

环境因子对蕨类植物孢子萌发的影响

张正修, 戴绍军*

(东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 生命科学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 蕨类植物通过孢子萌发形成独立生活的配子体, 配子体能够形成精子器和颈卵器, 进而通过受精作用形成新的孢子体。孢子萌发是蕨类植物生活史过程中配子体世代向孢子体世代转变的关键步骤。同时, 此过程不仅受到多种环境因子的影响, 也是研究细胞核极性移动、细胞不对称分裂、假根极性生长等独特的细胞学事件的良好模型。迄今为止, 人们已经研究发现多种环境因子对约 200 余种蕨类植物孢子萌发有影响。总结了环境因子对蕨类植物孢子萌发的规律如下: (1) 孢子萌发除了受到光照强度影响外, 主要受光质的影响, 光质的影响主要表现为 4 种方式: ①孢子萌发受红光刺激与远红光抑制像开关一样调控; ②孢子萌发不受远红光抑制; ③孢子萌发受蓝光抑制; ④孢子只能在黑暗条件下萌发。(2) 重力作用会影响孢子细胞核移动, 进而影响孢子细胞发育的极性。(3) 赤霉素(GA)能增加孢子萌发率或帮助孢子打破休眠。成精子囊素与 GA 作用相似, 启动或促进孢子萌发。而脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)和乙烯等其它激素对孢子萌发的影响相对较小。(4) 不同植物孢子有着各自最适的萌发培养基条件, 如不同种类孢子对 MS 培养基中无机盐含量、蔗糖含量、pH 值的要求不同。孢子外被中的 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} , 培养基中的 Cd^{2+} 和 La^{3+} , 以及孢子接种密度、萌发空间 CO_2 含量也会对孢子萌发造成影响。(5) 多数蕨类植物孢子在 15—30℃ 可以萌发, 最适萌发温度为 25℃。(6) 4℃ 和液氮储藏可以延长孢子寿命并保持较高萌发率。

关键词: 蕨类植物; 孢子萌发; 环境因子

Effect of environmental factors on fern spore germination

ZHANG Zhengxiu, DAI Shaojun*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, MOE; College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Ferns produce spores that germinate to form gametophytes which live independently. The gametophytes later develop antheridia and archegonia and produce new sporophytes upon fertilization. Spore germination is a key step for ferns to switch from the gametophytic phase to the sporophytic phase. Spore germination also is a good single-cell model for exploration of cell nuclear polar movement, asymmetrical cell division, tip-growth of rhizoids and other unique cellular differentiation events. Furthermore, fern spore germination is affected by various environmental factors. So far, fern spore germination features in response to environmental factors have been investigated in about 200 species. The present paper gives an overview of this research progress and summarizes the common responses to environmental factors for germination of fern spores as follows: (1) Fern spore germination is affected by light intensity, and the action spectrum for germination is diverse among species. The four representative influence modes include a) red light-stimulated and far red light-inhibited spore germination which operates as a switch, b) far red-uninhibited spore germination, c) blue light-inhibited spore germination, and d) spore germination in the dark. (2) Gravity directs the early nuclear polar movement in spores of *Ceratopteris richardii*, which irreversibly determines the axis of spore cell development. (3) Gibberellins (GA) can function to increase the germination rate of spores or break spore dormancy. Antheridiogen has a similar role as GA, which is to initiate and promote spore germination from many species. Absciscic acid, jasmonic acid and ethylene have only minor effects on spore germination. (4) The spores of diverse species have different optimal culture medium compositions for

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NECT-06-0327); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA021405); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (DL09DA03)

收稿日期: 2009-10-12; 修订日期: 2009-12-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: daishaojun@hotmail.com

germination and growth. Spores can obtain the maximum germination rate in their favorable mineral and sugar content in MS medium. Moreover, spores from different species may need an optimized pH to obtain the highest germination rate. Furthermore, the metal ions including Ca^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} in spore coat, Cd^{2+} or La^{3+} in culture medium, and CO_2 content in environment also have effects on spore germination. (5) Many fern spores can germinate under $15-30^\circ\text{C}$, and 25°C is suitable for most spores. (6) Storage at 4°C or in liquid nitrogen can increase spore longevity and maintain germination rate.

Key Words: Ferns; Spore germination; Environmental factors

在维管植物中,蕨类植物是唯一孢子体和配子体都可以独立生活的类群。多数蕨类植物孢子体产生的孢子可以萌发为能够独立生活的配子体,进而通过受精作用形成新的孢子体。自然条件下,蕨类植物孢子一般通过光照打破休眠,依靠重力作用完成细胞核迁移并建立极性,然后通过两次不对称的细胞分裂分别产生假根和原丝体原始细胞,原丝体原始细胞继续分裂形成配子体。可见,孢子萌发是蕨类植物生活史中的关键环节。蕨类植物孢子萌发有着自身的特点,它是真正意义上的单细胞(花粉为两细胞/三细胞,种子为多细胞)极性建立与生长过程^[1-2]。蕨类植物孢子萌发过程不仅可以作为比较研究花粉-种子-孢子萌发机制的模型之一,同时也是从细胞水平研究光响应、细胞核迁移、细胞骨架动力学和极性生长等事件分子机制的良好模型^[3]。蕨类孢子萌发更加依赖于自然环境因素的调控。迄今为止,已经报道了各种环境因子对约 200 种蕨类植物孢子萌发的影响,涉及到的环境因子主要包括光照、重力、激素类物质(赤霉素、成精子囊素、茉莉酸、脱落酸和乙烯)、萌发介质成分、温度等。然而,由于蕨类植物种类繁多,进化位置和分类地位不同的植物种类形成的孢子具有保守的萌发特性的同时,也具有响应环境因子的异质性特征。此外,长期以来,在国际上开展蕨类植物孢子萌发研究的各个实验室的试验条件各异,因此,已有的有关蕨类植物孢子萌发特性的报道多种多样,但是还未见有关对环境因子影响蕨类植物孢子萌发基本规律性的报道。本文首次归纳总结了有关研究成果,并分析了环境因子对孢子萌发影响的规律。

1 光照对孢子萌发的影响

自 20 世纪 50 年代以来,人们一直关注光照对蕨类植物孢子萌发的影响,已经研究了近 70 种蕨类植物孢子萌发过程中对不同光照条件的响应。人们发现自然条件下多数蕨类植物孢子在黑暗时不萌发,而只在光照时萌发,只有那些在地下生长的无光合作用的蕨类植物配子体是来自于黑暗条件下萌发的孢子,如球茎瓶尔小草(*Ophioglossum crotalophoroides*)和东北石松(*Lycopodium clavatum*)^[4-5]。然而,由于蕨类植物种类众多,不同物种孢子萌发对光照的响应存在差异,很难形成单一的模式去解释光照对蕨类孢子萌发的影响。虽然多数蕨类植物孢子(包括绿色孢子)萌发受到了光照条件的影响,但是光合作用在萌发过程中似乎并不起作用。如球子蕨(*Onoclea sensibilis*)孢子在黑暗吸涨处理和光诱导萌发早期(60h 以内)叶绿体数量和叶绿素含量都没有变化^[6]。用光合作用抑制剂 3-(3,4-二氯苯基)-1,1-二甲基脲处理后的球子蕨(*O. sensibilis*)孢子萌发也并未受到影响^[7]。现有研究表明,与种子萌发过程相似,光诱导蕨类植物孢子萌发过程是通过孢子中的光敏色素和蓝光受体来完成的。不同植物孢子萌发时对光强、光质和光照时间等光照条件有不同的要求。

