

珍稀濒危蕨类植物金毛狗配子体发育及无配子生殖的观察

余蓉培¹, 程薪宇², 张光飞³, 李涵¹, 桂敏^{1,*}

¹国家观赏园艺工程技术研究中心, 云南省农业科学院花卉研究所, 昆明650205; ²黑龙江省科学院大庆分院, 黑龙江大庆163319; ³云南大学生态学与地植物学研究所, 昆明650091

摘要: 金毛狗 [*Cibotium barometz* (L.) J. Sm.] 为国家二级重点保护野生植物, 是珍稀濒危蕨类植物的重要类群。本研究通过孢子无菌培养, 对金毛狗配子体发育及其无配子生殖现象进行观察。结果表明: 金毛狗孢子为黄色, 近四面体型, 三裂缝, 远极面具条状纹饰, 萌发类型为书带蕨型 (*Vittaria*-type), 多数配子体的发育类型符合铁线蕨型 (*Adiantum*-type)。孢子播种约40 d后, 原叶体开始产生精子器, 颈卵器晚于精子器出现。金毛狗属于兼性无配子生殖, 无配子生殖发生于增厚原叶体的两翼上缘。与同期有性生殖的组培植株相比, 无配子生殖组培植株的特征在于: 植株个体、复叶及小叶均小于有性生殖植株, 三回羽状复叶特征较为明显, 复叶叶柄的毛密而长, 染色体倍性为有性生殖植株的一半。

关键词: 金毛狗; 孢子萌发; 配子体发育; 无配子生殖

金毛狗 [*Cibotium barometz* (L.) J. Sm.], 隶属于蚌壳蕨科 (*Dicksoniaceae*) 金毛狗属, 为多年生大型树状蕨类植物。根状茎平卧、粗大, 端部上翘, 露出地面部分密被金色茸毛, 状似伏地的金毛狗, 形态独特, 具有较高观赏价值 (陆树刚2007; 石雷2002)。在欧美地区, 金毛狗作为“树蕨” (tree ferns) 的重要类群, 广泛应用于庭院造景中 (Jones 1987)。此外, 金毛狗亦有重要药用价值, 具有消炎、镇痛、止血以及预防骨质疏松的功效 (Cuong等2009; Wu和Yang 2009; Zhao等2011)。由于野生资源的过度开发和自然生境的破坏, 金毛狗的野外种群数量急剧减少, 已列入《濒危野生动植物种国际贸易公约(附录II)》 (CITES 2016)。在中国大陆地区, 蚌壳蕨科仅金毛狗1种, 《国家重点保护野生植物名录(第一批)》已将金毛狗列为国家二级重点保护野生植物 (陈水木等2007)。目前, 对于金毛狗的研究主要集中于药用成分及其功效 (Cuong等2009; Wu和Yang 2009; Zhao等2011)、化感作用 (张开梅等2008) 等方面, 在配子体发育方面, 郭治友 (2009) 和邢建娇等 (2012) 进行了初步研究, 但对孢子形态以及配子发育的深入观察还有待进一步完善。

蕨类植物通常经有性生殖繁衍后代, 但部分蕨类植物亦可通过无配子生殖产生后代 (Fernández和Revilla 2003)。蕨类植物无配子生殖是指不需要经过配子的结合, 而直接产生孢子体的现象, 它主要是由除卵细胞以外的配子体营养细胞分化形成 (陆树刚2007; 李杨等2012)。水蕨 (*Ceratopteris richardii* Brongn.) (Cordle等2007, 2010)、傅氏凤尾蕨

(*Pteris fauriei* Hieron.) (沈建等2009)、金粉蕨 [*Onychium siliculosum* (Desv.) C. Chr.] (代小菲等2010)、粉叶蕨 (*Pityrogramma calomelanos* L.) (Martin等2006) 和舟山碎米蕨 (*Cheilosoria chusana*) (郭严冬等2014) 等种类均被报道可以进行无配子生殖。目前, 尚未见金毛狗无配子生殖的相关报道。本研究以金毛狗孢子为培养材料, 对配子体发育及无配子生殖现象进行观察, 探讨其配子体发育及无配子生殖后代特征, 为珍稀濒危蕨类金毛狗野生资源的保护和合理开发利用提供基础资料。

