

罗汉果大孢子发生及雌配子体发育与花部形态、胚珠变化的关系

董志渊^{1,2,3}, 马小军^{1,2,4*}, 周光雄³

(1. 中国医学科学院药用植物研究所广西分所, 南宁 530023; 2. 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530023; 3. 暨南大学, 广州 510632; 4. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 为弄清罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)大孢子发生、雌配子体发育过程与花部形态特征、胚珠的关系, 运用石蜡切片法对罗汉果子房进行了显微观察。结果表明, 罗汉果的胚珠倒生, 双珠被, 厚珠心, 大孢子四分体呈线型排列, 合点端一个大孢子分化为功能大孢子, 成熟胚囊为蓼型。花蕾形态、胚珠变化与大孢子发生、雌配子体的发育时期具有一定相关性, 当子房长度为 $7.0\text{ mm} \leq L < 9.0\text{ mm}$, 珠心呈椭圆形时, 约有 45.83% 的大孢子母细胞处于减数分裂时期。因此, 依据罗汉果花部形态可有效确定大孢子发生与雌配子体发育的时期。

关键词: 罗汉果; 大孢子发生; 雌配子体; 花; 胚珠; 形态

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.03.008

Relationship between Megasporogenesis, Development of Female Gametophyte and Related Morphological Changes of Flower, Ovule in *Siraitia grosvenorii*

DONG Zhi-yuan^{1,2,3}, MA Xiao-jun^{1,2,4*}, ZHOU Guang-xiong³

(1. Guangxi Branch, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Nanning 530023, China; 3. Jinan University, Guangzhou 510632, China; 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The aim of this study was to find the relationship between megasporogenesis, development of female gametophyte and morphological changes of flower, ovule in *Siraitia grosvenorii*. The ovaries were observed under light microscope by means of paraffin wax fixation. The results showed that ovule of *Siraitia grosvenorii* was anatropous, bitegmic and crassinucellar. The chalazal megaspore of linear tetrad developed into *Polygonum*-type embryo sac. Morphological changes of flower and ovule indicated different developmental stages of megasporogenesis and female gametophyte. As the length of ovary ranged from 7 to 9 mm and the nucellus were oval-shape, 45.83% megaspore mother cells were at the stage of meiosis. These suggested that the morphological characteristics of flower and ovule could be used to distinguish different stages of megasporogenesis and female gametophyte development of *Siraitia grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; Megasporogenesis; Female gametophyte; Flower; Ovule; Morphology

收稿日期: 2012-07-16

接受日期: 2012-10-31

基金项目: 广西药用植物园青年基金项目(桂药基 20); 国家科技部支撑计划课题(2011BAI01B03)资助

作者简介: 董志渊, 博士, 主要从事药用植物品种选育与繁育研究。E-mail: yndongzhiyuan@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xjma@public.bta.net.cn

罗汉果[*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang]为葫芦科(Cucurbitaceae)罗汉果属多年生藤本植物,具有止咳祛痰、凉血舒胃、润肠通便等功效,是广西重要的道地药材^[1]。由于在生产中长期推广应用人工栽培和组培苗、扦插苗,罗汉果遗传资源日趋狭窄,品种混杂退化,严重影响了罗汉果的产量和品质^[2-3]。

目前,主要采用单株优选,组培繁育的方法进行罗汉果新品种培育^[4-5]。通过诱导大孢子染色体加倍产生未减数配子,并与正常二倍体植株杂交,可高效获得遗传变异丰富的多倍体种质材料,是培育有效成分含量高的无籽罗汉果新品种的有效新途径。在诱导大孢子染色体加倍中,雌配子体发育时期是决定诱导率的关键因素之一。依据未减数雌配子发生机制,一般应选择大孢子母细胞减数分裂时期进行处理^[6]。本研究以罗汉果主要栽培品种‘青皮果’为研究材料,该品种具有结实早、产量高、适应性强、甜甙V含量高的特点。采用石蜡切片法对罗汉果的大孢子发生、雌配子体发育及其花部形态、胚珠变化关系进行研究,为未减数雌配子诱导等实验取材提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

