

海菜花小孢子发生及雄配子体发育的研究

翟书华, 殷根深, 董晓琼, 侯思名, 杨晓虹

(昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

摘 要:以我国特有珍稀濒危水生植物海菜花为试材,采用石蜡切片法对海菜花的小孢子发生及雄配子体的发育过程进行了解剖学研究,以探讨其繁殖生物学特性。结果表明:海菜花雄花内含 9~12 枚雄蕊,每个花药有 4 个花粉囊,花药横切面呈蝴蝶型、哑铃状或不规则等多种形态,花粉壁完全分化时由外到内依次分为表皮、药室内壁、中层与绒毡层。小孢子母细胞减数分裂属连续型,四分体属左右对称型,偶见四面体型。观察到存在小孢子母细胞在减数分裂过程中出现微核、染色体落后、搭桥等异常现象,说明小孢子母细胞减数分裂异常是导致花粉败育的一个主要原因,影响海菜花的繁殖,成为海菜花数量不断减少而濒危的原因之一。

关键词:海菜花;小孢子;雄配子体;异常现象

中图分类号:S 645.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0099-06

海菜花 (*Ottelia acuminata* (Gagnep.) Dandy) 属水鳖科 (Hydrocharitaceae) 海菜花属,是我国特有的濒危水生植物,主要分布于广西、云南、四川、湖南、广东和贵州等省^[1],生长于湖泊、河流、鱼塘、池塘、沟渠和深水田中。海菜花具有观赏、食用、净化水质、水质监测、饵料、药用、单子叶植物系统演化研究等方面的价值^[2]。根据课题组 20 余年来的野外调查和栽培观察,其生长环境由于水体污染、干旱、水位下降、人类的过度采摘及自身适应等原因,导致海菜花的数量急剧下降而濒危。

植物传粉与花的颜色、花的结构特征、花粉数量、花粉化学成分及其对生长环境的适应等密切相关。海菜花为大型沉水草本植物,多为单性异株,雄花中通常有退化雌蕊,雌花中多有退化雄

蕊,传粉常为水媒传粉。目前对海菜花在营养成分、形态学、分子生物学研究等方面做了一些研究报道^[3-9],但是对海菜花的小孢子发育、雄配子体的形成等方面的研究尚鲜见报道。该研究进行了海菜花的雄花形态解剖,通过观察海菜花小孢子发生和雄配子体的发育过程,以期为海菜花属植物的繁殖生物学和传粉生物学提供参考依据,为海菜花属植物在水鳖科中的分类地位及亲缘关系提供胚胎学资料,为该种植物的栽培、引种驯化及保育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料海菜花采自云南省鹤庆县黑龙潭 (No.: HQH-1, 东经 100°10'04.4", 北纬 26°35'40.0", 海拔 2 192 m) 和剑川县金华乡格美江 (No.: JCJ-1, 东经 96°56'59.0", 北纬 26°31'13.4", 海拔 2 140 m)。

1.2 试验方法

试验于 2015 年 5 月在昆明学院植物学实验室进行。将海菜花装入写好标签的密封袋中,保持植株一直浸于水中,带回实验室后栽培于含自配

第一作者简介:翟书华(1963-),男,教授,现主要从事资源植物学与生理生态学教学和研究等工作。E-mail: 937701466@qq.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360065);云南省应用基础研究基金资助项目(2010ZC165);云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室资助项目。

收稿日期:2017-03-31

营养土(3份沙:6份红壤土:1份腐殖质土:微量有机肥)花盆中,将其沉入玻璃缸(长100 cm,宽50 cm,高60 cm)中养殖,每缸放置8~10盆,写好标签挂在花盆上。根据气温的变化,气温在25~30℃时15~20 d换一次水;25℃以下时,25 d换一次水。根据玻璃缸里水量和水质的情况进行加水、换水、施肥、打捞藻类、清除螺类和换土等管理。待花期时采摘雄花花葶,清洗后放入1 000 mL广口玻璃瓶中,FAA固定后置于4℃冰箱中保存。按其花蕾中的雄蕊由内向外发育成熟的顺序,即花柄长短及花蕾大小近乎一致分为10组(图1),分装于大小不同玻璃瓶中,对同一个样品的材料分别采用铁钒-苏木精整体染色、番红-固绿对染、改良石炭酸品红染色等方法,常规石蜡制片,切片厚度8~12 μm,制片后在莱卡数码显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 雄花的结构及退化的雌蕊

