

3 种牡丹雄配子体发育的比较研究

魏乐^{1,2,3}, 张怀刚¹ (1.中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049; 3.青海师范大学生命与地理科学学院, 青海西宁 810008)

摘要 [目的]为芍药科牡丹的引种栽培、遗传育种和物种生物学研究提供全面的资料。[方法]光镜下观察分属于芍药科 3 个种的 7 个牡丹品种的雄配子体发育过程, 并进行比较研究, 探讨异型花粉与各品种结实率的关系。[结果] 7 个品种普遍存在二型性花粉的现象, 在花粉群体中有一小部分花粉普遍表现为体积小, 细胞质稀薄, 发育迟缓, 且大部分将停滞发育, 但仍有极少数在体内沿着孢子体途径发育到 3 核水平。小孢子四分体的排列方式除正常的正四面体形, 所有品种中均存在少数排列为左右对称的四分体和减数分裂及小孢子发育不同步的现象。异常花粉的发生率表现出明显的种间差异及品种间分化, 而各品种能育花粉的数量与种子结实率并不完全成正比。[结论]减数分裂不同步及异常是导致异常花粉形成的主要原因, 异型花粉是导致结实率低的原因之一。

关键词 木质牡丹; 发育; 雄配子体

中图分类号 S685.11 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)02-00509-03

Comparative Study on the Development of Male Gametes of 3 Peonies Species

WEI Le et al. (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract [Objective] The purpose was to supply all-around data for introduction and cultivation, heredity and breeding and species biology researches of peony, peony family. [Method] Under light microscope, the gametes development courses of 7 peony varieties belonging to 3 species of peony families were observed and were compared to discuss the relationship between heterotype pollen and fruiting rate of each variety. [Result] Seven varieties had dimorphic pollen generally. In pollen population, a fraction of pollens generally showed to be small in volume, thin in cytoplasm, and slow in development, most of which would stagnate development, but very few pollens developed to 3-nucleus level along sporophyte approach in body yet. The arrangement mode of sporule tetrads had a few tetrads arranging bilateral symmetrically except for normal regular tetrahedron shape and there were unsynchronized phenomena of meiosis and sporule development in all the varieties. The occurrence rate of abnormal pollen showed obvious difference in interspecies and differentiation among varieties, but the fertile pollen quantities of various varieties had incompletely direct ratio to fruiting rates of seeds. [Conclusion] Unsynchronized and abnormal meiosis was the main reason causing the formation of abnormal pollen and heterotype pollen was one of reasons inducing low fruiting rate.

Key words Woody peony; Development; Male gametes

由于牡丹是兼性营养繁殖, 遗传性复杂多样, 再加上人为的选育栽培, 到目前为止, 还没有一个为多数人所公认的分类系统, 类群间的亲缘关系还很不清楚, 同时其生殖生物学方面的研究还有许多空白。笔者以杨山牡丹等 3 个种的 7 个栽培品种为材料, 以其雄花的雄配子体发育过程为中心进行比较研究, 旨在为芍药科牡丹组的引种栽培、遗传育种以及芍药的系统发育和牡丹的物种生物学研究提供更全面的资料。

1 材料与方

研究用材料均于 1999 年 3 月 7 日至 5 月 13 日采自甘肃省榆中县和平牡丹园的栽培地中。所选的 7 个品种分属于 3 个种, 其中冰山雪莲、红莲、书生捧墨、金波荡漾 4 品种归类于紫斑牡丹 (*Paeonia rockii*); 山花烂漫和赵粉是栽培牡丹中的中原栽培亚种, 表现出矮牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 的基本特征; 凤丹隶属于杨山牡丹 (*Paeonia ostii*)。

不同发育时期的花蕾或花药用 FAA 或卡诺固定, 经爱氏苏木精整体染色 3~5 d 后, 冲洗, 用浓度 1% 氨水反蓝, 再经常规乙醇脱水, 石蜡包埋。切片厚度 7~12 μm , 然后脱蜡、分色、中性树脂封片。在 Olympus-BH₂ 型显微镜下观察并照相。于 1999 年 7~8 月间, 各品种选取 20 朵花, 根据每朵花萼管果内成熟种子数目与败育的胚珠数目计算每一品种的结实率。并按 3 种内各品种结实率的平均数求得 3 种牡丹的结实率。