1.1 光质

对铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris*)孢子萌发的细胞学研究表明,孢子萌发过程中的第 1 次有丝分裂是响应光诱导的关键点,此时光敏色素(细胞定位不清楚)受到红光-远红光的调控^[8]。光敏色素分子在红光和远红光照下通过红光吸收型(Pr,最大吸收峰 666nm)和远红光吸收型(Pfr,最大吸收峰 730nm)两种构象的转换,像开关一样启动-关闭第 1 次有丝分裂,从而调控蕨类孢子萌发^[9]。同时,定位于细胞核的蓝光受体,可以在蓝光作用下抑制红光-远红光对第 1 次有丝分裂的调控过程,从而通过抑制第 1 次有丝分裂来抑制孢子萌发^[8],而定位于细胞核的蓝光受体可以在蓝光作用下促进铁线蕨(*A. capillus-veneris*)孢子萌发过程中的第 2 次及其以后的有丝分裂,从而促进原丝体原始细胞和丝状体的形成。此外,定位于细胞膜的光敏色素可以

在红光/远红光作用下抑制蓝光受体对第2次分裂的作用,从而抑制原丝体形成^[8]。这种受光敏色素和蓝光受体协同调控的孢子萌发过程在不同物种间存在很大差异,主要表现为以下几种形式:

(1) 红光-远红光对孢子萌发的“开关作用”明显。红光可以启动多数蕨类植物孢子萌发,如球子蕨(*O. sensibilis*)、海金沙(*Lygodium japonicum*)、沼泽蕨属的 *Thelypteris kunthii*、蜈蚣草(*Pteris vittata*)等。但间歇的红光照射似乎不利于萌发,如沼泽蕨属的 *T. kunthii* 孢子经过连续 18h 红光照射萌发率为 50%,而在 18h 内间隔给予红光照射(5min/1h 或者 5min/3h)萌发率只有 30%—40%。短时间红光照射启动后的孢子萌发会被远红光逆转,如短时间红光照射(8h)启动的 *T. kunthii* 孢子萌发可被远红光照射(5min)抑制,然而若继续给予 8h 红光照射又可以恢复孢子萌发(萌发率约 50%),若持续红光照射 10—12h,或者重复 8h 红光 5min 远红光照射 2 次后,再给予 8h 红光照射可以解除远红光的抑制作用,得到 50% 以上的萌发率,但短时间(5min)的红光照射却无法恢复远红光的抑制作用^[10]。深山粉背蕨(*Cheilanthes farinosa*)孢子也表现为相似的规律^[11]。有时,短时间(5—10min)红光照射可以解除远红光对某些种类(如台湾山苏花 *Asplenium nidus*)孢子萌发的抑制作用^[12]。远红光照射的 *Cheilanthes feei* 孢子,萌发过程会停留在 2 个细胞的原丝体时期,其它光质条件下都没有这种现象^[13]。

(2) 红光启动孢子萌发,但远红光对萌发没有抑制作用。非洲蕨属的 *Mohria caffrorum* 孢子在持续 144h 红光或远红光照射下都可以达到超过 60% 的最大萌发率,并且单独红光(12h)照射与红光(12h)-远红光(5min 或 1h)照射所获得的萌发率相似(约 40%)^[14]。球子蕨(*O. sensibilis*)孢子在 $13.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 红光或者 $75\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 远红光照射下都能诱导最大萌发^[7]。

(3) 蓝光对孢子萌发的抑制作用因种而异。蓝光对小黑桫欏(*Alsophila metteniana*)孢子萌发有明显的抑制作用,蓝光照射下孢子萌发率仅为 7.51%,远远小于白光、红光、黄光照射下的萌发率(后三者的萌发率分别为 68.78%、65.66% 和 63.74%)^[15]。此外,*C. feei* 孢子在蓝光照射下的萌发率只有 68%,而白光和红光照射下的萌发率分别为 98% 和 88%^[13]。并且深山粉背蕨(*C. farinosa*)孢子在被红光照射前或者照射后给予蓝光照射,萌发都被抑制^[11]。与之相似,短暂的蓝光照射即可抑制铁线蕨(*A. capillus-veneris*)孢子萌发^[16]。然而,对某些物种而言,蓝光对萌发的抑制不完全或无作用。如蓝光照射可以降低沼泽蕨属 *T. kunthii* 的萌发率(萌发率 < 20%),但并没有完全抑制萌发^[10],而且被蓝光抑制的蜈蚣草(*P. vittata*)孢子被置于黑暗处一段时间后再给予红光照射,仍可以萌发^[17]。与之相似,蓝光照射不能降低多足蕨属的 *Polypodium aureum* 孢子萌发率,甚至蓝光照射后再用红光照射(1、3、5d)的孢子萌发率比单独用红光照射的萌发率还高。对有些蕨类孢子而言,足够剂量的蓝光照射甚至可以促进孢子萌发,如非洲蕨属的 *M. caffrorum* 孢子在红光照射 12h 后继续用蓝光照射 72h 可以获得约 80% 的萌发率^[14]。

(4) 孢子在黑暗处萌发,远红光促进萌发,红光和白光抑制萌发。松叶蕨属(*Psilotum*)的松叶蕨 *P. nudum* 和 *P. complanatum* 与梅西蕨属(*Tmesipteris*)的 *T. lanceolata* 和 *T. signatifolia* 孢子只在黑暗中萌发,萌发率在 52%—98% 之间,虽然 *T. lanceolata* 在光照条件下也可萌发,但配子体只能长到 2 细胞时期^[18]。东北石松(*L. clavatum*)孢子在经过黑暗、远红光照射、红光-远红光照射后的萌发率为 95%—99%,而经过远红光-红光照射、红光照射、白光照射后的孢子萌发率都低于 7%^[5]。与之相似,球茎瓶尔小草(*Ophioglossum crotalophoroides*)孢子萌发同样受到红光和白光照射的抑制(萌发率为 0),却可以在黑暗、远红光-红光、红光-远红光-红光照射后完成萌发(萌发率约 25%—28%)^[4]。

1.2 光照强度

光照强度对孢子萌发的影响也表现为物种特异性。多数蕨类植物孢子在适当光照强度范围内萌发率与光照强度呈一定回归关系,若光照强度过大则会抑制孢子萌发^[19]。小黑桫欏(*A. metteniana*)孢子在光照强度从 $20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 上升到 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,萌发率也从 55.25% 逐渐上升到 80.45%,而当光照强度继续从 $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 上升到 $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时萌发率逐渐下降到 60.44%。可见, $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 是小黑桫欏孢子萌发的最佳光照强度^[15]。*C. feei* 孢子萌发率也表现为从 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 到 $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 逐渐上

升,而从 $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 到 $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 开始下降,在光强为 $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时萌发率达到最高^[13]。叉蕨属(*Tectaria*)4种植物(*T. heracleifolia*, *T. incisa*, *T. mexicana* 和 *T. transiens*)孢子萌发率也随光照强度上升而增加,在白光照条件下萌发率都在 65% 以上,而遮荫条件的萌发率低于 40%^[20]。人工培养的蚌壳蕨科(*Dicksoniaceae*)的 *Dicksona sellowiana* 在 5%、20%、36%、50% 自然光照条件下,培养 49d 后均可达到 85% 以上的萌发率,但是在萌发早期(21d 前),5% 和 20% 自然光强更有利于萌发(萌发率约 60%)^[21]。在林下自然生长的 *Cyathea delgadii* 在 5% 和 22% 的自然光照时可以分别达到 83.5% 和 76% 的萌发率^[19]。与之相似,巴西乌毛蕨(*Blechnum brasiliense*)在这两种光照条件下的萌发率分别为 84% 和 76%^[19],多足蕨属的 *P. lepidopteris* 在 8% 和 22% 自然光照时可达最大萌发率^[22]。光照强度高会抑制革叶蕨(*Rumohra adiantiformis*)孢子萌发,在较低光照强度(9% 的自然光照)条件下,孢子的萌发时间最短(8d),光照强度增强到 54% 的自然光时,孢子萌发时间需要延长到 23d^[23]。这些现象表明,有些蕨类植物孢子萌发与种子萌发相似,对光照强度敏感,萌发受光敏色素 B 的低辐照度($0.01\text{—}1\text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}$)反应调控^[24],但是也不排除不同实验室使用的光质和孢子接种密度差异所致。

