

影响泽泻蕨孢子培养的环境因素研究

莫日根高娃¹, 谭桂娟², 严岳鸿^{3*}, 赵国华^{1,3}, 刘保东¹

(1. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; 2. 北京吉鼎立达生物科技有限公司, 北京 101105; 3. 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海辰山植物园, 上海 201602)

摘要: 为了解环境因子对泽泻蕨(*Hemionitis arifolia* Moore.)培养的影响, 采用孢子培养技术研究温度、光照、pH、密度等对其有性繁殖的影响。结果表明, 泽泻蕨孢子为需光萌发, 孢子萌发和配子体发育的最适环境条件为: 温度 25℃, 日光灯光照强度为 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pH 为 6.5, 播种密度为 5~8 grains cm^{-2} , 幼苗管护简单, 成活率较高, 未见病虫害。这为保护和开发我国泽泻蕨资源提供了理论依据和技术支持。

关键词: 珍稀植物; 泽泻蕨; 孢子培养; 环境因素

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.008

Effects of Environment Factors on Spores Culture of *Hemionitis arifolia* Moore.

Morigengaowa¹, TAN Gui-juan², YAN Yue-hong^{3*}, ZHAO Guo-hua^{1,3}, LIU Bao-dong¹

(1. College of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 2. Beijing Jidinglida Biological Technology Co., LTD, Beijing 101105, China; 3. Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602, China)

Abstract: In order to understand the influence of environment factors on culture of *Hemionitis arifolia* Moore., the effects of temperature, light condition, pH and density on sexual reproduction of spores were studied by micro culture. The results showed that the germination of *H. arifolia* spores need light, the optimum condition for spore germination and gametophyte development of *H. arifolia* was under 25℃, 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensity, pH=6.5 with sowing density of 5–8 grains cm^{-2} . The management of seedlings was simple. The survival of *H. arifolia* was high with few disease and insect pest. So, these would provide the technical assistance and theoretical foundation for protection and development of *H. arifolia* resources.

Key words: Rare plant; *Hemionitis arifolia* Moore.; Spore culture; Environment factor

裸子蕨科(Hemionitidaceae)泽泻蕨属(*Hemionitis* Moore.)全球共有 8 种, 其中 7 种产热带美洲, 另 1 种泽泻蕨(*H. arifolia* Moore.)仅零散分布在我国台湾、海南和云南等地区, 生长于海拔 1000 m 左右的林下湿地、溪谷石缝或荫蔽灌丛中^[1]。泽泻蕨类植物株型清新自然, 叶片心形, 叶色淡雅, 具有较高的观赏价值。Ajikumaran 等^[2]报道其提取物有抗糖

尿病的作用; 在治疗烧伤、月经失调等方面也有一定的疗效^[3]。Kitherian 等^[4]报道泽泻蕨类的三氯甲烷提取物能有效控制花生锈病和叶斑病等。近年来, 泽泻蕨类植物的经济价值越来越受到欧美一些国家的重视, 少数种类已经通过韩国、日本、新加坡等地进入我国东南沿海地区的花卉市场^[5]。我国的泽泻蕨野生资源正遭受严重破坏, 同时作为珍稀物

收稿日期: 2014-11-19 接受日期: 2015-01-13

基金项目: 上海辰山植物园科研专项经费(F122421, F132422)资助

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yan.yh@126.com

种、进化渐危种和全球生态评价的理想材料,已经被建议列入国家二级保护植物^[6]。为保护种质资源,满足科研和市场需求,对我国的泽泻蕨进行人工繁殖研究具有重要意义。

一方面,蕨类植物的孢子数量多、繁殖系数高,而且体积小,易于运输和储藏,多数蕨类植物的孢子储藏多年后仍保持较高的萌发率^[7],蕨类植物孢子培养的成本较低^[8-9],孢子培养比组织培养更具生产优势。另一方面,不同于一般意义的组织培养,孢子培养有较高的实验条件要求和严格的技术方法限制,培养参数因种而异^[10-11]。目前尚未见泽泻蕨孢子培养的相关报道,本研究旨在探索人工条件下泽泻蕨的孢子培养技术,即有性世代发育与光照、温度、pH 和播种密度之间的规律,探索适合泽泻蕨繁殖的环境条件,进而提高幼孢苗的成活率和抗逆性,为相关种质资源保护提供理论依据,也为经济利用提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 孢子的采集

