

引种地芦荟雄性不育的生殖生物学研究

赵红艳

(新乡学院 生命科学技术学院,河南 新乡 453002)

摘要:以引种地库拉索芦荟为试材,通过田间试验和室内分析,综合应用解剖学、光学显微镜、荧光显微技术和石蜡切片技术相结合的方法,从形态学、细胞学、生殖生物学的角度进行研究。结果表明:芦荟花药壁的发育属基本型,完全分化时从外到内的细胞层依次是表皮、药室内壁、中层和绒毡层,其绒毡层属于腺质绒毡层。小孢子母细胞的减数分裂过程中胞质分裂为同时型,形成的小孢子四分体为左右对称型,成熟花粉为二细胞型。小孢子母细胞减数分裂过程出现异常,使小孢子呈现出不同程度的衰败,导致大量败育花粉产生,表现为雄性不育,导致库拉索芦荟雌性不育。

关键词:库拉索芦荟;引种地;形态学;胚胎学;不育

中图分类号:S 682.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0133-04

芦荟(*Aloe vera* L.)属多年生常绿肉质植物,原产于南非^[1],其叶片中含有大量蒽醌类物质,被广泛应用于生物制药、化工产品 & 美容保健等行业,历来倍受大家的关注。然而,一般情况下,芦荟只有少数种可以产生种子,极大多数不能结实,而且种植在引种地(主要是北方地区)的芦荟一般没有种子形成。虽然芦荟属资源丰富,但芦荟在引种地具有高度不育性,难以通过传统的方法进行新品种的培育和遗传改良。芦荟属植物以营养繁殖为主,传统上多用扦插和分株法繁殖,从而造成品质退化,种族衰退,不利于芦荟的开发利用。

目前,有关芦荟不育的相关研究单纯的集中在小孢子减数分裂异常^[2-8]、花粉败育^[9]和自交不亲和方面^[10],对于小孢子的发生和雄配子体发育的形态解剖学方面的研究不多,小孢子的发生和花粉的正常发育是实现受精结实的重要保证,因此,从细胞形态学和胚胎学的角度阐明芦荟雄性不育的机理具有重大意义,进一步为引种地芦荟的繁殖和育种提供科学依据和基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为生长良好、长势均匀、无病虫害的4年生库拉索芦荟(*Aloe vera* L.),取自河南新乡(东经113°50',北纬35°21'),年平均降雨量614.2 mm。

作者简介:赵红艳(1973-),女,河南平顶山人,硕士,讲师,现主要从事药用植物与种质资源等研究工作。E-mail:zhaohongyan92@sohu.com.

基金项目:河南省科技厅重点攻关资助项目(072102270018);河南省教育厅自然科学基金资助项目(2006180016)。

收稿日期:2014-07-21

1.2 试验方法

生长条件为大田种植和盆栽,春、秋季各施复合肥1次,每隔7 d浇水1次,冬季塑料薄膜覆盖和加热器控温10~15℃越冬。

1.3 项目测定

1.3.1 芦荟花期形态学观察 从2013年1月1日开始,每天2次,观察芦荟的开花过程并记录,同时用形态解剖学的方法观察芦荟雌雄蕊的形态特征。

1.3.2 石蜡切片技术 石蜡切片法包括取材、固定、洗涤和脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与粘片、脱蜡、染色、脱水、透明、封片等步骤。

1.3.3 荧光显微镜观察 取处于不同发育程度的新鲜库拉索芦荟花,轻轻取出雄蕊,用镊子将其花药打开,小孢子和花粉顺势撒落于滴有蒸馏水的载玻片上,制成临时装片,在Axioskop40型荧光显微镜观察小孢子和花粉的形态并摄影。

