

## 光轴肿足蕨配子体发育及其系统学意义\*

Gametophyte Development in *Hypodematium hirsutum* and Its Systematic Significance李丽诗<sup>1</sup>, 刘 静<sup>1</sup>, 易锦言<sup>1,2</sup>, 王任翔<sup>1,2\*\*</sup>, 陈彦安<sup>1</sup>LI Li-shi<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, YI Jin-yan<sup>1,2</sup>, WANG Ren-xiang<sup>1,2</sup>, CHEN Yan-an<sup>1</sup>

(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)

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 2. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University), Ministry of Education, Guilin, Guangxi, 541004, China)

**摘要:** 采用改良 Knop's 液体培养基对光轴肿足蕨 (*Hypodematium hirsutum* (D. Don) Ching) 的孢子进行培养, 观察其孢子萌发和配子体发育过程。结果表明, 成熟的孢子深褐色, 不透明, 两面体型, 单裂缝, 极面观椭圆形, 赤道面观为豆形, 周壁褶皱。接种 18 天后孢子开始萌发, 孢子萌发为书带蕨型, 播种 25 天左右发育为 3~5 个细胞的丝状体, 35 天左右发育为片状体, 50 天左右形成幼原叶体, 原叶体发育为二叉蕨型。幼原叶体不对称, 成熟的原叶体呈对称心形。原叶体边缘及背腹面都具单细胞乳头状的毛状体。播种 65 天左右开始出现性器官, 精子器近圆球形, 由 3 层细胞构成, 成熟颈卵器颈部由 4~5 层细胞构成。光轴肿足蕨的配子体发育特征表现出较为进化的特点。

**关键词:** 肿足蕨属 孢子萌发 配子体发育 系统学意义

中图法分类号: Q949.36 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)01-0044-04

**Abstract:** The spores of *Hypodematium hirsutum* (D. Don) Ching were artificial cultured, and the spore germination and gametophyte development were observed under the microscope. The mature spores were dark-brown, bilateral type, monolete, bean-shaped in equatorial view and elliptical in polar view with a wrinkled perines. The spore germination pattern occurred about 18 days after inoculation and was of the Vittaria-type. The gametophyte development was of the Aspidium-type. Filamentous growth appeared within 25 days after inoculation and formed a filament of 3~5 cells. Prothallial plates growth appeared within 35 days after inoculation. The young prothallium developed about 50 days after sowing. They were not symmetry, but the mature prothallium was symmetrical cordate type with one type hair. Antheridia were appeared on prothallus 65 days after inoculation. The pelletlike was consisted of three cells while the neck of mature archegonium was composed of 4~5 layers of cells. The characteristics of spore germination and gametophyte development were relatively advanced, and its taxonomic significance was discussed preliminarily.

**Key words:** *Hypodematium* Kunze, spore germination, gametophyte development, systematic significance

收稿日期: 2012-06-21

修回日期: 2013-02-16

作者简介: 李丽诗(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事蕨类植物学研究。

\* 国家自然科学基金项目(31060030); 广西自然科学基金项目(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项目(桂科能 1001Z017); 广西壮族自治区研究生教育创新计划项目(2011106020710M54)资助。

\*\* 通讯作者: 王任翔(1964-), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师。E-mail: wrx05@126.com。

光轴肿足蕨 (*Hypodematium hirsutum* (D. Don) Ching) 隶属于肿足蕨科 (Hypodematiaceae) 肿足蕨属 (*Hypodematium* Kunze), 在我国产河南西部、陕西(宁陕)、甘肃东南部(康县、文县)、四川、贵州(赫章)、云南、西藏南部(吉隆), 生长于山坡或林下石灰岩缝中, 海拔 400~2000m<sup>[1]</sup>。肿足蕨属目前约 16 种, 主产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其与近缘科

