

杜鹃红山茶大小孢子发生及雌雄配子体发育研究

罗晓莹^{1,2}, 莫罗坚^{1,3}, 庄雪影¹

(1 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642; 2 韶关学院 旅游与地理学院,
广东 韶关 512005; 3 东莞市林业科学研究所, 广东 东莞 523106)

摘要:应用石蜡切片法,研究了杜鹃红山茶 *Camellia changii* 的大小孢子发生及雌雄配子体的发育过程. 结果显示,杜鹃红山茶具四囊型花药,腺质绒毡层;药壁发育为基本型;小孢子发育为同时型;小孢子四分体四面体形;花粉粒成熟时具二细胞;胚囊发育属双孢八核葱型,具倒生胚珠,双珠被,薄珠心. 显微结构检测结果揭示,自然居群的杜鹃红山茶胚珠败育率达 39.4%,这可能是导致自然居群结果量少的主要原因之一.

关键词:杜鹃红山茶; 大小孢子; 雌雄配子体发育; 山茶科
中图分类号: Q944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2010)04-0068-04

Genesis of Megaspore and Microspore and the Development of Gametophytes in *Camellia changii*

LUO Xiao-ying^{1,2}, MO Luo-jian^{1,3}, ZHUANG Xue-ying¹

(1 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 School of Tourism and Geography, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;
3 Forestry Institute of Dongguan City, Dongguan 523106, China)

Abstract: The genesis of megaspore and microspore and the formation of female and male gametophytes in *Camellia changii* were investigated with the technique of paraffin section. The results were as follows: The anther was 4-sporangia with glandular tapetum; The anther wall formation conformed to the basic type; The cytokinesis of the microspore mother cells was simultaneous; The tetrads were tetrahedral; The mature pollen grains were two-celled. The development of embryo sac was bisporic, 8-nucleate, *Allium* type; The mature ovules were anatropous with dual-integument and tenuinucellate. The abortion rate of the examined ovules was 39.4%, which may be one of the main reasons causing low fruit production of the natural population.

Key words: *Camellia changii*; microspore and megaspore; development of the gametophytes; Theaceae

杜鹃红山茶 *Camellia changii* 为我国特有种,仅分布于广东省阳春市鹅凰嶂自然保护区,分布面积狭窄、种群小. 据统计,杜鹃红山茶现存植株不及 1 000 株,已被《中国物种红色名录》列为极危种 (CR)^[1]. 杜鹃红山茶四季常青,花大而艳丽,观赏价值高,在园林中具有较大的应用前景,因此,杜鹃红山茶的研究日益受到重视^[2]. 野外观察发现,杜鹃红

山茶开花数量多,但结实量少. 遗传多样性研究结果显示杜鹃红山茶的自然种群遗传多样性较低,亚种群间遗传分化较小^[3,4]. 珍稀植物胚胎学研究是揭示其致濒机制和制定解危措施的重要基础. 本文描述和分析了杜鹃红山茶的大小孢子发生和雌雄配子体发育过程,并从生殖生物学的角度,对杜鹃红山茶种群的致濒原因进行了探讨.

收稿日期: 2010-01-10

作者简介: 罗晓莹 (1979—), 女, 副教授, 博士; 通信作者: 庄雪影 (1961—), 女, 教授, 博士, E-mail: xyzhuang@scau.edu.cn

基金项目: 广东省林业局科技项目 (2006-14)

