

单瓣与重瓣樱花雌雄蕊发育的比较研究

刘志雄^{1,2} 马小婷¹ 程朋军¹ 刘 颀¹ 李凤兰¹

(1 北京林业大学生物科学与技术学院 2 长江大学园艺园林学院)

摘要:对单瓣和重瓣樱花雌雄蕊的发育进行了系统观察。结果表明:单瓣樱花‘大岛樱’雌蕊 1 心皮 1 室,胚珠发育后心皮开始愈合,2 倒生胚珠,通常仅有 1 个能发育为成熟胚囊,双珠被,厚珠心,大孢子四分体线型排列,胚囊发育方式属蓼型;雄蕊小孢子四分体为四面体型,成熟花粉为二细胞型。重瓣樱花‘普贤象’和‘一叶’雄蕊数量显著少于‘大岛樱’,花药瓣化,花粉败育,雌蕊叶化。‘普贤象’少数花萼筒上着生异位子房和败育胚珠,‘一叶’少数花未完全叶化的子房内壁着生败育胚珠;‘普贤象’和‘一叶’均存在同株花异型现象。并对樱花重瓣花形态建成的分子机制展开了探讨。

关键词: 樱花;大小孢子发育;雌雄配子体;花发育

中图分类号: S718.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)04-0086-06

LIU Zhi-xiong^{1,2}; MA Xiao-ting¹; CHENG Peng-jun¹; LIU Di¹; LI Feng-lan¹. **Development of stamens and carpels in single and double flowers of *Cerasus serrulata*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32 (4) 86-91 [Ch, 14 ref.]

1 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei, 434025, P. R. China.

Morphogenesis of stamens and carpels in single and double flowers of *Cerasus serrulata* var. *lannesiana* as well as the development of their male and female gametophytes were investigated. First, the ‘Makino’ ovules are borne on unsealed carpels. During their development, carpels close with the ovules hidden inside. The ovule is anatropous, bitegmatic and crassinucellate. Megaspore mother cells undergo meiosis and develop into linear tetrad. Subsequently, the larger one at the chalazal end becomes functional megaspore and develops into an embryo sac of a polygonum type after the third mitotic division. The ‘Makino’ microspore tetrads belong to the tetrahedral type, with two-celled mature pollen. In contrast, the ‘Albo-rosea’ and ‘Hisakura’ double flowers have petaloid anthers and leaflike carpels, with fewer numbers of stamens compared with ‘Makino’. The petaloid anther houses a large number of sterile pollen grains. Flowers on the same tree show different final floral architectures, where some flowers contain ectopic unsealed carpels housing abortion ovules. The molecular mechanisms of double flower morphogenesis in cherry are discussed.

Key words *Cerasus serrulata*; megasporogenesis and microsporogenesis; female and male gametophytes; flower development

樱花 (*Cerasus serrulata*) 是蔷薇科 (Rosaceae) 樱属著名的观赏花木。因其花色娇艳、树形优美、品种繁多、适应性广且观赏价值高,被广泛应用于园林绿化和景观建设。樱花主产于中国和日本,具有种内

变种、品种繁多,变异复杂等特点。本文对单瓣与重瓣樱花雌雄蕊发生和发育进行形态学和细胞学比较观察,并对樱花重瓣花形态建成的分子机制进行初步分析,以为樱花生殖生物学的研究提供更多的

收稿日期:2009-09-24

基金项目:国家自然科学基金项目(30571473)、“948”国家林业局引进项目(99417)。

第一作者:刘志雄,博士生,讲师。主要研究方向:植物发育生物学。电话:010-62338717 Email:zxliu1977@yahoo.com.cn 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:李凤兰,教授,博士生导师。主要研究方向:植物发育生物学。电话:010-62338717 Email: lifl@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://www.bjfjournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

