

濒危植物马蹄参的大孢子发生和雌配子体发育

杜夏瑾^{1,2}, 钟恒安¹, 黎啸峰¹, 王丽^{3*}

(1. 中南大学生命科学学院, 长沙 410013; 2. 中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650; 3. 南京审计大学自然资源与环境审计研究院, 南京 211815)

摘要: 为探讨马蹄参(*Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz.)濒危机制与雌性生殖发育的关系, 采用石蜡切片法观察马蹄参大孢子形成和雌配子体的发育过程。结果表明, 马蹄参雌蕊单心皮, 子房下位, 1室, 1枚胚珠。胚珠横生于短片状胎座上, 具单珠被, 厚珠心。单孢原细胞自珠心1~2层表皮细胞处分化; 大孢子四分体为直线形。成熟胚囊中, 2个极核在受精前融合为次生核, 3个反足细胞不发达, 较早退化; 二核胚囊时期出现二核分裂不均且较小核退化消失的异常发育现象。因此, 马蹄参雌配子体发育过程中出现异常现象是造成其结实率低的主要原因。

关键词: 马蹄参; 大孢子; 雌配子体; 发育

doi: 10.11926/jtsb.3696

Megasporogenesis and Development of Female Gametophyte of Endangered Plant *Diplopanax stachyanthus*

DU Xia-jin^{1,2}, ZHONG Heng-an¹, LI Xiao-feng¹, WANG Li^{3*}

(1. School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 3. Institute of Natural Resources and Environmental Audit, Nanjing Audit University, Nanjing 211815, China)

Abstract: In order to understanding the relationship between the endangered mechanism and the female reproductive development of *Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz., the megasporogenesis and development of female gametophytes were observed by using the paraffin section method. The results showed that the pistil of *D. stachyanthus* was single carpel, ovary inferior with one locule and one ovule. The amphitropous ovule located on a short flake placenta with single integument and thick nucellus. The single sporogonium differentiated from epidermis of nucellus; the megaspore tetrad was linear. In mature embryo sac, two polar nuclei fused into secondary nucleus before fertilization, three antipodal cells were undeveloped and degraded. The abnormal development happened at 2-nucleate embryo sac stage, two nuclei division was uneven and the small nuclei degenerated and disappeared. Therefore, it was suggested that the abnormal development of *D. stachyanthus* female gametophyte was the main reason for low setting rate.

Key words: *Diplopanax stachyanthus*; Megaspore; Femal gametophyte; Development

马蹄参(*Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz.)为常绿乔木, 高15~25 m, 主要分布于中国广西、广东、湖南、贵州、云南及越南北部^[1]。马蹄参是

第四纪冰川幸存的古老孑遗植物之一, 由于气候变化、人为干扰等原因, 文献记载原有分布的很多地方都未见其分布, 现存数量有限, 已被列为国家II

收稿日期: 2016-11-14

接受日期: 2017-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270700, 30800088); 湖南省自然科学基金项目(13JJ2006)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31270700, 30800088), and the Natural Science Foundation of Hunan Province (Grant No. 13JJ2006).

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangli@csu.edu.cn

级重点保护植物和活化石植物^[2]。

引起植物濒危的原因有很多,如遗传多样性低、传粉效率低、种子萌发率低、生态位狭小、物种竞争激烈、生境破坏、人类活动干扰等^[3]。其中,有性生殖过程异常是引起植物濒危的主要原因之一^[4]。本研究采用石蜡切片法对马蹄参大孢子发生和雌配子体形成过程进行观察,从生殖生物学角度探讨马蹄参濒危是否与其大孢子发生和雌配子发育异常有关,从而为马蹄参保育措施的制定及资源开发利用提供生殖生物学方面的理论依据。

