

金银忍冬雌雄配子体发育的解剖学研究

许珂, 江莎*, 古松, 陈旭辉, 王永周, 黄雅楠, 岳慧琴

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:对金银忍冬 (*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim) 大、小孢子的发生和雌、雄配子体的发育过程进行了研究, 结果表明: (1) 4月上中旬, 幼嫩的花粉囊壁由表皮、纤维层、中层和绒毡层共4层细胞组成, 绒毡层类型为变形绒毡层。4月15日左右小孢子母细胞进行减数分裂形成四面体型四分体, 四分体时期后, 部分小孢子为空瘪状态。4月23-26日即将开花时形成三细胞型的成熟花粉。(2) 子房三心皮, 中轴胎座, 胚珠倒生, 单珠被, 薄珠心。4月下旬开花前发育形成成熟胚囊, 胚囊的发育为蓼型, 合点端具有承珠盘。研究结果表明金银忍冬雌雄配子体的发育均属正常。

关键词:金银忍冬; 大、小孢子; 雌、雄配子体; 解剖学

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)06-0510-07

Anatomical Studies of Male and Female Gametophytes in Development of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim

XU Ke, JIANG Sha*, GU Song, CHEN Xu-hui, WANG Yong-zhou, HUANG Ya-nan, YUE Hui-qin

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The mega- and microsporogenesis and the development of male and female gametophytes in *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim were observed. Young anther walls were composed of four layers including epidermis, fibrous layer, middle layer and amoeboid tapetum in early and middle April. Tetrahedral tetrads of microspores were present on about April 15. After the stage of tetrad, some microspores aborted and cytoplasm were absent. Three-celled mature pollen grains developed from April 23 to April 26 shortly before flowering. The ovary was trilobular with axile placentation and the ovules were anatropous, unitegminous, and tenuinucellate. The mature embryo sacs occurred before flowering in late April, which were of the Polygonum type. Hypostase was at the chalazal end of the ovule. These results suggest that mega- and microspores and male and female gametophytes of *L. maackii* have normal development.

Key words: *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim; Mega and microspores; Male and female gametophytes; Anatomy

金银忍冬 (*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim), 别名金银木、鸡骨头, 属忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 (*Lonicera*) 植物。为灌木, 雌雄同株, 花两性, 两两并生, 花冠两唇形, 先白后黄, 故称金银忍冬, 分布于全国各地, 是优良的园林绿化、观赏及药用植物。金银忍冬可春季观花, 秋、冬二季观果, 且耐旱适应性强, 南北皆宜, 又较耐阴, 具较高的观赏及园

林绿化价值, 是城市园林绿化的优选树种。金银忍冬全株具有很高的药用价值: 叶可提取硬性胶; 幼叶和花可做饮料, 并能提取芳香油; 茎、皮可制人造棉; 种子可榨油制肥皂; 根入药, 可消肿止痛, 杀菌, 治头晕、跌打损伤等症, 且金银忍冬花的产量较高, 其有效成分的药理性能与金银花源植物相同, 因此是一种具有开发前景的药用植物^[1]。

收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-07-03

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金及南开大学科研启动基金资助

* 通讯作者: Corresponding author

有关金银忍冬的研究有过一些报道,主要是在种子生理^[2]、栽培嫁接技术、植株的生理特性^[3]、有效成分的提取^[4]、染色体核型分析^[5]等方面。有研究报道认为在某些金银花源植物资源较少的地区,可考虑以金银忍冬为金银花药材的新资源^[6],因为金银忍冬的藤茎、叶及花部位中的绿原酸含量较高,许多地区民间已将金银忍冬的花代替金银花进行药用。金银忍冬主要靠种子和扦插繁衍后代,以种子繁殖的后代既可保证遗传的稳定性又能使后代具有较强的生命力,同时利于大范围引种。但是,有关金银忍冬有性生殖方面的研究还未见报道。为此,本文采用常规石蜡切片技术对金银忍冬大、小孢子的发生及雌、雄配子体的发育进行了较为细致的观察,为研究该植物提供了胚胎学及有性生殖过程方面的资料,也为有效地开发和利用该药用植物及进行引种栽培、育苗育种等提供依据。

