

桫欏的快速繁殖与种质保存技术的研究*

程治英 张风雷 兰芹英 许再富 陶国达

(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊666303)

摘要 运用组织培养技术, 通过孢子繁殖、无性无融合生殖和愈伤组织分化不定芽等方式得到桫欏 (*Alsophila spinulosa*) 幼苗。成熟的新鲜的桫欏孢子有近1年的休眠期。用50ppmGA处理孢子2—5分钟, 是打破孢子休眠的较好措施。新鲜孢子在室温下寿命约8天, 在10℃下贮存, 孢子寿命达1年以上; 而经适当干燥处理后于10℃下贮存的孢子, 寿命达450天。在实验室内, 控制培养条件可保存桫欏的丝状体、原叶体和孢子体。这对于不适宜低温贮藏的热带植物的保存是一种经济、有效的方法。

关键词 桫欏; 组织培养; 繁殖途径; 种质保存

STUDY ON THE PROPAGATION AND CONSERVATION OF GERMPLASM IN ALSOPHILA SPINULOSA

CHEN Zhi-Ying, ZHANG Feng-Lei, LAN Qing-Ying,
XU Zai-Fu, TAO Guo-Da

(Xishuangbanna Tropical Botany Garden, Academia Sinica, Mengla Yunnan 666303)

Abstract Sporophytes of *Alsophila spinulosa* were obtained from spore propagation agamospory and adventitious bud produced from callus by tissue culture. The morphology of prothallus is plastic. In the tissue culture, the prothallus had three forms: normal long cordate prothallium, abnormal ligulate prothallium and cylindrical prothallium, and then they could produce normal plant. When BM was a improved MS, the spore germination, filamentous growth and transition from one to two-dimensional growth, prothallium development and sporophyte differentiation etc. were influenced by sugar concentration, inorganic salts concentration, composition and proportion of hormone. The sugar concentration by 0—1 per cent is suited for spore germination, but it helps differentiated sporophyte by 3—5 per cent. The days of differentiation sporophyte are

shortening (from 96 to 48 days) and the frequency of differentiation plantlet is raising (from 25.8 to 46.2%) along with the reduction of inorganic salts concentration (from 1/5 to 1/10). The sporophyte is getting better induced as improved MS+KT 1mg/l+2,4-D 0.4mg/l. Adult and fresh spores of *A. spinulosa* had a dormant period for one year. The dormancy was broken, when the spores were submerged in solution containing 50 ppm GA for 2—5 minutes. In a room ($24 \pm 5^\circ\text{C}$), the viability of spore had only 7—8 days; in cold storage condition (10°C), the life span of spore would continue over a year; in the condition of under lower (10°C) and suitable desiccation, the life of spore would attain about 450 days.

Filamentous prothallus and sporophytes of *A. spinulosa* can be stored in the laboratory ($24 \pm 5^\circ\text{C}$) with controled culture condition by tissue culture. Large numbers of tropical plant can not survive for long term in low temperature so the tissue culture method is possible to conserve tropical germplasm in room temperature. It is also economic and applicable to wide range of species.

Key words *Alsophila spinulosa*; Tissue culture; Way of propagation; Conservation of germplasm

桫欏 (*Alsophila spinulosa* (Hook.) Tryon) 是起源古老的一群蕨类植物的孑遗种之一。桫欏正常的生活史包括两个独立自养的相互交替的世代——孢子体世代 ($2n$) 和配子体世代 (n)。由于它们的结构独特, 要求生境严格, 种群小, 所以被列为珍稀濒危种。毕世荣等^[1]曾报道桫欏幼叶组织培养分化孢子体。本文探讨繁殖桫欏的其它途径, 以及在实验室保存这一热带、亚热带种质的可能性。这方面的工作在国内外尚未见报道。

材 料 与 方 法

供试样品桫欏的孢子采自1987年11月初, 勐海海拔1700m森林。孢子贮藏分: 室温 ($24 \pm 5^\circ\text{C}$); 低温 (10°C); 干燥冷藏 (孢子与5份于孢子体积的干燥剂混合, 10°C)。