另外,马蹄参的系统学位置长期存在争议。奥地利植物分类学家^[2]根据其具花标本将其归为五加科(Araliaceae);曾沧江^[5]将马蹄参与古植物 *Tectocarya rhenana* F. Kirchh. 进行比较,将其置于山茱萸科(Cornaceae);朱伟华等对马蹄参进行解剖观察,认为其叶表面、花瓣及花萼上着生单细胞的二叉毛,不具分泌道等特征与五加科特征不一致^[6];李耀利对单室山茱萸属(*Macrocarpium* Nakai.)的 27 个类群的 *rbcl* 进行分析,认为马蹄参归为山茱萸科较为合适^[7]。胚胎学研究涉及花药、胚珠和种子的发育,其中多个性状可用来探讨科间或科内关系^[8],而关于马蹄参的胚胎学研究至今未有详尽报道。本研究通过对马蹄参大孢子发生和雌配子体形成过程的观察,以期了解马蹄参属植物的胚胎学特征,并进一步探讨其系统位置。

1 材料和方法

马蹄参(*Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz.)的花芽(或花蕾)采自湖南莽山自然保护区和广东南岭国家级自然保护区。马蹄参每年 6 月开花,从 4 月份开始采集实验材料,每次随机选取 5 个花芽或花蕾,每隔 1 d 采样 1 次,直至 6 月底受精结束,花朵脱落。用改良的 FAA 固定液(50%乙醇:冰醋酸:甲醛=90:6:4)固定,采用常规石蜡切片法^[9]制片,切片厚度 5~7 μm,苏木精染色,中性树脂胶封片,用 Nikon 80i 显微镜观察并照相。

2 结果和分析

2.1 大孢子发生

雌蕊分化初期,在心皮内侧沿心皮边缘结合处的细胞向子房腔内迅速生长,形成圆锥状的胚珠原基(图 1: A)。随着进一步分化,原基前端形成珠心,

基部发育为珠柄,在靠珠心基部发生一环状突起,发展为珠被,同时,在珠心的顶端表皮下分化出 1 个孢原细胞(图 1: B),细胞质浓、核大,明显区别于其他珠心细胞。随后,孢原细胞通过平周分裂产生 1 个周缘细胞和 1 个造孢细胞,造孢细胞即为大孢子母细胞,而周缘细胞经多次分裂,将大孢子母细胞与珠心表皮细胞分隔开来(图 1: C)。大孢子母细胞经第一次减数分裂形成二分体(图 1: D),第二次减数分裂形成 4 个大孢子细胞,4 个大孢子细胞呈线形排列(图 1: E)。合点端的 1 个大孢子体积逐渐增大,发育成为功能大孢子,其余的 3 个大孢子细胞逐渐变小,最终退化消失(图 1: F)。功能大孢子形成时,体积小,核大;随着功能大孢子继续发育,体积增大,沿珠心纵轴方向生长,逐渐占据珠心内部,形成单核胚囊(图 1: G)。

2.2 雌配子体形成

单核胚囊中的细胞核逐渐移至胚囊中部,进行有丝分裂形成 2 个核(图 1: H)。随着胚囊体积的增大,2 个核分离,移向两极(图 1: I),继续进行第 2 次有丝分裂,形成四核胚囊(图 1: J, K)。此时,胚囊体积继续增大,并沿纵轴伸长。不久,四核胚囊中的 4 个核同时进行一次有丝分裂,形成八核胚囊。八核胚囊中,珠孔端和合点端各有 1 个核在液泡的作用下逐渐向胚囊中部运动,形成 2 个极核(图 1: L),珠孔端的 3 个核形成卵器,合点端的 3 个核形成反足细胞(图 1: M)。反足细胞不久即退化消失,中央细胞含有的 2 个极核融合成 1 个次生核(图 1: N),最终形成具有八核七细胞的成熟胚囊。

2.3 雌配子体发育过程中的异常现象

对马蹄参雌配子体发育过程进行观察,马蹄参雌蕊外部形态均正常,但有时胚珠发育会出现异常现象。

(1) 在四分体发育过程中,当合点端功能大孢子发生败育时,表现为由珠孔端前 3 个大孢子细胞随机 1 个继续发育为功能大孢子(图 1: O, P)。

(2) 单核胚囊发育成八核胚囊的过程中,正常发育的二核胚囊和四核胚囊较少。较多二核胚囊中的 2 个核并非均等分裂,而是位于珠孔端的核较小,细胞核不明显,细胞核膜模糊,核仁不规则,体积约为另 1 个核的一半,且较大的核位于囊腔中央(图

