

深山含笑大、小孢子发生和雌、雄配子体发育研究

熊海燕 刘志雄*

(长江大学园艺园林学院 荆州 434025)

摘要 采用石蜡切片技术对深山含笑大、小孢子的发生和雌、雄配子体发育进行观察。深山含笑花药4室,花药囊壁由5~7层细胞构成,腺质绒毡层,小孢子胞质分裂为修饰性同时型,四分体有四面体型、对称型,偶有交叉型,成熟花粉为2细胞型,胚珠倒生、双珠被、厚珠心,大孢子四分体直线型排列,合点端为功能大孢子,雌配子体发育方式为蓇葖型。从雌、雄配子体发育时间的先后来看,深山含笑春季雌、雄配子体能正常发育,雄蕊先熟,雄蕊和花瓣凋谢后雌蕊大孢子母细胞才形成。而秋季开花的深山含笑,花药中小孢子在孢原细胞或初生造孢细胞期停止发育,花粉败育,雌蕊胚珠珠心组织也未见大孢子母细胞发育,开花后雌蕊随花柄凋落。该研究为深山含笑生殖发育和杂交育种积累了资料。

关键词 深山含笑;大、小孢子发生;雌、雄配子体发育

中图分类号:Q949.747.1 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2018.02.007

Mega- and Microsporogenesis and Development of Female and Male Gametophytes in *Michelia maudiae* Dunn

XIONG Hai-Yan LIU Zhi-Xiong*

(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025)

Abstract The mega- and microsporogenesis and development of female and male gametophytes in *Michelia maudiae* Dunn were investigated by using the paraffin section method. Anthers are tetradymous and the anther wall is composed of 5~7 layer of cells, Glandular tapetum, Cytokinesis in meiosis is modified simultaneous type, the tetrads are tetrahedral, isobilateral and decusate. Mature pollen grains are 2-cell type. The ovule of *M. maudiae* is anatropous bitegmic and nucellus thickly. The megaspore mother cells undergo meiosis divides into linear type tetrads, and the one in the chalazal end is functional, Polygonum type. The female and male gametophytes in spring-flowering *M. maudiae* were developed normally, heterogamy. The megaspore mothercells formed after the petals and stamen were withered. The development of microspore in autumn is in the period of sporozoic cell or primary spore, abortion then. Megaspore in autumn-flowering *M. maudiae* undeveloped when flowering, withers away after flowering, were mostly developed unnormally. The study had accumulated information on the reproduction and hybridization in *M. maudiae* Dunn.

Key words *Michelia maudiae* Dunn; mega- and microsporogenesis; female and male gametophytes

深山含笑(*Michelia maudiae* Dunn)是木兰科(Magnoliaceae)含笑属(*Michelia*)常绿乔木,因其树姿优美、花色洁白、花型娟秀雅致、花大芬芳、花

期长,观赏价值高且花香宜人,少数种质具有春秋两季开花等优点,在长江流域及以南地区被广泛用于园林绿化和景观建设。深山含笑是我国特有

基金项目:国家自然科学基金(31101202)

第一作者简介:熊海燕(1983—),女,硕士研究生,主要从事植物遗传发育研究。

* 通信作者 E-mail: zxlou77@yahoo.com

收稿日期:2017-09-27

Foundation item: Project supported by National Natural Science Foundation of China(31101202)

First author introduction: XIONG Hai-Yan(1983—), female, current master student, major in plant heredity.

* Corresponding author E-mail: zxlou77@yahoo.com

Received date: 2017-09-27

的珍贵树种,主产于浙江、福建、湖南、广东、广西、贵州等地^[1]。目前用于庭园景观营造和四旁绿化的深山含笑多为直接引种驯化的种子实生苗后代或嫁接植株,花色单调,加之耐寒性差的特点极大限制了这一珍贵观赏树种在长江、淮南以北地区的推广应用。挖掘优良、珍稀和特异深山含笑新种质、开展其花型、花色、花香、株型和抗逆性形成的机制与遗传规律研究,选育观赏价值高、抗寒性强及适应性广的深山含笑新品种,对加快其开发利用、种植区域北移具有重要的理论意义和应用价值。

