

云贵水韭雌配子体发育及其濒危机制的研究

沈玮¹, 谭桂娟², 刘子玥¹, 路靖¹, 刘保东^{1*}

(1. 哈尔滨师范大学, 黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室, 哈尔滨 150025; 2. 北京吉鼎立达生物科技有限公司, 北京 101105)

摘要: 为了解云贵水韭(*Isoetes yunguiensis*)的生殖过程和濒危原因, 采用人工培养获得其雌配子体, 用半薄切片法观察雌配子体发育过程。结果表明, 云贵水韭的大孢子萌发率约为 26%; 雌配子体异养, 终生都在大孢子细胞壁内发育; 颈卵器发育只有 2 枚颈沟细胞而无腹沟细胞。雌配子体发育停止在游离核时期、颈壁细胞数量偏少或排列紊乱、颈沟细胞异常、卵细胞凋亡等可能是导致生殖濒危的原因。同时, 游离核是水韭生殖生物学研究和系统学研究的重要环节之一; 缺失腹沟细胞可能是水韭类简化性进化的特征之一。

关键词: 云贵水韭; 雌配子体; 颈卵器; 濒危

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.005

Female Gametophyte Development and Endangered Mechanism Research in *Isoetes yunguiensis*

SHEN Wei¹, TAN Gui-juan², LIU Zi-yue¹, LU Jing¹, LIU Bao-dong^{1*}

(1. Harbin Normal University, Key Laboratory of Plant Biology, College of Heilongjiang Province, Harbin 150025, China; 2. Beijing Jidinglida Biological Technology Co., LTD, Beijing 101105, China)

Abstract: In order to understand the reproductive process and endangered reason of *Isoetes yunguiensis*, its female gametophytes were obtained by artificial culture, the development of female gametophyte was observed by using semithin section technology. The results showed that the germination rate of megaspore was 26%. The female gametophyte was heterotrophic, and developed in megaspore wall throughout its lifetime. There were only two neck canal cells and no ventral canal cell in archegonium development of *I. yunguiensis*. The main reasons led to reproductive endanger could be female gametophyte development stop in free nuclear stage, less neck wall cell or arranged disorders, neck canal cell abnormal, apoptosis of egg, and so on. Meanwhile, free nuclear is one of important steps in reproductive biology and systematics study of *Isoetes*. The missing ventral canal cell might be a characteristic of simplicity evolution of *Isoetes*.

Key words: *Isoetes yunguiensis*; Female gametophyte; Archegonium; Endangered

水韭科(Isoetaceae)为石松类原始维管植物, 具有独特的系统演化地位, 是植物界较为孤立的类群, 起源或分布中心尚不明确^[1], 全世界约有 200 种, 少量而零散地分布在北半球的热带亚热带地区, 多为水生或半水生, 对原生环境较为依赖, 是

研究古生态及物种演化的活化石^[2]。我国产 5 种, 其中云贵水韭(*Isoetes yunguiensis*)是云贵高原特有种, 仅少量分布在云南昆明及贵州平坝的狭窄山沟或浅沼地带^[3]。长期以来, 云贵水韭被误判为宽叶水韭(*I. japonica*), 2002 年王青锋等依据其孢子形

收稿日期: 2015-01-19 接受日期: 2015-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目-中国特产濒危蕨类水韭科植物生殖生物学研究(31170294)资助

作者简介: 沈玮(1990~), 男, 硕士研究生, 主要从事植物生殖生物学研究。E-mail: 1150267996@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 99bd@163.com

态、染色体数目等主要特征,将其作为新种发表^[4]。云贵水韭的野生种群呈间断式分布,数量急剧减少、濒临灭绝,被列为国家一级重点保护物种^[5-6]。

目前对水韭属植物的研究多集中在生态习性^[7]、种类鉴定^[8]、形态结构^[9]、细胞遗传^[10-11]、生理生化^[12]等方面,其叶舌结构^[13]和孢粉学^[14]一直是研究重点。相对而言,水韭属的生殖研究较少, Motte^[15]对 *I. lithophila* 的孢子萌发率等进行了研究;刘虹报道了中华水韭(*I. sinensis*)孢子的无菌培养和温度对大孢子萌发率的影响^[16];路靖报道了中华水韭雌配子体及胚胎的发育,对云贵水韭的雌性特征进行了一般性描述^[17-18]。对雌配子体发育的特征性结构,即游离核、生殖辅助细胞的来源和分化、颈沟细胞的形态结构和位移等对卵受精的影响等尚无细致观察,在有性生殖的结构性障碍和生理性障碍方面缺乏深入研究。Huang 等^[19]曾报道台湾水韭(*I. taiwanensis*)雌配子体表面的颈卵器数量不等; Cochran^[20]对水韭的精子进行了超微观察。Nayar^[21]和吴兆洪^[22]都指出配子体与胚胎可以为蕨类植物分类提供重要依据,认为生殖结构不仅决定了生殖功能的强弱,而且具有稳定的系统学意义。云贵水韭由于种群数量很少,极难获得有性世代的活材料^[11],本文用半薄切片法深入细致地研究了云贵水韭雌配子体尤其是颈卵器的发育规律,为揭示云贵水韭的生殖规律和生殖濒危原因,以及科学预测其濒危趋势提供理论依据和技术支撑。

