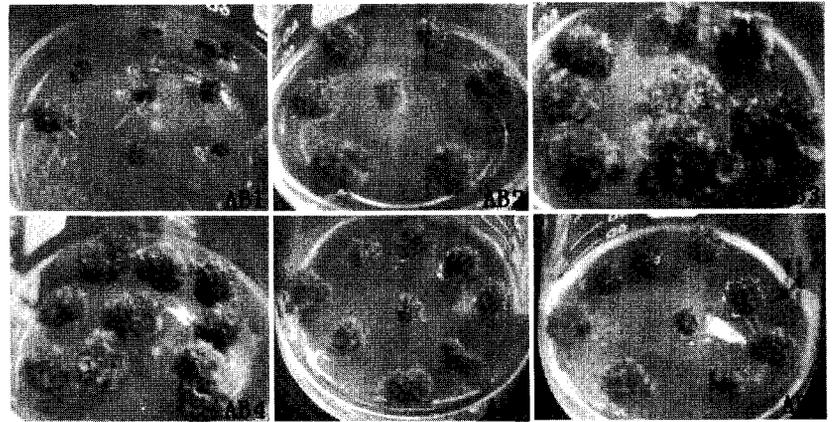
A: 丝状体; B: 片状体及假根; C: 幼原叶体; D: 原叶体及精子器;
E: 受精后变褐的颈卵器; F: 幼胚在原叶体上发育

图 1 配子体发育过程

影响 BA 的主要作用是促进芽的形成, 在组织培养中经常配合生长素 NAA 共同使用。本研究在 NAA 0.3 mg/L 的基础上, 设计了不同 BA 浓度。结果显示(图 2, 图 3), 浓度为 0.5~2.0 mg/L 时较适合原叶体生长, 其中以 1.0 mg/L 的效果最好, 得到的原叶体较大, 平均重量最重, 颜色呈鲜绿色, 并能一直维持在配子体世代。在 0~0.1 mg/L 浓度范围内, 原叶体分化出少量的孢子体根和叶片, 当 BA 浓度达到 3.0 mg/L 时, 原叶体团长势明显下降, 颜色变黄。

这说明低浓度的 BA 能促进孢子体发育, 高浓度的 BA 同时抑制配子体和孢子体的产生。只有 BA 浓度适中时, 才能促进配子体的生长。

2.2.2 NAA 对原叶体发育的影响 NAA 的主要作用是加速细胞分裂和伸长, 并促进植物生长发育, 在组织培养中常配合 BA 使用。本研究在 BA 1.0 mg/L 的基础上设计了 4 种 NAA 浓度。结果显示(图 4, 图 5), 随着 NAA 浓度的升高, 原叶体的长势变弱, 停留在丝状体和片状体阶段, 难以发育成熟。当 NAA 达到 1.5 mg/L 的时候, 原叶体出现玻璃化。这说明高浓度的 NAA 对原叶体的增殖有抑制作用。对比 BA 处理组, 添加了 NAA 后原叶体的生长速率明显降低, 且叶片细小, 颜色较浅。进一步的研究发现, 将 4 种不同 NAA 浓度下产生的原叶体继续接种到基本培养基中诱导孢子体, NAA 浓度越高, 孢子体出现得越晚且数量越少, AN4 中的原叶体甚至不生成孢子体。这说明, 高浓度的 NAA 对原叶体的生长有抑制作用, NAA 浓度小于 0.3 mg/L 最适合原叶体生



AB1: 生长缓慢, 有少量根及孢子体; AB2: 生长稍快, 有少量根及孢子体; AB3: 生长快, 原叶体松散; AB4: 生长迅速, 原叶体致密, 颜色鲜绿; AB5: 生长较慢, 原叶体较小, 变黄; AB6: 原叶体生长受抑制。