在深山含笑种质资源利用方面,前人从抗寒性的角度对其在南京地区的引种适应性进行了评价^[2],黄利斌等从实生变异单株中选育出了冠型优美、生长迅速的优良新品种‘锦绣含笑’(*Michelia maudiae* ‘Jinxiu’)^[3]。园艺育种实践证明,开展杂交育种,是增加品种遗传多样性、增强适应性、抗逆性,改变花型、花色,提升观赏性的有效途径之一。前人已通过含笑属植物种间杂交培育出适应性强、抗逆性好的品种‘晚春含笑’(*Michelia* ‘Wanchunhanxiao’)^[4]。综合亲本部分优良性状的品种‘云瑞’^[5]、红花含笑品种‘郁金含笑’、‘丹芯含笑’、‘沁芳含笑’^[6]、淡紫红含笑品种‘梦紫’^[7]。育种实践证明,弄清植物的生殖发育规律,是开展杂交育种工作的前提和基础。该研究拟采用石蜡切片技术,系统研究深山含笑花发育过程中大、小孢子发生和雌、雄配子体的发育过程,探究其发育规律,探讨其与木兰科近缘种生殖发育的异同,为利用深山含笑开展种间乃至属间的有性杂交,创制优良观赏花木新种质积累资料,同时完善木兰科植物生殖发育的胚胎学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

深山含笑花芽采自湖北荆州长江大学校园,从2016年1月~2017年3月,每隔3~7天采集新鲜花芽备用。

1.2 方法

取深山含笑不同发育时期的新鲜花芽,用游标卡尺测量其长度及直径后剥离雌雄蕊,FAA固定液(甲醛:冰乙酸:70%乙醇=1:1:18)固定,抽真空后固定24 h,50%乙醇润洗,后依次经70%、85%、95%、100%乙醇梯度脱水,每级2 h;再经1/2乙醇+1/2二甲苯、二甲苯透明,每级2 h,38℃条

件下放入饱和的石蜡二甲苯溶液中过夜,65℃条件下液态石蜡中浸蜡12 h,每4 h换1次新蜡,包埋成型。连续切片,切片厚度8 μm,番红—固绿对照,中性树胶封片,SDPTOP BH200光学显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 深山含笑春秋两季花器官形态发育比较

比较荆州地区春秋两季深山含笑花器官形态发育发现:深山含笑花被片原基在9月花芽长12~18 mm、直径3.5~5 mm时分化,至10月底,花芽长18~24 mm、直径5~7 mm时,雄蕊花药中小孢子母细胞形成,11月底花芽长24~30 mm、直径7~9 mm时小孢子四分体解体形成单核花粉粒。随着冬季气温的不断降低,雌雄蕊发育缓慢甚至休眠。至翌年2月中旬随着气温的回升,花芽发育迅速,长30~45 mm、直径9~14 mm时,单核小孢子发育成二细胞型花粉粒,至2月下旬开花前花粉完全发育成熟。2月中旬,当雄配子发育成二细胞型花粉粒时,雌蕊子房中胚珠原基开始发育,至3月中旬花被片与雄蕊完全脱落后,大孢子母细胞才形成,此后雌蕊生长迅速,至4月中旬雌配子发育成熟。从发育时间来看,春季最早开花的深山含笑雌配子体晚雄配子体近1个半月成熟。深山含笑花期从2月下旬持续到4月上旬。春季最晚开花的深山含笑花芽分化开始于3月中旬,由于春季气温相对较高,花芽生长迅速,3月下旬芽长已达30~40 mm、直径9~13 mm,4月上旬开花,雄配子体发育成熟,此时雌蕊子房中胚珠原基开始发育,至5月上旬雌配子体发育成熟。

秋季开花的深山含笑花原基从6月下旬开始分化,初夏气温适宜,花芽生长迅速。至7月下旬,花芽长达38~43 mm、直径8.5~9 mm,由于南方高温,花芽开始休眠,此时雄蕊花药中出现孢原细胞或初生造孢细胞。8月中旬随初秋夜间气温的回落,花芽打破短暂的休眠继续发育,雄蕊花药出现次生造孢细胞或小孢子母细胞时开花,但与休眠前相比,花芽长度及直径并未显著增加,花期持续到9月中旬。秋季开花的深山含笑花粉败育,雌蕊胚珠珠心中未见大孢子发育,开花后花瓣雄蕊连同雌蕊一起迅速枯萎,不能正常结实。

2.2 深山含笑小孢子发生和雄配子体发育

花药发育之初,靠近中心位置一侧的细胞快速分裂,向内弯曲,形成两个小突起(图版 I :A)

