

# 假鞭叶铁线蕨配子体发育的研究

罗顺元

(厦门大学, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 用 1/2MS 培养基培养假鞭叶铁线蕨(*Adiantum malesianum* Chatak)孢子, 光学显微镜下观察孢子萌发及配子体发育过程。结果表明: 成熟的孢子棕红色, 不透明, 四面体型, 辐射对称, 三裂缝。接种 6 d 左右孢子萌发, 萌发类型为紫萁型(*Osmunda*-type), 原叶体发育为铁线蕨型(*Adiantum*-type)。接种 25 d 左右片状体形成。接种 50 d 左右发育为成熟原叶体, 呈心脏形, 裸露无毛状体。接种 60 d 左右性器官出现, 雌雄同株。精子器长圆球形, 由 3 细胞构成; 成熟颈卵器颈部由 4 列细胞组成, 3~5 层细胞高。

**关键词:** 假鞭叶铁线蕨; 孢子萌发; 配子体; 发育

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)02-0164-05

## Gametophyte Development of *Adiantum malesianum* Chatak

LUO Shun-yuan

(Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The spores of *Adiantum malesianum* Chatak were cultured in 1/2MS medium. The spore germination and gametophyte development were observed by light microscope. The results showed that the mature spores were brown-red, opaque, tetrahedral type, actinomorphic, trilete. The spores germinated about six days after sowing. The spore germination belonged to the *Osmunda*-type, while the gametophyte development was of the *Adiantum*-type. The prothallial plates formed about 25 days after sowing. The mature cordate prothallus developed 50 days after sowing, gymnotremoid without trichomes. The sexual organs appeared 60 days after sowing, hermaphroditic. The antheridium was prolate spheroidal, consisting of three cells. Archegonial neck was usually composed of four rows of cells and three to five cells high at maturity.

**Key words:** *Adiantum malesianum* Chatak; Spore germination; Gametophyte; Development

蕨类植物有两个独立的生活植物体世代—孢子体世代和配子体世代, 其中配子体世代时间短, 易于观察记录。蕨类植物配子体的生长发育特征是研究蕨类植物的重要内容之一。关于蕨类植物配子体的发育过程, 前人做过大量的研究, Nayar 和 Kaur<sup>[1]</sup>研究了 100 多种蕨类植物配子体的发育过程后, 将薄囊蕨纲(*Leptosporangiopsida*)配子体的发育方式分为槲蕨型、铁线蕨型、三叉蕨型等 7 大类型。近年来包文美等<sup>[2]</sup>、张开梅等<sup>[3]</sup>、罗顺元等<sup>[4-5]</sup>分别对中国蕨科(*Sinopteridaceae*)、凤尾蕨科(*Pteridaceae*)、肾蕨科(*Nephrolepidaceae*)和鳞毛蕨科(*Dryopteridaceae*)的一些种的配子体发育过程进行了研究, 为探讨科、属的系统演化和分类提供资料。

假鞭叶铁线蕨(*Adiantum malesianum* Chatak)属

于铁线蕨科(*Adiantaceae*)铁线蕨属。本属有 200 多种, 广布于世界各地, 自寒温带至热带地区, 尤以南美洲为最多; 我国有 30 种, 主要分布于温带地区。具有药用、指示植物和栽培观赏价值<sup>[6]</sup>。假鞭叶铁线蕨属于鞭叶铁线蕨系, 此系有 7 种<sup>[6]</sup>。假鞭叶铁线蕨株高 15~20 cm, 根状茎短而自立, 叶簇生, 叶脉多回二歧分叉, 叶轴先端延长成鞭状, 落地生根, 分布于广东、海南、广西、湖南和贵州等地, 缅甸、越南、泰国和印度等国也有分布<sup>[6]</sup>。假鞭叶铁线蕨具有较大观赏价值, 目前对其孢子形态和组织培养与快速繁殖体系有报道<sup>[7]</sup>。

