

# 肾蕨配子体发育的研究

罗顺元, 王任翔\*

(广西师范大学生命科学院, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 利用光学显微镜观察肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)孢子的萌发及配子体发育过程。结果表明:成熟的孢子棕黄色,不透明,极面观圆球形,赤道面观豆形,单裂缝,表面光滑。孢子萌发类型为书带蕨型,播种后 15 d 左右萌发,形成 5-12 个细胞长的丝状体。原叶体发育为三叉蕨型。30 d 左右发育为片状体,45 d 左右形成幼原叶体,幼原叶体不对称,成熟原叶体心脏形对称。原叶体边缘及背腹面都具毛状体,毛状体由单细胞构成。60 d 左右精子器开始出现,精子器近球形,由 3 个细胞构成。70 d 左右颈卵器出现,成熟颈卵器颈部由 4 列细胞构成,3-5 层细胞高。原叶体受精后 1 个月内可看到幼胚生成。

**关键词:** 肾蕨; 孢子萌发; 配子体

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)06-0517-05

## Gametophyte Development in *Nephrolepis auriculata* (L.) Trimen

LUO Shun-yuan, WANG Ren-xiang\*

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

**Abstract:** The spore germination and the gametophyte development in *Nephrolepis auriculata* were observed by light microscope. The mature spores are yellow-brown, monolete, opaque, bean-shaped in equatorial view and elliptical in polar view with a smooth surface. The spore germination pattern is of the Vittaria-type. It occurs about 15 days after sowing and forms a filament of 5-12 cells in length. The gametophyte development is of the Aspidium-type, coming into being the prothallus cells about 30 days after sowing followed by young asymmetrical prothalli at the 45<sup>th</sup> day. The mature prothalli are symmetrically heart-shaped. Unicellular hairs spread on the upper and lower surfaces and along the margin of the prothalli. The antheridium is visible 60 days after sowing, pelletlike, consisting of three cells. Within the following ten days, archegonium is available. The neck of mature archegonium is composed of 4 rows of cells and 3-5 layers of cells high. Young embryos are present within one month after fertilization.

**Key words:** *Nephrolepis auriculata*; Spore germination; Gametophyte

肾蕨(*Nephrolepis auriculata* (L.) Trimen)别名蜈蚣草、蓖子草、石黄皮等<sup>[1]</sup>,为肾蕨科(Nephrolepidaceae)肾蕨属(*Nephrolepis*)多年生常绿草本植物,叶高 30-70 cm<sup>[2]</sup>。原产于热带亚热带地区,我国的福建、广东、广西、云南等南方诸省区都有野生分布<sup>[2]</sup>,常见于溪边林中或岩石缝内或附生于树木上<sup>[1]</sup>。它是世界各地普遍栽培的观赏蕨<sup>[2]</sup>,除盆栽或吊盆栽

培观赏以外,叶片广泛用于插花配叶,块茎富含淀粉,可供药用和食用<sup>[2]</sup>。

对于肾蕨科植物的繁殖过程,国内外都进行过大量的研究。Higuchi 研究了肾蕨根状茎尖的离体培养,诱导出 GGB(Geen globe body),提出了新的工厂化生产途径<sup>[3]</sup>。王彭伟<sup>[4]</sup>,曹轩峰<sup>[5]</sup>,张弓<sup>[6]</sup>等对肾蕨科植物的组织培养及栽培管理进行过报道。冯莉<sup>[7]</sup>

收稿日期: 2006-04-03 接受日期: 2006-07-04

\* 通讯作者 Corresponding author

等用电镜观察了肾蕨根状茎尖的诱导发育过程。但对于肾蕨配子体的发育过程却未见报道。

本文对肾蕨配子体的发育过程进行研究,为完善观赏蕨类植物的孢子繁殖技术和开发利用提供科学依据,也为肾蕨的分子生物学、遗传学和系统演化研究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 孢子的采集

肾蕨的成熟孢子于 2005 年 12 月采自桂林七星公园。将成熟孢子囊、孢子从肾蕨叶的背面刮下来,搓动孢子囊,使孢子散落,用毫米筛除去杂质,然后把孢子装于硫酸纸袋中,置于 4℃ 冰箱中保存。

