植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (1): 72–79, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

水蕨孢子壁的形成和发育

戴锡玲, 曹建国, 王全喜*

上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘要 利用光镜、扫描电镜和透射电镜对水蕨科(Parkeriaceae)水蕨(*Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.)孢子壁的形成和发育进行了研究。结果表明, 水蕨孢子呈辐射对称, 三裂缝, 表面具肋条状纹饰。孢子壁由内壁、外壁和周壁三部分构成。在四分体阶段外壁已基本形成, 其外壁显著, 表面光滑, 质地均匀, 由孢粉素形成, 外壁厚约3-5 μm, 脊高约5-7 μm。周壁由绒毡层残余物在外壁表面沉积形成, 较薄, 厚度只有0.1 μm, 表面具有杆状突起。研究结果对揭示孢子纹饰和孢子壁各层的形成过程、来源和稳定性有一定的意义, 并为蕨类植物孢粉学和系统学研究提供基础资料。

关键词 水蕨, 孢子发育, 孢子壁

戴锡玲, 曹建国, 王全喜 (2008). **水蕨孢子壁的形成和发育**. **植物学通报 25**, 72-79.

水蕨(*Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.)隶属于水蕨科(Parkeriaceae)水蕨属, 为一年生淡水水生(或沼生)蕨类植物。水蕨是蕨类中较受广泛关注的一种植物, 它的茎、叶可入药, 嫩叶可做蔬菜。因其孢子大、容易收集及生活史短等特征而成为一种教学和科研的模式植物(Hickok et al., 1995; Renzaglia and Warne, 1995)。在水蕨孢子形态方面, 中国科学院植物研究所古植物研究室孢粉组 (1976) 描述了我国产水蕨(*C. thalictroides*) 的孢子形态, 他们通过光镜观察, 认为水蕨没有周壁, 只有外壁, 其厚度可达 12 μm。中国台湾学者黄增泉(Huang, 1981)描述了产于台湾的水蕨(*C. thalictroides*), 其外壁厚 5-6 μm。Tryon 和 Lugardon (1991) 在电镜下观察了水蕨属4 种植物的孢子形态和孢子壁结构。李新国等(2001)研究了水蕨(*C. thalictroides*)和粗梗水蕨(*C. pteridoides*)的孢子形态和孢子壁结构。尽管有诸多关于水蕨的文献, 但尚无水蕨孢子壁发育研究的报道。有关其它蕨类植物孢子壁发育的研究也报道较少, 已有的工作包括 Lugardon(1966, 1969, 1979)研究了 *Blechnum spicant*、*Equisetum maximum*、*Osmunda regalis* 和 *Psilotum triquetrum* 的孢子壁个体发生; Uffelen(1992, 1993, 1997)对水龙骨科蕨类孢子壁的发育进行了研究; Uehara 等(1989a, 1989b, 1999)研究了 *Equisetum arvense*、*Ophioglossum thermale* 和 *Thelypteris decursive-pinnata* 孢子壁的发育过程; Parkinson(1995)对 *Schizaea pectinata* 周壁的形成进行了研究。对孢子壁形成和发育的研究有助于解释在研究成熟孢子时遇到的各种问题, 也有助于更好地理解不同种之间以及不同等级的分类群之间的演化关系(Uffelen, 1993)。

本文利用光镜、扫描电镜和透射电镜对照的方法, 对水蕨孢子壁的形成和发育进行了研究, 这将有助于进一步了解真蕨类植物孢子外壁和周壁的来源和形成方式, 并为蕨类植物的系统学和孢粉学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料的采集和固定

水蕨(*Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.)采自上海师范大学植物园。选择生长良好的植株, 取不同发育时期的材料进行现场固定。方法如下: 把长有孢子囊的小

收稿日期: 2006-12-04; **接受日期**: 2007-05-28
基金项目: 国家自然科学基金(No. 30270088)和上海市教育委员会科学研究项目(No. 06DZ017)
* **通讯作者**。E-mail: wangqx@shnu.edu.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

羽片剪下, 按照不同发育时期分别放入不同的瓶中, 用3% 的戊二醛溶液固定, 保存于 0 - 4°C 冰箱中备用。

1.2 处理和观察

1.2.1 光镜观察

将不同时期的孢子囊从孢子叶上剥离下来, 用蒸馏水反复冲洗。制水封片之前将孢子囊刺破, 使孢子散落在载玻片上, 去除孢子囊后盖上盖玻片。用 Nikon E800 型光学显微镜观察并照相。