有关铁线蕨属配子体发育的研究, Kachroo 等报道了印度产的铁线蕨属 7 种<sup>[8]</sup>, Kawasakig 报道了 4 种铁线蕨成熟配子体的形态<sup>[9]</sup>。包文美等<sup>[10]</sup>、

周玲革<sup>[1]</sup>分别报道了掌叶铁线蕨(*Adiantum pedatum*)和铁线蕨(*A. capillus-veneris*)的配子体发育过程。分布于我国热带和亚热带地区的鞭叶铁线蕨系的配子体发育研究至今未见报道。配子体的形态学和性器官的位置与结构是蕨类植物分类的重要指标<sup>[2]</sup>。本文用1/2MS培养基无菌培养,研究假鞭叶铁线蕨的孢子萌发以及配子体发育过程,以为蕨类植物的系统演化分类研究和假鞭叶铁线蕨的园艺栽培提供资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 孢子的采集

假鞭叶铁线蕨(*Adiantum malesianum* Chatak)的成熟孢子于2005年12月采于广西桂林市七星公园后山的岩石狭缝间。将带有成熟孢子的叶片置于干净纸袋中,放于干燥通风处使孢子自然散落,约1周后将孢子除杂并收集于硫酸纸袋中,然后存放于4℃的冰箱中备用。

### 1.2 方法

采用1/2MS培养基无菌培养:1/2MS(大量元素为MS培养基的1/2,其余成分相同)+3%蔗糖+0.7%琼脂,pH 6.0,培养基经121℃高温、高压灭菌20 min左右。用滤纸包好成熟的孢子,折成2 cm<sup>2</sup>左右,75%酒精消毒30 s,无菌水漂洗1遍,5% NaClO消毒15 min,无菌水漂洗3遍,然后在超净工作台上接种于1/2MS无菌培养基上。放置培养基的培养箱温度为25℃,日光灯光源,光照强度为30~40 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,光暗交替为12 h/12 h。用光学显微镜观察,并用OLYMPUS DP70拍照。各数据为随机测得的10个数值的平均值(孢子大小为20个的平均值)。

## 2 结果和分析

### 2.1 孢子及孢子萌发

假鞭叶铁线蕨的成熟孢子棕红色,四面体形,辐射对称,具三裂缝(图版I:2)。孢子极面观为钝三角圆形或近圆形,赤道面观为半圆形(图版I:1)。以极轴观察,孢子大小为37(34~40) μm × 39(36~42) μm。

接种6 d左右孢子开始萌发,孢子壁从三裂缝处裂开,现出含叶绿体的绿色细胞。孢子第一次分裂时形成两个细胞,1个小细胞和1个大细胞。小细胞穿出孢子壳的裂缝伸长形成假根,或者小细胞

在形成假根的过程中直接把孢子壳顶开;大细胞为配子体的母细胞,横向分裂形成丝状体。两细胞的横壁与赤道面平行,这两个细胞沿着极轴各自向两极生长。孢子的萌发类型属于紫萁型(*Osmunda-type*)<sup>[1]</sup>(图版I:3)。大部分孢子萌发时产生1条假根,小部分产生两条假根(图版I:4)。

### 2.2 丝状体

原叶体原始细胞萌发后进行连续横向分裂,形成2~9细胞组成的单列丝状体(图版I:5)。有些丝状体在2~3细胞时,顶端细胞会发生一次纵向分裂而形成两个顶端细胞,进而形成双列丝状体(图版I:6)。丝状体细胞连接处向内凹陷形成沟,而细胞本体则圆鼓状向外突出。丝状体含较密集、均匀分布的球状叶绿体。

### 2.3 片状体

接种25 d左右,可见有部分丝状体发育成片状体。丝状体顶端细胞先进行1次纵向分裂形成两个细胞,再由这两个细胞不断交替斜向分裂,原叶体原始细胞由一维生长变成了二维生长,形成片状体(图版I:7)。随着生长,片状体基部的假根不断增多。

