

海南山薯雌花发育及胚胎发育的研究

杨玲玲, 吴文婧, 许云, 黄小龙, 陈跃华, 黄东益

(海南大学农学院, 海口 570228)

摘要: 通过研究山薯的雌花及胚胎发育, 为山薯的胚胎学研究以及杂交育种奠定基础。结果表明: 山薯大部分为雌雄异株, 海南岛的山薯雌花花期约 3 个月, 为 9 月初至 11 月末。子房 3 室, 每室有 2 个倒生胚珠; 胚珠具厚珠心, 双珠被。珠孔一端表皮下的孢原细胞逐渐发育为大孢子母细胞。大孢子母细胞减数分裂形成 4 个呈线形排列的大孢子, 其中只有 1 个可以发育为功能大孢子。成熟的胚囊为 7 胞 8 核胚囊, 其胚囊发育类型为蓼型。卵细胞的受精属于有丝分裂前型。其胚的发育类型为柳叶菜型, 经过二细胞原胚、倒 T 型原胚、棒状胚、球形胚和梨形胚这 5 个发育阶段。胚乳的发育为核型。

关键词: 山薯; 雌花; 胚胎发育

Studies on Female Flower Development and Embryonic Development of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. in Hainan

YANG Ling-ling, WU Wen-qiang, XU Yun, HUANG Xiao-long, CHEN Yue-hua, HUANG Dong-yi

(Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: This paper studied the development of female flowers and embryo in *Dioscorea fordii* Prain et Burk., and laid the foundation for it on the study of embryology and hybridization breeding. The results showed that: most of *D. fordii* Prain et Burk. was dioecious, and female flowering period was about 3 months in Hainan, from early September to the end of November. There were three rooms in its ovary, and two anatropous ovules in each room; The ovule was crassinucellate and bitegminous. The archesporial cell under the micropyle epidermis gradually developed into megasporocyte mother cell. Then the megaspore mother cell underwent meiosis and formed 4 megaspore in line, and only one of megaspore developed into functional megaspore. The mature embryo sac was Polygonum type with 7 cells and 8 nuclei. The fertilization of egg cell was premitotic type. The development of embryo was onagrad type, and went through 5 development stages, including 2-cell proembryo, inverted T type proembryo, globular embryo clavate embryo and pear shaped embryo. The development of endosperm was karyotype.

Key words: *Dioscorea fordii* Prain et Burk.; female flower; embryonic development

山薯 (*Dioscorea fordii* Prain et Burk.) 是薯蓣科薯蓣属的一种缠绕草质藤本植物。山薯俗称广东淮山, 属于周生翅组, 周生翅组中还包括山药、参薯、日本薯蓣等 14 种、5 变种。我国是山薯的原产地之一, 目前主要分布在南方各省市, 包括福建、浙江、广东、广西、海南等省^[1-2]。山薯的块茎含有丰富的碳

水化合物、膳食纤维, 以及多种人体必需的维生素和矿物质, 既可食用又可开发为药物, 具有重要的经济价值和产业开发价值^[3]。山薯目前主要采用零余子或薯块进行无性繁殖, 少有利用杂交进行有性繁殖的报道^[4]。在薯蓣属内其他作物中通过杂交来进行有性繁殖的研究工作开展较少, S. Sadik 等^[5]

收稿日期: 2015-04-14 修回日期: 2015-05-13 网络出版日期: 2015-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151211.1459.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260346); 海南省自然科学基金项目 (311036); 海南省重点科技计划项目 (ZDXM20110009)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: 604787117@qq.com

通信作者: 吴文婧, 研究方向为薯蓣抗病育种。E-mail: wqiang_81@qq.com

黄东益, 研究方向为薯蓣种质资源创新利用及遗传机理研究。E-mail: hdongyi@126.com

总结了限制白山药有性繁殖的几个因素,并希望通过改善种子萌发来提高其有性繁殖率。吴宝成^[6]对盾叶薯蓣进行了人工杂交和空间诱变的研究。植物胚胎发育学的系统研究是杂交育种技术的基础性研究内容^[7]。目前山薯方面的研究主要集中在组织培养和引种栽培,但胚胎发育方面的系统研究报道较少^[8-11]。秦慧贞等^[12]、徐静^[13]都有对盾叶薯蓣的胚胎发育进行研究。徐静^[13]、符策等^[14]观察到盾叶薯蓣中存在雌雄同序异花株。本文对山薯雌花发育、大孢子发生、雌配子体发育、受精以及胚和胚乳发育开展研究,为山薯的杂交育种和种质创新奠定基础。