海菜花为单性花,雌雄异株,雄株形成佛焰花序,常10~50朵簇生,据课题组10多年的观察,海菜花在15~25℃气温适宜时可常年开花。雄花花萼3枚,绿色,花瓣3片,上部白色,基部黄色或浅黄色(图2a),雄蕊9~12枚,2轮,内轮较外轮长,每枚雄蕊由花丝和花药组成,花丝扁平,花药具有4个花粉囊,花药成熟时常纵裂。在其中央处有凸起的雌蕊退化痕迹(图2b~c),随着雄蕊发育,凸起结构顶端分裂为3个柱状结构,直至雄蕊成熟也无明显发育变化,雌花中也有退化雄蕊(图2d),由此推测海菜花的单性花可能是由两性花演化而来的。

2.2 花药壁的发育

在花芽不断发育和分化的过程中,花芽内产生的雄蕊原基逐渐形成雄蕊。花药原基的分生组织细胞在4个角隅处的细胞较快分裂,使花药具有近四棱的外形。进一步发育时,原表皮进行垂周分裂,发育成表皮,包围整个花药。在每棱的表皮下出现一个或多个体积较大、核较大、细胞质较浓的细胞为孢原细胞。孢原细胞进行分裂分化形成造孢组织和初生壁细胞,初生造孢细胞分化发育成小孢子母细胞。在小孢子母细胞发生减数分裂时,药壁已基本发育成形,从外到内依次为表皮、药室内壁、中层和绒毡层(图3),由此判断海

菜花的花药壁发育类型为单子叶型。此时,各细胞层之间紧密接触,绒毡层与小孢子母细胞连在一起;小孢子前期分裂结束后,绒毡层与花药壁开始分离;当分裂到四分体时期,绒毡层与花药壁有明显的间隙;当雄配子体形成时,绒毡层与中层溶解消失;在散粉时,2个相连花粉囊之间的细胞逐渐溶解消失,形成一体。在花药中部的细胞进行分裂、分化形成花药的药隔和维管束。

2.3 小孢子的发生

海菜花在雄蕊原基发育为雄蕊后,基部分化发育形成花丝,顶部形成花药,花药的4个角隅细胞分化为孢原细胞,孢原细胞平周分裂分化形成造孢细胞。造孢细胞进一步发育为近球形的小孢子母细胞,小孢子母细胞形态与周围的药壁细胞显著不同,主要表现为体积较大,细胞核较大,细胞质浓厚,无明显液泡(图4a)。小孢子母细胞经过减数分裂形成四分体是个连续分裂的过程,经减数分裂Ⅰ和减数分裂Ⅱ2个时期。减数分裂时前期Ⅰ包含有细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期5个时期(图4b~f);中期Ⅰ染色体排列在细胞赤道板上(图4g);后期Ⅰ染色体在纺锤丝的作用下,分别移向细胞两极(图4h);末期Ⅰ形成2个子核(图4i)。随后细胞发生胞质分裂,在细胞中部形成的细胞壁将2个子核分隔开产生二分体(见图4j),当二分体形成后,紧接着开始进入减数分裂Ⅱ时期,经前期Ⅱ、中期Ⅱ、后期Ⅱ、末期Ⅱ4个分裂时期(图4k~n),分裂形成4个单倍性的小孢子即四分体(图4o~p),小孢子是雄配子体的第1个细胞。

2.4 雄配子体的形成

从四分体释放(图5a)出来的小孢子由扁平状逐渐发育为圆形,核较大,位于细胞中央,细胞质浓,外壁越来越明显,萌发沟清晰可见(图5b),随着小孢子体积的增大,细胞核从中央移到细胞的一侧,形成单核靠边期(图5c)。随后经过有丝分裂形成一个较大的营养细胞和一个稍小的生殖细胞(图5d),生殖细胞核大,核仁明显。随着二细胞发育分化,生殖细胞和营养细胞间的细胞壁消失,形成2-胞花粉粒,花粉为圆球形(图5e)。