后期分化形成花粉囊。每个突起处中央一个细胞分化形成孢原细胞,孢原细胞经平周分裂,形成外层的周缘细胞(初生壁细胞)和内层的造孢细胞;随着花粉囊的发育,周缘细胞继续由外至内分裂形成1层药室内壁、2~3层中层和1~2层绒毡层;与此同时,初生造孢细胞也经过有丝分裂形成次生造孢细胞(图版 I :B)。至10月底,花药中出现明显的小孢子母细胞,其核大、生理活动旺盛(图版 I :C)。随后小孢子母细胞通过减数分裂形成四分体,深山含笑小孢子四分体的排列方式有对称型、四面体型或交叉型(图版 I :D~G);在小孢子母细胞减数分裂形成四分体过程中,绒毡层细胞开始解体并为小孢子的发育提供营养,当四分体形成时,绒毡层仅残留一层细胞,且细胞间出现明显的间隙(图版 I :H)。四分体小孢子最初被包裹在半透明的胼胝质中,随着胼胝质的溶解,小孢子从四分体中释放,刚释放出来的小孢子呈不规则三角形,此时残存的一层绒毡层大部分细胞已解体消失(图版 I :I)。翌年2月底,小孢子核进行有丝分裂形成二细胞型花粉,包含一个大的营养核和一个贴于细胞壁处的生殖核,小孢子处在靠边期,此时中层细胞也大部分解体,仅留残存的细胞壁骨架(图版 I :J),药室内壁细胞开始径向变长,带状增厚,细胞体积增大,但两两相邻的花粉囊壁处有几个药室内壁细胞并不增厚,当二细胞型花粉继续发育形成成熟花粉粒时,发生破裂,花粉囊随之裂开,花粉散出(图版 I :K)。

秋季开花深山含笑6月下旬开始花芽分化,雄蕊花药中小孢子初期发育正常,至7月下旬,小孢子发育成孢原细胞或初生造孢时停止发育,至8月中旬开花后表现出明显的花粉败育(图版 I :L~M)。

2.3 深山含笑大孢子发生和雌配子体发育

2月中旬,雌蕊原基基部卷合,在卷合的心皮腹面细胞快速生长形成几团细胞,进一步发育成胚珠原基(图版 II :A)。3月初,胚珠原基发育成指状突起,但同一朵花不同雌蕊内的胚珠发育并不同步,有时同一子房内的胚珠发育也并不同步(图版 II :B)。3月中旬,孢原细胞出现于珠心组织顶端表皮下,经过有丝分裂形成造孢细胞。3月下旬,当花瓣与雄蕊完全脱落后,能观察到明显内外珠被,此时大孢子母细胞生理活动旺盛,细胞核明显(图版 II :C,D)。随后,大孢子母细胞进行两次减数分裂(图版 II :E),形成直线型四分体,合点端的一

