



文章编号: 1000-4025(2013)02-0301-05

中华刺蕨和长耳刺蕨配子体发育研究

郭严冬¹, 曹建国^{1*}, 戴锡玲¹, 王全喜¹, 李宝贵²

(1 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234; 2 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

摘要: 采用光镜观察, 对中华刺蕨和长耳刺蕨配子体发育进行了观察研究。结果表明: 中华刺蕨和长耳刺蕨的孢子和配子体发育特征相似, 孢子均两侧对称, 单裂缝, 孢子萌发方式为书带蕨型; 配子体经丝状体、片状体发育为心形原叶体, 毛状体多产生于幼原叶体生长点两侧边缘, 为多细胞棒状, 原叶体发育方式为槲蕨型; 幼原叶体阶段即可产生精子器, 而颈卵器只产生于大型心形原叶体生长点下方, 性器官发育类型为薄囊蕨型, 卵受精后发育成孢子体。该研究结果支持秦仁昌将刺蕨属和实蕨属独立为实蕨科的观点。

关键词: 中华刺蕨; 长耳刺蕨; 配子体

中图分类号: Q944.5

文献标志码: A

Studies on the Development of Gametophyte of *Egenolfia sinensis* and *Egenolfia bipinnatifida*

GUO Yandong¹, CAO Jianguo^{1*}, DAI Xiling¹, WANG Quanxi¹, Li Baogui²

(1 College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China)

Abstract: Gametophyte development of *Egenolfia sinensis* and *E. bipinnatifida* (Bolbitidaceae) were studied by the microscopy. The results indicate that both of them have similar features in spore germination and gametophyte development. The spores are bilateral, allmonolete. The spore germination pattern is the vitaria-type. The gametophyte development undergoes the filament and plate and finally forms the heart-shaped prothallus. Club-shaped, multicellular, marginal hairs are mostly found on the young prothallus towards the anterior end. The development of the prothallus is the drynaria-type. Sperms are produced in the young prothallus stage, while the archegonia are produced only in growing point under the large heart-shaped prothallus. Sex organs are the leptosporangiate-type. After fertilization, the zygotes develop into sporophyte. We discussed the phylogenetic relationship of Bolbitidaceae, Dryopteridaceae and Lomariopsidaceae through comparisons of the gametophyte development.

Key words: *Egenolfia sinensis*; *E. bipinnatifida*; gametophyte

刺蕨属(*Egenolfia*)和实蕨属(*Bolbitis*)原属于藤蕨科(Lomariopsidaceae)^[1]; 秦仁昌主要依据孢子体特征将该两属从藤蕨科独立出来, 单列为实蕨科(Bolbitidaceae)^[2]。近来的分子系统学分析认为实蕨科应包含于鳞毛蕨科(Dryopteridaceae)中, 并将刺蕨属并入实蕨属^[3-4]。这些研究表明有关实蕨科的分属学研究还存在一定争议, 而配子体发育对阐

明蕨类科属关系具有重要价值^[5]。有关实蕨科配子体发育的研究, Momose^[6]对 *Bolbitis subcordata* 成熟配子体做了较详细观察, Nayar 等^[7]对实蕨属和刺蕨属的一些种的配子体发育进行了研究; 孙淑红等^[8]对实蕨科中的刺蕨和实蕨的配子体发育进行了研究, 但均缺少性器官发生阶段的描述, 对毛状体发育的研究也不甚完善。本研究对刺蕨属中华刺蕨

* 收稿日期: 2012-10-26; 修改稿收到日期: 2013-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(30970267); 上海市教委重点项目(12ZZ128)

作者简介: 郭严冬(1990-), 女, 上海师范大学 硕士研究生, 主要从事蕨类植物生殖与发育生物学研究。E-mail: gydshnu@163.com

* 通信作者: 曹建国, 副教授, 主要从事蕨类植物生殖与发育生物学研究。E-mail: caojianguo101@163.com

(*Egenolfia sinensis*)和长耳刺蕨(*Egenolfia bipinnatifida*)配子体发育过程进行了详细观察,比较了实蕨科与鳞毛蕨科、藤蕨科的配子体发育的不同,对阐明实蕨科的分类地位有一定的科学价值。

