

中华水韭雌配子体及胚胎发育的初步研究

路靖¹, 关维元², 徐永星², 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. 浙江省建德市林业科学研究所, 浙江建德 311600)

摘要: 中华水韭 (*Isoetes sinensis* Palmer) 属水韭科 (Isoetaceae) 草本拟蕨类, 是长江中下游特有的古老物种, 对环境污染敏感, 为国家一级重点保护的极度濒危的野生植物。本研究通过人工培养, 按不同发育阶段, 用常规石蜡切片法连续观察了雌配子体及胚胎发育的全过程。结果显示: 大孢子培养 15~20 d 萌发, 雌配子体为球状、属壁内发育型, 每个雌配子体着生 8~20 个颈卵器。成熟的颈卵器发育有多种可能, 但只有颈沟细胞和腹沟细胞都退化, 卵才有受精的机会。合子首先进行横向分裂, 培养约 50 d 发育成数十个细胞的球形胚胎, 约 80 d 雌配子体的细胞萎缩, 第一叶及其叶舌、第一根结构更明显, 出现第二叶。文中还初步探讨了中华水韭濒危的生殖生物学机制。

关键词: 中华水韭; 雌配子体; 胚胎; 发育

中图分类号: Q949.36+3.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)04-0353-07

Preliminary Study on the Megagametophyte and Embryological Development of *Isoetes sinensis*

LU Jing¹, GUAN Wei-Yuan², XU Yong-Xing², LIU Bao-Dong^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Biology, College of Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin 150025, China;

2. Research Institute of Forestry of Jiande City in Zhejiang Province, Jiande, Zhejiang 311600, China)

Abstract: *Isoetes sinensis* Palmer belongs to Isoetaceae, it's an herbaceous fern-ally and an old endemic species from middle and downside of the Yangtze River. It is extremely sensitive to environmental pollution, and falls under national level protection of extreme endangered wild plants. The gametophytes of *Isoetes sinensis* were cultivated artificially. We observed the development process of megagametophytes and embryos based on different developmental stages, using paraffin section. Results show that the megaspore germinated when fostered for 15–20 days. The megagametophytes were spherical and belonged to intramural development type. Between 8 to 20 archegonia formed in each megagametophyte. The development of mature archegonia had many possibilities. Only neck canal cells and ventral canal cells degenerated, and eggs had the chance to fertilize. The zygote first proceeded to transverse division, and then developed into dozens of spherical embryo cells when fostered for about 50 days. After 80 days the megagametophyte cells become atrophied, the structure of the first leaf, ligule and first root were more obvious, and the second leaf also appeared. This paper discusses preliminary research on the reproductive biology mechanism of endangered *Isoetes sinensis* Palmer.

Key words: *Isoetes sinensis* Palmer; Megagametophyte; Embryo; Development

收稿日期: 2012-11-20, 修回日期: 2012-12-25。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 31170294)。

作者简介: 路靖 (1988 –), 女, 硕士, 主要从事蕨类配子体发育生物学研究 (E-mail: lujingplm@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence): 刘保东 (1962 –), 男, 教授, 主要从事孢子植物学科研究及教学工作 (E-mail: 99bd@163.com)。

水韭科(Isoetaceae)是古老的孑遗蕨类,全世界有60~70种,我国共有5种^[1],其中中华水韭(*Isoetes sinensis* Palmer)仅分布于长江中下游的沼泽湿地^[2],由于对水污染敏感,加之近三四十年生境的巨变,野生种群几近灭绝^[3],已被列为国家一级重点保护^[4]的极度濒危级(CR)^[5]的野生植物。