2 结果与分析

2.1 芦荟花期形态学观察结果

从2013年1月12日开始,北方温室栽培的库拉索芦荟,从成年植株近顶端叶片之叶腋处长出绿色的总状花序幼体。2月初开始开花,每个花序上有80~100朵小花,花从花序轴下部向上依次开放,边开边凋谢。每朵小花具有2轮花被,每轮由3个花被片,不分花萼和花冠,属于同被花。花被之内是雄蕊群,由6枚雄蕊组成,间隔排列,一类花丝粗,另一类花丝细。花药形态类似,背着药,花药的开裂方式为纵裂,表面为黑褐色,花粉黄色。随着花期的结束,在花序轴上未曾看到果实和种子。这表明北方引种地的库拉索芦荟不产生种子,是高

度不育的。

2.2 解剖学观察结果

花芽形态分化完成(雄蕊原基形成)后,一般入冬休眠其内部将发育至造孢细胞和胚珠孢原细胞阶段,于翌年春随芽的萌动,茎叶生长的同时继续进行性器官的分化与发育。

2.2.1 小孢子囊的发育 芦荟雄蕊 6 枚,花药一般由 4 个小孢子囊组成。当花药达到成熟时期,每一侧的 2 个小孢子囊往往由于隔壁的消失而连通。每一小孢子囊包含药室和数层细胞组成的药壁。在药室中产生小孢子并继续留在小孢子囊中进一步发育成雄配子体即花粉,因此,小孢子囊与花粉囊这 2 个词可以通用。花药壁的发育:芦荟花药壁的发育属基本型,花药的壁在达到完全分化时期,从外到内的细胞层依次是:表皮、药室内壁、中层和绒毡层。这几层细胞在花药的生长过程中发生着各种变化。小孢子母细胞:小孢子母细胞来源于孢原细胞分裂所形成的初生造孢细胞。初生造孢细胞经几次有丝分裂,形成更多多角形的细胞(即称为次生造孢细胞),观察发现一般入冬前发育到此阶段。于翌年春季,多角形的次生造孢细胞逐渐变为圆形的小孢子母细胞,然后进入减数分裂。花药中的造孢细胞都有可能成为小孢子母细胞和产生小孢子。

2.2.2 小孢子的发生 芦荟小孢子母细胞分裂过程中所发生的胞质分裂属于同时型。芦荟小孢子母细胞正常减数分裂的过程,根据石蜡切片观察,只有极少数小孢子母细胞处于这种正常分裂状态,而极大多数小孢子母细胞在减数分裂过程中出现了异常。在小孢子形成过程中,减数分裂异常引起遗传物质不均衡分配,从而致使产生不同程度的败育小孢子,而且在分裂的早期,这种现象就已经存在(图 1)。小孢子母细胞减数分裂异常是导致败育花粉产生的主要因素,是造成芦荟不育的另一个关键因素。



图 1 小孢子发育时期的呈现不同程度的败育现象(×400)

2.2.3 雄配子体的发育 小孢子是雄配子体的第一个细胞,在被子植物中常常用花粉代表雄配子体,所以当小孢子从四分体释放后即可称之为花粉,但花粉一词更多用于指称 2-细胞或 3-细胞时期的雄配子体,以与小孢

子区别。当芦荟花药达到成熟时,散粉前的花粉粒是 2-细胞型,即有一个营养细胞和一个生殖细胞组成,这说明芦荟花粉的发育是原始的。在 2-细胞花粉中,生殖细胞的有丝分裂过程延续时间较长。通常在花粉粒里生殖核停滞在分裂前期,直至花粉萌发以后,继续在花粉管中完成分裂和形成精子。以上所述是所观察到的库拉索芦荟花粉发育过程一种现象——正常的发育,同时,也观察到另一种很常见的现象——花粉败育。由于小孢子母细胞减数分裂时期出现异常,加之外界因素的干扰,导致了大量花粉以三角形、心形或其它不规则形态出现,逐渐呈现出败育的现象,使成熟的可育花粉少之又少(图 2),最终芦荟表现为高度的雄性不育,这无疑增加了改进芦荟遗传育种措施、培育更为优良的芦荟品种和开发芦荟资源的难度。