1.3 光照时间

来自各个实验室的研究结果也反映了不同种类孢子萌发需要的光照时间有差异。有些孢子需要经长时间光照才能萌发,如台湾山苏花(*A. nidus*)孢子经红光照射 4d 长出假根,多足蕨属的 *P. aureum* 孢子被红光照射 5d 能达到最大萌发率。沼泽蕨属的 *T. kunthii* 孢子在黑暗浸泡 4d 后,经白光或红光照射 7d 能达到最大萌发率^[10]。也有的孢子经过短时间红光照射(3—5min)就能萌发,如球子蕨(*O. sensibilis*)^[7]、鳞毛蕨属(*Dryopteris*)的欧洲鳞毛蕨(*D. filix-mas*)和 *D. paleacea*,以及耳蕨属的 *Polystichum minutum* 等^[25]。光照 24h 蕨菜 *Pteridium aquilinum* 的孢子需要 3—5d 萌发,光照 12h 要比光照 24h 推迟 3—4d 萌发^[26]。这些种间的差异除了物种特性不同造成的以外,很可能是由于不同实验室使用的光照强度与光质不同所致,也可能是不同的孢子的寿命或接种密度造成的。

2 重力与 Ca^{2+} 对孢子萌发的影响

对于多数蕨类植物而言,光照是影响蕨类植物孢子萌发的主要因素,然而对水蕨属 *Ceratopteris richardii* 的研究表明,重力对其孢子萌发过程中极性建立的作用要大于光照的作用^[27]。在 *C. richardii* 孢子萌发过程中,进行第 1 次有丝分裂之前,细胞核发生定向移动,从而决定了孢子细胞的不对称性和假根伸出的方向,这段时间被称为“极性决定窗口期”。Roux 与其合作者^[1, 27]的研究表明,重力在此时期对细胞核移动起决定作用。在重力条件下,有约 94% 孢子的假根向重力方向生长,只有 6% 孢子假根伸出的方向与重力方向相反,而在失重状态下细胞核表现为随机运动,假根伸出的方向也是随机的^[27]。光照方向在此期间对细胞核的移动方向只起了微弱的影响。若沿重力方向在两侧给予孢子光照或者各方向均匀给予孢子光照时,都有 92%—93% 假根向重力方向伸出。若在孢子上部沿重力方向给予光照时,假根向下萌发的比率增加到 98%,而在孢子下部给予光照则会使向下生长的假根的比率降到 81% 左右^[27]。

3 激素类物质对孢子萌发的影响

3.1 赤霉素

外源施加的赤霉素(GA)很可能通过刺激孢子萌发过程中 mRNA 与蛋白质的合成来影响孢子萌发。而孢子内源 GA_3 的生物合成受到红光诱导,红光通过调节光敏色素促进 GA_3 合成,进而促进孢子萌发,研究表明海金沙(*L. japonicum*)孢子在 GA_3 和红光诱导下萌发率均提高^[28]。已有证据表明,GA 种类与处理强度(浓度和时间)对不同植物孢子萌发的影响存在差异,主要表现在以下几方面:第 1,GA 处理对多数不同类群蕨类植物孢子萌发有促进作用:如:(1)蕨科(*Pteridiaceae*)的欧洲蕨(*Pteridium aquilinum*)孢子在不含 GA_3 的培养基上约需 4d 萌发,施加 $2.89 \times 10^{-11}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 后 3d 萌发, GA_3 浓度提高到 $4.33 \times 10^{-11}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 2d 即可萌发^[29];(2) $1 \times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA 可使肾蕨科(*Nephrolepidaceae*)的肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)孢子萌发率提高 15%^[30];(3)用 $5.77 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 处理蹄盖蕨科(*Athyriaceae*)的猴腿蹄盖蕨(*Athyrium multidentatum*)孢

子 2—10min 后,孢子萌发时间比未处理孢子提前 4—10d^[31]; (4) GA 可以促进桫欏科 (Cyatheaceae) 植物孢子成熟或打破休眠。如经过 $0.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 预处理的海南白桫欏 (*Sphaeropteris hainanensis*) 孢子囊中释放出来的孢子比未经预处理的萌发时间缩短 11d^[32]。而桫欏 (*Alsophila spinulosa*) 孢子有几年的休眠期,若用 $1.44 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 处理桫欏孢子 2—5min, 可以打破孢子休眠^[33]。第 2, 不同种类 GA 对孢子萌发作用存在差异,如细小莎草蕨 (*Schizaea pusilla*) 孢子经黑暗预处理 20d 后,对 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_{4+7} 或 GA_3 处理的响应不同。 GA_{4+7} 对萌发率几乎无影响,而 GA_3 能使萌发率提高 15% 左右^[34]。第 3, GA 处理时间对孢子萌发率也有影响。如密穗蕨 (*Anemia phyllitidis*) 孢子经 GA 处理 12h 和 24h 后,萌发率分别为 30% 和 70%,但继续增加 GA 处理时间孢子萌发率不再升高。第 4, GA 处理对有些蕨类植物孢子萌发促进作用不明显或无作用。如 $8.66 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 可以使蕨菜 (*P. aquilinum* var. *latiusculum*) 孢子假根伸出时间提前约 2d,但并不提高孢子萌发率^[35]。而用 $8.66 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 处理乌蕨 (*Sphenomeris chinensis*) 孢子 15min 后,孢子萌发率 (38.07%) 与未经处理孢子萌发率 (39.37%) 基本无差别^[36]。

3.2 成精子囊素

成精子囊素 (Antheridiogen) 是蕨类植物配子体分泌的一类疏水小分子激素类物质,与赤霉素有着相似的分子结构。人们已经发现蕨属 (*Pteridium*)、凤尾蕨属 (*Pteris*)、密穗蕨属 (*Anemia*)、球子蕨属 (*Onoclea*)、海金沙属 (*Lygodium*)、水蕨属 (*Ceratopteris*) 中的 50 种蕨类植物含有成精子囊素^[37],并分离纯化了 Apt、Aps、Aan、Aon、Aly、Ace 等多种成精子囊素^[30],同时发现成精子囊素能够促进蕨类植物孢子萌发。多数成精子囊素似乎能够替代光照作用启动孢子萌发^[37],如可以刺激铁线蕨科 (Adiantaceae) 的 *Bommeria* spp. 孢子在黑暗中萌发,并且孢子萌发率随成精子囊素浓度提高而上升^[38],但是水蕨 (*C. thalictroides*) 的成精子囊素 (Ace) 和 *Phlebodium aureum* 的成精子囊素 (Aph) 不能促进自身孢子和其它种类孢子在黑暗中萌发^[37]。多数成精子囊素对孢子萌发的促进作用具有个体特异性,即只能诱导自身孢子的萌发,如瓦韦 (*Lepisorus thunbergianus*)、瘤蕨 (*Phymatosorus scolopendria*)、多足蕨属的 *P. pellucidum*、*Campyloneurum* 属的 *C. angustifolium* 和 *C. Phyllitidis*、*Microgramma heterophylla* 和密穗蕨属 (*Anemia*) 植物的成精子囊素只能诱导自身的孢子萌发^[37]。然而,欧洲蕨 (*P. aquilinum*) 中含有的成精子囊素 (Apt) 可以诱导其它物种孢子在黑暗条件下萌发^[37]。此外,施加外源成精子囊素 Apt 还可以帮助球子蕨 (*O. sensibilis*) 孢子克服某些 C_5 到 C_9 脂肪酸对其萌发的抑制作用^[39]。