对水韭属(*Isoetes* L.)的研究多集中在孢子体和孢粉学领域,孢子体的叶舌结构则一直是学者们的研究热点^[6,7];在分子系统学方面,前人做了很多工作,但水韭属植物的物种起源仍有争议^[8,9];水韭属的生理生态学及分类学的研究进展显著,为探讨这一类群的分布格局及进化途径提供了理论依据^[10-14];孢粉学成果同样丰富^[15-17]。而配子体及胚胎发育的报道相对较少,经典的只有Campbell和Motte曾分别对晚期胚胎发育有过粗略地描述,并指出胚胎定位等技术上的困难^[18,19],其后几乎再无相关报道。直至1986年,Taylor指出了几种水韭的孢子萌发和孢苗生长需要的培养条件^[20],Karrfalt探讨了*I. andicola*的配子体到胚胎发育的生殖解剖过程^[21],Hilger等提出了*I. boliviensis*的配子体与孢子体“分界沟”在世代交替过程中的意义^[22],认为这一结构可能是对水生环境的适应亦或是现存水韭属的一个原始特征。

我国王青锋^[23]、黄宏文^[8]、陈家宽^[24]等团队对国产水韭孢子体的遗传结构、形态解剖与植被恢复等方面都有过报道。就中华水韭有性世代而言,只有刘虹等报道了孢子的无菌培养和温度对大孢子萌发率的影响^[25,26],而针对胚胎发育过程却没有详细的描述。Nayar和吴兆洪等都指出配子体与胚胎的形态特征是现代蕨类植物分类的重要依据,生殖器官蕴藏着稳定而丰富的系统学特征^[27,28],而且珍稀濒危植物的复壮离不开胚胎和生殖发育方面的探索^[29]。由于中华水韭的濒危机理尚不能确定,我们以中华水韭雌配子体及幼孢苗为材料,详细观察了雌配子体、颈卵器及胚胎发育特征,并探讨了其濒危的生殖生物学机制,以期种群复壮、迁地保护及相关物种研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 研究材料

中华水韭(*Isoetes sinensis* Palmer)于2001年

11月由浙江大学丁炳扬教授赠送,原产地为浙江省华顶山,后在哈尔滨师范大学培养繁殖,材料取自哈尔滨师范大学温室。

1.2 研究方法

取发育成熟的新鲜孢子囊,自然晾干后,将孢子收集于硫酸纸袋中,立即培养或置4℃冰箱保存备用。大小孢子用5% NaClO水溶液消毒4 min后,无菌水离心水洗4~5次,供接种用。无菌接种在Knop's的1.1%琼脂培养基或亚布力暗棕壤浸出液的1.1%琼脂培养基上,首先接种大孢子,密度为10~20个/cm²,接种后15~60 d之间,每3 d补接1次适量小孢子。培养条件是温度20℃~25℃,相对湿度70%~95%,各重复培养5次。

定期选取培养材料在显微镜下观察,用FAA液固定,常规石蜡切片法连续切片,番红固绿对染,Olympus-BH₂显微镜观察、Nikon-4500相机显微拍照并记录。

2 研究结果

2.1 颈卵器的形态发育

大孢子培养15~20 d萌发,萌发过程是大孢子壁自三裂缝开裂,形成球形的成熟雌配子体(图版I:1),而后近极端表皮细胞分化出颈卵器(图版I:2)。成熟颈卵器颈部由4纵列细胞构成,横切面呈“田”字状(图版I:3)。初生盖细胞先分裂,经多次有丝分裂形成4层4列颈壁细胞,下方为中央细胞,中央细胞的体积较大且细胞核明显(图版I:4)。中央细胞再经过两次分裂形成纵向排列的3个细胞(图版I:5),近盖细胞端的为颈沟细胞,呈截球形;远盖细胞端的为卵,颜色较深且体积较大,也呈截球形;二细胞间呈不规则扁平状的是腹沟细胞。从体积来看,卵细胞最大,腹沟细胞最小,颈沟细胞介于二者之间。

成熟颈卵器发育有多种可能:腹沟细胞溶解,颈沟细胞和卵细胞不溶解(图版I:6,7);卵细胞溶解,颈沟细胞和腹沟细胞不溶解(图版I:8);以上两种都是败育类型,只有颈沟细胞和腹沟细胞都溶解,卵的体积增大直至完全填补颈沟细胞和腹沟细胞的位置才能受精(图版I:9)。每个

