

蓝猪耳大孢子发生和雌配子体发育

陈素红^{1,2}, 邹璞², 廖景平^{2*}

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520; 2. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650)

摘要 [目的]研究蓝猪耳大孢子发生和雌配子体发育。[方法]采用常规石蜡切片和超薄切片技术研究蓝猪耳大孢子发生和雌配子体发育过程。[结果]蓝猪耳为中轴胎座, 倒生胚珠, 单珠被, 薄珠心。大孢子母细胞减数分裂形成T-形和直线形四分体。T-形四分体合点端大孢子具功能, 胚囊为蓇葖型发育形式; 直线形四分体中珠孔端大孢子具功能, 最终形成八核七细胞的成熟胚囊。胚囊发育异常偶有发生, 但大部分胚囊都能发育成正常的7-细胞胚囊。[结论]蓝猪耳雌性生殖细胞发育异常并不是其结实率低的主要原因。

关键词 蓝猪耳; 大孢子发生; 雌配子体形成

中图分类号 S188+2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0128-03

Megasporogenesis and Female Gametophyte Development of *Torenia fournieri*

CHEN Su-hong^{1,2}, ZOU Pu², LIAO Jing-ping^{2*} (1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520; 2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650)

Abstract [Objective] To study megasporogenesis and female gametophyte development of *T. fournieri*. [Method] Megasporogenesis and female gametophyte development of *T. fournieri* were investigated by techniques of paraffin sections and ultra-thin sections. [Result] *T. fournieri* had axile placenta. The ovule was anatropous, unitegmic and tenuinucellatae. The megasporocyte divided into T-tetrad or linear tetrad after meiosis. The chalazal end megaspore was functional in T-tetrad and the embryo sac was the polygonum type. However, the micropyle end megaspore was functional in linear tetrad. The mature embryo sac was 7-celled and 8-nucleate type. Abnormal embryo sac was observed by chance, but most of the embryo sacs could develop normally. [Conclusion] The abnormal development of female germ cells wasn't a crucial factor for the low setting rate of *Torenia fournieri*.

Key words *Torenia fournieri*; Megasporogenesis; Female gametophyte development

蓝猪耳(*Torenia fournieri* Linden. Ex Fourn.)是玄参科(Scrophulariaceae)蝴蝶草属一年生直立草本植物。现栽培种花色鲜艳,是夏季优良草花盆栽观赏花卉之一。它花期长、花量大,还具有半裸露胚囊,因而被作为研究被子植物受精生物学的理想模式植物^[1]。

数十年来,借助蓝猪耳特殊的胚囊结构,研究多集中在花粉管生长、受精前后发育过程、离体受精体系建立等^[2-10],而有关蓝猪耳胚胎学的研究较少。Vivian等^[11]着重研究了蓝猪耳胚和胚乳的发育,以及胚乳的吸器、营养功能与成熟种子形成的关系。Tiwari^[12-13]报道了蓝猪耳成熟胚囊中有胼质壁的出现,通过组织化学法研究了承珠盘的细胞壁。Wallwork等^[14]研究了蓝猪耳授粉后至受精前胚囊内细胞结构的变化。目前,有关蓝猪耳大孢子发生和雌配子体发育的研究少见报道。笔者研究了蓝猪耳大孢子发生和雌配子体发育过程,探讨了蓝猪耳半裸露胚囊的形成和栽培种结实率不高的原因,为蓝猪耳的胚胎学研究积累资料。

1 材料与方法

试验材料为中国科学院华南植物园种植蓝猪耳。用卡尺测量不同发育时期的花苞,按花苞长度和开放状态分别放于FAA液中固定,抽气。爱氏苏木精整体染色,常规石蜡切片,厚度8 μm。用Olympus-AX70光学显微镜观察和Olympus-DP50数码拍照。