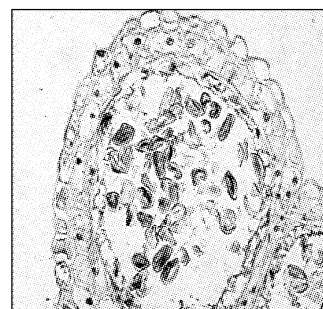


图 2 小孢子母细胞减数分裂接近完成时绒毡层细胞开始分解(×100)

2.3 荧光显微镜观察结果

通过 Axioskop40 型荧光显微镜观察,可以清楚地看到小孢子母细胞呈多边形,细胞体积大,核明显,细胞质中含许多小液泡。同时也观察到小孢子母细胞经减数分裂产生的 4 个一群的单倍体细胞,即小孢子四分体阶段。四分体的 4 个小孢子间有胼胝质壁将其分开,且被共同的母细胞壁包围(图 3)。但也存在发育畸形的小孢子母细胞,就此可以看出芦荟在小孢子母细胞发育时期就已经出现败育。

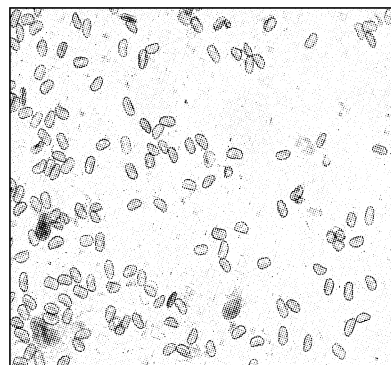


图 3 荧光显微镜观察下的四分体小孢子(×100)

在 Axioskop40 型荧光显微镜下,花粉呈现多种形态,圆球形、长椭圆形、心形、三角形等,都有明显的细胞壁(图 4),并不能看清内部构造,只能从形态上判断出成熟的花粉很少,极大多数是畸形的不育花粉。

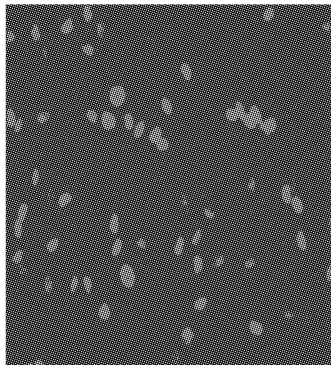


图 4 示荧光显微镜蓝光下花粉形态及其败育现象 ($\times 100$)

3 讨论与结论

通过对库拉索芦荟的胚胎发育进行了研究,结果表明,库拉索芦荟隶属于百合科(Liliaceae)芦荟属(*Aloe*),其胚胎学发育特征基本上与百合科的胚胎学特征相符合。在我国北方引种的芦荟,在大棚或温室保护下能安全越冬,2月初开始开花,总状花序,每个花序上有80~100朵花,花从花序轴下部向上依次开放,边开边凋谢,不产生果实和种子。每朵花具有2轮花被,每轮由3个花被片,不分花萼和花冠,属于同被花。花被之内是雄蕊群,由6枚雄蕊组成,间隔排列,一类花丝粗,另一类花丝细。花药由4个小孢子囊组成,其开裂方式为纵裂。在雄配子体发育过程中,小孢子母细胞的减数分裂过程中胞质分裂为同时型,形成的小孢子四分体为左右对称型,成熟花粉为二细胞型。同时,小孢子母细胞减数分裂过程出现异常,使小孢子呈现出不同程度的衰败,导致大量败育花粉产生,表现为雄性不育。

人工授粉和植物生长调节剂处理结果显示,自授粉后持续观察直至花凋谢,花序轴枯干,也未见有果实和种子产生。说明导致库拉索芦荟的不育是发生在受精之前,也就是说,导致其败育的关键是雌雄配子体的发育是否正常。因而,无论是人工授粉,还是植物生长调节剂处理,对于败育的库拉索芦荟来说都不能发挥其应有的作用。