1 材料和方法

云贵水韭(*Isoetes yunguiensis*)由中国科学院昆明植物研究所成晓研究员于2011年9月提供,原产地为贵州省平坝,凭证标本保存在哈尔滨师范大学植物标本室(HANU)。

按照路靖^[18]的培养方法,大孢子经5% NaClO 溶液消毒8 min 并充分水洗后,接种在改良的 Knop's 培养基上,改良之处是所用溶剂为原产地土壤浸出液(蒸馏水与土壤质量比为4:1)。定期在显微镜下观察大孢子的萌发率,将不同发育阶段的雌配子体在倒置显微镜下精确剥离大孢子壁后,用 FAA 固定液固定,常规半薄切片法切片并用甲苯胺蓝染色,用 Olympus-BX53F 显微成像系统观察并照相。

2 结果和分析

2.1 雌性发育的基本特征

云贵水韭大孢子近圆球形,萌发率为26%,大孢子的纵切面(图1:1)可见其细胞质均匀,三裂缝明显,孢子壁分3层,其中周壁和外壁结合紧密,厚度达10~20 μm,内壁较薄;大孢子培养7~10 d 后吸涨萌发(图1:2),原生质均匀,且含有大量的颗粒状营养物质,在内壁和中壁之间形成宽约30 μm 的空腔;孢子培养30~50 d 雌配子体多数发育成熟(图1:3),由大量的富含营养物质的薄壁细胞组成,雌配子体的绝大部分都被大孢子壁包裹,只是沿大孢子的三裂缝开裂处稍有隆起,并在隆起的顶端分化有颈卵器,每个雌配子体能先后产生6~14个颈卵器。雌配子体终生没有同化功能,一旦大孢子所储存的营养物质消耗殆尽,雌配子体也会随之枯萎。

颈卵器(图1:4)由雌配子体的表皮细胞分化而来,分为颈部和腹部两部分,颈部由16个细胞以每层4个共4层围成具有颈沟的颈壁,颈沟狭窄;幼嫩的颈卵器腹部无腹壁细胞,近底部只有一枚半球形或更扁平的卵细胞以及上方的两枚呈圆片状的颈沟细胞,卵细胞核明显,核周围有较大的质地透明的椭球形区域。

云贵水韭的颈卵器由幼嫩(图1:5)到成熟(图1:12),大约需要10~20 d。其间,卵细胞一直位于颈卵器腹部最下方,随着颈卵器的发育,其厚度不断增大,上缘周边向上突起,逐渐形成厚底圆盘状(图1:6,7,9~11),底部也向侧下方产生隆起(图1:12);两枚颈沟细胞在颈卵器成熟过程中的形态和位置变化明显:首先第一颈沟细胞向上提升,并在正上方形成钝刺状突起,突起的尖端伸向颈沟(图1:5~7),但颈沟直径基本保持不变(图1:8);第二颈沟细胞始终紧贴卵细胞的凹陷面并随之下陷(图1:5~7,9~11);两个颈沟细胞随着间距的加大,都向外分泌粘液状物质(图1:10~12),颈卵器的腹壁逐渐明显,腹壁细胞由雌配子体营养细胞直接演化而来。

颈卵器成熟后,两枚颈沟细胞几乎同时解体,卵细胞由厚底圆盘状(图1:13)膨胀成近球状(图1:14),体积迅速增大的同时,先是细胞核周围出现较大的透明区域(图1:15),随着卵细胞胞质变浓,透明区域逐渐减少(图1:16)。颈卵器发育过程如图2。