泽泻蕨(*Hemionitis arifolia* Moore.)孢子于2012年11月采自深圳仙湖植物园,原产地是海南乐东,在哈尔滨师范大学黑龙江省普通高等学校植物学重点实验室(45°52'02" E, 126°33'10" N)进行孢子繁殖研究和幼孢苗栽培实验。

泽泻蕨孢子的采收参照马洪娜^[12]的方法并加以改进,将充分成熟的颜色为黄绿色且没有开裂的孢子叶剪下,装入清洁密封的纸袋内,置于通风干燥处3~5 d,待孢子自然散落后,收集于硫酸纸袋内,立即接种或置于4℃冰箱中保存。

1.2 孢子的消毒与定量播种

孢子的消毒参照徐艳等^[13]的方法,取适量新鲜成熟的孢子置于2.5 mL离心管内,加入5% NaClO水溶液2 mL消毒5 min,在10.02×g下离心5 min,沉淀用无菌水冲洗5遍。用移液枪精确滴加适量无菌水于消毒的孢子悬浊液中,用血球计数器检测,制成浓度约为 5×10^5 grains mL⁻¹的无菌孢子悬浊液,按照平板培养基的面积和所需接种的孢子数量,吸取孢子悬浊液进行均匀定量播种。

1.3 孢子的培养

在孢子无菌培养的基础上,分别以温度、光强、

pH、接种密度进行单因素培养,每个因子均设6组重复。

温度 在pH为6.5的改良Knop's半固体琼脂平板培养基上,用移液枪按6~9 grains cm⁻²吸取无菌孢子悬浊液均匀接种,置于14 h d⁻¹光照、光照强度为150~200 μmol m⁻²s⁻¹的日光灯下培养,温度分别设置为15℃、20℃、25℃、30℃、35℃。

光照强度 在pH为6.5的改良Knop's半固体琼脂平板培养基上,用移液枪按6~9 grains cm⁻²吸取无菌孢子悬浊液均匀接种,置于14 h d⁻¹光照、温度为23℃~26℃的日光灯下培养,光照强度分别设置为50、100、150、200、250 μmol m⁻²s⁻¹。

pH 改良Knop's半固体琼脂平板培养基的pH分别设置为4.5、5.5、6.5、7.5和8.5,用移液枪按6~9 grains cm⁻²吸取无菌孢子悬浊液均匀接种,置于14 h d⁻¹光照、温度为23℃~26℃、光照强度为150~200 μmol m⁻²s⁻¹的日光灯下培养。

孢子接种密度 在pH为6.5的改良Knop's半固体琼脂平板培养基上,用移液枪吸取适量的无菌孢子悬浊液均匀接种后,置于14 h d⁻¹光照、温度为23℃~26℃、光照强度为150~200 μmol m⁻²s⁻¹的日光灯下培养,孢子密度分别设置为3、6、9、12、15 grains cm⁻²。

孢子的土壤培养法 参照马洪娜等^[12]的方法,在原叶体形成后,每天早晚各喷1次水,保持空气湿度在70%以上。每天定时通风1~2次,温度为23℃~26℃,以保证配子体的正常生成和受精。

1.4 观察记录与数据统计

接种3 d后定时观察,测量或拍照记录配子体发育、胚胎发育、幼孢苗分株移栽成活、初具观赏性各阶段的相关生理参数或形态特征。所有数据用统计软件SPSS 19.0在P=0.05水平上进行单因素方差分析。

2 结果和分析

2.1 温度的影响

从表1可见,在pH为6.5,光强为150~200 μmol m⁻²s⁻¹的条件下,培养温度为15℃时,孢子萌发率最低,萌发时间和丝状体持续时间较长;15℃~25℃的孢子萌发率和配子体成活率逐渐增大,25℃时达到最高;25℃~35℃的孢子萌发率

