

无菌条件下砷对蜈蚣草配子体生长发育的影响

亢希然¹, 范稚莲¹, 乔西¹, 莫良玉^{1*}, 石云平², 陈海凤¹

(1. 广西大学农学院, 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 研究无菌条件下不同浓度砷对蜈蚣草的孢子萌发、假根和原叶体生长发育的影响。结果表明, 培养基中 As 浓度大于 30 mg/L 时, 孢子萌发速度、假根和原叶体的生长发育受到抑制, 假根的着生点位置发生改变; 而与高浓度 As 影响不同的是, 低浓度 As (30 mg/L) 可促进孢子变绿的速率和初期原叶体(播后 8 d 内)的生长。因此, 高浓度 As 能抑制配子体生长发育并改变假根着生点位置, 而低浓度 As 则可促进配子体早期的生长。

关键词: 无菌条件; 砷; 蜈蚣草; 配子体

中图分类号: Q948.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)06-0882-04

Effect of arsenic on gametophytes development of *Pteris vittata* under aseptic condition

KANG Xi-Ran¹, FAN Zhi-Lian¹, QIAO Xi¹, MO Liang-Yu^{1*},
SHI Yun-Ping², CHEN Hai-Feng¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The effects of different concentrations of arsenic on spore germination and rhizoid and prothallium growth of *Pteris vittata* under aseptic condition were studied. The results showed that, when the concentration of arsenic of medium was more than 30 mg/L, the speed of spore germination decreased, the growth of rhizoid and prothallium was restrained, and the distribution range of rhizoid increased. But low As concentration (30 mg/L) was able to increase the greening speed of spores and growth of prothallium in early stage (in 8 days after seeding). Therefore, high As concentration is able to restrain the growth of gametophyte and change the distribution range of rhizoid, however, low As concentration accelerate the growth of gametophyte in early stage.

Key words: aseptic condition; arsenic; *Pteris vittata*; gametophyte

由于工业的发展、过量使用化肥以及废物的不合理处置, 使土壤受到重金属的严重污染。近年来用植物来修复重金属污染的土壤已取得一些进展 (Cunningham 等, 1996; Raskin 等, 1997; Salt 等, 1998)。植物修复就是筛选一些能富集重金属的植物, 然后利用这些植物除去污染土壤中的重金属。这种治理土壤的方法花费少, 因而得到广泛关注 (Salt 等, 1998; Krämer 等, 2001; McGrath 等, 2003)。所筛选的植物称为超富集植物, 对高浓度的重金属有很强的耐性, 能在体内大量富集重金属, 并且地上部分的重金属浓

度与根部的浓度比值大于 1 (Baker 等, 2002)。蜈蚣草 (*Pteris vittata*) 是最先被发现的 As 超富集植物 (Ma 等, 2001), 把蜈蚣草栽种在砷 (As) 浓度 6~50 mg/L 的土壤中 2 周, As 占叶片干物质量的 1.5%, 且 As 主要在蜈蚣草的叶子里。因此, 蜈蚣草可用来修复砷污染的土壤, 鉴于这一重要作用, 蜈蚣草受到广泛关注, 许多人开始研究其对砷的富集特征 (刘颖茹等, 2005; Singh 等, 2006), 砷在蜈蚣草体内的位置和存在形式 (Zhang 等, 2002; Tu 等, 2003), 磷或其它元素对砷吸收的影响 (Wei 等, 2006) 以及砷对这些元素

收稿日期: 2007-03-26 修回日期: 2007-05-29

基金项目: 广西大学科研启动基金 [Supported by Initial Foundation for Scientific Research of Guangxi University]

作者简介: 亢希然 (1980-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要研究方向是土壤污染植物修复。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: moliangyu99@yahoo.com.cn)

吸收的影响(肖细元等,2003;范稚莲等,2006)。蜈蚣草是一种蕨类,其生活史中具有一个独立生活的配子体世代和一个独立生活的孢子体世代。近年关于 As 和蜈蚣草关系的研究都是针对蜈蚣草孢子体植株,而 As 对蜈蚣草配子体生长发育的影响至今还不清楚。本研究在无菌条件下不同浓度的砷对蜈蚣草配子体生长的影响,为修复砷污染的土壤提供理论依据。