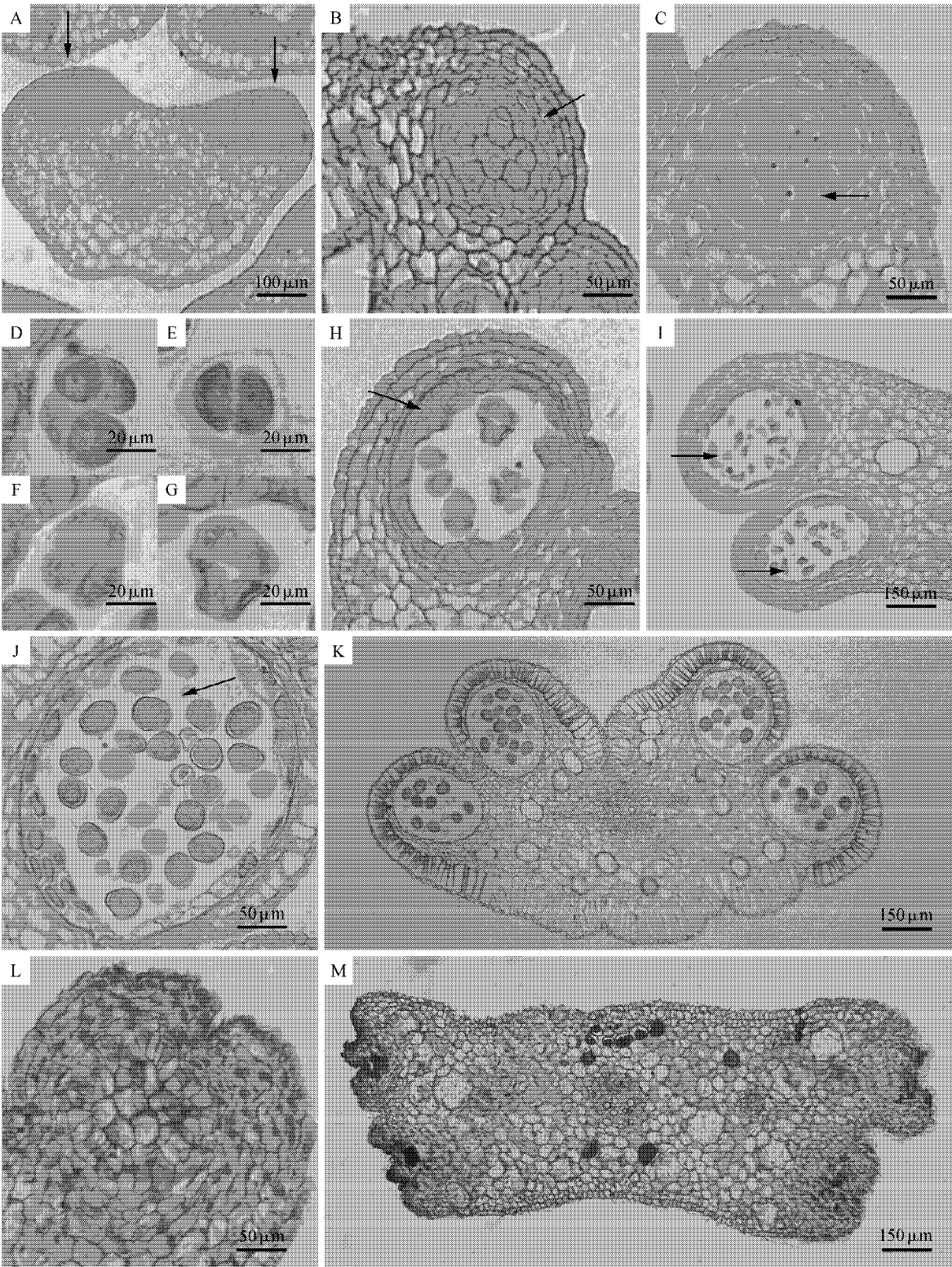
个发育成功能大孢子,其余3个退化消失。在大孢子母细胞发育分化形成功能大孢子过程中,内外珠被顶端伸长,至单核时期已在珠孔端愈合;同时,由于胚珠基部的不平衡生长,胚珠逐渐倒生(图版 II :F)。单核雌配子体进行有丝分裂形成二核,二核雌配子体的两个核移向两端(图版 II :G),随后进行第2次有丝分裂形成四核。4月中旬,四核雌配子体进行第3次有丝分裂形成八个游离的核,两端各有一个核向中间靠拢,融合成为具2个核的中央细胞(图版 II :H),合点端的另外3个细胞集合在一起形成3个反足细胞,珠孔端的3个细胞组成卵器,包括1个卵细胞和2个助细胞(图版 II :I)。至此,成熟雌配子体形成。从大孢子发生到雌配子体形成的发育过程中,胚珠的珠孔一端逐渐弯曲,形成倒生胚珠,双珠被,厚珠心,深山含笑的雌配子体发育方式为蓼型。

3 讨论

深山含笑花单生,多生于叶腋,偶生于枝顶,雌雄蕊多数、离生、螺旋状排列,花药4室,腺质绒毡层,四分体有四面体型、对称型,偶有交叉型,花粉成熟时为2细胞型。雌蕊成熟时胚珠倒生、双珠被、厚珠心,大孢子四分体呈直线型排列,雌配子体发育方式为蓼型。花粉具4个小孢子囊,2细胞花粉,倒生胚珠,双珠被,厚珠心,蓼型胚囊,合点端大孢子具功能等被认为是比较原始的胚胎学性状。深山含笑胚胎发育与前人对木兰科其他种胚胎发育研究结果相似^[8~14],均表现出原始的特征,体现其胚胎发育的保守性。