### 2.4 原叶体

接种50 d左右,可见幼原叶体形成(图版I:8)。随着片状体的继续发育,片状体顶端长出一排扁平细小细胞,这排细胞具有分裂能力。接着顶端部分演变为分生组织,在顶部形成凹入不断横向分裂,而且衍生细胞也连续分裂。再往后,随着顶端分生组织的不断分裂,凹陷进一步扩大,配子体进一步发育成原叶体。像这样,原叶体由丝状体顶端早期形成的楔形细胞发育而成的发育方式属于铁线蕨型(*Adiantum-type*)<sup>[1]</sup>。

成熟的原叶体(图版I:9)绿色,裸露无毛状体,对称,心脏形,大小为2(1.5~2.5) mm × 3(2.2~3.5) mm之间。原叶体基部有很多次生增殖组织,而且原叶体与原叶体之间多粘连生长。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)。原叶体基部有大量的假根着生。

### 2.5 叶绿体

最初的叶绿体在孢子萌发时就产生,在铁线蕨配子体的整个发育过程中,叶绿体(图版I:12)的形态几乎没有变化,都是正球形,直径4 μm左右。

在一些假根中也观察到少量叶绿体存在。

## 2.6 假根

孢子萌发时产生 1~2 条假根(图版 I: 3~4), 白色透明, 个别还具有叶绿体。在丝状体阶段, 假根一般不增多。到片状体及原叶体阶段后, 假根逐渐增多。假根基部略膨大, 其它部分粗细均匀。到原叶体阶段后, 假根略显棕色, 直径 10  $\mu\text{m}$  左右, 长度变化很大, 从几十微米到几毫米(图版 I: 14)。

## 2.6 绿色球状物

在 1/2MS 培养基上发现有少量绿色球状物生成(图版 I: 16)。绿色球状物是本实验发现的变态结构, 肉眼观察为绿色球状, 它由丝状体发育而成, 不是假鞭叶铁线蕨配子体发育的必经阶段。在蕨类植物的组培快繁过程中, 可先通过诱导外植体形成 GGB(绿色球状体), 然后再通过 GGB 快速繁殖; 然而 GGB 通常由孢子体形成<sup>[13]</sup>, 但是本文的绿色球状物由配子体形成, 与此有区别。在另外的组织培养增殖实验中发现, 糖对假鞭叶铁线蕨配子体形成绿色球状物有决定作用。在无糖的 MS 培养基上无绿色球状物生成, 而在 MS + 6% 蔗糖(及以上浓度)的培养基上没有正常原叶体产生, 全部为绿色球状物。用解剖针挑开绿色球状物后, 发现其内部全部是丝状体样结构(图版 I: 17)。

## 2.7 性器官

接种后 60 d 左右, 原叶体上出现性器官。性器官雌雄同株, 精子器位于假根丛中, 颈卵器位于原叶体生长点到假根之间的区域。精子器(图版 I: 11, 15)混生于假根丛中, 呈长圆球形, 由 3 细胞(基细胞、环细胞和盖细胞)构成, 直径约 45  $\mu\text{m}$ , 高约 55  $\mu\text{m}$ 。颈卵器(图版 I: 10, 13)生长在原叶体生长点之下和假根群边缘之间。成熟颈卵器(图版 I: 13)颈部由 4 列细胞构成, 3~5 层细胞高; 直径约 50  $\mu\text{m}$ , 高度约 60  $\mu\text{m}$ ; 顶端形成圆孔, 受精后腹部内逐渐变为褐色。

## 2.8 胚的发育

原叶体受精后 1 月内可见幼胚生成, 幼胚第一叶无拳卷现象, 扇状分叉自然展开(图版 I: 18)。幼孢子体长出后, 原叶体继续发育, 再过约 1 个月, 直到幼孢子体长出 2~3 片叶后原叶体死亡。假鞭叶铁线蕨在试管内无菌培养基上几乎不能形成幼孢子体, 但在常规培养皿培养基上有很高的幼孢子体形成率。将成熟原叶体从培养容器中取出, 洗净后

