

槲蕨配子体形态发育研究

徐艳^{1,2}, 李杨^{1,3}, 李东¹, 刘燕², 檀龙云⁴, 刘保东⁴, 石雷^{1*}

(1. 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 2. 北京林业大学园林学院, 北京 100083;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

摘要:用无机培养基和土壤培养基分别培养槲蕨(*Drynaria roosii* Nakaike)孢子, 显微镜下观察孢子萌发及配子体形态发育过程。结果表明:孢子黄色, 具单裂缝, 赤道面观豆形, 极面观椭圆形, 不具周壁, 孢子外壁局部具大小不一的颗粒状纹饰。接种后 10~12 d 孢子萌发, 萌发类型为书带蕨型, 原叶体发育为槲蕨型。接种后 20 d 左右发育为片状体, 片状体形成顶端细胞的时间较晚。毛状体出现在片状体形成之后, 数量丰富, 多为单细胞, 分布于原叶体背腹面及边缘。接种后 60 d 左右发育形成幼原叶体, 成熟原叶体呈心脏形。接种后 65 d 左右开始有性器官出现, 精子器的出现较颈卵器早 10 d 左右。颈卵器成熟后, 颈部常向原叶体基部倾斜或弯曲。原叶体受精后幼胚突破颈卵器生长。

关键词: 槲蕨; 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)01-0012-05

Observation on the Gametophyte Development of *Drynaria roosii* Nakaike

XU Yan^{1,2}, LI Yang^{1,3}, LI Dong¹, LIU Yan², TAN Long-yun⁴, LIU Bao-dong⁴, SHI Lei^{1*}

(1. Institute of Botany, the Chinese Academy of Science, Beijing 100093, China; 2. College of Landscape Architecture,

Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: The spores of *Drynaria roosii* Nakaike were cultured in inorganic medium and soil, respectively. The spore germination and gametophyte development were observed under microscope. The results showed that the spores were yellowish, monolete, without perispore and bearing granular ornamentation on the exospore. They are bean-shaped in equatorial view and elliptical in polar view. The spores germinated within 10~12 days after inoculation, the type of germination is *Vittaria*-type while that of gametophyte development is *Drynaria*-type. The prothallial plates formed in 20 days after inoculation and the establishment of apical cell was later. After the formation of the prothallial plate, profuse unicellular hairs occurred on both the surfaces and margin of the prothalli. The young prothalli developed in 60 days after inoculation and the mature prothalli are cordate-thalloid. The sex organs formed in 65 days after inoculation. The antheridia appeared about 10 days earlier than archegonia. Archegonial neck usually inclines or curves towards the base of the prothallus at maturity. It could be observed that the embryos break through the archegonia after fertilization.

Key words: *Drynaria roosii* Nakaike; Spore germination; Gametophyte development

槲蕨 (*Drynaria roosii* Nakaike) 是槲蕨科 (*Drynariaceae*) 槲蕨属中型附生蕨类植物^[1]。叶二型, 不育叶短, 基生, 没有叶柄, 外形似槲叶, 覆盖于根状茎上, 具有保水和搜集落叶和飞鸟粪便的功

能; 可育叶长, 具叶柄, 叶片羽状深裂, 叶片背面黄色、大而圆的孢子囊群具有独特的观赏效果(图版 I:1), 是室内外园林造景的优良植物材料。

槲蕨的根状茎可入药, 药名骨碎补, 能补肾坚

收稿日期: 2008-01-14 接受日期: 2008-04-27

基金项目: 国家科技部项目(2005DKA21006, 2006GH559901, 2007AA021405); 中国科学院重要方向性项目(KSCXZ-YW-N-52); 北京市自然科学基金项目(7072045)资助

* 通讯作者 Corresponding author

骨,活血止痛,治跌打损伤等^[2]。槲蕨是中药骨碎补的主要来源,目前市售的药材主要来自于浙江、湖北、广东、广西和四川的野生槲蕨。由于市场需求量较大,使得这些地区的槲蕨资源被过度开采,野生槲蕨资源遭到严重破坏。自然状况下,槲蕨孢子萌发率低,配子体发育、性器官发育、受精和孢子体生长对外界环境的要求比较高,使得槲蕨的自然繁殖很困难。因此,摸索人工栽培槲蕨的方法,对槲蕨资源的保护和利用意义重大。

孢子繁殖是扩大蕨类植物繁殖的有效途径之一^[3-4]。孢子的萌发是孢子繁殖成功的前提^[5],而配子体的生长发育是繁殖的关键,它直接影响到成苗率^[6]。人工进行孢子繁殖系数高、生长速度快,对槲蕨野生资源的保护和大规模栽培具有十分重要的意义。本文利用显微摄影技术,详细观察、记录了槲蕨孢子萌发及配子体形态发育过程,为人工繁殖槲蕨的过程提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 孢子的采集