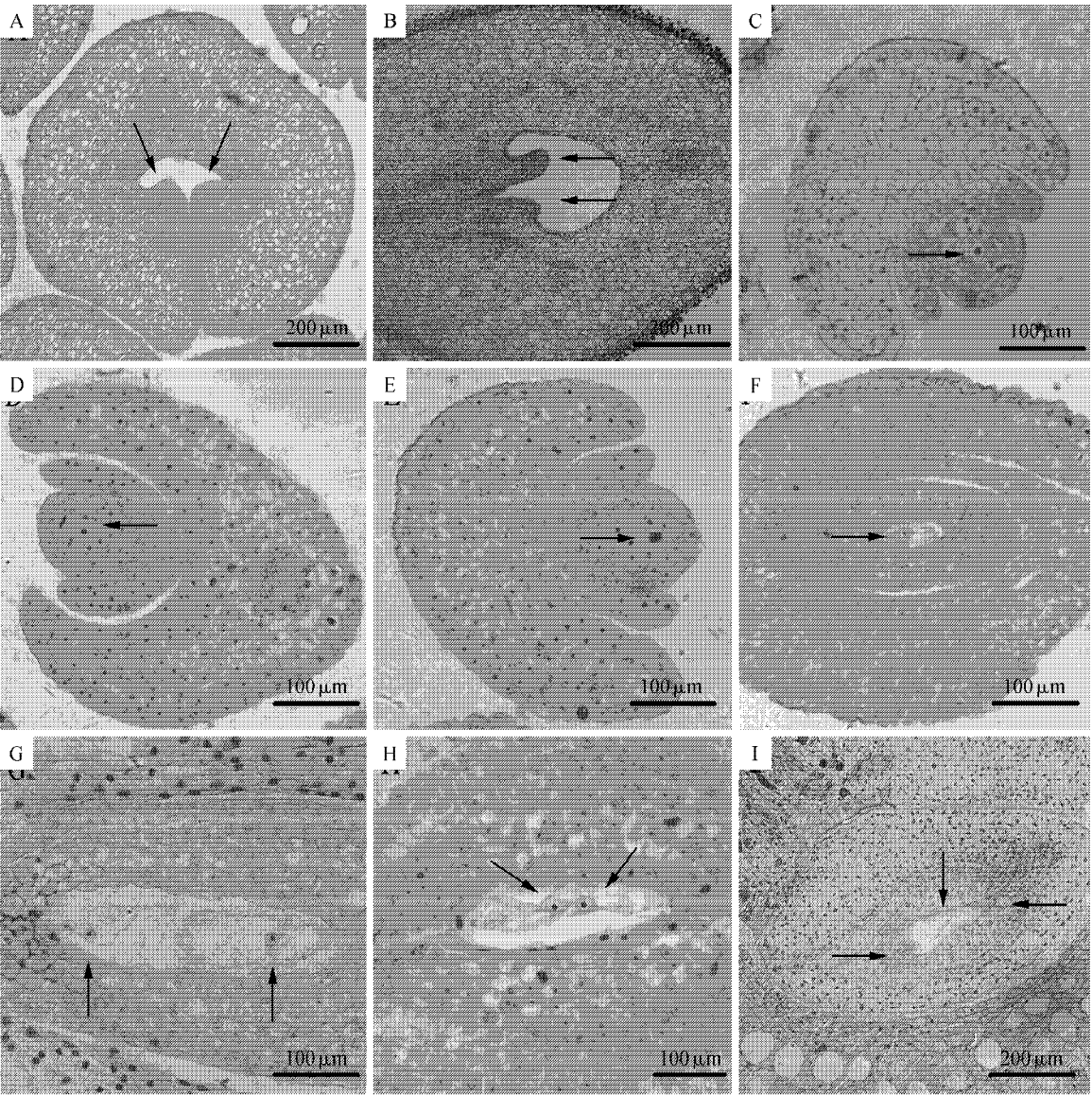
深山含笑春季花期长,花量大,结实多,早花发育过程持续时间长,晚花持续时间短,雌、雄配子体发育出现严重不同步现象。秋季花期较春季短,花量小,大多不能结实,整个发育过程持续时间短,雌、雄配子体多不能正常发育成熟。春季最早开花花芽在荆州地区头年10月底小孢子母细胞形成,次年2月底形成成熟花粉粒。2月中旬胚珠开始发育,3月中旬,花被片和雄蕊凋落后,大孢子母细胞才开始形成。深山含笑雌、雄配子体发育表现出严重不同步现象,可能是进化中对异交结实的一种适应。