2 结果与分析

2.1 7 品种牡丹雄配子体发育的共同特征

2.1.1 单核小孢子早期。四分体中的小孢子体积较小, 一般呈椭圆形或近圆形, 核大位于细胞中央, 细胞质较为浓厚 (图 1)。当四分体外面的胼胝质壁溶解消失时, 小孢子即被释放在花粉囊腔内, 随即转变为圆球形, 体积开始增大, 进入单核早期。最初单核小孢子细胞壁薄, 随后花粉壁和 3 个萌发孔形成; 细胞质中出现许多小液泡并逐渐变得越来越明显, 使细胞质变得稀薄; 细胞核较大而染色深, 位于细胞的近中央 (图 2-A)。

2.1.2 单核小孢子晚期。随着细胞体积的增大, 中央大液泡形成, 细胞核逐渐向边缘移动, 形成单核靠边期 (小孢子单核晚期) (图 2-B)。此时细胞质围绕着花粉壁的周围呈一薄层分布, 逐渐增厚, 并进行着必要的物质合成, 为即将来临的有丝分裂做着充分准备。小孢子不同的遗传潜势在这一时期相继表现, 正常和异常花粉在形态上发生分化, 出现各自不同的形态特征, 预示着它们将具有不同的发育前途。

2.1.3 有丝分裂期。单核在贴近细胞壁的边缘行有丝分裂, 形成一个营养核和一个生殖核 (图 3)。接着细胞质分裂, 两核之间产生细胞板, 进而形成细胞壁, 分隔成小瓶状的生殖细胞, 并游离于大营养细胞的细胞质中。分隔生殖细胞与营养细胞的弧形细胞壁 (生殖细胞壁) 的形成, 标志着花粉第一次有丝分裂的结束, 花粉发育进入了 2-细胞阶段。

2.1.4 2-细胞花粉早期。单核小孢子有丝分裂刚形成的两个子核均为圆形, 大小和染色都比较近似。继续发育, 生殖核的染色质浓缩, 显示出两核的明显分化, 结果生殖细胞要比营养细胞小得多, 它以生殖细胞壁与营养细胞相隔, 紧贴

作者简介 魏乐 (1964-), 女, 陕西西安人, 副教授, 从事花卉育种研究。
致谢 本研究蒙廉永善教授和李嘉珏、刘健全研究员指导, 谨致谢意。
收稿日期 2007-09-03

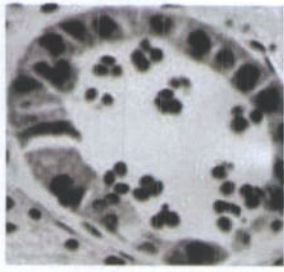
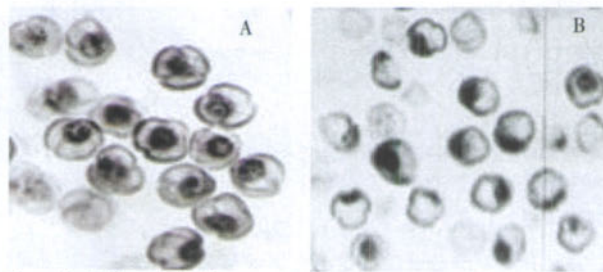


图1 小孢子四分体(×200)
Fig. 1 Sporule tetrads



注:A为早期,B为晚期。Note: A: Forpart; B: Afternoon.