槲蕨(*Drynaria roosii* Nakaike)孢子于2003年4月采自中国科学院植物研究所植物园。剪下具有成熟孢子的叶片,置洁净、密封的纸袋中,置于干燥通风处令孢子自然散落,7~10 d后将孢子收集于硫酸纸袋中,及时接种或播种,剩余孢子置4℃冰箱中保存,供重复培养使用。

1.2 培养方法

培养方法有无机培养基培养和土壤培养基培养2种。

无机培养基采用1/2MS固体培养基^[7](大量和微量元素为MS培养基全量的1/2,铁盐和有机物的含量与MS培养基相同),琼脂浓度为0.7%。孢子消毒按下述方法进行:取成熟的孢子置于1.5 ml离心管内,滴入无菌水,充分振荡使成悬浊液,静置2 h,2×g离心1 min,弃去上清液。离心管内再滴入约1.2 ml的5% NaOCl水溶液,灭菌4 min,无菌水冲洗4~5遍,获得无菌的孢子悬浊液。用滴管将此悬浊液均匀接种在培养基的表面。接种后将三角瓶放入透明的保鲜盒中,以玻璃覆盖,盒的底部铺有一层脱脂棉,培养过程中始终保持脱脂棉湿润,以保证孢子萌发所需的湿度,先置黑暗处保存24 h,以促使孢子同步萌发。培养室温度为25℃;荧光灯光源,每天照光12 h,光照强度35.7~

41.1 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

土壤培养是将过细筛的草炭土和细沙以体积比为1:1均匀混合后放入底部有孔的塑料盘(大小为25 cm×20 cm×5 cm)内,基质厚度约3 cm,将基质表面整平、压实,把塑料盘放入装有水的平盘中洒水,待基质表面湿润后取出待用。将孢子均匀地撒播在土壤表面,用保鲜膜封盘口,待长出原叶体后将保鲜膜换为玻璃板,以防止污染,并保持湿度。光照及温度同无机培养基培养。

在配子体各发育阶段,用XTS20/30体视显微镜进行观察,并用NikonECLIPSE E600拍照,孢子及性器官显微结构用S-4800扫描电镜观察并拍照。

2 结果和分析

2.1 孢子及孢子的萌发

光学显微镜观察到:槲蕨孢子黄色,具单裂缝(图版I:2),赤道面观呈豆形,极面观呈椭圆形,不具周壁,孢子外壁具小穴状纹饰,局部表面具大小不一的球形颗粒(图版I:3)。

接种后10~12 d,从孢子壁的单裂缝处伸出一条无色透明的初生假根,标志孢子萌发。假根与原叶体母细胞同时发育,原叶体母细胞的分裂面与形成假根的分裂面垂直,表现为书带蕨型(*Vittaria-type*)^[8]。

2.2 丝状体

原叶体母细胞分裂形成基原细胞和原叶体细胞。基原细胞一般不再分裂,而原叶体细胞进行连续的横分裂,经15 d左右,形成2~5个细胞的丝状体。在丝状体发育过程中,可由丝状体细胞分裂形成次生假根(图版I:4)。

2.3 片状体

接种后20 d左右,孢子由一维生长转为二维生长,进入片状体阶段(图版I:4)。片状体形成顶端细胞的时间较晚,位于片状体前端的一个细胞经两次斜分裂,分化出一楔形的顶端细胞,表现出槲蕨型(*Drynaria-type*)的发育特点^[8]。此时,原叶体边缘有单细胞毛状体分布(图版I:5)。

2.4 原叶体

幼原叶体生长点偏向一侧(图版I:5),经较长时间的分裂调整,最后形成左右对称的心脏形成熟原叶体,原叶体背腹及边缘均有单细胞毛状体分布

(图版 I :11),假根主要集中分布在原叶体中肋及其附近区域(图版 I :10)。

2.5 毛状体

毛状体出现在片状体形成之后,多为单细胞,数量丰富,分布于原叶体背腹及边缘。毛状体内有细胞核和叶绿体,毛状体形成 20 d 后,可见表面有分泌物,40 d 后,叶绿体几乎全部解体,分泌物有部分外排,还有部分积累在内部(图版 I :6),直至毛状体枯死脱落,而多细胞毛状体常常变为褐色而不脱落。