雌配子体产生的颈卵器数目不一，一般在大孢子培养约25 d时，孢子壁开裂区域可着生10~20个肉眼可见的颈卵器(图版I：10)。

2.2 胚胎的形态发育

2.2.1 胚胎发育前期

卵一旦受精，形成合子，合子的发育趋势是体积膨大，细胞质变得不均匀，形成两个明显的核区(图版II：1)，上部是基下细胞的细胞核，下部是基上细胞的细胞核，同时近盖细胞端向颈沟方向有乳突状的延伸，受精卵周围有一圈质地均匀的透明物质，此时为2细胞时期。图版II：2显示着进一步分裂成3细胞的趋势，上部是基下细胞，下部是基上细胞，此时两细胞形态差异较大，基上细胞的细胞质浓厚。大小形状不规则的2个细胞变成明显的3个细胞(图版II：3)：基下细胞不分裂、细胞核明显，基上细胞分裂成2个大小不等的细胞[图版II：3(A、B)]，2个细胞有明显的分界线，此时为3细胞时期。然后发生一次纵向分裂，即4细胞阶段(图版II：4)，分别是基足原始细胞、第一根原始细胞、茎干原始细胞和第一叶原始细胞。

2.2.2 胚胎发育中期

培养50 d左右受精卵发育成近球形、数十个细胞组成的胚胎(图版II：5)。球形胚在近颈卵器颈部端向不同方向分别形成第一叶原基、第一根原基和基足(图版II：6)，基足不发达，在靠近第一叶原基处有叶舌原始细胞出现。第一叶原基和第一根原基分别发育成第一幼叶和第一根，并出现第二叶原基，胚胎的形状不对称，此时雌配子体与胚胎之间的间隙显著加大(图版II：7)。

2.2.3 胚胎发育后期

随着发育的进行，根与叶各部分均发育成熟，表皮、皮层分化明显，近基足处横切面呈近圆形(图版II：8)，并出现扇形的叶舌。大孢子培养约80 d，叶端突出配子体表面，发育为具光合能力的第一叶，孢子体可以通过叶的光合作用吸收营养，根端稍后也突破配子体，此时基足表皮细胞由稀疏变得致密(图版II：9)。雌配子体颜色进一步变淡，细胞萎缩，孢子体第二叶开始分化，第一叶及其叶舌与第一根结构更加典型(图版II：10)。

3 讨论

3.1 颈卵器发育

一般来说，蕨类植物的颈卵器呈烧瓶状，由细长的颈部和圆形的腹部构成，颈部容纳有2个颈沟细胞，腹部包括1个腹沟细胞和1枚卵，4个细胞排成单列。颈沟细胞和腹沟细胞都是生殖辅助细胞，卵体积较大、分化最精细。而中华水韭的颈卵器沿纵轴方向显著压缩，导致颈沟细胞、腹沟细胞和卵也随之压缩，颈沟细胞由2个减化成1个，直至使颈沟细胞、腹沟细胞和卵共同组成了一个近球形个体，这与整个雌配子体严重特化成壁内发育型这一简化式选择相吻合。

水韭属(*Isoetes* L.)和卷柏属(*Selaginella* Beauv)同为有叶舌类^[30]，其共同祖先似乎首先选择了旱生习性，即配子体壁内发育、有叶舌。笔者认为水韭似乎是在旱生的基础上，进而形成的次水生习性，其依据是叶片上均有气孔分布，在没有明水的情况下，只要空气湿度达80%以上，中华水韭都可以正常生长。所以中华水韭壁内发育、有叶舌的旱生特征与实际的水生环境形成了生态的自相矛盾，这似乎是水韭越来越退化甚至濒危的系统演化的内在原因。

史密斯指出水韭的雌配子体可以产生多个颈卵器^[31]。笔者发现一个颈卵器发育成熟，如果一直未受精，新颈卵器就会不断产生，直到大孢子内的养分耗尽为止，其原因可能是为了增加受精机会。