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(Thelypteridaceae)<sup>[2]</sup>、鳞毛蕨科(Dryopteridaceae)<sup>[3]</sup>或蹄盖蕨科(Athyriaceae)<sup>[4]</sup>;秦仁昌(1975)将肿足蕨属从金星蕨科中分出成立了肿足蕨科(Hypodematiaceae),其位置介于蹄盖蕨科与金星蕨科之间<sup>[5]</sup>。

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<sup>[6-9]</sup>。目前对肿足蕨属植物配子体发育的研究很少<sup>[10-12]</sup>。本文首次对光轴肿足蕨孢子进行人工培养,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,为其系统学研究提供配子体方面的证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 孢子的采集

光轴肿足蕨(*H. hirsutum* (D. Don) Ching)的孢子于2011年8月采自甘肃东南部康县的石灰岩缝,将成熟孢子的叶片放入自封袋中,带回实验室转入硫酸纸袋内,搁置通风处让孢子自然脱落后,用牛皮纸袋收集孢子放在4℃冰箱中保存备用。

### 1.2 培养方法

采用改良Knop's<sup>[13]</sup>营养液体培养。培养基经121℃高温、高压灭菌20min左右,在无菌操作条件下,用滤纸包好成熟的孢子,折成2cm<sup>2</sup>左右,75%酒精消毒30s,无菌水漂洗1遍,5%NaCl消毒10~15min,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,每天光照12h,黑暗12h,光照强度为2500Lx。在配子体发育的各个阶段用光学显微镜进行活体观察,并用Nikon DXM1200C显微照相机拍照记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 孢子及萌发

光轴肿足蕨的孢子都为深褐色,两面体型,单裂缝,极面观椭圆形,赤道面观豆形,大小约为43.8μm×50.4μm(取15个孢子大小的平均值),具褶皱状周壁,深褐色(图1,1)。

光轴肿足蕨孢子播种培养18天左右能看到明显的吸水膨胀,细胞渐变为绿色,可见孢子内有多数叶绿体产生,稍后,孢子壁自裂缝处裂开(图1,2),绿色细胞的底部长出1条几乎垂直的假根(图1,3),也有的在基细胞产生第2条假根(图1,4),假根白色透明不具叶绿体;随后分裂的原叶体原始细胞从萌发孔伸出,其分裂面与假根垂直,孢子萌发为书带蕨型(Vittaria-type)<sup>[7]</sup>,孢子壁多数宿存于基部。

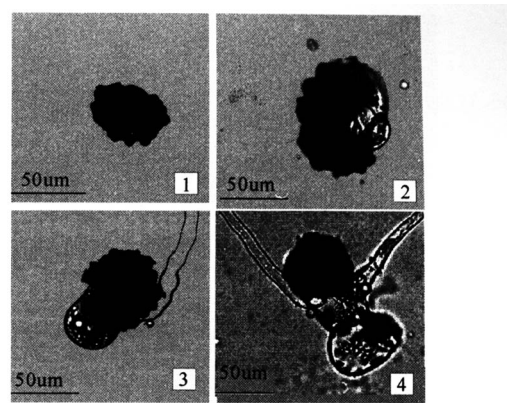


图1 孢子及其萌发

Fig. 1 Spore germination

1. 孢子赤道面观;2. 孢子萌发开裂;3~4. 假根产生。

1. Equatorial view of spore; 2. Spore germination; 3~4. Rhizoids.

### 2.2 丝状体

孢子萌发25天后,有的原叶体原始细胞经过连续3~4次横向分裂,细胞排成单列丝状,形成3~5个细胞的丝状体(图2,1~3);也有的原叶体原始细胞经过1~2次横向分裂后进行纵向分裂,原叶体从一维的线状(丝状单列细胞)向二维的平面(多列细胞)发育(图2,4~6)。丝状体顶端细胞上一般都有毛状体(图2,1~2),但是也有个别丝状体顶端细胞上不长毛状体(图2,3)。