罗汉果[*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang]品种‘青皮果’,于2011年7、8月间在广西壮族自治区永福县堡里乡进行

采样。

1.2 方法

随机采集罗汉果健康雌株不同发育时期的子房。依据雌花子房的长度、颜色,花萼和花瓣的颜色,将罗汉果雌花发育过程分为5个形态阶段(图1)。形态阶段Ⅰ:子房上部明显收缩,棕黄色,花萼淡绿色,子房长度为 $4.0\text{ mm} \leq L < 5.0\text{ mm}$;形态阶段Ⅱ:子房未明显膨大,花萼绿色花瓣露出,深绿色,子房长度为 $5.0\text{ mm} \leq L < 7.0\text{ mm}$;形态阶段Ⅲ:子房明显膨大,呈弧型,子房长度为 $7.0\text{ mm} \leq L < 9.0\text{ mm}$;形态阶段Ⅳ:花萼、花瓣明显伸长,部分花瓣裂开,子房长度为 $9.0\text{ mm} \leq L < 11.0\text{ mm}$;形态阶段Ⅴ:花瓣伸长,花瓣上部黄色,下部棕黄色,子房长度为 $11.0\text{ mm} \leq L < 14.0\text{ mm}$ 。分别切取不同形态阶段雌花的子房中部(厚度约3 mm),采用FAA固定液固定保存。

2011年8-12月,在中国医学科学院药用植物研究所广西分所采用常规石蜡切片法进行切片和观察。每一形态阶段取20个样品,切片厚度 $10\text{ }\mu\text{m}$,硫酸铁铵苏木精染色。Leica DM2000型光学显微镜下观察与摄影。统计各发育时期频率。

本研究将罗汉果大孢子发生和雌配子体发育时期分为:大孢子母细胞、减数分裂、单核胚囊、双核胚囊、四核胚囊和八核胚囊等6个时期。不同形态阶段的发育时期频率按公式计算:某一发育时期频率=某一发育时期数目/观察的发育时期数目 $\times 100\%$ 。

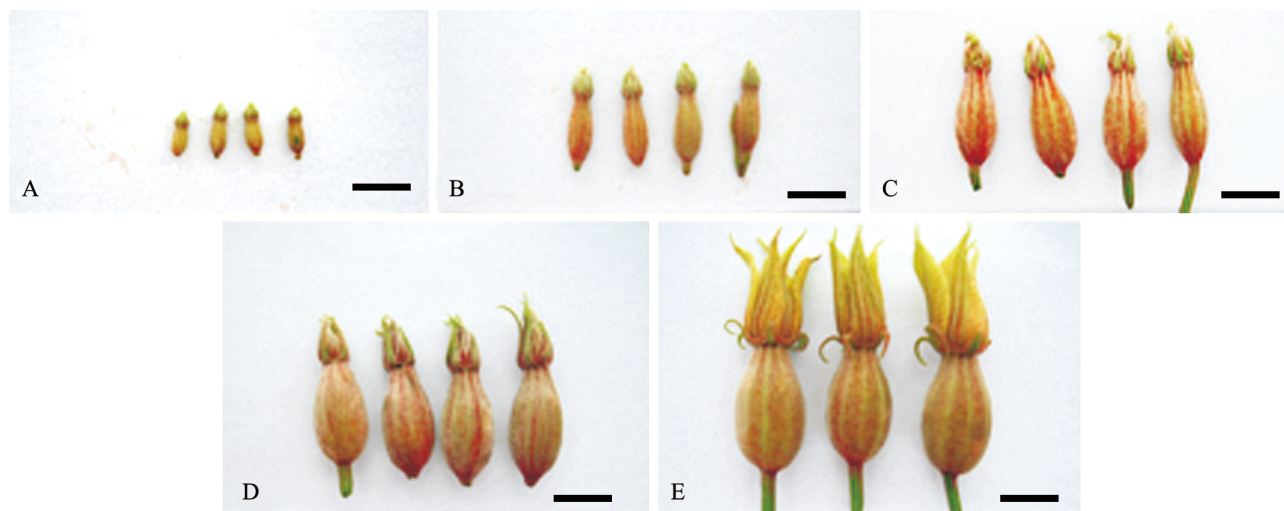


图1 罗汉果雌花发育的形态阶段。A~E. 形态阶段Ⅰ~Ⅴ; 标尺=5 mm

Fig. 1 Morphological stages of female flowers in *Siraitia grosvenorii*. A-E. Morphological stages from I to V, respectively. Bars = 5 mm

