

毛叶粉背蕨配子体的泌粉现象及其系统学意义

刘贤¹, 杨文利², 王鸾¹, 毛星星¹, 张钢民^{1*}

(1. 北京林业大学自然保护区学院, 北京 100083; 2. 河北农业大学园林与旅游学院, 河北 保定 071000)

摘要: 为探讨蕨类配子体泌粉现象的系统学意义, 对 5 种粉背蕨属(*Aleuritopteris*)植物的配子体发育过程进行了观察。结果表明, 毛叶粉背蕨(*A. squamosa*)的配子体(通常是雌配子体)也具有泌粉现象, 而其他 4 种的配子体不具粉状分泌物。基于叶绿体 *rbcL* 序列的证据表明, 毛叶粉背蕨与粉背蕨属其他植物、中国蕨属(*Sinopteris*)等构成一个具有强烈支持率的单系, 即 Hemionitids 支, 该支与美洲分布的隐囊蕨类互为姐妹群。因此, 配子体泌粉现象在碎米蕨类中并非隐囊蕨类植物所特有, 泌粉现象的产生, 在系统发育上至少涉及 2 次独立的演化事件。毛叶粉背蕨的泌粉现象多发生在雌性配子体上, 暗示配子体的泌粉可能与配子体的雌性分化和胚发生发育相关。

关键词: 配子体; 泌粉现象; 毛叶粉背蕨; 系统发育

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.02.007

Farina Observation in Gametophytes of *Aleuritopteris squamosa* (Pteridaceae), with Comments on Its Phylogenetic Significance

LIU Xian¹, YANG Wen-li², WANG Wan¹, MAO Xing-xing¹, ZHANG Gang-ming^{1*}

(1. College of Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Landscape Architecture and Tourism, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: In order to understand the phylogenetic significance of farina in gametophytes of fern, the gametophyte development of five *Aleuritopteris* species were observed. The results showed that the gametophytes (usually female gametophytes) of *A. squamosa* had also farina phenomena. Based on the evidence of chloroplast *rbcL* sequences, it was confirmed that *A. squamosa* is a member of the Hemionitids, one of four well-supported clades resolved by molecular data. The American *Notholaena*, within which the farinose gametophytes were formerly reported, was resolved as monophyletic, forming a sister group to the Hemionitids. As the farinose gametophyte now observed in two of the four clades of cheilanthoid ferns (Hemionitids and Notholaenids), it was postulated that the farinose gametophyte would be derived independently at least twice in the evolution of the cheilanthoid ferns. The fact that the farina is produced exclusively in female gametophytes implies that the occurring of the farina would be relevant to the gender differentiation and the embryo formation in cheilanthoid ferns.

Key words: Gametophyte; Farina; *Aleuritopteris squamosa*; Phylogeny

碎米蕨类(Cheilanthoids)是一群特殊的旱生蕨类, 其叶片革质或厚纸质, 有角质层, 背面常具毛被、鳞片或蜡质粉状物, 多生长在水分稀少的石

灰岩山地, 在水分减少时叶片向上翻卷, 露出叶背的覆盖物, 以减少水分流失和强光伤害^[1]。近年来的系统学研究表明, 碎米蕨类确为一个自然

收稿日期: 2014-08-08

接受日期: 2014-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270253); 基金委重大国际合作项目(31110103911)资助

作者简介: 刘贤, 硕士研究生, 研究方向为蕨类植物生殖发育与系统进化。E-mail: xina87@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gary1967@bjfu.edu.cn

类群,属于凤尾蕨科(Pteridaceae)的碎米蕨亚科(Cheilantheoideae),包含秦仁昌系统的中国蕨科和裸子蕨科的部分类群^[2-3]。由于具有多倍化、无融合生殖等现象,加之长期对干旱生境的适应,碎米蕨类植物形态趋同,类群间的界定非常困难,被 Tryon 等称为“蕨类植物中最有争议的自然类群”^[4-5]。许多原用于区别种属的形态特征现已证实为非同源的,故需要更多的形态证据,以探讨类群间的系统发育关系^[1,6]。