1 材料和方法

中华刺蕨和长耳刺蕨的孢子于 2011 年 10 月采自云南西双版纳植物园。将带成熟孢子的叶片收集于标本纸中,置于干燥通风处使孢子自然散落。10 d 后将孢子去杂并收集于硫酸纸袋中,置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。凭证标本现存放于上海师范大学植物标本室。

将成熟孢子置于 5% 的次氯酸钠溶液中消毒 3 min,无菌水离心洗涤 3 次,获无菌孢子悬浊液。用滴管将此悬浊液均匀涂布在改良的 Knop's 固体培养基上。接种后将其置于 ZRX-300E 型智能人工气候培养箱内,光照 $18 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,照度约为 2 000 lx,温度为 25 ℃,黑暗 6 h,温度为 20 ℃。在配子体发育的各个阶段用解剖镜(Nikon SMZ1500)和光学显微镜(Nikon E800)进行观察并照相记录。

2 观察结果

2.1 孢子及其萌发

中华刺蕨和长耳刺蕨孢子为同型孢子,褐色,单裂缝,近球形,极轴长 $27 \sim 35 \mu\text{m}$,赤道轴长为 $41 \sim 52 \mu\text{m}$ 。光镜下,中华刺蕨孢子具明显的褶皱,表面具少许颗粒状纹饰(图版 I,1)。接种 30~40 d 后,孢子萌发,长出假根。长耳刺蕨孢子纹饰与中华刺蕨相同(图版 II,1),孢子接种 20~30 d 后,渐变为绿色,开始萌发,向一端发育出 1 条或 2 条近乎无色透明的假根(图版 II,2)。两者萌发方式均为书带蕨型^[7]。

2.2 丝状体

假根产生后,自孢子裂缝处产生绿色原叶体细胞,原叶体细胞进行连续几次横分裂形成丝状体。中华刺蕨孢子萌发后 15 d 左右可形成 2~6 个细胞的丝状体(图版 I,2、3),丝状体细胞圆筒状,基部细胞较大,先端细胞较小且其内叶绿体数量较多,当丝状体达到 3~6 个细胞时,开始纵分裂进入片状体时期。长耳刺蕨孢子伸出假根后 12 d 左右,原叶体细胞经过横分裂形成 3~6 个细胞的丝状体(图版 II,3),丝状体细胞富含叶绿体。

2.3 片状体

中华刺蕨的丝状体继续培养 15~25 d 后顶端

和居间细胞进行纵向分裂形成片状体(图版 I,4)。片状体顶端产生的分生细胞通过反复分裂使基部衍生的细胞逐个增多,顶部形成分生组织,片状体时期基部的细胞近长方形,随着片状体细胞的增多,细胞近方形(图版 I,5),细胞内含丰富的叶绿体,叶绿体一般呈圆形或椭圆形。在一些片状体上出现了毛状体(图版 I,6)。

长耳刺蕨的丝状体培养 10~20 d 后开始纵分裂进入片状体时期(图版 II,4)。在片状体时期假根随着片状体的发育不断增多,生长点由片状体先端细胞分裂而形成。片状体细胞大小不均一,形状大多近方形,片状体细胞内富含叶绿体,近球形,颜色鲜绿。

2.4 原叶体

中华刺蕨的原叶体出现于接种 70~80 d 后,由于细胞横裂次数大于纵裂次数,从而使生长点两侧凸出,生长点下陷,发育为心形的原叶体,生长点位于中上方的凹陷处,原叶体基部多呈尾状,腹面发育出数条假根,此时的幼原叶体常常不规则(图版 I,7)。在之后的发育过程中多形成规则的心形原叶体(图版 I,8、9)。

长耳刺蕨孢子培养约 60~70 d 后产生原叶体,分生细胞分裂的速度较它衍生的细胞慢,使幼原叶体呈披针形,两翼渐上延,生长点渐下陷(图版 II,5);腹面发育出数条假根,边缘陆续产生毛状体,此时幼原叶体常常左右不对称(图版 II,6)。在之后的发育过程中可调整为对称的心形(图版 II,7),生长点上方的凹陷较深,呈“V”型。中华刺蕨与长耳刺蕨的原叶体发育方式均为槲蕨型^[7]。