光镜下确定发育时期,选取主要时期的胚珠固定于1%戊二醛(0.1 mol/L磷酸缓冲液配制,pH 7.2)中,4℃下12~

24 h。用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)洗涤后转入1%锇酸(0.1 mol/L磷酸缓冲液配制,pH 7.2)中固定,4℃下16 h。再用上述缓冲液冲洗后经各级乙醇脱水,环氧丙烷置换,Epon 812环氧树脂渗透并包埋。包埋块在半薄切片机上用玻璃刀切片,厚度为1~2 μm,0.5%甲苯胺蓝溶液染色,光学显微镜下观察、定位,LK-S型超薄切片机切片,醋酸双氧钼和柠檬酸铅染色,在日本JEM-1010透射电镜100 kV下观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 胚珠的发育与大孢子发生 蓝猪耳为中轴胎座,子房室中有上百个胚珠,其中胚珠的发育基本是同步的。当心皮原基腹缝线开始连合后,胎座部位细胞的细胞质变得浓厚并开始迅速分裂分化,向子房腔内迅速隆起形成圆球形的胚珠原基(图1a)。

蓝猪耳胚珠倒生,单珠被,薄珠心。当珠被刚包围珠心时,珠孔端珠心组织表皮下分化出一个体积较大、细胞质浓、细胞核显著的细胞,即孢原细胞。孢原细胞直接发育为大孢子母细胞,大孢子母细胞的体积比孢原细胞更大,细胞质更浓,细胞器丰富(图1b)。单层的珠心表皮细胞没有进一步分裂分化,而是在减数分裂时期开始解体,到功能大孢子时期珠孔端只留下一些退化的痕迹(图1c),蓝猪耳胚珠为薄珠心胚珠。蓝猪耳胚珠属单珠被胚珠,功能大孢子时期珠被细胞具有3~4层细胞(图1d)。与此同时,由于胚珠基部的不均衡生长,导致珠柄弯向一侧,在功能大孢子形成时完全倒转形成倒生胚珠。大孢子母细胞进行减数分裂后形成四分体,四分体的4个大孢子排列方式多数为直线形,少数为T-形。在T-形四分体中,靠近珠孔端的3个大孢子同时解体消失,只有合点端的大孢子保留,即功能大孢子(图1e)。在直线形四分体中,靠近合点端的3个大孢子逐个解体消