1 材料与方法

本试验材料采自海南儋州、文昌、临高等市县,并种植于海南大学农学院农业部薯蓣种质资源圃,山薯(*Dioscorea fordii* Prain et Burk.)薯块于4月份种植,9月初待雌花花序分化生长后,选取长势良好、发育程度相当的雌花序做标记,每1~3 d定点调查雌花花序及雌花的发育,并且采集不同发育时期的雌花,根据雌花大小、开放程度,分别固定于FAA固定液(50%酒精:冰醋酸:甲醛=89:6:5)中,固定24 h后转入70%乙醇中,在4℃中保存。部分材料不经过固定直接在体视显微镜下解剖观察并拍照。固定的材料通过乙醇梯度脱水,正丁醇透明,石蜡包埋,使用LeicaRM2235切片机切片,切片厚度8~12 μm,切片通过番红-固绿对染,中性树胶封片。于Olympus BH-2光学显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 雌花开花习性 & 雌花结构

通过形态观察发现山薯有4种开花株型:雌株(占39%)、雄株(占50%)、雌雄同株异序(占7%)和雌雄同序异花(占4%)(图1a、b、c、d),其中绝大部分为雌雄异株,且雌雄同序异花在山薯上首次发现。山薯薯块于4月份种植,9月中旬雌花开放,雌花花序单个着生于主茎和侧枝叶腋间,每个花序上的雌花由基部向顶部依次开放(图1e)。雌花花序穗状、色绿,长度为8~30 cm,着生雌花2~15个不等。在海南岛的山薯雌花的花期大致为:9月5~20日为花蕾期(图1f),9月20日~10月5日为初花期(图1g),10月5日~11月5日为盛花期(图1h),11月5~20日为末花期(图1i)。1个雌花序从开花到花萎缩需10~20 d,1朵雌花从开花到花萎缩

需10~18 d。雌花花被6瓣,花冠黄色,直径4~8 mm。雌蕊有3个分离的花柱,中央具花柱道,能看到6个退化雄蕊(图1j)。子房下位,具3室。中轴胎座,每室2个倒生胚珠(图1l)。胚珠受精后子房膨大,长成绿色蒴果,到后期果壳夹紫色,蒴果成熟干燥后呈黑褐色,长1.5~2.5 cm,宽0.5~1.5 cm,2个种子着生于子房室中轴中部,成熟时呈棕褐色,四周有薄膜状翅(图1k)。

2.2 胚珠的发育

在开花前14~16 d,子房胎座表皮下层的一些细胞平周分裂,产生胚珠原基(图2a),胚珠原基继续细胞分裂,前端发育形成珠心,然后基部形成珠柄。珠心基部的表皮细胞分裂较快,产生1环状突起,发育成内珠被(图2b),在珠心前端留下珠孔(图2c)。接着在紧靠内珠被基部又产生1个环状突起,形成外珠被(图2b)。珠心基部,珠被、珠心、珠柄连合为合点。由于珠被一侧发育快,一侧发育慢,使胚珠弯曲,逐渐发育形成倒生胚珠(图2b、c)。胚珠发育的同时,胚囊也在发育。

2.3 大孢子的发生

在珠被形成同时,珠心内部发生变化,在开花前14~16 d时,在靠近珠孔一端的表皮下,逐渐形成1个孢原细胞(图2d),该细胞体积较大,细胞质较浓,细胞器丰富,细胞核大而显著。孢原细胞经多次分裂,外侧形成珠心细胞,内侧形成大孢子母细胞。数层珠心细胞包围着大孢子母细胞,所以山薯的胚珠为厚珠心型。开花前9~11 d时,大孢子母细胞纵向延长其体积,第1次减数分裂形成2个子细胞(图2e),接着进行第2次分裂,形成呈直线形排列的大孢子四分体(图2f),只有近合点端的大孢子即功能大孢子能进一步发育(图2g)。而此时珠被也已将珠心包围,在顶端形成珠孔。