### 1.2 培养方法

采用培养基培养或水培养。培养基有 MS、1/2MS、1/4MS 和 1/8MS,琼脂均为 0.7%,蔗糖 3%,pH6.0(1/2MS 等培养基指大量元素为 MS 的 1/2,其余元素与 MS 相同)。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>,75% 酒精消毒 30 s,无菌水漂洗 1 次,5% NaClO 消毒 15 min,无菌水漂洗 3 次,然后在超净工作台上接种于各培养基上。每种培养基 4 个重复,包括 2 支试管和 2 个三角瓶,各培养基上单位面积的接种量基本一致,孢子较稀疏地布满培养基表面。

水培养是在培养皿中放数层滤纸,然后用蒸馏水浸润滤纸,再把肾蕨孢子撒于湿润的滤纸上。孢子较稀疏地分布于滤纸表面,约 200 个 cm<sup>2</sup>。

各种培养方式均置于相同条件下培养。培养箱温度 25℃,日光灯光源,每天光照 12 h,黑暗 12 h,光照强度为 2500 Lx。

### 1.3 观察统计

用光学显微镜进行活体观察记录,并用 OLYMPUS DP70 显微拍照机拍摄照片。研究方法和所用术语参考张开梅等<sup>[8-9]</sup>、徐艳等<sup>[10]</sup>、包文美等<sup>[11-12]</sup>,方法上略有变化。

## 2 结果和分析

### 2.1 孢子及孢子萌发

肾蕨孢子呈棕黄色,左右对称,赤道侧面观豆

形,极面观圆球形,孢子较小,大小为 15 μm×20 μm(10 个孢子的平均值),单裂缝,无周壁,外壁表面微微有波纹状起伏,表面光滑(图版 I:1,2)。

孢子播种后 15 d 左右开始萌发,萌发时裂缝处开裂,长出绿色细胞,萌发类型为书带蕨型(Vittaria-type)<sup>[13]</sup>(图版 I:3-5)。可以明显观察到,在孢子萌发及丝状体细胞中有圆形橙黄色透明的油粒,细胞中央的一颗较大,周围的一些较小(图版 I:4,5)。随着丝状体的发育,这些油粒渐渐消失。

### 2.2 丝状体

原叶体原始细胞经过连续横分裂,形成 5-12 个细胞长的单列丝状体(图版 I:6)。有些丝状体在 3 细胞长时,顶端细胞斜分裂成 2 个或多个顶端细胞,各自向前生长,成为 2 分枝或多分枝丝状体(图版 I:7,8)。另外还有一些在单列丝状体的基部或中部横生出一个或多个顶端细胞,并由此发育为双分枝或多分枝丝状体。分枝丝状体在培养基培养中很常见,尤其是 MS 和 1/2MS 培养基中。这些分枝有些各自独立发育成片状体和原叶体,在孢子比较密集的地方,会继续不断分枝,形成绿色球状体(图版 I:21)。丝状体细胞呈圆筒状,高度稍大于宽度,有些细胞侧壁向外鼓出,形成椭球状。丝状体前端细胞内的叶绿体数量较多,呈鲜绿色,基部细胞的叶绿体也多,往往是丝状体中部细胞由于分裂较快,叶绿体较稀疏,不过后来也会变得很稠密。丝状体内的叶绿体多呈圆饼状。丝状体在发育过程中,常会见到一些乳头状突起,内有叶绿体,这些突起将会发育成假根。

水培的丝状体则普遍比较瘦弱,细胞高度与宽度的比值比培养基培养的更加大一些,而且未见到有分枝现象。水培养的配子体发育到片状体阶段后逐渐死亡,不能形成正常的原叶体。

### 2.3 片状体

播种 30 d 左右,可见有部分丝状体发育成片状体。丝状体的顶端细胞纵向分裂,然后再左右交替斜向分裂,发育由一维变成了二维,形成片状体(图版 I:9)。片状体较长、较大,长度为 0.5-1 mm,宽度为 0.2-0.4 mm 左右,呈广阔的芭蕉扇状(图版 I:10,12)。若丝状体为分枝状,则各分枝都能发育为片状体,形成分枝片状体(图版 I:12)。片状体仅在边缘及前缘长有毛状体(图版 I:10)。片状体的基腹部及