图 2 BA 对原叶体发育的影响

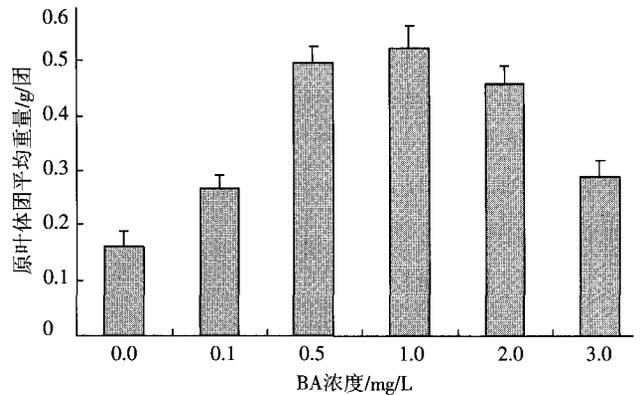


图 3 不同 BA 浓度培养 60 d 后原叶体团平均重量

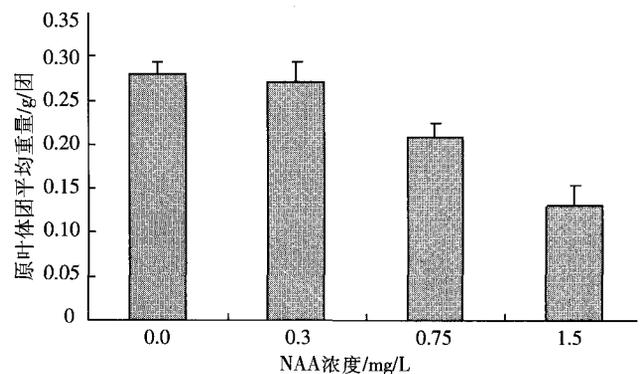


图 5 不同 NAA 浓度培养 60 d 后原叶体团平均重量

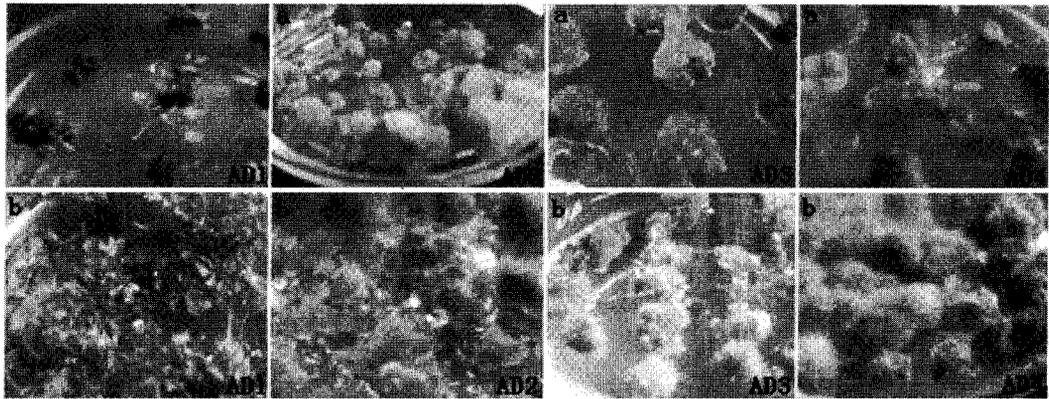


AN1: 生长快, 原叶体叶片较大, 颜色鲜绿; AN2: 生长较快, 原叶体叶片稍小; AN3: 生长变慢, 原叶体叶片小, 基部有玻璃化现象; AN4: 生长受抑制, 叶片细小, 玻璃化现象严重。

图 4 NAA 对原叶体发育的影响

长，原叶体呈颜色鲜绿，生长迅速，重量最重。

2.2.3 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响 蕨类植物对 2,4-D 较敏感。本研究中，几种 2,4-D 浓度下，接种后 7 d 都出现愈伤组织，15 d 左右生长最旺盛，其中以 AD2 和 AD3 的愈伤组织生长状态最好，呈黄绿色，较干爽，增殖速度快。随着时间的推移愈伤组织的质量开始下降，出现长毛、变褐及玻璃化的现象，且 2,4-D 浓度越高，褐化越明显(图 6)。约 45 d 时，愈伤组织均开始脱分化产生孢子体幼叶，但长势较差。以上结果说明，0.5~2.0 mg/L 的 2,4-D 都能成功诱导出愈伤组织，其中以 1.0 mg/L 培养 15 d 为最佳。