在碎米蕨类植物中,有部分种属的孢子体叶背具有白色或黄色的蜡质粉末,如隐囊蕨属(*Notholaena*)(产于美洲,非亚洲地区的“隐囊蕨”和“中华隐囊蕨”)、*Argyrochosma*(特产于美洲)、粉背蕨属(*Aleuritopteris*)和中国蕨属(*Sinopteris*)^[1]。这种粉末由叶表皮上的腺毛分泌产生,成分复杂,被认为是植物适应旱生环境的结果^[1]。蕨类植物的孢子体和配子体彼此独立生活,配子体的形态发育也一直是国内外学者关注的重点,其中孢子体具粉现象在配子体阶段也有表现的情况就尤为特殊,配子体的泌粉现象即是此类。碎米蕨类的配子体多数都表现为光滑无毛无粉,唯有隐囊蕨类(*Notholaenids*)成员稳定地表现出一致的泌粉现象,这种特性被认为可能是隐囊蕨一支在系统进化中的同源性状^[1,7]。Rothfels 等对以隐囊蕨类为主的碎米蕨类配子体发育过程进行研究,认为确实唯有特产于美洲的隐囊蕨类的配子体有泌粉现象,且与孢子体世代表现一致。这种现象在其他碎米蕨类中并未观察到,故支持配子体泌粉为该类群在系统进化中的同源性状的观点^[6]。

亚洲地区也有大量碎米蕨类分布,其中以粉背蕨属最为多见,其最明显的特征为孢子体叶背常常被有白色或黄色的蜡质粉末。它们的配子体发育阶段是否也具有泌粉现象至今还未有系统的研究。本文在前人工作的基础上,对国产粉背蕨属类群的配子体发育特征进行研究,并结合分子系统学分析,旨在理清它们的系统发育关系,并进一步认识配子体的泌粉现象在碎米蕨类中的系统学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料均采自野外。分子材料采用传统的硅胶干燥方法保存,凭证标本存放于北京林业大学标本馆(BJFC)。孢子材料则取自干净成熟的孢子叶,置于纸质信封中,待其自然干燥弹射孢子后收集。本文选取 5 种粉背蕨属植物进行配子体发育观察,包括毛叶粉背蕨(*Aleuritopteris squamosa*)、粉背蕨(*A. anceps*)、银粉背蕨(*A. argentea*)、无银粉背蕨(*A. argentea* var. *obscura*)和 华北粉背蕨(*A. kuhni*) [华北薄鳞蕨(*Leptolepidium kuhni*)](表 1)。

1.2 孢子培养

植物孢子采用混合基质培养。培养基质为草炭土与蛭石以 1:1 混匀,在 121℃ 下高压灭菌 30 min。待其自然冷却后,填充在长宽高均为 7 cm 的方花盆中,均匀喷洒蒸馏水,使基质湿润,而后播撒孢子,每种重复 2 次。随后置于人工气候箱(宁波赛福 PRX-350B)中培养,昼夜交替培养,条件为

表 1 实验材料

Table 1 Materials tested

植物 Species	采集地 Location	采集人和采集号 Collector and collect No.
毛叶粉背蕨	海南东方市东河镇俄贤岭	毛星星 HN2012121601
<i>Aleuritopteris squamosa</i>	E'xian ling, Dongfang, Hainan	Mao Xing-xing HN2012121601
银粉背蕨	北京市西山国家森林公园	毛星星 M2012092702
<i>A. argentea</i>	Xishan National Forest Park, Beijing	Mao Xing-xing M2012092702
无银粉背蕨	北京市西山国家森林公园	毛星星 M2012092701
<i>A. argentea</i> var. <i>obscura</i>	Xishan National Forest Park, Beijing	Mao Xing-xing M2012092701
华北粉背蕨	内蒙古赤峰市喀喇沁旗	张钢民 Z006
<i>A. kuhni</i>	Keerqing, Chifeng, Inner Mongolia	Zhang Gang-ming Z006
粉背蕨	江西省龙南县小武当山	刘贤 JLS2012081301
<i>A. anceps</i>	Xiaowudangshan, Lonngnan, Jiangxi	Liu Xian JLS2012081301