木兰科除木兰属的木兰亚属和玉兰亚属之间有较强的生殖隔离、没有杂交亲和性外,其他属内都有杂交亲和性^[15],前人基于分子系统学的研究也进一步证明了木兰属与含笑属之间有很近的亲缘



图版 I 深山含笑小孢子发生和雄配子体发育 A. 形成两个突起 B. 次生壁细胞和次生造孢细胞 C. 小孢子母细胞 D. 交叉型四分体 E. 对称型四分体 F~G. 四面体型四分体 H. 加厚的绒毡层 I. 刚释放的小孢子 J. 二细胞花粉 K. 花粉成熟时雄蕊横切 L. 秋季发育异常的花粉囊 M. 秋季花粉败育

Plate I Microsporogenesis and development of male gametophytes in *M. maudiae* Dunn A. Protuberance ;B. The secondary sporogenous cell and the secondary parietal cell ;C. Microsporocyte ;D. Decussatetrad ;E. Isobilateraltrid ;F - G. Tertrahedroidtetrad ; H. Apetum ;I. Microspore appeared ;J. Two-celled pollen grain ;K. Crosscutting at mature pollen stage ;L. Dysplasia ;M. Abortion



图版Ⅱ 深山含笑大孢子发生和雌配子体发育 A. 基部卷合形成突起 ;B. 胚珠发育不同步 ;C ~ D. 大孢子母细胞 ;E. 大孢子母细胞有丝分裂 ;F. 单核胚囊 ;G. 二核胚囊 ;H. 中央细胞 ;I. 成熟胚囊

Plate II Megasporogenesis and development of female gametophytes in *M. maudiae* Dunn A. Protuberance ; B. Ovule development are not synchronized ; C ~ D. Megaspore mother cell ; E. Mitosis ; F. Mononuclear embryo sac ; G. Bi-nucleateembryosac ; H. Central cells ; I. Mature embryo sac

关系^[16]。属间杂交研究表明,山玉兰(*Magnolia delavayi* Franch.)与乐东拟单性木兰(*Parakmeria lotungensis*)杂交结实率高达90%^[17]。同样,含笑属内杂交也培育出许多适应性强,观赏价值高的含笑属新品种,如徐海燕等以云南含笑(*M. yunnanensis* Franch. ex Finet et Gagn.)和南亚含笑(*M. shiluensis* Chun et Y. F. Wu)杂交培育出‘云霞’、‘云馨’和‘云星’含笑,以此杂交后代为母本,以深山含笑为父本杂交培育出‘云瑞’含笑^[5]。

深山含笑部分种质具有花开两季、花量大、花期长、抗性强等优点,异交授粉的结籽率与座果率显著高于自交授粉^[18]。弄清植物的生殖发育规律,是进行杂交育种的前提和基础,在本研究中,深山含笑雄蕊和花瓣脱落后雌蕊胚珠中才出现大孢子母细胞,但鉴于单株花期长、花量大的特点,杂交育种应选取单株早期开花的花朵套袋,尽量避免同株后期花粉的干扰,本研究为深山含笑在荆州地区的杂交育种工作积累了资料。