3.3 与茉莉酸

脱落酸 (ABA) 可以促进植物器官 (如种子) 休眠,并且抑制其萌发和生长。然而,ABA 对蕨类孢子萌发的影响很小或无影响。Chia 和 Raghavan^[40] 的研究表明 ABA 浓度从 $3.78 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 逐渐上升到 $7.57 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,只能使海金沙科非洲蕨属的 *M. caffrorum* 孢子萌发率从 89.6% 逐渐降低到 80.8%,而 ABA 处理对荚果蕨 (*Matteuccia struthiopteris*) 孢子萌发没有影响^[41]。这很可能是由于成熟的蕨类植物孢子已经预合成了用于萌发的 mRNA、蛋白质及相关的能量物质,这些储存在成熟孢子中的物质保证了孢子萌发的足够条件,从而使其不再受外源 ABA 的影响。与之相似,Camloh 等^[42] 的研究表明 $0.01\text{—}100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸 (JA) 对二歧鹿角蕨 (*Platyceium bifurcalum*) 孢子萌发时最初假根的伸出没有影响,但能明显促进假根延长与配子体早期发育。这同样是由于孢子中预合成的 mRNA 已经可以满足萌发需要,而来自 JA 促进新合成的 mRNA 虽然对假根延长和早期配子体发育是必须的,但对于孢子萌发不是必须的。

3.4 乙烯

虽然已有大量研究表明乙烯可以促进种子萌发,但是却有报道乙烯可以抑制蕨类植物孢子萌发。乙烯通过影响 DNA 合成、细胞核迁移和细胞分裂来抑制孢子萌发。乙烯浓度达到 $1 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时,球子蕨 (*O. sensibilis*) 孢子萌发率降至 40%。但是,这种抑制作用可以被光照部分解除,在乙烯处理并给予远红光照射时,球子蕨孢子萌发率为 75%,而给予蓝光和红光照射萌发率分别为 67.7% 和 57.2%^[43]。这种抑制也部分受到 CO_2 逆转,无 CO_2 时, $1 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯条件下孢子萌发率为 10%,而加入 1% CO_2 能使萌发率提高到 65% 左

右^[44]。同时,乙烯能够完全抑制黑暗中球子蕨(*O. sensibilis*)孢子萌发^[45]。此外,乙烯利(2-氯乙基膦酸)被植物吸收后降解产生的乙烯可以提高新鲜或未成熟水蕨属 *C. richardii* 孢子的萌发率,却降低了成熟孢子的萌发率。用乙烯利处理未成熟水蕨属 *C. richardii* 孢子 4d 或 6d,其萌发率从原来的 3%—4% 增加到 42%—62%;然而,用乙烯利处理成熟孢子 8d 其萌发率却从 51% 下降到 42%^[46]。

4 培养基质与接种密度对孢子萌发的影响

4.1 培养基类型与无机盐含量

早期曾有人认为液体培养基比固体培养基更利于孢子萌发,因为固体培养基可能不利于孢子壁开裂。但是, Camloh^[47] 对二歧鹿角蕨(*P. bifurcatum*)的研究表明,液体培养基只是比固体培养基更适合配子体早期发育,而并不影响孢子萌发率。如培养基类型相比,差异比较明显的是不同类群物种对培养基中无机盐浓度的要求。石韦(*Pyrrosia lingua*)孢子在 1/8 MS 或 Knop's 培养基中萌发较快,接种 6d 后开始萌发,萌发率分别达 83.2%、84.1%,而在 MS 培养基中的孢子接种 9d 后才开始萌发,萌发率仅为 59.5%^[48]。与之相似,紫萁(*Osmunda japonica*)孢子在 1/8 MS 培养基中孢子萌发率可达 95.3%,高于在 1/2 MS 培养基和 MS 培养基上的萌发率(后两者分别为 80.2% 和 50.3%)^[49]。黑桫欏(*A. podophylla*)孢子在 1/10 MS 或 1/5 MS 培养基集中的萌发率(约 67%)要高于在 MS 培养基上的萌发率(约 60%)^[50]。凤尾蕨属的白玉凤尾蕨(*P. cretica*)和西南凤尾蕨(*P. wallichiana*)孢子在 1/2 MS 培养基中可以达到 80% 以上的萌发率^[51-52]。变异鳞毛蕨(*D. varia*)在 1/2 MS 培养基上孢子的萌发率(38%)要比 MS 培养基上的高 5%^[53]。楔叶铁线蕨(*Adiantum raddianum*)孢子萌发的最适培养基质是在 1/2 MS 培养基中加入 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA、 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂^[54]。

4.2 蔗糖与其它物质

培养基中的蔗糖不仅可以作为碳源,也可以调节培养基中的渗透压,而这两者会对不同种类孢子萌发有影响。由于不同种类孢子的大小、孢子壁厚度,以及其储藏物质含量的差异,它们萌发时对培养基碳源和其它营养物质及渗透压的要求不同。蔗糖浓度小于 2% 时,白玉凤尾蕨(*P. cretica*)孢子萌发率在 80% 以上,而蔗糖浓度在 3%—5% 时,萌发率仅为 50%—60%^[51]。与之相似,较低的蔗糖浓度(小于 2%)也适于石韦(*P. lingua*)和变异鳞毛蕨(*D. varia*)孢子萌发^[48,53],紫萁孢子萌发最适的蔗糖浓度也为 2%—3%^[49]。而有些物种孢子可以适应培养基中稍高的蔗糖浓度,如欧洲蕨(*P. aquilinum*)、蹄盖蕨属的 *A. filix-femina*、广布鳞毛蕨(*D. expansa*)和密穗蕨(*A. phyllitidis*)等 4 种植物孢子在蔗糖浓度为 6.8% 时的萌发率要高于蔗糖浓度 1.7% 和无蔗糖时的萌发率^[55]。

此外,在培养基中填加蔗糖和蕨叶提取液可以分别增加密穗蕨(*A. phyllitidis*)和毛轴蕨(*Pteridium revolutum*)孢子的萌发率^[56]。加入高浓度蔗糖和一定浓度生长辅助物质(如硫胺素、吡哆醇、甘氨酸、谷氨酸、吡哆乙酸、激动素、蕨叶提取液等),可提高蕨(*P. aquilinum* var. *latiusculum*)孢子的萌发率,加快萌发速度,并促进原叶体生长^[57]。而亚硝酸盐、羟基巴比妥盐和亲脂性溶剂则会分别抑制欧洲蕨(*P. aquilinum*)、密穗蕨(*A. phyllitidis*)和球子蕨(*O. sensibilis*)等孢子萌发^[58-59]。在培养基中加入一定比例(5%、10%、20%、30%、40% 和 50%)的紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*)提取液可以导致金毛狗(*Cibotium barometz*)孢子萌发时间延迟、萌发率下降、假根生长停止,并且随着培养基中紫茎泽兰提取液比例的提高,对孢子萌发的影响逐渐加大。其中,50% 紫茎泽兰提取液对孢子萌发的影响最显著,可使萌发延迟 4—7d,并且使萌发率从 98% 下降到 18%^[60]。

4.3 pH 值

不同种类植物孢子萌发所需要的培养基(液)最适 pH 值范围有差异。有些物种孢子能够适应的 pH 范围比较宽泛,如槲蕨属的 *Drynaria fortunei* 孢子在 pH 值 3.7—9.7 之间都能萌发,在最适 pH 值 7.7 时的萌发率可达到 63.3%^[61],*C. feei* 孢子在 pH 值 4.5—8.5 之间的孢子均能萌发,萌发最适 pH 值为 4.5(萌发率 92%)^[13]。有些物种孢子只在偏酸性条件下萌发,如小黑桫欏(*A. metteniana*)孢子在 pH 值为 3.7—6.7 时