18 h d⁻¹ 全光照(150 μmol m⁻²s⁻¹), 温度 24℃, 湿度 85%; 6 h d⁻¹ 弱光照(60 μmol m⁻²s⁻¹), 18℃, 湿度 75%。

1.3 发育观察

从播种的第 7 天开始, 每天检查记录孢子的萌发和配子体发育的情况, 取出的配子体用蒸馏水清洗干净, 腹面朝上置于载玻片上, 制成临时装片, 用光学显微镜 Olympus BX51 观察记录并照相。

1.4 系统发育树构建

根据配子体发育的研究结果, 对毛叶粉背蕨的 *rbcL* 基因进行测序, 结合由 GenBank 下载的相关序列(表 2), 探讨隐囊蕨类和其他粉背蕨属成员的

系统关系。内类群为粉背蕨属、中国蕨属、隐囊蕨属、碎米蕨属等的种类。以戟叶黑心蕨(*Doryopteris ludens*)、凤丫蕨(*Coniogramme japonica*)、黑足金粉蕨(*Onychium contiguum*)、蚀盖金粉蕨(*O. tenuifrons*)和稀叶珠蕨(*Cryptogramma stelleri*)等作为外类群。

总 DNA 的提取采用传统的 CTAB 法^[8], 继而对 *rbcL* 基因序列进行 PCR 扩增, 送交测序公司测序。用于系统发育分析的 *rbcL* 序列长度为 1205 bp, 保守位点 1010, 变异位点 195, 信息位点 182 (15%)。将对位排列后的序列导入系统发育分析软件 MEGA5.2 进行计算和系统发育树构建。采用最大似然法(Maximum likelihood, ML), 重复计算 1000 次获取支持率。

表 2 基因库中下载的 *rbcL* 序列号

Table 2 Accession No. of *rbcL* sequences downloaded from GenBank

分类群 Taxon	序列号 Accession No.	分类群 Taxon	序列号 Accession No.
<i>Aleuritopteris squamosa</i>	DQ432642	<i>Notholaena standleyi</i>	EU268805
<i>A. albomarginata</i>	AY266411	<i>N. chinensis</i>	DQ432651
<i>A. grisea</i>	AY299653	<i>N. aurea</i>	U28786
<i>A. kuhni</i>	AY266412	<i>N. californica</i>	EU268792
<i>A. likiangensis</i>	DQ432645	<i>N. sulphurea</i>	U28254
<i>A. tamburii</i>	DQ432644	<i>N. rosei</i>	U27728
<i>A. argentea</i>	AY266410	<i>N. grayi</i>	EU268795
<i>A. duclouxii</i>	U27447	<i>N. aliena</i>	EU268790
<i>A. niphobola</i>	AY266409	<i>Argyrochosma nivea</i>	HQ846449
<i>Cheilosoria hancockii</i>	DQ432649	<i>A. formosa</i>	HQ846419
<i>Sinopteris albofusca</i>	DQ432647	<i>P. atropurpurea</i>	EF452162
<i>S. grevilleoides</i>	DQ432648	<i>P. rotundifolia</i>	U28788
<i>Coniogramme japonica</i>	KC700111	<i>P. falcata</i>	GU136794
<i>Hemionitis palmata</i>	KC984525	<i>Onychium contiguum</i>	AY266416
<i>Doryopteris concolor</i>	AY266414	<i>O. tenuifrons</i>	AY266415
<i>D. ludens</i>	EF452150	<i>Cryptogramma brunoniana</i>	KC700160
<i>Bommeria ehrenbergiana</i>	U19497	<i>C. stelleri</i>	KC700078

2 结果

2.1 配子体形态观察

对粉背蕨类的配子体进行观察, 孢子均在播种后 7~15 d 开始萌发, 30 d 后逐渐成熟, 均有正常的性别分化, 为有性生殖种类。毛叶粉背蕨的配子体亦为心形(图 1: A, B), 性器官集中分布在原叶