参 考 文 献

- 刘玉壶. 木兰科分类系统的初步研究 [J]. 植物分类学报, 1984, 22(2): 89–109.
Law Y W. A preliminary study on the taxonomy of the family Magnoliaceae [J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1984, 22(2): 89–109.
- 田如男, 薛建辉, 李晓储, 等. 深山含笑和乐昌含笑的抗寒性测定 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(6): 55–57.
Tian R N, Xue J H, Li X C, et al. A study on cold resistance of *Michelia maudiae* and *M. chapaensis* by electric conductivity method [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2004, 28(6): 55–57.
- 黄利斌, 窦全琴, 董筱昀, 等. 深山含笑新品种‘锦绣含笑’ [J]. 林业科学, 2016, 52(9): 154.
Huang L B, Dou Q Q, Dong X Y, et al. A new variety of *Michelia maudiae* ‘Jinxiu’ [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2016, 52(9): 154.
- 毛常丽, 潘跃芝, 龚洵. 含笑新品种‘晚春含笑’ [J]. 园艺学报, 2009, 36(5): 778.
Mao C L, Pan Y Z, Gong X. A new *Michelia* cultivar ‘Wanchun Hanxiao’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(5): 778.
- 徐海燕, 李文祥, 潘跃芝, 等. 含笑新品种‘云瑞’ [J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 403–404.
Xu H Y, Li W X, Pan Y Z, et al. A new *Michelia* cultivar ‘Yunrui’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(2): 403–404.
- 龚洵, 张国莉, 潘跃芝, 等. 含笑新品种——郁金含笑、丹芯含笑和沁芳含笑 [J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 123.
Gong X, Zhang G L, Pan Y Z, et al. Three new varieties of *Michelia* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(1): 123.
- 邵文豪, 姜景民, 董汝湘. 含笑新品种‘梦紫’ [J]. 园艺学报, 2015, 42(9): 1863–1864.
Shao W H, Jiang J M, Dong R X. A new *Michelia* cultivar ‘Mengzi’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(9): 1863–1864.
- 王利琳, 胡江琴, 庞基良, 等. 凹叶厚朴大、小孢子发生和雌、雄配子体发育的研究 [J]. 实验生物学报, 2005, 38(6): 490–500.
Wang L L, Hu J Q, Pang J L, et al. Studies on the Megasporeogenesis and Microsporeogenesis and the development of their female and male gametophyte in *Magnolia biloba* [J]. Acta Biologica Experimental Sinica, 2005, 38(6): 490–500.
- 赵兴峰, 孙卫邦, 杨华斌, 等. 极度濒危植物西畴含笑的大小孢子发生及雌雄配子体发育 [J]. 云南植物研究, 2008, 30(5): 549–556.
Zhao X F, Sun W B, Yang H B, et al. Mega- and microsporeogenesis and development of female and male gametophytes of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a globally critical endangered plant in south-east Yunnan of China [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2008, 30(5): 549–556.
- 陈丽园, 桑子阳, 陈发菊, 等. 红花玉兰大小孢子发生及雌雄配子体发育的研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2016, 44(9): 181–185.
Chen L Y, Sang Z Y, Chen F J, et al. Sporogenesis and gametophytes development of *Magnolia wufengensis* [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2016, 44(9): 181–185.
- 陈发菊, 李凤兰, 梁宏伟, 等. 珍稀濒危植物巴东木莲胚胎学研究 [J]. 植物研究, 2008, 28(6): 657–662.
Chen F J, Li F L, Liang H W, et al. Megasporeogenesis, Microsporeogenesis and development of gametophytes in the rare endangered plant *Manglietia patungensis* Hu [J]. Bulletin of Botanical Research, 2008, 28(6): 657–662.
- 潘跃芝, 龚洵. 濒危植物红花木莲大孢子发生和雌配子体发育的研究 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(5): 1209–1214.
Pan Y Z, Gong X. Megasporeogenesis, development of female gametophyte of *Manglietia insignis* (Magnoliaceae) [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(5): 1209–1214.
- 谭金桂, 吴鸿, 李勇, 等. 焕镛木小孢子发生及雄配子体发育研究 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(5): 937–944.
Tan J G, Wu H, Li Y, et al. Microsporeogenesis and male gametophyte formation of *Woonyoungia septentrionalis* (Dandy) Law [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2009, 29(5): 937–944.
- 付琳, 徐凤霞, 曾庆文, 等. 广西含笑的小孢子发生及雄配子体形成的研究 [J]. 广西植物, 2011, 31(3): 312–317.
Fu L, Xu F X, Zeng Q W, et al. Studies of Microsporeogenesis and male gametophyte formation of *Michelia guangxiensis* [J]. Guihaia, 2011, 31(3): 312–317.
- 龚洵, 潘跃芝, 杨志云. 木兰科植物的杂交亲和性 [J]. 云南植物研究, 2001, 23(3): 339–344.
Gong X, Pan Y Z, Yang Z Y. The cross-compatibility of Magnoliaceae [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2001, 23(3): 339–344.
- Kim S, Park C W, Kim Y D, et al. Phylogenetic relationships in family Magnoliaceae inferred from *ndhF* sequences [J]. American Journal of Botany, 2001, 88(4): 717–728.
- 王亚玲, 李勇, 张寿洲, 等. 木兰科植物的人工杂交 [J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(6): 508–514.
Wang Y L, Li Y, Zhang S Z, et al. The crossing result of Magnoliaceae [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2003, 21(6): 508–514.
- 钱一凡, 黎云祥, 陈兰英, 等. 深山含笑传粉生物学研究 [J]. 广西植物, 2015, 35(1): 36–41.
Qian Y F, Li Y X, Chen L Y, et al. Pollination biology of *Michelia maudiae* [J]. Guihaia, 2015, 35(1): 36–41.