目前对于雄性不育或雄蕊败育的研究仍以细胞、胚胎学观察为主,在分子机理方面的研究尚不多见,由于小孢子的发生和雄配子体发育的复杂性,又使得雄性不育机制的研究报道较少。该试验以此为切入点,从细胞学、胚胎学的角度探讨了库拉索芦荟雄性不育的原因,即芦荟没有发育形成功能性的雄配子体。从库拉索

芦荟雄配子体发育过程中,可以观察到芦荟花药壁的发育属基本型,完全分化时从外到内的细胞层依次是:表皮、药室内壁、中层和绒毡层,其绒毡层属于腺质绒毡层。小孢子母细胞的减数分裂过程中胞质分裂为同时型,形成的小孢子四分体为左右对称型。成熟花粉为二细胞型。但是,形成成熟的花粉,但其概率很小,很大程度上形成的都是败育的花粉,是芦荟不育的重要因素。在不正常的环境条件,或是由于遗传上的原因,都能发生花粉败育或雄性不育的现象。温度、水分等环境因素对花粉的败育有密切的关系。小孢子在减数分裂是对环境条件特别敏感,干旱也可影响花粉的正常发育,在土壤水分不足时,其减数分裂会受到阻碍。在缺水情况下主要影响到细胞质的粘性增高,而妨碍了减数分裂的正常进行。

综上所述,该文从库拉索芦荟小孢子发生和雄配子体发育的胚胎学过程讨论了芦荟花粉不育的原因,然而影响花粉发育的因素是多方面的、综合的,要全面探究芦荟花粉高度不育的原因,还需要从芦荟绒毡层发育对花粉育性的影响,小孢子发育过程中胼胝质壁、淀粉粒、细胞器的动态变化等^[1]方面分析;从基因角度研究,直接从DNA入手分离核不育基因和胞质不育基因,通过分析基因的序列结构与功能,揭示芦荟雄性不育分子机理;从发育生物学角度出发,研究雄性不育基因在个体发育和系统发育中的功能与作用,阐明雄性不育发生的分子机制。

参考文献

- [1] Gilbert M G, Demissew S. Notes on the genus *Aloe* in Ethiopia; misinterpreted taxa[J]. Kew-Bull, 1992, 47(4): 647-653.
- [2] 梁秀梅, 卜秀玲. 开普芦荟和木立芦荟的染色体核型分析[J]. 植物研究, 2001, 21(1): 84-87.
- [3] 王永中, 沈淑瑜. 中国芦荟染色体核型分析[J]. 生物学杂志, 1998, 15(5): 42-43.
- [4] 李爱华, 鲁坤存, 陈灿. 沅江芦荟染色体核型和 Giemsa C-带带型[J]. 生物学杂志, 2003, 20(4): 24-25.
- [5] 丁为群, 张孜孜, 王爱红. 三种芦荟的区别及其遗传差异[J]. 安徽技术师范学院学报, 2002, 16(2): 8-12.
- [6] 曲春香, 沈颂东, 孟祥勋, 等. 木立芦荟的试管快速繁殖及核型分析[J]. 江苏农业科学, 2002(4): 54-55.
- [7] 纪春燕, 马玉心, 崔大练. 芦荟属四种植物染色体核型研究[J]. 中国林副特产, 2002(3): 15-16.
- [8] Brandham P E. Meiotic crossing-over between sites on opposite sides of the centromeres of homoeologues is frequent in hybrid *Aloeaceae* [J]. Genome, 1990, 33: 170-176.
- [9] 吕琳, 何聪芬, 董银卯, 等. 木立芦荟小孢子母细胞减数分裂与花粉育性关系的初步研究[J]. 遗传, 2005, 27(3): 429-434.
- [10] Spare A B. Meiosis and pollen mitosis in *Aloe barbadensis* Mill [J]. Cyrologia, 1975, 40: 525-533.
- [11] 吕世友, 李彦舫, 林金星, 等. 花粉发育的研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(3): 340-346.

