

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.03.016

陈彦安,马晓彤,王任翔,等. 球腺肿足蕨的配子体发育特征及其系统学意义[J]. 广西植物, 2013, 33(3):383—387

Chen YA, Ma XT, Wang RX, et al. Gametophyte development in *Hypodematium glanduloso-pilosum* and its systematic significance[J]. Guihaia, 2013, 33(3):383—387

球腺肿足蕨的配子体发育特征及其系统学意义

陈彦安¹, 马晓彤³, 王任翔^{1,2*}, 李丽诗¹

(1. 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004; 2. 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541004; 3. 梧州市第十中学, 广西 梧州 543000)

摘要: 采用改良 Knop's 营养液液体和固体培养基, 对球腺肿足蕨的孢子进行人工培养, 利用光学显微镜观察其孢子的萌发及配子体发育过程。结果表明: 成熟的孢子深褐色, 不透明, 极面观为椭圆形, 赤道面观为豆形, 单裂缝, 周壁具密集的波纹状褶皱。孢子萌发类型为书带蕨型, 原叶体发育类型为三叉蕨型。孢子接种后 7 d 左右萌发, 30 d 左右形成为片状体, 50 d 左右发育为幼原叶体, 幼原叶体不对称, 但成熟原叶体心脏形对称。原叶体边缘及背腹面都具乳头状毛状体。75 d 左右精子器出现, 精子器近圆球形, 由 3 个细胞构成。90 d 左右颈卵器出现, 成熟颈卵器颈部由 4~5 列细胞构成, 3~5 层细胞高。原叶体受精后 1 个月内可看到幼孢子体生成。最后讨论其系统学意义。

关键词: 肿足蕨属; 孢子萌发; 配子体发育; 系统学意义

中图分类号: Q944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)03-0383-05

Gametophyte development in *Hypodematium glanduloso-pilosum* and its systematic significance

CHEN Yan-An¹, MA Xiao-Tong³, WANG Ren-Xiang^{1,2*}, LI Li-Shi¹

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University) co-established by Guangxi and ministry of Education, Guilin 541004, China; 3. No. 10 Middle School of Wuzhou, Wuzhou 543000, China)

Abstract: The spores of the *Hypodematium glanduloso-pilosum* were artificially cultured in Knop's liquid and solid culture media. Its spore germination and gametophyte development were observed by optical microscope. The results showed that mature spores were dark brown, opaque, elliptical in polar view and bean-shaped in equatorial view, single fracture and peripheral wall with dense corrugated folds. The type of spore germination was *Vittaria*-type while that of gametophyte development was *Aspidium*-type. The spores germinated about 7 days after sowing. The prothallial plates formed about 30 days after sowing. The young prothallium developed about 30 days after sowing, and they were not symmetry, but the mature prothallium was symmetrical cordate. Papillary trichomes spread on upper and lower surfaces and along the margin of the prothallium. The antheridia was visible 75 days after sowing, pellet shape, consisting of 3 cells. About 90 days after sowing, archegonia was available. The neck of mature archegonium was composed of 4—5 rows of cells and 3—5 layers of cells high. Sporophytes were present within one month after fertilization. The paper preliminary discussed its taxonomic significance.

收稿日期: 2012-12-05 修回日期: 2013-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(31060030); 广西自然科学基金(2011GXNSFA018089); 广西教育厅项目(201010LX070); 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室研究基金(桂科能 1001Z017); 广西壮族自治区研究生教育创新计划项目(2011106020710M54)

作者简介: 陈彦安(1986-), 女, 广西平南县人, 硕士研究生, 从事蕨类植物学研究, (E-mail) 84040654@qq.com。

通讯作者: 王任翔, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事细胞学和蕨类植物系统学研究, (E-mail) wrx05@126.com。

Key words: *Hypodematium*; spore germination; gametophyte development; systematic significance