Bell和Muhlethaler指出蕨卵的发生是卵细胞与配子体越来越分离的过程^[32]。本实验发现从卵受精以后这种分离过程更明显，单倍体的卵与单倍体的配子体之间的发育差异要小于二倍体合子与单倍体配子体之间的发育差异，受精卵周围形成的分离腔则为受精卵的发育提供了相对独立的环境。石磊等曾指出：蕨的卵细胞成熟后，颈沟细胞和腹沟细胞退化^[33]。本研究发现中华水韭的卵也有退化的可能，导致卵发育不成熟，这可能直接降低了中华水韭的生殖能力。

3.2 胚胎发育

雌配子体中颈卵器的卵细胞一旦受精即刻开始分裂，Motte认为*Isoetes lithophila*受精卵的最初

分裂面与长轴形成 20 度的夹角^[34], Campbell 则提出北美水韭 *I. echinospora* var. *braunii* 幼胚中合子的第一次分裂方向为横向分裂^[18]。而中华水韭合子的第一次分裂是横向分裂, 这是否提示与 *Isoetes lithophila* 相比, 中华水韭与北美水韭的亲缘关系更近些。

有关水韭属植物“分界沟”(the gametophyte-sporophyte junction)的研究直到最近一二十年才有涉及^[22,35,36]。中华水韭在球形胚及其后期一直存在分界沟, 直到第一叶和初生根形成后。尽管胚胎后期发育迅速, 分界沟也没有对胚胎形成结构上的物理性限制, 只是“沟”的宽度越来越小而已。

有性生殖是水韭的主要繁殖方式^[18], Karrfalt 阐述了北美水韭的无配子体生殖^[37], Hickey 发现了南美水韭的无性繁殖^[38]。本实验的中华水韭是有性生殖还是孤雌生殖, 虽然尚不能明确得出结论, 但本研究的培养方法已为雌配子体提供了有性生殖的条件。从胚胎发育过程来看, 笔者认为有性生殖的可能性要远大于其他生殖方式。