2.4 雌配子体的发育

开花前8~10 d时,功能大孢子形成后,其体积不断增大,同时出现1个大液泡,进一步发育成为单核胚囊(图2h),胚囊细胞中液泡逐渐占据胚囊大部分体积,随后细胞核分裂成2个子核,形成二核胚囊(图2i),2个核分别位于珠孔端和合点端。接着这2个核进一步分裂,形成四核胚囊,两端各有2个核(图2j),中间被1个大液泡所占据。然后这4个核又进行一次分裂,形成八核胚囊(图3a),其中4个核在珠孔端,另外4个核在合点端,且都游离于共同的细胞质中。随着核分裂的进行,胚囊细胞沿长轴方向显著地扩大,8个核开始进行形态和功能上的



a:雌株;b:雄株;c:雌雄同株异序;d:雌雄同序异花;e:雌花序;f:雌花花蕾期;g:雌花初花期,雌花开放;h:雌花盛花期,子房膨大;
i:雌花末花期,花枯萎,种子成熟;j:体视显微镜下的雌花;k:示2个倒生胚珠,其四周有膜状翅;
l:子房横切面,示3个胚珠,100×(光学显微镜下,下同)
a:Female plants,b:Male plants,c:Hermaphrodite isobaric plants,d:Androgynous different, e:Female anthotaxy,f:Female flowers in bud stage,
g:Early female flowering,h:Female flowering,i:End of female flowering,j:Female flower under stereomicroscope,k:Two anatropous,
surrounded by membranous wings,l:Cross section of ovary,showing the three ovules,100×(under light microscope,similarly hereinafter)

图1 山薯四种开花类型及其雌花的发育

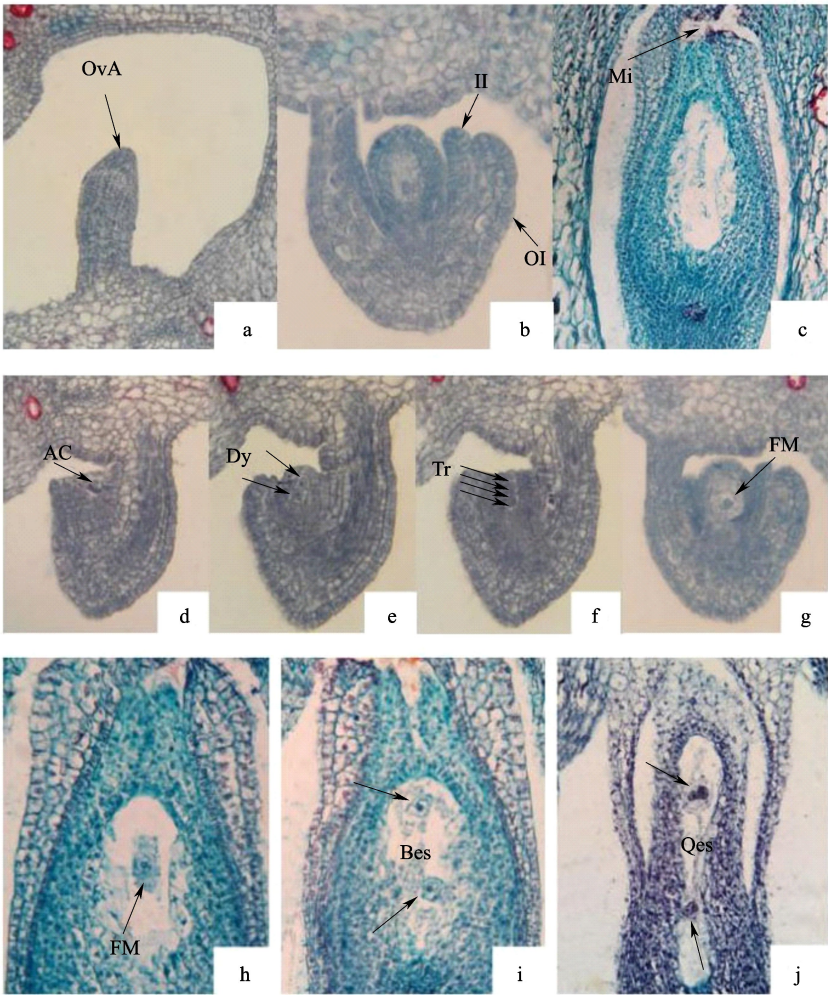
Fig.1 Four kinds of blossom and development of female flowers in *D. Prain et Burk*.