基金项目 广东省自然科学基金项目(2015A030313865)。

作者简介 陈素红(1979—),女,河南洛阳人,副教授,博士,从事细胞生物学研究。*通讯作者,研究员,博士生导师,从事植物学研究。

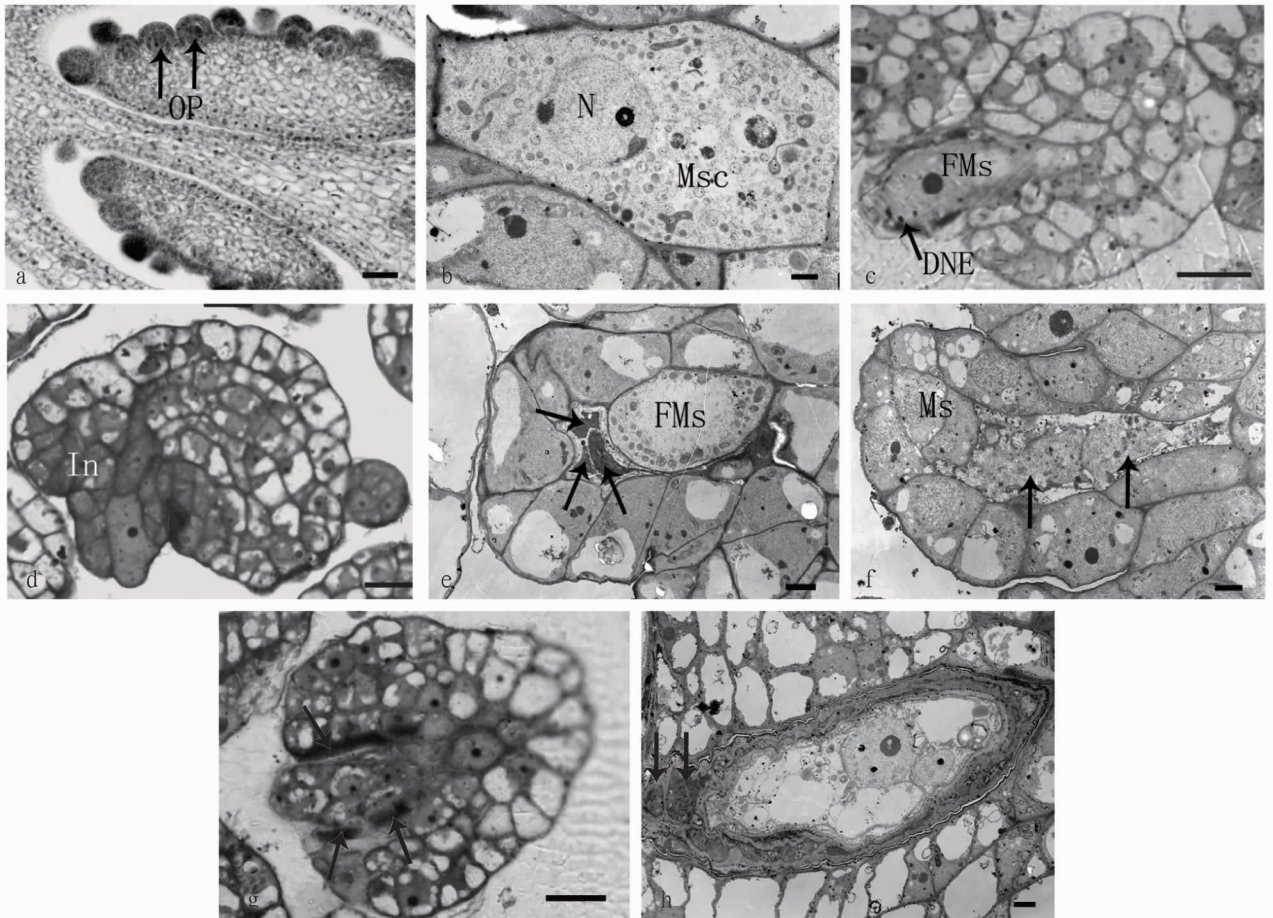
收稿日期 2017-05-24

失,只有珠孔端的大孢子保留,成为功能大孢子(图 1f)。蓝猪耳以单孢子胚囊的发育方式进一步发育为成熟胚囊。

2.2 雌配子体发育

减数分裂完成后,功能大孢子与其他 3 个分离,细胞膨大,细胞质浓厚,细胞核显著。功能大孢子继续发育形成单核胚囊,单核胚囊的体积进一步增大,进行第 1 次有丝分裂,形成二核胚囊。二核胚囊初期,胚囊随着大量的小液泡出现而体积增大;之后 2 个核分别向胚囊两极移动,中间被大液泡隔开,但两核之间有细胞质相连。接着,两核各自进行 1 次有丝分裂,形成四核胚囊,此时可观察到被珠被包被的珠

心表皮细胞退化留下的痕迹(图 1g)。随着核的分裂,胚囊逐渐拉长并出现大液泡化,四核同时进行 1 次有丝分裂形成八核胚囊,在靠珠孔端有 4 个核,在合点端也有 4 个核,8 个核处于共同的细胞质中。在八核胚囊时期,合点端有 2 个核出现退化现象,核变形,染色变黑(图 1h)。接着发生细胞化,在珠孔端的 4 个核有 3 个组成卵器,包含 1 个卵细胞和 2 个助细胞;在合点端的 4 个核有 2 个形成反足细胞;珠孔端的上极核和合点端的下极核共同构成含 2 个核的中央细胞。这 2 个极核融合形成次生核。这样,形成八核七细胞的成熟胚囊。



注:a、d、g 为光镜照片,其他为透射电镜照片;a. 胚珠原基(OP),Bar = 50 μm ;b. 大孢子母细胞(Msc),Bar = 1 μm ;c. 功能大孢子时期,珠孔端退化珠心表皮(DNE),Bar = 20 μm ;d. 功能大孢子时期,珠被(In),Bar = 20 μm ;e. T-形四分体,合点端 1 个大孢子为功能大孢子(FMs),珠孔端 3 个大孢子同时退化(\rightarrow),Bar = 2 μm ;f. 直线形四分体,珠孔端 2 个大孢子(Ms)和合点端 2 个将退化的大孢子(\rightarrow),Bar = 2 μm ;g. 四核胚囊时期,珠被内退化珠心表皮(\rightarrow),Bar = 20 μm ;h. 八核异常胚囊中,合点端有 2 个核退化(\rightarrow),Bar = 2 μm