材料与方法

1 孢子收集

金毛狗 [*Cibotium barometz* (L.) J. Sm.] 孢子于2013年11月采集于云南屏边地区。将带有成熟孢子的叶片装于信封中, 置于干燥通风处待孢子自然散落。1周后将孢子除去杂质, 收集于硫酸纸袋中, 保存于4°C冰箱中备用。

2 孢子形态的扫描电镜观察

将干燥的金毛狗孢子直接均匀撒在双面胶带上, 并固定在样品台上, 使用Hitachi E-1010离子溅射仪镀铂靶合金膜, 然后置于Hitachi S-3000N扫描电镜下观察并拍照。

收稿 2016-06-28 修定 2016-07-25

资助 云南省应用基础研究计划(2014FD066)、云南省科技惠民计划(2014RA053)、国家观赏园艺工程技术研究中心(2012FU125X10)、云南省农业科学院创新团队(2014-CZYY019)和云南省生物多样性保护专项。

* 通讯作者(E-mail: gming-114@163.com)。

3 配子体培养

参照张婷婷等(2012)的孢子消毒方法对金毛狗孢子进行消毒,消毒后的孢子接种于1/2MS+3%蔗糖+0.7%琼脂的培养基上,参照王晓倩等(2014)的方法对孢子接种密度进行控制,暗培养24 h后,放置于培养室中培养,光照强度为 $30\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间为 $12\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,温度为 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ 。孢子播种后每2 d使用Leica DM 6000B显微镜对配子体发育情况进行观察,并用Leica DFC 450C相机拍照。

4 无配子生殖后代的形态观察和倍性鉴定

将配子体培养过程中得到的无配子生殖后代接种于1/2MS+3%蔗糖+ $1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭+0.7%琼脂的培养基上培养,培养3个月后,与同期有性生殖形成的组培植株进行形态比较,并采用Partec

CyFlow Space-3000流式细胞仪对无配子生殖后代进行倍性鉴定,所用方法参照钱敏等(2015)的鉴定方法。

实验结果

1 配子体发育

1.1 孢子形态及孢子萌发

金毛狗孢子为黄色,近四面体型,辐射对称,三裂缝,裂缝长 $18\ \mu\text{m}$,未及赤道面,裂缝边缘具脊状纹饰(图1-A),远极面具条状纹饰(图1-B)。孢子大小约为 $50\ \mu\text{m}$ (极轴) $\times 52\ \mu\text{m}$ (赤道轴),近极面观近正三角形(图1-A)。播种7 d左右,孢子开始萌发,原叶体细胞从三裂缝处伸出,初生假根与原叶体细胞垂直(图1-C),无色透明,偶见少量叶绿体,孢