资料,并为樱花新品种选育和种质创新提供一定的理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的单瓣樱花为日本晚樱(*Cerasus serrulata* var. *lannesiana*)品种‘大岛樱’(*C. lannesiana* ‘Makino’),重瓣樱花为日本晚樱品种‘一叶’(*C. lannesiana* ‘Hisakura’)和‘普贤像’(*C. lannesiana* ‘Albo-rosea’)。其中,‘大岛樱’采自中国农业大学校园,‘一叶’采自清华园,‘普贤像’采自北京林业大学校园。

1.2 方法

分别取3个日本晚樱品种不同发育时期的新鲜花芽,在Nikon SMZ-10型实体显微镜下观察花序、小花及各个花器官的结构,并用游标卡尺测量其大小,拍照记录。按小花大小归类分装(长度分别为1.0~1.5、2.0~2.9、3.0~3.9、4.0~5.9、6.0~7.9、8.0~9.9、10.0~14.9、15.0~20 mm),并取开花当天的子房和未散粉的花药,用FAA固定液固定,按常规石蜡切片技术包埋,用Leica RM 2015石蜡切片连续切片,切片厚度8 μm,用1%蕃红-0.1%固绿对染显示其细胞结构,在Olympus BH-2型显微镜下观察拍照。开花当天取新鲜成熟

的花粉,用悬滴法测定花粉活力,蔗糖浓度为15%,在25℃下培养40~50 min后取出,在显微镜下观察其花粉萌发情况,用Olympus BH-2显微镜拍照,选取30个视野统计其萌发率^[1-2]。在开花当天各取鲜花30朵,分别统计其花瓣数和雄蕊数,用软件SPSS 13.0进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单瓣与重瓣樱花花器官的形态学及细胞学比较

单瓣‘大岛樱’萼片5枚,绿色,向阳面有红晕;花瓣5片,白色;雄蕊多数(43~52枚)(图1a);子房上位,1心皮1室,胚珠发育后心皮开始愈合,边缘胎座2倒生胚珠(图1d,图2a、b),通常仅有1个发育为成熟胚囊,双珠被,厚珠心。

重瓣品种‘普贤像’萼片5枚;花瓣30~40片,白色或粉白(图1e);雄蕊多数(17~27枚),花药瓣化(图1f),且雄蕊极显著少于‘大岛樱’和‘一叶’($P < 0.01$);雌蕊叶化,前端残留2个花柱,少数花萼筒内长出异位心皮,偶有胚珠,但未见成熟胚囊(图1g、h)。重瓣品种‘一叶’萼片5枚;花瓣24~34片,白色或粉白(图1i);雄蕊多数(19~29枚),花药瓣化,且数量极显著少于‘大岛樱’($P < 0.01$)(图1j);雌蕊叶化,通常1~2片,少数花雌蕊子房未完全叶化,生有胚珠,但未见成熟胚囊(图1k、l)。