分化。胚囊合点端和珠孔端各有1核向胚囊的中部移动,成为互相靠拢的两个极核(图3c)。极核核仁较大,并与周围的细胞质一起组成胚囊中央大型的高度液泡化的中央细胞。近珠孔端的其他3个核分化成卵器,1个分化成卵细胞,另2个分化成助细胞(图3b)。近合点端3个核则发育成反足细胞。珠孔端2助细胞极性明显,与卵细胞成“品”字形排列。至此,单核胚囊就发育成7胞8核的成熟胚囊(图3a),此时花已完全开放,呈黄色。在成熟胚囊

晚期的时候,3个反足细胞开始消失。从上述大孢子发育过程来看,山薯的胚囊发育为蓼型。

2.5 双受精

(1)卵细胞受精过程。山薯的雌雄花开放后,花粉通过风媒或虫媒传到雌蕊柱头上,花粉管萌发,沿着珠孔进入胚囊。到达胚囊后,进入一个助细胞,并将精细胞等内容物释放,其中1个精细胞很快与卵细胞接触,贴附在其质膜上(图3d)。接着,精核进入卵细胞,其染色质分散开来,在靠近卵核的



a: 胚珠原基, 400 × ; b: 倒生胚珠, 示内珠被和外珠被, 400 × ; c: 倒生胚珠, 示珠孔, 400 × ; d: 孢原细胞, 400 × ; e: 二分体, 400 × ; f: 呈线形排列的四分体, 400 × ; g: 功能大孢子, 400 × ; h: 单核胚囊, 400 × ; i: 二核胚囊, 400 × ; j: 四核胚囊, 400 × 。
OvA: 胚珠原基; II: 内珠被; OI: 外珠被; Mi: 珠孔; AC: 孢原细胞; Dy: 二分体; Tr: 四分体; FM: 功能大孢子; Bes: 二核胚囊; Qes: 四核胚囊
a: The ovule primordia, 400 × , b: An anatropous, showing internal integument and outer integument, 400 × ,
c: An anatropous, showing micropyle, 400 × , d: The archesporial cell, 400 × , e: The dyad, 400 × , f: The tetrad in line, 400 × ,
g: The function megaspore, 400 × , h: Uninucleate embryo sac, 400 × , i: Binucleate embryo sac, 400 × , j: Quad embryo sac, 400 × .
OvA: Ovule primordia; II: Internal integument; OI: Outer integument; Mi: Micropyle; AC: Archesporial cell; Dy: Dyad; Tr: Tetrad;
FM: Function megaspore; Bes: Binucleate embryo sac; Qes: Quad embryo sac