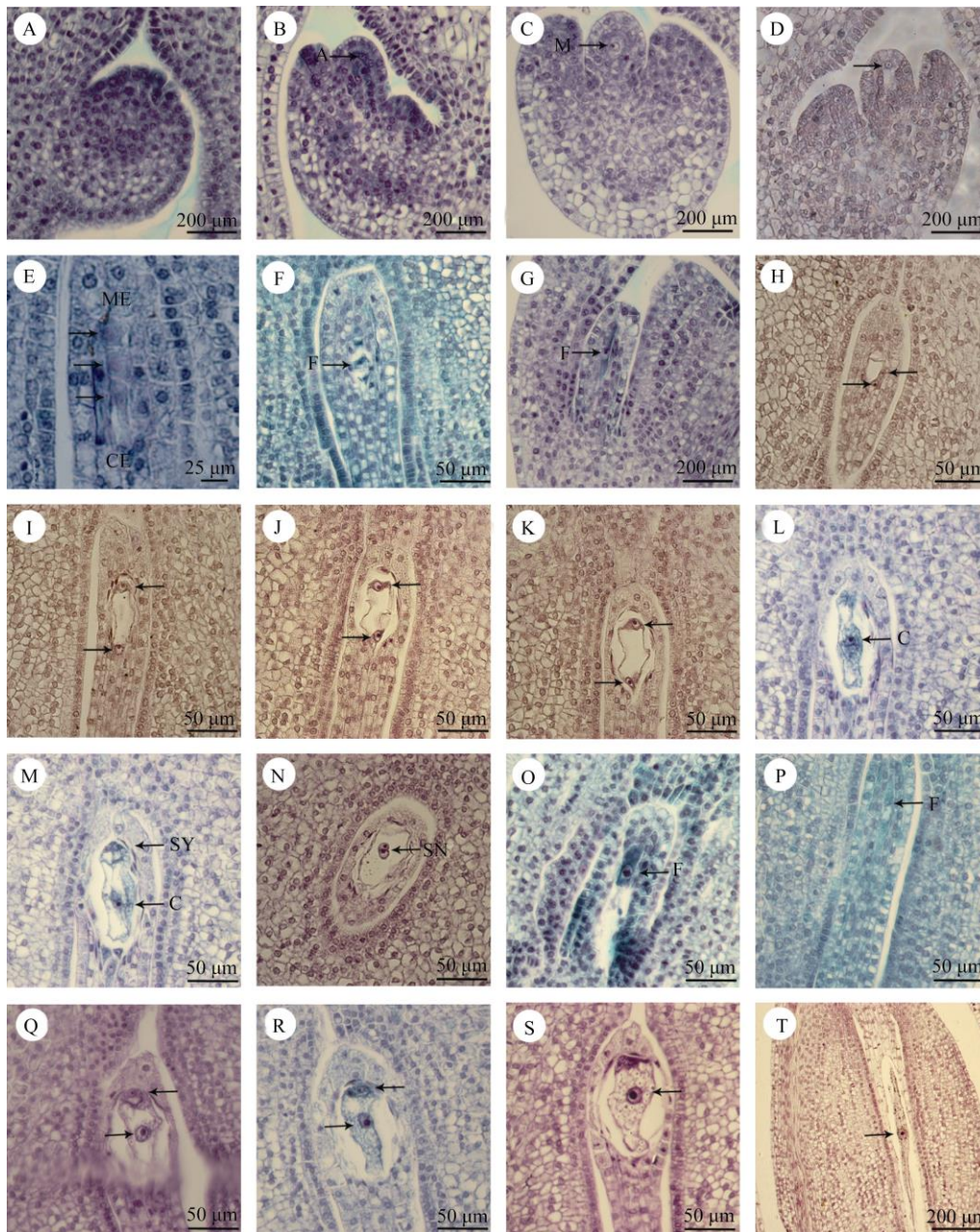


图1 马蹄参大孢子发生和雌配子体形成。A: 孢原细胞; M: 大孢子母细胞; F: 功能大孢子; C: 中央细胞; E: 卵细胞; SY: 助细胞; SN: 次生核; ME: 珠孔端; CE: 合点端。A: 胚珠原基; B: 表皮细胞分化出的单孢原细胞; C: 由孢原细胞直接发育成的大孢子母细胞; D: 大孢子二分体; E: 大孢子四分体; F: 合点端的大孢子发育为功能大孢子, 其余3个细胞退化; G: 单核胚囊; H: 单核胚囊有丝分裂形成2个核; I: 二核胚囊; J, K: 四核胚囊; L, M: 八核胚囊; N: 两个极核; O: 珠孔端第1个细胞发育为功能大孢子; P: 珠孔端第2个细胞发育为功能大孢子; Q, R: 二核胚囊期细胞不均等分裂; S: 二核胚囊后期一核逐渐消失; T: 开花期的单核胚囊。

Fig. 1 Megasporogenesis and development of female gametophyte of *Diplopanax stachyanthus*. A: Sporogonium; M: Megaspore mother cell; F: Functional megaspore; C: Central cell; E: Egg cell; SY: Synergid; SN: Secondary nucleus; ME: Micropylar end; CE: Chalazal end. A: Ovule primordium; B: Single sporogonium differentiate from epidermis cell; C: Megaspore mother cell derives from the sporogonium; D: Megaspore dyad; E: Megaspore tetrad; F: Megaspore in chalazal end develops into functional megaspore, another three cells degenerate; G: Uninucleate embryo sac; H: Two nuclei are formed by mitosis in uninucleate embryo sac; I: Two nuclear embryo sac; J, K: Four nuclear embryo sac; L, M: Eight nuclear embryo sac; N: Two