体腹面中肋区域, 突出表面。成熟的雌性配子体长宽约 1.3~1.5 mm, 背腹两面均光滑, 边缘均匀分布有毛状体(图 1: C)。毛状体由二细胞组成, 基部细胞为长圆锥形, 末端腺细胞膨大为球形, 白色分泌物呈帽状附着在腺细胞表面, 积累到一定量时脱落(图 1: E)。雄性配子体多光滑无毛状体, 无泌粉现象, 体型约为雌性配子体的 1/3 (图 1: F), 精子器球

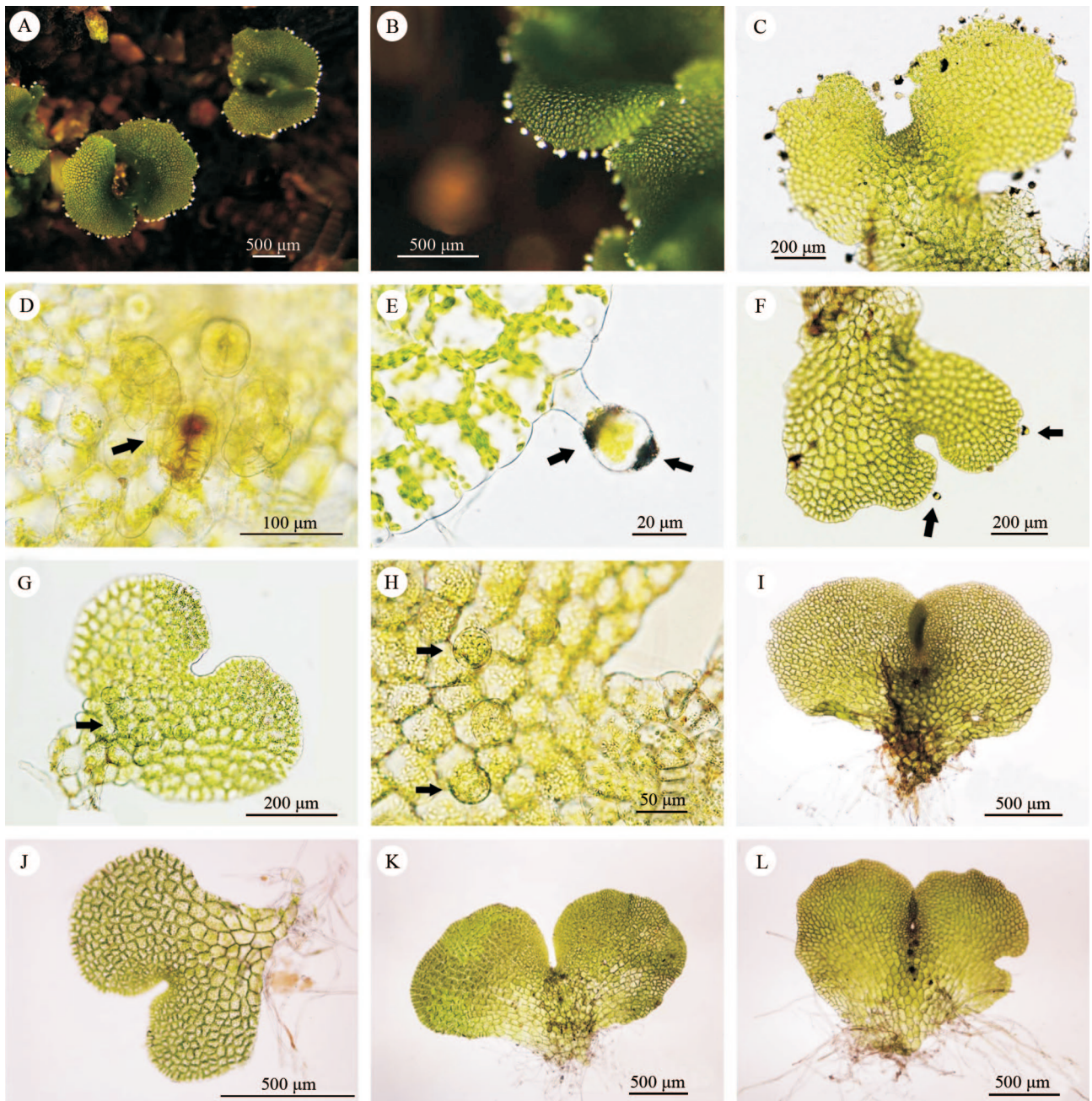


图 1 毛叶粉背蕨及其他粉背蕨属的配子体。A~H: 毛叶粉背蕨; A, B: 培养基质中的配子体; C: 有毛状体和粉状分泌物的雌性配子体; D: 雌性配子体的颈卵器(箭头); E: 配子体叶缘的毛状体及粉状分泌物(箭头); F: 毛状体稀少的雄性配子体(箭头示分泌腺和粉状分泌物); G: 光滑无毛的雄性配子体(箭头示精子器); H: 雄性配子体的精子器(箭头); I~L: 其他粉背蕨类; I: 华北粉背蕨; J: 银粉背蕨; K: 无银粉背蕨; L: 粉背蕨。
 Fig. 1 Gametophytes of *Aleurites squamosa* and other *Aleurites* species. A~H: *A. squamosa*; A, B: Gametophyte on culture medium; C: Farinose female gametophyte; D: Archegonium of female gametophyte; E: Glandular hairs with white farina on the margin of gametophyte (arrows); F: Male gametophyte with few hairs