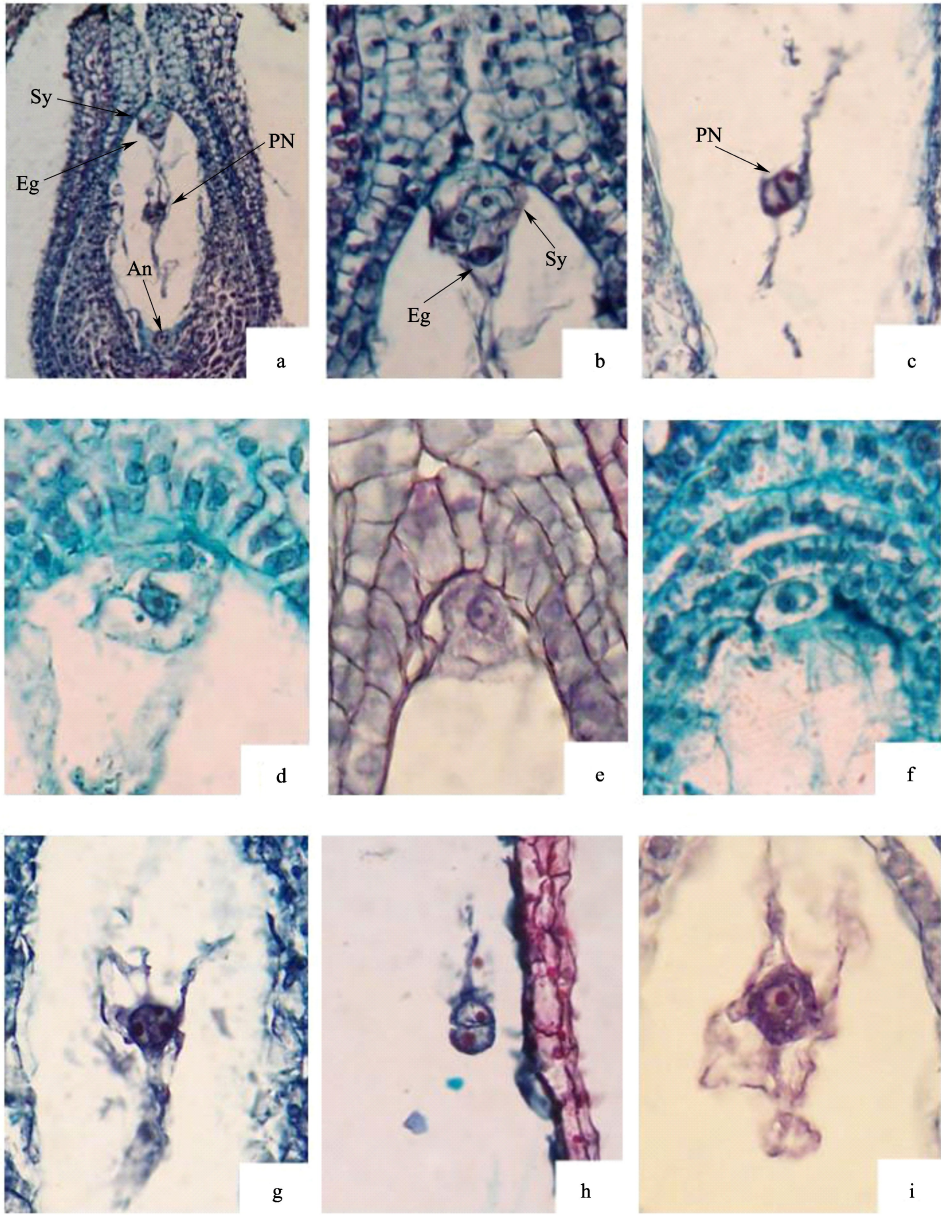
图 2 山薯胚珠的发育、大孢子的发生、雌配子体的发育和双受精过程(一)

Fig. 2 Ovule development, megasporogenesis, female gametophyte development and double fertilization in *D. Prain et Burk.* (一)

位置形成雄性小核仁(图 3e), 雄性小核仁增大一些后便与雌性核仁融合, 形成一个核仁的合子(图 3f)。合子核仁染色较深, 细胞质较多。至此, 卵细胞完成受精。由于精核与卵核的融合在合子进行有丝分裂之前, 所以山薯的卵细胞受精属于有丝分裂前型。

(2) 极核受精过程。在山薯成熟胚囊中, 两个极核相互靠在一起, 各含 1 个核仁(图 3c)。从花

粉管中释放出来的 2 个精细胞, 一个与卵细胞融合, 另一个精细胞靠近 2 个极核, 与其中一个发生融合, 雄性小核仁出现在这个受精极核之中(图 3g), 并逐渐与这个极核的核仁融合, 形成一个大的核仁(图 3h)。之后, 这个受精极核在有丝分裂之后才慢慢与另一个极核融合形成初生胚乳核(图 3i)。精子与极核的融合稍早于精核与卵核的融合。



a:成熟胚囊,400 × ;b:卵细胞和助细胞的放大,400 × ;c:两个极核的放大,400 × ;d:精核贴附在卵细胞膜表面,1000 × ;e:精核进入卵细胞,1000 × ;f:精卵融合形成合子,1000 × ;g:精核进入一个极核,1000 × ;h:精核与一个极核融合,形成一个较大的核仁,1000 × ;i:初生胚乳核,1000 × 。 Sy:助细胞;An:反足细胞;Eg:卵细胞;PN:极核

a; Mature embryo sac,400 × ,b;Enlargement of egg cell and synergids,400 × ,c;Enlargement of two polar nuclei,400 × ,
d:One sperm attached to the egg membrane surface,1000 × ,e:One sperm went into the egg,1000 × ,
f:Sperm-egg fusion to form a zygote,1000 × ,g:Another sperm went into a polar nuclei,1000 × ,
h:Sperm fusion with a pole,forming a large nucleolus,1000 × ,i:Primary endosperm nucleus,1000 × .
Sy:Synergids;An:Antipodal cells;Eg:Egg cell;PN:Polar nuclei