1 材料和方法

供试材料为南开大学校园周围的金银忍冬栽培植株不同发育时期的花芽。2005年3-6月每3d采样一次,样品用FAA固定液固定,常规石蜡切片法制片^[7],切片厚度6-10 μm,铁矾-苏木精染色,固绿对染,中性树脂胶封片;小孢子减数分裂过程采用醋酸洋红压片,Olympus BH-2型光学显微镜下观察并照相。

2 结果

金银忍冬花两性,花冠两唇形,长约2cm;雄蕊5枚,离生;雌蕊1枚,子房下位,花期5-6月。

2.1 小孢子发生与雄配子体的发育

3月30日左右,雄蕊原基出现,原基外为一层表皮细胞,内为一团分生组织(图版I:1)。随后在花药原基的4个角隅处分化出孢原细胞(图版I:2),孢原细胞经平周分裂形成初生壁细胞和初生造孢细胞。

初生壁细胞平周分裂形成的内层再分裂一次成为绒毡层和中层,而外层发育为药室内壁。4月6-15日小孢子母细胞形成,此时幼嫩的花粉囊壁由表皮、药室内壁、中层、绒毡层共4层细胞组成,药室内壁与中层细胞长轴沿圆周方向排列(图版I:

3)。紧接着,小孢子母细胞进行减数分裂,绒毡层细胞长轴沿径向规则地排列于花粉囊内侧(图版I:4),绒毡层细胞常具有多核(图版I:5),此时中层细胞开始解体。4月13-17日,减数分裂完成形成四分体时,绒毡层细胞已开始解体,此时,中层细胞几乎完全消失(图版I:6)。4月15-18日,绒毡层细胞破裂,原生质体移动至花药腔中,在花药腔中融合形成绒毡层的原生质团(图版I:7),可以看到在小孢子之间的空隙中充满周缘质团和绒毡层细胞的细胞核,因此属于变形绒毡层。紧接着,绒毡层的周缘质团将花粉囊中的单核花粉紧密的包被在一起(图版I:8)。4月23-26日即将开花时,花药成熟,同侧相邻2个花粉囊在连接处开裂,花粉散出,此时,绒毡层和中层细胞完全被吸收,药室内壁纤维化发育成为纤维层。成熟的花药具有由不完整的一层表皮和一层纤维层组成的花粉囊壁(图版I:9)。

在花粉囊壁发育的同时,4月6日左右形成的初生造孢细胞发育为次生造孢细胞,紧接着次生造孢细胞进一步发育为小孢子母细胞(图版I:3)。4月15日左右小孢子母细胞进行减数分裂,形成四面体型四分体,外有胼胝质包围(图版I:6,10)。随后四分体分离,释放四个单核花粉粒,此时绒毡层细胞脱离花粉囊壁,其自溶释放的物质包围着小孢子(图版I:8),这些细胞的自溶释放物为小孢子的发育提供营养物质。在雄配子体的发育过程中,观察到了不育花粉(图版I:7-9),不育花粉的细胞质完全消失,只剩下空的花粉壁,其比率约为20%。可育花粉常呈球状,细胞质较浓,细胞核位于中央,细胞仍有胼胝质包围(图版I:11)。4月23-26日即将开花时,单核花粉进行一次不均等的有丝分裂,产生两个大小差异明显的核,大的为营养核,小的为生殖核(图版I:12)。在两核之间形成弧形细胞板后,大的营养细胞包括了原来细胞的大液泡和大部分细胞质,而小的生殖细胞只含有少量的细胞质。随后,生殖细胞脱离花粉壁,并游离于营养细胞质中,形成了营养细胞内含生殖细胞的形式(图版I:13),生殖细胞再次进行有丝分裂,在开花时形成成熟的三细胞型花粉(图版I:14)。同时可以看到花粉的三个萌发沟,花粉表面具有大量刺状突起。