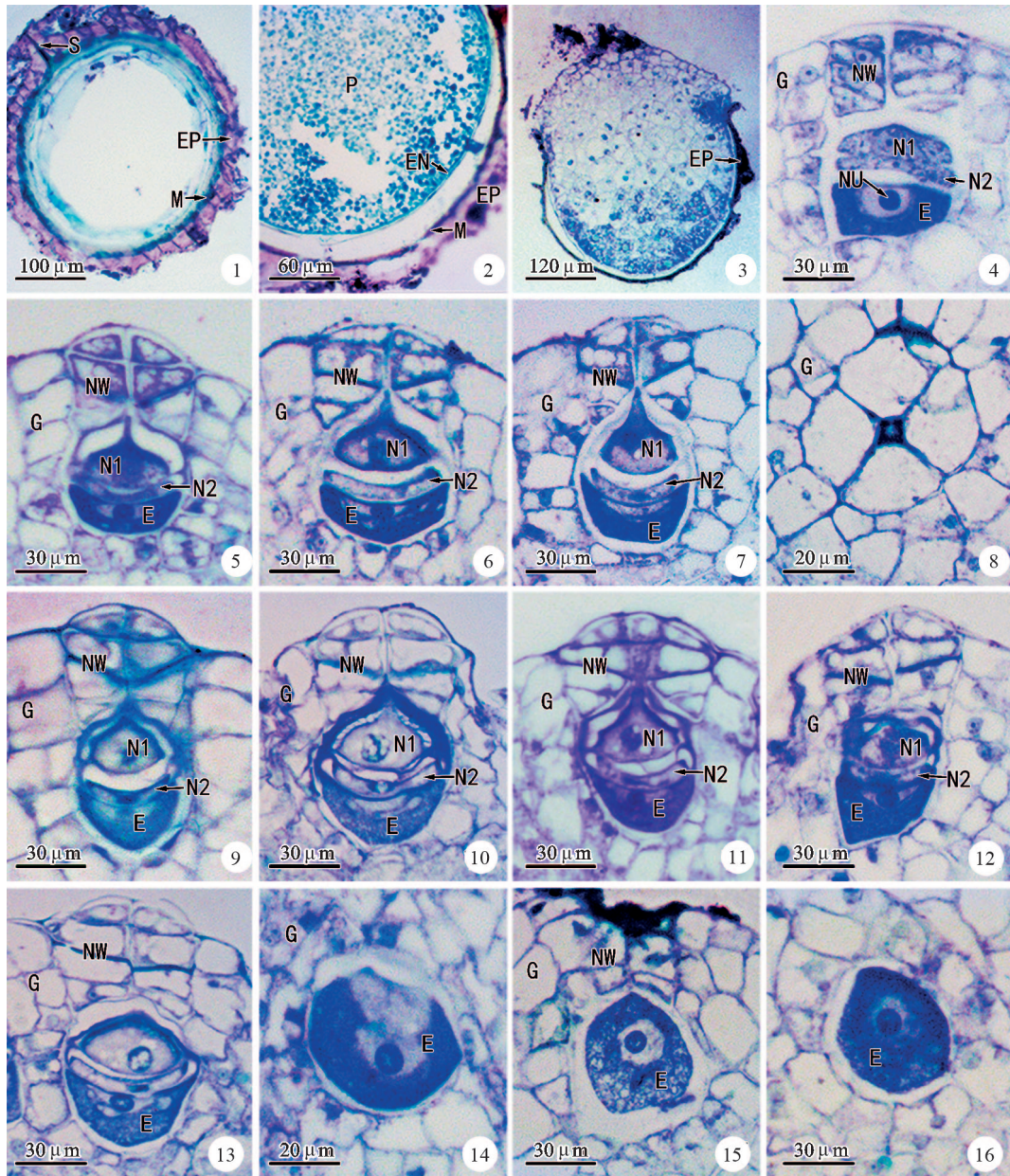


图1 云贵水韭雌配子体及其颈卵器的发育。S: 裂缝; Ep: 外壁; M: 中壁; P: 原生质; En: 内壁; G: 配子体; Nw: 颈壁细胞; N1: 第一颈沟细胞; N2: 第二颈沟细胞; Nu: 细胞核; E: 卵。1: 大孢子纵切面; 2: 雌配子体发育初期; 3: 成熟雌配子体纵切面; 4: 颈卵器纵切, 示两个颈沟细胞刚刚分裂; 5: 颈卵器纵切, 示颈沟细胞下沉; 6: 颈卵器纵切, 示两个颈沟细胞间出现空隙; 7: 颈卵器纵切, 示卵细胞上方进一步凹陷; 8: 颈卵器颈部横切; 9: 颈卵器纵切, 示卵细胞体积增加; 10: 颈卵器纵切, 示颈沟细胞间充满泡沫状物质; 11: 颈卵器纵切, 示颈沟细胞周围泡沫状物质进一步积累; 12: 颈卵器纵切, 示卵细胞底部向一侧延伸, 细胞核周围出现浅色区域; 13: 颈卵器纵切, 由雌配子体营养细胞特化出的颈卵器腹壁; 14: 颈卵器纵切, 示颈沟细胞凋亡, 卵细胞体积加大, 胞质染色不均; 15: 卵细胞核周围浅色区域进一步加大; 16: 颈卵器横切, 示成熟的卵。