polar nucleus; O: The first cell in micropylar end develops into functional megaspore; P: The second cell in micropylar end develops into functional megaspore; Q, R: Uneven division at two-nuclear embryo sac stage; S: One nucleus disappear gradually at later two-nuclear embryo sac stage; T: Mononuclear embryo sac at anthesis.

1: Q, R)。

(3) 二核胚囊后期的多数胚囊中仅能观察到位于中央的 1 个核, 细胞体积较大, 细胞核明显, 被一团胶质物所包围, 将合点端和珠孔端连接, 并且在合点端可以观察到明显的细胞退化痕迹(图 1: S)。

(4) 对开花前 1 d、开花期及开花后 1 d 的切片中出现大量的“单核胚囊”(图 1: T), 即在八核胚囊的胚囊腔中仅观察到 1 个明显的细胞位于囊腔的中央, 该细胞体积较大, 细胞核明显, 细胞周围并非中空, 而是被一团类似于胶状物质所包围, 连接合点端和珠孔端。

对胚珠发育异常现象进行统计, 开花前 1 d、开花期及开花后 1 d 共采集样品 250 个, 正常发育的八核胚囊为 3 个(1.2%), 异常发育的“单核胚囊”为 247 个(98.8%)。

3 讨论

3.1 马蹄参胚胎发育中的异常现象

目前关于马蹄参的研究主要集中在马蹄参的起源分布^[1]、形态解剖学特征^[10]、化学成分^[11]和古植物学^[12]等方面, 其胚胎学特征尚未有详细报道。

在马蹄参雌配子体发育的过程中, 我们观察到子房内部胚珠出现异常发育现象: (1) 功能大孢子的位置不确定。合点端的细胞异常发育时, 靠近珠孔端的 3 个细胞随机发育为功能大孢子, 刺五加(*Acanthopanax senticosus*)^[13]中也存在类似现象, 具体原因尚不清楚; (2) 败育主要发生在单核胚囊发育成二核胚囊时期, 败育方式为 2 核分布不均, 较小的核退化消失, 仅留 1 核位于囊腔中央。在马蹄参的近缘种喜树(*Camptotheca acuminata*)的大孢子发育过程中也曾观察到类似现象, 胚囊停留在 1~2 核期, 核不呈完整的圆形^[14]。(3) 在开花前期, 成熟胚囊应为八核七细胞, 但是约 98.8%的囊腔中仅有 1 个明显的细胞位于囊腔的中央。