孢子培养前的处理: 新鲜的能育叶在灯光下照射2小时, 然后收集孢子囊和孢子, 在黑暗中吸胀23—48小时, 再用不同剂量的GA处理孢子30秒—48小时, 以水处理作对照。

孢子培养: 基本培养基为1—1/20改良的MS培养基, 用琼脂固化或用滤纸桥的液体培养基。一组试验连续暗培养, 其余光下培养, 每日光照10小时, 光强为2000lx。孢子萌发和丝状体的生长与转变附加2, 4-D 0.5—4 mg/l (单位下同)。孢子体分化附加植物激素有KT、BA与2, 4-D、IBA、IAA和NAA等的组合, 使用剂量为0.2—2。培养室温度为 $24 \pm 5^\circ\text{C}$ 。糖种类有葡萄糖、蔗糖和食用白糖等, 糖浓度为0—10%。每处理接4—10瓶, 接种孢子密度为30个/ mm^2 。孢子萌发率是在规定的培养时期内, 统计萌发孢子数占接种孢子总数的百分率。孢子萌发时间为从接种到孢子萌发的间隔时间。每处理观察群

体数在3000个孢子以上。孢子生活力的测定采用分期播种的方法。

试 验 结 果

1. 桫欏的繁殖技术

(1) 孢子繁殖 桫欏的孢子呈圆锥三角形,在光学显微镜下可见孢子外壁的纹饰。培养几天后,孢子壁颜色变暗,孢子吸水后膨胀,使孢子内壁扩展,培养8天左右有的孢子外壁在近极面裂开。在含2,4-D的培养基上两个月,孢子核明显变大呈球形占据孢子的中央(图版I:1),不久经过第一次有丝分裂,形成两枚不均等的子细胞,大的一个发育为丝状体的基本细胞——绿细胞,小的发育为假根,孢子壁呈“帽状”退到细胞基部(图版I:2),这标志孢子萌发。经过15天,绿细胞分裂3—4次,形成4或5个细胞的丝状体。丝状体伸长的方向平行于培养基,与假根呈90—120°角度。这时丝状体开始改变分裂方向(图版I:7),形成中间一个为楔形的3个姊妹细胞,中间的细胞又充当分生细胞。又经过8天左右,经多次平行和垂直极轴的分裂,形成一个细胞厚的各种过渡形状的原叶体,如匙形、梨形等平面体(图版I:8,9),最后长成较长而窄的心形原叶体(图版I:10)。原叶体能行自养,成熟时的原叶体中肋加厚,有背腹面之分。颈卵器(图版I:11)位于腹面中肋近心形凹口处,它包含基部一个大形卵、一个腹沟细胞和约5个细胞的一列颈沟细胞。在腹面中肋下部,密生假根,精子器(图版I:12)分布其中,它是多细胞的球形结构,内含大量精子。借助原叶体腹部的自由水,精子能游动到达颈卵器,并进入其内与卵结合发育成胚。随后原叶体变褐。1个原叶体上大约可长1—5苗。