能萌发,并在 pH 值 4.7 时达到最大萌发率 65.6%,而在 pH 值 7.7 时不能萌发^[15]。有些物种孢子只在偏碱性条件下萌发,如萍属的 *Marsilea vestita* 大孢子萌发的 pH 值范围为 7—8。

4.4 金属离子

培养基中的 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 可以分别作为孢子萌发过程中的信号分子或者酶(磷酸酶、ATP 酶、核苷酸酶)的螯合离子,从而保证孢子萌发初期细胞极性建立,以及参与假根生长过程中的酶活性,从而通过保证萌发过程中物质的极性运输和细胞壁的延展来促进假根极性生长。培养基或孢子外壁/周壁中含有的金属离子(如 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 等)会利于球子蕨(*O. sensibilis*)孢子萌发。而 Cd^{2+} 和 La^{3+} 等会干扰 Ca^{2+} 和其它金属离子活性,从而影响孢子萌发。外源施加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 不能引起水蕨(*C. thalictroides*)孢子萌发改变,但 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 能够分别抑制 14% 和 36% 的孢子萌发^[62]。此外,外源的 La^{3+} 能够抑制鳞毛蕨属的 *Dryopteris paleacea* 孢子萌发^[63]。

4.5 接种密度

孢子接种密度决定了每个孢子所占有的有效萌发与生长空间,从而影响着孢子萌发和配子体生长过程中营养物质的获得与利用。因此,接种密度不仅会影响蕨类配子体发育,也会影响孢子萌发^[64]。紫萁(*O. japonica*)孢子接种密度分别为 100、500、1000、2000、3000、5000 个/ cm^2 时,孢子萌发率分别为 0、12.3%、46.1%、71.0%、95.4%、67.2%。由此可见,接种密度为 3000 个/ cm^2 左右时较适于紫萁孢子萌发^[49]。

5 温度

温度不仅可以影响孢子萌发过程中细胞膜透性与各种酶的活性,而且影响光敏色素的构型和活性。低温会限制膜透性和酶活性,而高温会抑制光敏色素的活性,从而影响孢子的萌发率。虽然蕨类植物孢子在 15—30℃ 条件下都可萌发,但是不同种类孢子的最适萌发温度有差异,这很可能是由于不同种类孢子的结构特征和对光照的要求不同所致。温度对孢子萌发的影响主要表现为以下 3 种情况:

(1) 多数种类孢子的最适萌发温度为 25℃ 左右。草叶蕨(*R. adiantiformis*)孢子在 25℃ 时萌发时间(8d),短于在 30℃ 和 15℃ 时的萌发时间(10d 和 12d)^[23]。在 25℃ 时,*Microgramma lindbergii*、*M. squamulosa*、多足蕨属的 *P. hirsutissimum*、*P. pleopeltifolium* 和 *P. latipes*、*Adiantopsis radiata*、凤尾蕨属的 *P. denticulata* 等孢子萌发约需 5—8d,都分别少于在其它温度(18.4℃、21.7℃、29.4℃)时的萌发时间^[65]。在 25℃ 时,铁角蕨(*Asplenium trichomanes*)与对开蕨(*Asplenium scolopendrium*)孢子在第 3 天开始萌发,而温度下降到 15℃ 与 10℃ 时,萌发时间分别推迟 2d 与 8d^[66]。卵叶铁角蕨(*Asplenium ruta-muraria*)在 25℃ 时第 16 天达到最大萌发,而在 10℃ 时直至第 28 天才只见 1 个孢子萌发^[66]。此外,萍属的 *M. vestita*、多足蕨属的 *P. pleopeltifolium* 和 *P. latipes*^[65]、狗脊属(*Woodwardia*)的 *W. radicans*^[67]、*C. feei*^[13]、小黑桫欏(*A. metteniana*)^[15]、以及叉蕨属的 *T. heracleifolia*、*T. incisa*、*T. mexicana* 和 *T. transiens*^[20] 等植物孢子 25℃ 条件下都可以获得较高的萌发率。

(2) 有些植物孢子的最适萌发温度在 20℃ 左右。*Culcita macrocarpa* 孢子在 20℃ 时萌发率为 87%,高于 15℃、25℃ 和 10℃ 时的萌发率(76%、55% 和 7%)^[67]。铁皇冠(*Microsorium pteropus*)孢子在 20℃ 培养时的萌发率为 85%,高于 15℃ 时的 17% 与 25℃ 时的 20%^[68]。

(3) 有些蕨类孢子的最适萌发温度为 30℃ 左右。小黑桫欏孢子在 15℃、20℃、25℃ 和 30℃ 下萌发率分别为 46.17%、67.26%、68.78% 和 72.37%。可见,低于 15℃ 时小黑桫欏孢子的萌发率很低,在较高温度时(20—30℃)其萌发率比较高^[15]。球子蕨(*O. sensibilis*)在 30℃ 时能达到最大萌发率,多足蕨属的 *P. hirsutissimum* 和凤尾蕨属的 *P. denticulata* 孢子在 29.4℃ 萌发率都能达到最高,分别为 95.7% 和 67.2%^[65]。也有些蕨类孢子在稍高的温度下才萌发更快,如多足蕨属的 *P. pleopeltifolium* 孢子在 29.4℃ 萌发时间(5.6d)短于 25.2℃ 时(6.3d)^[65],乌蕨(*Sphenomeris chinensis*)孢子在 28℃ 时的萌发速度要高于 20—25℃^[36]。

6 储存条件对孢子萌发的影响

蕨类植物成熟孢子的寿命因种而异,含叶绿体孢子的寿命较短(从 10d 到 1a 不等),不含叶绿体孢子的寿命可达几年。已有研究表明,木贼科(Equisetaceae)、紫萁科(Osmundaceae)、禾叶蕨科(Grammitidaceae)、膜

蕨科(Hymenophyllaceae)、罗曼藤蕨属(*Lomariopsis*)、戟蕨属(*Christiopteris*)、荚果蕨属(*Matteuccia*)、球子蕨属(*Onoclea*)、*Onocleopsis*、*Marginariopsis*、乌毛蕨属(*Blechnum*)的乌毛蕨(*B. nudum*)等植物孢子大都含有叶绿体,这些绿色孢子有持续的呼吸作用并且不经过休眠,大都能够能够在3d(平均1.46d)内萌发,但是其活力大约只有1a或者更少(平均48d)。而多数蕨类植物孢子不含叶绿体,虽然它们需要更长的时间才可萌发(4—210d,平均9.5d),但是具有更久的活力(约1045d)。

孢子寿命与萌发能力大都受到储存条件的影响。一般而言,适当干燥与低温储存可以延长孢子寿命。如4℃储存的细小莎草蕨(*S. pusilla*)孢子萌发率要高于22℃储存的孢子^[69]。干燥条件下-12℃储存的*C. delgadii*孢子两年后仍有很好的萌发率^[70]。梅西蕨属的*T. lanceolata*和*T. signatifolia*孢子在-70℃储存21个月后仍具有与新鲜孢子一样的萌发率^[18]。此外,干燥孢子在液氮中保存可延长其寿命。革叶蕨(*R. adiantiformis*)孢子在液氮中保存90d后仍可达到与新鲜孢子相近的萌发率,且萌发时间缩短^[71]。紫萁属的*O. regalis*孢子可在液氮中保存18个月^[72],铁线蕨属的*A. tenarum*、拟贯众属的*Cyclopeltis semicordata*、叉蕨属的*T. incisa*和普通针毛蕨(*Macrothelyptris torresiana*)孢子能够在液氮中保存52个月,凤尾蕨属的*Pteris* sp.、全缘贯众(*Cyrtomium falcatum*)、对马耳蕨(*Polystichium tsus-simense*)等植物的孢子在液氮中可保存75个月。然而,对于某些喜湿的种类,干燥与低温却能导致孢子死亡。如-20℃保存可以明显降低乌蕨(*S. chinensis*)孢子萌发率^[36]。干燥或者湿润-20℃保存可使*C. macrocarpa*和狗脊属的*Woodwardia radicans*孢子失去活性,而5℃和20℃湿润保存可使孢子保持较好萌发率^[73]。