密植于经高温灭菌的河沙培养皿中, 喷水加盖保持湿润, 其他条件与前相同。孢子体幼苗形成率可达 90% 以上。

## 3 结论和讨论

假鞭叶铁线蕨孢子四面体形, 辐射对称, 具三裂缝, 孢子极面观为钝三角圆形, 赤道面观为半圆形, 孢子萌发类型为紫萁型(*Osmunda-type*)<sup>[1]</sup>, 原叶体发育方式为铁线蕨型(*Adiantum-type*)<sup>[1]</sup>, 原叶体裸露无毛状体。这些结果中, 孢子形态、原叶体发育方式和原叶体形态与 Nayar 和 Kaur<sup>[1]</sup>、包文美等<sup>[10]</sup>、周玲革<sup>[11]</sup>等报道的铁线蕨属的性状、特点相同。但是, 本文研究的假鞭叶铁线蕨雌雄同株, 与 Kachroo 等<sup>[8]</sup>和周玲革<sup>[11]</sup>对铁线蕨科铁线蕨属其它种的研究结果一致; 与包文美等<sup>[10]</sup>对本属另一种的研究结果不同, 他认为掌叶铁线蕨是雌雄异株。另外, 包文美等<sup>[10]</sup>、周玲革<sup>[11]</sup>分别报道掌叶铁线蕨、铁线蕨的孢子萌发方式为向心型或书带蕨型(*Vittaria-type*), 这种萌发方式的最大特点是丝状体的生长方向与假根垂直, 本文观察结果与他们不同, 这很可能是不同种之间的差异所致。

笔者在少数初生假根中观察到叶绿体的存在。包文美<sup>[10]</sup>报道, 掌叶铁线蕨(*Adiantum pedatum*)初生假根含叶绿体是原始类型的表现。曾汉元等<sup>[14]</sup>认为毛状体的出现是一个进化性状, 只有进化地位较高的蕨类植物的原叶体才具毛状体。据此, 假鞭叶铁线蕨在蕨类植物的演化过程中处于较低地位。

假鞭叶铁线蕨配子体在低湿度的棉花塞试管内未见有幼孢子体形成, 在高湿度常规培养皿内幼孢子体形成率可达 90% 以上。说明了它的繁殖过程对水的高度依赖, 它的陆生适应能力应该还是比较差的。

本文详细记录了假鞭叶铁线蕨配子体的生活史, 并且拍摄了假鞭叶铁线蕨配子体各个发育阶段的清晰照片, 丰富了铁线蕨属配子体发育的实验资料, 同时也为实验生物学领域开展分子生物学及遗传学等研究提供了可能材料。

假鞭叶铁线蕨株形优美, 具有很高的商业观赏潜质。本研究中观察到的由配子体形成的绿色球状物, 对假鞭叶铁线蕨的组培快繁有一定参考价值, 可由此途径建立它的快速繁殖体系。本研究成功获得了用孢子人工繁殖假鞭叶铁线蕨的方法, 在控光和恒温的条件下, 配子体受精率可达 90% 以