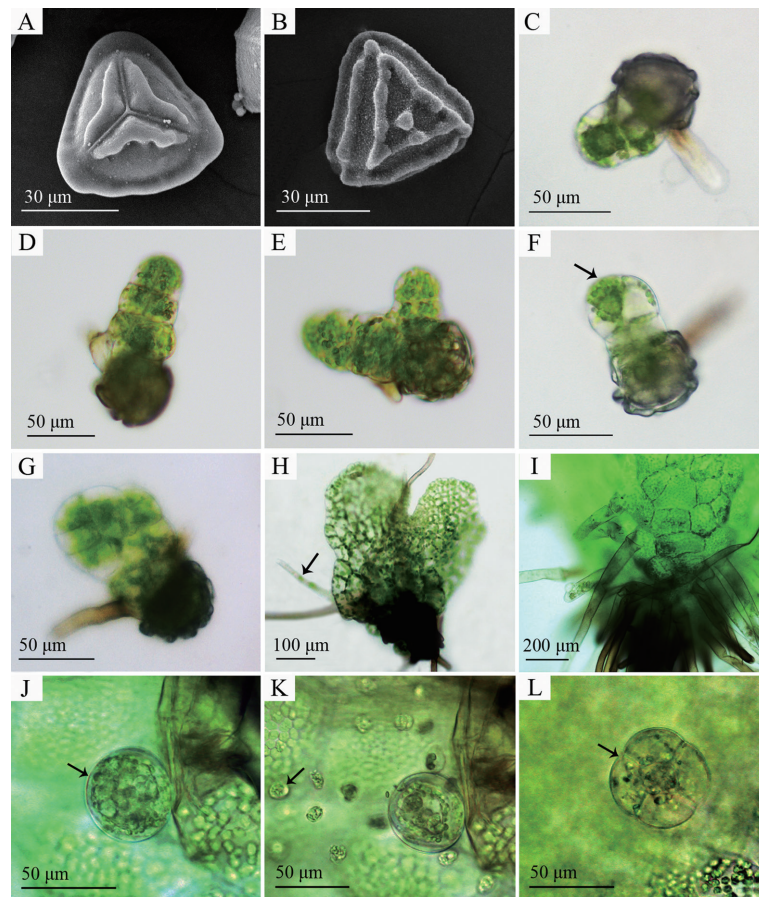


图1 金毛狗孢子形态及配子体发育

Fig.1 Spore morphology and gametophyte development of *Cibotium barometz*

A: 近极面观孢子形态; B: 远极面孢子纹饰; C: 孢子萌发; D: 双列丝状体; E: 仅基部相连的2个丝状体; F: 丝状体顶部的楔形细胞(箭头所示); G: 片状体; H: 原叶体(箭头所示为具有叶绿体的假根); I: 原叶体假根; J: 成熟的精子器(箭头所示); K: 正在释放精细胞的精子器(箭头所示为精细胞); L: 颈卵器顶面观(箭头所示)。

子壁宿存于原丝体基部(图1-C), 孢子萌发类型为书带蕨型(*Vittaria-type*) (Nayar和Kaur 1971)。

1.2 丝状体及片状体

原叶体母细胞分裂形成基细胞和原叶体细胞, 基细胞一般不再分裂, 原叶体细胞则连续进行横向分裂, 形成3~4个细胞的丝状体, 单列的丝状体有时也会经过纵向分裂形成双列丝状体(图1-D)。少数原叶体细胞会先进行一次纵向分裂形成2个原叶体细胞, 然后2个原叶体细胞各自进行分裂形成丝状体, 2个丝状体仅基部细胞相连, 形成丝状体分枝现象(图1-E)。

当丝状体生长至3~4细胞长时, 顶端会形成一个楔形细胞, 即分生细胞(图1-F), 楔形细胞不断向两边分裂形成新细胞, 新细胞再不断分裂逐渐形成片状体(图1-G), 其发育类型符合铁线蕨型(*Adiantum-type*), 但部分片状体的发育亦不完全符合铁线蕨型特征, 具有多态性。

1.3 原叶体

随着片状体的生长, 生长点逐渐下陷, 两翼上延, 经过不断调整最后形成左右对称的心形原叶体(图1-H), 原叶体基部有大量假根(图1-I), 少数假根可见叶绿体(图1-H)。随着原叶体逐步发育成熟, 中肋处加厚并突出, 且原叶体的翼缘会有褶皱形成。金毛狗原叶体的形态随性别而存在一定差

异, 雄性配子体较小, 长大于宽; 雌性或两性配子体较大, 长小于或等于宽, 具有细胞排列紧密的“U”形生长点。

1.4 性器官的形成

金毛狗孢子播种后40 d左右, 原叶体开始产生精子器, 精子器主要着生于原叶体腹面的两翼下部、假根丛中及假根周围, 数量从十几个至数十个不等。精子器顶面观为球形, 直径为44~51 μm , 内部充满大量精细胞(图1-J), 成熟精子器的盖细胞会出现裂口, 精细胞从裂口处溢出(图1-K)。颈卵器晚于精子器形成, 主要着生于原叶体腹面“U”形生长点的下方以及中肋区域, 数量从几个至十几个不等。颈卵器直径为58~62 μm , 突出颈部由4列细胞组成, 成熟时, 颈卵器中央的颈沟细胞和腹沟细胞破裂, 露出颈沟(图1-L)。

2 无配子生殖

2.1 无配子生殖植株的获得及其形态特征

当孢子萌发形成原叶体之后, 部分原叶体成簇状生长, 少部分原叶体明显加厚, 呈现深绿色, 其中1个原叶体的两翼边缘形成3个无配子生殖芽体(图2-A)。将该原叶体单独培养, 待芽体长至约1 cm, 将其从原叶体上剥离下来, 分别培养, 形成无配子生殖组培植株(图2-B)。与有性生殖产生的组培植株相比, 无配子生殖组培植株的生长较为缓