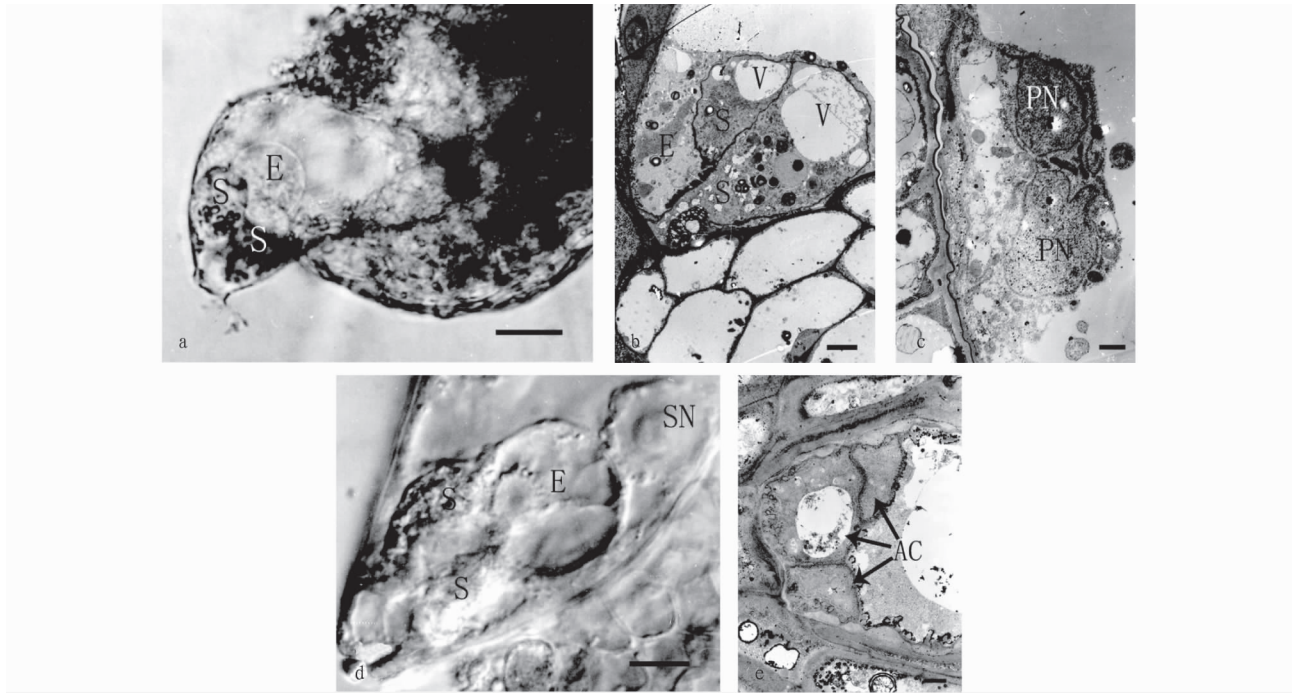
Note:a, d, g were photographs under light microscope, the others were transmission electron microscope images; a. Ovular primordium (OP), Bar = 50 μm ; b. Megasporocyte (Msc), Bar = 1 μm ; c. Functional megaspore, showing degradation nucellus epidermis (DNE), Bar = 20 μm ; d. Functional megaspore, showing integument (In), Bar = 20 μm ; e. T-type tetrad, showing functional megaspore in the chalazal end (FMs) and three degenerating megaspores (\rightarrow) in the micropyle end, Bar = 2 μm ; f. Linear tetrad, showing two megaspores in the micropyle end (Ms) and two degenerating megaspores (\rightarrow) in the chalazal end, Bar = 2 μm ; g. The nucellus epidermis surrounded by integument has degenerated in 4-nucleate embryo sac (\rightarrow), Bar = 20 μm ; h. Two degradation nuclei (\rightarrow) of the chalazal end in 8-nucleate embryo sac, Bar = 2 μm

图 1 大孢子发生和雌配子体发育

Fig. 1 Megasporogenesis and female gametophyte development

蓝猪耳成熟胚囊半裸露于珠孔端,卵器和部分中央细胞清晰可见(图 2a)。卵细胞内有大液泡,细胞核与细胞质大部分位于细胞的合点端,较大的液泡则位于珠孔端;2 个助细

胞和卵细胞呈“品”字型排列,2 个助细胞的核和大部分细胞质都分布在珠孔端(图 2b)。中央细胞中 2 个极核距离较近,位于胚囊的中心位置(图 2c)。当胚囊发育成熟,2 个极