7 CO₂对孢子萌发的影响

适宜的CO₂浓度利于石韦属*P. piloselloides*孢子萌发。在萌发环境中不含CO₂时,孢子从第6天开始萌发,到第17天达到最大萌发率64%,而培养环境CO₂浓度在0.02%、0.04%、0.05%或0.34%时,孢子第4天开始萌发,到第17天达到最大萌发率90%以上^[74]。但是,过高的CO₂浓度也能抑制孢子萌发。如2%CO₂对球子蕨(*O. sensibilis*)孢子萌发没有任何抑制(萌发率为95%),CO₂浓度升高到5%和10%时,萌发率分别下降到65%和25%,而孢子在CO₂浓度上升到15%—25%时孢子不萌发^[44]。

8 结论与展望

蕨类植物孢子萌发是在短时间内完成的非常精细的基因与环境两种调控机制的耦合过程。现有报道主要集中在对孢子萌发过程生理生态学现象的描述,缺乏分析各种环境因子对不同蕨类植物类群孢子萌发影响的规律性分析。此外,虽然近年来有少数报道利用基因芯片技术比较了蕨类孢子-花粉-种子三者之间在萌发过程中的基因表达特性,或者利用分子生物学技术分析了蕨类植物孢子萌发过程中部分响应光照与重力的基因表达特征^[75-76],然而,这些研究都没有能够全面系统地反映蕨类萌发过程的自身分子调控机理,以及应答环境因子的调控机制。近年来,种子植物分子生物学理论与方法学的快速发展已经为研究蕨类植物孢子萌发响应环境因子的分子机理提供了可能。虽然至今还没有获得水蕨(模式植物)的全基因组信息,但是水蕨EST数据库(超过5000个EST)和cDNA文库(超过3000个cDNA)在不断丰富^[1],而且大约70%以上的EST与拟南芥基因有明显的相似性^[77]。同时,蕨类植物突变体库也在不断丰富,在利用物理(X射线)、化学(甲基磺酸乙酯)和分子生物学技术获得更多的突变体,人们也在尝试利用瞬时表达技术和RNAi技术分析孢子中表达基因的功能^[78]。此外,在进行水稻花粉萌发蛋白质组学研究过程中发现,花粉中表达的转录本与蛋白质的特征并不完全相同,蛋白质作为生物学功能的最终执行者,更能反映基因表达的特征与代谢过程的分子机制^[2, 79-81]。蛋白质组学技术发展迅速,已经由定性蛋白质组学向精确定量蛋白质组学发展^[82]。利用iTRAQ技术结合LC-MS/MS技术进行定量差异表达蛋白质组学研究已经被应用于植物细胞蛋白质组研究^[83]。这些都为利用分子生物学和蛋白质组学技术分析蕨类孢子萌发机制奠定了良好的基础。因此,今后应该依次逐渐开展以下研究:(1)建立不同类群蕨类植物孢子萌发的模式研究体系;(2)以光照、重力、激素等为研究重点,在一致的试验条件下,分析与总结不同类群植物孢子萌发响应环境因子的生理学规律;(3)利用分子生物学与蛋白质组学技术分析决定孢子萌发响应环境因子过程中关键事件的重要基因/蛋白质;(4)利

用基因工程技术,改良蕨类植物孢子萌发特性,为提高药用与经济蕨类植物产量,保护濒危蕨类植物服务。

References:

- [1] Chatterjee A, Porterfield D M, Smith P S, Roux S J. Gravity-directed calcium current in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Planta*, 2000, 210(4): 607-610.
- [2] Dai S J, Lei L, Chen T T, Chong K, Xue Y B, Wang T. Proteomic analysis of *Oryza sativa* mature pollen novel proteins associated potentially with pollen germination and tube growth. *Proteomics*, 2006, 6(8): 2504 -2529.
- [3] Dai S J, Gao J, Mu H F, Song Y Y. Comparison of germination between fern spores and spermatophyte pollen. *Chinese Bulletin of Botany*, 2008, 25 (2): 139-148.
- [4] Whittier D P. Red light inhibition of spore germination in *Ophioglossum crotalophoroides*. *American Fern Journal*, 2006, 84(7): 1156-1158.
- [5] Whittier D P. Red light inhibition of spore germination in *Lycopodium clavatum*. *American Fern Journal*, 2008, 98(4): 194-198.
- [6] Raghavan V. Chloroplast activities of dark-imbibed and photoinduced spores of the fern *Onoclea sensibilis*. *Protoplasma*, 1993, 175(1/2): 75-84.
- [7] Towill L R, Ikuma H. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores I. action spectrum. *Plant Physiology*, 1973, 51(5): 973-978.
- [8] Furuya M, Kanno M, Okamoto H, Fukuda S, Wada M. Control of mitosis by phytochrome and a blue-light receptor in fern spores. *Plant Physiology*, 1997, 113(3): 677-683.
- [9] Raghavan V. Germination of fern spores. *American Scientist*, 1992, 80: 176-185.
- [10] Huckaby C S, Raghavan V. Photocontrol of spore germination in the fern *Thelypteris kunthii*. *Physiologia Plantarum*, 1981, 51(1): 19-22.
- [11] Raghavan V. Blue light interference in the phytochrome controlled germination of the spores of *Cheilanthes farinosa*. *Plant Physiology*, 1973, 51 (2): 306-311.
- [12] Raghavan V. Phytochrome control of germination of the spores of *Asplenium nidus*. *Plant Physiology*, 1971, 48(1): 100-102.
- [13] Nondorf S L, Dooley M A, Palmieri M, Swatzell L J. The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of southeast Missouri. *American Fern Journal*, 2003, 93(2): 56-69.
- [14] Reynolds T L, Raghavan V. Photoinduction of spore germination in a fern, *Mohria caffrorum*. *Annals of Botany*, 1982, 49(2): 227-233.
- [15] Du H H, Li Y, Li D, Dai S J, Jiang C D, Shi L. Effects of light, temperature and pH on spore germination and early gametophytic development of *Alsophila metteniana*. *Biodiversity Science*, 2009, 17 (2): 182-187.
- [16] Sugai M, Furuya M. Action spectrum in ultraviolet and blue light region for the inhibition of red-light-induced spore germination in *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant and Cell Physiology*, 1985, 26(5): 953-956.
- [17] Sugai M, Furuya M. Photomorphogenesis in *Pteris vittata* L. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. *Plant and Cell Physiology*, 1967, 8(4): 737-748.
- [18] Whittier D P, Braggins J E. Spore germination in the Psilotaceae. *Canadian Journal of Botany*, 1994, 72(5): 688-692.
- [19] Hiendlmeyer R, Randi Á M. Response of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta Botanica Brasílica*, 2007, 21(4): 909-915.
- [20] Pérez-García B, Mendoza-Ruiz A, Sánchez-Coronado M E, Orozco-Segovia A. Effect of light and temperature on germination of spores of four tropical fern species. *Acta Oecologica*, 2007, 32(2): 172-179.
- [21] Renner G D R, Randi Á M. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 2004, 18(2): 375-380.
- [22] Viviani D, Randi Á M. Effects of pH, temperature and light intensity on spore germination and growth analysis of young sporophytes of *Polypodium lepidopteris* (Pteridophyta, Polypodiaceae). *Rodrigu sia*, 2008, 59(4): 751-761.
- [23] Brum F R, Randi A M. High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 2002, 25(4): 391-396.
- [24] Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Watanabe M, Furuya M. Action spectra for phytochrome A- and B- specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(13): 8129-8133.
- [25] Haupt W. Effects of nutrients and light pretreatment on phytochrome-mediated fern-spore germination. *Planta*, 1985, 164(1): 63-68.
- [26] Niu J Y, Li S, Xu Z M, Qin S H, Lian R F. Effect of illumination and exogenous substance on spore germination and seedling survival of *Pteridium aquilinum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29 (6): 584-586.
- [27] Edwards E S, Roux S J. Influence of gravity and light on the developmental polarity of *Ceratopteris richardii* fern spores. *Planta*, 1998, 205(4): 553-560.
- [28] Kagawa T, Sugai M. Involvement of gibberellic acid in phytochrome mediated spore germination of the fern *Lygodium japonicum*. *Journal of Plant*