由于缺乏详细的切片支持, 基上细胞分裂出的两个子细胞[图版 II: 3 (A、B)]哪个发育成茎或叶, 本文还不能给出明确的结论。

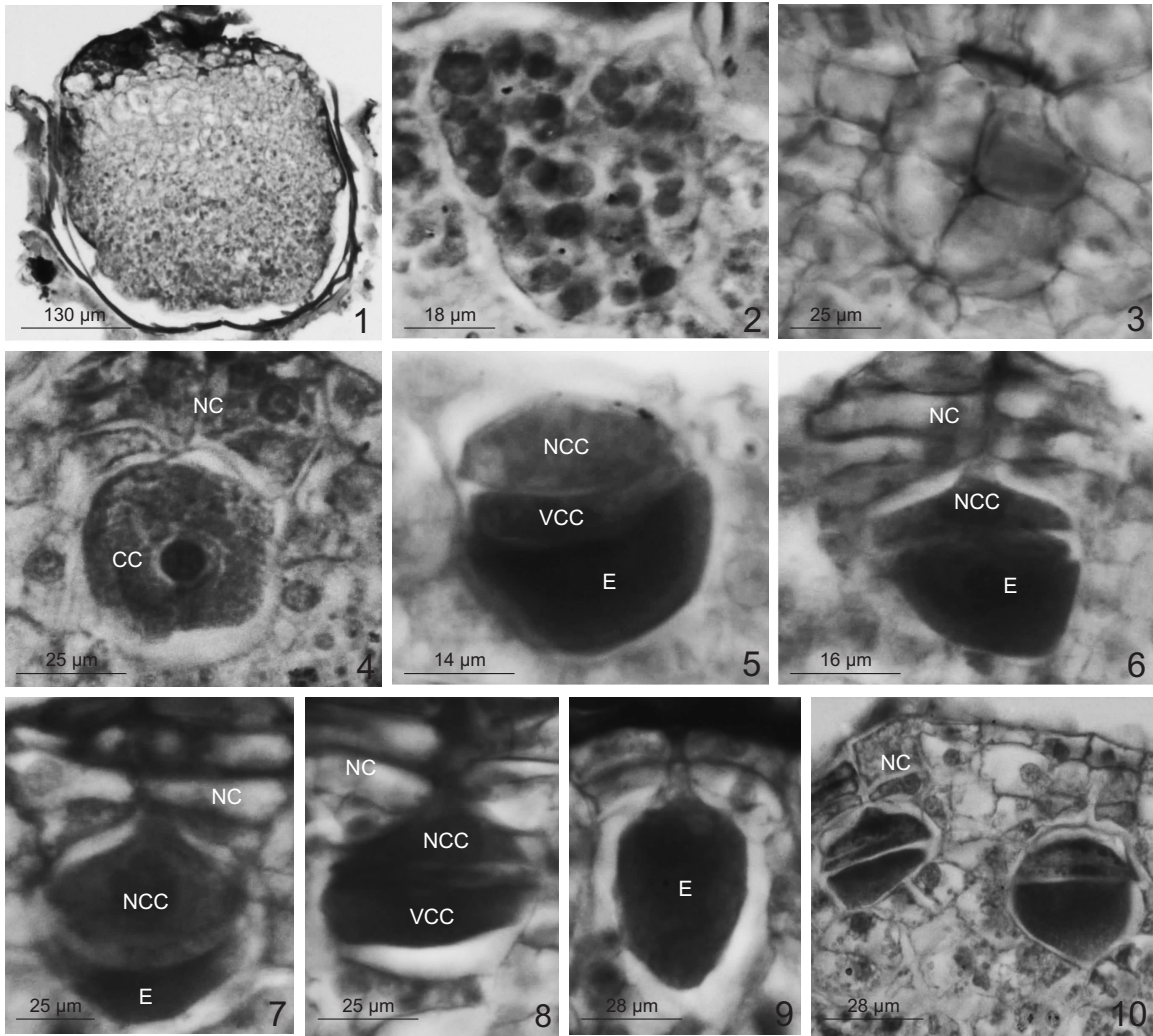
参考文献:

- [1] 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.
- [2] Liu H, Wang Q F, Taylor W C. *Isoetes orientalis* (Isoetaceae), a new hexaploid quillwort from China [J]. *Novon*, 2005, 15: 164–167.
- [3] 叶其刚, 李建强. 浙江省中华水韭分布现状与濒危原因[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21: 216–220.
- [4] 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(151): 4–11.
- [5] 严岳鸿, 张宪春, 马克平. 中国珍稀濒危蕨类植物的现状及保护[C]//中国生物多样性保护与研究进展 VII. 长春: 中国野生植物保护协会, 2006: 77–87.
- [6] Shaw S W, Hickey R J. Comparative morphology of the glossopodia of three North American *Isoetes* ligules [J]. *Am Fern J*, 2005, 95(3): 94–114.
- [7] Budke J M, Hickey R J, Heafner K D. Analysis of morphological and anatomical characteristics of *Isoetes* using *Isoetes tennesseensis* [J]. *Brittonia*,

2005, 57(2): 167–182.