图3 山薯胚珠的发育、大孢子的发生、雌配子体的发育和双受精过程(二)

Fig. 3 Ovule development, megasporogenesis, female gametophyte development and double fertilization in *D. Prain et Burk.* (二)

2.6 胚的发育

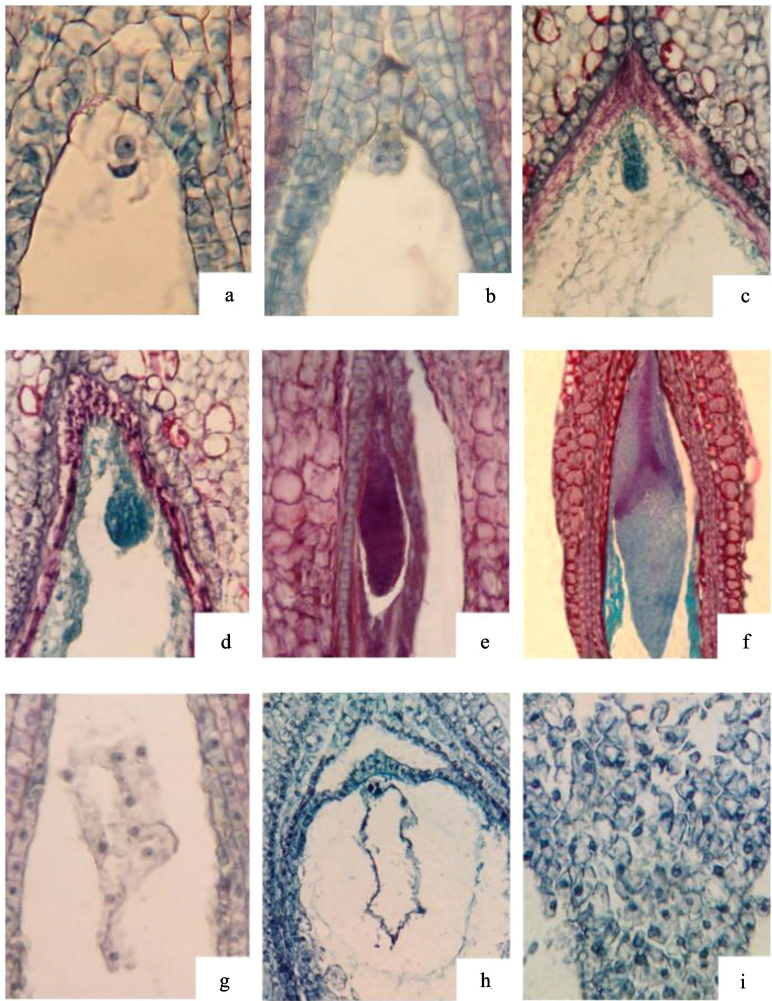
合子的分裂开启了胚的发育。双受精结束后,合子经过短暂的休眠,细胞质浓度增加,极性加强,呈液泡化。花开放后4~7 d,合子进行第1次分裂,

为不均等的横分裂,形成靠合点端的顶细胞和靠珠孔端的基细胞,这2个细胞构成山薯的二细胞原胚(图4a)。顶细胞较小,有浓厚的细胞质,染色较深,形成以后的胚体;基细胞较大,有大的液泡,染色较

浅,发育成以后的胚柄。基细胞随后进行一次横分裂,顶细胞进行一次纵分裂,形成由 4 个细胞组成的倒 T 型原胚(图 4b)。这 4 个细胞的大小及其液泡化程度都不相同。接着基细胞进行多次横分裂和纵分裂,顶细胞也无规律地进行多次横分裂和纵分裂,形成多细胞的棒状原胚(图 4c)。山薯的顶细胞逐渐分裂构成胚体,而基细胞逐渐发育构成胚柄,故山薯的胚胎发育类型为柳叶菜型。形成棒状原胚之后,胚体细胞不断分裂形成球形胚(图 4d、e),其体积也不断增大。花开放后 10 ~ 13 d,随着细胞分裂的继续进行,在将来形成子叶的位置出现子叶原基,在胚的一侧出现一个凹口,进入到梨形胚阶段(图 4f),胚逐渐发育完成,而种子的外壳也已变得坚硬,长大成为蒴果。