球腺肿足蕨(*Hypodematium glanduloso-pilosum*)隶属于肿足蕨科(Hypodematiaceae)肿足蕨属(*Hypodematium*),在我国产于河南南部(大别山)、江苏南部(南京、江浦)、福建西南部(龙岩)及广西桂平,生于干旱的石灰岩石缝中(邢公侠,1999;覃海宁等,2010)。肿足蕨属最早由 Kunze 于 1833 年提出,全属目前约 16 种,主产于亚洲和非洲的亚热带和暖温带地区,中国为本属的分布中心。肿足蕨的系统位置及近缘科属间关系,曾经存在各种各样的意见。过去曾将它放在金星蕨科(秦仁昌,1963)、鳞毛蕨科(Christensen, 1905)或蹄盖蕨科(Pichi, 1977);秦仁昌(1975)将肿足蕨属从金星蕨科中分成立了肿足蕨科,其位置介于蹄盖蕨科(Athyriaceae)与金星蕨科(Thelypteridaceae)之间。

配子体发育的研究对蕨类植物的分类和系统演化的研究具有重要的意义(Stokey, 1960; Nayar & Kaur, 1971; Atkinson, 1973; 包文美等, 1994)。目前对肿足蕨属植物配子体发育的研究很少(Loyal, 1960; Nayar & Bajpai, 1970; 郭治友等, 2010)。郭治友等(2010)认为,虽然在配子体发育特征上,肿足蕨(*Hypodematium crenatum*)同蹄盖蕨科和金星蕨科有较多相同之处,但也存在差异,反映出他们彼此之间的系统关系较远。球腺肿足蕨的叶柄、叶轴、羽片和囊群盖上均有针状毛和乳头状毛,而肿足蕨则只有针状毛。本文首次对球腺肿足蕨进行人工培养,并在显微镜下详细观察和记录其孢子萌发和配子体发育各个阶段的形态特征,为肿足蕨属植物的配子体发育提供新的资料,为其系统分类学研究提供配子体方面的证据。

1 材料和方法

1.1 材料

球腺肿足蕨采自广西桂平罗丛岩石缝间,凭证标本存放于广西师范大学标本室。成熟孢子连同叶片用纸袋密封存冰箱,实验时选取具有成熟孢子的叶片,将成熟孢子囊、孢子从球腺肿足蕨的叶背面刮下来,用手搓动孢子囊,使孢子散落,除去杂质后把孢子装于密封纸袋中,置于 4℃ 冰箱中保存。

1.2 方法

采用改良 Knop's 营养液体培养和固体培养,

改良的 Knop's 营养液配方见表 1,固体培养另加 0.7% 琼脂粉。培养基经 121℃ 高温、高压灭菌 20 min 左右。在无菌操作条件下,用滤纸包好成熟的孢子,折成 2 cm² 左右,75% 酒精消毒 30 s,无菌水漂洗 1 遍,5% NaClO 消毒 10~15 min,无菌水漂洗 3 遍,超净工作台上接种于 Knop's 无菌培养基上。培养箱温度 25℃,日光灯光源 12 h/d,强度为 2 500 lx。光暗交替为 12h/12h。重复培养多次,在配子体发育的各个阶段用光学显微镜进行活体观察记录,精子用龙胆紫染色液处理,镜检后用 OLYMPUS DP70 拍摄照片。

2 观察结果和分析

2.1 孢子及孢子萌发

成熟的孢子深褐色,不透明,大小为 29.6 μm×42.3 μm(各数据为随机测得的 10 个数值的平均值),极面观椭圆形(图版 I:1),赤道面观肾形(图版 I:2),单裂缝,周壁具密集的波纹状褶皱。孢子播种后吸水膨胀,接种 7 d 左右孢子开始萌发,萌发时,孢子壁先沿其裂缝开裂,裂口处长出一个含叶绿体的绿色细胞,无初生假根,孢子壁宿存。随着细胞的生长,绿色细胞底部分裂出一条假根(图版 I:3 箭头示),假根无色透明,具薄壁,不分枝。孢子萌发为书带蕨型(*Vittaria*-type)(Nayar & Kaur, 1971)。

表 1 改良的 Knop's 营养液
Table 1 Modified recipe of Knop's solution

试剂 Reagent	浓度 Concentration (mg · L ⁻¹)
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1 000
KNO ₃	250
KH ₂ PO ₄	250
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	12.5
NaNO ₃	微量 Trace
蒸馏水 Distilled water	定容至 1 000 mL

注: pH=7.0

2.2 丝状体

原叶体原始细胞先横分裂为二(图版 I:4),顶端细胞再经过连续横分裂,接种 15 d 左右发育成 3~8 个细胞长的单列丝状体(图版 I:5)。丝状体细胞呈圆筒状,侧壁向外鼓出,细胞长度与直径有些几乎等长,有些细胞高度略大于宽度,内分布较多叶绿