2 结果

显微观察表明,罗汉果大孢子发生、雌配子体发育过程可分为 5 个形态阶段(表 1)。

形态阶段 I :100% 的胚珠处于大孢子母细胞

时期,大孢子母细胞体积大,细胞质浓密,核仁明显(图 2:A);胚珠突起,呈 60° ~ 90° 弯曲,内外珠被均未分化,厚珠心,大孢子母细胞位于珠心表皮 2 ~ 3 层细胞的下面(图 3:A)。

形态阶段 II : 100% 的胚珠处于大孢子母细胞

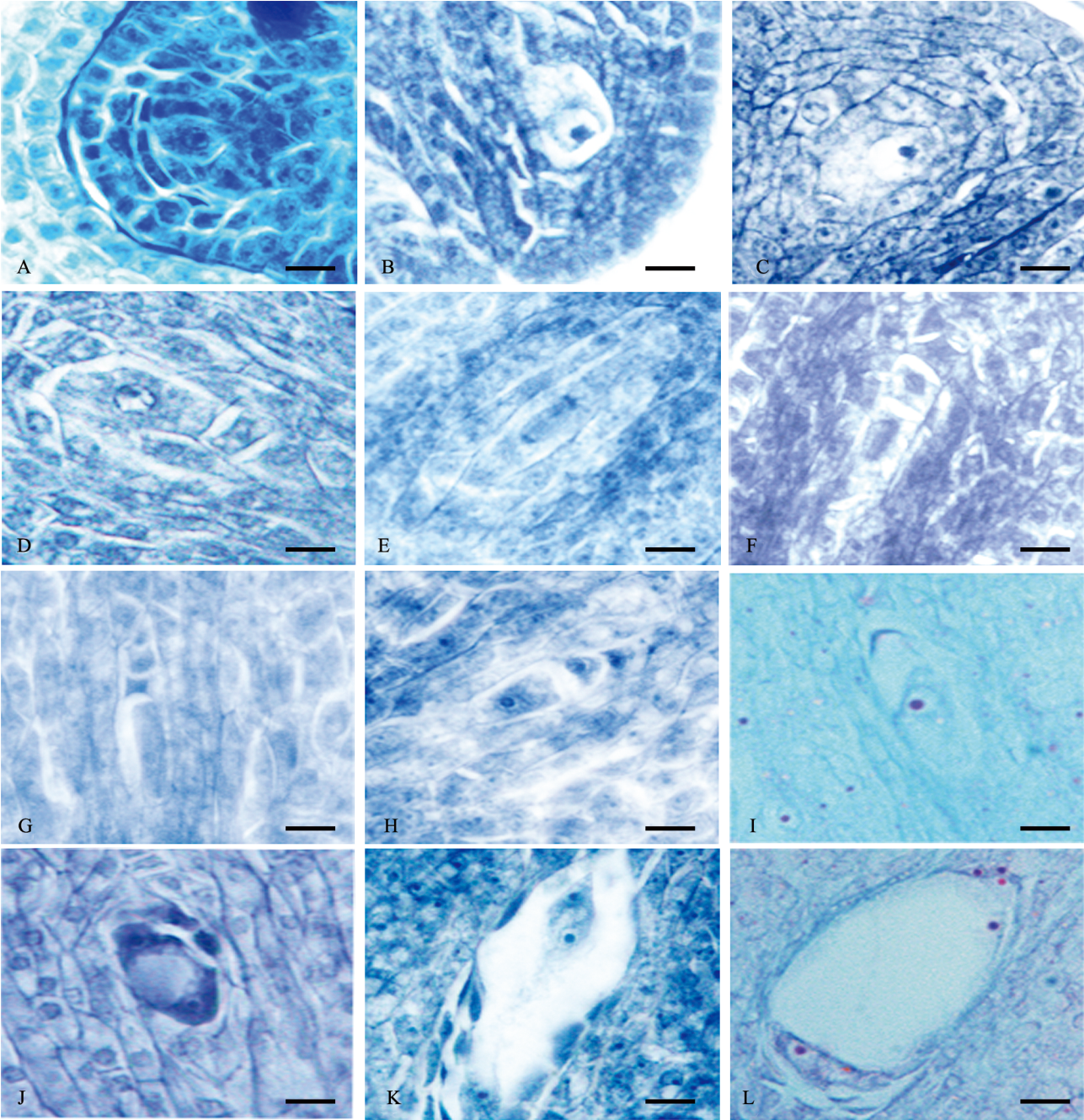


图2 罗汉果大孢子发生与雌配子体发育过程。A~D. 大孢子母细胞; E. 大孢子母细胞第一次减数分裂; F. 大孢子母细胞第二次减数分裂; G,H. 四分体; I. 单核胚囊; J. 二核胚囊; K. 四核胚囊; L. 成熟八核胚囊。标尺 = 10 μm

Fig. 2 Megasporogenesis and female gametophyte development of *Siraitia grosvenorii*. A – D. Megaspore mother cell; E. Megaspore mother cell meiosis I; F. Megaspore mother cell meiosis II; G – H. Tetrad; I. Mononuclear embryo sac; J. Two-nucleate embryo sac; K. Four-nucleate embryo sac; L. Eight-nucleate embryo sac. Bars = 10 μm