和配子体成活率逐渐下降;35℃时萌发时间最长,虽然孢子萌发率略高但不能形成原叶体。因此,25℃为泽泻蕨孢子萌发和配子体发育的适合温度。

2.2 光照强度的影响

从表 2 可见,泽泻蕨孢子在无光条件下不能萌发,光照强度为 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时的孢子萌发率最低,原叶体形成时间最长。光照强度在 50~150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时,孢子萌发率和配子体成活率与光照强度呈正相关关系;光照强度为 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

时的孢子萌发率和配子体成活率最高;光照强度为 150~250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时,孢子萌发率和配子体成活率与光照强度呈负相关关系。由此可见,泽泻蕨培养的适合光照强度为 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

2.3 pH的影响

从表 3 可见,当 pH 为 4.5 时,孢子萌发率和配子体成活率较低,分别为 49.21% 和 47.16%,萌发时间和丝状体持续时间也最长;pH 为 4.5~6.5 时,孢子萌发率和配子体成活率随 pH 升高而提高,

表 1 温度对孢子萌发和配子体发育的影响

Table 1 Effect of temperature on spore germination and gametophyte development

温度 (℃) Temperature	萌发率 Germination rate (%)	萌发时间 Days of germination	丝状体持续时间 Duration days of filament	片状体形成时间 Days of spatulate formation	原叶体形成时间 Days of prothallus formation	配子体成活率 Survival of gametophyte (%)
15	74.57±7.36c	12.83±2.4b	25.5±5.01a	32.5±2.88a	60.33±5.96a	47.16±3.28d
20	87.83±3.51b	9.00±2.68c	14.83±2.71bc	21.83±2.40b	53.00±5.93bc	90.13±4.12b
25	92.75±2.2a	6.67±0.82d	10.83±3.87c	17.67±2.16c	46.33±4.32c	97.32±0.84a
30	85.3±2.20b	6.17±0.41d	15.67±2.16c	23.00±1.10b	57.83±6.31bc	85.57±3.88c
35	84.67±1.21b	15.00±1.26a	23.83±3.66b	23.54±0.76b	0	0

$n=5$, 同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

$n=5$, data followed different letters within column indicate significant difference at 0.05 level. The same is following Tables.

表 2 光照强度对孢子萌发和配子体发育的影响

Table 2 Effect of light intensity on spore germination and gametophyte development

光照强度 Light intensity ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	萌发率 (%) Germination rate	萌发时间 Days of germination	丝状体持续时间 Duration days of filament	片状体形成时间 Days of spatulate formation	原叶体形成时间 Days of prothallus formation	配子体成活率 Survival of gametophyte (%)
50	86.84±3.58c	9.33±1.51a	16.83±2.32a	25.67±2.66a	59.50±3.78a	85.50±1.77d
100	90.34±3.65bc	7.50±1.38b	14.17±1.47c	19.50±1.76bc	55.00±1.26bc	90.17±3.31c
150	95.04±2.37a	6.00±1.26b	14.00±1.41c	19.67±1.63d	48.00±3.16d	97.33±1.63a
200	93.00±2.00ab	6.83±0.75ab	15.50±1.38b	22.83±2.64c	54.17±2.40c	93.67±2.07b
250	88.00±2.90c	7.83±2.14a	17.17±2.14ab	25.33±2.34ab	58.00±2.61ab	87.33±4.46cd

表 3 pH 对孢子萌发和配子体发育的影响

Table 3 Effect of pH on spore germination and gametophyte development

pH	萌发率 Germination rate (%)	萌发时间 Days of germination	丝状体持续时间 Duration days of filament	片状体形成时间 Days of spatulate formation	原叶体形成时间 Days of prothallus formation	配子体成活率 Survival of gametophyte (%)
4.5	49.21±3.31d	12±1.26a	20.66±2.16a	28.67±2.42a	60.33±5.95a	47.16±3.27c
5.5	70.98±2.35b	10.33±1.50a	16.8±1.47b	23.83±1.47b	54.67±3.61b	75.31±3.20b
6.5	95.04±2.37a	6.5±1.04b	13±1.09c	20.67±2.50a	49±2.44c	97.585±1.69a
7.5	67.11±3.88c	10.83±1.94a	17.66±1.36b	26.33±3.07ab	55.67±4.71b	69.67±3.13c
8.5	13.98±2.07e	11.66±2.80a	0	0	0	0