2.2 大孢子发生与雌配子体的发育

金银忍冬子房为三心皮三室,中轴胎座,单珠被,薄珠心,倒生胚珠。4月4日左右,珠心表皮下方

分化出孢原细胞(图版 II:15),细胞核明显,体积较大。孢原细胞进一步发育为造孢细胞,造孢细胞直接起大孢子母细胞功能(图版 II:16)。随后,大孢子母细胞进行两次减数分裂,依次形成二分体和四分体。大孢子四分体主要成线形排列,但也观察到“T”形四分体的存在(图版 II:17,18)。四分体中位于珠孔端的 3 个细胞退化,合点端的一个发育成为功能性大孢子(图版 II:19)。

4 月 15-20 日,功能性大孢子体积增大,发育为单核胚囊(图版 II:20)。单核胚囊经一次有丝分裂发育形成二核胚囊(图版 II:21),二核分别位于胚囊的珠孔端与合点端。二核胚囊体积增大的同时,核分别进行有丝分裂形成四核胚囊(图版 II:22-24),两端分别有 2 个核。4 月 22-26 日,4 个核分别进行有丝分裂形成八核胚囊,珠孔端 4 个核,合点端 4 个核。随后,珠孔端的 1 个核向下移动,合点端的 1 个核向上移动,构成 2 个并列的极核(图版 II:25)。2 个助细胞并列位于珠孔端(图 II,26),卵细胞较大呈梨形,位于两助细胞间(图版 II:27),三者一起构成卵器。3 个反足细胞呈“品”字型排列(图版 II:28),位于胚囊的合点端。完全倒生的成熟胚珠形成时,胚囊周围可观察到一层珠被绒毡层(图版 II:29)。在整个胚囊发育过程中,合点端可观察到细胞质较浓的一团细胞,这些细胞形态上明显区别于周围的珠被绒毡层细胞,细胞排列整齐、紧密,体积较大,细胞核染色深,存留时间较长,这些细胞构成承珠盘结构(图版 II:29)。金银忍冬胚囊的发育类型为蓼型。

3 讨论

金银忍冬花药壁的发育过程与已报道的忍冬科蝟实(*Kolkwitzia amabilis* Graebn.)和七子花(*Heptacodium miconioides* Rehd.)的花药壁层发育的资料基本相同^[8-10]。金银忍冬的绒毡层发育类型为变形绒毡层,在雄配子体的发育过程中,绒毡层细胞破裂,原生质体移动至花药腔中,在花药腔中融合形成绒毡层的原生质团,随着发育的进行,绒毡层的周缘质团消失,绒毡层细胞的胞内物质为花粉粒的发育提供营养。

在单核花粉粒刚形成,花粉囊中所有花粉粒仍包被在绒毡层的周缘质团时,就已经出现了空的单

核花粉粒,在花粉成熟散开时,不育花粉只剩下一层花粉壁,细胞质完全丢失。刘林德等在对刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)的研究中发现,刺五加在开花时的花药中有一些空花粉的存在^[11];马虹等在葶苞菊(*Tugarinovia mongolica* Iljin)的雄配子体发育过程中也发现了较多的空花粉出现^[12]。空花粉的出现是雄配子体发育过程中的异常现象,可看作雄性不育的一种表现形式,最终造成花粉产量减少,有性生殖能力降低。有研究认为,不育花粉的产生可能是由于花粉母细胞在减数分裂时出现的染色体异常所造成的。有研究将花粉败育归因于绒毡层异常所致,认为绒毡层对小孢子的发育有营养功能,所以绒毡层的异常会造成小孢子发育的异常:如小麦(*Triticum aestivum* Linn.)、大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)、水稻(*Oryza sativa* Linn.)、高粱(*Sorghum bicolor* Moench)、甜菜(*Beta vulgaris* Linn.)、亚麻(*Linum usitatissimum* Linn.)、胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa*)的不育系花药绒毡层发育不正常,绒毡层肥大生长、延迟退化或提早解体等反常行为,造成花药发育不正常。还有研究认为:不育花粉的产生是由于绒毡层提供的营养较多地转向了药室内壁,而内侧小孢子争取不到发育需要的足够营养,而使原生质体收缩变形,以致解体,最后花粉粒空瘪败育^[13]。我们进一步对金银忍冬的减数分裂过程进行了观察,在我们所用醋酸洋红染色所观察到的减数分裂过程中,染色体的行为并未发现异常现象(结果未展示),且在本文的研究中可以看到,在同一花粉囊中,部分花粉为可育花粉,部分为不育花粉,因此,我们推测:在金银忍冬发育过程中不育空花粉的出现,可能是与绒毡层的发育和营养物质的供应有关,更进一步的原因有待于深入的研究。据我们统计,在一个花粉囊中不育花粉的比例约为 20%。