- Physiology, 1991, 138(3): 299-303.
- [29] Zhang J W, Niu J Y. The effects of culture ground substances, GA₃ and B, on spores germination and planting rate of *Pteridium aquilinum*. Acta Prataculturae Sinica, 1999, 8(1): 62-66.
- [30] Li J L, Yuan Y B, Cao Z X. View of the cytology and biochemisry of sexual reproduction of algae and pteridophyta. Chinese Bulletin of Botany, 1995, 12(2): 1-8.
- [31] Guo Q X, Shen Y X, Song X H, Zhao H T. The effects of spores germination and planting rate of *Athyrium multidentatum*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(2): 343-345.
- [32] Jiang S J, Zeng X, Wang S P, Zhuang N S. Study of tissue culture of *Sphaeropteris hainanensis*. Tropical Agriculture Science, 2002, 22(6): 9-12.
- [33] Cheng Z Y, Zhang F L, Lan Q Y, Xu Z F, Tao G D. Study on the propagation and conservation of geramplasm in *Alsophila spinulosa*. Acta Botanica Yunnanica, 1991, 13(2): 181-188.
- [34] Guiragossian H A, Koning R E. Induction of spore germination in *Schizaea pusilla*. American Journal of Botany, 1986, 73(11): 1588-1594.
- [35] Zai G Y, Bian K, Jia K G, Zhu L X. Effect of GA₃ and MS medium ratio treatments on spore germination of wild Brake. China Vegetables, 2007 (8): 21-23.
- [36] Ren B R, Xia B, Li W L, Wu J L, Zhao Y Y. Investigation on spore germination of *Sphenomeris chinensis* (Lindsaeaceae). Acta Botanica Yunnanica, 2008, 30(6): 713-717.
- [37] Chiou W L, Farrar D. Antheridiogen production and response in Polypodiaceae species. American Journal of Botany, 1997, 84(5): 633-640.
- [38] Haufler C H, Welling C B. Antheridiogen dark spore germination and outcrossing mechanisms in *Bommeria* (Adiantaceae). American Journal of Botany, 1994, 81(5): 616-621.
- [39] Pringle R B. Interaction between antheridogens and fatty acids in fern spore germination. Plant Physiology, 1970, 45(3): 315-317.
- [40] Chia S G, Raghavan V. Absciscic acid effects on spore germination and protonemal growth in the fern, *Mohria caffrorum*. New Phytologist, 1982, 92(1): 31-37.
- [41] Jarvis S J, Wilkins M B. Photoresponses of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro I. Germination. Journal of Experimental Botany, 1973, 24(6): 1149-1157.
- [42] Camloh A, Ravnikaar M, Zel J. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation of rhizoids and early development of gametophytes. Physiologia Plantarum, 1996, 97(4): 659-664.
- [43] Fisher R W, Miller J H. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. IV. Involvement of photosynthesis in overcoming ethylene inhibition of spore germination. American Journal of Botany, 1975, 62(10): 1104-1111.
- [44] Edwards M E. Carbon dioxide and ethylene control of spore germination in *Onoclea sensibilis* L. Plant Physiology, 1977, 59(4): 756-758.
- [45] Fisher R W. Reversal by light of ethylene-induced inhibition of spore germination in the sensitive fern *Onoclea sensibilis*; an action spectrum. Plant Physiology, 1979, 63(6): 984-988.
- [46] Warne T R, Hickok L G. (2-Chloroethyl) phosphonic acid promotes germination of immature spores of *Ceratopteris richardii* Brongn. Plant Physiology, 1987, 83(4): 723-725.
- [47] Camloh M. Spore germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. American Fern Journal, 1993, 83(3): 79-85.
- [48] Du J Z, Li L H, Li Y Q, Yin X H, Huang R S, Chen R. Effects of different factors on the germination and growth of *Pyrrosia lingua* spores. Guangxi Agricultural Sciences, 2009, 40(2): 120-123.
- [49] Yuan Y, Tian S N, Ye A H, Lu P L. Studies on the rapid propagate of the *Osmunda japonica* Thund. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(3): 247-250.
- [50] Zhang Y L, Li Y, Ji M C, Li D, Shi L. Spore sterile culture in *Alsophila podophylla* Hook. Plant Physiology Communications, 2007, 43(6): 1139-1140.
- [51] Xu Y, Shi L, Liu Y, Li D. Studies on spore propagation of *Pteris cretica* Albo lineata. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(4): 658-662.
- [52] Zhang K M, Shi L, Li D, Zhang X C. Development process and spore sterile culture of *Pteris wallichiana* Agardh. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(1): 94-98.
- [53] Ouyang C J, Tang Y J, Wang R J. Spore culture and gametophyte development of *Dryopteris varia* (L.) Ktunze. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2008, 16(4): 344-349.
- [54] Tian X Y, Liu Y J, Wang S. The fast establishment of micropropagation system on *A. raddianum* using spore as explants. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(4): 103-106.
- [55] Sheffield E, Douglas G E, Hearne S J, Huxham S, Wynn J M. Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media. American Fern Journal, 2001, 91(4): 179-186.