1 材料与方法

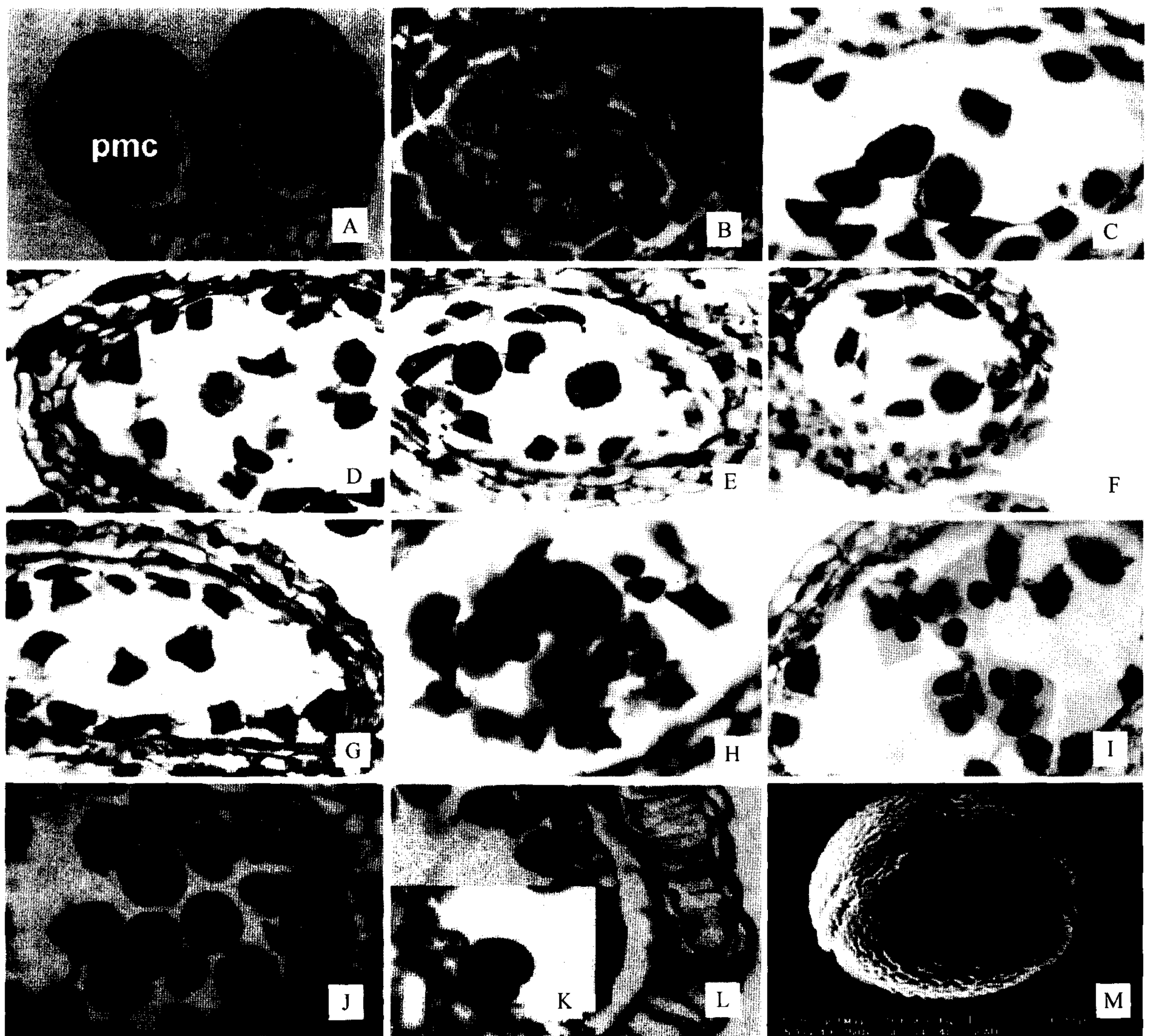
试验材料均采自鹅凰嶂自然保护区的野生种群. 选取不同发育阶段的杜鹃红山茶花蕾或花朵, 用FAA固定并保存. 经系列酒精脱水后, 常规石蜡切片法切片, 厚度 $8 \sim 10 \mu\text{m}$, 番红-固绿对染, 中性树胶封片. 在Leica DMLB光学显微镜下观察并摄影. 取成熟的花粉, 干燥后均匀撒到粘有双面胶的铜台上, 镀膜后在Philips XL-30型ESEM环境扫描电镜下观察、拍照.

胚珠败育检测及统计方法: 用常规石蜡切片法对随机抽取的34个子房进行横切, 观察315个胚珠. 败育率 = 不育胚珠数/总检测胚珠数.

2 结果与分析

2.1 小孢子的发生及发育

杜鹃红山茶的花药为四囊型. 花药壁从外向内依次为表皮、药室内壁、中层和绒毡层(图1A). 表皮细胞横切面为长方形, 花药成熟时彼此分离; 药室内壁随花粉的成熟而径向加宽, 花药成熟时发育至最大(图1L); 中层随花药的发育逐渐横向伸长呈长梭形, 不久就解体; 绒毡层细胞初期与邻近细胞相似, 当花粉母细胞进入第一次减数分裂前期时不断径向加宽, 细胞质变浓, 细胞核增大, 常分裂为二; 随后绒毡层开始解体, 花粉成熟时只剩下残迹, 属于腺质绒毡层.