体,多为圆饼状呈鲜亮的绿色(图版 I:4 箭头示),顶端的细胞中叶绿体数量较丰富且多分布整个细胞,而其他细胞叶绿体多位于边缘。

水培的丝状体则由于缺乏养分普遍比较瘦弱,细胞比培养基培养的更长,呈长条形(图版 I:6 箭头示)。水培养的配子体发育到片状体阶段后生长缓慢后逐渐死亡,不能形成正常的原叶体。

2.3 片状体

大部分丝状体在 2~5 细胞长时,顶端细胞纵向分裂成 2 个或多个顶端细胞,各自进行分裂(图版 I:6-9)。也有的单列丝状体的基部或中部横生出一个顶端细胞(图版 I:9)。接种 30 d 左右,可见有部分丝状体发育成片状体。丝状体顶端细胞纵向分裂,然后再左右交替斜向分裂,由一维生长变成了二维生长,形成片状体(图版 I:10-12)。片状体较长、较大,长度 0.5~1.1 mm,宽度 0.2~0.4 mm。随着片状体不断发育,基部及腹部假根数量逐渐增多,边缘细胞长出更多毛状体,叶绿体更丰富,两侧细胞分裂增多。

顶端细胞常产生单细胞乳头状突起的毛状体(图版 I:7,8 箭头示),其细胞内含叶绿体,这些突起的毛状体可发育成假根。

2.4 原叶体

接种 50 d 左右,肉眼可见培养基表面有明显的浅绿色组织,此为幼原叶体(图版 I:13)。幼原叶体多不对称,边缘大多凹凸不平(图版:14),其基腹部及表面都生长有毛状体,前端出现凹陷,即幼原叶体的生长点(图版 I:15),顶端及边缘细胞与表面细胞形态差异明显,为多列紧密排列的楔形小细胞,楔形细胞不断斜向分裂形成分生组织,凹陷加深,顶端细胞侧生出的细胞不再分裂,顶端细胞不断分裂,幼原叶体细胞增多,细胞壁不断增厚,两翼面积增大,形成成熟原叶体。成熟原叶体为深绿色,呈对称心形,两翼展开(图版 I:16),大小为 $(2.4\sim 4.5)\mu\text{m}\times(3.6\sim 8.1)\text{mm}$,假根数量增多成丛(图版 I:17),变成深褐色。叶绿体分布均匀。表面及边缘均有毛状体。原叶体的发育为三叉蕨型(*Aspidium*-type)(Nayar & Kaur, 1971)。本研究在培养基中发现许多形状不规则的原叶体,其上长有生殖器官(精子器和颈卵器),预示着性器官的成熟程度。

2.5 毛状体

在配子体发育中,球腺肿足蕨只出现乳头状单细胞毛状体。毛状体最早出现于丝状体顶端,一般

由单个营养细胞外突构成。在片状体阶段,毛状体只出现于边缘的前端细胞上,数量较多,从幼原叶体开始,毛状体开始出现于背腹面,但分布较稀疏。毛状体内始终含有叶绿体。发育至成熟原叶体阶段,毛状体的数量也逐渐增多,位于原叶体边缘(图版 I:18)和表面(图版 I:19),原叶体边缘每隔 3~5 个细胞产生一条毛状体。针状毛直到幼孢子体才出现(图版 I:20)。

2.6 假根

假根最早出现于丝状体时期,且只生长出一条,初生假根白色透明(图版 I:3 箭头示),个别具有少量叶绿体,随着配子体的不断发育,假根的数量会越来越多,到了原叶体时期,其基部和腹部都密生假根,即假根丛(图版 I:17)。当原叶体逐渐成熟,约过 10 d,假根由原来的无色,逐渐变成黄褐色,偶见分叉及尖端膨大,直径约 $20\mu\text{m}$,其中短的呈管状,长的则多呈现出不规则弯曲,基部较大,长度不一,长度在几十微米到几毫米之间,数量 1 000 多条。