孢子萌发和发育受以下因素影响:(1)前处理(表1):GA50ppm乙醇溶液处理孢子2—5分钟促进孢子萌发效果显著。用水处理的孢子未萌发,这表明桫欏成熟孢子离开叶片后,具有休眠的特性,休眠期近一年,GA处理能部分打破孢子休眠。(2)播种孢子的密度为5000个/cm²以上时,仅表面和边缘部分的孢子萌发,下层孢子为褐色未萌发。在这种密度下萌发的孢子,丝状体的绿细胞的数目达10个以上,也不转变为平面生长。但稀播时(2—13个/cm²孢子),孢子近一年也不萌发。播种密度为3000个/cm²较合适。(3)培养基的物理状况:琼脂固化程度高时(0.7%),培养了五个月的孢子未萌发。当培养基能随三角瓶倾斜而移动时(0.5%),培养的孢子约经过3个月萌发。液体培养基上孢子培养了近一年不萌发。(4)培养基无机盐浓度高时(1—1/2改良MS),孢子不萌发;1/5盐浓度的培养基上的孢子283天萌发;1/10盐浓度的培养基上孢子89天萌发;1/20盐浓度时孢子99天萌发。以上结果表明无机盐浓度是制约孢子萌发的关键因素。(5)培养基中附加植物激素的种类和组合,在含2,4-D 2的培养基上的孢子68天萌发,萌发率58.3%,绿细胞大小为82.8×52.5μm;2,4-D浓度增加到4时,孢子70天才萌发53.3%,绿细胞较小为58.6×49.5μm;在2,4-D+KT的培养基上,孢子82天才萌发44.3%,绿细胞增大为93.9×62.6μm。结果表明;2,4-D剂量由2增加到4,对孢子萌发影响不大,但限制细胞体积的增大。KT与2,4-D组合使用,稍抑制孢子萌发,但促使细胞体积增大。(6)随着糖浓度的降低(由2%→0),孢子萌发所

需时间缩短,萌发率增高。如糖浓度为2%时,孢子82天萌发27%;糖浓度为1%时,孢子65天萌发60%;无糖培养基上的孢子63天萌发98%。当糖浓度为2%时,葡萄糖效果最好,蔗糖其次,食用白糖较差。孢子萌发需要的天数分别是82天、100天和113天。

(7) 连续暗培养孢子不萌发。

表1 前处理对孢子萌发和发育的影响

Table 1 Effect of pretreatment on germination and development of spore

前 处 理	萌发时间 (天)	萌发率 (%)	配 子 体 种 类
GA100ppm水溶液30小时	240	40	2—5细胞的丝状体(水渍状)
GA10ppm水溶液30小时	81	50	1—2细胞的丝状体
GA100ppm水溶液23小时	98	95	2—4列细胞的原叶体
水 30小时	0	0	孢 子
GA50ppm乙醇液5分钟	64	100	2—3列细胞的原叶体
GA50ppm乙醇液2分钟	58	100	2—3列细胞的原叶体
GA50ppm乙醇液0.5分钟	330	50	2—3列细胞的原叶体

丝状体的生长和分裂平面的转变在适合孢子萌发的条件下能正常进行。

幼孢子体的分化受无机盐浓度、糖浓度和附加的植物激素成分与量的影响(表2, 3)。一般随着盐浓度的降低形成幼孢子体苗的时间缩短。1/10盐浓度较适合苗的分化。1/20盐浓度下原叶体分化的苗瘦弱、矮小、叶色黄绿甚至苍白,这可能是氮等营养缺乏造成的。糖浓度以2—5%较适宜。高浓度糖(10%)影响分化苗的发育,往往它的全部羽叶呈拳卷状(图版I: 14)。补加KT 1+2, 4-D 0.4有利苗的形成。不加激素的1/5盐浓度的培养基有利苗的生长,平均每月增加0.4—1 cm。当苗高4 cm左右、5片叶以上、根系发达时,经0.1%多菌灵消毒10分钟后,植于碎砖、生土和珍珠岩混合的基质上,放在90%荫蔽度下,保持空气湿度90%,幼苗能成活。幼苗栽培管理中发现空气中有DDV的气味,能使桫欏幼苗死亡。

(2) 无配子生殖(apogamy) 在组织培养中,无配子生殖现象较普遍。在不适宜的培养条件下,原叶体发育延迟,有时长成大小为 $1.8 \times 1.6 \text{ cm}^2$ 的加厚的原叶体(正常原叶体约 $0.3 \times 0.5 \text{ cm}^2$)。在它的中肋、基部和两翅的边缘能长出单一的(图版I: 3)或丛状的再生原叶体(20个以上),大小为 $1—2 \text{ mm}^2$ 。将小原叶体切割下来培养,约60天长出不定胚,又经过约30天培养得到正常的无性孢子体苗或丛苗。当培养基中细胞分裂素与生长素为1:2时,原叶体异常发育形成较厚、两面被毛的舌状原叶体,或在正常原叶体的基部等位置产生大小为 $1—3 \times 10 \text{ mm}^2$ 以上的圆柱状原叶体或圆柱状原叶体丛(图版I: 4, 8)。它们约经过3个月的培养,在不切割的情况下,在圆柱状原叶体基部或顶部均能产生单一的或丛状的不定胚,继而分化出苗和苗丛。