2.7 胚乳的发育

山薯的初生胚乳核分裂比合子分裂进行得早。在合子休眠时,初生胚乳核就开始分裂,第 1 次分裂为纵向分裂,不伴随胞质分裂,不形成细胞壁,呈游离状态(图 4g),所以山薯的胚乳发育为核型。分裂方式为有丝分裂,分裂速度较快,形成的游离胚乳核大小相近,多分布在胚囊周边位置。在合子形成棒状原胚时,游离的胚乳核与周围的原生质一起连成胚乳膜(图 4h),包围幼胚。接着,游离胚乳核开始细胞化,出现细胞壁,首先在珠孔端形成,在胚囊中自由生长形成。到梨形胚阶段时,游离核已经形成胚乳细胞(图 4i),其体积较大,排列紧密。在山薯成熟种子中,含丰富的胚乳。



a: 合子分裂成二细胞原胚,1000 × ;b: 四细胞原胚,1000 × ;c: 成棒状的胚,400 × ;d: 球形胚,400 × ;e: 球形胚晚期,400 × ;

f: 梨形胚,400 × ;g: 游离的胚乳核,400 × ;h: 胚乳膜,200 × ;i: 胚乳细胞,400 ×

a: Zygote split into two proembryo,1000 × ,b: Four-cell proembryo,1000 × ,c: Club-shaped proembryo,400 × ,d: Globular embryo,400 × ,e: Late stage of globular embryo,400 × ,f: Pyriform embryo,400 × ,g: Endosperm free nuclei,400 × ,h: Endosperm membrane,200 × ,i: Endosperm cells,400 ×

图 4 山薯胚的发育和胚乳的发育

Fig. 4 The development of embryo and endosperm in *D. Prain et Burk.*

3 讨论

观察到的山薯大部分为雌雄异株,少数几株雌雄同株异序或同序的材料,雌雄同株植物在薯蓣属内所占的比例非常低,杨俊林^[15]认为雌雄同序不是一种能够稳定遗传的类型,只是由于性别分化产生的偶然现象。B. Charlesworth 等^[16]认为最原始的被子植物是雌雄同体的,有花植物性系统进化的主要趋势是从性别联合走向性别分离。推测发现的雌雄同株异序和雌雄同序异花在山薯中属较原始的材料。郑玉红^[17]研究发现山薯在外部形态或化学成分方面存在着很丰富的变异类型,本文研究表明山薯的开花株型体现了这种变异,出现了较原始和较进化的开花类型,说明了海南岛不仅存在着丰富的山薯资源,也说明了海南可能是山薯重要的分化地区。

退化雄蕊存在于雌花中是被子植物常见的现象,吴宝成等^[18]发现在薯蓣属中很多物种雌花中都有退化雄蕊 3~6 枚,并认为演化越原始的物种,其雌花中的退化雄蕊更接近正常雄蕊,而演化较高级的物种,其退化雄蕊的退化程度较大,山薯的退化雄蕊不明显,只有半透明的杆状突起,就雌花中的雄蕊退化的情况来看,山薯在周生翅组中属于较进化的物种。

大孢子发生时产生的孢原细胞没有直接位于表皮层下,且形成了多层珠心细胞,因而将山薯的珠心类型归为厚珠心型^[19]。比较胚胎学上认为厚珠心,卵细胞比助细胞体积小,蓼型胚囊等一些特征比较原始^[20]。而山薯具厚珠心,切片观察中发现卵细胞比 2 个助细胞的体积要小,因而认为山薯保留了较多的原始性状。在很多成熟胚囊的切片中没有看到反足细胞,可能是其存在时间短,在受精前就已消失,这可能跟其胚胎发育过程的营养有关^[21]。冯玲枫^[22]也在连蕊茶中观察到 3 个反足细胞在形成后不久就退化消失了。山薯的胚胎发育过程与徐静^[13]描绘的盾叶薯蓣的发育过程基本相似。胚胎发育后期形成 2 个子叶原基,1 个形成子叶迅速长大,另 1 个退化。山薯等一些薯蓣属的植物既有单子叶植物的特征也兼有双子叶植物的一些形态特征,其在系统演化上有重要意义^[23]。更详细的胚胎发育过程以及山薯在系统进化分类的意义需要更进一步的深入研究。