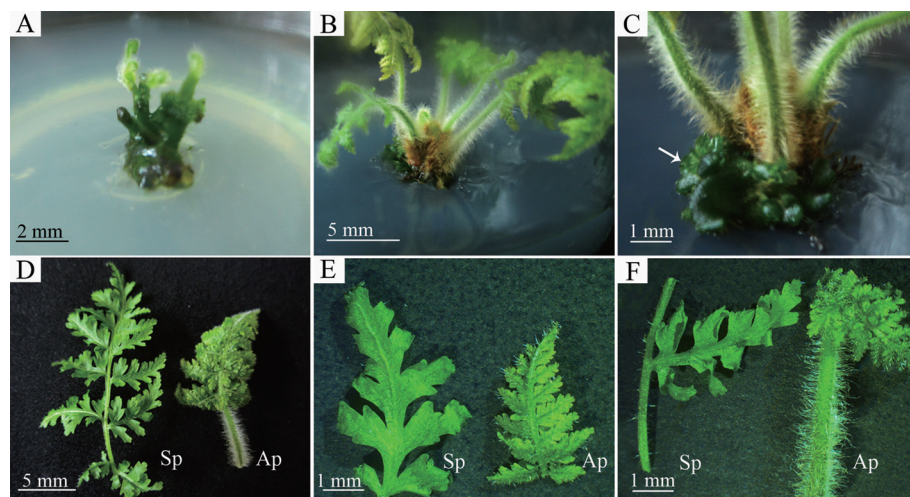


图2 金毛狗无配子生殖组培植株的形成及其形态特征

Fig.2 The formation and morphology of *in vitro* apogamic plantlet of *Cibotium barometz*

A: 原叶体上形成的无配子生殖芽体; B: 无配子生殖组培植株; C: 无配子生殖植株基部形成的原叶体(箭头所示); D: 有性生殖组培植株和无配子生殖组培植株的复叶形态差异; E: 有性生殖组培植株和无配子生殖组培植株的小叶形态差异; F: 有性生殖组培植株和无配子生殖组培植株的茸毛形态差异。Sp: 有性生殖组培植株; Ap: 无配子生殖组培植株。

慢, 培养2个月后, 无配子生殖组培植株基部有新的原叶体形成(图2-C)。

无配子生殖组培植株培养3个月后, 与同期有性生殖产生的组培植株进行比较, 其差异主要表现在: 无配子生殖的植株个体、复叶及小叶均小于有性生殖植株, 三回羽状复叶特征较有性生殖植株更为明显, 小叶着生间隔小于有性生殖植株(图2-D和E); 无配子生殖植株复叶叶柄的茸毛多而密集, 且显著长于有性生殖植株的茸毛(图2-F); 无配子生殖植株基部出现金色茸毛(图2-B), 但有性生殖植株在组培阶段均未出现。

2.2 无配子生殖植株的染色体倍性鉴定

以金毛狗有性生殖产生的组培植株(Sp)为内

部参照, 采用流式细胞术对金毛狗无配子生殖产生的组培植株(Ap)的染色体倍性进行鉴定, 无配子生殖植株细胞核相对DNA含量为有性生殖植株的1/2 (图3-A), 说明无配子生殖植株的染色体倍性发生了变化, 其倍性为有性生殖植株的一半, 与有性生殖过程中产生的正常原叶体倍性相同。

此外, 对无配子生殖植株基部产生原叶体(Pr)的染色体倍性鉴定结果显示: 其细胞核相对DNA含量为有性生殖植株(Sp)的1/2 (图3-B), 其染色体倍性为有性生殖植株的一半, 与无配子生殖植株的染色体倍性情况相同, 说明该原叶体从无配子生殖植株基部产生的过程未发生染色体倍性的改变, 且与有性生殖过程中产生的正常原叶体倍性相同。