pH 为 6.5 时达到最高,分别为 95.04% 和 97.59%; 而萌发时间和丝状体持续时间随 pH 升高而缩短, pH 为 6.5 时降到最低。pH 为 6.5~7.5 时,萌发率和成活率均下降;pH 为 8.5 时只有少数孢子能萌发,不形成丝状体。可见 pH 为 6.5 适合泽泻蕨孢子萌发和配子体发育。

2.4 孢子接种密度的影响

从表 4 可知,播种密度为 3~15 grain cm⁻² 时配子体都能发育,当播种密度为 3 grain cm⁻² 时,配子体之间的距离较大,配子体能充分发育,性器官成熟较早,但较难形成幼孢子体。孢子播种密度为

5~8 grain cm⁻² 时较为合适,容易形成幼孢子体。在土壤培养中,配子体的发育及其孢子体发生也随孢子的低密度(1~3 grain cm⁻²)(图 1: A)、中密度(6~9 grain cm⁻²)(图 1: B)、高密度(12~15 grain cm⁻²)(图 1: C)而表现出相同的规律。过高的播种密度会使配子体发育迟缓,孢子体发生率降低,而且配子体的长势较弱,容易被藻类和杂菌污染。

2.5 幼苗管护

当幼孢子体叶数为 2~3 枚、苗株高达 1~2 cm、长势良好时(图 1: D),在 60 cm×40 cm×15 cm 的育苗盘中加入筛过且灭菌的腐殖土,将幼孢苗移栽到

表 4 孢子接种密度对配子体发育和孢苗发生率的影响

Table 4 Effect of spore density for gametophyte development and spore germination

密度 Density (grain cm ⁻²)	丝状体持续时间 Duration days of filament	片状体形成时间 days of spatulate formation	原叶体形成时间 Days of prothallus formation	配子体成活率 Survival of gametophyte (%)	孢子体发生率 Sporophyte rate (%)
3	17.33±5.72	23.66±5.65	45.33±5.05	53.63±2.78	32.16±2.86
6	17.83±1.72	23.50±1.05	50.50±4.68	45.87±2.36	47.58±1.69
9	13.50±0.55	20.00±1.90	49.66±2.34	70.98±2.37	43.64±2.85
12	17.66±1.37	26.33±3.08	55.66±4.72	95.04±3.88	34.67±3.55
15	23.00±2.37	39.50±4.76	67.00±2.28	67.11±2.07	19.62±2.80



图 1 泽泻蕨的繁殖与幼苗管护。A: 成熟原叶体; B: 具有受精能力的原叶体群侧面观; C: 具有受精能力的原叶体群顶面观; D: 二叶龄幼孢子体群; E: 幼孢子体分株移栽; F: 幼孢子体复壮; G: 初具观赏价值的幼孢子体。

Fig. 1 Reproduction and seedling management of *Hemionitis arifolia*. A: Mature prothallus; B: Lateral view of prothallial groups with fertilization ability; C: Apical view of prothallial groups with fertilization ability; D: Two-leaf-old young sporophyte groups; E: Ramet transplanting of young sporophytes; F: Rejuvenation of young sporophytes; G: Ornamental young sporophytes.