(3) 无孢子生殖(apospory) 在组织培养中,观察到少量的芽原基的叶片能长出原叶体(图版I: 4)。如果将它转移到适宜的培养基上正常发育,有可能得到四倍体苗(将另文发表)。我们曾将桫欏试管苗的长约1 cm的展开羽叶以及切割的叶段培养均未成功。

表 2 无机盐浓度和植物激素对苗分化的影响

Table 2 Effect of inorganic salts and phytohormones on differentiation of bud

培养基(mg/l) ¹	分化苗的天数	接种总瓶数	分化苗的瓶数	分化率(%)
BM		40	0	0
1/2BM		40	0	0
1/5BM	164	74	16	21.6
1/5BM+KT1+2,4-D2	96	31	8	25.8
1/10BM	64	47	20	42.6
1/10BM+KT1+2,4-D2	48	39	18	46.2
1/10BM+KT1+2,4-D1	34	79	28	35.4
1/10BM+KT1+2,4-D0.4	30	49	32	66.7

表 3 糖浓度、糖种类对分化苗的影响

Table 3 Effect of concentration and kinds of sugar on differentiation of bud

糖浓度 (%)	糖种类	形成苗时间 (天)	每瓶苗数
0			1
1	蔗糖	163	3
2	蔗糖	112	8
2	葡萄糖	56	7
2	食用白糖	97	17
5	蔗糖	44	50
10	蔗糖	129	66

（4）愈伤组织的繁殖途径 原叶体培养在细胞分裂素与生长素为10：1的培养基上，形成长丝状体构成的空心的半圆形愈伤组织团，表面光滑、易碎且繁殖快，约经3个月能在绿色丝团上长出幼孢子体或仅长根。在高盐浓度的培养基上补加高剂量的生长素，培养的原叶体形成坚实致密的实心愈伤组织团块，不易切割开，表面粗糙不平，由褐色愈伤组织相间少量再生绿色原叶体，在愈伤组织的凹陷处产生单个或丛状黄绿色球形不定胚，进而发育为不定苗。这种愈伤组织一团最多形成66株苗以上。另外在BA与NAA为1：5的培养基上，培养的孢子体的羽状叶的小裂片的边缘，有规则的形成大小为0.5—1mm的圆形丝状体构成的愈伤组织，这种愈伤组织是否成苗有待观察。

值得指出的是：以上几种繁殖方式有时并不是截然分开的，而是同时存在两种以上的形式（图版Ⅱ：1，4，5）。在组织培养中产生无配子生殖、无孢子生殖等繁殖方式的原因，归纳如下：（1）培养基加入过量的琼脂，或pH值高引起培养基干燥，原叶体褐化并在基部长出圆柱状原叶体。（2）培养基无机盐浓度低（1/10—1/20），原叶体上长满褐色长毛状物，羽叶从毛丛中抽出。（3）培养基无机盐浓度高（1—1/2），易产生无配子生殖和愈伤组织团。（4）培养基中加入了不合适的植物激素，如BA与NAA和IAA的组合易产生愈伤组织。（5）培养基中加入了高浓度糖（10%）或用糊精代替糖时，再生原叶体呈重瓣菊花状堆积在一起。（6）继代中切割再生原叶体也能促使无