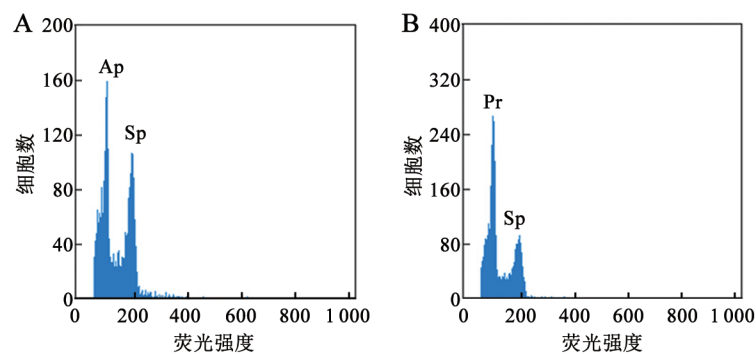


图3 金毛狗无配子生殖植株及其基部配子体相对DNA含量的流式细胞术鉴定图

Fig.3 Flow cytometry histograms on the relative DNA contents of apogamic plantlet and prothallus at the root of apogamic plantlet of *Cibotium barometz*

A: 无配子生殖植株的相对DNA含量; B: 无配子生殖植株基部产生原叶体的相对DNA含量。Sp: 有性生殖组培植株, 作为流式细胞术鉴定中的内部参照; Ap: 无配子生殖植株; Pr: 无配子生殖植株基部产生的配子体。

讨 论

金毛狗孢子的萌发类型为书带蕨型, 其多数配子体的发育类型符合铁线蕨型, 亦具有多态性。就孢子萌发类型而言, 与郭治友(2009)的研究结果相符, 但在配子体发育类型上存在一定差异。郭治友(2009)认为金毛狗配子体发育类型为三叉蕨型; 陈水木等(2007)则认为具有明显丝状体阶段的配子体发育类型符合铁线蕨型, 而无明显丝状体阶段的配子体发育类型则更符合三叉蕨型。造成配子体发育类型观察结果差异的原因可能在于金毛狗配子体发育具有多态性, 且蕨类配子体发育通常会受培养方式、播种密度、光照等因素的影响(杜红

红等2009a, b; 张光飞等2009; 张银丽等2009)。本研究在金毛狗丝状体发育时期, 在丝状体顶端观察到楔形细胞, 楔形细胞向两侧分裂产生新细胞。Takahashi等(2015)研究结果显示, 蕨类植物配子体的形成主要基于两个分生组织, 其中, 基于顶端细胞的分生组织(apical-cell-based meristem)即起源于楔形细胞, 该种分生组织类似于植物的顶端分生组织, 在配子体形成过程中起到关键作用。此外, 本研究采用1/2MS固体培养基对金毛狗孢子进行培养, 在配子体发育过程中出现丝状体分枝现象。陈水木等(2007)也曾观察到丝状体分枝现象, 但仅在采用Knop's液体培养基进行培养的过程中发现。同时, 刘保东和檀龙颜(2009)在肾蕨

[*Nephrolepis auriculata* (L.) Trimen]中也发现丝状体分枝现象,但产生的分枝形似假根,有横隔且无叶绿体分布,与本研究中的丝状体分枝现象存在一定差异,对于金毛狗丝状体分枝现象的产生及其生物学意义有待进一步观察和探讨。

无配子生殖是蕨类植物的一种生殖方式,部分种类,如:金粉蕨(代小菲等2010)、舟山碎米蕨(郭严冬等2014)、*Dryopteris affinis* sp. *affinis* (Fernández等1996)只能产生精子器而不能产生颈卵器,是严格的专性无配子生殖;而水蕨(Cordle等2010)等种类则属于兼性无配子生殖,可以通过正常受精作用产生孢子体,但在自然环境或生理环境不适宜时,受精作用会被抑制,从而诱导配子体进行无配子生殖。本研究中金毛狗配子体可以正常形成性器官,并通过受精作用形成胚,由此可以判断金毛狗应属于兼性无配子生殖。

与有性生殖植株相比,蕨类植物无配子生殖植株在形态学和细胞学上会存在一定差异,但这种差异不是特别巨大。Kawakami等(1995)在对井栏边草(*Pteris multifida* Poir.)无配子生殖的研究中发现,其无配子生殖植株的叶片比有性生殖植株的略窄、保卫细胞变小、且可育叶不能进行正常的减数分裂产生孢子,但紫萁(*Osmunda japonica* Thunb.)无配子生殖植株则主要表现为叶片变小、保卫细胞变小(Kawakami等1999)。本研究中金毛狗无配子生殖产生的组培植株个体、复叶和小叶均小于同期有性生殖产生的组培植株,部分性状特征突出表现,如:三回羽状复叶特征较为明显、复叶叶柄的茸毛密且长。