图2 单核小孢子早期和晚期(×200)
Fig. 2 Forepart and afternoon of monokaryon sporule

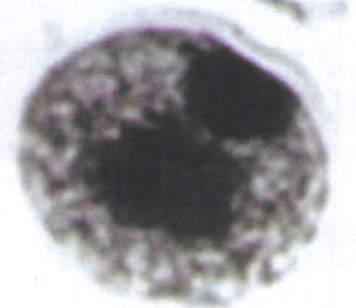


图3 双核小孢子早期(×400)
Fig. 3 Forepart of dicryon sporule

着花粉壁,呈双凸镜状,营养核位于生殖细胞上方接近花粉中央的位置。接着便发生了生殖细胞进入营养细胞的过程。首先生殖细胞壁从两侧与花粉壁的连接处沿着花粉内壁向心地生长,使原来呈双凸镜状的生殖细胞逐渐变成半球形或球形,最后当生殖细胞壁两端汇合时生殖细胞便脱离花粉壁进入营养细胞的细胞质中。刚刚游离于营养细胞中的生殖细胞呈圆球形,外面的生殖细胞壁依然十分清楚。随后,生殖细胞的细胞壁消失,同时包围着核的薄细胞质层在光镜下也无法辨认,花粉发育即将进入2-细胞花粉晚期。细胞质增多是2-细胞花粉早期的另一明显特征。在生殖细胞刚刚形成时,花粉内的细胞质已较单核时期明显增多,但是细胞内的大液泡依然存在。随后胞质积累的速度明显加快,直到生殖细胞进入营养细胞中,生殖细胞壁消失时,液泡已完全消失,细胞质充满了整个花粉。在细胞质不断增多的同时,花粉开始积累淀粉粒、蛋白质和脂类等营养物质,从而使得花粉原生质显得越来越厚。

2.1.5 2-细胞花粉晚期。当生殖细胞浸没于营养细胞的细胞质中,裸露的生殖细胞核开始变形变化,向两端不断延伸,从最初的圆球形经过短纺锤形、长纺锤形、长梭形,逐渐转变为两端较尖的长条形,横跨花粉直径(图4-A-B)。在许多情况下,长条形的生殖细胞核两端会进一步延长,并向营养核所在的一侧弯曲,最后呈半月状,包围着位于花粉中央的营养核(图4-C),营养核的位置自形成后几乎再没有发生变化,一直位于花粉近中央。这一时期的主要特征是生殖细胞经过变形变化发育成熟,花粉内大量积累储藏物质,尤其是淀粉粒急剧增加,最后充斥整个花粉。光镜下成熟能育花粉呈圆三角形(图5-6)。

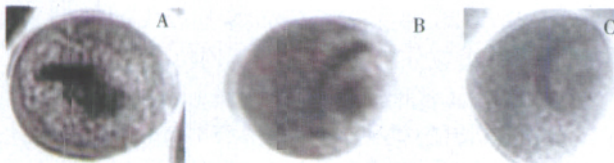


图4 双核小孢子晚期生殖核变化示意(×400)
Fig. 4 Sketch map for changes of dicryon sporule procreation at afternoon

2.2 雄配子体发育过程中的异常现象

(1) 在少数品种中,一个花药除具有4个正常的花粉囊外,还多余生长有1-2个败育的花粉囊(图7)。

(2) 雄配子体发育表现出不同步现象。异常花粉的发育也是极不同步的。在同一花药或同一花粉囊中可以观察到不同发育阶段的异常花粉。以至于常常在同一个切面上可以看到单核早期、单核晚期、双核早期、双核晚期等不同发

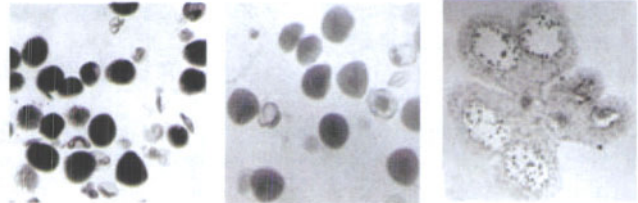


图5 成熟花粉(×200) 图6 异常花粉(×200) 图7 多余败育花粉囊示意(×40)
Fig. 5 Mature pollen Fig. 6 Abnormal pollen Fig. 7 Sketch map for abortion of spilt anther

育时期的小孢子(图6、8)。

(3) 个别品种刚从四分体中散发出来的小孢子全部异常,其细胞呈多角形或各种畸形,绒毡层细胞大而径向伸长,核大而胞质很浓,并整齐排列在药壁最内层(图9)。

(4) 从四分体散发出来的少数小孢子从单核时期就有种种异常表现。小孢子纵向伸长,结果形成椭圆形、不规则形或圆形而空瘪的花粉,体积明显小于正常花粉,细胞质不再增多,保持稀薄状态,几乎不着色。继续发育时,当正常花粉进入2-细胞阶段后,异常小孢子将停留在初始状态不发育,或逐渐退化,内容物消失至花药成熟时仅剩花粉壁空壳(图2、5-6、8)。

(5) 异常小孢子发育的另一种表现是进入单核晚期时,形态大小与正常小孢子相近或略小,但是细胞质比较稀薄,染色浅淡,核或者不增大变为浓缩核,或者与正常核形态大小相同,但染色较正常核弱。前者将停滞在单核晚期(图6、8),或者产生多核和微核(图10),后者有些将停滞发育,少量将沿着孢子体发育途径形成三核或多核花粉(图11)。