在雌配子体发育过程中,从较早的四分体形成时期,合点端就出现了几列细胞,这些细胞体积较大,细胞质浓,细胞核染色深,明显不同于周围的珠心细胞,且细胞存留时间较长,在成熟的八核胚囊时期仍可以观察到,我们认为是承珠盘结构。对于倒生胚珠,承珠盘是直接位于胚囊之上和在珠柄进入维管束之下的一群形态特殊的珠心细胞群,在许多植物中都曾有发现。通常认为此群细胞壁厚,且木质化或栓质化。承珠盘在不同植物中出现的时间也

不同^[4],其功能尚不清楚,但是,这些细胞的位置是位于胚囊的合点端且细胞质浓,所以承珠盘很可能起到了从珠被及珠心组织中吸取营养、贮存并转运营养物质到胚囊内的作用^[15-16]。有文献指出:承珠盘不仅在雌配子体发育过程中存在,而且在植物受精后胚发育的一些时期仍存在,此时承珠盘的作用可能是与种子及种皮的快速发育有关^[17]。我们将继续报道有关其后续发育及存在的情况。

本实验通过对金银忍冬雌雄配子体发育的解剖学的研究,为进一步研究金银忍冬的有性生殖过程打下了基础。目前,单倍体育种越来越引起人们的关注,而选择适宜时期做培养材料,则是技术成败的关键。本研究确定了金银忍冬雌雄配子体各发育阶段的时间,为将来的引种栽培、进行单倍体育种和花药组织培养以及更有效开发和利用该植物提供了依据。