1.2.2 扫描电镜观察

把经光镜检查后的不同时期的孢子囊从孢子叶上剥离下来, 依次放入 0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液的小瓶中, 用相同缓冲液冲洗 3 次。乙醇逐级脱水, 用乙酸异戊酯过渡, CO_2 临界点干燥, 将干燥后的孢子囊放在铜台的双面胶上, 然后将孢子囊刺破, 用 EIKO IB-3 型离子溅射仪喷金。最后将材料置于 H-520 型扫描电子显微镜下观察并照相。

1.2.3 透射电镜观察

把经光镜检查后的不同时期的孢子囊从孢子叶上剥离下来, 用 1% 锇酸水溶液在室温黑暗条件下进行固定后过夜, 用 0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液冲洗, 经丙酮逐级脱水后, 将材料置于不同比例的丙酮与 Epon 812 树脂渗透液中逐级渗透, 最后置于纯包埋剂中包埋, 并于 60°C 烘箱中聚合。在 Ultracut E 型切片机上切片, 切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 最后用 H-600 型透射电子显微镜观察并照相。

2 结果

2.1 孢子囊的形成和四分孢子的发育

在孢子母细胞时期, 水蕨孢子囊是由囊壁、绒毡层和孢子母细胞组成的。刚形成的孢子母细胞为方形, 具有明显的细胞壁, 但细胞内的细胞器较为退化(图 1A)。随着发育, 孢子母细胞由方形逐渐变为圆形, 细胞之间相互分离, 但孢子母细胞之间可通过一些通道相互联系(图 1B, 箭头)。当孢子母细胞进一步发育时, 细胞变为圆形, 孢子母细胞相互之间完全分离, 此时, 可见到绒毡层细胞壁开始分解, 融合后形成绒毡层物质(图1D), 侵入孢子母细胞之间(图 1C, E)。

孢子母细胞减数分裂形成四分孢子, 进入四分体时期, 由于水蕨四分孢子的位置呈四分体型排列, 因而孢子是辐射对称的, 具三裂缝。在光学显微镜下, 四分孢子外面包裹着一层绒毡层物质, 去除四分孢子后, 只剩下绒毡层物质(图 1H), 刚形成的四分孢子的赤道面观略呈三角形, 赤道轴长约 40 μm, 极轴长约 33 μm(图 1I)。四分孢子形成后, 孢子内的原生质收缩, 尤其是在四分孢子的近极面, 原生质向内收缩形成痕褶(图 1F, G)。在透射电镜切片过程中, 由于取材位置的不同, 可以看到四分体痕褶有在顶端或中部分叉的现象(图 1F), 痕褶长约 10 - 15 μm。放大观察表明, 痕褶是由质膜形成的(图 1G, 箭头) 。

2.2 孢子壁的形成和发育

2.2.1 孢子外壁的形成

水蕨孢子在四分孢子痕褶形成后, 开始在其表面沉积孢粉素, 形成孢子外壁。在光学显微镜下观察, 孢子外壁光滑, 在近极面, 孢子三裂缝清晰可见, 长度约为孢子直径的 2/3(图 1K), 在近极面的裂缝附近有大小不一的小球, 直径约 1.5 - 5 μm 不等(图 1K)。而远极面孢子表面具有肋状纹饰, 肋条状纹饰从孢子裂缝的 3 个角处发出, 伸向远极面, 近平行排列, 这时孢子的直径增大, 约为 85 - 90 μm(图 1J)。在透射电镜下, 外壁表面呈波浪状, 厚度约 3 - 5 μm(图 1L)。

随着孢子的进一步发育, 外壁发育成熟, 这时孢子赤道径可达到 100 μm, 孢子表面光滑, 偶分布有低矮的突起和大小不一的小球, 外壁向外形成粗大的肋条状的脊, 成为孢子表面纹饰的轮廓, 肋条状脊高度进一步增加, 脊宽约 3.5 μm, 相邻两脊之间的距离为 4 - 6 μm(图 2A, B)。在透射电镜下, 在裂缝附近仍可见到大小不一的小球, 直径约 1 - 4 μm, 其结构和孢子外壁相同。孢子外