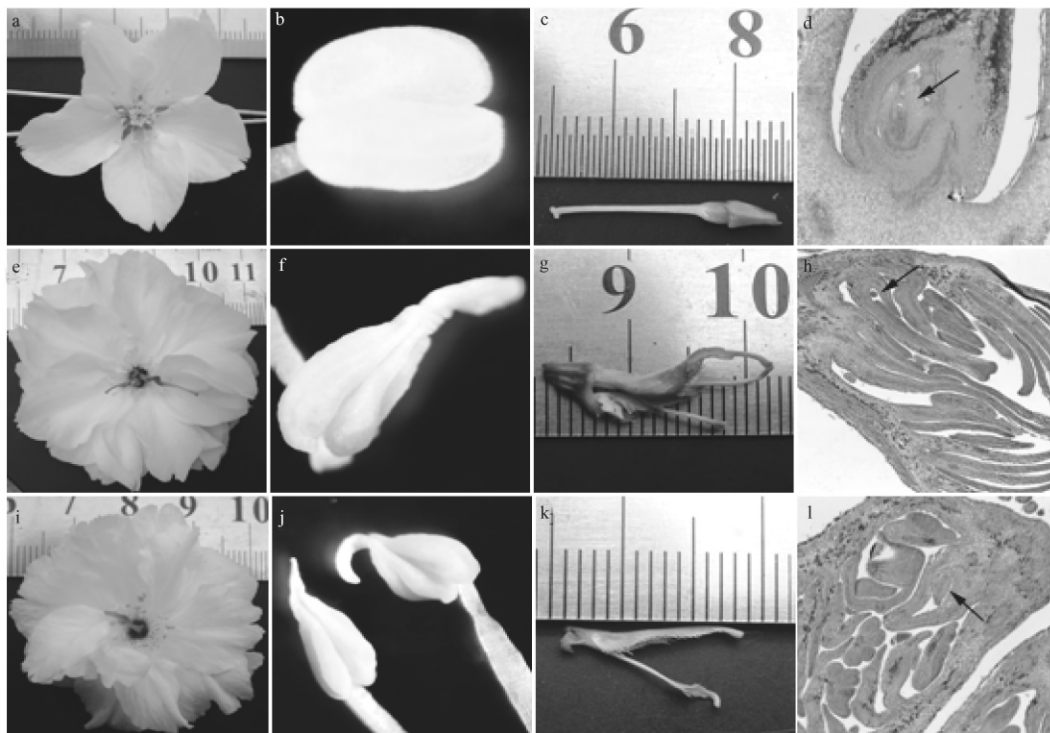


图1 单瓣与重瓣樱花花器官的形态学及细胞学比较

Fig. 1 Morphological and cytological observation on simple and double flowers of *C. serrulata* var. *lannesiana*

注:a. ‘大岛樱’的花;b. ‘大岛樱’的雄蕊($\times 3.5$);c. ‘大岛樱’的雌蕊;d. 倒生胚珠($\times 12.8$);e. ‘普贤像’的花;f. ‘普贤像’瓣化的雄蕊($\times 3.5$);g. ‘普贤像’叶化的心皮;h. ‘普贤像’的异位心皮($\times 12.8$);i. ‘一叶’的花;j. ‘一叶’瓣化的雄蕊($\times 2.5$);k. ‘一叶’叶化的心皮;l. ‘一叶’的异位胚珠($\times 12.8$)。

2.2 单瓣与重瓣樱花雌、雄蕊发育的比较

连续2年(2007年10月—2009年10月)观察供试的3个日本晚樱品种在北京地区雌雄蕊发育规律发现,单瓣‘大岛樱’在9月底形成雄蕊原基,10月上旬花芽长约为6.48 mm时形成雌蕊原基,并在当年11月底,小花长为1.0~1.5 mm时,雌蕊基本形成,雄蕊花药中出现造孢细胞或小孢子母细胞,接着花芽进入休眠期。翌年2月底在子房内壁才会出现胚珠原基,当3月中旬小花长为3.0~3.9 mm时,小孢子母细胞减数分裂形成四分体,珠心组织开始分化出内珠被,珠心中孢原细胞分化成造孢细胞。小花长为6.0~7.9 mm时,大孢子母细胞开始减数分裂,外珠被出现,花粉囊中出现靠边期的单核小孢子。小花长为8.0~9.9 mm时,功能大孢子分裂成2核大孢子,单核小孢子发育成二孢子型花粉粒。小花长为10.0~14.9 mm,2核大孢子发育成8核胚囊。从发育时间上来看,单瓣‘大岛樱’雌蕊的发育相对滞后于雄蕊的发育,雄配子体早雌配子7 d左右成熟。

重瓣‘普贤像’和‘一叶’雌、雄蕊原基在10月形成,在11月底‘一叶’花药中出现造孢细胞后开

始休眠,但‘普贤像’花芽休眠前花药中未观察到造孢细胞。与单瓣‘大岛樱’相比,重瓣‘普贤像’和‘一叶’翌年小孢子发生和雄配子体的发育在时间上明显晚于‘大岛樱’,而且从小孢子母细胞到成熟花粉粒整个发育过程所用的时间要比单瓣短。‘普贤像’和‘一叶’雌蕊叶化,而且通常2个原基发生后,各自发育长成叶化雌蕊。‘普贤像’少数花萼筒上会长出异位心皮,心皮子房中有1~2个胚珠,但未发育成成熟胚囊;而且有部分子房未完全愈合的心皮内壁会长出1~2个裸露败育胚珠。‘一叶’少数花中雌蕊未完全叶化的子房内壁上也会长出败育胚珠。