参考文献

- [1] The group of Ligneous flora of Boreali-Sinica (华北树木志编写组). Ligneous Flora of Boreali-Sinica [M]. Beijing: China Forest Press, 1983. 643-646. (in Chinese)
- [2] An P Y (安蒲媛), Sun X Q (孙秀琴). Study on germination characteristics of three shrubs seeds [J]. For Sci Tech (林业科技通讯), 1995, 9:11-13. (in Chinese)
- [3] Leng P S (冷平生), Yang X H (杨晓红), Hu Y (胡悦), et al. Studies on the characteristics of photosynthesis and transpiration of five gardening trees [J]. J Beijing Agri coll (北京农学院报), 2000, 15 (4):13-18. (in Chinese)
- [4] Li C H (李春华). The extraction of flavonoids in the leaves of *Lonicera maackii* Maxim [J]. J Agri Univ Hebei (河北农业大学学报), 2003, 26 (3):65-68. (in Chinese)
- [5] Wang F (王飞), Wang B (王冰). Karyotype analysis of *Lonicera japonica* and *L. maackii* [J]. J Chin Medic Mater (中药材), 2005, 28 (3):168-170. (in Chinese)
- [6] Yu H Z (于华忠), Li G Z (李国章), Li G (李贵), et al. Determination of chlorogenic acid in different genus and different part in *Lonicera* [J]. Food Res Develop (食品研究与开发), 2004, 25 (6):108-109. (in Chinese)
- [7] Li Z L (李正理). The technology of making sections in plant tissues [M]. Beijing: Peking University Press, 1996. 130-139. (in Chinese)
- [8] Li Z X (李智选), Zhu W Q (朱文清), Li L (李立). Studies on microsporogenesis and development of male gametophyte in *Kolkwitzia amabilis* [J]. J Northwest Univ (Nat Sci) (西北大学学报自然科学版), 1995, 25 (4):328-330. (in Chinese)
- [9] Hu J Q (胡江琴), Wang L L (王利琳). Studies on the formation of microspores and development of male gametophyte in *Heptacodium miconioides* [J]. Bull Sci Tech (科技通报), 2003, 19 (5):387-391. (in Chinese)
- [10] Zhang Y Q (章月琴), Xu D Q (徐冬青), Cai J J (蔡洁洁). The process of meiosis and genesis of microspore in *Heptacodium miconioides* [J]. Subtrop Plant Sci (亚热带植物科学), 2004, 33 (2):18-20. (in Chinese)
- [11] Liu L D (刘林德), Wang Z L (王仲礼), Tian G W (田国伟), et al. Megasporeogenesis, microsporogenesis, and development of gametophytes in *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae) [J]. Acta Phytotax Sin (植物分类学报), 1998, 36(4):289-297. (in Chinese)
- [12] Ma H (马虹), Wang Y C (王迎春), Cao R (曹瑞), et al. The embryological study of *Tugarinovia mongolica* - megasporeogenesis, microsporogenesis and development of gametophytes [J]. Acta Bot Bor-Occid Sin (西北植物学报), 2000, 20(3):461-466. (in Chinese)
- [13] Zhang L J (张林静), Wang L (王丽), Li Z X (李智选), et al. The microsporogenesis and the malegametophyte development of *Psathyrostachy shuashanica* Keng [J]. J Northwest Univ (Nat Sci) (西北大学学报自然科学版), 2002, 32 (1):77-82. (in Chinese)
- [14] Chen C (陈超), Wang Y Z (王耀芝). Embryological studies in *Rheum palmatum* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1993, 35 (4):261-267.
- [15] Maria C C M, Jorge E A M. Female gametophyte development in *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae - Papilionoideae) [J]. Revista Brasil Bot, 2004, 27 (2):241-248.
- [16] Juliana M, Kathia S M M. Morphology and anatomy of the fruit and seed in development of *Chorisia speciosa* A. St.-Hil.-Bombacaceae [J]. Revista Brasil Bot, 2003, 26:23-34.
- [17] Xue C Y (薛春迎), He T N (何廷农), Liu J Q (刘健全). Embryology of a Tibetan Medicine *Halenia elliptica* [J]. Acta Bot Yunnanica (云南植物研究), 1999, 21(2):212-217. (in Chinese)

图版说明

T: 绒毡层 Tapetum; Ep: 表皮 Epidermis; ML: 中层 Middle layer; En: 药室内壁 Endothecium; Per: 周原质团 Periplasmodium; GC: 生殖细胞 Generative cell; VC: 营养细胞 Vegetative cell; DM: 退化的大孢子 Degenerated megaspores; PN: 极核 Polar nucleus; Sy: 助细胞 Synergid cell; EC: 卵细胞 Egg cell; Ant: 反足细胞 Antipodal cell; IT: 珠被绒毡层 Integumentary tapetum; Hy: 承珠盘 Hypostase.

图版 I

金银忍冬小孢子发生

1. 未分化的雄蕊原基;
2. 造孢时期的花药;
3. 小孢子母细胞时期, 箭头(↑)示具有四层细胞的花粉囊壁;
4. 小孢子母细胞减数分裂时期, 箭头(↑)示多核的绒毡层细胞;
5. 多核的绒毡层细胞;
6. 四分体时期, 箭头(↑)示四分体和开始降解的绒毡层;
7. 四分体释放出小孢子, 箭头(↑)示变形绒毡层形成的周缘质团;

8. 单核花粉粒时期, 箭头(↑)示不育花粉粒;
9. 成熟花粉粒时期, 箭头(↑)示不育花粉粒;
10. 四面体型小孢子四分体;
11. 单核花粉, 箭头(↑)示细胞核;
12. 二核细胞花粉, 箭头(↑)示营养细胞核和生殖细胞核;
13. 生殖细胞逐渐融合到营养细胞中, 箭头(↑)示营养细胞核和生殖细胞核;
14. 成熟的 3-细胞花粉, 箭头(↑)示营养细胞核和生殖细胞核。