A: 花药横切, 示早期花粉母细胞(pmc)和5层花药壁($\times 400$); B~G: 花粉母细胞减数分裂各时期($\times 630$); H: 小孢子四分体($\times 630$); I: 刚从四分体释放出来的小孢子($\times 630$); J: 二孢成熟花粉($\times 400$); K: 二孢成熟花粉放大($\times 630$); L: 成熟花药横切, 示纤维素加厚的药室内壁($\times 400$); M: 成熟花粉粒的扫描电镜照片, 示皱沟状表面纹饰和三拟孔沟花粉(标尺 = $10 \mu\text{m}$).

图1 杜鹃红山茶小孢子和雄配子体的形成和发育

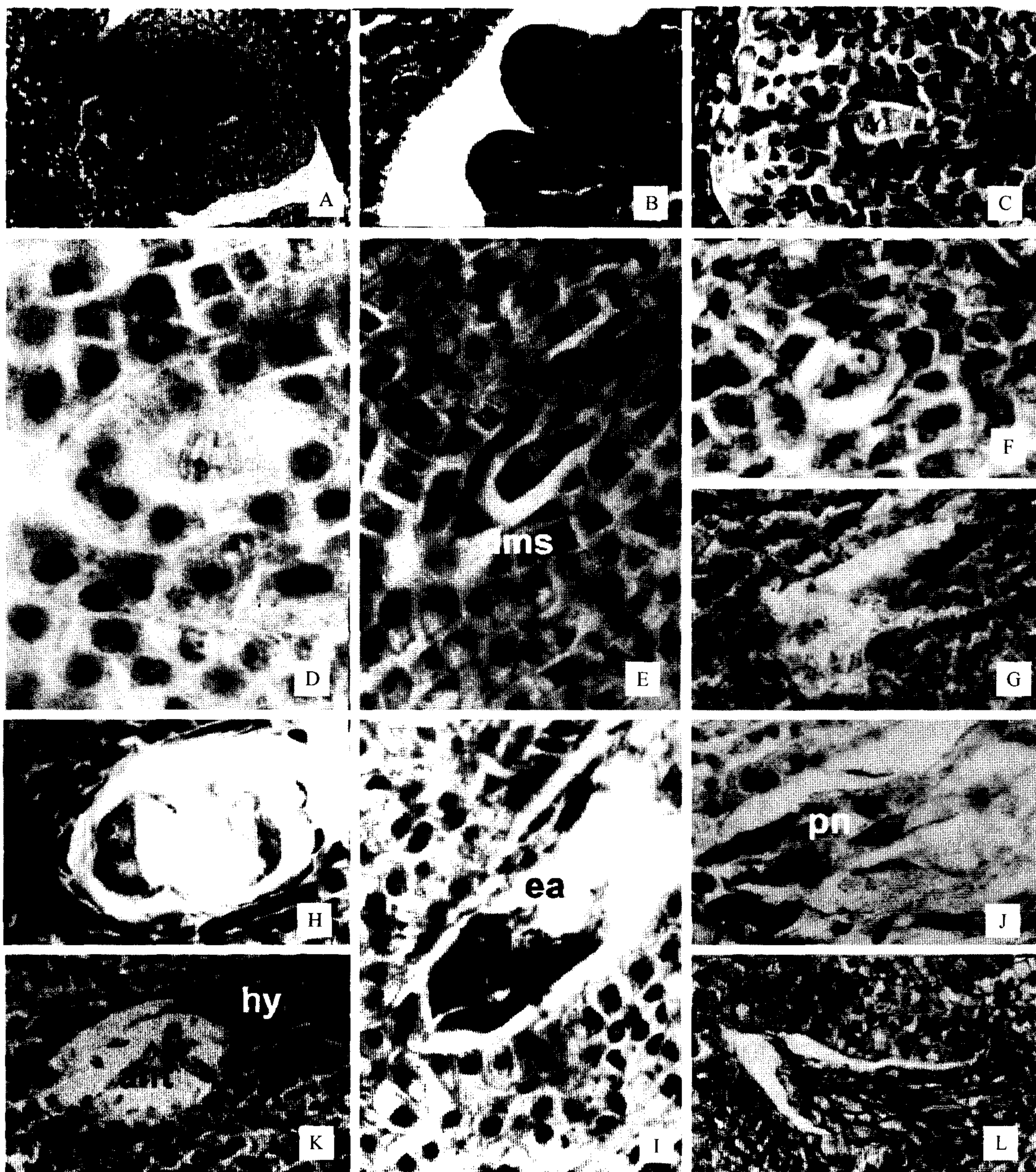
Fig. 1 Formation and development of microspores and male gametophytes in *Camellia changii*