Fig. 1 Development of female gametophyte and archegonium of *Isoetes yunguiensis*. S: Stomium; Ep: Epispore; M: Mesospore; P: Protoplasm; En: Endospore; G: Gametophyte; Nw: Neck wall cell; N1: 1st neck canal cell; N2: 2nd neck canal cell; Nu: Nucleu; E: Egg. 1: Vertical section of megaspore; 2: Early stage of female gametophyte; 3: Vertical section of mature female gametophyte; 4: Vertical section of archegonium, two neck canal cells just dividing; 5: Vertical section of archegonium, neck canal cell sink; 6: Vertical section of archegonium, cavity between two neck canal cells; 7: Vertical section of archegonium, further sinking above egg; 8: Transverse section of archegonium neck; 9: Vertical section of archegonium, egg volume increase; 10: Vertical section of archegonium, foam was filled between neck canal cells; 11: Vertical section of archegonium, foam further accumulate around neck canal cells; 12: Vertical section of archegonium, bottom of egg extend to the side, light area around nucleu; 13: Vertical section of archegonium, archegonium ventral wall specialized from vegetative cell of female gametophyte; 14: Vertical section of archegonium, neck canal cell apoptosis, egg volume increase, cytoplasmic uneven dyeing; 15: Light areas around nucleu increase; 16: Transverse section of archegonium, mature egg.

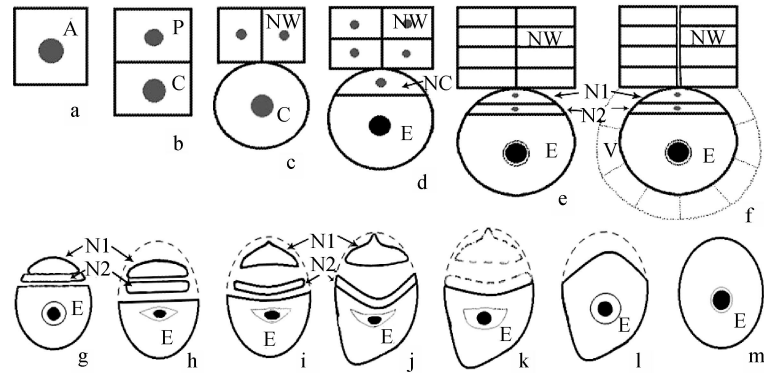


图2 云贵水韭颈卵器的发育过程。A: 原始细胞; P: 初生颈壁细胞; C: 中央细胞; NW: 颈壁细胞; NC: 初生颈沟细胞; E: 卵细胞; N1: 第一颈沟细胞; N2: 第二颈沟细胞; V: 由配子体营养细胞特化的颈卵器腹壁。

Fig. 2 Development process of archegonium in *Isoetes yunguiensis*. A: Initial cell; P: Primary neck wall cell; C: Central cell; NW: Neck wall cell; NC: Primary neck canal cell; E: Egg; N1: 1st neck canal cell; N2: 2nd neck canal cell; V: Archegonium ventral wall specialized from vegetative cell of gametophyte.

2.2 雌性败育现象

雌配子体败育有3个方面:一是大孢子败育(不萌发)率高达74%;二是部分雌配子体在游离核阶段就停止了发育,始终不能细胞化(图3:1);三是约有半数的雌配子体能够分化出颈卵器,但颈卵器腹部始终不能产生生殖细胞,颈卵器附近的多层营养细胞的胞质都稀薄透明,营养物质只堆积在雌配子体深处(图3:2)。

颈卵器败育有4个方面:一是感染败育,颈沟开口一旦被菌类感染,其生殖细胞多数败育,表现为生殖细胞胞质稀薄,不能正常分裂(图3:3),腹腔内细胞破碎化(图3:4)甚至全部解体(图3:5);二是颈壁细胞排列紊乱,颈沟不通,精子无法进入(图3:6,9);三是2个颈沟细胞异常,主要有体积过小(图3:6)或过大(图3:7~9),或第一颈沟细胞不向上提升(图3:9,10)导致第二颈沟细胞产生多个指状突起(图3:9,12~14)或泡沫化(图3:14,15);四是卵细胞体积膨大后胞质稀薄而失去活性(图3:11)或体积不增加(图3:12,13,15),即使是颈卵器腹壁已经充分发育,卵细胞等也可能凋亡(图3:16)。上述多种障碍可能在同一个颈卵器里发生(图3:6,9,14,15)。颈卵器败育的共同特征是卵细胞或颈沟细胞发育不良(图3:3~16)。