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

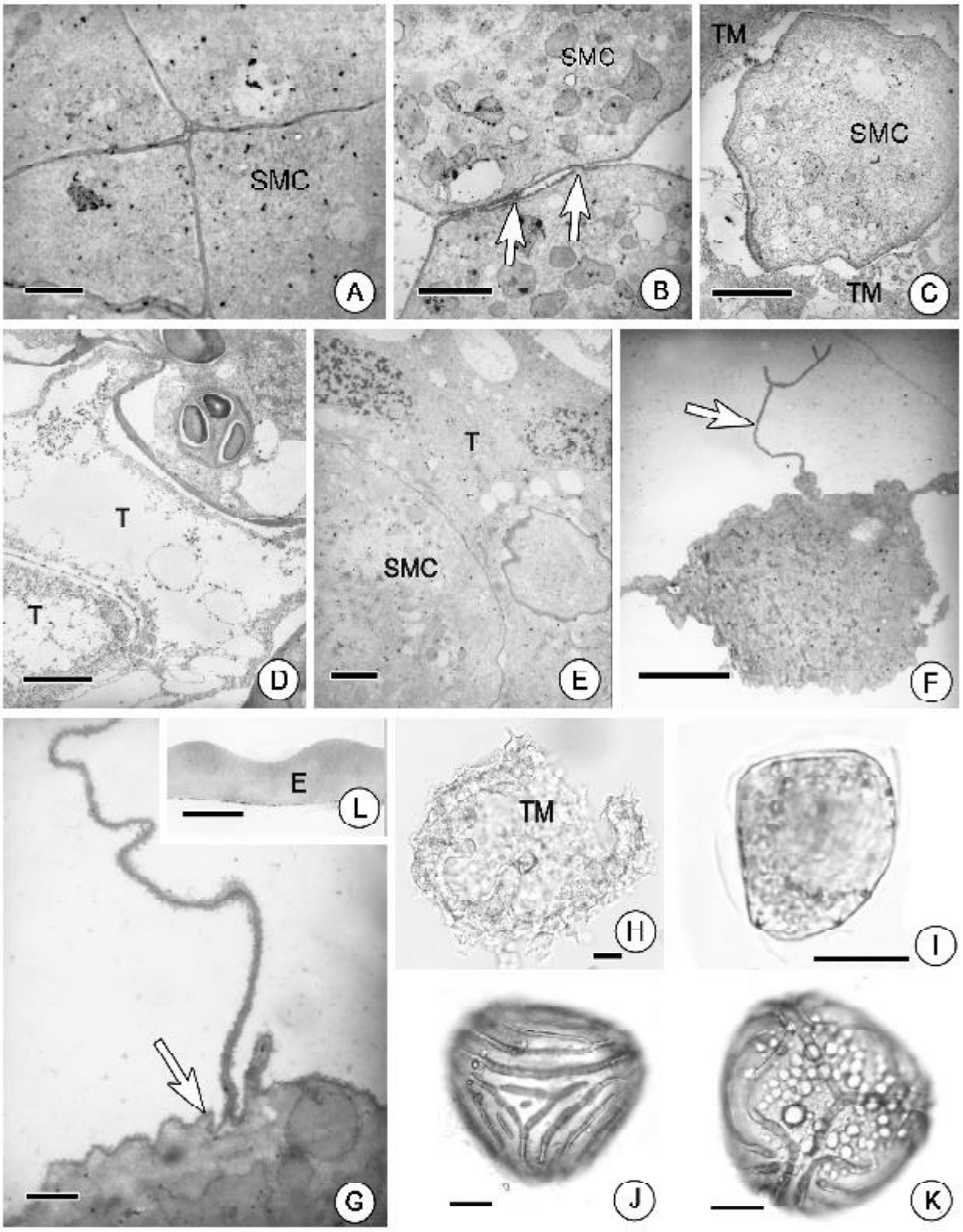


图 1
Figure 1

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

壁近极面比远极面厚(2个脊之间), 近极面厚约4-5 μm, 远极面厚约2.5 μm, 脊高为5-7 μm(图2C,E)。

2.2.2 孢子周壁的形成

孢子外壁形成后, 孢子周壁开始形成。在扫描电镜下, 可见到孢子的外方和表面有少量的绒毡层残余物(图2D)。在透射电镜下也可以看到这些残余物(图2E,H)。这些绒毡层残余物在成熟外壁表面迅速沉积形成孢子周壁。首先, 绒毡层残余物的片状物在光滑的孢子外壁表面沉积, 形成致密的一层, 紧贴外壁。此后, 绒毡层残余物又在表面形成细小的杆状突起, 直径约0.1-0.15 μm, 长约0.2-0.5 μm, 小杆几乎垂直于外壁表面(图2H)。周壁颜色较外壁深, 因而在光镜下观察, 孢子表面的颜色明显加深。最后, 一些更加细小的颗粒覆盖在孢子周壁的表面, 这些颗粒直径约0.1 μm, 与周壁的结合较为疏松(图2I,J)。在孢子外壁附近的小球表面也同样发生类似孢子周壁的沉积过程, 并且可能通过共同的周壁使小球与孢子外壁连在一起(图2G,I)。

成熟的孢子, 直径可达125 μm(图2F)。孢子纹饰是由外壁的隆起形成的, 为典型的肋条状纹饰。周壁很薄, 基部厚约0.1 μm, 覆盖在外壁和小球的表面, 周壁表面具有密集的小杆状突起, 在孢子的表面, 小杆之间覆盖着大量的细小颗粒。

←

图1 水蕨孢子的发育及孢子壁的形成

(A) 孢子母细胞形成初期呈多边形(透射电镜观察);
(B) 孢子母细胞变圆, 细胞之间有通道相连(箭头);
(C) 孢子母细胞相互分离, 每个细胞周围有大量的绒毡层物质;
(D, E) 在孢子母细胞形成末期, 绒毡层细胞解体;
(F) 四分孢子形成后, 原生质体收缩, 细胞形状不规则, 在孢子近极面形成痕褶(箭头);
(G) 痕褶的放大观察, 表明痕褶是由质膜(箭头)形成的;
(H) 四分体时期, 去除四分孢子后留下绒毡层物质(光镜观察);
(I) 刚形成的1个四分孢子;
(J) 孢子外壁发育中期, 孢子表面形成外壁, 在远极面呈肋条状(光镜观察);
(K) 孢子外壁发育中期, 孢子表面形成外壁, 在近极面具有三裂缝和小球体(光镜观察);
(L) 孢子外壁形成中期(透射电镜观察)
T: 绒毡层细胞; TM: 绒毡层物质; SMC: 孢子母细胞; E: 孢子外壁
(G: bar=1 μm; A,D,L: bar=3 μm; B,C,E,F: bar=5 μm; H-K: bar=20 μm)

Figure 1 Observation on the formation of the sporoderm and the development of the spore of *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.

(A) In the early stage the spore mother cells (SMC) show a polygonal shape (TEM observation);
(B) In this stage, the SMCs change shape from angular to rounded and some canals (indicated by arrow) connect the SMCs;
(C) The SMCs were separated from each other and each of them was surrounded by the tapetal materials;
(D,E) The tapetal cell starts to break down and the tapetum moves into between the SMCs;
(F) In the stage of tetrads, each tetraspore contracts and the shape becomes irregular with the laesural fold formed on the proximal face;
(G) The magnification of the laesual fold shows that the fold was formed by plasmalemma (indicated by arrow);
(H) In the tetraspore stage, the tetraspores were taken out and the tapetal materials leave behind (LM observation);
(I) A tetraspore just formed;
(J) Spore in the middle stage of exospore (LM observation), showing the distal face; showing the proximal face and aperture;
(K) Spore in the middle stage of exospore (LM observation), showing the proximal face and aperture;
(L) The cross section of exospore (TEM observation).
T: tapetum cells; TM: tapetal materials; SMC: spore mother cells; E: exospore
(G: bar=1 μm; A,D,L: bar=3 μm; B,C,E,F: bar=5 μm; H-K: bar=20 μm)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