初生造孢细胞排列紧密,呈多角形(图1A),以后逐渐分开、变圆,发育形成小孢子母细胞进入减数分裂.减数分裂各时期见图1B~1G,孢质分裂为同时型.同一花粉囊内小孢子母细胞的减数分裂过程同步,但不同花药或同一花药不同花粉囊内的减数分裂不同步.小孢子母细胞经减数分裂形成小孢子四分体,四分体的排列为四面体形,由共同的胼胝质壁包围(图1H).胼胝质壁解体后释放出单个的小孢子

(图1I).单核小孢子进行有丝分裂,形成2个大小不等的细胞,营养细胞较大,生殖细胞较小,成熟花粉为二细胞型(图1J、1K),花粉以此状态散发.扫描电镜下成熟花粉壁具皱沟状纹饰和三拟孔沟(图1M).

2.2 大孢子的发生和胚囊的形成

杜鹃红山茶雌蕊由2~4心皮合生而成,子房多数3室,中轴胎座,每室一般着生3枚胚珠.由图2A可知,倒生胚珠具双层珠被,内珠被的发育较外珠被



A: 胚珠纵切, 示倒生胚珠, 双珠被 ($\times 200$); B: 早期胚珠纵切, 示珠心表皮下起源的单个孢原细胞 ($\times 400$); C: 胚珠纵切, 示大孢子母细胞 ($\times 400$); D: 大孢子母细胞减数分裂前期 ($\times 1000$); E: 大孢子二分体, 示珠孔端 1 个退化的大孢子 (dms) ($\times 400$); F: 单核胚囊 ($\times 630$); G: 二核胚囊 ($\times 630$); H: 四核胚囊 ($\times 630$); I~K: 八核胚囊, 其中 I 为珠孔端, 示卵器 (ea) (另一个助细胞被切离未见, $\times 400$), J 示 2 个极核 (pn) ($\times 400$), K 为合点端, 示 3 个反足细胞 (ant) 和承珠盘 (hy) ($\times 400$); L: 不育胚珠 ($\times 400$).

图2 杜鹃红山茶大孢子和雌配子体的形成和发育

Fig. 2 Formation and development of megaspores and female gametophytes in *Camellia changii*

早,到大孢子母细胞时期,内外珠被包围整个珠心,外珠被较内珠被短,珠柄侧外珠被发育微弱,珠孔由内珠被围成,珠孔直,属薄珠心类型.合点端珠心组织发育成为承珠盘(图2K),其他部位的珠心组织随胚囊的发育逐渐崩溃,由内珠被直接包裹胚囊.

由珠心表皮下起源的孢原细胞(图2B)直接转化为大孢子母细胞(图2C),通过减数分裂,形成二分体大孢子.近珠孔端的一个二分体大孢子很快趋向退化,被合点端另一个迅速发育的二分体大孢子(功能大孢子)推至珠孔端成为浓缩的一团(图2E).功能大孢子(图2F)经过3次连续有丝分裂先后形成二核、四核和八核胚囊(图2G~2K),这是典型的葱型胚囊发育过程.随着胚囊的发育及珠心细胞的消失,胚囊腔逐渐扩大,原生质分布于核的周围.成熟胚囊由珠孔端3个细胞的卵器、中央的二极核和合点端的3个反足细胞组成(图2I~2K).

2.3 胚珠败育率检测

随机观察了34个子房中315个胚珠的可育性,结果显示不育胚珠有124个,败育率达到39.4%.这些胚珠初期与正常发育的胚珠完全相同,具有完整的内外珠被、珠心.但当正常胚珠形成胚囊时,它们的珠心逐渐消失(图2L),不能形成正常的胚囊.这些不育胚珠在珠心消散后仍象正常胚珠一样增大体积,中央形成一空腔,在外形上与正常发育的胚珠无法区分.当幼果开始生长时,这些不育胚珠不能进一步发育,最后形成不育的种子.