上,并发育出孢子体。可尝试用这种方法批量繁殖假鞭叶铁线蕨,对未来假鞭叶铁线蕨的商业化生产应用可能有一定的参考价值。

## 参考文献

- [1] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. Bot Rev, 1971, 37(3): 295-396.
- [2] Bao W M(包文美), Wang Q X(王全喜), Ao Z W(敖志文). Studies on the development of gametophytes of ferns from North-eastern China VI. Sinopteridaceae [J]. Bull Bot Res(植物研究), 1995, 15(3): 373-417.(in Chinese)
- [3] Zhang K M(张开梅), Shi L(石雷), Li D(李东). The gametophyte development in *Pteris ensiformis* [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2005, 22(5): 566-571.(in Chinese)
- [4] Luo S Y(罗顺元), Wang R X(王任翔). Gametophyte development in *Nephrolepis* (L.) Trimen [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2006, 14(6): 517-521.(in Chinese)
- [5] Luo S Y(罗顺元), Wang R X(王任翔), Ma W H(麻维华). Gametophyte development of *Dryopteris erythrosora* [J]. J Guangxi Norm Univ (Nat Sci)(广西师范大学学报:自然科学版), 2007, 25(3): 105-108.(in Chinese)
- [6] Xing G X(邢公侠), Lin Y X(林尤兴), Wu Z H(吴兆洪), et al. Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 3 (1) [M]. Beijing: Science Press, 1990: 173-186.(in Chinese)
- [7] Luo S Y(罗顺元), Wang R X(王任翔). Tissue culture of spore of *Adiantum maiesianum* Chatak [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2007, 43(1): 131-132.(in Chinese)
- [8] Kachroo R, Nayar B K. Studies in Pteridaceae observations on gametophytes of some species of *Adiantum* L. [J]. Phytomorphogy, 1953, 3: 240-248.
- [9] Kawasaki T. Studies on the sexual generation of ferns (8) [J]. J Japn Bot, 1956, 31(7): 205-209.
- [10] Bao W M(包文美), Ao Z W(敖志文), Liu B D(刘保东). Studies on the development of gametophytes of ferns from North-eastern China IV. Adiantaceae [J]. Bull Bot Res(植物研究), 1987(4): 65-

73.(in Chinese)

- [11] Zhou L G(周玲革). Observations and researches on the spore culture of *Adiantum capillus-veneris* L. [J]. J Jingzhou Teach Coll (Nat Sci)(荆州师专学报:自然科学版), 1996, 19(5): 81-84.(in Chinese)
- [12] Foster A S, Gifford E M. Li Z L(李正理), Zhang X Y(张新英), Li R A(李荣敖), et al. Translated. Comparative Morphology of Vascular Plants [M]. Beijing: Science Press, 1983: 1-207.(in Chinese)
- [13] Cheng L(程磊), Pu B J(浦冰洁), Zhou G Y(周根余). The effects of physical and chemical factors on differentiation and growth of green globular bodies of *Nephrolepis cordifolia* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2001, 9(2): 142-148.(in Chinese)
- [14] Zeng H Y(曾汉元), Ding B Y(丁炳扬). Studies on the gametophytes development in ferns [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2003, 23(2): 154-158.(in Chinese)