蕨类植物无配子生殖是由配子体的营养细胞直接产生,其产生植株的染色体倍性理论上应与配子体一致。Kawakami等(1997)对铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris* L.)、鸟巢蕨(*Asplenium nidus* L.)、紫萁等12种蕨类植物进行无配子生殖诱导,获得的无配子生殖植株均为单倍体,染色体数目是有性生殖植株的一半,与原叶体染色体倍性一致。本研究中金毛狗无配子生殖植株的染色体倍性为有性生殖植株的一半,与前人研究结果相符。此外,无配子生殖植株基部产生的原叶体的倍性亦为有性生殖植株的一半,与有性生殖过程中正常配子体的染色体倍性一致。无配子生殖植株基部的配

子体可能由无孢子生殖产生,但对其起源和形成过程需进一步开展研究。

参考文献

- Chen SM, Deng HP, Liu GH, Han M (2007). Gametophyte development and its diversity in *Cibotium barometz*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27 (3): 460–463 (in Chinese with English abstract) [陈水木, 邓洪平, 刘光华, 韩敏(2007). 金毛狗配子体发育阶段性及其多样性研究. 西北植物学报, 27 (3): 460–463]
- CITES (2016). Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora Appendices I, II, and III. (2016-03-10) [2016-05-05]. <https://cites.org/eng/app/appendices.php>
- Cordle AR, Bui LT, Irish EE, Cheng CL (2010). *Working with Ferns*. New York: Springer Press
- Cordle AR, Irish EE, Cheng CL (2007). Apogamy induction in *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci*, 168 (4): 361–369
- Cuong NX, Minh CV, Kiem PV, Huong HT, Ban NK, Nhiem NX, Tung NH, Jung JW, Kim HJ, Kim SY, et al (2009). Inhibitors of osteoclast formation from rhizomes of *Cibotium barometz*. *J Nat Prod*, 72 (9): 1673–1677
- Dai XF, Cao JG, Huang WJ, Zhong XY, Li XG (2010). Development and apogamy of the gametophyte of the fern *Onychium siliculosum* (Desv.) C. Chr. *Bull Bot Res*, 30 (2): 180–184 (in Chinese with English abstract) [代小菲, 曹建国, 黄武杰, 仲晓辉, 李新国(2010). 金粉蕨配子体发育及其无配子生殖的研究. 植物研究, 30 (2): 180–184]
- Du HH, Li Y, Li D, Dai SJ, Jiang CD, Shi L (2009a). Effects of light, temperature and pH on spore germination and early gametophytic development of *Alsophila metteniana*. *Biodivers Sci*, 17 (2): 182–187 (in Chinese with English abstract) [杜红红, 李杨, 李东, 戴绍军, 姜闯道, 石雷(2009a). 光照、温度和pH值对小黑桫椤孢子萌发及早期配子体发育的影响. 生物多样性, 17 (2): 182–187]
- Du HH, Liu HM, Shi L, Dai SJ (2009b). Application of molecular biology techniques in pteridophyte researches. *Plant Physiol Commun*, 45 (6): 625–632 (in Chinese with English abstract) [杜红红, 刘红梅, 石雷, 戴绍军(2009b). 分子生物学技术在蕨类植物研究中的应用. 植物生理学通讯, 45 (6): 625–632]
- Fernández H, Bertrand AM, Sánchez-Tamés R (1996). Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 45 (1): 93–97
- Fernández H, Revilla MA (2003). *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 73: 1–13
- Guo YD, Cao JG, Dai XL, Wang QX (2014). Gametophyte development and apogamy of the fern *Cheilosoria chusana*. *Bull Bot Res*, 34 (3): 322–327 (in Chinese with English abstract) [郭严冬, 曹建国, 戴锡玲, 王全喜(2014). 舟山碎米蕨配子体发育及无配子生殖. 植物研究, 34 (3): 322–327]
- Guo ZY (2009). Study on gametophytes development and spore propagation of endangered plant *Cibotium barometz* (Linn.) J. Sm. *Seed*, 28 (5): 67–70 (in Chinese with English abstract) [郭治友(2009). 濒危植物金毛狗的配子体发育观察及孢子繁殖研究. 种子, 28 (5): 67–70]