育苗盘中,株间距为 3 cm (图 1: E)。刚移栽的幼孢苗需要缓苗 5~7 d,缓苗期间用塑料膜包住育苗盘,在温度为(22±2)℃、空气相对湿度≥90%、14 h d⁻¹光照、光强为(60±10) μmol m⁻²s⁻¹的日光灯下培养。缓苗后直接进行复壮培养,培养条件为温度 25℃、湿度保持在 70%~80%、14 h d⁻¹光照、光强为 200 μmol m⁻²s⁻¹的日光灯下培养,土壤含水量以(45±3)%为宜。复壮培养约 30 d,幼孢苗可生长到 4~5 枚叶片,株高 4~6 cm (图 1: F),此时可分株定植,定植后的管护条件与幼苗移栽基本相同,两个月后即有较好的观赏性(图 1: G)。

3 讨论

温度是促进孢子萌发和配子体发育至关重要的因素,本研究结果表明,低温和高温都会抑制孢子萌发。在一定范围内,温度的升高可以促进孢子萌发和配子体成活,25℃是泽泻蕨孢子萌发和配子体发育的适合温度,这和许多蕨类适合生长的温度相近^[14-15]。泽泻蕨在 25℃~35℃的萌发率降低,这可能是由于光敏色素介导的孢子萌发受到影响^[16]。高温条件下即使有少量孢子萌发,也不能形成原叶体。

光照是决定孢子是否萌发的决定性因素^[17-18],但光强的变化对孢子和配子体的发育影响不大,并不是限制其繁殖的主要原因^[19]。相对光强来说,光质(红、黄、蓝光)对配子体的发育更有影响力^[15]。无光条件下,泽泻蕨孢子不能萌发。泽泻蕨较耐阴,适当的光照强度就满足其生长需要^[5]。本文的结果亦证明,光照强度对泽泻蕨孢子的萌发率和配子体成活率影响不大,泽泻蕨发育的适合光强为 150 μmol m⁻²s⁻¹。

pH 对孢子萌发、丝状体的形成和配子体的存活率影响较大。适合的 pH 往往与植物原产地土壤的酸碱度相匹配。本研究结果表明,偏弱酸性(pH 6.5)最适合泽泻蕨孢子发育,这与韩见宇等^[20]在进行桫欏(*Alsophila spinulosa*)的人工繁殖时,将孢子播种在腐质土加酸性田土的基质上,也能产生孢子体的结论较为一致。有些蕨类孢子,如 *Cheilanthes feei*^[21]和 榭蕨(*Drynaria fortunei*)^[22],适合在弱碱环境中萌发,后者孢子在 pH 8.5 的环境中仍能萌发。

接种的密度往往影响配子体的性别分化,进而影响孢苗的发生率,Miller^[23]认为高培养密度下的

配子体通常发育成无性或雄性的狭长丝状体,而低培养密度下的配子体则通常发育为雌性或两性的心形原叶体。通过对紫萁(*Osmunda japonica*)^[24]、水蕨属(*Ceratopteris*)^[25]、鳞毛蕨属(*Dryopteris*)^[26]、狗脊蕨属(*Woodwardia*)^[27]等进行观察,从不同角度论证了培养密度与性别分化的关系,但都没有论及培养密度与孢苗发生率的关系。本研究结果表明,当培养密度较低时,配子体有充分的发育空间和营养条件,多发育成雌配子体,致使雌雄发育不平衡,而且由于配子体间距离较大,不利于受精,难以形成幼孢子体;相反,当培养密度过高时配子体发育迟缓、长势较弱,容易被藻类和杂菌污染,形成雄配子体的几率极高,形成雌配子体的几率很低,从而降低了孢子体的发生率,这与前人的结论相似^[28]。本研究认为泽泻蕨的理想培养密度为 5~8 grain cm⁻²。

在泽泻蕨幼孢体移栽和复壮的过程中,根系的管护尤为重要,植株移栽的深度要低于嫩叶的生长点,且要及时浇透水,保持土壤湿度。泽泻蕨孢苗生长的过程中没有出现病虫害,但会滋生出少量的藻类和苔藓,这是由于通风不及时,湿度过高造成的。由于泽泻蕨比较耐阴,光强一般不得超过 400 μmol m⁻²s⁻¹。