and farina; G: Glabrous male gametophyte; H: Antheridium of male gametophyte; I~L: Other *Aleurites* species; I: *A. kuhni*; J: *A. argentea*; K: *A. argentea* var. *obscura*; L: *A. anceps*.

形,盖裂(图 1: H)。除此之外,还有少量配子体仅具极稀疏的腺毛(图 1: F),为雄性或性别分化不明显。而华北粉背蕨、粉背蕨、银粉背蕨和无银粉背蕨的配子体均为心形,体表光滑,无毛状体(图 1: I~L);

2.2 配子体的泌粉现象和性别特征

随机抽取 50 个毛叶粉背蕨配子体进行观察,取样约占整体居群的 20%。在所观察的样本中,雌性配子体占 50%,雄性占 32%,还有 18%的个体

无性别分化,或性别特征难以分辨。雌性配子体的体型明显较大,且96%的个体有明显泌粉现象;而88%的雄性配子体光滑无粉,只有12%的个体长有稀疏的腺毛并有泌粉现象;少数无性别分化的配子体有类似腺体的结构,但未见分泌物。

2.3 分子系统学分析

基于叶绿体 *rbcL* 序列,按照多数(>50%)一致

原则构建系统发育树(图2)。可以看出,碎米蕨类植物基本可分为4大支:Hemionitids、Notholaenids、Myriopterids 和 Pellaeids。毛叶粉背蕨与粉背蕨属和中国蕨属等亚洲碎米蕨类成员聚在一起,并与黑心蕨属(*Doryopteris*)和泽泻蕨属(*Hemionitis*)等共同构成 Hemionitids 大支。该大支与特产美洲的隐囊蕨类 Notholaenids 形成姊妹群,证实毛叶粉背蕨是粉背蕨属的成员,与隐囊蕨类植物关系较远。