- Jones DL (1987). *Encyclopaedia of Ferns*. Portland: Timber Press
- Kawakami SM, Ito M, Kawakami S (1995). Apogamous sporophyte formation in a fern *Pteris multifida* and its characteristics. *J Plant Res*, 108 (2): 181–184
- Kawakami SM, Ito M, Kawakami S, Kondo K (1997). Induction of apogamy in twelve fern species and the study of their somatic chromosomes. *Chromosome Sci*, 1 (2): 89–95
- Kawakami SM, Kondo K, Kawakami S (1999). Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (Osmundaceae). *Plant Syst Evol*, 216: 325–331
- Li Y, Yu RP, Li H, Li D, Shi L (2012). A review of the development in tissue culture of ornamental ferns. *Acta Horti Sin*, 39 (9): 1839–1848 (in Chinese with English abstract) [李杨, 余蓉培, 李慧, 李东, 石雷(2012). 观赏蕨类植物组织培养研究进展. *园艺学报*, 39 (9): 1839–1848]
- Liu BD, Tan LY (2009). Studies on gametophyte development and spore propagation of *Nephrolepis auriculata* and *N. falcata*. *Acta Horti Sin*, 36 (4): 545–552 (in Chinese with English abstract) [刘保东, 檀龙颜(2009). 肾蕨和镰叶肾蕨配子体发育及孢子繁殖研究. *园艺学报*, 36 (4): 545–552]
- Lu SG (2007). *Pteridology*. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [陆树刚(2007). 蕨类植物学. 北京: 高等教育出版社]
- Martin KP, Sini S, Zhang CL, Slater A, Madhusoodanan PV (2006). Efficient induction of apospory and apogamy *in vitro* in silver fern (*Pityrogramma calomelanos* L.). *Plant Cell Rep*, 25 (12): 1300–1307
- Nayar BK, Kaur S (1971). Gametophytes of homosporous ferns. *Bot Rev*, 37 (3): 295–396
- Qian M, Wang GY, Meng Y, Yang YP (2015). Karyotypes and C-values of two *Plantago* species from the Qinghai-Tibet plateau, China. *Plant Divers Res*, 37 (4): 407–415 (in Chinese with English abstract) [钱敏, 王广艳, 孟盈, 杨永平(2015). 青藏高原二种车前属植物的核型和C-值报道. *植物分类与资源学报*, 37 (4): 407–415]
- Shen J, Li XG, Dai XL, Zhang YY, Cao JG, Wang QX (2009). Development and apogamy of the gametophyte of the fern *Pteris fauriei*. *Bull Bot Res*, 29 (4): 385–390 (in Chinese with English abstract) [沈建, 李新国, 戴锡玲, 张寅莹, 曹建国, 王全喜(2009). 傅氏凤尾蕨配子体发育及其无配子生殖的研究. *植物研究*, 29 (4): 385–390]
- Shi L (2002). *Ornamental Ferns of China*. Beijing: China Forestry Press (in Chinese) [石雷(2002). 观赏蕨类. 北京: 中国林业出版社]
- Takahashi N, Kami C, Ota I, Morita N, Imaichi R (2015). Developmental morphology of the typical cordate gametophyte of a homosporous leptosporangiate fern, *Lygodium japonicum* (Lygodiaceae), focusing on the initial cell behavior of two distinct meristems. *Am J Bot*, 102 (2): 197–207
- Wang XQ, Zhang TT, Meng Z, Dong L (2014). *In vitro* culture of *Dryopteris championnii* (Benth.) C. chr. from spores. *Plant Physiol J*, 50 (2): 159–163 (in Chinese with English abstract) [王晓倩, 张婷婷, 孟卓, 董丽(2014). 阔鳞鳞毛蕨孢子的无菌繁殖. *植物生理学报*, 50 (2): 159–163]
- Wu Q, Yang XW (2009). The constituents of *Cibotium barometz* and their permeability in the human Caco-2 monolayer cell model. *J Ethnopharmacol*, 125 (3): 417–422
- Xing JJ, Sun SH, Meng XL, Liu BD (2012). New observation of morphological characteristics of gametophyte in the endangered fern *Cibotium barometz*. *J Trop Organ*, 3 (4): 357–360 (in Chinese with English abstract) [邢建娇, 孙淑红, 孟宪利, 刘保东(2012). 金毛狗配子体形态学特征的观察. *热带生物学报*, 3 (4): 357–360]
- Zhang GF, Zhai SH, Yang H, Su WH (2009). Influence of light and temperature on spore germination of *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ. *Plant Physiol Commun*, 45 (9): 847–850 (in Chinese with English abstract) [张光飞, 翟书华, 杨慧, 苏文华(2009). 光照和温度对扇蕨孢子萌发的影响. *植物生理学通讯*, 45 (9): 847–850]
- Zhang KM, Shi L, Jiang CD, Li ZY (2008). Allelopathic effects of *Eupatorium adenophorum* on spore germination and gametophyte development in *Cibotium barometz*. *Acta Pratacul Sin*, 17 (2): 19–25 (in Chinese with English abstract) [张开梅, 石雷, 姜闯道, 李振宇(2008). 紫茎泽兰对金毛狗孢子萌发和配子体发育的化感作用. *草业学报*, 17 (2): 19–25]
- Zhang TT, Wang XQ, Gao F, Dong L (2012). *In vitro* culture of *Onoclea sensibilis* L. from spores. *Plant Physiol J*, 48 (11): 1079–1083 (in Chinese with English abstract) [张婷婷, 王晓倩, 高凤, 董丽(2012). 球子蕨孢子的无菌繁殖. *植物生理学报*, 48 (11): 1079–1083]
- Zhang YL, Du HH, Li Y, Li Dong, Ji MC, Jiang CD, Shi L (2009). Studies on the effect of different sterilization procedures, medium, and different light intensity on spore propagation of *Drynaria roosii*. *Acta Horti Sin*, 36 (5): 711–716 (in Chinese with English abstract) [张银丽, 杜红红, 李杨, 李东, 季梦成, 姜闯道, 石雷(2009). 消毒方式, 无机盐浓度及光照强度对槲蕨孢子繁殖的影响. *园艺学报*, 36 (5): 711–716]
- Zhao X, Wu ZX, Zhang Y, Yan YB, He Q, Cao PC, Lei W (2011). Anti-osteoporosis activity of *Cibotium barometz* extract on ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Ethnopharmacol*, 137 (3): 1083–1088