注:a,d 为光镜照片,其他为透射电镜照片;a. 半裸露的胚囊,可见卵细胞(E)和两助细胞(S),Bar = 50 μm ;b. 卵器,两助细胞中合点端各有大液泡,Bar = 7 μm ;c. 中央细胞,两极核(PN),Bar = 1 μm ;d. 在成熟胚囊中中央细胞向珠孔端靠近,次生核(SN),Bar = 20 μm ;e. 3 个反足细胞(AC),Bar = 1 μm

Note:a,d were photographs under light microscope,the others were transmission electron microscope images;a. Half-naked embryo sac,showing egg cell (E) and two synergids(S),Bar = 50 μm ;b. Egg apparatus,big vacuole located in the chalazal end of synergid,Bar = 7 μm ;c. Central cell,showing two polar nuclei(PN),Bar = 1 μm ;d. Central cell near to the micropyle end,showing secondary nucleus,Bar = 20 μm ;e. Three antipodal cells (AC),Bar = 1 μm

图 2 成熟胚囊

Fig.2 Mature embryo sac

核融合成的次生核有向珠孔端移动的趋势,中央细胞的核和核仁与卵细胞的相比都较大(图 2d)。3 个反足细胞呈“品”字型排列,细胞为长椭圆形(图 2e)。

3 讨论

Vivian 等^[11]简要报道了蓝猪耳雌配子体发育特征,显示大孢子母细胞减数分裂后成 4 个大孢子,合点端的一个行使功能最终发育成雌配子体,然而该研究结果与之不同。该研究显示:胚囊发育为单孢子型,当大孢子减数分裂后为 T-形四分体时,胚囊为蓼型发育形式,成熟胚囊为八核七细胞;当大孢子减数分裂后为直线形四分体时,珠孔端第 1 个大孢子为功能大孢子,其他 3 个逐个退化,最终成熟胚囊仍为八核七细胞。蓝猪耳胚囊发育特征有待进一步研究。

从花苞外部形态与内部大、小孢子发生及雌、雄配子体发育情况比较(表 1)可见,蓝猪耳花蕾不大,生殖器官发育所经历的时间不长,但雌蕊与雄蕊发育进程是不同步的。早期雄蕊的发育快于雌蕊,但胚囊后期发育进程快,使得雌、雄性生殖细胞在开花时基本同时达到成熟阶段。

植物开花后所产生的成熟果实比所开的花少,而果实中成熟种子数比胚珠数少许多,这既是环境条件对植物进行选择的结果,也是植物对有限环境资源适应的结果^[16]。许多植物不能正常地繁衍后代,很重要的原因之一是植物有性生殖过程的某些环节出现了障碍^[17-18]。笔者研究了蓝猪耳雌

表 1 花苞外部形态与内部发育比较

Table 1 The comparison between the outer morphology and internal development of the flower bud

| 花蕾长度 Length of flower bud//mm | 小孢子发生及雄配子 体发育 ^[15] Microsporo- genesis and male game- tophyte development ^[15] | 大孢子发生及雌配子体 发育 Megasporogenesis and female gametophyte development |
|-------------------------------------|---|--|
| <1.5 | 次生造孢细胞时期 | 胚珠原基 |
| 1.5 ~ <3.0 | 小孢子母细胞时期 | 孢原时期 |
| 3.0 ~ <4.0 | 小孢子四分体时期 | 大孢子母细胞时期 |
| 4.0 ~ <5.0 | 单核小孢子时期 | 功能大孢子时期 |
| 5.0 ~ <6.0 | 小孢子核分裂时期 | 单核、二核胚囊 |
| 6.0 ~ <8.0 | 二胞花粉时期 | 四核胚囊 |
| 8.0 ~ <12.0 | 二胞或成熟花粉时期 | 八核胚囊 |
| 12.0 ~ 15.0 | 成熟花粉时期 | 七细胞八核胚囊 |

配子体发育情况,发现在胚囊形成的过程中有异常现象发生,但经过大量切片统计,胚囊不能正常发育的数量很少,大部分都能发育成正常的 7-细胞胚囊。因此,认为蓝猪耳雌性生殖细胞发育异常并不是其结实率低的主要原因。

参考文献

- [1] 陈素红,田惠桥,廖景平. 蓝猪耳受精生物学研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(6): 532-538.