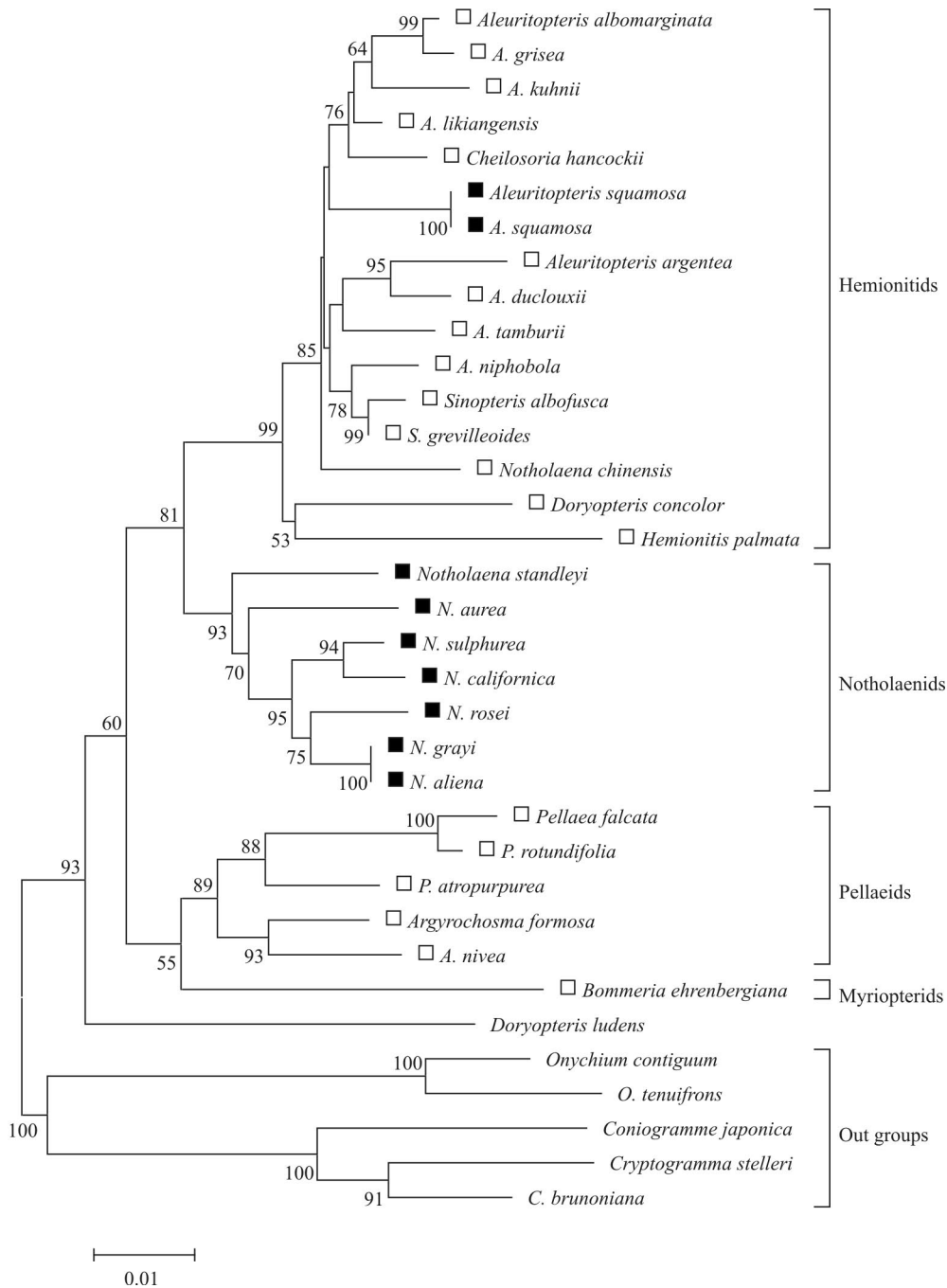


图2 基于 *rbcL* 序列的 ML 树。自展支持率大于 50%; ■: 配子体有粉; □: 配子体无粉。

Fig. 2 ML tree based on *rbcL* sequences. Bootstraps support >50% are above branches; ■: Gametophytes with farina; □: Gametophytes without farina.