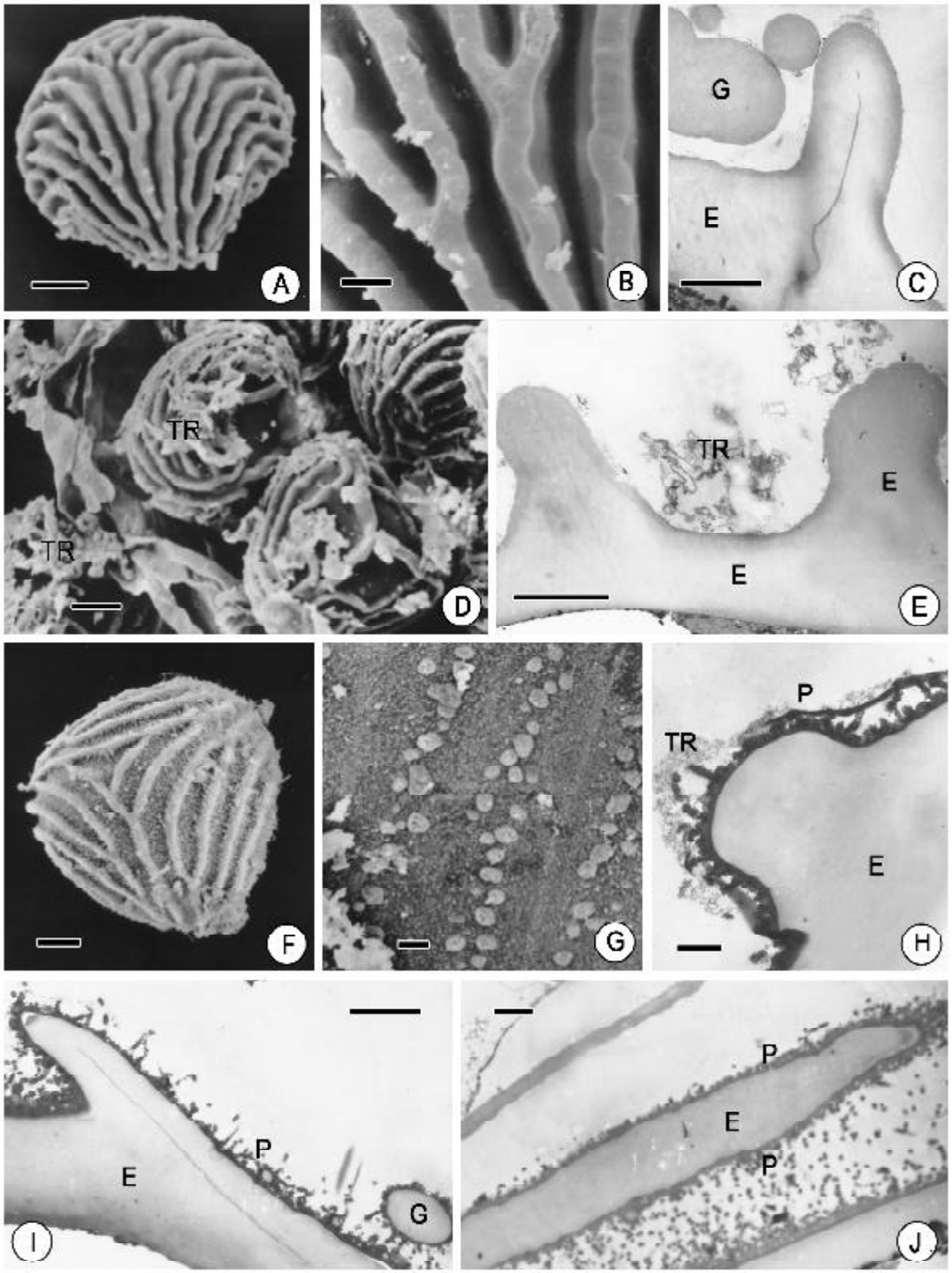


图 2
Figure 2

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

3 讨论

Uffelen(1993)指出水龙骨科 *Drynaria* 孢子发育时, 四分孢子不规则的形状可能是由于固定的假象造成的。在本研究中, 孢子母细胞减数分裂形成四分孢子后, 原生质收缩, 细胞形状亦变得不规则(图1F,G), 然而, 孢子囊壁细胞形状却未发生变化, 这说明四分孢子形状的变化可能是其本身在由营养细胞转变为生殖细胞时经历的一种特殊的变化, 而并非由于固定的假象所引起。