1 材料与方 法

培养基采用不添加蔗糖和有机物的 1/2Knop 无机盐培养基+MS 培养基的微量元素。在培养基中加入不同浓度的 As,各处理的 As 浓度分别为 0,30,50,100,150,200 mg/L,每个处理有 5 个重复,每个培养皿即为一个重复。将培养基在 120℃,1.1×10⁵ Pa 条件下灭菌 20 min,然后将培养基转入培养皿(90 cm×10 cm),每个培养皿约 10 mL。

采集孢子囊刚刚变褐色的蜈蚣草叶片,剪成 3~5 cm 的段,在超净台上先用 70% 的酒精浸泡 1 min 无菌水清洗 3 次后用 1% 的 HgCl₂ 浸泡 3 min,再用无菌水清洗 6 次。将消毒好的叶片放在无菌滤纸上用无菌风吹干后用镊子夹起,在装有培养基的培养皿上轻轻敲打,使孢子落入培养基上。播种孢子后将培养皿放到光照培养箱培养,培养温度 25℃,光合有效辐射 90 μmol photons/m²·s。孢子播后第二天开始观察测定,记为播后第一天,以后定期观察。方法:通过摄影解剖显微镜(Mz6,瑞士莱卡公司)进行观察。主要项目:孢子萌发、假根长度、假根数目、原叶体的长和宽。数据用 SPSS 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 As 对孢子萌发的影响

经观察,对照和各处理的孢子在播后第 3 天开始萌发,到第 8 天萌发率基本达 100%。As 对孢子萌发的速度影响主要是在播后第 3 天到第 5 天,各处理孢子的萌发率均低于对照(图 1)。基质中 As 浓度越大,萌发速率越低,播后第 3 天,50 mg As/L 处理的萌发速率显著($P \leq 0.05$)高于其它处理(除 30 mgAs/L),且低于对照。播后第 4 天,各处理的萌发速率都显著($P \leq 0.05$)低于对照。在播后第 5 天,30、50、100 mgAs/L 处理的萌发速率显著($P \leq 0.05$)高于 150 mgAs/L 处理的,200 mgAs/L 处理

的萌发速率最低,对照的萌发率仍最高。

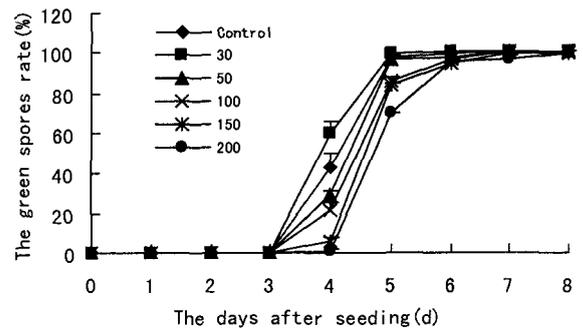


图 1 播后不同处理的孢子萌发率

Fig. 1 Germination rate of spores under different treatments

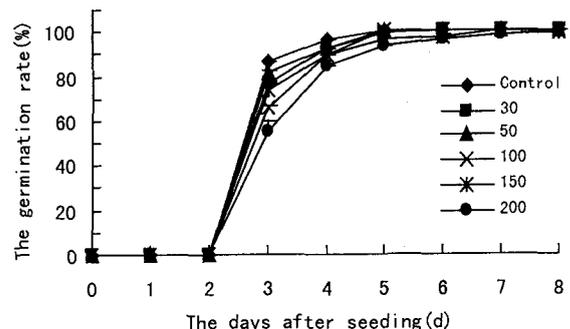


图 2 不同处理绿色孢子所占的比率

Fig. 2 Ratio of green spores to total spores under different treatments

As 对孢子变绿速率的影响。30 mgAs/L 处理加快孢子变绿的速度,As 的浓度大于 30 mg/L 时则是抑制孢子变绿的速率(图 2)。在播后第 4 天最为明显,30 mgAs/L 处理的绿色孢子数目显著($P \leq 0.05$)多于对照和其它处理,其它处理(除 30 mgAs/L 处理外)均显著($P \leq 0.05$)少于对照,而且 As 浓度越高孢子的变绿率就越低。在播后第 5 天,30 mgAs/L 处理的与对照、50 mg As/L 处理的差异不显著,30 mgAs/L 处理的达到 99%,50 mgAs/L 处理的达到 96%,对照达到 97%。播后第 8 天对照和各处理的孢子变绿率基本达到 100%。