3 讨论

卷柏(*Selaginella tamariscina*)是著名的耐旱植物,可生长在极端干旱的裸岩缝隙中,在严重缺水

的条件下,其主要的生殖对策是配子体世代演化为壁内发育,用大孢子细胞壁保护整个有性世代所必须的水分^[23]。云贵水韭尽管与卷柏同属石松类(Lycophytes),却是典型的水生植物,雌配子体终生都在水中发育。既然生殖过程不存在水分限制的问题,那么云贵水韭壁内发育的生物学意义就无法解释。孟繁松^[24]证实水韭类的祖先曾经长期生长在古海岸地带,干湿不定甚至是严重干旱。云贵水韭所在的云贵高原也经历了漫长的海岸抬升,因此,本研究支持孟繁松的观点。中华水韭的雌性发育及其结构^[17-18]与云贵水韭基本相同,表明二者的系统演化关系较近。

本研究观察到云贵水韭雌配子体常停留在游离核时期,因细胞化进程受阻而败育。而油松(*Pinus tabulaeformis*)的雌配子体也具有游离核,而且游离核的形态结构、分裂状态不仅能直接决定配子体是否败育,还具有稳定的遗传性^[25]。因此,深入研究雌配子体游离核的发育特征,可能是破解云贵水韭生殖濒危机制的有效途径之一,也有助于揭示维管植物生殖演化的系统学规律。

颈卵器(Archegonium)是苔藓植物、蕨类植物、银杏、苏铁等类群的共同结构,是随着植物进化而不断简化的雌性生殖器,是讨论高等植物进化的重要依据^[23]。一般认为蕨类植物颈卵器内具有2个颈沟细胞(Neck canal cell)或1个颈沟细胞里具有2个细胞核和1个腹沟细胞(Ventral canal cell),2个颈沟细胞由1个初生颈沟细胞(Primary neck canal cell)分裂而来,腹沟细胞和卵细胞则是由中央细胞