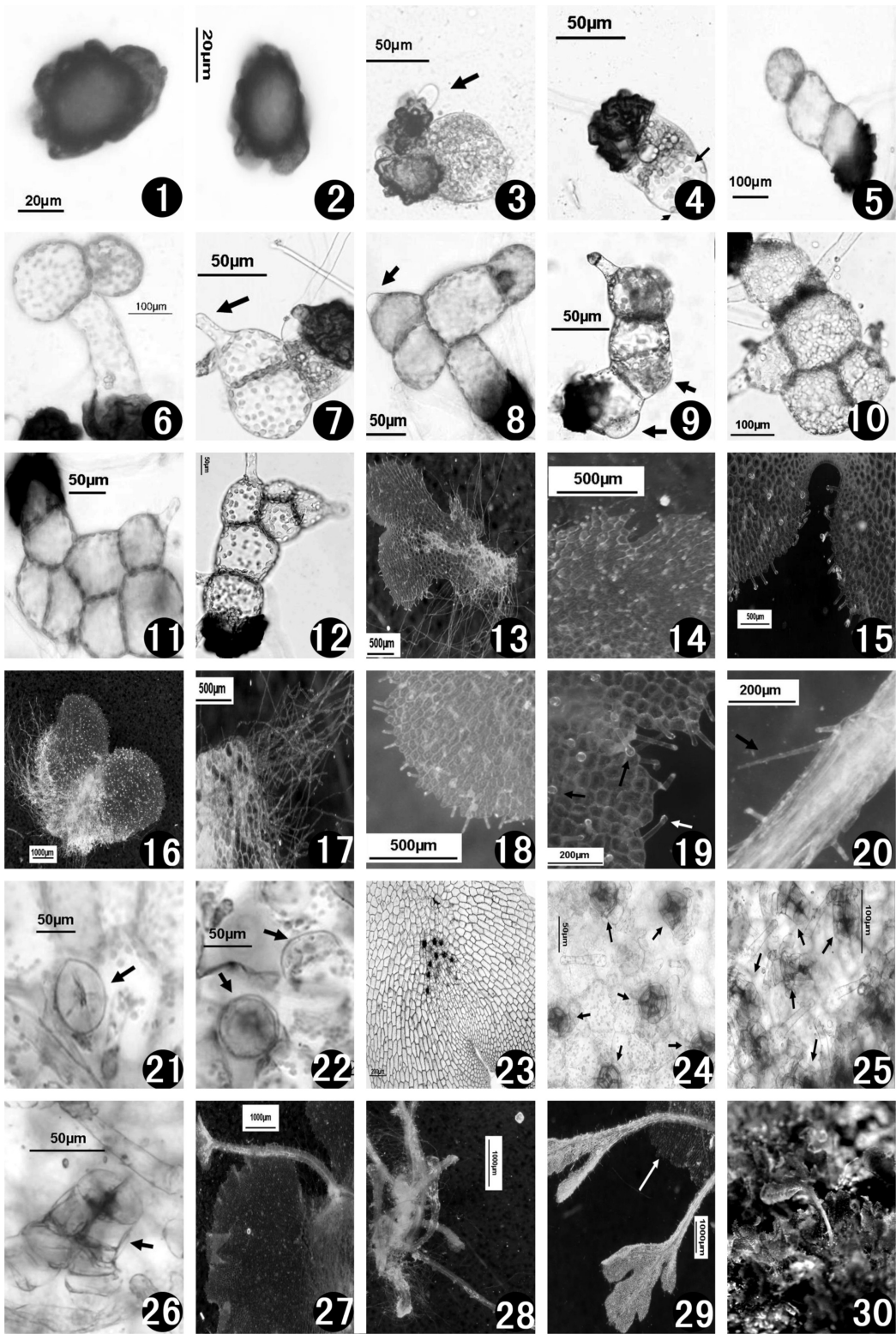
2.7 性器官

培养 12 周左右,将成熟原叶体腹面朝上放在载玻片上,精子器成熟时,将配子体从培养基上取出,制成临时装片标本,在显微镜下观察。利用龙胆紫染色液将精子器和假根染成紫色,能增加视觉反差,使观察效果更好。球腺肿足蕨配子体雌雄同株。精子器主要着生于假根丛中,数量较多。精子器顶面观呈长圆球形(图版 I:21),侧面观为圆形或椭圆形(图版 I:22 前头示),直径约 $58\mu\text{m}$,高约 $30\mu\text{m}$ 。它的壁由 3 细胞组成,即基细胞,环细胞和盖细胞。盖细胞较小,基细胞使精子器附着于原叶体上,略长于中间的环细胞,由 3 个细胞包围着内部的若干精细胞。精子成熟时盖细胞孔裂使精子放出。