2.5 毛状体

中华刺蕨和长耳刺蕨最初的毛状体最初由片状体顶端的细胞分裂产生,大多为棒状多细胞,先端膨大,内含少量叶绿体。此后,原叶体生长点细胞可继续形成毛状体,随着生长,毛状体可分布于原叶体的边缘。中华刺蕨的毛状体通常有 3~5 个细胞,毛状体朝向原叶体的生长点处生长(图版 I,11、12)。而长耳刺蕨的毛状体一般发育为 2~3 个细胞(图版 II,8)。30~40 d 后,叶绿体几乎全部解体,有时可发现毛状体细胞脱落的现象。

2.6 假根

中华刺蕨和长耳刺蕨的初生假根均是孢子萌发时细胞壁外突延长产生的,初生假根呈管状,内含少数叶绿体,无色透明,直径约为 $5 \sim 10 \mu\text{m}$,次生假根发生于原丝体形成之后,由营养细胞外凸分裂产生,

初期一般为 1~3 根,随着配子体细胞的不断增多,假根也随之增多,由分布于丝状体基部和片状体边缘细胞,逐渐扩展到原叶体腹面(图版 I, 4、5、8;图版 II, 5~7)。进入成熟配子体阶段后,假根的数量均可增至百余条。假根幼时无色透明,少数含有叶绿体或其他内容物质,大小不一。假根生长约 20 d 后,逐渐变为褐色并慢慢枯萎,最后死亡。

2.7 精子器及颈卵器

中华刺蕨在培养 80~90 d 后在腹面假根丛中产生精子器,数量较多(图版 I, 9),精子器直径约 40~60 μm ,透明,均质;侧面观为长圆形,顶端微窄(图版 I, 10)。长耳刺蕨在培养 60~75 d 后产生精子器,最早的精子器产生于原叶体的表面(图版 II, 9),直径约 35~45 μm ,透明,均质,外观与中华刺蕨相似(图版 II, 10)。精子器由 2 个基本等高的环细胞和 1 个盖细胞组成,精细胞成熟时,盖细胞中央孔裂,精细胞从盖细胞的开口处溢出。自精子器形成至精子成熟并释放约需 12 d,精子释放 15~20 min 后,若不与卵结合则会死亡或解体。

接种约 90~95 d 后,中华刺蕨颈卵器(图版 I, 13、14)开始出现,通常着生于生长点下方,数目 5~15 不等,大小不一,成熟颈卵器细长,侧面观为圆筒形,向基部弯曲,约 5~6 层细胞,性器类型为薄囊蕨型^[7]。长耳刺蕨在接种 3 个月后产生颈卵器(图版 II, 11),发育类型与中华刺蕨基本相同,中华刺蕨与长耳刺蕨的成熟颈卵器数目都较多,其他形态特征与王晓楠等^[9]的描述类似。卵细胞成熟后,在适宜条件下可发生受精作用,而未受精的颈卵器在一段时间后会逐渐退化,变为深褐色。

2.8 有性生殖与孢子体

在营养充足、条件适宜的情况下,精子器释放精子,颈卵器释放粘性物质、露出颈沟以便于精子进入,发生受精作用,进而胚胎发育形成新的孢子体(图版 I, 15、16;图版 II, 12、13)。中华刺蕨和长耳刺蕨的新生孢子体随着营养物质的吸收会逐渐长大,中华刺蕨受精后 30 d 左右可长至 2 cm 左右,长耳刺蕨孢子体在受精后培养 30~50 d 左右可长到 8