(6) 在成熟花粉囊中,依然能观察到许多异常花粉。体积比正常花粉小,基本上保持单核靠边期的大小,甚至萎缩成更小,其细胞质稀薄,不积累淀粉,染色浅淡或不着色(图5-6、8)。

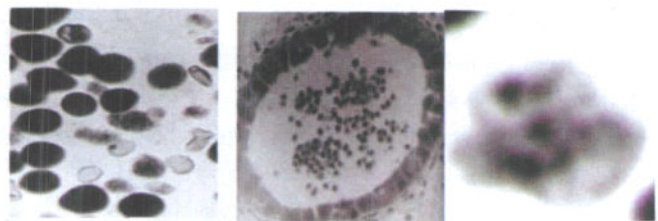


图8 花粉发育不同步(×200) 图9 整个花粉囊的小孢子全部败育示意(×200) 图10 具有多个微核的异常小孢子(×400)
Fig. 8 Unsynchronized development of pollen Fig. 9 Sketch map for abortion of all sporules in whole anther Fig. 10 Abnormal sporule with multi-nucleus

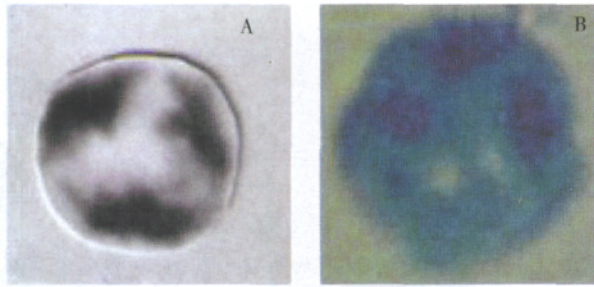
图 11 沿孢子体途径发育的三核花粉($\times 400$)

Fig.11 Three-nucleus pollen developed along sporophyte approach

2.3 异常花粉百分比与结实率的对比 对于雄配子体发育过程中的 6 类异常现象,笔者在统计时都视为不育花粉。每一品种从单核早期至成熟花粉各个时期随机选取 5 个花药的横切面进行异常花粉的统计。各品种及种异常花粉百分率与其种子结实率不完全成正比(表 1)。

表 1 牡丹 7 品种的花粉败育率和种子结实率的比较

Table 1 Comparison between the abortion rate of pollen and setting rate of seed in 7 peony varieties

种名 Specific name	品种名 Variety name	花粉败育率 Pollen sterility rate	种子结实率 Seed setting rate	花型 Flower type
紫斑牡丹	书生捧墨	19.8	52.6	单瓣
	红莲	49.7	34.2	单瓣
	雪莲	41.4	18.4	单瓣
	金波荡漾	38.3	3.2	绣球
中原牡丹	山花烂漫	34.6	15.4	荷花
	赵粉	35.4	15.4	皇冠
杨山牡丹	凤丹	54.8	50.0	单瓣

3 结论与讨论

3.1 花粉二型性现象的成因及其意义 Sunderland 提出的花粉二型性的理论假设在许多植物中得到了验证^[1-3]。与其他植物相比,芍药科花粉二型性的研究是比较深入的^[4-7]。李懋学发现芍药品种大富贵的异常花粉比例高达 24.2%,并详细观察了异常花粉在体内发育过程中表现出的种种不同的雄核发育途径,结果发现,在离体条件下观察到的各种雄核发育途径大部分能在花药中见到其雏形,即孢子体发育有一个体内预定的基础。这一发现对植物胚胎发育和组织培养的研究具有深远的影响。该研究显示在牡丹组的 3 种 7 品种中普遍存在二型性花粉的现象:在花粉群体中有一小部分形态特征与正常花粉明显不同,普遍表现为体积小,细胞质稀薄,发育迟缓等;它们大部分将停滞发育,但仍有极少数在体内沿着孢子体途径发育到 3 核水平。因此尚不能肯定这些异常花粉是否具有胚胎发育潜力,但推测花粉二型性可能是芍药科的一个共同特征^[8],并认为异常花粉发生的频率受遗传因素和花药生理状况及外部环境的双重影响,其遗传根源可追溯到小孢子发生时减数分裂的不同步和异常。有些学者认为二型性花粉的形成与小孢子母细胞减数分裂时的轴向和极性以及四分孢子的排列有关^[5-6,9-10]。

(上接第 459 页)

simplex virus mediated nerve growth factor expression in bladder and afferent neurons: potential treatment for diabetic bladder dysfunction[J]. J Urol, 2001, 165(5): 1748-1754.