90 d 左右颈卵器出现。颈卵器常着生于精子器上方,即生于近心脏形配子体腹部(图版 I:23),凹陷部位的下方,并向后倾。成熟颈卵器顶面观为铜钱状(图版 I:24),颈部由 4~5 列细胞组成,直径为 $40\sim 60\mu\text{m}$,侧面观柱状,基部大于顶部(图版 I:25、26),突出,略弯曲,由 3~5 层细胞组成,高 $60\sim 100\mu\text{m}$,当颈卵器顶部的盖细胞开裂,精子即可进入颈卵器与卵结合形成受精卵。未受精的颈卵器一般会变为褐色。

2.8 胚及幼孢子体的发育

球腺肿足蕨受精后 1 个月内即可观察到从原叶体上生成的幼孢子体(图版 I:27)。幼孢子体长出



图版 I 球腺肿足蕨的配子体发育过程 1. 孢子赤道面观; 2. 孢子极面观; 3. 孢子萌发开裂(箭头示假根); 4-5. 丝状体(箭头示叶绿体); 6-9. 丝状体细胞分裂(箭头示毛状体); 10-12. 片状体; 13. 幼原叶体; 14. 幼原叶体边缘; 15. 生长点; 16. 成熟原叶体; 17. 假根丛; 18-20. 毛状体(箭头示); 21-22. 精子器(箭头示); 23-26. 颈卵器(箭头示); 27-29. 幼孢子体; 30. 幼苗。

Plate I Gametophyte development process of *H. glanduloso-pilosum* 1. Equatorial view of spore; 2. Polar view of spore; 3. Spore germination (arrow showing rhizoid); 4-5. Filament (arrows showing chloroplasts); 6-9. Filament cells division (arrows showing trichomes); 10-12. Prothallial plate; 13. Young prothallium; 14. Margin of young prothallium; 15. Growing point; 16. Mature prothallium; 17. Rhizoids plexus; 18-20. Trichomes (arrows); 21-22. Antheridium (arrows); 23-26. Archegonia (arrows); 27-29. Young sporophyte; 30. Young seedling.

1~5 片叶片后, 叶绿体逐渐解体, 毛状体不脱落, 原叶体退化(图版 I : 28、29 箭头示)。将幼孢子体从培养容器中取出, 洗净后密植于经高温灭菌的土壤培养皿中, 喷水加盖保持湿润, 其他条件与前面所述相同, 原叶体形成幼苗率达 90% 以上(图版 I : 30)。

3 讨论

球腺肿足蕨孢子为深褐色, 二面体型, 单裂缝, 周壁具密集的波纹状褶皱, 孢子萌发为书带蕨型, 原叶体发育为三叉蕨型。球腺肿足蕨的毛状体最早出现在丝状体阶段, 随着配子体发育而数量不断增加, 在成熟的原叶体阶段, 毛状体不仅分布在原叶体基腹部, 边缘和表面也有, 内含有大量的叶绿体。这些均与肿足蕨孢子的萌发、配子体发育及形态特征相似(Loyal, 1960; Nayar & Bajpai, 1970; 郭治友等, 2010), 说明两者亲缘关系十分相近。

球腺肿足蕨与肿足蕨的配子体都有乳头状毛状体, 但肿足蕨的配子体还具有针状毛状体(Loyal, 1960; Nayar & Bajpai, 1970; 郭治友等, 2010)。肿足蕨在成熟的原叶体开始出现的针状毛, 而球腺肿足蕨的配子体则不出现针状毛, 他的针状毛直到幼孢子体才出现。在成熟的孢子体中, 球腺肿足蕨的叶柄、叶轴、羽片和囊群盖上均同时有针状毛和乳头状毛, 而肿足蕨则只有针状毛。由此可见, 球腺肿足蕨与肿足蕨的毛状体无论在配子体阶段还是在孢子体阶段都不一样, 这为种的鉴定及系统学研究提供了新的证据。