2.5 减数分裂的异常现象

试验发现海菜花小孢子母细胞在减数分裂过程中存在不均等分离、染色体桥(图6a)、染色体落

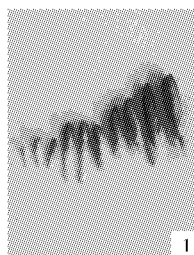
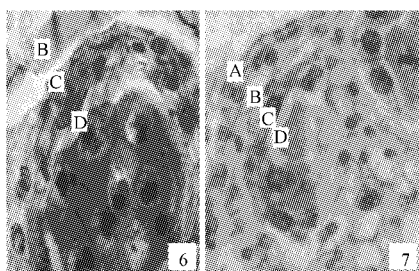


图 1 雄花花序发育顺序

Fig. 1 Male flower development ordinal

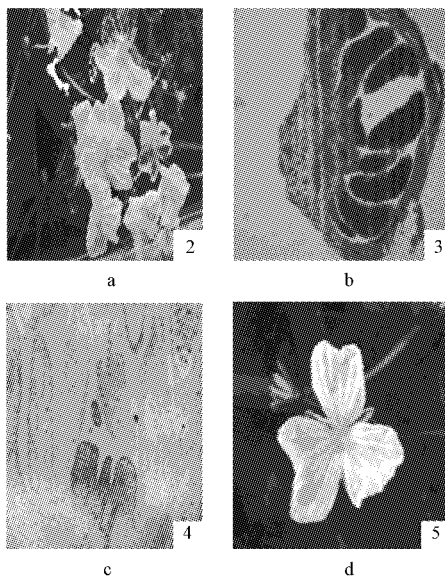


注:A.表皮;B.药室内壁;C.中层;D.绒毡层(100×)。

Note: A. Cuticular layer; B. Endothecium; C. Middle layer; D. Tapetum(100×).

图 3 花药壁发育

Fig. 3 Development of anther wall

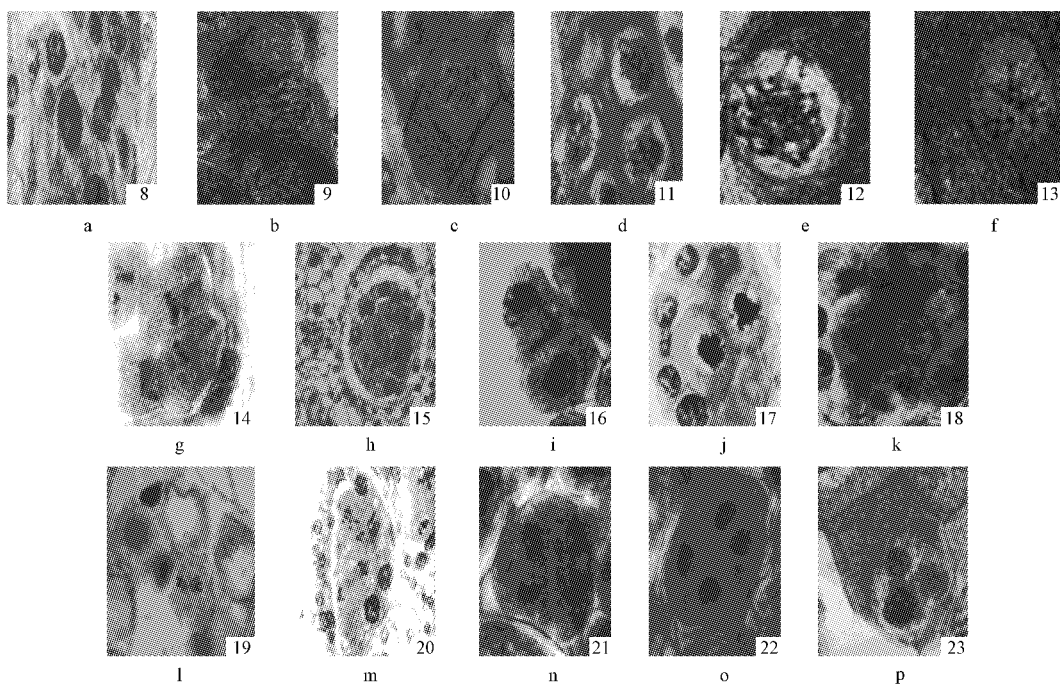


注:a.海菜花雄花植株;b~c.雄花纵切中央凸起为退化雌蕊(40×);d.雌花中的退化雄蕊。

Note: a. Male flower of *Ottelia acuminata*; b~c. Male flowers slitting and central bulge as pistillode(40×); d. Stamens in female flower.