2.2 As 对配子体假根发育的影响

播后第 3 天,孢子萌发出出一条假根,随着配子体的生长,假根数目越来越多,但不同处理的假根数目变化也有所不同。播后 12 天内,各处理的假根数目均少于对照(图 3)。播后第 12 天内(除播后第 9 天),各处理的假根数目显著($P \leq 0.05$)低于对照,各

处理间假根数目与 As 的浓度没有明显对应关系。

As 对配子体假根长度也有一定的影响。播后 12 d 内, As 处理的配子体假根长度都短于对照(图 4)。其中,播后 10 d 内影响最明显, As 处理的假根长度显著($P \leq 0.05$)短于对照,而各处理间差异与 As 的浓度没有对应关系。播后第 11 天以后,对照与处理间的差异越来越小。

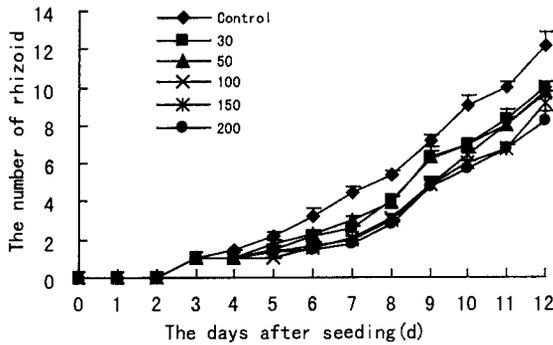


图 3 不同处理单个配子体的假根数目

Fig. 3 The number of rhizoid of each gametophyte under different treatments

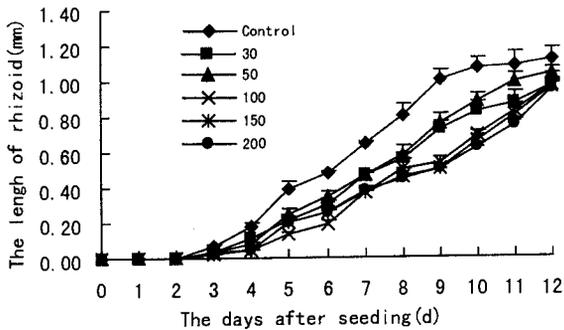


图 4 不同处理配子体的假根长度

Fig. 4 Length of rhizoid of gametophyte under different treatments

通过摄影解剖显微镜观察与拍照发现, As 对配子体假根着生点的分布有一定的影响,随着 As 浓度增大,这种影响越明显。30、50 mgAs/L 处理和对照的假根主要集中在配子体的基部,100、150、200 mgAs/L 的假根的着生点沿着原叶体边缘向上移,这种变化在 200 mgAs/L 中最为明显(图 5)。

2.3 As 对原叶体生长发育的影响

As 对原叶体生长发育的影响既有促进作用,也有抑制作用。在播后第 8 天内,30 mgAs/L 处理的原叶体面积大于其它处理和对照的,在播后 8 d 后,对照的原叶体面积大于各处理的(图 6)。在播后第 4 天和第 5 天,30 mgAs/L 的原叶体面积显著($P <$

0.05)大于对照和其它处理,50 mgAs/L 和对照的原叶体面积又显著($P \leq 0.05$)大于 100、150、200 mgAs/L 处理。在播后第 8 天,30 mgAs/L 处理的原叶体面积与对照的差异不显著($P \leq 0.05$)。从播后第 9 天开始,As 处理的原叶体面积显著($P \leq 0.05$)小于对照的,30 mgAs/L 和 50 mgAs/L 处理的原叶体面积显著大于 100、150、200 mgAs/L 处理的原叶体面积($P \leq 0.05$)。播后第 54 天,As 浓度小于或等于 150 mg/L 处理的原叶体上长出了孢子体,但孢子体数目很少,显著($P \leq 0.05$)少于对照,各处理间孢子体数目差异不显著(表 1)。