此外,中国特有的中华隐囊蕨(*Notholaena chinensis*)同毛叶粉背蕨一样,聚在亚洲的碎米蕨群分支中,与美洲的隐囊蕨属种类关系疏远,说明中华隐囊蕨并不是真正的隐囊蕨属成员。

3 讨论

3.1 毛叶粉背蕨与其他碎米蕨类的系统关系

在碎米蕨类植物中,配子体泌粉现象被推断是隐囊蕨类的同源性状,因其仅在隐囊蕨类中报道过^[1,7],而一个形态特征能够在孢子体和配子体阶段都表达是非常罕见的,为蕨类植物中的特例^[1,4]。Johnson等^[6]研究了隐囊蕨属及相关类群的配子体发育特征,认为这种配子体的泌粉现象确实仅出现在隐囊蕨类中,其他类群成员无论孢子体是否具有粉,配子体均无泌粉现象。

早蕨类的 *Argyrosma*, 曾置于隐囊蕨属中,其孢子体叶背具粉。分子系统学和细胞学研究都证明该属属于早蕨类^[1,9,13]。对 *Argyrosma* 配子体形态发育的研究表明,其配子体多表现为无粉,支持配子体泌粉现象是隐囊蕨类特有现象的观点^[6,9-11]。但在某些条件下, *Argyrosma nivea* 的配子体上也有少数分泌腺分泌粉状物的情况^[12]。

结合已有的亚洲碎米蕨类的配子体发育研究报告,包括银粉背蕨^[6,14]、无银粉背蕨^[15]、中国蕨^[16]、中华隐囊蕨^[6,17]等,亚洲碎米蕨类的配子体多表现为无粉状分泌物,而毛叶粉背蕨是罕见的有粉物种。毛叶粉背蕨在粉背蕨属中是非常特殊的物种,它的分布范围极小,特产于我国海南及云南中部,与泛喜马拉雅地区为主要分布区的其他粉背蕨属成员明显不同。其叶背除密被白色粉状物外,还覆盖有浓密的鳞片,同时在配子体的发育过程中也具有泌粉现象,这些特征与美洲分布的隐囊蕨属成员非常相似。但系统发育分析表明,毛叶粉背蕨仍然与粉背蕨属的其他成员聚在一起,共同构成亚洲“*Cheilanthes*”群,并与美洲的隐囊蕨类成员关系较远。由此可认为,在碎米蕨类群中,配子体的泌粉现象并非隐囊蕨类植物所特有。

3.2 配子体泌粉现象与性别分化的关系

在本研究中,我们观察到毛叶粉背蕨的泌粉现象基本集中在雌性配子体上,而雄性配子体上却十分少见,即便有也很稀疏。对于这种有趣现象,鲜

有文献讨论。Giauque^[11]对部分碎米蕨类配子体的研究中,观察到很多种配子体,如 *Notholaena* 的分泌腺持续产生蜡粉,但若配子体上密布精子器时,分泌蜡粉的腺体就会减少或消失;而在通常无粉种类的居群中,偶尔也会有极个别的配子体产生可泌粉的毛状体,这一般出现在胚发生发育时期。近年 Gabriel等^[2,10]的研究佐证了这种观点,他们认为无融合生殖种 *Agrychosma nivea* 在通常情况下是无粉的,但偶然情况下居群中会有少数配子体长有稀疏的毛状体,且有蜡粉分泌,此现象是伴随着无融合胚的发生发育过程,故推断配子体的泌粉现象受到了胚发育的诱导。在本研究中,毛叶粉背蕨配子体表现出的特性,暗示着毛状体泌粉现象与配子体雌性分化及胚的发生发育有着密切联系,可能是由相关激素诱导产生,且这种现象仅在部分类群中出现。