cm 左右。如移栽到土壤并给予合适生长条件可长成成熟的孢子体植株。

3 讨 论

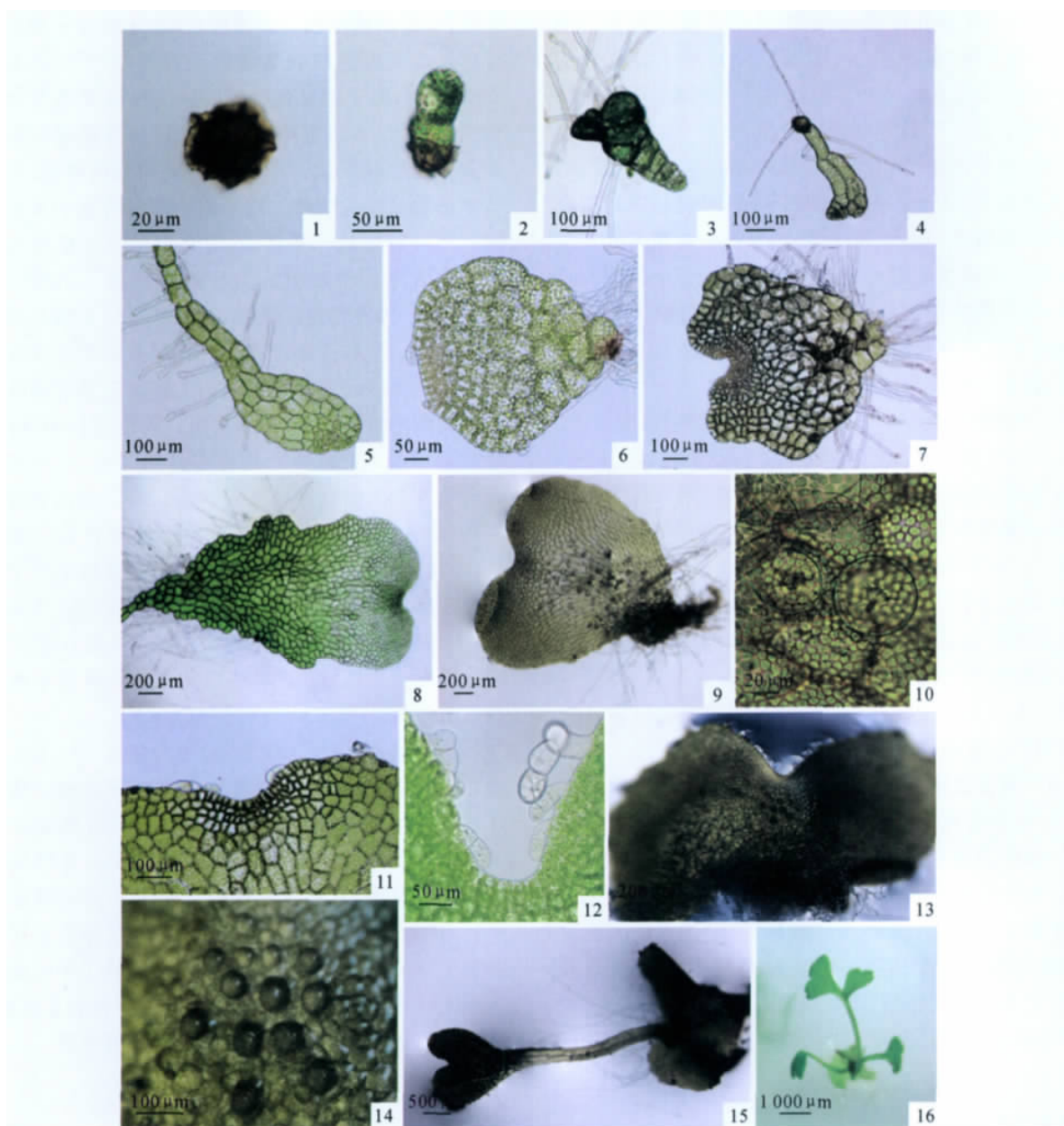
Holtum^[10]将舌蕨属(*Elaphoglossum*)、实蕨属、刺蕨属归入舌蕨科(Elaphoglossaceae),Nayar 等^[7]将实蕨属、刺蕨属、舌蕨属归于藤蕨科,后秦仁昌^[11]将实蕨属和刺蕨属从藤蕨科独立出来,单列为实蕨科,舌蕨属则独立为舌蕨科;近来的分子系统学分析认为实蕨科应包含于鳞毛蕨科中^[3-4]。Atkinson 曾指出配子体发育对阐明蕨类科属关系具有重要的价值^[5],本研究中中华刺蕨和长耳刺蕨的孢子萌发为书带蕨型,原叶体发育方式均为栅蕨型,且具有多细胞棒状毛状体。这与鳞毛蕨科普遍的叉蕨型原叶体发育方式^[7]不相同,且它们的毛状体也与鳞毛蕨科大多为单细胞乳突状的毛状体^[7]不同。由此,从配子体发育角度来看,将刺蕨属归于鳞毛蕨科并不自然。同样中华刺蕨和长耳刺蕨的配子体发育特点也与 Nayar 等^[7]观察到的舌蕨属的带状原叶体以及叉蕨型发育的特点不相同。因而,Holtum^[10]将刺蕨属归入舌蕨科可能也不自然。然而,中华刺蕨和长耳刺蕨的发育特点与 Nayar 等^[7]所描述的藤蕨科(除舌蕨属外)很相似,如原叶体发育均为栅蕨型、毛状体均为多细胞棒状等,但是实蕨科的孢子体特征与藤蕨科不相同^[11]。相对而言,我们认为秦仁昌将刺蕨属和实蕨属独立为实蕨科的观点更为合理。由此也表明,配子体发育在探讨科分类系统上是有价值的。