- [56] Haas C J, Scheuerlein R. Nitrate effect on phytochrome mediated germination in fern spores investigations on the mechanism of nitrate action. *Plant Physiology*, 1991, 138(3): 350-357.
- [57] Bao M, Wu X M, Ding L. Effect of sucrose and the growth of auxiliary substances on spore artificial propagation of *Pteridium aquilinum*. *Journal of Qinghai Normal University (Natural Science)*, 2000(3): 39-43.
- [58] Sahi A N, Singh S K. Effect of sulphite on spore germination and rhizoid development in the tropical fern *Lygodium japonicum* (Filicales: Lygodiaceae). *Revista de Biologia Tropical*, 1994, 42(1/2): 53-57.
- [59] Bannon M, Kordan H, Sheffield E. Effects of Oxybar biturates on fern spore germination and gametophyte development. *Alternatives to Laboratory Animals*, 1991, 19(3): 308-315.
- [60] Zhang K M, Shi L, Jiang C D, Li Z Y. Allelopathic effects of *Eupatorium adenophorum* on spore germination and gametophyte development in *Cibotium barometz*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2008, 17(22): 19-25.
- [61] Chang H C, Agrawal D C, Kuo C L, Wen J L, Chen C C, Tsay H S. In vitro culture of *Drynaria fortunei*, a fern species source of Chinese medicine "Gu-Sui-Bu". *In Vitro Cellula & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43(2): 133-139.
- [62] Gupta M, Devi S, Singh J. Effects of long-term low-dose exposure to cadmium during the entire life cycle of *Ceratopteris thalictroides*, a water fern. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 23(2): 184-189.
- [63] Scheuerlein R, Wayne R, Roux S J. Calcium requirement of phytochrome-mediated fern spore germination: No direct phytochrome-calcium interaction in the phytochrome-initiated transduction chain. *Planta*, 1989, 178(1): 25-30.
- [64] Song Y Y, Gao J, Dai S J. Sex differentiation in ferns response to environmental factors. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(9): 5030-5038.
- [65] Rana M A. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest. *American Fern Journal*, 1999, 89(2): 149-158.
- [66] Pangua E, Lindsay S, Dyer A. Spore germination and gametophyte development in three species of *Asplenium*. *Annals of Botany*, 1994, 73(6): 587-593.
- [67] Quintanilla L G, Pajar N S, Pangua E, Amigo J. Effect of temperature on germination in northernmost populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*. *Plant Biology*, 2000, 2(6): 612-617.
- [68] Xue C L, Wang W J, Gao Y H. Artificial culture of spore of *Microsorium pteropus*. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, 2008(5): 16-17.
- [69] Kiss H G, Kiss J Z. Spore germination in populations of *Schizaea pusilla* from New Jersey and Nova Scotia. *International Journal of Plant Sciences*, 1998, 159: 848-852.
- [70] Simabukuro E A, Dyer A F, Felipe G M. The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii*. *American Fern Journal*, 1998, 88(2): 72-80.
- [71] Brum F M R, Randi A M. Germination of spores and growth of gametophytes and sporophytes of *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) after spore cryogenic storage. *Revista Brasileira de Botânica*, 2006, 29(3): 489-495.
- [72] Pence V C. Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. *American Fern Journal*, 2000, 90(4): 119-126.
- [73] Quintanilla L G, Amigo J, Pangua E, Pajaron S. Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Annals of Botany*, 2002, 90(4): 461-467.
- [74] Ong B L, Koh C K, Wee Y C. Effects of CO₂ on growth and photosynthesis of *Pyrrosia piloselloides* (L.) Price gametophytes. *Photosynthetica*, 1998, 35(1): 21-27.
- [75] Salmi M L, Roux S J. Gene expression changes induced by space flight in single-cells of the fern *Ceratopteris richardii*. *Planta*, 2008, 229(1): 151-159.
- [76] Imaizumi T, Kanegae T, Wada M. Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *The Plant Cell*, 2000, 12(1): 81-95.
- [77] Salmi M L, Bushart T J, Stout S C, Roux S J. Profile and analysis of gene expression changes during early development in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiology*, 2005, 138(3): 1734-1745.
- [78] Stout S C, Clark G B, Archer-Evans S, Roux S J. Rapid and efficient suppression of gene expression in a single-cell model system, *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 1165-1168.
- [79] Dai S J, Chen T T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T. Proteomic identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2007, 6(2): 207-230.
- [80] Dai S J, Wang T, Yan X F, Chen S X. Proteomics of pollen development and germination. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(12): 4556-4563.

- [81] Dai S J. Research advances on pollen proteomics. Chinese Bulletin of Botany, 2007, 24 (3): 319-329.
- [82] Yu J J, Dai S J. Research advances in plant proteomics. Chinese Bulletin of Botany, 2009, 44(4): 410-425.
- [83] Zhu M M, Dai S J, McClung S, Yan X F, Chen S X. Functional differentiation of *Brassica napus* guard cells and mesophyll cells revealed by comparative proteomics. Molecular and Cellular Proteomics, 2009, 8(4): 752-766.

参考文献:

- [3] 戴绍军, 高晶, 牟鸿飞, 宋莹莹. 蕨类植物孢子与种子植物花粉萌发的比较. 植物学通报, 2008, 25(2): 139-148.
- [15] 杜红红, 李杨, 李东, 戴绍军, 姜闯道, 石雷. 光照、温度和 pH 值对小黑桫欏孢子萌发及早期配子体发育的影响. 生物多样性, 2009, 17(2): 182-187.
- [26] 牛俊义, 李胜, 徐作半, 秦舒浩, 连容芳. 光照条件及外源物质对蕨菜孢子萌发成苗的影响. 园艺学报, 2002, 29(6): 584-586.
- [29] 张金文, 牛俊义. 培养基质、赤霉素和硼对蕨菜孢子萌发成苗影响的研究. 草业学报, 1999, 8(1): 62-66.
- [30] 李兆亮, 原永兵, 曹宗巽. 藻类植物和蕨类植物有性生殖的细胞学和生物化学研究现状. 植物学通报, 1995, 12(2): 1-8.
- [31] 郭庆勋, 沈云霞, 宋晓宏, 赵恒田. 猴腿蹄盖蕨孢子萌发和成苗影响因素初探. 中国农业学报, 2007, 23(2): 343-345.
- [32] 蒋胜军, 曾霞, 王胜培, 庄南生. 海南白桫欏孢子组织培养的研究. 热带农业科学, 2002, 22(6): 9-12.
- [33] 程治英, 张风雷, 兰芹英, 许再富, 陶国达. 桫欏的快速繁殖与种质保存技术的研究. 云南植物研究, 1991, 13(2): 181-188.
- [35] 翟国燕, 边珂, 贾克功, 朱立新. GA₃ 及不同比例 MS 培养基对蕨菜孢子萌发的影响. 中国蔬菜, 2007(8): 21-23.
- [36] 任冰如, 夏冰, 李维林, 吴菊兰, 赵友谊. 乌蕨孢子萌发研究. 云南植物研究, 2008, 30(6): 713-717.
- [48] 杜金子, 李良活, 李雁群, 尹小红, 黄荣韶, 陈荣. 不同因素对石韦孢子萌发及生长的影响. 广西农业科学, 2009, 40(2): 120-123.
- [49] 袁艺, 田胜尼, 叶爱华, 卢佩玲. 紫萁快速繁殖技术的研究. 园艺学报, 2002, 29(3): 247-250.
- [50] 张银丽, 李杨, 季梦成, 李东, 石雷. 黑桫欏孢子的无菌栽培. 植物生理通讯, 2007, 43(6): 1139-1140.
- [51] 徐艳, 石雷, 刘燕, 李东. 白玉凤尾蕨孢子繁殖技术的研究. 园艺学报, 2005, 32(4): 658-662.
- [52] 张开梅, 石雷, 李东, 张宪春. 西南凤尾蕨(*Pteris wallichiana* Agardh.) 发育过程及其孢子的无菌繁殖. 园艺学报, 2008, 35(1): 94-98.
- [53] 欧阳婵娟, 唐源江, 王瑞江. 变异鳞毛蕨的孢子培养与配子体发育研究. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(4): 344-349.
- [54] 田晓艳, 刘延吉, 王姝. 以孢子为外植体的楔叶铁线蕨组织培养. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 103-106.
- [57] 鲍敏, 吴学明, 丁莉. 蔗糖和生长辅助物质对蕨孢子人工繁殖的影响. 青海师范大学学报(自然科学版), 2000(3): 39-43.
- [60] 张开梅, 石雷, 姜闯道, 李振宇. 紫萁泽兰对金毛狗孢子萌发和配子体发育的化感作用. 草业学报, 2008, 17(22): 19-25.
- [64] 宋莹莹, 高晶, 戴绍军. 蕨类植物性别分化对环境的响应. 生态学报, 2009, 29(9): 5030-5038.
- [68] 薛春丽, 王卫江, 高永红. 铁皇冠孢子人工培养研究. 云南农业科技, 2008, (5): 16-17.
- [81] 戴绍军. 花粉蛋白质组学研究进展. 植物学通报, 2007, 24(3): 319-329.
- [82] 喻娟娟, 戴绍军. 植物蛋白质组学研究若干重要进展. 植物学报, 2009, 44(4): 410-425.