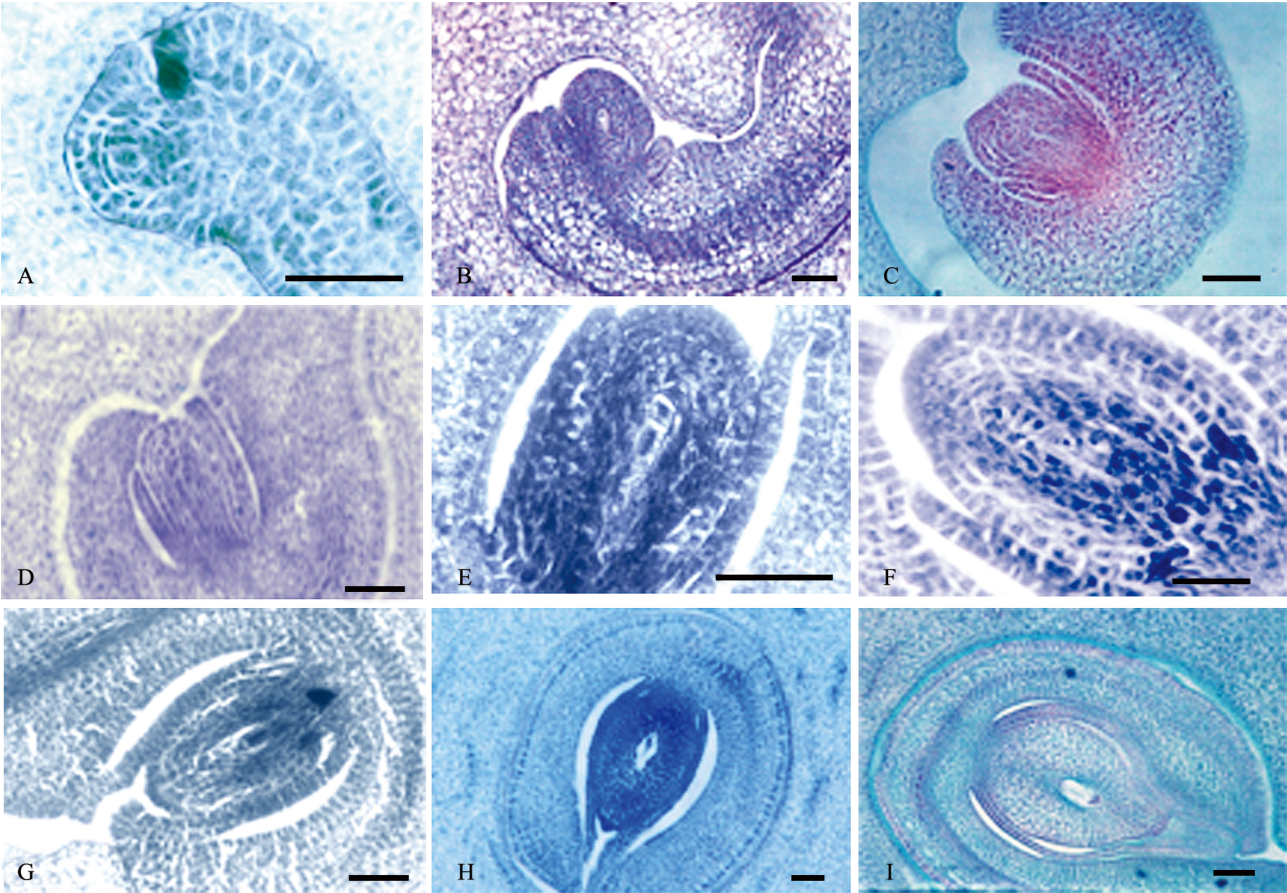


图 3 罗汉果大孢子发生与雌配子体发育过程中的胚珠形态特征变化。A ~ D. 大孢子母细胞时期；E. 减数分裂时期；F. 单核胚囊时期；G. 双核胚囊时期；H. 四核胚囊时期；I. 八核胚囊时期。标尺 = 50 μm

Fig. 3 Ovule morphology of megasporogenesis and development of female gametophyte of *Siraitia grosvenorii*. A – D. Megaspore mother cell; E. Megaspore mother cell meiosis; F. Mononuclear embryo sac; G. Two-nucleate embryo sac; H. Four-nucleate embryo sac; I. Eight-nucleate embryo sac. Bars = 50 μm

表 1 罗汉果不同形态阶段的大孢子发生与雌配子体发育进程

Table 1 Megasporogenesis and development of female gametophyte of *Siraitia grosvenorii* at different morphological stages

阶段 Stage	大孢子母细胞 Megaspore mother cell	减数分裂 Meiosis	单核胚囊 Mononuclear embryo sac	双核胚囊 Dionuclear embryo sac	四核胚囊 Quadrangular embryo sac	八核胚囊 Eight- nucleous embryo sac
I	51 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