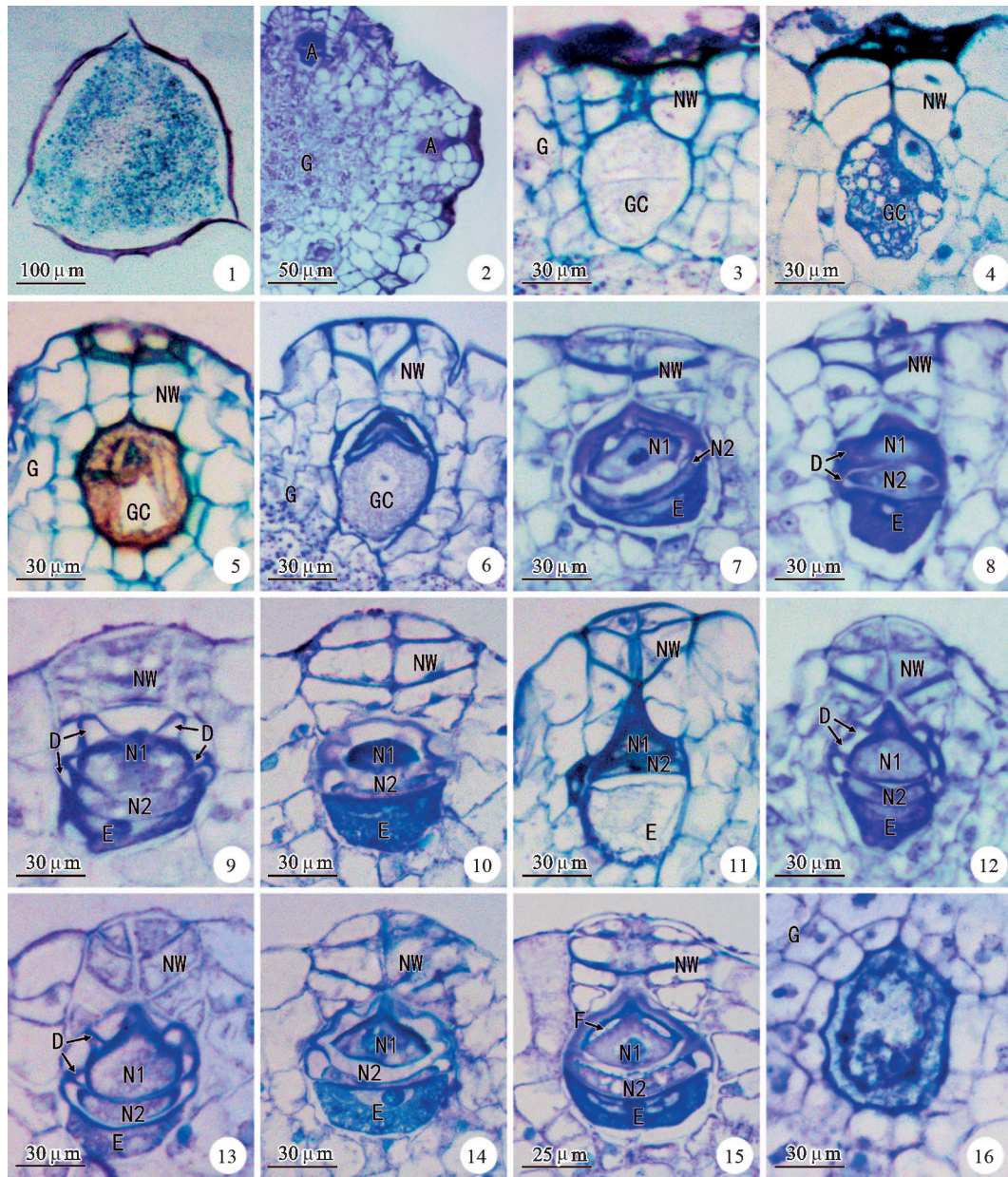


图3 云贵水韭雌配子体及颈卵器的败育结构。A: 颈卵器; M: 中壁; G: 配子体; NW: 颈壁细胞; GC: 生殖细胞; N1: 第一颈沟细胞; N2: 第二颈沟细胞; D: 指状突起; E: 卵; F: 泡沫。1: 停止在游离核时期的雌配子体; 2: 着生有败育颈卵器群的雌配子体; 3: 颈卵器纵切面, 示菌类感染后卵细胞败育; 4: 颈卵器纵切面, 示菌类感染后破碎化的卵细胞; 5: 老化的卵细胞; 6: 颈卵器纵切面, 示颈沟不通、颈沟细胞发育不良; 7: 颈卵器纵切, 示颈沟细胞过大、卵细胞发育不良; 8: 颈卵器纵切, 示颈沟细胞过大、卵细胞老化; 9: 颈卵器纵切, 示颈沟不通、第二颈沟细胞侧向上产生多个指状突起; 10: 颈卵器纵切, 示第一颈沟细胞未产生盾刺状突起; 11: 颈卵器纵切, 示败育的卵细胞; 12: 颈卵器纵切, 示过大的第一颈沟细胞; 13: 颈卵器纵切, 示卵细胞萎缩; 14: 颈卵器纵切, 示颈沟不通、第二颈沟细胞产生多个指状突起、第一颈沟细胞被泡沫状物质托起; 15: 颈卵器纵切, 示过熟的颈沟细胞和尚未发育的卵细胞; 16: 颈卵器横切, 示解体的卵细胞。

Fig. 3 Abortive structures of female gametophyte and archegonium in *Isoetes yunguiensis*. A: Archeogonium; M: Mesospore; G: Gametophyte; NW: Neck wall cell; GC: Germ cell; N1: 1st neck canal cell; N2: 2nd neck canal cell; D: Digitation; E: Egg; F: Foam. 1: Female gametophyte stop in free nuclei stage; 2: Abortive archegoniums on female gametophyte; 3: Vertical section of archegonium, egg abortive infected by fungus; 4: Vertical section of archegonium, fragment egg infected by fungus; 5: Aged egg; 6: Vertical section of archegonium, neck canal impassability, neck canal cell dysplasia; 7: Vertical section of archegonium, neck canal cell oversize, egg dysplasia; 8: Vertical section of archegonium, neck canal cell oversize, aged egg; 9: Vertical section of archegonium, neck canal impassability, many digitations above side of 2nd neck canal cell; 10: Vertical section of archegonium, no shield spike on 1st neck canal cell; 11: Vertical section of archegonium, abortive egg; 12: Vertical section of archegonium, 1st neck canal cell oversize; 13: Vertical section of archegonium, atrophied egg; 14: Vertical section of archegonium, neck canal impassability, many digitations above side of 2nd neck canal cell, 1st neck held by foam; 15: Vertical section of archegonium, overripe neck canal cell and undeveloped egg; 16: Transverse section of archegonium, disintegrated egg.