配子体的泌粉特征,并非隐囊蕨类植物所特有,这一性状也出现在毛叶粉背蕨中,而后者属于 Hemionitids 类(隐囊蕨类的姐妹群)。由此可以推测,配子体的泌粉特征,并不是碎米蕨类植物的一个同源性状,它在碎米蕨类植物的演化历史上,至少有两次不同的起源。但到目前为止,我们对于配子体泌粉现象的产生机理还知之甚少,这种粉状分泌物对于配子体的意义何在还是个谜,还需要进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Rothfels C J, Windham M D, Grusz A L, et al. Toward a monophyletic *Notholaena* (Pteridaceae): Resolving patterns of evolutionary convergence in xeric-adapted ferns [J]. *Taxon*, 2008, 57(3): 712–724.
- [2] Zhang X C, Wei R, Liu H M, et al. Phylogeny and classification of the extant lycophytes and ferns from China [J]. *Chin Bull Bot*, 2013, 48(2): 119–137.
张宪春, 卫然, 刘红梅, 等. 中国现代石松类和蕨类的系统发育与分类系统 [J]. *植物学报*, 2013, 48(2): 119–137.
- [3] Zhang G M, Zhang X C, Chen Z D, et al. First insights in the phylogeny of Asian cheilanthoid ferns based on sequences of two chloroplast markers [J]. *Taxon*, 2007, 56(2): 369–378.
- [4] Tryon R M, Hodge W H, Tryon A F. *Ferns and Allied Plants: With Special Reference to Tropical America* [M]. New York: Springer-Verlag, 1982: 213–284.
- [5] Gastony G J, Rollo D R. Phylogeny and generic circumscriptions of cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilantheoideae) inferred from *rbcL* nucleotide sequences [J]. *Amer Fern J*, 1995, 85(4): 341–

- 360.
- [6] Johnson A K, Rothfels C J, Windham M D, et al. Unique expression of a sporophytic character on the gametophytes of *Notholaenid* ferns (Pteridaceae) [J]. *Amer J Bot*, 2012, 99(6): 1118–1124.
- [7] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. *Bot Rev*, 1971, 37(3): 295–396.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(11): 11–15.
- [9] Windham M D. *Argyrochosma*: A new genus of cheilanthoid ferns [J]. *Amer Fern J*, 1987, 77(2): 37–41.
- [10] Gabriel J M, Galán Y. Gametophyte development and reproduction of *Argyrochosma nivea* (Pteridaceae) [J]. *Biologia*, 2011, 66(1): 50–54.
- [11] Giaouque M F A. Wax glands and prothallia [J]. *Amer Fern J*, 1949, 39(2): 33–35.
- [12] Gabriel J M, Galán Y, Prada C. Farina production by gametophytes of *Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham (Pteridaceae) and its implications for cheilanthoid phylogeny [J]. *Amer Fern J*, 2012, 102(3): 191–197.
- [13] Sigel E M, Windham M D, Huiet L, et al. Species relationships and farina evolution in the cheilanthoid fern genus *Argyrochosma* (Pteridaceae) [J]. *Syst Bot*, 2011, 36(3): 554–564.
- [14] Huang D, Feng Y L, Dong L. Studies on gametophyte development and spore propagation of *Aleuritopteris argentea* [J]. *Acta Hort Sin*, 2009, 36(9): 1345–1352.
黄笛, 冯玉兰, 董丽. 银粉背蕨的配子体发育及孢子繁殖技术的研究 [J]. *园艺学报*, 2009, 36(9): 1345–1352.
- [15] Bao W M, Wang Q X, Aur C W. Gametophytes of ferns from north-eastern China, VI: *Sinopteridaceae* [J]. *Bull Bot Res*, 1995, 15(3): 373–376.
包文美, 王全喜, 敖志文. 东北蕨类植物配子体发育的研究VI: 中国蕨科 [J]. *植物研究*, 1995, 15(3): 373–376.
- [16] Wang W Q, Cheng X, Jiao Y, et al. Substratum affects the gametophyte development and reproduction of *Sinopteris grevilleoides* (Sinopteridaceae), an endangered fern endemic to China [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2010, 32(1): 25–31.
王卫清, 成晓, 焦瑜, 等. 基质对中国特有濒危蕨类中国蕨配子体形态发育和繁殖的影响 [J]. *云南植物研究*, 2010, 32(1): 25–31.
- [17] Chen L Q, Liu D M, Bao W M. Studies on the development of gametophytes of *Notholaena chinensis* [J]. *Nat Sci J Harbin Norm Univ*, 1998, 14(3): 78–82.
陈立群, 刘冬梅, 包文美. 中华隐囊蕨配子体发育的研究 [J]. *哈尔滨师范大学学报: 自然科学版*, 1998, 14(3): 78–82.