II	42 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
III	36 (50.00%)	33 (45.83%)	3 (4.17%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
IV	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (3.45%)	21 (24.14%)	48 (55.17%)	15 (17.24%)
V	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	38 (100.00%)

时期,但大孢子母细胞形态发生一定变化,胚珠表皮下的珠心细胞不断分裂,大孢子母细胞逐步进入胚珠的中部,细胞体积不断增大,形状由卵型逐渐变化为长椭圆型(图 2:B ~ D),胚珠呈 120° ~ 160°

弯曲,内珠被、外珠被形成并伸长,外珠被由“碗”型(图 3:B)发育为“杯”型(图 3:C,D),珠心由短倒卵型发育为长倒卵形。

形态阶段Ⅲ:珠心内细胞不断分裂,大孢子母

细胞逐渐进入胚珠内部,近 50% 大孢子母细胞进入减数分裂时期(图 2:E,F),形成四分体,呈线形排列,珠孔端的 3 个大孢子逐渐解体,合点端的大孢子形成功能大孢子(图 2:G,H),内珠被、外珠被进一步伸长,珠心呈椭圆型(图 3:E)。

形态阶段Ⅳ:合点端大孢子体积不断增加,出现液泡,发育形成单核胚囊(图 2:I),胚珠呈 160°~180° 弯曲(图 3:F);单核胚囊经过一次有丝分裂,形成二核胚囊(图 2:J),胚珠近 180° 弯曲,珠心宽卵型,钝尖(图 3:G);两核移向两端,各进行一次有丝分裂形成四核胚囊(图 2:K),胚珠 180° 弯曲,珠心卵型,锐尖(图 3:H);四核各进行一次有丝分裂形成八核胚囊(图 2:L),内珠被合拢呈闭合状(图 3:I)。