- [8] 陈媛媛, 叶其刚, 李作洲, 黄宏文. 极濒危植物中华水韭休宁居群的遗传结构[J]. 生物多样性, 2004, 12(6): 564–571.
- [9] Luebke N T, Budke J M. *Isoetes tennesseensis* (Isoetaceae), an octoploid wuillwort from Tennessee [J]. *Am Fern J*, 2003, 93(4): 184–190.
- [10] Marianne H. Sulfate reduction in lake sediments inhabited by the isoetid macrophytes *Littorella uniflora* and *Isoetes lacustris* [J]. *Aquat Bot*, 1998, 60: 307–324.
- [11] 刘星, 庞新安, 王青锋. 中国 3 种水韭属植物自然居群水体化学性质特征及差异性研究[J]. 植物生态学报, 2003, 4: 510–515.
- [12] 庞新安, 刘星, 刘虹, 吴翠, 王晶苑, 杨书香, 王青锋. 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, 4: 288–295.
- [13] Daniel F B, Donald M B. The status, distribution, and identification of Georgia quillwort (*Isoetes georgiana*; Isoetaceae) [J]. *Am Fern J*, 1996, 86(4): 105–113.
- [14] Daniel F B, Donald M B. *Isoetes melanopoda* spp. *silvatica* (subsp. nov.), a new quillwort (Isoetaceae) from eastern North America [J]. *Castanea*, 2006, 71(1): 15–30.
- [15] Macluf C C, Morbelli M A, Giudice G E. Morphology and ultrastructure of megaspores and microspores of *Isoetes savatieri* Franchet (Lycophyta) [J]. *Rev Palaeobot Palyno*, 2003, 126: 197–209.
- [16] Macluf C C, Morbelli M A, Giudice G E. Microspore morphology of *Isoetes* species (Lycophyta) from southern South America [J]. *Bot Rev*, 2006, 72(2): 121–134.
- [17] Taylor W A. Megaspore wall development in *Isoetes melanopoda* — morphogenetic postinitiation changes accompanying spore enlargement [J]. *Rev Palaeobot Palyno*, 1992, 72: 61–72.
- [18] Campbell D H. Contributions to the life history of *Isoetes* [J]. *Ann Bot*, 1891, os-5(3): 231–258.
- [19] Motte C L. Morphology and orientation of the embryo of *Isoetes* [J]. *Ann Bot*, 1937, 1(4): 695–715.
- [20] Taylor W C, Luebke N T. Germinating spores and growing sporelings of aquatic *Isoetes* [J]. *Am Fern J*, 1986, 76: 21–24.

- [21] Karrfalt E. Some observations on the reproductive anatomy of *Isoetes andicola* [J]. *Am Fern J*, 1999, 89(3): 198–203.
- [22] Hilger H H, Weigend M, Frey W. The gametophyte-sporophyte junction in *Isoetes boliviensis* Weber (Isoetales, lycopodiophyta) [J]. *Phyton Ann Rei Bot A*, 2002, 42: 149–157.
- [23] Wang Q F, Liu X, Taylor W C, He Z R. *Isoetes yunguiensis* (Isoetaceae), a new basic diploid quillwort from China [J]. *Novon*, 2012, 12(4): 587–591.
- [24] 陈家宽, 王海洋, 何国庆. 江西境内珍稀植物普通野生稻和中华水韭产地的考察 [J]. 生物多样性, 1998, 6(4): 260–266.
- [25] 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.
- [26] 刘虹. 温度对珍稀极危水生植物中华水韭大孢子萌发率的影响 [J]. 中南民族大学学报, 2007, 26(2): 39–41.
- [27] Nayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous ferns [J]. *Bot Rev*, 1971, 37(3): 295–396.
- [28] 吴兆洪, 秦仁昌. 中国蕨类植物科属志 [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 38.
- [29] 国家环境保护局自然保护司. 珍稀濒危植物保护与研究 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1991: 127–135.
- [30] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第6卷, 第3分册 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 86–220.
- [31] 史密斯 G M 著. 隐花植物学: 下册 [M]. 陈邦杰, 李正理, 译. 北京: 科学出版社, 1959: 45.
- [32] Bell P R, Muhlethaler K. The fine structure of the cells taking part in oogenesis in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn [J]. *J Ultrastruct Res*, 1962, 7 (Suppl): 452–466.
- [33] 石磊, 刘宁, 刘建武. 蕨雌性生殖器官发育的初步研究 [J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2003, 23: 42–47.
- [34] Motte L C. Morphology of the megagametophyte and the embryo sporophyte of *Isoetes lithophila* [J]. *Am J Bot*, 1993, 20: 217–233.
- [35] Ligrone R, Duckett H G, Renzaglia K S. The gametophyte-sporophyte junction in land plants [J]. *Adv Bot Res*, 1993, 19: 231–317.
- [36] Frey W, Hofmann M, Hilger H H. The gametophyte-sporophyte junction: unequivocal hints for two evolutionary lines of archegoniate land plants [J]. *Flora*, 2001, 96: 431–445.
- [37] Karrfalt E E. Some observations on the reproductive anatomy of *Isoetes andicola* [J]. *Am Fern J*, 1999, 89: 198–203.
- [38] Hickey R J. The early evolutionary and morphological diversity of *Isoetes*, with descriptions of two new neotropical species [J]. *Syst Bot*, 1986, 11: 309–321.