图 2 花的结构

Fig. 2 Structure of flower

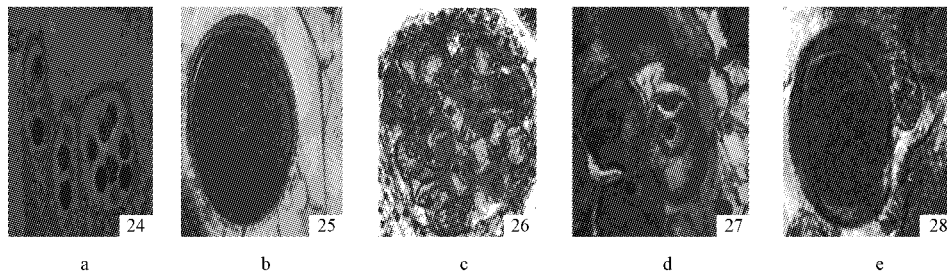


注:a.小孢子母细胞(400×);b.细线期(400×);c.偶线期(400×);d.粗线期(400×);e.双线期(400×);f.终变期(400×);g.中期Ⅰ(400×);h.后期Ⅰ(400×);i.末期Ⅰ(400×);j.二分体(400×);k.前期Ⅱ(400×);l.中期Ⅱ(400×);m.后期Ⅱ(400×);n.末期Ⅱ(400×);o.左右对称型四分体(400×);p.四面体型四分体(400×)。

Note: a. Microsporocyte(400×); b. Leptotene(400×); c. Zygotene(400×); d. Pachytene(400×); e. Diplotene(400×); f. Diakinesis(400×); g. Metaphase I (400×); h. Anaphase I (400×); i. Teloaphase I (400×); j. Dyad(400×); k. Prophase II (400×); l. Metaphase II (400×); m. Anaphase II (400×); n. Teloaphase II; o. Tetrad stage(isobilateral, 400×); p. Tetrad stage (tetrahedral, 400×).

图 4 小孢子发生时期

Fig. 4 Microspore occurring period

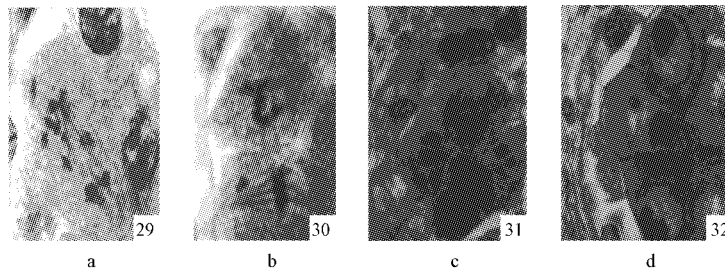


注:a. 释放的小孢子(400×);b. 具萌发沟的单核花粉粒(400×);c. 单核靠边期(100×);d. 二核花粉粒(生殖细胞和营养细胞, 400×);e. 三核花粉粒(400×)。

a. Microspore having shedded from tetrad stage(400×);b. Germination ditch of nuclei(400×);c. Late-uninucleate stage(100×);d. Two-nuclei stage(reproductive cells and nutrition cells, 400×);e. 3-nucleipollen grain (400×).

图5 雄配子体形成

Fig. 5 Formation of male gametophyte



注:a. 不均等分离、染色体桥(400×);b. 染色体落后(400×);c~d. 微核(400×)。

Note: a. Unequal separation and chromosome bridges(400×);b. Lagging chromosomes(400×);c—d. Micronuclei(400×).

图6 减数分裂异常现象

Fig. 6 Abnormal phenomena of meiosis

后(图 6b)及微核(图 6c~d)等异常现象。通过观察 50 个视野,1 500 个细胞,异常现象发生率约 11.50%;有些小孢子在发育至单核期时,细胞质出现萎缩现象,与花粉内壁发生分离,有点类似质壁分离现象。后随着雄配子的分裂,该类细胞的细胞核、细胞质全部解体消失,形成无任何内含物的空粒花粉粒。待到快要散粉时,此类细胞的细胞壁已经消失不见,只留下一个球状的残骸。