表 1 不同处理长出孢子体的数目

Table 1 The number of sporophyte under different treatments

As 浓度 Concentration (mg/L)	0	30	50	100	150	200
孢子体数目(个/重复)No. of sporophyte	12.6	2	2.5	0.2	0.6	0

表中数据是 5 个重复的平均数

3 讨论和结论

从孢子萌发到长出孢子体的过程中, As 浓度大于 30 mg/L 时,生长发育状况差于 As 浓度为 30 mg/L 处理的。主要表现为抑制孢子的萌发速度(图 1),降低绿色孢子的形成速度(图 2),抑制假根和原叶体的生长(图 3,4,6),改变了假根着生点位置(图 5),并抑制孢子体出现(表 1);而孢子的萌发率和变绿率不受影响,说明 As 只是延缓孢子萌发和叶绿素合成相关酶发挥作用的时间。假根尤其是假根长度生长虽受到抑制,但抑制作用随着配子体的生长而逐渐变弱(图 4),这可能是 As 抑制了假根细胞的分化和分裂,但随着配子体的不断成熟,假根对 As 的抗性增加的缘故。在 As 浓度大于或等于 100 mg/L 时能改变假根着生点位置的原因可能是高浓度 As 改变了原叶体边缘细胞的性质,使许多边缘细胞上长出假根。

低浓度的 30 mgAs/L 处理在孢子萌发的速度、假根生长等方面受到的抑制趋势与高浓度的相似(图 1,3,4);但不同的是,低浓度的 30 mgAs/L 处理能促进绿色孢子出现的速度(图 2),促进前期原叶体的生长(播后 8 d 前)(图 6)。这表明,在配子体生长发育的一定阶段,低浓度的 As 能促进配子体生长发育,可能是低浓度的 As 有利于原叶体细胞的分裂和膨胀;但多低的 As 浓度才能在整个配子体生长发育阶段有促进作用,仍有待于进一步研究。

以上分析表明,As 浓度大于或等于 30 mg/L 时,

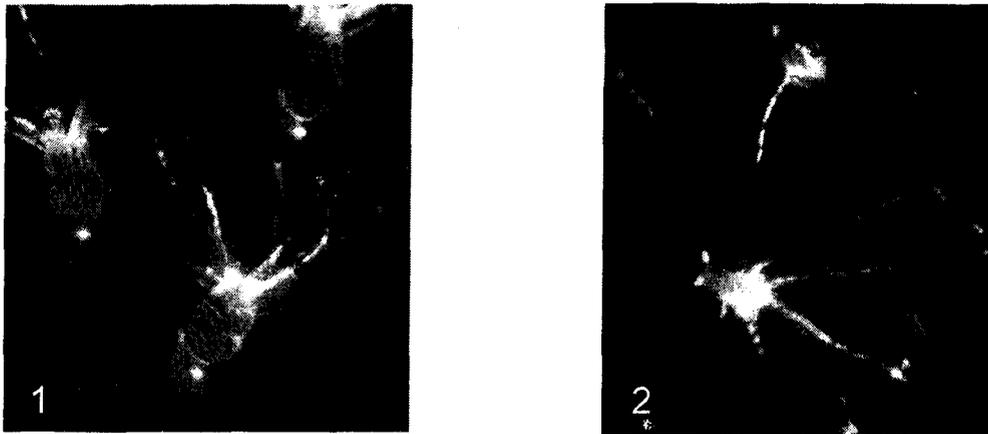


图 5 不同浓度 As 对配子体假根分布的影响

Fig. 5 Effect of different As concentrations on rhizoid distribution of gametophytes