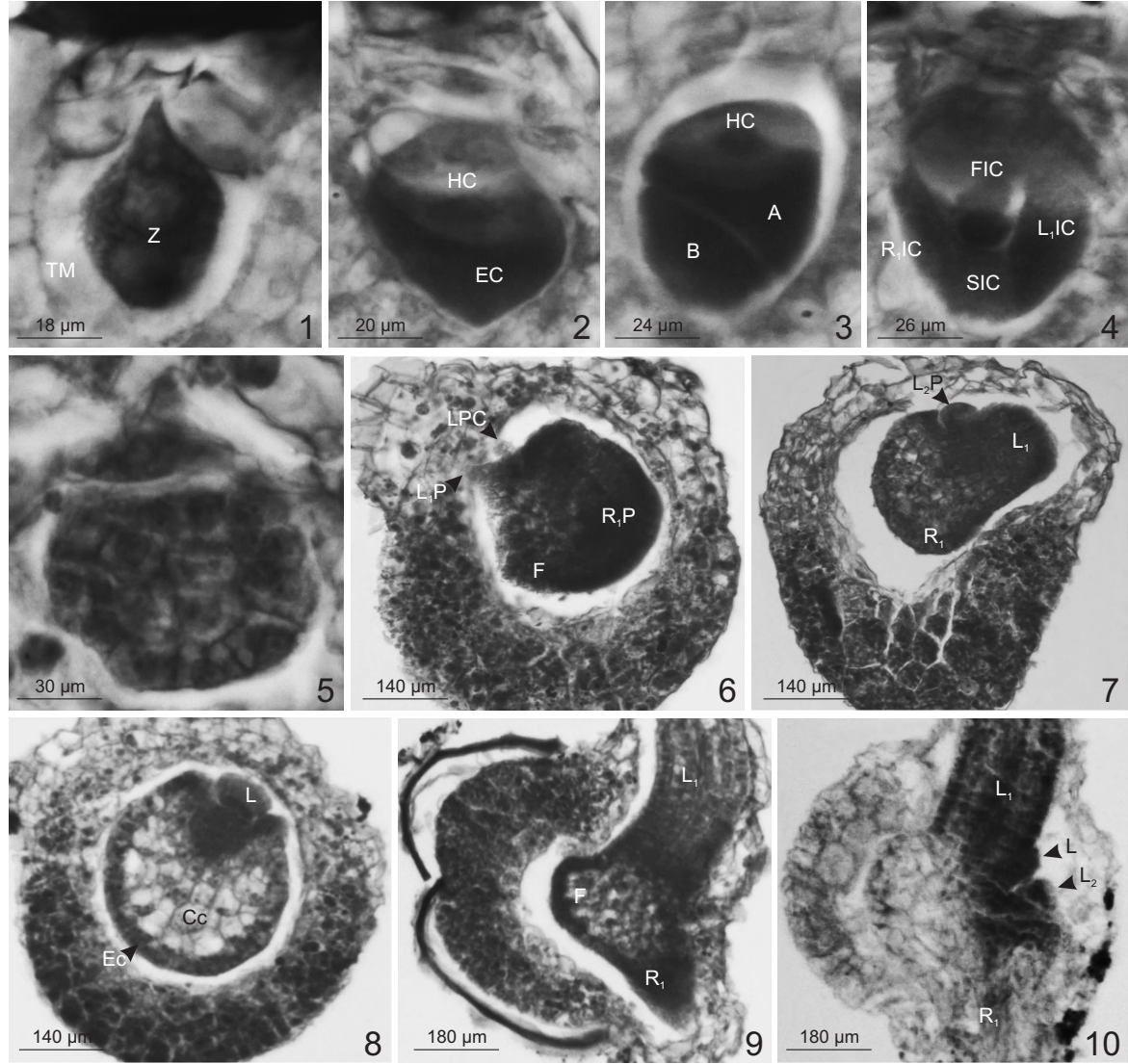


中华水韭雌配子体发育。 1. 成熟雌配子体纵切； 2. 幼颈卵器纵切； 3. 颈卵器颈部横切； 4. 成熟颈卵器纵切，示颈壁细胞 (NC) 和中央细胞 (CC)； 5. 示颈沟细胞 (NCC)、腹沟细胞 (VCC) 和卵 (E)； 6, 7. 示颈壁细胞 (NC)、颈沟细胞 (NCC) 和卵 (E)； 8. 颈卵器纵切，示颈壁细胞 (NC)、颈沟细胞 (NCC) 和腹沟细胞 (VCC)； 9. 示膨大的卵 (E)； 10. 成熟颈卵器纵切，示颈壁细胞 (NC)。

Megagametophyte development of *Isoetes sinensis* Palmer. 1. Vertical section of mature megagametophyte; 2. Vertical section of young archegonium; 3. Cross section of neck of archegonium; 4. Vertical section of mature archegonium, neck cell (NC), center cell (CC); 5. Neck canal cell (NCC), ventral canal cell (VCC), egg (E); 6, 7. Neck cell (NC), neck canal cell (NCC), egg (E); 8. Vertical section of archegonium, neck cell (NC), neck canal cell (NCC), ventral canal cell (VCC); 9. Intumescent egg (E); 10. Vertical section of mature archegonium, neck cell (NC).

路 靖等：图版 II

LU Jing *et al.* : Plate II