2.6 成熟花粉粒花粉管萌发

在切片观察的过程中发现个别花粉粒在花粉囊中已有花粉管(图 7)形成。花粉管与细胞壁连成一体,呈弯沟状,表明花粉粒的成熟时间差异较大。

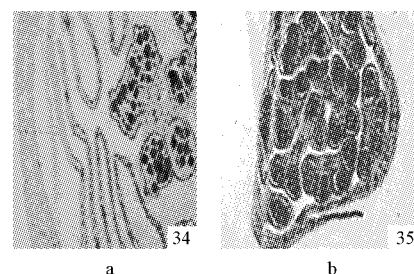
2.7 花粉囊的形状

海菜花每个花药有 4 个花粉囊,花药横切面有蝴蝶型、哑铃状、不规则等多种形态(图 8),药壁结构从外到内依次为表皮、药室内壁、中层和绒毡层。四分体的排列方式为对称形和四面体型,胞质分裂为连续型,与“连续型存在于大多数单子



图7 花粉管萌发(400×)

Fig. 7 Pollen tubes germination(400×)



注:a. 蝴蝶型花粉囊(100×);b. 多种形状的花粉囊(100×)。

Note: a. Butterfly pollen sacs(100×);b. Variety of pollen sacs(100×).

图8 花粉囊形状

Fig. 8 Pollen sacs shape

叶植物中,而同时型常出现在双子叶植物中”相符^[10]。海菜花的花粉粒以 2-胞花粉粒为主,少数为单核花粉粒和 3-胞花粉粒。

3 讨论

海菜花在减数分裂过程中存在不均等分裂,形成微核,染色体落后、凝缩和拖延等异常现象,在这些异常现象中出现微核的频率最高,为 32.1%。正常生物的减数分裂过程受一系列基因精确地控制,其中任何一个基因发生突变,将使减数分裂过程出现异常,产生遗传变异^[11]。另一方面,在花粉囊中产生一定数量的无核花粉粒,造成不育,导致无核花粉粒的原因有很多,花粉母细胞不正常减数分裂会引起空粒花粉粒的产生^[12]。这些异常现象成为自然授粉结实率不高的主要原因。

成熟花粉的萌发一般是以萌发孔突出花粉管为标志,而且必须具备合适的外界环境(如花粉与柱头的识别作用、湿度、温度等)^[13]。海菜花属于沉水植物,由于传粉必须在水面完成,开花到结实的过程通常较短,因此推测花粉管的提前萌发可能是海菜花适应环境的生殖需要。

海菜花在生存环境的不断变化下,为了保证自身的生存繁衍,其会随着环境的改变而改变植物自身的形态结构,如植株高度,叶形的多样性变化,尤其是总花梗的螺旋状结构,像弹簧一样不会受水体高度的变化产生折断,导致生殖器官数量的减少而影响生殖。在海菜花雄花解剖观察中,发现雄花中有雌蕊退化痕迹,其随着花蕾的发育成熟而逐渐发育成约 4 mm 的顶端三裂的柔软圆柱状结构,但基部无子房结构,因此可以推测海菜

花在雄花中发现雌蕊退化痕迹对于研究植物由两性花演化为单性花的系统发育提供胚胎学资料。

参考文献

- [1] 孙祥钟. 中国植物志:第 8 卷[M]. 北京:科学出版社,1992:160.
- [2] 翟书华,郭庆,樊传章,等. 珍稀濒危植物路南海菜花的生物学特性及保护研究[J]. 北方园艺,2012(8):81-83.
- [3] ZHANG H Y, TIAN K, YU Y, et al. Genetic diversity among natural populations of *Ottelia acuminata* (Gaghep.) Dandy revealed by ISSR[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 22(8):6089-6093.
- [4] LONG C, JIANG Z, DAO Z. Research genetic diversity of *Ottelia acuminata* (Hydrocharitaceae) from the Eastern Himalayas, revealed by ISSR Markers[J]. Botanica Orientalis Journal of Plant Science, 2011(7):56-63.
- [5] XU C, DU Z Y, CHEN J M, et al. Microsatellite primers for the endangered aquatic herb, *Ottelia acuminata* (Hydrocharitaceae)[J]. American Journal of Botany, 2012, 99(6):262-264.
- [6] 李原,杨君兴,崔桂华,等. 海菜花营养成分初步分析[J]. 营养学报, 2009, 31(1):96.
- [7] 张中原,周存宇,曹特,等. 底泥和水深对海菜花生长的影响[J]. 长江蔬菜, 2016(4):68-70.
- [8] 翟书华,王斌,王定康,等. 路南海菜花的核型分析及其海菜花属的演化探讨[J]. 湖泊科学, 2010, 22(5):735-738.
- [9] 郭庆,翟书华,熊继会,等. 嵩明海菜花的核型分析[J]. 北方园艺, 2012(2):121-124.
- [10] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2005.
- [11] KAUL M L, MURTHY T G. Mutant genes affecting higher plant meiosis[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 70(5):449.
- [12] 罗来水,肖德兴,霍光华,等. 新白凤桃花粉的发生和发育[J]. 江西农业大学学报, 1998, 20(4):448-451.
- [13] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京:人民教育出版社, 1982:216-224.