2.3 单瓣樱花大孢子发生和雌配子体发育

2.3.1 大孢子发生

单瓣‘大岛樱’雌蕊为1心皮1室,边缘胎座,2倒生胚珠,通常仅有1个发育为成熟胚囊,双珠被,厚珠心。发育初期,在未愈合的腹缝两侧子房内壁的胎座上各产生一团突起,即胚珠原基(图2a),随着腹缝的愈合,胚珠原基逐渐增大(图2b),最后分化为具珠被、珠心和珠柄的成熟倒生胚珠。当内珠被起源时,珠心表皮下的一个细胞体积增大,发育成

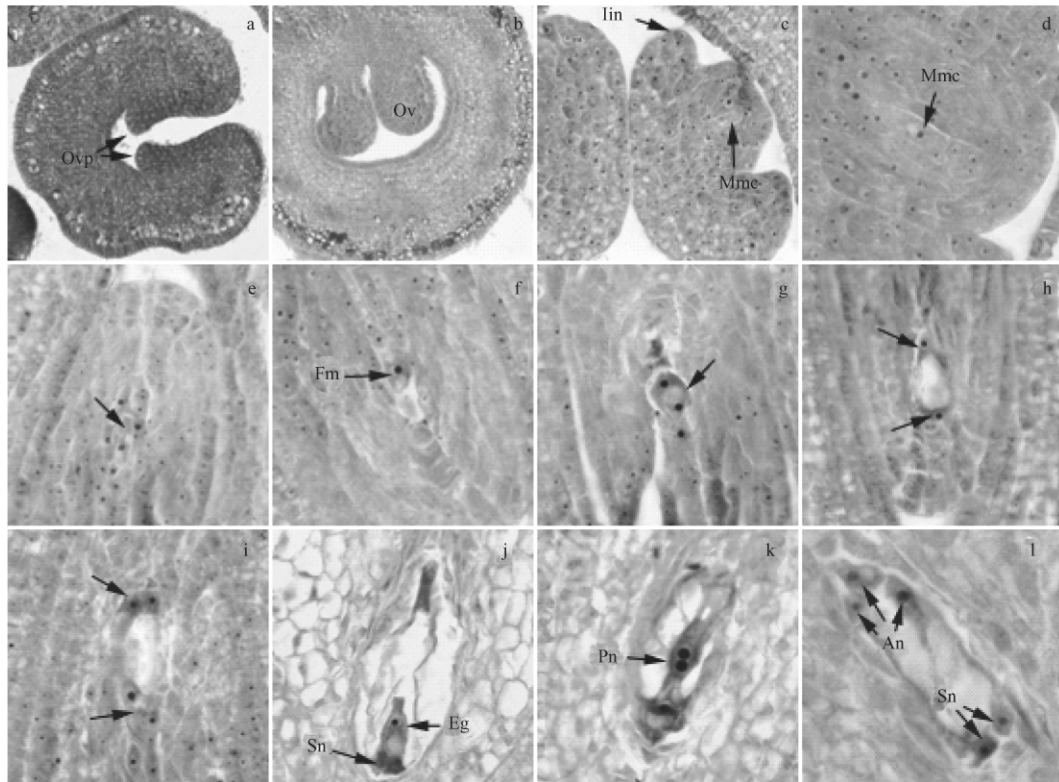


图2 单瓣樱花‘大岛’大孢子发生和雌配子体发育

Fig.2 Megasporogenesis and development of female gametophyte of ‘Makino’