1. 播后第 11 天对照的照片; 2. 播后第 11 天 200 mgAs/L 处理的照片。

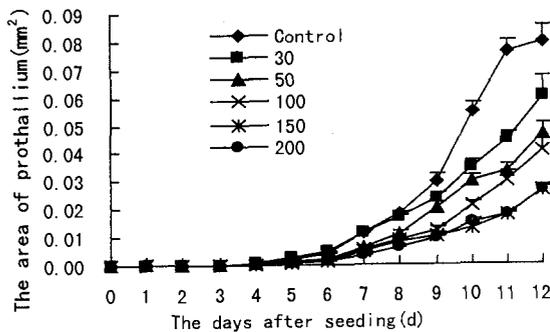


图 6 不同处理的原叶体面积

Fig. 6 The area of gametophytes under different treatments

蜈蚣草配子体生长发育受抑制。而有研究表明,蜈蚣草孢子体对 As 的抗性强于配子体。Tu 等(2005)在研究蜈蚣草孢子体时发现,As 浓度小于或等于 100 mg/kg 时,能促进蜈蚣草孢子体的生长。这说明蜈蚣草在整个生长发育过程中对 As 的抵抗能力不同,其可能的原因是二倍体对 As 的抗性弱于单倍体,蜈蚣草在配子体阶段是单倍体,因而抗性弱,而孢子体阶段是二倍体,因而抗性强。这些研究结果对利用蜈蚣草进行修复 As 污染环境时提供一些理论依据,如在培育蜈蚣草时,在配子体生长发育阶段,As 的浓度应该低于 30 mg/L,在孢子体生长发育阶段可适当提高 As 的浓度来促进幼苗生长。

参考文献:

Baker A J M, Whiting S N. 2002. In search of the Holy Grail—a further step in understanding metal hyperaccumulation? [J]. *New Phytol*, **155**:1–4
 Cunningham SD, Ow DW. 1996. Promise and prospects of phytoremediation[J]. *Plant Physiol*, **110**:715–719

Fan ZL(范稚莲), Lei M(雷梅), Chen TB(陈同斌), et al. 2006. Phosphorus availability in soil *Pteris vittata* system affected by arsenic(砷对土壤—蜈蚣草系统中磷生物有效性的影响)[J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, **26**(2):536–541
 Liu YR(刘颖茹), Chen TB(陈同斌), Huang ZC(黄泽春), et al. 2005. As-hyperaccumulation of *Pteris vittata* as influenced by As concentrations in soils of contaminated fields(野外条件下土壤砷浓度对蜈蚣草砷富集特征的影响)[J]. *Chin J Environ Sci(环境科学)*, **26**(5):181–186
 Krämer U, Chardonnens AN. 2001. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, **55**:661–672
 Ma LQ, Komar KM, Tu C. et al. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic[J]. *Nature*, **409**:579
 McGrath SP, Zhao FJ. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils[J]. *Curr Opin Biotech*, **14**:277–282
 Raskin I, Smith RD, Salt DE. 1997. Phytoremediation of metals; using plants to remove pollutants from the environment [J]. *Curr Opin Biotech*, **8**:221–226
 Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**:643–668
 Singh N, Ma LQ. 2006. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* [J]. *Environ Pollut*, **141**(2):238–246
 Tu C, Ma LQ, Zhang WH, et al. 2003. Arsenic species and leachability in the fronds of the hyperaccumulator Chinese brake (*Pteris vittata*)[J]. *Environ. Pollut.*, **124**(2):223–230
 Tu C, Ma LQ. 2005. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Environ Pollut*, **135**(2):333–340
 Wei CY, Sun X, Wang C, et al. 2006. Factors influencing arsenic accumulation by *Pteris vittata*; A comparative field study at two sites [J]. *Environ Pollut*, **141**(3):488–493
 Xiao XY(肖细元), Liao XY(廖晓勇), Chen TB(陈同斌), et al. 2003. Effects of arsenic and calcium on metal accumulation and translocation in *Pteris vittata*(砷、钙对蜈蚣草中金属元素吸收和转运的影响)[J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, **23**(8):1477–1487
 Zhang WH, Cai Y, Tu C, et al. 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant[J]. *The Sci Total Environ*, **300**:167–177