长耳刺蕨在《中国植物志》中为新拟,在《云南植物志》中则未提及长耳刺蕨。中华刺蕨的孢子体羽片长达 11 cm,基部羽片的基部对称,两侧裂片等长。长耳刺蕨的孢子体羽片长达 15 cm,基部羽片的基部不对称,下侧裂片伸长。两者的孢子体除上述外,其他性状极为相似。本研究观察分析长耳刺蕨和中华刺蕨的配子体发育特征表明除了中华刺蕨产生毛状体的时期较晚外,二者之间并无明显区别,这说明配子体发育在种的区分方面价值有限。

参考文献:

- [1] NAYAR B K,KAUR S. Contributions to the morphology of *Tectaria*: The spores,prothalli, and juvenile sporophytes[J]. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*,1964,91:95-105.
- [2] 吴兆洪,秦仁昌. 中国蕨类植物科属志[M]. 北京:科学出版社,1991:455-459.
- [3] SMITH A R,PRYER K M,SCHUETTPELZ E,et al. A classification for extant ferns[J]. *Taxon*,2006,55(3):705-731.
- [4] LIU H M,ZHANG X C,WANG W,et al. Molecular phylogeny of the fern family Dryopteridaceae inferred from chloroplast *rbcL* and *atpB* genes[J]. *International Journal of Plant Sciences*,2007,689:1 311-1 323.

- [5] ATKINSON L R. The gametophyte and family relationships[J]. *J. Linn Soc. (Bot)*, 1973, **67**(Supp. l No. 1): 73—90.
- [6] MOMOSE. Prothallia of the Japanese Ferns[M]. Japan; University of Tokyo Press, 1967: 509—512.
- [7] NAYAR B K, KAUR S. Gametophytes of Homosporous ferns[J]. *Botany Review*, 1971, **37**(3): 345—346.
- [8] SUN SH H(孙淑红), LIU B D(刘保东), MENG X L(孟宪利). Studies on the development of gametophyte of *Bolbitis hainanensis* and *Egenolfia appendiculata* (Bolbitidaceae)[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 2008, **26**(3): 224—228(in Chinese).
- [9] WANG X N(王晓楠), LIU B D(刘保东), SHI L(石 雷). Studies on the development of gametophyte in *Matteuccia orientalis*[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 2006, **24**(4): 310—315(in Chinese).
- [10] HOLTUM R E. A Revised Flora of Malaya vol. II. Ferns of Malaya[M]. Government Printing Office. Singapore, 1954.
- [11] QIN R CH(秦仁昌). Fern families and genera in China; their system of arrangement and historical origin[J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), 1978, **16**(3): 1—19(in Chinese).