因此推测, 在四分体发育过程中, 由于合点端功能大孢子存在败育现象, 靠近珠孔端的 3 个细胞随机 1 个继续发育, 但是在随后的 2 核胚囊期发育停滞, 其中 1 核逐步退化消失, 仅留 1 核位于囊腔中央, 不能发育为完整的八核七细胞的成熟胚囊。因此, 濒危植物马蹄参的胚胎发育过程中, 特别是其雌性结构中胚珠和胚囊发育各阶段的败育是其生殖障碍的主要内因之一。

3.2 马蹄参的濒危原因

马蹄参生长稀疏、地理分布局限性大, 仅分布于有限的几个典型地方, 且主要分布区目前均属于自然保护区。因此, 对其濒危类型、原因以及机制的研究意义重大。结合前人的研究, 引起马蹄参濒危的原因主要有: 种子产量低、种子萌发率低、幼苗成活率低、种群缺乏竞争力、人为破坏等因素^[15]。本研究报道了马蹄参濒危的一个重要内在因素, 即雌配子体败育是限制马蹄参生殖成功的重要因素之一。马蹄参雄配子体发育正常, 由于胚囊败育, 导致花粉管进入胚囊后次生核不能与卵细胞结合, 胚囊发育停止。

就马蹄参整个生殖生物学过程而言, 本研究所涉及的仅是一个很短的阶段。目前在花粉活力、传粉、受精、胚和胚乳的发育等环节还缺乏资料。因此, 有关马蹄参致濒的机制, 还有待深入研究后才能做出完整的解释。

3.3 马蹄参分类的胚胎学证据

对马蹄参大孢子和雌配子体发育特征进行观察, 胚珠原基从胚囊侧方伸出向子房腔内生长; 大孢子母细胞减数分裂后 4 个大孢子母细胞呈线性排列; 当合点端的大孢子发生败育时, 其余 3 个大孢子均有发育为功能大孢子的可能。

关于五加科和山茱萸科的胚胎学研究多集中在刺五加、人参(*Panax ginseng*)、刺参(*Oplopanax elatus*)、中华青莢叶(*Helwingia japonica*)等^[13,16-17]物种, 他们的发育类型均为典型的蓼型胚囊, 与大部分被子植物相同。马蹄参的发育过程中出现非合点端的大孢子特化为功能大孢子, 其异常发育特征与刺五加类似, 但不能作为胚胎学分类的主要依据。因此, 对马蹄参进行胚胎学分类需要进一步对单室茱萸属(*Mastixia*)等相近物种的胚胎学进行观察研究。

参考文献

- [1] ZHU W H, XIANG Q B. The origin and distribution of genus *Diplopanax* Hand.-Mazz. [J]. J Nanjing For Univ, 2001, 25(1): 35-38. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2001.01.009.
朱伟华, 向其柏. 马蹄参属的起源和地理分布 [J]. 南京林业大学学报, 2001, 25(1): 35-38. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2001.01.009.
- [2] WU S G. Living fossil plant: *Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz. [J]. Plants, 1997(1): 23.