(Central cell)分裂而来,初生颈沟细胞和中央细胞是姊妹关系^[26],腹沟细胞因与卵细胞为姊妹关系而不同于颈沟细胞^[27]。本研究观察到云贵水韭颈卵器的2个“沟细胞”是由1个细胞分裂而来,颈卵器内只有颈沟细胞而无腹沟细胞。从系统演化的角度来看,云贵水韭的中央细胞不再分裂而直接演化为卵细胞,因此可以证明腹沟细胞要比颈沟细胞分化晚,腹沟细胞主要生殖意义是辅佐卵细胞发育。在水韭类存在着中央细胞的简化式退化。

云贵水韭的颈卵器在具有受精能力前,2枚颈沟细胞和1枚卵细胞在形态、位置等方面都有着一定的变化规律,这是未见报道的。Karrfalt等^[28]观察到*I. andicola*成熟颈卵器颈部近下方有一个短管状通道,但长度不会穿过最外层的两层颈壁细胞,与云贵水韭一样,颈沟细胞并不在颈沟内,只是第一颈沟细胞在解体前曾沿颈沟底部向上产生1个钝刺状突起,认为这个突起应该有疏通颈沟、利于精子游入的生理功能。

Huang^[19]观察到台湾水韭(*I. taiwanensis*)雌配子体表面可产生5~12枚颈卵器,路靖等^[17]指出颈卵器发育成熟后如果一直没有受精机会,过熟的颈卵器就会逐渐枯死,新颈卵器不断产生,直到大孢子内的养分耗尽为止,这应该是为了获得更多的受精机会。本研究在支持上述结果的基础上,进一步认为云贵水韭雌性败育的主要原因是颈卵器高度简化且分化紊乱:由于颈卵器的腹壁细胞是由配子体的营养细胞转化而来,又缺失腹沟细胞,这和蕨类植物^[22,27]相比,云贵水韭的卵发育得不到很好的保护和滋养;颈壁细胞排列紊乱,颈沟不通;颈沟细胞产生指状突起或泡沫化;卵细胞在体积膨大后,常出现胞质稀薄而失去活性,而且这些障碍可能在同一个颈卵器里发生。此外,大孢子败育率高达74%、多数不能萌发,雌配子体发育初期常停留在游离核时期、细胞化受阻,半数细胞化的雌配子体不能产生颈卵器等,也应该是云贵水韭生殖濒危的重要原因。

参考文献

- [1] Zhang L B, Taylor W C. Isoëtaceae [M]// Flora of China, Vol. 2-3. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2013: 35-36.
- [2] Taylor W C, Hickey R J. Habitat, evolution and speciation in *Isoetes* [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1992, 79(3): 613-622.
- [3] Pang X A, Liu X, Liu H, et al. The geographic distribution and habitat of the *Isoetes* plants in China [J]. Biodiv Sci, 2003, 11(4): 288-294.
庞新安, 刘星, 刘虹, 等. 中国三种水韭属植物的地理分布与生境特征 [J]. 生物多样性, 2003, 11(4): 288-294.
- [4] Wang Q F, Liu X, Taylor W C, et al. *Isoetes yunguiensis* (Isoetaceae), a new basic diploid quillwort from China [J]. Novon, 2002, 12(4): 587-591.
- [5] the State Council of the People's Republic of China. National key protected wild plants list [J]. Plants, 1999(5): 4-11.
中华人民共和国国务院. 国家重点保护野生植物名录(第一批) [J]. 植物杂志, 1999(5): 4-11.
- [6] Yan Y H, Zhang X C, Ma K P. Pteridophytes in China: Diversity and Distribution [M]. Beijing: Science Press, 2013: 76-218.
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: 76-218.
- [7] Zhu W J, Chen X, Tang J J, et al. Analyses on soil nutritional status and water pH value in natural habitat of endangered plant *Isoetes orientalis* [J]. J Plant Res Environ, 2010, 19(2): 75-78.
朱文杰, 陈欣, 唐建军, 等. 濒危植物东方水韭(*Isoetes orientalis*)自然生境土壤营养状况及水体pH值分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(2): 75-78.
- [8] Liu H, Wang Q F, Taylor W C. *Isoetes orientalis* (Isoetaceae): A new hexaploid quillwort from China [J]. Novon, 2005, 15(1): 164-167.
- [9] Liu H, Wang Q F, Taylor W C. Morphological and anatomical variation in sporophylls of *Isoetes sinensis* Palmer (Isoetaceae), an endangered quillwort in China [J]. Amer Fern J, 2006, 96(3): 67-74.
- [10] Liu X, Wang Y, Wang Q F, et al. Chromosome numbers of the Chinese *Isoetes* and their taxonomical significance [J]. Acta Phytotaxon Sin, 2002, 40(4): 351-356.
刘星, 王勇, 王青锋, 等. 中国水韭属植物的染色体数目及其分类学意义 [J]. 植物分类学报, 2002, 40(4): 351-356.
- [11] Chen J M, Liu X, Wang Q F. Genetic diversity in *Isoetes yunguiensis*, a rare and endangered endemic fern in China [J]. J Wuhan Univ (Nat Sci), 2005, 51(6): 767-770.
陈进明, 刘星, 王青锋. 中国珍稀濒危特有蕨类植物——云贵水韭的遗传多样性 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51(6): 767-770.
- [12] Chen Y Y, Ye Q G, Huang H W. Preliminary study on allozyme analysis for *Isoetes sinensis* Palmer [J]. J Wuhan Bot Res, 2003, 21(1): 91-94.
陈媛媛, 叶其刚, 黄宏文. 中华水韭(*Isoetes sinensis*)等位酶分析的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(1): 91-94.
- [13] Shaw S W, Hickey R J. Comparative morphology of the glossopodia of three North American *Isoetes* ligules [J]. Amer Fern J, 2005, 95(3): 94-114.