[7] 李御宇,黄秉仁,蔡良琬. 中国人神经生长因子基因(NGF)的扩增、克隆及序列分析[J]. 中国医学科学院学报, 1994, 16(5): 334-338.

[8] 尹元琴,臧承光,陈红,等. 人神经生长因子 cDNA 的体外扩增和序

列测定[J]. 中国医科大学学报, 2001, 30(6): 404-406.

笔者在对这 7 个品种牡丹小孢子发生的研究中,并没有观察到明显的减数分裂极性的变化以及多种分裂轴向的存在。而小孢子四分体的排列方式除正常的正四面体形,在所有品种中均存在少数排列为左右对称形的四分体,同时减数分裂及小孢子发育不同步现象在各品种中表现比较普遍和突出。这种不同步所造成的差异奠定了小孢子发育的异质性。当进入单核晚期后,小孢子内部隐藏的这种异质性在形态上表现了出来,最终成为异常花粉,丧失了生殖机能,但异常花粉在花粉培养以及花粉在植物体内发育和胚胎发生的意义不容忽视。

3.2 异常花粉率与种子结实率的关系 笔者研究的牡丹品种中,异常花粉的发生率表现出明显的种间差异及品种间的分化,而各品种能育花粉的数量与种子结实率并不完全成正比。紫斑牡丹品种书生捧墨、金波荡漾,中原牡丹两品种山花烂漫、赵粉花粉败育率与种子结实率基本成反比,金波荡漾表现尤为突出,其结实率非常低。而紫斑牡丹品种雪莲、红莲,以及杨山牡丹凤丹情况刚好相反。特别是凤丹虽然在小孢子母细胞减数分裂时有较多的异常,小孢子发育过程中也出现较多的不正常状态,异常花粉数量最多,但其种子结实率却很高。当然花粉及合子败育原因及比值的增减,不仅受小孢子母细胞异常发育的制约,而且也受开花期环境条件的制约;同时也要考虑各品种的花型及花药数量的多少,会影响其实际授精花粉的比例。异常花粉和结实率的统计与取样、检测方法以及制片技术等都有一定的关系;另外,受精能否成功,还要取决于花粉管生长的诸要素、雌配子的发育、雌雄配子体的有效结合等,因此笔者认为不育花粉的数量并不是导致牡丹结实率低的主要因素,但它无疑会直接影响到种子结实,与于玲的观点相同^[11]。

参考文献

- [1] 张新英,刘德民,王迎利. 水稻花药培养中小孢子形成植株的组织分化和器官建成的初步观察[J]. 植物学报, 1978, 20(1): 197-203.
- [2] 孙敬三,朱至清,王敬驹. 黑麦花药培养及雄核发育[J]. 植物学报, 1978, 20(2): 210-214.
- [3] 朱至清,孙敬三,王敬驹. 小麦雄核发育的细胞学研究[J]. 植物学报, 1978, 20(6): 6-12.
- [4] SUNDERLAND N, DUNWELL J M. Tissue Culture and Plant Science[M]//STREED H E, ed. London: Acad Press, 1974: 141-167.
- [5] SUNDERLAND N. Haploids in higher plants. Advances and Potential[J]. Unev Guelph, 1974, 41: 122.
- [6] SUNDERLAND N. proceedings of symposium on plant tissue culture [M]. Peking: Science Press, 1978.
- [7] 李懋学. 芍药花粉的二型性和雄核在体内的发育[J]. 植物学报, 1982, 24(1): 17-21.
- [8] 李懋学. 芍药的小孢子母细胞减数分裂和花粉发育[J]. 园艺学报, 1981, 8(4): 49-55.
- [9] ROMANOV I D. Features of the pollen development of poaceae and their importance for some genetical studies[J]. Genetics, 1970, 6(1): 11-23.
- [10] 成仿云,金芝兰. 谷子雄配子体发育的细胞形态学研究[J]. 西北植物学报, 1988, 3(3): 155-161.
- [11] 于玲,何丽霞. 紫斑牡丹小孢子形成过程的细胞遗传学研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 467-471.