在真蕨目蕨类孢子中, 内壁在孢子形成时通常是不存在的, 只有在孢子萌发时才会显现(Tryon and Lugardon, 1991)。因此, 本研究只针对水蕨孢子外壁和周壁的结构及发育。中国科学院植物研究所古植物研究室孢粉组 (1976) 通过光镜观察研究了水蕨(*C. thalictroides*) 的孢子形态, 认为水蕨没有周壁, 只有外壁, 厚可达 12 μm。Huang (1981)描述了光镜下产于台湾的水蕨(*C. thalictroides*), 认为其外壁厚 5-6 μm。我们通过透射电镜观察, 表明水蕨孢子近极面外壁厚约 5 μm, 裂缝和球体高约 7 μm, 总高度约 12 μm, 而远极面外壁厚约 2.5 μm, 脊高约 5 μm, 与上述学者的研究结果有所不同, 这可能是由于观察方法的差异造成的。Tryon 和 Lugardon (1991)及李新国等(2001)用透射电镜观察了水蕨孢子的孢子壁结构, 认为水蕨孢子壁是由厚的外壁和薄的周壁构成, 我们的观察结果与他们的相一致。

Uffelen(1993)在研究水龙骨科植物*Drynaria*孢子外壁时指出, 其外壁可分为内层和外层, 内层是沉积在质膜表面的一层暗的孢粉素层; 外壁外层的形成过程较为复杂, 但仍然是由不同形式的孢粉素构成的。在本研究中未观察到外壁的分层现象, 这可能是由于观察时期不同造成的, 水蕨外壁是否具有分层现象还需进一步研究。Tryon和Lugardon(1991)指出构成外壁的物质是孢粉素, 很难被乙酰水解, 因此, 外壁对孢子具有很好的保护作用。本研究表明水蕨孢子外壁也由孢粉素形成, 厚度可达 3-5 μm, 比 *Drynaria* 孢子外壁(厚约 1.5 μm)厚 2-3 倍, 对孢子具有很好的保护作用。

←

图 2 水蕨孢子壁的形成和发育

(A) 具有成熟外壁的孢子(扫描电镜观察);
(B) 图 2A 的局部放大;
(C) 孢子外壁形成末期, 孢子近极面切片, 示裂缝和小球体;
(D) 绒毡层残余物覆盖在孢子外壁的表面;
(E) 孢子外壁的横切, 其外层有少量绒毡层残余物(透射电镜观察);
(F) 成熟孢子扫描电镜观察;
(G) 成熟孢子近极面表面观察, 示表面的小球体;
(H) 孢子壁横切, 示周壁形成时仍可见到少量绒毡层残余物;
(I) 成熟孢子壁近极面的横切, 其附近可见小球;
(J) 成熟孢子肋状脊的横切。
TR: 绒毡层残余物; E: 孢子外壁; P: 周壁; G: 小球体
(H,J: bar=1 μm; C,E,I: bar=3 μm; B,G: bar=5 μm; A,D,F: bar=20 μm)

Figure 2 Observation on the formation and development of the sporoderm of *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.

(A) Spore with mature exospore (SEM observation);
(B) Magnification of part of figure 2A;
(C) In the stage of mature exospore formation, showing a cross section of laesura and globules;
(D) There are a few tapetal residues (TR) outside the exospore;
(E) A cross section of exospore layer showing that some tapetal residues are also visible outside the exospore (TEM observation);
(F) The mature spore observed under SEM;
(G) Magnification of the proximal face of the mature spore, showing the globules;
(H) A cross section of the spore wall, showing the formation of the perispore and some tapetal residues which can also be seen in this stage;
(I) Cross section of laesura of mature spores observed under TEM, showing that the globules can also be seen sometimes;
(J) A cross section of the rib-shaped ridges of mature spores.
TR: tapetal residues; E: exospore; P: perispore; G: globule.
(H,J: bar=1 μm; C,E,I: bar=3 μm; B,G: bar=5 μm; A,D,F: bar=20 μm)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

水蕨的周壁很薄，基部厚约0.1 μm，上面有杆状突起并覆盖着大量的细小颗粒。按照Tryon和Lugardon (1991)对蕨类植物孢子周壁类型的划分，水蕨孢子周壁应属于实心型(solid type)。关于周壁的来源，Uffelen (1993)指出*Drynaria*孢子周壁是由绒毡层残余物在外壁表面的快速沉积形成的。Tryon和Lugardon(1991)指出周壁是由衰老的原生质绒毡层(plasmodial tapetum)所分泌的丝状-颗粒状物质形成的。本研究表明外壁完全形成之后，孢子外面有少量的绒毡层残余物，这些残余物能快速沉积到孢子外壁的表面(图2C,E)，研究结果支持上述观点，但水蕨大部分绒毡层物质都用来形成外壁，只剩下少量的绒毡层残余物。由于绒毡层残余物是非孢粉素性质的，因而周壁的性质与外壁区分明显。

参考文献

李新国, 戴锡玲, 王全喜 (2001). **中国水蕨属孢子形态及其系统学意义的研究**. **植物研究 21**, 200-202.