2.6 性器官

接种后 65 d 左右开始产生精子器,每个原叶体上约有十余个(雌雄同株)至数十个(雄性原叶体),混生于假根丛中。精子器顶面观圆形(图版 I :7),盖细胞圆形,精子器开裂时,盖细胞塌陷(图版 I :8)。精细胞自精子器中溢出时呈圆球形,外被薄膜,暂时停留在精子器的顶端,不能游动,约 3~4 min 薄膜溶解,精子迅速游动。游动精子借助原叶体表面的自由水游进颈卵器,完成受精作用。

颈卵器自接种后 75 d 左右开始产生,一般位于心脏形原叶体生长点之下、原叶体背腹两面中肋范围内,并伴随中肋发育而不断上延,每个原叶体上有数个至数十个不等。初始为营养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 4 列细胞组成,4~5 个细胞高,常向原叶体基部倾斜或弯曲,有大型基座(图版 I :9)。

随着培养时间的延长,原叶体上的性器官(包括精子器和颈卵器)会随配子体的生长而不断产生,老的性器官不断衰亡,幼的性器官不断产生。

2.7 胚的发育

接种后 90~100 d 开始出现幼孢子体。槲蕨一般都是单株单胚,受精后,幼胚第一叶首先突破颈卵器帽状体直立于原叶体外生长(图版 I :12),基足深陷配子体中肋,随着幼孢子体的生长,原叶体逐渐死亡。

3 结论和讨论

槲蕨的孢子黄色,具单裂缝,赤道面观豆形,极面观椭圆形,不具周壁,孢子外壁具小穴状纹饰,局部表面具大小不一的球形颗粒。接种后 10~12 d 孢子萌发,萌发类型为书带蕨型,原叶体发育为槲蕨型。接种后 55 d 左右开始出现性器官,精子器

的出现较颈卵器早 10 d 左右,此时要注意保持培养环境的空气湿度,以利于原叶体受精。接种后 90~100 d 开始出现幼孢子体。当幼孢子体苗的第 1 片子叶长至 1~2 cm 长时,将密集生长的幼孢子体苗分成 1 cm×1 cm 大小的苗丛,移植到 72 孔的穴盘中,保持相对湿度 60% 以上,待幼孢子体苗长至 3~5 cm 高且根系发达时,可结合分株进行上盆,缓苗 1 个月后可进行施肥。

本实验对槲蕨生活史进行了详细观察,为合理开发利用槲蕨提供了配子体发育的基础资料,同时建立了槲蕨孢子的人工繁殖方法,在控制光照及温度的条件下,配子体的受精率可达 80% 左右,并发育出幼孢子体,幼孢子体移栽成活率可达 90% 以上,为槲蕨的规模化繁育提供了基础资料。

参考文献

- [1] Shi L(石雷). Ornamental Ferns [M]. Beijing: Chinese Forestry Press, 2002: 160-161.(in Chinese)
- [2] Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Chinese Traditional Medicine Dictionary [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1979: 1658-1660.(in Chinese)
- [3] Xu Y(徐艳), Shi L(石雷), Liu Y(刘燕), et al. Studies on spore propagation of *Pteris cretica* 'Albo-lineata' [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32(4): 658-663.(in Chinese)
- [4] Yuan Y(袁艺), Tian S N(田胜尼), Ye A H(叶爱华), et al. Studies on the rapid propagate of the *Osmunda japonica* Thund. [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2002, 9(3): 247-250.(in Chinese)
- [5] He L Z(郝丽珍), Deng J L(邓俊玲), Huang F W W(皇甫武威), et al. Effect of environmental factors on spore germination and developing process of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* [J]. J Inner Mongol Inst Agri Anim Husb(内蒙古农牧学院学报), 1998, 19(2): 75-80.(in Chinese)
- [6] Wu Y F(吴艳芳), You M(尤敏), Wang X S(王新胜), et al. Primary study on effect factors for gametophyte development of *Drynaria fortunei* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2005, 23(5): 461-463.(in Chinese)
- [7] Xu Y(徐艳), Shi L(石雷), Liu Y(刘燕), et al. Spore sterile culture in *Alsophila gigantean* var. *gigantea* [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2004, 40(1): 72.(in Chinese)
- [8] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. Bot Rev, 1971, 37: 295-396.