### 2.3 片状体

播种35天以后进入片状体阶段。丝状体顶端细胞不仅横向分裂而且纵向分裂,反复纵向横向分裂形成不同形状的片状体(图2,4~6)。片状体边缘细胞排列较整齐,顶端细胞上一般都长毛状体。片状体达4~7个细胞宽时,前端边缘细胞出现斜向分裂产生倒圆锥形的分生细胞,发育成为生长点(图3,1),不断分裂形成分生组织;分生组织细胞不断分裂,逐渐使片状体阶段进入到原叶体阶段。

### 2.4 原叶体

播种50天左右,能观察到在片状体前端及其后的分生组织进行纵分裂,再进行横分裂,左右两边细胞分裂快,形成原叶体的两翼,前端凹口深陷(图3,2~3),幼原叶体在基部长出多条假根,原叶体边缘不整齐,其边缘及前端都长有毛状体(图3,1~2)。幼原叶体不对称,随着生长,成熟时发育为对称的心脏形原叶体(图3,4)。成熟时原叶体两翼展开,无或稍有波折,在生长点上方不相交,腹面中下部分布有大量假根,原叶体边缘及背腹面均有毛状体分布(图3,5~6),原叶体发育方式为三叉蕨型(Aspidium-type)<sup>[7]</sup>。

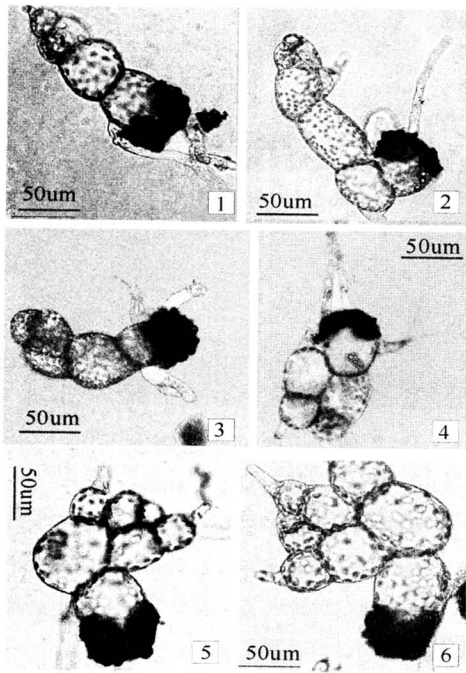


图2 丝状体和片状体

Fig. 2 Filament and Prothallial plate

1~3. 丝状体; 4~6. 片状体。

1~3. Filament; 4~6. Prothallial plate.

## 2.5 毛状体

最初的毛状体由丝状体的先端细胞或其后的细胞形成,大多数为单细胞的乳头状毛,毛状体内具少量叶绿体(图2,1~2,4~6),随着原叶体生长,毛状体由原叶体的生长点细胞分化产生,也可由原叶体营养细胞分裂而形成(图3,1~2)。

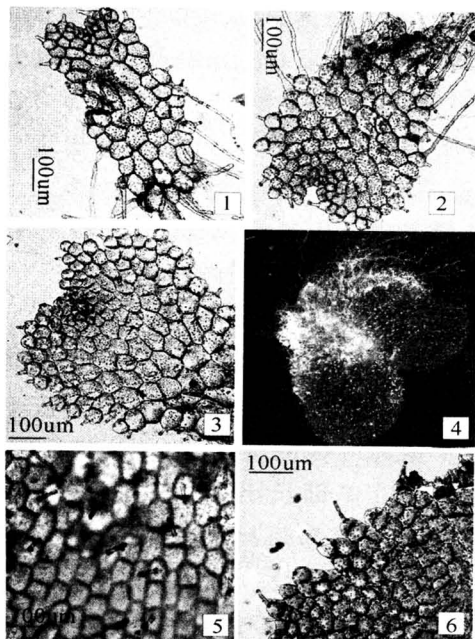


图3 原叶体和毛状体

Fig. 3 Prothallium and trichomes

1~3. 幼原叶体; 4. 成熟原叶体; 5~6. 毛状体

1~3. Young prothallium; 4. Mature prothallium; 5~6. Trichomes.