配子生殖等现象产生。不利的条件如培养基中加入BA、高糖、高生长素或低盐浓度等,虽能诱导无性繁殖、无融合生殖,但也容易导致培养的外殖体褐化、水渍状死亡。

胚和不定胚在原叶体或愈伤组织上,继续发育为肉眼可见的球形结构(芽原基),呈黄绿色(少数呈绿色),其上密布单列多细胞毛和多列细胞构成的鳞片,培养30天左右,在球形结构上抽出拳状叶,逐渐叶片伸展为羽状叶,同时它的基部长出1—3条褐色根,根尖白色长约2mm,根上有长约1mm的密毛。当不定苗含3片叶时,可将它与愈伤组织或原叶体分离,转接在1/5盐浓度的改良的MS上,有利试管苗的生长。由孢子培养到幼孢子体形成需要7—15个月;而无性方式得到的苗仅需要3—6个月,但苗长势弱。

2. 桫欏的种质保存

(1) 孢子的贮藏与寿命 新鲜的成熟的桫欏孢子含水量约40%,室温下以塑料袋封存带孢子的叶片,孢子寿命仅7、8天;快速从新鲜叶片上脱下孢子,并降低孢子含水量到28.7%,装入磨口瓶室温下存放,孢子寿命达33天;冷藏孢子的寿命达一年以上;干冷藏的孢子寿命达463天。各种方式贮藏孢子1个月后,做孢子萌发试验(重复三次),结果是带孢子的叶片冷藏对孢子萌发最有利,培养的孢子67天萌发,萌发率达100%。室藏、冷藏和干冷藏孢子萌发所需天数分别是262天、86天和72天。孢子萌发率分别是45%、60%和76.7%。

(2) 配子体的保存和增殖 配子体包括丝状体和原叶体,在实验室常温条件下保存,可提供试验所需材料。采用方法如下:(1)加大孢子播种密度约为4000个/cm²,可得到以丝状体为主和各种过渡形态的幼原叶体。(2)选用高盐培养基或高盐培养基补加2,4-D 1—4,糖浓度为0—1%。(3)附加细胞分裂素和生长素的比为10:1。(4)只用MS培养基的微量元素制作培养基。采用以上方法,能保存这类材料9—16个月不继代也不会死亡。当需要启用这类材料作试验时,采用1—1/2改良的MS+BA2+IAA0.2的培养基进行转接,月增殖率为1:2—5。

(3) 孢子体的保存 在低盐浓度的培养基上补加等量的细胞分裂素和生长素,能保存孢子体呈丛芽状半年以上不生长。一旦需要孢子苗,可将丛芽苗切为单苗转到低盐培养基上,加或不加植物激素均得到正常试管苗。

讨 论

采用组织培养技术,通过无配子生殖、无孢子生殖和愈伤组织获得不定芽等方式产生的不定芽、苗,从形态上看与有性过程产生的苗无大的差异,但这些方式产生苗的速度更快,产生苗的数量也大于有性过程数十倍。可以推测:无孢子生殖产生的原叶体,若能通过有性过程产生苗应为4n;无配子生殖有可能得到单倍体苗(n)。繁殖方式的不同导致染色体倍性差异,肯定会反映到形态、生理和遗传特性上,这有待今后深入研究加以利用。

桫欏作为蕨类植物较原始的成员,在分化特性上与被子植物存在明显区别。蕨类植物的孢子形态结构与大小,与被子植物的花粉相似,但花粉是植物细胞中生长最快的,

而桫欏孢子具有休眠的特性, 休眠解除后的萌发生长也不及花粉。在花粉培养中, 许多作者^[2-4]指出: 花粉的去分化启动(即花粉第一次对等分裂的出现), 只有糖是必须的; 而孢子的第一次有丝分裂在无糖培养基上有利。Sulklyan等^[5]指出: 糖是分化的关键化合物, 1%以下的糖有利于配子体形成, 高浓度糖只形成孢子体。我们的试验表明糖浓度只影响配子体和孢子体分化频率的高低和速度的快慢(表3)。如在2%—5%糖浓度的培养基上, 配子体仍能形成、增殖。另外, 我们试验中观察到无机盐浓度高低, 明显的影响孢子体分化(表2)。在1—1/2改良的MS培养基上, 外殖体培养半年以上也不分化孢子体, 一旦把盐浓度降低到1/5—1/20, 不到1个月出现了孢子体的分化。植物激素的种类和对比对桫欏组织培养的影响表现是: 单一的IAA、IBA和NAA(使用剂量为0.2—2), 以及它们分别与ZT组合使用, 都导致外殖体褐化、水渍死亡; 而在2, 4—D单独使用的情况下, 约3个月分化了孢子体, 只是这些苗的叶片不伸展, 色黄绿。在激动素与生长素组合上, 似乎要求较高的生长素剂量来满足分化的要求。