参考文献

- [1] Ching R C, Xing G X. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 3(1) [M]. Beijing: Science Press, 1990: 217-219.
秦仁昌,邢公侠. 中国植物志,第3卷第1分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 217-219.
- [2] Ajikumar N S, Shylesh B S, Gopakumar B, et al. Anti-diabetes and hypoglycaemic properties of *Hemionitis arifolia* (Burm.) Moore. in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 106(2): 192-197.
- [3] Hima B N, Suvamalatha D P, Rukmini K, et al. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Hemionitis arifolia* (Burm.) Moore. [J]. Ind J Nat Prod Resour, 2012, 3(1): 9-13.
- [4] Sahayaraj K, Borgio J F, Raju G. Antifungal activity of three fern extracts on causative agents of groundnut early leaf spot and rust diseases [J]. J Plant Protect Res, 2009, 49(2): 141-144.
- [5] Yang F C. Special tropical ferns (16): Culture of *Hemionitis arifolia* Moore. [J]. China Flower Hort, 2010(6): 26-27.
杨逢春. 热带蕨类植物专题(十六): 泽泻蕨的栽培 [J]. 中国花卉园艺, 2010(6): 26-27.
- [6] Yan Y H, Zhang X C, Ma K P. Pteridophytes in China: Diversity and Distribution [M]. Beijing: Science Press, 2013: 76-87.
严岳鸿, 张宪春, 马克平. 中国蕨类植物多样性与地理分布 [M]. 北京: 科学出版社, 2013: 76-87.
- [7] Wang H, Feng Y L, Huang D, et al. Spore germination of *Dryopteris*