- [14] Liu X, Liu H, Wang Q F. Spore morphology of *Isoetes* (Isoëtaceae) from China [J]. *J Syst Evol*, 2008, 46(4): 479–489.
刘星, 刘虹, 王青锋. 中国水韭属植物的孢子形态特征 [J]. *植物分类学报*, 2008, 46(4): 479–489.
- [15] LaMotte C. Conditions affecting germination of the megaspores of *Isoetes lithophila* [J]. *Amer J Bot*, 1937, 24(7): 454–456.
- [16] Liu H, Wang Q F. Aseptic culture of spores in the rare and endangered plant: *Isoetes sinensis* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2003, 39(5): 466.
刘虹, 王青锋. 珍稀濒危植物——中华水韭孢子的无菌培养 [J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(5): 466.
- [17] Lu J, Guan W Y, Xu Y X, et al. Preliminary study on the megagametophyte and embryological development of *Isoetes sinensis* [J]. *Plant Sci J*, 2013, 31(4): 353–359.
路靖, 关维元, 徐永星, 等. 中华水韭雌配子体及胚胎发育的初步研究 [J]. *植物科学学报*, 2013, 31(4): 353–359.
- [18] Lu J. Comparative study on the gametophytes and embryological development of *Isoetes yunguiensis* and *I. sinensis* [D]. Harbin : Harbin Normal University, 2014: 7–23.
路靖. 云贵水韭和中华水韭配子体及胚胎发育的比较研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2014: 7–23.
- [19] Huang S F, Tsai Chiang S H. The development of the female gametophyte in *Isoetes taiwanensis* Devol [J]. *Taiwania*, 1986, 31(1): 15–32.
- [20] Cochran G A, Renzaglia K S, Taylor W C. Ultrastructure of the spermatozoid of *Isoetes* [C]// Process XVI International Botanical Congress. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 1999: 561–562.
- [21] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. *Bot Rev*, 1971, 37(3): 295–396.
- [22] Wu Z H, Qin R C. Fern Families and Genera of China [M]. Beijing: Science Press, 1991: 37–38.
吴兆洪, 秦仁昌. 中国蕨类植物科属志 [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 37–38.
- [23] Judd W S, Campbell C S, Kellogg E A. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach* [M]. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2008: 188–192.
- [24] Meng F S. Primitive Lycopsid Flora in the Yangtze Valley of China and Systematics and Evolution of Isoetales [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 2000: 1–64.
孟繁松. 长江流域原始石松植物群及水韭目植物分类与演化 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2000: 1–64.
- [25] Yang Y Y. The cytology study on the free nuclei mitosis of female gametophyte in *Pinus tabulaeformis* Carr. [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2008: 29–33.
杨远媛. 油松雌配子体游离核有丝分裂的细胞学研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008: 29–33.
- [26] Raghavan V. *Developmental Biology of Fern Gametophytes* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2005: 49–74, 222–256.
- [27] Cao J G, Dai X L, Wang Q X. Archegonial development and oogenesis of the fern *Plagiogyria euphlebia* and their phylogenetic significance [J]. *Amer Fern J*, 2011, 101(4): 231–240.
- [28] Karrfalt E. Some observations on the reproductive anatomy of *Isoetes andicola* [J]. *Amer Fern J*, 1999, 89(3): 198–203.