逆境胁迫下罗布麻生理响应研究

王 雷, 黄 国 庆, 李 瑶, 吴 琼, 王 东 凯, 曹 涤 非

(黑龙江省科学院 高技术研究院, 黑龙江 哈尔滨 150020)

摘 要:以罗布麻为试材,研究了盐碱、干旱和低温条件下,不同胁迫时期罗布麻过氧化物酶(POD)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量的变化情况。结果表明:盐碱、干旱、低温条件下,罗布麻 POD 活性表现出先升高后降低的趋势。盐碱、干旱条件下,罗布麻 SOD 活性呈现先升高后下降的趋势;在低温胁迫条件下,随着胁迫时间的延长,罗布麻 SOD 活性先下降后上升。盐碱胁迫条件下,罗布麻 MDA 含量均高于对照;干旱和低温胁迫条件下,除在干旱胁迫后的 24 h 和低温 48 h 罗布麻 MDA 含量极显著地高于对照外,其余时间点罗布麻 MDA 含量均低于对照。综上结果表明,罗布麻对盐碱、干旱、低温胁迫的响应存在差异,盐碱胁迫对罗布麻的伤害最大,造成抗氧化酶活性减弱,活性氧清除能力下降,细胞膜被破坏。

关键词:罗布麻;抗逆性;逆境胁迫;生理响应

中图分类号:S 563.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0136-03

罗布麻(*Apocynum venetum* L.)属夹竹桃科罗布麻属多年生宿根亚灌木植物,又称野麻、泽漆麻、茶叶花、红麻等,主要分布在新疆、青海、甘肃、宁夏、山东等省区^[1]。罗布麻对环境要求不严,抗逆性强,大量成片地分布于盐碱、沙荒、河滩地上,耐寒、耐旱、耐盐碱、耐风沙,适于多种气候和土质^[2-3]。另外,罗布麻纤维细长、柔

软、有光泽、抗拉力强,素有“野生纤维之王”的美誉^[4-5];罗布麻有很高的药用价值,其根、茎、叶、花均可入药,罗布麻叶含芸香甙、槲皮素等多种成分,有防治感冒、镇咳、降血压、降血脂、抗炎、抗过敏等功效^[6-7]。关于罗布麻植物生理学的研究,多见盐碱胁迫下对罗布麻种子萌发^[8-9]、幼苗生长影响^[10]的研究,但干旱、低温条件下,对罗布麻幼苗的氧化胁迫影响研究相对较少。该研究通过对盐碱、干旱、低温胁迫条件下,罗布麻幼苗在不同胁迫时期 POD 活性、SOD 活性、MDA 含量的测定,对罗布麻逆境胁迫下的生理响应机制进行了初步探讨,以期对罗布麻在盐碱地治理上的应用提供理论依据和参考。

第一作者简介:王雷(1980-),女,博士,副研究员,现主要从事植物抗逆生理和分子生物学等研究工作。E-mail:wleileyu@163.com.

基金项目:黑龙江省青年科学基金资助项目(QC2011C115);黑龙江省科学院春苗专项资助项目(CM12H01)。

收稿日期:2014-07-14

Research on Reproductive Biology of Aloe Male Sterility in Introduction Area

ZHAO Hong-yan

(College of Life Science and Biotechnology, Xinxiang University, Xinxiang, Henan 453002)

Abstract: Taking *Aloe vera* L. as test material, integrated application anatomy, optical microscopy, fluorescence microscopy and paraffin method of combining technology, morphology, cytology, reproductive biology study of the angle through field trials and laboratory analysis were studied. The results showed that the aloe anther wall's growth was fundamental style, the cellular layer when differentiated completely from outside to inside was in turn: the epidermis, the endothecium, the middle layer and the tapetum, its tapetum was glandular. For the development of male gametophyte, in microspore mother cell meiosis, the cytoplasm division was of simultaneous types and procreant microsporocyte tetrad was eudipleural. The mature anthers belonged to a two-cell type. At the same time, pollen mother cells in the process of meiosis occurred abnormality, showed a small spore were different degree of abortion, resulted in a large number of abortion pollen, for the performance of male sterility.

Keywords: *Aloe vera* L.; introduction area; morphology; embryology; sterility