中国科学院植物研究所古植物研究室孢粉组 (1976). **中国蕨类植物孢子形态**. **北京**: **科学出版社**.

Hickok LG, Warne TR, Fribourg RS (1995). The biology of the fern *Ceratopteris* and its use as a model system. *Inter J Plant Sci* **156**, 332-345.

Huang TC (1981). Spore Flora of Taiwan. Taibei: Meitai Color Print Co., Ltd.

Lugardon B (1966). Formation de l'exospore chez *Blechnum spicant* (L.) Roth. *C R Acad Sci Paris ser D* **262**, 2029-2031.

Lugardon B (1969). Sur la structure fine des parois sporales d' *Equisetum maximum* Lamk. *Pollen Spores* **11**, 449-474.

Lugardon B (1979). Sur la formation du sporoderme chez *Psilotum triquetrum* Sw. (Psilotaceae). *Grana* **18**, 145-165.

Parkinson BM (1995). Spore wall development in *Schizaea pectinata* (Schizaeaceae: pteridophyta). *Grana* **34**, 217-228.

Renzaglia KS, Warne TR (1995). Ceratopteris: an ideal model system for teaching plant biology. *Inter J Plant Sci* **156**, 385-392.

Tryon AF, Lugardon B (1991). Spores of the Pteridophyta. New York: Spriger-Verlag Inc.

Uehara K, Kurita S (1989a). An ultrastructural study of spore wall morphogenesis in *Equisetum arvense*. *Am J Bot* **76**, 939-951.

Uehara K, Kurita S (1989b). Ultrastructual study of spore wall morphogenesis in *Ophioglossum thermale* Kom. var. *nipponicum* (Miyabe et kudo) Nishida. *Bot Mag Tokyo* **102**, 413-427.

Uehara K, Nishino E (1999). Ultrastructural study of spore wall development in *Thelypteris decursive-pinnata* (Thelypteridaeae). *Tech Bull Fac Hort Chiba Univ* 19-28.

Uffelen GA (1992). Sporogenesis in Polypodiaceae (Filicales). II. The genera *Microgramma* Presl and *Belvisia* Mirbel. *Blumea* **36**, 515-540.

Uffelen GA (1993). Morphogenesis and Evolution of the Spore Wall of Polypodiaceae (Filicales). London: Rijksherbarium / Hortus Botanicus.

Uffelen GA (1997). The spore wall in Polypodiaceae: development and evolution. In: Johns RJ, ed. Holttum Memorial Volume. London: Royal Bot Gardens. pp. 95-117.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422

Formation and Development of Sporoderm of *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. (Parkeriaceae)

Xiling Dai, Jianguo Cao, Quanxi Wang*

College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract The formation and development of sporoderm of the fern *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. (Parkeriaceae) were studied by means of light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. The mature spores are radially symmetrical and trilete. The surface of spores is smooth and shows a rib-shaped (costate) ornamentation. The sporoderm consists of endospore, exospore and perispore. The exospore, which is formed by sporopollenint, is prominent; it is about 3-5 μm thick, and its rib-shaped ridges are about 5-7 μm high. The surface is smooth and the texture is uniform. The perispore is formed by the tapetal residues, which deposit on the outside of the exospore. The perispore is very thin, about 0.1 μm thick, with many small rod-like projections in the surface of perispore. The results will contribute to a better understanding of the origin, development and formation process of the sporoderm of ferns. They can also provide basic information about the palynology and phylogeny of ferns.

Key words *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn., spore development, sporoderm

Dai XL, Cao JG, Wang QX (2008). Formation and development of sporoderm of *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. (Parkeriaceae). *Chin Bull Bot* **25**, 72–79.

* Author for correspondence. E-mail: wangqx@shnu.edu.cn

(**责任编辑**: **白羽红**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-422