## 图版说明

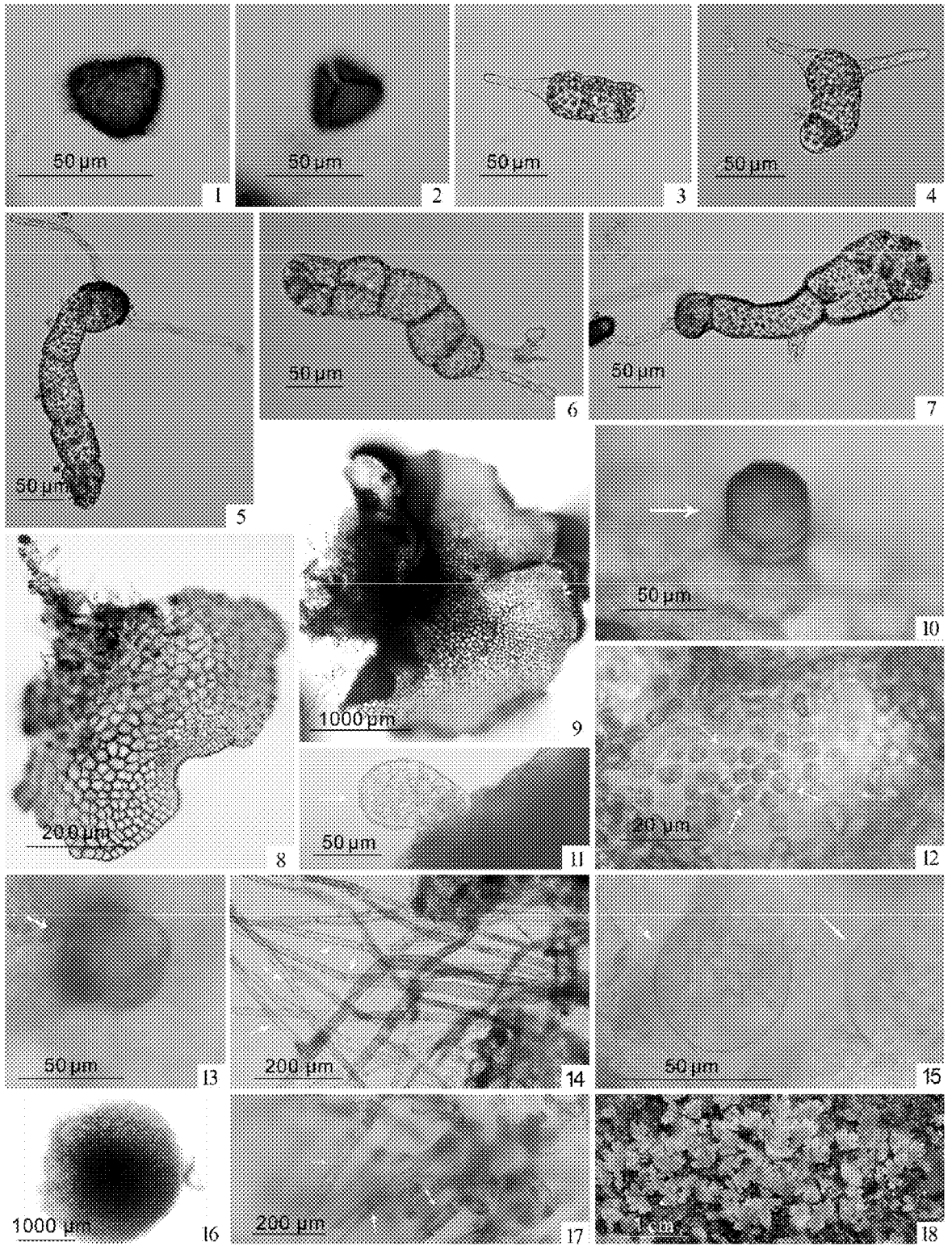
### 图版 I

1. 孢子; 2. 孢子三裂缝; 3. 具一条假根的 3 细胞丝状体; 4. 具两条假根的 3 细胞丝状体; 5. 丝状体; 6. 双列丝状体; 7. 片状体; 8. 幼原叶体; 9. 成熟原叶体; 10. 幼颈卵器; 11. 精子器侧面观; 12. 成熟原叶体细胞内的叶绿体; 13. 成熟颈卵器顶面观; 14. 假根; 15. 精子器; 16. 绿色球状物; 17. 绿色球状物内部结构; 18. 幼孢子体。

## Explanation of plate

### Plate I

1. Spore; 2. Three cracks of spore; 3. Three-cell filament with one rhizoid; 4. Three-cell filament with two rhizoids; 5. Filament; 6. Two-column filament; 7. Prothallial plate; 8. Young prothallium; 9. Mature prothallium; 10. Young archegonium; 11. Lateral view of the antheridium; 12. Chloroplast in mature prothallium; 13. Top view of mature archegonium; 14. Rhizoids; 15. Antheridiums; 16. Green spherical body; 17. Inner structure of green spherical body; 18. Young sporophytes.



罗顺元:图版 I

LUO Shun-yuan: Plate I