a. 15 d 时的愈伤组织状态, b. 30 d 时的愈伤组织状态

图 6 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

2.2.4 蔗糖对愈伤组织诱导的影响 蔗糖为外植体提供碳源，影响渗透压，对愈伤组织的分化具有调节的作用。本研究在 2,4-D 为 0.75 mg/L 的基础上设计了 4 种蔗糖浓度。结果显示(图 7)，蔗糖为 15 g/L (AS2)时，愈伤组织的生长最旺盛。值得注意的是，继续提高蔗糖浓度，虽然愈伤组织长势变弱，但结构变得致密、干爽，有利于将来愈伤组织分化成孢子体。



图 7 蔗糖对愈伤组织的影响

2.2.5 蔗糖对孢子体分化的影响 为了研究蔗糖对孢子体分化的影响，设计了不同的蔗糖浓度。结果表明(图 8)，在 5~30 g/L 的浓度范围内，均有分化出幼叶和根的孢子体出现，孢子体的发育状况和生长速度没有明显的区别。由此推断，孢子体的发育对蔗糖的敏感程度不高。而在 MS4 中，孢子体的分化较迟及体积较小，其原因可能是由于培养基中因渗透压过高而抑制了孢子体产生。

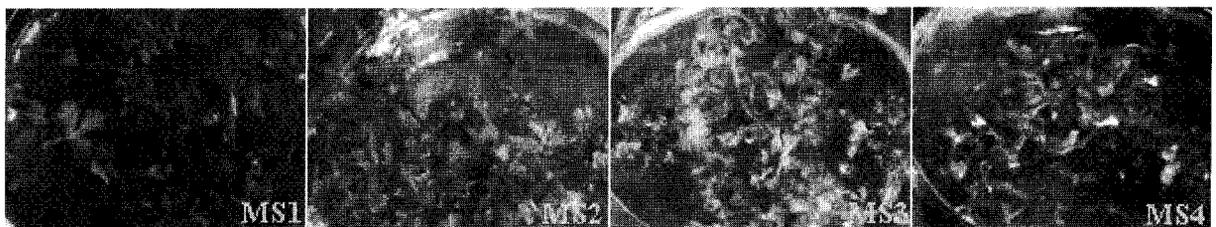


图 8 蔗糖浓度对孢子体分化的影响

3 讨论

目前,国内外还没有关于狭眼凤尾蕨形态发生过程的观察报道。本研究通过无菌培养的方式,促使孢子萌发发育完成整个世代周期。在培养过程中笔者观察到了8个具有显著形态特征差别的发育阶段,即孢子萌发、丝状体、片状体、原叶体、性器官、合子、胚,这与张开梅等^[9]对其他蕨类的描述相似。

利用孢子体上的根状茎茎尖、嫩叶等作外植体进行组培有成苗速度快等优点。但由于蕨类植物带有大量的内生菌,以野外生长的植株孢子体进行组织培养时,消毒非常困难,笔者曾尝试采用提高次氯酸钠和升汞的浓度、延长消毒时间及在培养基中添加抗生素等方法,但都没有收到理想的效果,故而采用孢子作为外植体消毒,获得了较高成功率。以孢子为外植体进行快繁是狭眼凤尾蕨组织培养的有效方法。

在基本培养基的选用上, Kwa 等^[7]认为凤尾蕨的配子体在 1/2 MS 上只能增殖,只有转移到 1/10MS 上才能诱导分化形成孢子体。而本研究采用 1/2 MS,同样能够得到孢子体,与前人的研究结果有所不同,这可能是狭眼凤尾蕨对于大量元素不敏感造成的。