形态阶段Ⅴ:雌配子体发育处于成熟的八核胚囊时期,成熟胚囊为蓼型。

3 讨论

本研究结果表明,罗汉果胚珠倒生,二层珠被,大孢子减数分裂形成的 4 个大孢子线形排列,合点端的大孢子形成功能大孢子,珠孔端的 3 个大孢子逐渐解体,成熟胚囊为蓼型。这与张振珏等^[7]的观察结果相同。

在花药培养、游离小孢子培养、未授粉子房培养和未减数配子人工诱导等研究中,选取特定发育时期的材料进行培养或诱导,是实验成功与否的关键^[8-11]。由于采用肉眼无法观察植物配子体的发育时期,研究中一般根据植物花部形态特征来确定配子体发育时期^[12-15]。

关于雌配子体发育时期的确定,目前主要通过花部形态特征、雄配子体与雌配子体发育时期的对应关系等途径进行确定。董美芳等^[16]研究了小盐芥(*Thellungiella halophila*)花蕾长度等花蕾外部形态特征与雌配子体发育的对应关系。王艳杰和申家恒^[17]研究了柴胡(*Bupleurum chinense*)花蕾大小与雌雄配子体发育的对应关系。高鹏等^[18]根据雌雄配子体发生、发育的时序性对应关系,根据小孢子发育进程对杜仲(*Eucommia ulmoides*)大孢子母细胞减数分裂时期进行判别。

罗汉果为雌雄异株植物,不能采用雄配子体与雌配子体发育时期的对应关系确定雌配子体的发育时期,而只能采用花部形态特征途径确定雌配子体的发育时期。本研究结果表明,罗汉果大孢子

发生、雌配子体发育与花部形态特征具有一定相关性,可通过子房长度、花萼颜色、子房形状等花部形态特征确定雌配子体发育时期;同时,雌配子体发育不同时期,珠心的性状、胚珠生长方向等胚珠形态存在显著差异。因此,研究中也可采用透明-压片的简易方法^[19],通过观察胚珠外部形态特征,确定罗汉果雌配子体发育时期。

根据本研究结果,罗汉果的雌花处于形态阶段Ⅲ,子房明显膨大,呈弧型,子房长度为 $7.0\text{ mm} \leq L < 9.0\text{ mm}$,珠心呈椭圆形,近 50% 大孢子母细胞进入减数分裂时期,此时适宜进行未减数雌配子诱导。

参考文献

- [1] Lu A M, Zhang Z Y. The genus *Siraitia* Merr. in China [J]. Guihaia, 1984, 4(1): 27-33.
路安民, 张志耘. 中国罗汉果属植物 [J]. 广西植物, 1984, 4(1): 27-33.
- [2] Zhou C Y, Jiang J S. Production status and development strategy of luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) in Yongfu County [J]. Guangxi Agri Sci, 2003(6): 3-4.
周昌远, 蒋纪森. 永福县罗汉果生产现状及发展对策 [J]. 广西农业科学, 2003(6): 3-4.
- [3] Zhou J Y, Tang S Q. Genetic diversity of cultivated luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) revealed by RAPD markers [J]. Mol Plant Breed, 2006, 4(1): 71-78.
周俊亚, 唐绍清. 栽培罗汉果遗传多样性的RAPD分析 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 71-78.
- [4] Ma X J, Mo C M, Bai L H, et al. A new *Siraitia grosvenorii* cultivar 'Yongqing 1' [J]. Acta Hort Sin, 2008, 35(12): 1855.
马小军, 莫长明, 白隆华, 等. 罗汉果新品种'永青1号' [J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1855.
- [5] Ma X J, Mo C M, Bai L H, et al. A new *Siraitia grosvenorii* cultivar 'Pufeng Qingpi' [J]. Acta Hort Sin, 2009, 36(2): 310.
马小军, 莫长明, 白隆华, 等. 罗汉果新品种'普丰青皮' [J]. 园艺学报, 2009, 36(2): 310.
- [6] Werner J E, Peloquin S J. Frequency and mechanisms of $2n$ egg formation in haploid tuberosum-wild speices F_1 hybrids [J]. Amer Potato J, 1987, 64(12): 641-65.
- [7] Zhang Z J, Mo T X, Qian N F. Megasporogenesis, microsporogenesis and development of female and male gametophyte in *Siraitia grosvenorii* [J]. Acta Bot Sin, 1990, 32(2): 157-159.
张振珏, 莫庭旭, 钱南芬. 罗汉果大小孢子发生与雌雄配子体发育 [J]. 植物学报, 1990, 32(2), 157-159.
- [8] Wu C H, Liang C Y, Ye X L. Progress in studies on *in vitro* culture of unfertilized ovules and ovaries in angiosperms [J]. J Trop Subtrop Bot, 2004, 12(6): 580-586.