Microspores Development and Male Gametophytes Formation of *Ottelia acuminata*

ZHAI Shuhua, YIN Genshen, DONG Xiaoqiong, HOU Siming, YANG Xiaohong

(Life Science & Technology Department, Kunming University, Yunnan, Kunming 650214)

Abstract: *Ottelia acuminata* of the specific rare and endangered aquatic plant in China was used as material, on the growth of microspore mother cells and development of male gametophyte was carried out to explore its reproductive biological characteristics by using paraffin-cut section method. The

多歧苏铁对高温和聚乙二醇处理的生理响应

郑艳玲

(西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘 要:以多歧苏铁离体叶片为试材,研究了高温(25、35、45、55 ℃)和聚乙二醇(PEG)处理(0、0.05、0.10、0.15、0.20 g · mL⁻¹)对多歧苏铁生理指标的影响,以期了解多歧苏铁的抗逆机理及生态适应策略。结果表明:各温度处理间丙二醛含量无显著差异;45 ℃处理后的过氧化氢酶(CAT)活性显著高于其它温度处理;与 25 ℃处理相比较,35、45、55 ℃处理后的过氧化物酶(POD)活性显著下降,超氧化物歧化酶(SOD)活性显著升高;45 ℃和 55 ℃处理后可溶性糖含量显著升高,但各温度处理间脯氨酸含量无显著差异。各浓度 PEG 处理间,色素含量及组成、Fv/Fm、丙二醛和脯氨酸含量及抗氧化酶(CAT、POD、SOD)活性均无显著差异,但 0.10 g · mL⁻¹和 0.15 g · mL⁻¹ PEG 处理后的可溶性糖含量较其它浓度 PEG 处理后的显著提高。综上所述,多歧苏铁对高温具有一定耐受性,其中,可溶性糖和抗氧化酶(CAT、SOD)在渗透调节和抗氧化胁迫中起了一定作用。同时,所试 PEG 浓度并未引起多歧苏铁明显生理变化,该种可能具有较强的耐旱性。

关键词:多歧苏铁;高温;PEG 处理

中图分类号:S 687.901 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0104-06

现代苏铁类植物有 11 属约 290 种,主要分布在热带和亚热带地区。我国仅有苏铁属(*Cycas*)

作者简介:郑艳玲(1981-),女,博士,讲师,现主要从事植物种质资源保育及利用的教学与科研等工作。E-mail: flashingzyl@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31560093)。

收稿日期:2017-04-11

1 属,且是该属植物的多样性分布中心。中国分布的有 20 多个种,其中云南分布的苏铁属植物占全国的一半左右^[1]。多歧苏铁(*Cycas multipinnata*)属于叉叶类苏铁,是苏铁属植物中最进化的典型^[2],分布于云南东南部及越南北部。该种具有极高的研究和观赏价值,但由于人为采挖和栖息地破坏等因素,现存种群正面临灭绝的威胁。

results showed that 9—12 stamens might exist in one female flower, 4 pollen sacs in each anther, with different shapes as butterfly, dumbbell, even anomalous formation occurring in its transection. In this experiment it was also elucidated that pollen wall differentiated successively into 4 layers of epidermis, endothelium, middle layer and tapetum, and the type of meiosis for its microspore mother cells belonged to continuous one; tetrads to symmetrical one with tetrahedral type occasionally. Besides, such abnormal phenomenon of microspore mother cells as micronuclei, chromosomes lagging and chromosome bridges was observed in its process of meiosis, suggesting that abnormal meiosis of microspore mother cells was the main reason for pollen abortion, which affected its reproduction of *Ottelia acuminata*, and thus became one of the main factors causing a decrease of its quantity and being endangered for *Ottelia acuminata*.

Keywords: *Ottelia acuminata*; microspore; male gametophyte; abnormality