- 武素功. 活化石植物——马蹄参 [J]. 植物杂志, 1997(1): 23.
- [3] HUANG X P, GU Y, WU H. Research progress on endangered mechanism of rare and endangered plants [J]. Guangdong Agric Sci, 2016, 43(4): 78–83. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2016.04.016.
黄向鹏, 谷勇, 吴昊. 珍稀濒危植物濒危机理研究进展 [J]. 广东农业科学, 2016, 43(4): 78–83. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2016.04.016.
- [4] HERRERA C M, PELLMYR O. Plant Animal Interactions: An Evolutionary Approach [M]. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2002: 118–125.
- [5] ZENG C J. Systematic position of genus *Diplopanax* [J]. Acta Phytotaxon Sin, 1983, 18(1): 89–95.
曾沧江. 马蹄参属的系统位置 [J]. 植物分类学报, 1983, 18(1): 89–95.
- [6] ZHU W H, XIANG Q B, GAN X H, et al. Wood anatomy of *Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz. and its systematic implication [J]. J Sichuan Agri Univ, 1998, 16(1): 106–109. doi: 10.3969/j.issn.1000-2650.1998.01.014.
朱伟华, 向其柏, 甘习华, 等. 马蹄参属木材解剖特征及其系统学意义 [J]. 四川农业大学学报, 1998, 16(1): 106–109. doi: 10.3969/j.issn.1000-2650.1998.01.014.
- [7] LI Y L, ZHU H, YANG J B. Systematic position of the genus *Mastixia*: Evidence from *rbcL* gene sequences [J]. Acta Bot Yunnan, 2002, 24(3): 352–358. doi: 10.3969/j.issn.2095-0845.2002.03.008.
李耀利, 朱华, 杨俊波. 从 *rbcL* 序列探讨单室茱萸属的系统位置 [J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 352–358. doi: 10.3969/j.issn.2095-0845.2002.03.008.
- [8] HU Z H. The prospect and progression of the plant comparative anatomy during fifty years in China [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin, 2003, 23(2): 344–355. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2003.02.029.
胡正海. 植物比较解剖学在中国 50 年的进展和展望 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 344–355. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2003.02.029.
- [9] WANG J, ZUO X, HUANG Z W. Improvement and application of plant paraffin sectioning [J]. Anhui Agri Sci Bull, 2011, 17(11): 36–39. doi: 10.3969/j.issn.1007-7731.2011.11.015.
王静, 左幸, 黄正文. 常规植物石蜡制片技术的改进及应用 [J]. 安徽农学通报, 2011, 17(11): 36–39. doi: 10.3969/j.issn.1007-7731.2011.11.015.
- [10] ZHU W H, XIANG Q B. Morphological characters of the genus *Diplopanax* Hand.-Mazz. and its systematic implication [J]. Bull Bot Res, 1999, 19(3): 286–291.
朱伟华, 向其柏. 马蹄参属的解剖学特征及其系统学意义 [J]. 植物研究, 1999, 19(3): 286–291.
- [11] YAN X H, GUO Y W. Studies on chemical constituents from leaves of *Diplopanax stachyathus* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2004, 35(2): 125–127. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2004.02.003.
严小红, 郭跃伟. 马蹄参化学成分的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 125–127. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2004.02.003.
- [12] EYDE R H, XIANG Q Y. Fossil mastixioid (Cornaceae) alive in eastern Asia [J]. Amer J Bot, 1990, 77(4): 689–692. doi: 10.2307/2444816.
- [13] LIU L D, WANG Z L, TIAN G W, et al. Megasporegenesis, microsporegenesis and development of gametophytes in *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae) [J]. Acta Phytotaxon Sin, 1998, 36(4): 289–297.
刘林德, 王仲礼, 田国伟, 等. 刺五加大、小孢子发生和雌、雄配子体发育的观察 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 289–297.
- [14] HU J Q, WANG L L, XIANG T H, et al. Studies on the megasporegenesis and microsporegenesis and the development of the female gametophyte and male gametophyte in *Camptotheca acuminata* Decne [J]. J Mol Cell Biol, 2008, 41(5): 367–375. doi: 10.3321/j.issn:1673-520X.2008.05.004.
胡江琴, 王利琳, 向太和, 等. 喜树大小孢子发生和雌雄配子体的发育 [J]. 分子细胞生物学报, 2008, 41(5): 367–375. doi: 10.3321/j.issn:1673-520X.2008.05.004.
- [15] WANG L, YOU Z P, XU Y, et al. Research status and endangered causes of *Diplopanax stachyanthus* [J]. Bull Bot Res, 2010, 30(3): 344–348.
王丽, 游章平, 徐翊, 等. 濒危植物马蹄参的研究现状和濒危原因分析 [J]. 植物研究, 2010, 30(3): 344–348.
- [16] Liu L D. Advances in embryology of Araliaceae [J]. J Yantai Norm Univ (Nat Sci), 1996, 12(4): 296–300.
刘林德. 五加科植物胚胎学研究进展 [J]. 烟台师范学院学报(自然科学版), 1996, 12(4): 296–300.
- [17] FAN J. Study on leaf anatomy and embryology of *Helwingia chinensis* [D]. Kaifeng: Henan University, 2012.
范佳. 中华青荚叶解剖学和胚胎学研究 [D]. 开封: 河南大学, 2012.