中华水韭胚胎发育。 1. 2 细胞时期，示合子(Z)、透明物质(TM)； 2. 基下细胞(HC)、基上细胞(EC)； 3. 3 细胞时期，示基下细胞(HC)、A 细胞、B 细胞； 4. 4 细胞时期：基足原始细胞(FIC)，第一根原始细胞(R₁IC)，茎干原始细胞(SIC)，第一叶原始细胞(L₁IC)； 5. 胚胎； 6. 示第一叶原基(L₁P)，第一根原基(R₁P)，基足(F)和叶舌原始细胞(LPC)； 7. 示第一幼叶(L₁)，第一根(R₁)，第二叶原基(L₂P)； 8. 示表皮(Ec)，皮层(Cc)，叶舌(L)； 9. 示第一叶(L₁)，第一根(R₁)，基足(F)； 10. 示第一叶(L₁)，叶舌(L)，第二叶(L₂)，第一根(R₁)。

Embryological development of *Isoetes sinensis* Palmer. 1. Two cells period, zygote (Z), transparent material (TM); 2. Hypobasal cell(HC), epibasal cell(EC); 3. Three cells period, hypobasal cell(HC), A cell, B cell; 4. Four cells period, foot initial cell(FIC), first root initial cell(R₁IC), stem initial cell(SIC), first leaf initial cell(L₁IC); 5. Embryos; 6. First leaf primordium (L₁P), first root primordium(R₁P), foot(F), ligule primitive cells(LPC); 7. First leaf(L₁), first root(R₁), second leaf primordium (L₂P); 8. Epidermis cells(Ec), cortex cells(Cc), ligule(L); 9. First leaf(L₁), first root(R₁), foot(F); 10. First leaf(L₁), ligule (L), second leaf(L₂), first root(R₁) .

(责任编辑：王豫鄂)