肿足蕨科的系统位置仍有较大争议, 它曾放在金星蕨科(秦仁昌, 1963)、鳞毛蕨科(Christensen, 1905)或蹄盖蕨科(Pichi, 1977; 秦仁昌, 1975)中。目前的分子证据对肿足蕨属的系统位置提出了一些不同观点。Smith *et al.* (2006) 在新的世界蕨类分类系统中, 认为肿足蕨属与大膜盖蕨属的亲缘关系最近, 并把它放在鳞毛蕨科中; Liu *et al.* (2007) 依据两个叶绿体基因的分析结果也支持肿足蕨属和大膜盖蕨属近缘, 但与鳞毛蕨科亲缘关系远。金星蕨科、蹄盖蕨科、鳞毛蕨科及肿足蕨属植物孢子萌发方式大都为书带蕨型, 但原叶体发育方式存在差异, 金星蕨科有铁线蕨型(包文美等, 1994)、三叉蕨型(包文美等, 1994), 鳞毛蕨科有三叉蕨型(王全喜等, 1995), 蹄盖蕨科有铁线蕨型(张开梅等, 2010)、三叉

蕨型, 肿足蕨与球腺肿足蕨的原叶体萌发方式都为三叉蕨型。从孢子萌发和原叶体发育方式看, 肿足蕨科与金星蕨科、蹄盖蕨科和鳞毛蕨科有一些不同, 但也有一定的亲缘关系。因此, 肿足蕨属的系统位置还有待于进一步的研究。

参考文献:

- 邢公侠. 1999. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 4(1): 3—14
- Atkinson LR. 1973. The gametophyte and family relationships[J]. *Bot J Lin Soc*, 67(Suppl.1): 73—90
- Bao WM(包文美), Wang QX(王全喜), Ao ZW(敖志文). 1994. Studies on the development of gametophytes of ferns from north-eastern China Ⅷ. Thelypteridaceae(东北蕨类植物配子体发育的研究 Ⅷ. 金星蕨科)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 14(4): 409—415
- Ching RC(秦仁昌). 1963. A reclassification of the family Thelypteridaceae from the mainland of Asia(亚洲大陆金星蕨科新分类系统)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 8(4): 289—335
- Ching RC(秦仁昌). 1975. Two new fern families(蕨类植物的两新科)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 13(1): 96—98
- Christensen C. 1905. Index Filicum[M]. Hafniae: Hagerup
- Dyer. 1979. The experimental biology of ferns[J]. *Exp Bot Math-em Sci Eng*, (14): 657
- Guo ZY(郭治友), Liu HM(刘红梅). 2010. Studies on the gametophyte development of *Hypodematium crenatum* (Forssk.) Kuhn(肿足蕨的配子体发育研究)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 18(3): 245—250
- Liu HM(刘红梅), Zhang XC(张宪春), Chen ZD(陈之端). 2007. Molecular phylogeny of the fern family Dryopteridaceae inferred from chloroplast *rbcl* and *atpB* genes(鳞毛蕨科的分子系统发育: 叶绿体 *rbcl* 和 *atpB* 序列证据)[J]. *Int J Plant Sci*(国际植物科学杂志), 168(9): 1 311—1 323
- Loyal DS. 1960. Some observations on the gametophyte of *Hypodematium crenatum* (Forsk.) Kuhn with a note on the phyletic affinities of the genus[J]. *J Ind Bot Soc*, 39: 133—139
- Nayar BK, Bajpai N. 1970. A reinvestigation of the morphology of *Hypodematium crenatum*[J]. *Am Fern J*, 60(3): 107—118
- Nayar BK, Kaur S. 1971. Gametophytes of homosporous ferns[J]. *Bot Rev*, 37(3): 346—347
- Smith AR, Pryer KM, Schuettpelz E, *et al.* 2006. A classification for extant ferns[J]. *Taxon*, 56(3): 705—731
- Stokey AG. 1960. Multicellular and branched hairs on the fern gametophyte[J]. *Am Fern J*, 50: 78—87
- Wang QX(王全喜), Shao CW(邵成文), Cao JG(曹建国), *et al.* 1995. Studies on the development of gametophytes of ferns from north-eastern China Ⅺ. Dryopteridaceae(东北蕨类植物配子体发育的研究 Ⅺ. 鳞毛蕨科)[J]. *J Harbin Norm Univ: Nat Sci Edit*(哈尔滨师范大学学报·自然科学版), 11(4): 83—89
- Zhang KM(张开梅), Fang YM(方炎明), Wan J(万劲). 2010. Gametophyte development of *Athyrium niponicum* (日本蹄盖蕨配子体发育的研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 30(5): 513—516