参 考 文 献

- 1 毕世荣, 苏成端, 徐正兰等. 植物生理学通讯 1985; (1): 35
- 2 Uchimiya Hirofumi, Toshio Murashige. *Plant Physiology* 1976; 57: 424—429
- 3 Nitsch J P. (译文). 单倍体育种资料集(一). 北京: 科学出版社, 1972; 64—87
- 4 朱自清, 孙敬三, 王敬驹. 植物学报 1978; 20: 6—12
- 5 Sulklyan D S, Mehra P N. *Phytomorphology* 1977; 27: 396—407

图 版 说 明

图版 I . 桫欏的个体发育

1. 正待第一次有丝分裂的孢子。×500 2. 孢子萌发。×2800 3—4. 具两个绿细胞的丝状体。×2800 5. 具3个绿细胞的丝状体。×1000 6. 化学物质处理引起顶细胞膨大。×2800 7. 丝状体分裂平面的改变。×1000 8. 匙状原叶体。×140 9. 梨状原叶体。×140 10. 成熟的长心形原叶体。×140 11. 颈卵器, ×800 12. 精子器, ×800 13. 完整试管苗。 14. BM含10%糖时, 孢子体羽叶呈拳卷状。 15. 丛芽。

图版 II . 桫欏的繁殖途径

1. 葫芦形丛状物。2. 愈伤组织和不定芽。3. 原叶体翅的边缘长原叶体。4. 原叶体上长孢子体芽, 芽上又长原叶体。5. 舌状原叶体上长原叶体和不定芽。6. 棒状原叶体基部长原叶体。7. 棒状原叶体顶部长原叶体。8. 棒状原叶体顶部长不定芽。