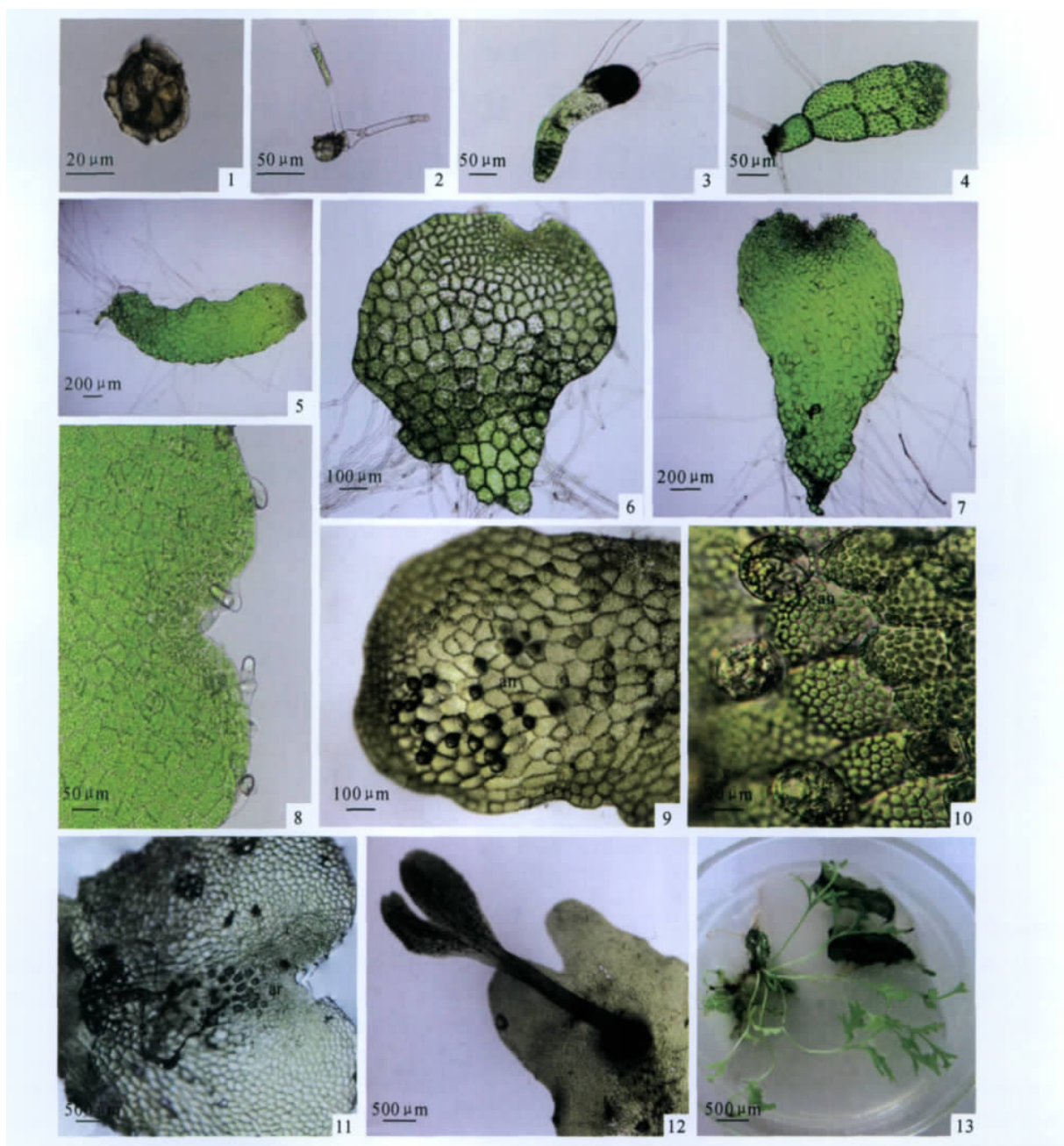


图版 I 中华刺蕨配子体发育显微观察

1. 孢子; 2, 3. 丝状体; 4~6. 片状体; 7, 8. 原叶体; 9, 10. 产生精子器(an); 11, 12. 毛状体; 13, 14. 产生颈卵器(ar); 15, 16. 有性生殖产生的孢子体

Plate I Microscopical observations of the gametophyte development of fern *E. sinensis*

Fig. 1. Spores; Fig. 2, 3. Filament; Fig. 4~6. Plates; Fig. 7, 8. Prothallus; Fig. 9, 10. Antheridia(an); Fig. 11, 12. Hair of *E. sinensis*; Fig. 13, 14. Archegonia(ar); Fig. 15, 16. New sporophyte produced from sexual reproduction.



图版 II 长耳刺蕨配子体发育显微观察

1. 孢子; 2. 孢子萌发, 假根; 3. 丝状体; 4、5. 片状体; 6、7. 原叶体; 8. 毛状体; 9、10. 产生精子器(an); 11. 产生颈卵器(ar); 12、13. 有性生殖产生的孢子体

Plate II Microscopical observations of the gametophyte development of fern *E. bipinnatifida*

Fig. 1. Spores; Fig. 2. Spore germination, rhizoid (r) produced; Fig. 3. Filament; Fig. 4, 5. Plates; Fig. 6, 7. Prothallus; Fig. 8. Hair of *E. bipinnatifida*; Fig. 9, 10. Antheridia(an); Fig. 11. Archegonia(ar); Fig. 12, 13. New sporophyte produced from sexual reproduction.