丝状体上都长有大量的假根(图版 I :10)。在幼片状体中,可以看到由于细胞分裂很快,而叶绿体的分裂较慢,造成片状体前中部细胞叶绿体很少或没有,后部细胞叶绿体集中的现象。不过,随着发育叶绿体布满整个片状体细胞。片状体内的叶绿体多为椭球形。

## 2.4 原叶体

播种 45 d 左右,可见幼原叶体形成。当片状体的前端凹陷形成分生组织,分生组织的分裂活动替代顶端细胞进行分裂活动时,片状体便进入了幼原叶体阶段。肾蕨的幼原叶体大多数不对称,在原叶体的背腹面及周围都有毛状体生长。幼原叶体后期,逐渐发育成对称形(图版 I :13,14)。

成熟的原叶体墨绿色,坚韧挺拔,原叶体发育为三叉蕨型(*Aspidium-type*)<sup>[3]</sup>(图版 I :15)。细胞壁厚,细胞内叶绿体较大,成椭球形。原叶体形状较大,宽度大于长度,一般在 2–4 mm×4–7 mm 之间,基本上心脏形对称,也有其它形状如圆状倒宽卵形、蝴蝶形和不规则形状等。生长点内的细胞呈楔形排列紧密,与周围细胞明显不同(图版 I :19)。原叶体背腹面及四周边缘都有毛状体分布,表面的毛状体较稀疏。在原叶体的基部及近基部都长有大量假根(图版 I :11,14)。

## 2.5 毛状体

毛状体由 1 个细胞构成,最早见于片状体顶端,极少数见于丝状体侧缘。毛状体最初呈棒状,基部宽于顶部,成熟后毛状体顶端有帽状附属结构。成熟的毛状体呈长棒状,大小一般在长 50–100  $\mu\text{m}$ ,宽 10  $\mu\text{m}$  左右。在片状体阶段,毛状体只出现于边缘,从幼原叶体开始,毛状体开始出现于背腹面,分布较稀疏。毛状体内始终含有叶绿体(图版 I :10, 20)。

## 2.6 假根

最初的假根在孢子萌发时产生,棒状,大多数含有少量叶绿体,假根的壁无颜色(图版 I :5)。随着生长发育,假根不断长出(图版 I :10)。幼原叶体的假根一般长于基部,也有少量叶绿体,假根的壁起初也无色,当生长一段时间后,约 10 d 左右,多呈黄棕色(图版 I :13,14)。到原叶体成熟时,基部和近基部的背腹面都有假根,多而且稠密,呈棕黄色,短的

棒状直立,长的发生弯曲。每个成熟的原叶体的假根可达 100 条左右,假根直径 15  $\mu\text{m}$  左右,长短不一,最长的可达 1 500  $\mu\text{m}$  左右(图版 I :4)。

## 2.7 绿色球状体

在 MS、1/2MS 培养基上,肾蕨配子体无一发育成正常的原叶体,孢子萌发后,逐渐形成绿色球状体(图版 I :21)。在 1/4MS 和 1/8MS 培养基上,一部分孢子发育成绿色球状体,另一部分发育成正常的原叶体。将绿色小球解剖后置于显微镜下观察,可见绿色小球是由多分枝丝状体缠绕而成(图版 I :22)。

## 2.8 性器官

接种后 60 d 左右,可见精子器形成。精子器混生于假根丛中,每个原叶体上约有十到数十个精子器(图版 I :17)。精子器近圆球形,由 3 个细胞(基细胞、环细胞、盖细胞)组成,直径 40  $\mu\text{m}$  左右,高约 45  $\mu\text{m}$ (图版 I :16)。精子器成熟时,盖细胞破裂,精子自精子器中溢出,精子近球形,借助原叶体表面的水分游动至颈卵器完成受精作用。若不能与卵细胞结合,15 min 左右即死亡,旋即解体消失。

颈卵器在接种后 70 d 左右出现,生长于生长点到假根基部,一般长于腹面,每个原叶体上一般有颈卵器 6 个左右。成熟的颈卵器圆柱形,基部直径略大于顶部,由 4 列细胞构成,3–5 层细胞高,直径 50  $\mu\text{m}$  左右,高约 60  $\mu\text{m}$ (图版 I :18)。颈卵器在受精后,腹部逐渐变为褐色。

## 2.9 胚的发育

肾蕨颈卵器受精后,1 个月可见幼孢子体从原叶体上长出。幼孢子体长出后,原叶体仍能继续发育。幼孢子体生长一个月左右,已长出 2–3 片叶子时,原叶体才逐渐枯死。将观察到性器官的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 讨论