注:a. 胚珠原基在未愈合的心皮内壁形成($\times 64$);b. 发育中的胚珠和愈合的心皮($\times 64$);c. 大孢子母细胞和内珠被的发育($\times 128$);d. 大孢子母细胞($\times 128$);e. 4个大孢子($\times 128$);f. 功能大孢子和3个退化的大孢子($\times 128$);g. 单核胚囊第1次有丝分裂末期($\times 128$);h. 2核胚囊($\times 128$);i. 4核胚囊($\times 128$);j. 卵器($\times 128$);k. 极核($\times 128$);l. 助细胞和反足细胞($\times 128$);Ovp. 胚珠原基;Ov. 胚珠;Mmc. 大孢子母细胞;lin. 内珠被;Eg. 卵细胞;Sn. 助细胞;Pn. 极核;An. 反足细胞。

孢原细胞,随后,孢原细胞的体积迅速扩大,细胞核颜色加深,细胞质变浓,直接发育成大孢子母细胞(图2c、d)。当外珠被起源后,大孢子母细胞经过减数分裂形成4个单相核的大孢子,大孢子四分体成线型排列(图2e),其中位于合点端的大孢子发育较快,核大,成为功能大孢子,能进一步发育成胚囊,其余3个位于珠孔端的大孢子很快退化消失(图2f)。

2.3.2 雌配子体发育

功能大孢子进行连续的3次有丝分裂,分别形成2核胚囊(图2g、h)、4核胚囊(图2i)、8核胚囊(图2j、k、l)。其发育类型属于蓍型,靠近珠孔端3个细胞组成卵器(图2j),在胚囊中央两枚极核形成中央细胞(图2k),在胚囊合点端的3枚核,成为3个反足细胞聚合在一起(图2l)。

2.4 单瓣与重瓣樱花小孢子发生和雄配子体发育的比较

单瓣‘大岛樱’花药发育早期,花药角隅表皮下的孢原细胞分裂形成内外两层细胞,即外层的初生壁细胞和内层的造孢细胞。壁细胞继续分裂,形成花粉囊的壁。它位于花药表皮之下,分化为3层,即纤维层、中层和绒毡层(图3a)。造孢细胞继续分裂分化成小孢子母细胞,小孢子母细胞初期呈多边形,细胞核大,细胞质浓,体积较大(图3a)。当多核绒毡层开始解体时,小孢子母细胞彼此分离(图3b),开始减数分裂形成四面体型的四分体(图3c、d、e)。四分体外有厚的胼胝质包围(图3e)。随着四分体胼胝质的解体消失,四分体中的小孢子各自分离,形成4个多边体型的单核小孢子(图3f)。多边体型