在激素的使用方面,试验结果表明,BA 在狭眼凤尾蕨的组织培养中起着重要的作用,可以促进原叶体的形成和增殖。相反,高浓度的 NAA 对原叶体的生长有抑制作用。两种激素的最佳组合是 BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L。2,4-D 可使原叶体脱分化为愈伤组织,其中 0.75 mg/L 的浓度最适合。本研究还发现原叶体在没有添加外源激素的情况下能够顺利分化出孢子体,与 Teng^[8]的报道相同。

蕨类植物的组培中,一般采用蔗糖为糖源。本研究发现,愈伤组织能够在低浓度蔗糖的条件下迅速生长,且细胞大,含水量多,同时会在短时间内衰老,而随着蔗糖浓度升高,虽然愈伤组织生成速度减慢,但愈伤组织较干爽,细胞大小适中,适宜继代和分化。蔗糖的另一个作用是对世代转换起重要调控作用^[9]。本试验发现 5~30 g/L 的蔗糖对孢子体的发育无明显影响,当蔗糖浓度达到 45 g/L 时孢子体长势开始变差,这与 Hirsch^[10]提出的“高浓度蔗糖能促进原叶体直接向孢子体分化,原因是由于高浓度糖有促进衰老的作用”基本相符。因此,15 g/L 的蔗糖浓度较适合狭眼凤尾蕨的孢子体诱导及生长。

总的说来,对于应用激素、糖源等因素调控蕨类植物世代转换的大部分研究还处于探索阶段,具体机理还需深入的研究^[10]。目前,由于有关狭眼凤尾蕨的快繁技术的研究未见报道,本研究通过选择不同激素和蔗糖的培养基探讨其适合的培养条件,对这一观赏蕨类植物的推广具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 王宏航,李朝森,刘慧琴. 观赏蕨类植物组培快繁及其移栽技术[J]. 江西农业学报, 2006, 18(5): 125~126
- 2 韩 敬,赵 莉. 蕨类植物繁殖研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(7): 1261~1263
- 3 董 丽,苏雪痕. 荚果蕨 *Matteuccia struthiopteris* Todaro 孢子繁殖的研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 274~278
- 4 曾宋君,邢福武. 观赏蕨类[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002. 256
- 5 张开梅,石 雷,李 东. 乌毛蕨配子体发育的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(5): 419~422
- 6 曾汉元,丁炳扬. 蕨类植物配子体发育研究[J]. 植物研究, 2003, 23(2): 154~158
- 7 Kwa S H, Wee Y C, Lim T M, et al. IAA induced apogamy in *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv. Gametophytes cultured in vitro[J]. Plant Cell Reports, 1995, 14: 598~602
- 8 Teng W T. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platyserium bifurcarum*[J]. Plant Cell Reports, 1997, 17: 777~783
- 9 蒋盛军,宋希强,王胜培,等. 蕨类植物组织培养研究进展[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 651~656
- 10 Hirsch A M. The effects of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or Sporophytes[J]. Plant Physiol, 1975, 56: 390~393

Morphogenesis and Tissue Culture in *Pteris biaurita* L.

Li Jing¹ Xia Guichun² Gong Hui¹ Zeng Xianfeng³

1 College of Life and Science, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642

2 Yongding District Grain and Oil Station, Zhangjiajie, Hunan 42700

3 Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041

Abstract *Pteris biaurita* spores were cultured *in vitro* on 1/2 MS medium with 200 mg/L NaH₂PO₄. Eight distinct morphological stages were observed during the culture: spore germination, filament, prothallial plates, young prothalli, prothalli, sexual organ, zygote, and young sporophyte. In cultures of germinated spores as explants it was found that the development of prothalli was enhanced when 1.0 mg/L BA and 1.5% sucrose were applied in the medium, while NAA at concentrations higher than 0.3 mg/L had inhibitory effects. Calli could be induced readily from prothalli on the medium with 0.5~1.0 mg/L 2,4-D, and the medium added with 3.0% sucrose was suitable for the development of zygotes, while the medium with 15g/L was optimum for inducing and subculture of these calli. Moreover, the young sporophytes could grow well on the medium without any exogenous hormones.

Key words *Pteris biaurita* L. morphogenesis tissue culture micro-propagation