图版 II

金银忍冬大孢子发生

15. 箭头(↑)示孢原细胞;
16. 箭头(↑)示大孢子母细胞;
17. 直列大孢子四分体, 箭头(↑)示四分体细胞;
18. T-形排列大孢子四分体, 箭头(↑)示四分体细胞;
19. 合点端功能性大孢子, 箭头(↑)示功能性大孢子和退化的细胞;
20. 单核胚囊;
21. 二核胚囊;
- 22-24. 连续切片示四核胚囊, 箭头(↑)示胚囊中的四核;
25. 箭头(↑)示两极核;
26. 箭头(↑)示两助细胞;
27. 箭头(↑)示卵细胞;
28. 箭头(↑)示 3 个反足细胞;
29. 成熟胚珠, 箭头(↑)示珠被绒毡层和承珠盘结构。

Explanation of plates

Plate I

Microsporogenesis of *L. maackii*

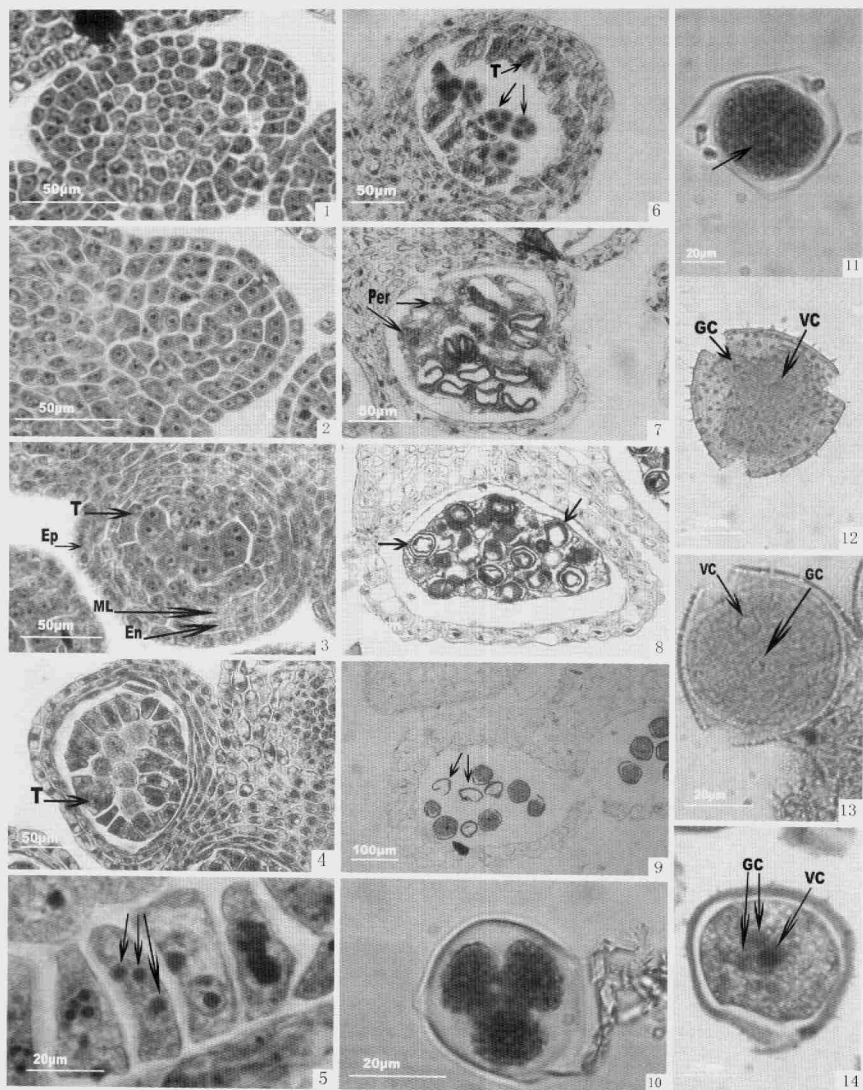
1. The undifferentiated staminate primordia;
2. Sporogenous anther tissue;

3. Microspore mother cells surrounded by anther wall with four layers in a pollen sac;
4. Meiotic division of microspore mother cells and multinucleate tapetum;
5. Nuclei in tapetum cell;
6. Tetrahedral microspore tetrads and the degenerated tapetum;
7. Periplasmodium from amoeboid tapetum;
8. Uninucleate pollen grains and sterile pollens (in the direction of arrows);
9. Mature pollen grains and sterile pollens;
10. Tetrahedral microspore tetrad;
11. Nuclear in a uninucleate pollen grain;
12. Two-celled pollen grain with a vegetative and a generative cell;
13. The generative cell moving into the vegetative cell;
14. Three-celled pollen with a vegetative and two generative cells.