3 讨论

3.1 杜鹃红山茶胚胎学主要特征

杜鹃红山茶的胚胎学特征与已见报道的山茶属其他植物^[5-14]相似,即其花药为四囊型,药壁发育为基本型,具腺质型绒毡层,小孢子发育为同时型;四面体形小孢子四分体;成熟花粉为二细胞型;具倒生胚珠,双珠被,内珠被构成珠孔,珠心薄,合点端珠心组织发育成承珠盘;具合点端功能大孢子,具双孢八核葱型胚囊.

3.2 杜鹃红山茶大孢子发育异常现象分析

现有研究表明,大孢子发育异常是导致部分濒危植物出现濒危的主要原因之一.如秦慧贞等^[15]研究了鹅掌楸 *Liriodendron chinense* 雌配子体发育过程,发现其胚囊在大孢子液泡化后通常形成空腔,缺乏胚囊核或者在1~2核胚囊期就停止发育.此外,一些继续发育的胚囊也常出现周缘破裂,卵细胞和助细胞分界不清、助细胞过早消失以及卵细胞发育不良等异常现象;进一步对胚珠结构进行解剖,发现

许多胚珠仅具珠被空囊,而缺乏相应的胚囊结构,从而揭示了胚珠和雌配子体的败育是限制鹅掌楸生殖成功的重要因素;何田华等^[16]检测了木根麦冬 *Ophiopogon xylorrhizus* 236枚受精胚珠发育情况,揭示了胚胎的早期败育率为43.3%,是导致木根麦冬濒危的内在原因之一.此外,张寿洲等^[17]和王仲礼等^[18]也分别研究了矮牡丹 *Paeonia suffruticosa* subsp. *spontanea* 和短柄五加 *Eleutherococcus brachypus* 的胚珠发育情况,指出其胚珠败育率高可能是其自然居群出现濒危的主要原因.

曹慧娟^[6]报道了油茶胚胎发育出现异常的现象,指出其不育胚珠与正常胚珠的比例约为3:1;李天庆等^[10]报道了金花茶的不育胚珠比例为11%;刘成运等^[8]报道了云南红花油茶的栽培品种张家茶 *Camellia zhangjiangcha* 由于雌雄蕊发育出现异常而导致结实率低的现象.有关山茶科植物胚胎学研究的种类还有茶树 *Camellia sinensis*^[5]、茶梅 *C. sasanqua*^[7]、细叶山茶 *C. tenuifolia*、恒春山茶 *C. hengchunensis*^[12]、毛果猴子木 *C. yunnanensis* var. *camellioides*^[13]、毛叶茶 *C. ptilophylla*^[14]、大头茶 *Gordonia acuminata*^[19]、短叶核果茶 *Pyrenaria garrettiana*、石笔木 *Tutcheria championi*、粗毛石笔木 *T. hirta*、屏边石笔木 *T. pingpienensis* 等^[20],但这些研究均未涉及胚胎发育不正常的现象.

本研究结果表明杜鹃红山茶的胚珠败育率达到39.4%,该结果与我们在自然居群中观察到的许多植株大量开花但不结果的现象是一致的.由此可见,胚珠败育可能是引起杜鹃红山茶种群萎缩的主要原因.植物传粉不成功,会引起部分胚囊、胚珠的败育或退化,降低结实率^[21].花粉数量不足、传粉媒介不足和气候条件恶劣等都会导致传粉不成功.从杜鹃红山茶的生境条件和形态学结构来看,该种群生长在水热条件较好的山区;其花部具有多数雄蕊,花粉萌发率检测结果显示其自然种群的花粉活性较高,达88.6%(结果另文发表).因此,胚珠败育的原因可能与传粉媒介不足有关,但这还需要作进一步的研究.

参考文献:

- [1] 汪松,解炎.中国物种红色名录[M].北京:高等教育出版社,2004:362.
- [2] 朱高浦,李纪元.珍稀濒危植物张氏红山茶研究进展(综述)[J].亚热带植物科学,2009,38(3):83-89.
- [3] 罗晓莹,唐光大,许涵,等.山茶科三种中国特有濒危植物的遗传多样性研究[J].生物多样性,2005,13(2):112-121.

(下转第75页)

研究利用 PCR-DGGE 技术建立了一套饲用微生物地衣芽孢杆菌、粪肠球菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌的快速同步检测技术. 只要将待测饲用微生物制剂样品和标准品同时进行 DGGE 指纹图谱分析, 观察待测样品的 PCR 产物经 DGGE 分离后的电泳图谱, 根据标准品中这 4 种菌条带的位置即可判断待测样品中这 4 种菌的有无情况. 通过条带的亮度进行软件分析还可进一步半定量地确定该菌的含量. 本技术还可以推广应用到目前国家允许添加的其他 16 种饲用微生物的检测.