## 2.6 假根

在配子体发育过程中,从孢子萌发开始就出现假根,假根白色透明,无叶绿体,20天后变为深褐色。孢子萌发时,一般只产生1条假根(图1,3);也有的在基细胞产生第2条假根(图1,4),以后随着发育过程的进行,在丝状体、片状体的基腹部不断有假根长出。成熟的原叶体上,假根密集分布在原叶体的腹面远生长点端。假根不分叉;大部分假根直立而且粗细均匀,呈长管状,但是也有的假根末端膨大,近球形(图3,4和图4,1)。

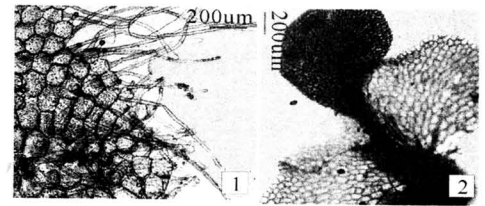


图4 假根和幼孢子体

Fig. 4 Rhizoids and young sporophyte

1. 假根; 2. 幼孢子体。1. Rhizoids; 2. Young sporophyte.

## 2.7 性器官

光轴肿足蕨的精子器和颈卵器类型为同型孢子薄囊蕨类的一般类型。颈卵器自培养后2个月开始产生,位于原叶体腹面生长点之下到假根之间,每个个体有数个至数十个不等,初始为颈卵器母细胞产生突起并垂直于原叶体表面,成熟颈卵器细长,颈部由7列细胞组成,每列4~5个细胞,高约85µm,直径约48µm,常向原叶体基部倾斜或弯曲,有大型基座,侧面观为烟囱状,有4~5层细胞高(图5,2)。接种后约65天开始产生精子器,每个个体上约十余个(雌雄同株)至数十个,与假根混生;精子器大小不一,侧面观截圆形,顶面观呈圆形(图5,1),由3个细胞(基细胞、环细胞和盖细胞)组成;精子器成熟时,盖细胞裂开,精子逸出并借助原叶体表面的水膜游入颈卵器,完成受精作用。受精后8天内即可观察到突破原叶体的幼胚(图4,2)。

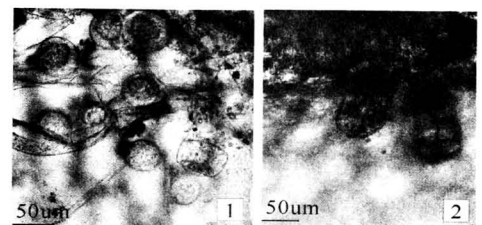


图5 精子器和颈卵器

Fig. 5 Antheridium and archegonia

1. 精子器; 2. 颈卵器。1. Antheridium; 2. Archegonia.

## 3 讨论

光轴肿足蕨成熟的孢子深褐色,不透明,两面体

型,单裂缝,极面观椭圆形,赤道面观为豆形,周壁褶皱。接种 18 天后孢子开始萌发,孢子萌发为书带蕨型(Vittaria-type),原叶体发育为三叉蕨型(Aspidium-type)。成熟的原叶体阶段,毛状体不仅分布在原叶体的基部和腹部,边缘和表面也有;毛状体内含有的叶绿体。这些均与肿足蕨(*H. crenatum* (Forsk.) Kuhn)孢子的萌发、配子体发育及形态特征相似<sup>[10~12]</sup>,说明两者亲缘关系十分相近。

光轴肿足蕨在孢子萌发基细胞变绿时就长出第 1 条假根,有的在基细胞还产生第 2 条假根,假根不分叉;肿足蕨则在进入丝状体阶段后基细胞才长出第 1 条假根,假根分叉<sup>[12]</sup>。光轴肿足蕨与肿足蕨的配子体都有乳头状毛状体,但是肿足蕨的配子体还具有针状毛<sup>[12]</sup>,而光轴肿足蕨的配子体则不出现针状毛。在成熟的孢子体中,光轴肿足蕨的叶柄无针状毛和乳头状毛,而肿足蕨则只有有针状毛。由此可见,光轴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。