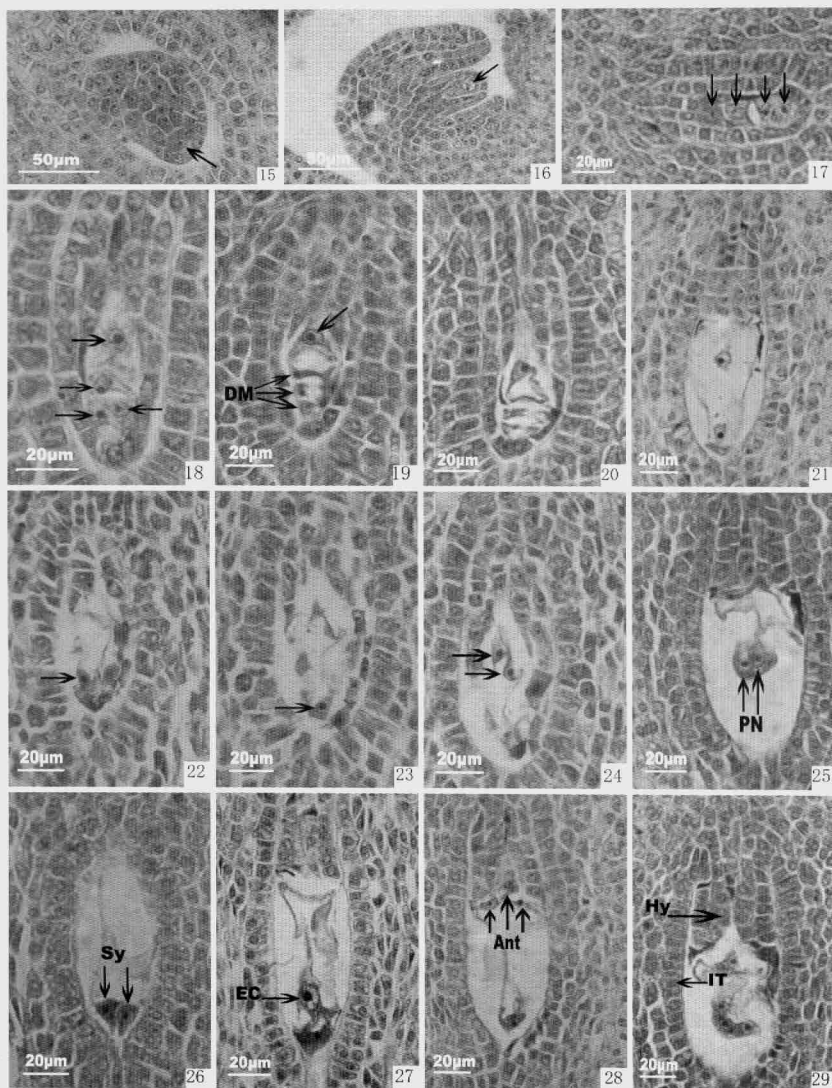
Plate II

Megasporogenesis in *L. maackii*

15. Archesporial stage;
16. Megaspore mother cell;
17. Linear megaspore tetrad;
18. T-shaped megaspore tetrad;
19. The functional megaspore at the end of chalaza and the degenerated cells;
20. Uninucleate embryo sac;
21. Binucleate embryo sac;
- 22-24. Nuclei in four-nucleate embryo sac;
25. Two polar nuclei;
26. Two synergid cells;
27. Egg cell;
28. Three antipodal cells;
29. Mature embryo sac surrounded by integumentary tapetum and hypostase.



许珂等: 图版 I



许珂等:图版 II