肾蕨科是一类极具观赏价值的蕨类植物,虽然对其不少种的繁殖和栽培有过广泛的研究报道<sup>[4]</sup>,但是有关该科配子体发育的研究至今未见报道。本

文通过对该科代表植物—肾蕨配子体发育过程的研究,能从发育学上为肾蕨系统分类提供参考。

我们观察到肾蕨孢子左右对称,单裂缝,孢子萌发为书带蕨型,原叶体发育为三叉蕨型,原叶体表具毛状体,精子器较小,颈卵器也较小,这些都说明了肾蕨在蕨类植物中处于进化较高的地位。

在肾蕨孢子萌发时及丝状体阶段,细胞内具有油粒。包文美等<sup>[11-12]</sup>在研究无粉银粉背蕨(*Aleuritopteris argentea* (Gmel.) Fea var. *obscura* (Christ) China) 和过山蕨(*Camptosorus sibiricus* Rupr.)的配子体发育时也发现油粒;徐艳<sup>[10]</sup>在研究阔鳞瘤蕨(*Phymatosorus hainanensis* (Noot.) S. G. Lu)的配子体发育时也发现有油粒。无粉银粉背蕨、过山蕨、阔鳞瘤蕨、肾蕨分别属于中国蕨科、铁角蕨科、水龙骨科和肾蕨科,油粒的出现,是否预示着这几个科在进化上有某种亲缘关系。另外油粒的作用是什么,还有待进一步研究。

本研究详细观察并记录了肾蕨配子体的生活史,成功获得了用孢子人工繁殖肾蕨的方法。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。可尝试用此种方法批量繁殖肾蕨,为赏叶植物肾蕨的种植开发提供了新的资料。

## 参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所主编. *Iconographia Cormophytorum Sinicorum Tomus 1* [M]. Beijing: Science Press, 1972. 146. (in Chinese)
- [2] Wu Z H(吴兆洪), Wang C H(王铸豪). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 6 (1)* [M]. Beijing: Science Press, 1999. 146-148. (in Chinese)
- [3] Higuchi H, Amaki W, Suzuki S. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Prsel [J]. *Sci Hort*, 1987, 32:105-113.
- [4] Wang P W(王彭伟). Studies on propagation of *Nephrolepis cordifolia* *in vitro* [J]. *J Beijing For Univ* (北京林业大学学报), 1998, (2): 107-109. (in Chinese)
- [5] 曹轩峰, 陈红武. 肾蕨栽培管理技术 [J]. *北方园艺*, 2004, (4):48-49.
- [6] 张弓, 刘玉娟, 韩利. 切叶肾蕨栽培技术简介 [J]. *吉林蔬菜*, 1999, (2):34-35.
- [7] 冯莉, 田兴山, 李庚午, 等. 肾蕨离体培养过程中形态发生的扫描电镜观察 [J]. *电子显微学报*, 1994, (5):375.
- [8] Zhang K M(张开梅), Shi L(石雷), Li D(李东). Observation on the gametophyte development of *Blechnum orientale* [J]. *J Trop*

*Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2005, 13(5):419-422. (in Chinese)

- [9] Zhang K M(张开梅), Shi L(石雷). Gametophyte development of *Pteris fauriet* [J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 2005, 22(Suppl.): 50-60. (in Chinese)
- [10] Xu Y(徐艳), Shi L(石雷), Liu B D(刘保东), et al. Observation on the gametophyte development of *Phymatosorus hainanensis* (Polypodiaceae) [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2005, (1):34-38. (in Chinese)
- [11] 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 VIII. Aspleniaceae [J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 1995, 15(1):61-64. (in Chinese)
- [12] 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):373-378. (in Chinese)
- [13] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. *Bot Rev*, 1971, 37(3): 295-396.