- crassirhizoma* (Dryopteridaceae) [J]. Bull Bot Res, 2012, 32(3): 270–274.
- 王禾, 冯玉兰, 黄迪, 等. 粗茎鳞毛蕨孢子萌发研究 [J]. 植物研究, 2012, 32(3): 270–274.
- [8] Liu B D, Zhu C M, Lin X H, et al. An artificial sexual propagation and rejuvenation technology of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn var. *latiusculum* [J]. Nat Sci J Harbin Norm Univ, 1996, 12(3): 72–76.
- 刘保东, 朱传茂, 李新宏, 等. 蕨的人工有性繁殖及复壮技术 [J]. 哈尔滨师范大学学报: 自然科学版, 1996, 12(3): 72–76.
- [9] Dong L, Su X H. Study on spore propagation of the ostrich fern, *Matteuccia struthiopteris* Todaro [J]. Acta Hort Sin, 1993, 20(3): 274–278.
- 董丽, 苏雪痕. 荚果蕨(*Matteuccia struthiopteris* Todaro)孢子繁殖的研究 [J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 274–278.
- [10] Liu B D, Tan L Y. Studies on gametophyte development and spore propagation of *Nephrolepis auriculata* and *N. falcata* [J]. Acta Hort Sin, 2009, 36(4): 545–552.
- 刘保东, 檀龙颜. 肾蕨和镰叶肾蕨配子体发育及孢子繁殖研究 [J]. 园艺学报, 2009, 36(4): 545–552.
- [11] Guo M Q, Guo J, Liu B D. Reproduction pattern and daily management of ornamental pteridophyte [J]. China Flower Hort, 2011(3): 18–21.
- 郭梦桥, 郭捡, 刘保东. 观赏蕨类植物的繁殖方式及日常管理 [J]. 中国花卉园艺, 2011(3): 18–21.
- [12] Ma H N, Li Y, Tan L Y, et al. Spore propagation and rejuvenation of *Sphaeropteris lepifera* [J]. Acta Hort Sin, 2010, 37(10): 1679–1684.
- 马洪娜, 李杨, 檀龙颜, 等. 笔筒树的孢子繁殖及其复壮研究 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1679–1684.
- [13] Xu Y, Shi L, Liu Y, et al. Studies on spore propagation of *Pteris cretica* ‘Albo-lineata’ [J]. Acta Hort Sin, 2005, 32(4): 658–662.
- 徐艳, 石雷, 刘燕, 等. 白玉凤尾蕨孢子繁殖技术的研究 [J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 658–662.
- [14] Rana M A. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest [J]. Amer Fern J, 1999, 89(2): 149–158.
- [15] Du H H, Li Y, Li D, et al. Effects of light, temperature and pH on spore germination and early gametophytic development of *Alsophila metteniana* [J]. Biodiv Sci, 2009, 17(2): 182–187.
- 杜红红, 李杨, 李东, 等. 光照、温度和pH值对小黑桫欏孢子萌发及早期配子体发育的影响 [J]. 生物多样性, 2009, 17(2): 182–187.
- [16] Haupt W. Phytochrome-mediated fern-spore germination: A temperature-sensitive phase in the transduction chain after the action of P_{fr} [J]. J Plant Physiol, 1992, 140(5): 575–581.
- [17] Niu J Y, Li S, Xu Z M, et al. Effect of illumination and exogenous substance on spore germination and seedling survival of *Pteridium aquilinum* [J]. Acta Hort Sin, 2002, 29(6): 584–586.
- 牛俊义, 李胜, 徐作非, 等. 光照条件及外源物质对蕨菜孢子萌发成苗的影响 [J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 584–586.
- [18] Zeng H Y, Ding B Y. Observations on the spore germination and prothallium development of ferns [J]. J Wuhan Bot Res, 2004, 22(4): 368–371.
- 曾汉元, 丁炳扬. 蕨类植物孢子萌发及原叶体发育的观察 [J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(4): 368–371.
- [19] Guo J, Liu T T, Meng X L, et al. Spore culture and propagation of *Platycterium wallichii* [J]. Acta Hort Sin, 2013, 40(1): 155–162.
- 郭捡, 刘婷婷, 孟宪利, 等. 鹿角蕨的孢子培养及其繁殖 [J]. 园艺学报, 2013, 40(1): 155–162.
- [20] Han J Y, Zeng L L, Wang Y P, et al. Raising *Alsophila spinulosa* from spores [J]. Guizhou Sci, 1991, 9(1): 61–64.
- 韩见宇, 曾莉莉, 王用平, 等. 桫欏的孢子繁殖 [J]. 贵州科学, 1991, 9(1): 61–64.
- [21] Nondorf S L, Dooley M A, Palmieri M, et al. The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of southeast Missouri [J]. Amer Fern J, 2003, 93(2): 56–69.
- [22] Chang H C, Agrawal D C, Kuo C L, et al. *In vitro* culture of *Drynaria fortunei*, a fern species source of Chinese medicine “Gu-Sui-Bu” [J]. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 2007, 43(2): 133–139.
- [23] Miller J H. Fern gametophytes as experimental material [J]. Bot Rev, 1968, 34(4): 361–440.
- [24] Cao J G, Bao W M, Dai S J. Study on the morphology and development of the archegonium and antheridium of the fern *Osmunda cinnamomea* [J]. Bull Bot Res, 2003, 23(1): 42–45.
- 曹建国, 包文美, 戴绍军. 蕨类植物桂皮紫萁颈卵器和精子器形态和发育的研究 [J]. 植物研究, 2003, 23(1): 42–45.
- [25] Guo L L, Chen W B, Jiang N, et al. The effect of culture density on spore germination and sex differentiation of *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn [J]. J Shanghai Norm Univ (Nat Sci), 2010, 39(2): 210–212.
- 郭冷冷, 陈文博, 姜楠, 等. 培养密度对水蕨孢子萌发及配子体性别分化的影响 [J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2010, 39(2): 210–212.
- [26] Jiménez A, Quintanilla L G, Pajarón S, et al. Reproductive and competitive interactions among gametophytes of the allotetraploid fern *Dryopteris corleyi* and its two diploid parents [J]. Ann Bot, 2008, 102(3): 353–359.
- [27] DeSoto L, Quintanilla L G, Méndez M. Environmental sex determination in ferns: Effects of nutrient availability and individual density in *Woodwardia radicans* [J]. J Ecol, 2008, 96(6): 1319–1327.
- [28] Song Y Y, Gao J, Dai S J. Sex differentiation in ferns response to environmental factors [J]. Acta Ecol Sin, 2009, 29(9): 5030–5038.
- 宋莹莹, 高晶, 戴绍军. 蕨类植物性别分化对环境的响应 [J]. 生态学报, 2009, 29(9): 5030–5038.