Explanation of Plates

Plate I. The ontogenetic process of *Alsophila spinulosa*

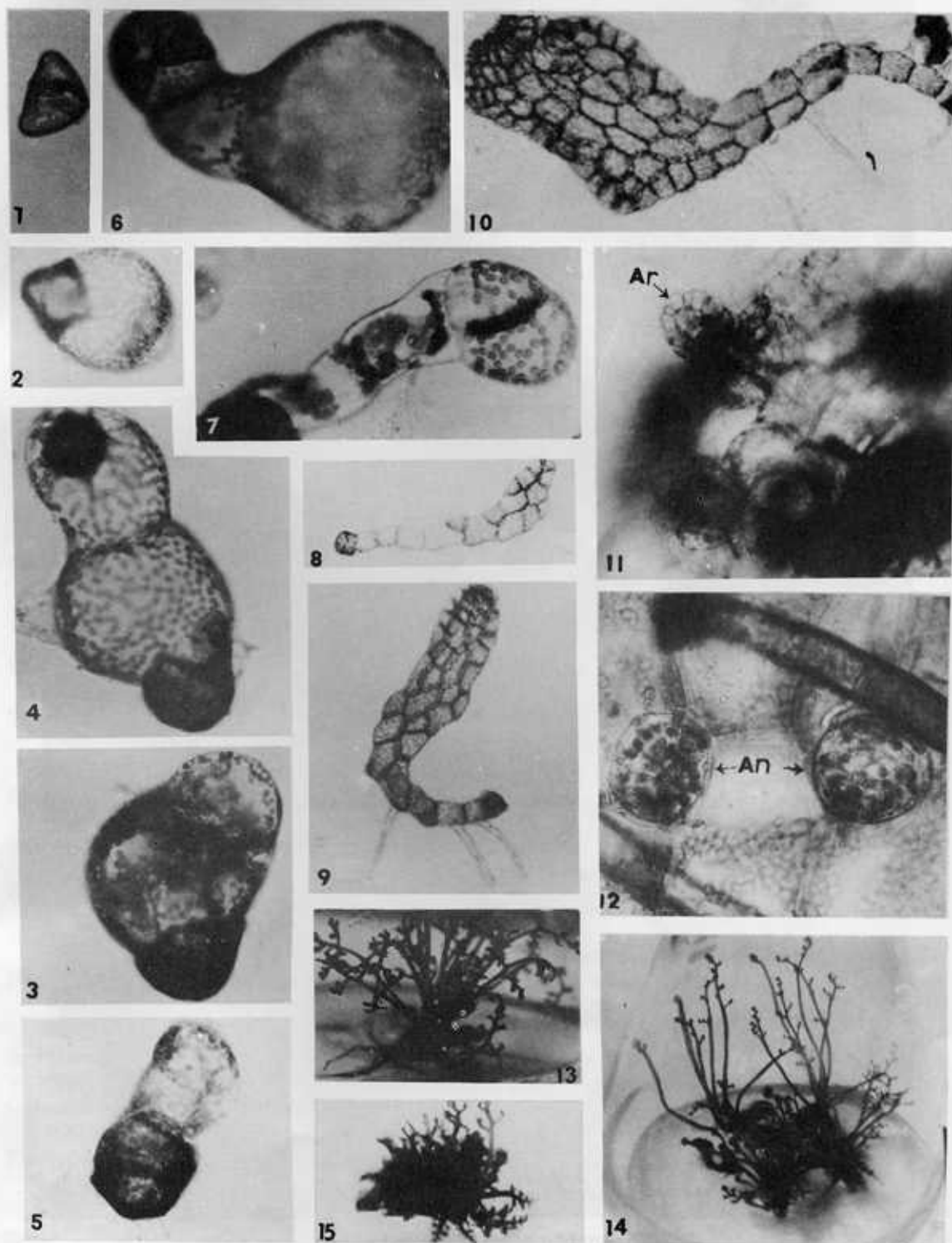
1. Spore (the nucleus is centrally situated). $\times 1000$ 2. spore germination. $\times 2800$ 3.—4. A two chlorocytes of filament. $\times 2800$ 5. A three chlorocytes of filament. $\times 1000$ 6. Chemical substances lead to abnormal development of swollen apical cell filament. $\times 2800$ 7. Cell division in the apical cell of the filament is changed from one-to two-dimensional. $\times 1000$ 8. Spatulate prothallium. $\times 140$ 9. Pear-shaped prothallium. $\times 140$ 10. Adult long cordate prothallium. $\times 140$ 11. Archegonia. $\times 800$ 12. Antheridia. $\times 800$ 13. Juvenile sporophyte. 14. When BM contains 10% sugar, the frond of sporophyte showed circinate form 15. Clustered shoot.