参考文献:

- [1] MUYZER G, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [2] SMALLA K, WIELAND G, BUCHNER A, et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4742-4751.
- [3] ELLIS R J, THOMAPSON I P, BAILEY M J. Temporal fluctuations in the pseudomonas population associated with sugar beet leaves [J]. FEMS Microb Ecol, 2000, 28: 3996-4001.
- [4] BOURRAIN M, ACHOUAK W, URBAIN V, et al. DNA extraction from activated sludge [J]. Curr Microbiol, 1999, 38(6): 315-319.
- [5] YEATES C, GILLING M R. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification [J]. Biological Procedures Online, 1998, 1: 40-47.
- [6] 孙晓棠, 姚青, 刘琼光, 等. 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力 [J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 482-486.
- [7] TEMMERMAN R, SCHEIRLINCK I, HUYS G. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 1220-1226.
- [8] ELLIOT E, TEVERSHAM K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa [J]. S Afr Med J, 2004, 94(2): 121-124.
- [9] 马俊孝, 孔健, 季明杰. 利用 PCR—DGGE 技术分析微生物生态制剂在传代过程中的菌群变化 [J]. 山东大学学报, 2008, 43(7): 56-160.
- [10] LUO Xiao-ying, ZHUANG Xue-ying, YANG Yue-sheng. Genetic diversity of *Camellia changii* Ye (Theaceae) using ISSR markers [J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 93-100.
- [11] KAPIL R N, SETHI S B. Development of male and female gametophytes in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, 1963, 29(B): 567-574.
- [12] 曹慧娟. 油茶胚胎学的观察 [J]. 植物学报, 1965, 13(1): 44-53.
- [13] CHARIVUKALA J M. Development of male and female gametophytes in *Camellia sasanqua* [J]. Phytomorphology, 1978, 28(3): 262-269.
- [14] 刘成运, 张香兰. 云南山茶雌雄配子体的发育 [J]. 云南植物研究, 1983, 5(2): 401-408.
- [15] 李天庆, 曹慧娟. 金花茶种子早期发育的胚胎学研究 [J]. 北京林业大学学报, 1986, 2: 43-47.
- [16] 李天庆, 曹慧娟. 金花茶小孢子囊、小孢子和雄配子体的发育 [J]. 北京林业大学学报, 1986, 2: 30-35.
- [17] 李坤季, 杨貌仙. 金花茶小孢子的发生和雄配子体的形成 [J]. 云南大学学报, 1986, 8(3): 302-308.
- [18] TSOU C H. Embryology of Theaceae-anther and ovule development of *Camellia*, *Franklinia* and *Schima* [J]. American Journal of Botany, 1997, 84(3): 369-381.
- [19] 杨世雄, 彭华, 梁汉兴. 毛果猴子木的胚胎学观察及山茶属胚胎学特征比较 [J]. 广西植物, 2002, 22(4): 340-344.
- [20] 敖成齐. 毛叶茶大小孢子的发和雌雄配子体的发育 [J]. 茶叶科学, 2004, 24(1): 37-40.
- [21] 秦慧贞, 李碧媛. 鹅掌楸雌配子体败育对生殖的影响 [J]. 植物资源与环境, 1996, 5(3): 1-5.
- [22] 何田华, 饶广远, 尤瑞麟. 濒危植物木根麦冬的胚胎学研究 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 305-309.
- [23] 张寿洲, 潘开玉, 张大明, 等. 矮牡丹小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察 [J]. 植物学报, 1997, 39(5): 397-404.
- [24] 王仲礼, 刘林德, 田国伟, 等. 短柄五加开花后雌蕊的发育状态与受精作用的研究 [J]. 植物学报, 1998, 40(4): 309-315.
- [25] 王兰, 任一龙. 大头茶的大小孢子发生及雌雄配子体发育 [J]. 西南师范大学学报, 1987(4): 127-133.
- [26] 杨世雄, 闵天禄. 山茶科核果茶属和石笔木属的胚胎学研究 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(1): 67-71.
- [27] 高润梅. 珍稀濒危植物的胚胎学研究进展 [J]. 山西农业大学学报, 2002, 22(3): 239-245.

【责任编辑 李晓卉】

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 71 页)