- 伍成厚, 梁承邨, 叶秀麟. 被子植物未受精胚珠与子房离体培养的研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 580–586.
- [9] Ferrie A M R, Caswell K L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, 104(3): 301–309.
- [10] Dunwell J M. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation [J]. Plant Biotechnol J, 2010, 8(4): 377–424.
- [11] Pécirix Y, Rallo G, Folzer H, et al. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. [J]. J Exp Bot, 2011, 62(10): 3587–3597.
- [12] Han X L, Tian X M, Jia G X. Induction of haploid plantlets for *Lilium* $\times$ *formolongi* [J]. Acta Hort Sin, 2010, 37(2): 263–268.
韩秀丽, 田晓明, 贾桂霞. 新铁炮百合单倍体植株的诱导 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 263–268.
- [13] Pan L, Yang T Z. Studies on the induction of embryoid from unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin, 2000, 20(1): 59–63.
潘莉, 杨铁钊. 烟草未授粉子房胚状体诱导的研究 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(1): 59–63.
- [14] Dong Z Y, Guo H C. Inducement of unreduced pollen in *Dioscorea parviflora* [J]. J W China For Sci, 2008, 37(3): 6–12.
董志渊, 郭华春. 小花盾叶薯蓣未减数花粉的人工诱导研究 [J]. 西部林业科学, 2008, 37(3): 6–12.
- [15] Dewitte A, Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, et al. Induction of $2n$ pollen formation in *Begonia* by trifluralin and N_2O treatments [J]. Euphytica, 2010, 171(2): 283–293.
- [16] Dong M F, Hu N, Shang F D. Megasporogenesis and female gametophyte development of *Thelluniella halophila* [J]. Chin Bull Bot, 2006, 23(6): 658–664.
董美芳, 胡楠, 尚富德. 小盐芥大孢子发生和雌配子体发育 [J]. 植物学通报, 2006, 23(6): 658–664.
- [17] Wang Y J, Shen J H. Megasporogenesis, microsporogenesis and development of female and male gametophyte of *Bupleurum chinense* [J]. Chin Bull Bot, 2007, 24(3): 425–432.
王艳杰, 申家恒. 柴胡大、小孢子发生及雌、雄配子体发育 [J]. 植物学通报, 2007, 24(3): 425–432.
- [18] Gao P, Kang X Y, Zhang P D, et al. Corresponding relation between MMC and PMC meiosis of *Eucommia ulmoides* [J]. J Beijing For Univ, 2006, 28(1): 60–64.
高鹏, 康向阳, 张平冬, 等. 杜仲大小孢子母细胞减数分裂进程对应关系的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(1): 60–64.
- [19] Hao J H, Qiang S. The examples and analysis of wholemount clearing techniques in plant biology [J]. Chin Bull Bot, 2007, 24(4): 490–497.
郝建华, 强胜. 整体透明技术在植物生物学中的应用实例及其剖析 [J]. 植物学通报, 2007, 24(4): 490–497.