肿足蕨属的系统位置仍有较大的争议,它曾经放在金星蕨科<sup>[2]</sup>、鳞毛蕨科<sup>[3]</sup>或蹄盖蕨科<sup>[4]</sup>;秦仁昌<sup>[5]</sup>将肿足蕨属从金星蕨科中分出成立了肿足蕨科(Hypodematiaceae)。目前的分子证据对肿足蕨属的系统位置提出了一些不同的观点。Smith 等<sup>[14]</sup>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,并把他们放在鳞毛蕨科中;Liu 等<sup>[15]</sup>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,但是原叶体发育方式存在差异,金星蕨科有铁线蕨型(Adiantum-type)、三叉蕨型<sup>[9]</sup>,鳞毛蕨科有三叉蕨型<sup>[16]</sup>,蹄盖蕨科有铁线蕨型、三叉蕨型<sup>[17]</sup>,肿足蕨与光轴肿足蕨的原叶体萌发方式都为三叉蕨型。因此,从孢子萌发和原叶体发育方式看,肿足蕨属与金星蕨科、蹄盖蕨科和鳞毛蕨科有一些不同,但是也有一定的亲缘关系。因此,肿足蕨属的系统位置有待进一步的研究。

#### 致谢:

在研究过程中,广西师范大学谢彦军同学在采集材料中提供帮助,在此表示衷心感谢!

#### 参考文献:

- [1] 邢公侠. 中国植物志:第 4 卷:第 1 分册[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [2] 秦仁昌. 亚洲大陆金星蕨科新分类系统[J]. 植物分类学报,1963,8(4):289-335.
- [3] Christensen C. Index Filicum Hafniae[M]. Hageru, 1905.
- [4] Pichi Sermolli R E G. Tentamen pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi [J]. Webbia, 1977, 31:313-512.
- [5] 秦仁昌. 蕨类植物的两新科[J]. 植物分类学报,1975,13(1):96-98.
- [6] Stokey A G. Multicellular and branched hairs on the fern gametophyte [J]. Amer Fern Jour, 1960, 50:78-87.
- [7] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. The Botanical Review, 1971, 37(3):346-347.
- [8] Atkinson L R. The gametophyte and family relationships [J]. Bot J Lin Soc, 1973, 67(suppl 1):73-90.
- [9] 包文美,王全喜,敖志文. 东北蕨类植物配子体发育的研究Ⅶ:金星蕨科[J]. 植物研究, 1994, 14(4):409-415.
- [10] Loyal D S. Some observations on the gametophyte of *Hypodematium crenatum* (Forsk.) Kuhn with a note on the phyletic affinities of the genus[J]. J Indian Bot Soc, 1960, 39:133-139.
- [11] Nayar B K, Bajpai N. A reinvestigation of the morphology of *Hypodematium crenatum* [J]. American Fern Journal, 1970, 60(3):107-118.
- [12] 郭治友,刘红梅. 肿足蕨的配子体发育研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(3): 245-250.
- [13] 赵建成,黄士良,李敏,等. 小扭口蕨芽胞发育特征的实验研究[J]. 植物研究, 2005, 25(2):169-172.
- [14] Smith A R, Pryer K M, Schuettpelz E, et al. A classification for extant ferns [J]. Taxon, 2006, 56(3):705-731.
- [15] 刘红梅,张宪春,陈之端,等. 叉蕨科是一个多系类群:基于叶绿体 *rbcL* 和 *atpB* 基因的分析[J]. 中国科学:C 辑:生命科学, 2007, 50:789-798.
- [16] 王全喜,邵成文,曹建国,等. 东北蕨类植物配子体发育的研究Ⅺ:鳞毛蕨科[J]. 哈尔滨师范大学学报:自然科学版, 1995, 11(4):83-89.
- [17] 林孝辉,王全喜,包文美. 东北蕨类植物配子体发育的研究Ⅸ:蹄盖蕨科[J]. 植物研究, 1996, 16(3): 322-335.

(责任编辑:邓大玉)