Plate II. Way of propagation of *Alsophila spinulosa*

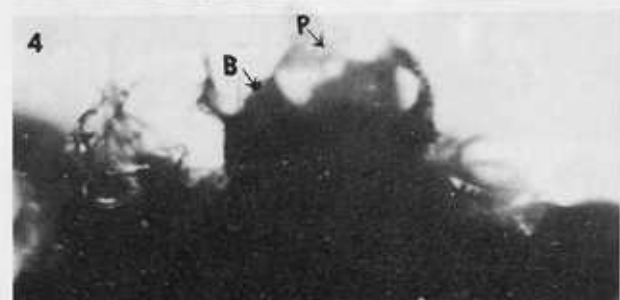
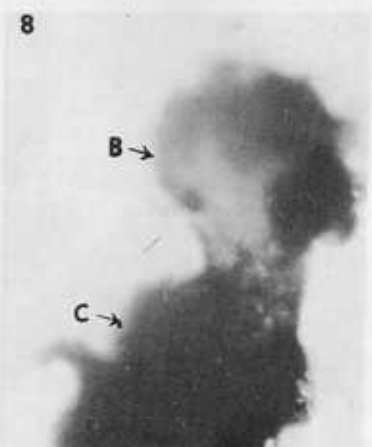
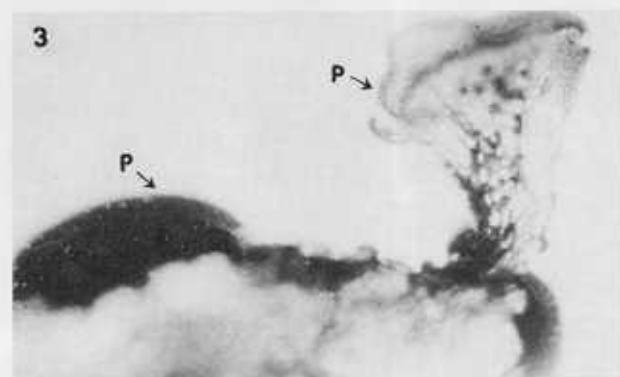
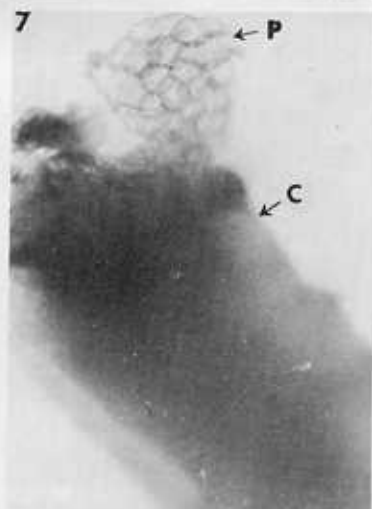
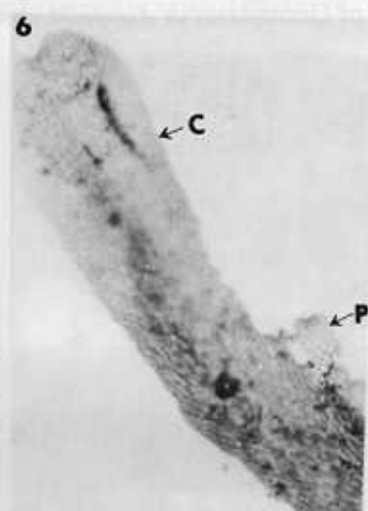
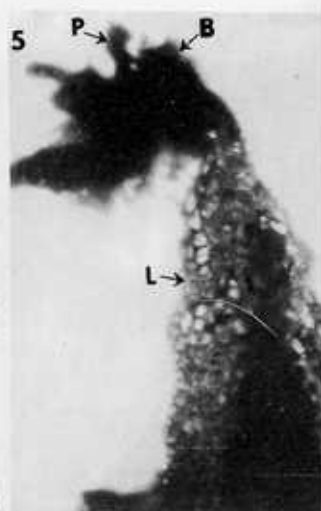
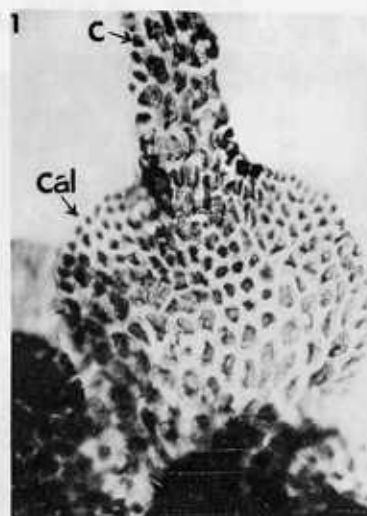
1. Appearance of clusteral bottle gourd. 2. Callus (cal) and adventitious bud (B). 3. The adventitious prothallium from fringe region of the wing of prothallus (P) (vegetative reproduction). 4. Apogamy, apospory. 5. The prothallus and adventitious buds from ligulate (L) prothallium. 6. Prothallium from base of cylinder (C). 7. Prothallium from apex of cylinder. 8. Adventitious bud from apex of cylinder.

CHEN Zhi-Ying et al: Studies on the Propagation and Conservation
of Germplasm in *Alsophila spinulosa*

Plate I



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text