山薯雌花在发育过程中,会出现部分胚珠败育现象,即果实成熟时,子房中原有的 6 个胚珠有 1~3 个不正常种子。导致胚珠败育的原因可能比较复

杂。胚囊发育的任何时候都可能发生胚珠败育^[24]。授粉不完全、受精不良导致胚珠败育^[25]。杨培周等^[26]发现花粉量偏少会导致高州普通野生稻结实率低。试验发现成熟的果实中远离柱头的胚珠常发生胚珠败育,可能花粉管的伸长不够导致远端的胚珠受精不良。有报道认为导致胚囊败育除了内因,也有可能是外界环境引起,其中之一就是病虫害的发生,炭疽病等病害的发生会严重影响山薯的生长^[27]。笔者也观察病害严重的植株种子往往发育不良。另外,山薯中雌雄同株异序和雌雄同序异花的材料的种子结实率远远低于雌株,胚珠败育的情况更明显,这很可能是由于珠心、珠被细胞早期生长缓慢或畸形、解体引起的^[28],也可能是大孢子母细胞不正常减数分裂或功能大孢子在发育过程中的核降解、胞质收缩而无法形成功能大孢子,还有可能是胚乳的解体使胚营养供应不足。具体导致胚珠败育的原因有待更进一步的研究。

参考文献

- [1] 方玉霖,刘剑秋,姜业芳. 福建薯蓣属植物叶脉序特征及其分类学意义[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2002,18(2): 65-67
- [2] 华树妹,涂前程,雷伏贵. 福建山药种质资源多样性的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):195-200
- [3] 韦本辉,甘秀芹,韦威泰,等. 淮山品种“桂淮 2 号”的选育及栽培研究[J]. 广西农业生物科学,2005,24(1):48-50
- [4] 韦本辉,唐荣华,韦威泰,等. 广西淮山生产现状及发展对策[J]. 广西农业科学,2003(1):7-9
- [5] Sadik S. A review of sexual propagation for yam improvement [M]. Nigeria: Tropical Root Crops Symposium, 1980:40-44
- [6] 吴宝成. 盾叶薯蓣人工杂交与空间诱变研究[D]. 南京:南京农业大学,2006
- [7] 黄亚辉. 盾叶薯蓣雄花发育、小孢子发生及雄配子体发育的研究[J]. 中国野生植物资源,2010,29(5):50-54
- [8] Apata D F, Ologhobo A D. Some aspects of the biochemistry and nutritive value of African yam bean seed[J]. Food Chem, 1990, 36:271-280
- [9] 丰锋,叶春海,李映志,等. 生长调节物质、碳源和光周期对山薯试管薯形成和生长发育的影响[J]. 植物生理学通讯, 2007,43(6):1045-1050
- [10] 严华兵,杨丽涛,董伟清,等. 山薯试管零余子形成过程中几种内源激素的变化[J]. 广西农业科学,2010,41(9):893-896
- [11] 朱保民. 野生山薯人工栽培技术[J]. 广西园艺,2005,16(5):53-54
- [12] 秦慧贞,李碧媛,吴竹君. 盾叶薯蓣的胚胎发育及其在演化上的意义[C]//南京中山植物园研究论文集. 南京:江苏科技出版社,1991:7-14
- [13] 徐静. 盾叶薯蓣大小孢子发生、雌雄配子体发育及受精的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2006
- [14] 符策,陆祖正,周婧,等. 盾叶薯蓣开花结果调查[J]. 广西热带农业,2005(1):10-12
- [15] 杨俊林. 盾叶薯蓣性别分化及其开花习性的初步研究[D]. 武汉:华中农业大学,2006
- [16] Charlesworth B, Charlesworth D. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy[J]. Am Nat, 1978, 112(988):975-977

(下转 302 页)