表 2 单因子生态安全分值

Table 2 Single factor ecological security score

| 序号 No. | 因子 Factor | 指标类型 Index type | 权重 Weight | 数值 Value | | 变化率 Change rate//% | 单因子分值 Score of single factor |
|-----------|---------------|--------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | | | | 2010 年 | 2020 年 | | |
| 1 | 全区生态服务价值 | 正向指标 | 0.114 | 3.37 | 3.44 | 2.10 | 1.021 0 |
| 2 | 全区绿当量 | 正向指标 | 0.086 | 52.66% | 51.55% | -2.11 | 0.974 5 |
| 3 | 人均耕地面积 | 正向指标 | 0.072 | 197.09 m ² | 147.47 m ² | -25.18 | 0.748 2 |
| 4 | 全区生态承载力 | 正向指标 | 0.045 | 82 380 | 81 508 | -1.06 | 0.989 4 |
| 5 | 森林覆盖率 | 正向指标 | 0.062 | 60.06% | 72.00% | 19.77 | 1.197 7 |
| 6 | 生态用地比例 | 正向指标 | 0.034 | 59.12% | 56.49% | -4.45 | 0.955 5 |
| 7 | Shannon 多样性指数 | 正向指标 | 0.131 | 2.585 6 | 2.6093 | 0.91 | 1.009 1 |
| 8 | 蔓延度指数 | 正向指标 | 0.085 | 0.967 | 50.968 1 | 0.06 | 1.000 6 |
| 9 | 聚集度指数 | 正向指标 | 0.074 | 56.537 8 | 56.471 2 | -0.12 | 0.998 8 |
| 10 | 总人口数 | 逆向指标 | 0.061 | 1 060 400 人 | 1 233 742 人 | 16.35 | 0.934 0 |
| 11 | 城镇化率 | 正向指标 | 0.038 | 22.00% | 37.00% | 68.18 | 1.681 8 |
| 12 | 人口增长率 | 逆向指标 | 0.037 | 1.00% | 0.70% | -30.00 | 2.174 7 |
| 13 | 农民人均纯收入 | 正向指标 | 0.060 | 2 666 元 | 12 000 元 | 350.11 | 4.501 1 |
| 14 | 农林牧渔产值 | 正向指标 | 0.065 | 42.07 亿元 | 60.00 亿元 | 42.62 | 1.426 2 |
| 15 | 粮食产量 | 正向指标 | 0.035 | 454 191 万 t | 500 000 万 t | 10.08 | 1.100 8 |

根据公式(2)计算出平江县土地整治规划环境影响生态安全综合指数为 1.120 4,参照土地生态安全等级划分,属于较安全等级。

从总体上看,说明规划从生态安全角度是切实可行的,改善了全县的生态环境,优化了景观格局,促进了社会经济发展。具体来说,生态服务价值总量增长了 2.10%,森林覆盖率上升 19.77%。根据景观格局指数的提高,说明农村生活生产环境明显改善。社会环境影响显著,人口增长速度放缓,城镇化率逐年提高。经济环境影响较大,土地整治最大受益者农民的收入逐年增加,粮食安全得到保障。

4 结论

(1)在总结前人研究成果的基础上,创新性地引入生态服务价值和景观格局因素,将考核范围扩大到空间层面,建立了一套包含生态环境、景观格局、社会环境、经济环境四大因素的全新土地整治规划环境影响评价指标体系,采用层次分析法和熵值法主客观相结合的综合确权方法,使土地整治规划环境影响评价更加科学。

(2)实证分析结果显示,平江县 2020 年的生态安全综合

指数为 1.120 4,明显优于 2010 年的现状值,说明土地整治规划对环境的整体影响是正面的,该规划从生态安全方面来看是切实可行的。同时也应注意,某些指标如全区绿当量、人均耕地面积、全区生态承载力和聚集度指数等呈下降趋势,在规划的调整过程中应重点关注这些可能被忽视的指标,在生态环境允许的范围内,使得各项指标尽可能保持均衡。