## 图版说明

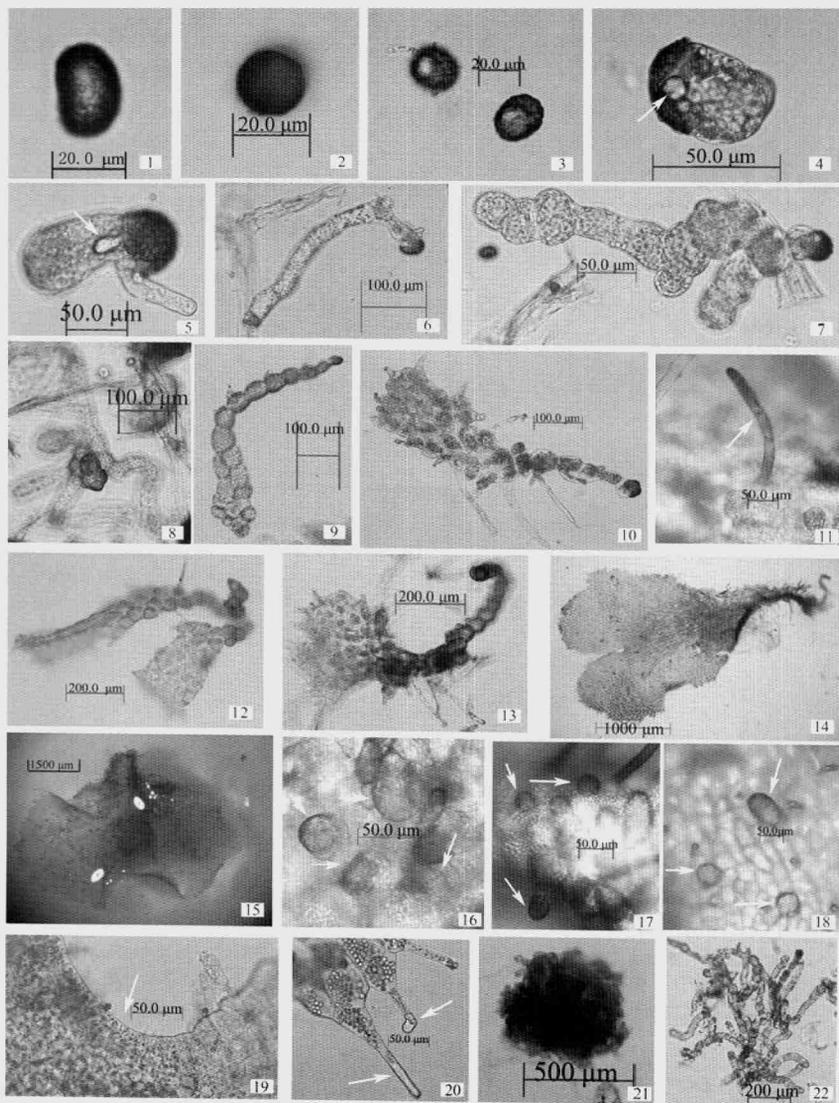
### 图版 I

1. 孢子赤道面观; 2. 孢子极面观; 3. 孢子萌发时裂开; 4. 孢子萌发(箭头示油粒); 5. 孢子萌发及假根(箭头示油粒); 6. 单列丝状体; 7. 二分枝丝状体; 8. 多分枝丝状体; 9. 丝状体向片状体发育; 10. 片状体; 11. 原叶体上的假根; 12. 二分枝片状体; 13. 星状幼原叶体; 14. 对称幼原叶体; 15. 成熟的原叶体; 16. 混生于假根丛中的精子器(箭头所示); 17. 精子器(箭头所示); 18. 颈卵器(箭头所示); 19. 原叶体的生长点; 20. 毛状体及其附属结构; 21. 绿色小球; 22. 绿色小球内部结构。

## Explanation of plate

### Plate I

1. Spore in equatorial view; 2. Spore in polar view; 3. Spore opening up in germination process; 4. Germinating spore with tryphine (in the direction of arrow); 5. Germinating spore with rhizoid and tryphine (in the direction of arrow); 6. Filament of single row of cells; 7. Two-branched filament; 8. Multi-branched filament; 9. Filament developing into prothallial plate; 10. Prothallial plate; 11. Rhizoid of prothallium; 12. Two-branched prothallial plate; 13. Young star-shaped prothallium; 14. Young symmetrical prothallium; 15. Mature prothallium; 16. Antheridium in rhizoid cluster; 17. Antheridium; 18. Archegonium; 19. The growing point of prothallium; 20. Hairs and appendant; 21. Green globe body; 22. Inner structure of green globe body.



罗顺元等: 图版 1

LUO Shun-yuan et al.: Plate 1