图版说明

图版 I

1. 叶背的孢子囊群;
2. 孢子; ×1 700
3. 孢子外壁表面的纹饰; ×10 000
4. 形成楔形的顶端细胞(箭头示); ×714
5. 片状体具分生组织; ×357

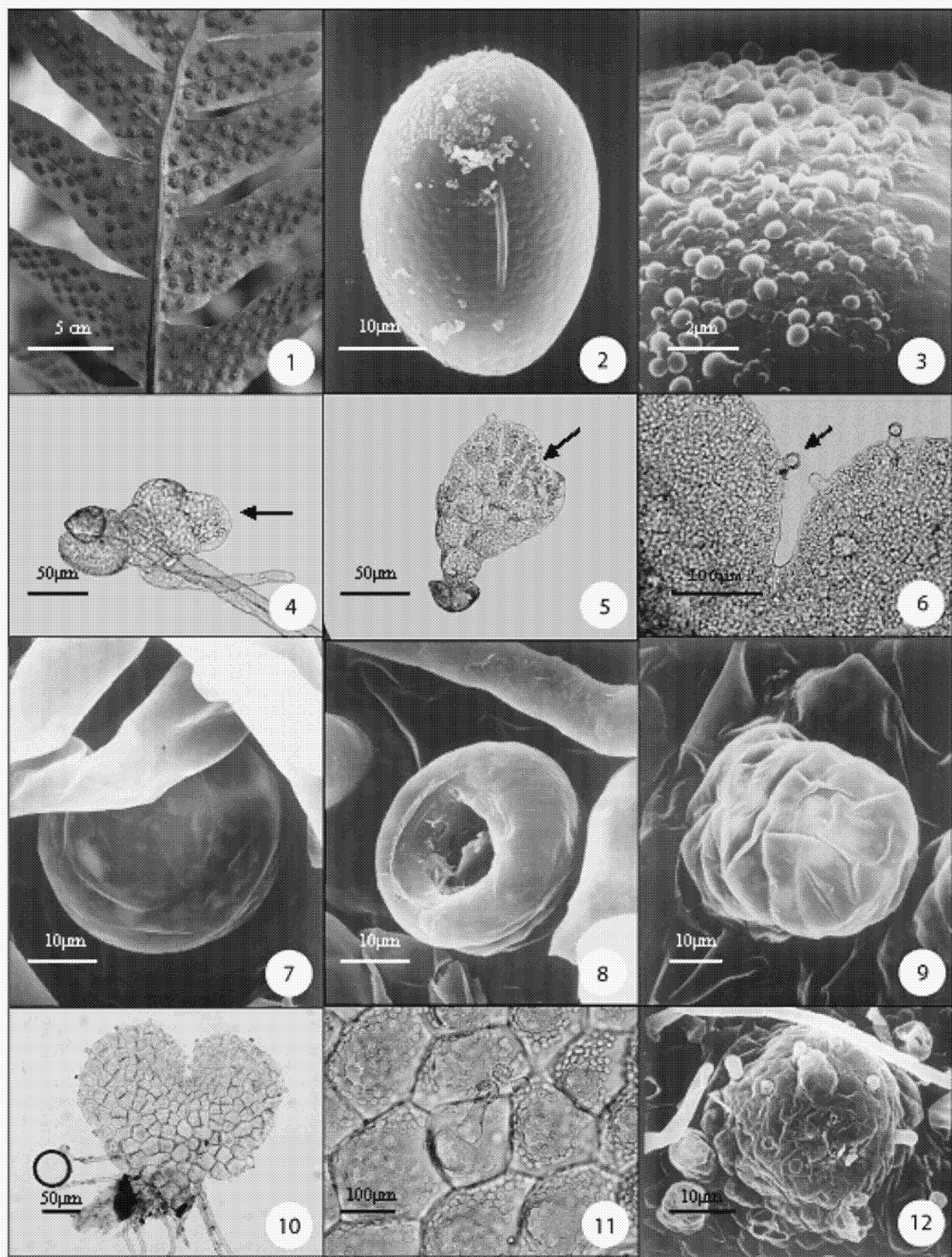
6. 原叶体顶端凹陷; $\times 357$
7. 成熟精子器顶面观; $\times 1\ 500$
8. 盖细胞已脱落的精子器; $\times 1\ 500$
9. 成熟颈卵器; $\times 1\ 300$
10. 心形幼原叶体; $\times 357$
11. 原叶体背面的毛状体; $\times 714$
12. 发育中的胚。 $\times 1\ 500$

Explanation of plates

Plate I

1. Sorus in the back of leaf;

2. Spore; $\times 1\ 700$
3. The exine bearing verrucate ornamentation; $\times 10\ 000$
4. Formation of the wedge-shaped meristematic cell (arrow); $\times 714$
5. The Prothallial plate with meristem (arrow); $\times 357$
6. The notch of the prothallus; $\times 357$
7. The top view of the mature antheridium; $\times 1\ 500$
8. The cap cell of the mature antheridium was thrown off; $\times 1\ 500$
9. The mature archegonium; $\times 1\ 300$
10. Young cordate-thalloid prothallus; $\times 357$
11. Hair in the dorsal side of the prothallus; $\times 714$
12. The developing embryo. $\times 1\ 500$



徐艳等:图版 I

XU Yan, et al. : Plate I