参考文献

- [1] 顾湘,姜海,曲福田. 区域建设用地集约利用综合评价:以江苏省为例[J]. 资源科学,2006,28(6):112-119.
- [2] 贾冰,李升峰,贾克敬,等. 中国土地利用规划环境影响评价研究评述[J]. 中国土地科学,2009,23(5):76-80.
- [3] 陈威,潘润秋,张强,等. 基于生态安全的土地整治规划环境影响评价:以莆田市荔城区为例[J]. 中国国土资源经济,2016(2):68-72.
- [4] 谢高地,甄霖,鲁春霞,等. 一个基于专家知识的生态系统服务价值化方法[J]. 自然资源学报,2008,23(5):911-919.
- [5] 刘艳芳,明冬萍,杨建宇,等. 基于生态绿当量的土地利用结构优化[J]. 武汉大学学报(信息科学版),2002,27(5):493-498.
- [6] 李春燕,南灵. 陕西省土地生态安全动态评价及障碍因子诊断[J]. 中国土地科学,2015,29(4):72-81.
- [7] 刘庆,陈利根,舒帮荣,等. 长株潭城市群土地生态安全动态评价研究[J]. 长江流域资源与环境,2010,19(10):1192-1197.
- [8] 陈素红,杨延红,廖景平,等. 蓝猪耳卵细胞和合子的分离[J]. 植物生理与分子生物学学报,2005,31(4):383-388.
- [9] CHEN S H, LIAO J P, KUANG A X, et al. Isolation of two populations of sperm cells from the pollen tube of *Torenia fournieri* [J]. Plant Cell Rep, 2006,25(11):1138-1142.
- [10] HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KAWANO S, et al. Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri* [J]. Plant cell, 1998,10(12):2019-2031.
- [11] HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KAWANO S, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell [J]. Science, 2001,293:1480-1483.
- [12] HAN Y Z, HUANG B Q, ZEE S Y, et al. Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* Lind. before and during fertilization [J]. Planta, 2000,211(1):158-162.
- [13] HAN Y Z, HUANG B Q, GUO F L, et al. Sperm extract and inositol 1,4,5-triphosphate induce cytosolic calcium rise in the central cell of *Torenia fournieri* [J]. Sex Plant Reprod, 2002,15(4):187-193.
- [14] YUAN M, FU Y, WANG F, et al. Fertilization in *Torenia fournieri*: Actin organization and nuclear behavior in the central cell and primary endosperm [J]. Science in China (Life sciences), 2002,45(2):211-224.
- [15] 吴娟子. 蓝猪耳花粉管细胞壁超微结构的 FESEM 和 AFM 比较研究 [J]. 安徽农业科学, 2011,39(35):21802-21804.
- [16] 于金,成诚,王雅英,等. 蓝猪耳离体受精初试 [J]. 植物生理学报, 2012,48(10):1015-1020.
- [17] VIVIAN B G, EMMA L F. Megasporogenesis and seed development in *Mimulus tigrinus* and *Torenia fournieri* [J]. Bull Tor Bot Club, 1951,79(1):6-24.
- [18] TIWARI S C. Callose in the walls of mature embryo sac of *Torenia fournieri* [J]. Protoplasma, 1982,110(1):1-4.
- [19] TIWARI S C. The hypostase in *Torenia fournieri* Lind.: A histochemical study of the cell walls [J]. Ann Bot, 1983,51(1):17-26.
- [20] WALLWORK M A B, SEDGLEY M. Early events in the penetration of the embryo sac in *Torenia fournieri* (Lind.) [J]. Ann Bot, 2000,85(4):447-454.
- [21] 陈素红,邹璞,廖景平. 蓝猪耳小孢子发生和雄配子体发育 [J]. 热带亚热带植物学报, 2010,18(2):122-128.
- [22] CHARLESWORTH D. Why do plants produce so many more ovules than seeds? [J]. Nature, 1989,338:21-22.
- [23] 刘林德,王仲礼,田国伟,等. 刺五加大、小孢子发生和雌、雄配子发育的观察 [J]. 植物分类学报, 1998,36(4):289-297.
- [24] 潘跃芝,龚海. 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.

(上接第 130 页)