Observation on gametophyte development and apogamy of the endangered fern *Cibotium barometz*

YU Rong-Pei¹, CHENG Xin-Yu², ZHANG Guang-Fei³, LI Han¹, GUI Min^{1,*}

¹National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; ²Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

³Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: *Cibotium barometz* (L.) J. Sm., an important group of the endangered ferns, is listed in the Category II of State Special Protected Plants. In present study, the gametophyte development and apogamy of *Cibotium barometz* were investigated by the sterile culture of spores. The results showed that spores were yellow, tetrahedral and trilete. There were strip ornamentations on the distal surface of spores. The germination type of spores was *Vittaria*-type. The gametophyte development was mainly *Adiantum*-type. Antheridia appeared after about 40 days of spore cultivation. Archegonia appeared later than antheridia. Apogamy of *Cibotium barometz* was facultative, which happened at the apical region of thickened prothallus. Compared with *in vitro* sporophytic plantlet, *in vitro* apogamic plantlet had smaller frond and leaflet, and characters of tripinnate leaf was more significant. Hairs on the stipe of apogamic plantlet were denser and longer. Ploidy of apogamic plantlet was half of sporophytic plantlet.

Key words: *Cibotium barometz*; spore germination; gametophyte development; apogamy

Received 2016-06-28 Accepted 2016-07-25

This work was supported by the Yunnan Foundation Research Projects for Application (Grant No. 2014FD066), Yunnan Science and Technology Program for Public Wellbeing (Grant No. 2014RA053), National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture (Grant No. 2012FU125X10), Innovation Team of Yunnan Academy of Agricultural Sciences (Grant No. 2014CZYY019) and Yunnan Biodiversity Conservation Projects.

*Corresponding author (E-mail: gming-114@163.com).