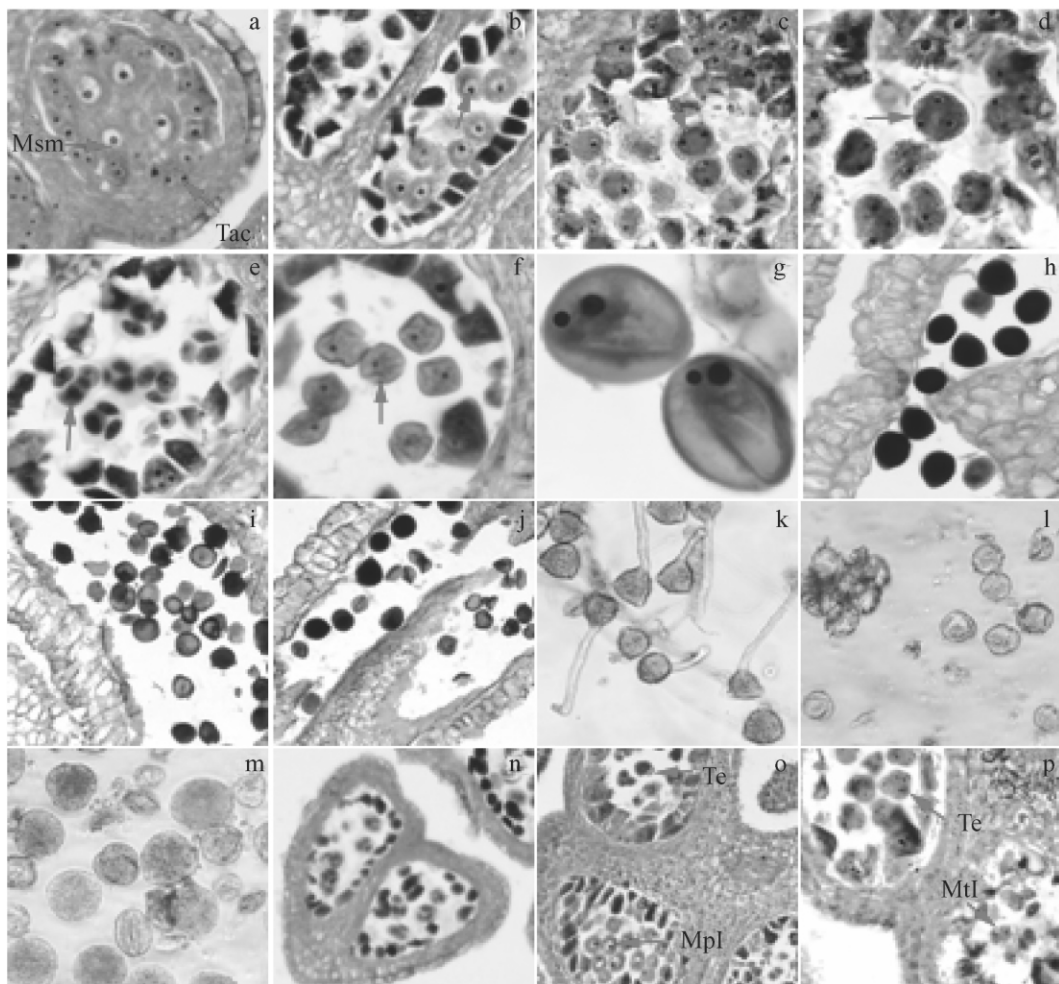


图3 单瓣与重瓣樱花小孢子发生和雄配子体发育的比较

Fig. 3 Microsporogenesis and development of male gametophyte of simple and double flowers of *C. serrulata* var. *lannesiana*

注:a.小孢子母细胞和多核绒毡层细胞($\times 128$);b.小孢子母细胞减数分裂前期I($\times 128$);c.小孢子母细胞减数分裂末期I($\times 128$);d.小孢子母细胞减数分裂末期II($\times 128$);e.四面体型的四分体($\times 128$);f.单核小孢子($\times 128$);g.二孢型花粉粒($\times 320$);h.‘大岛樱’成熟花粉粒($\times 64$);i.‘普贤像’成熟花药($\times 32$);j.‘一叶’成熟花药($\times 32$);k.‘大岛樱’花粉体外萌发($\times 128$);l.‘普贤像’花粉体外萌发($\times 128$);m.‘一叶’花粉体外萌发($\times 128$);n.发育中的‘大岛樱’花药($\times 32$)(四分体时期);o.发育中的‘普贤像’花药($\times 32$);p.发育中的‘一叶’花药($\times 64$);Msm.小孢子母细胞;Tac.绒毡层细胞;Te.四分体;Mpl.小孢子母细胞减数分裂前期I;Mtl.小孢子母细胞减数分裂末期I。

的单核小孢子,经过单核靠边期后核分裂发育形成两个核:生殖核和营养核,形成椭圆形的二细胞型花粉粒(图3g),二细胞型花粉粒进一步发育成近圆形的成熟花粉粒(图3h)。

重瓣日本晚樱‘普贤像’和‘一叶’小孢子发生与雄配子体的发育过程基本与单瓣‘大岛樱’相同,但重瓣日本晚樱‘普贤像’和‘一叶’成熟花药不开裂或极少开裂,开花当天多数雄配子体发育停留在单核花粉时期,仅少数二细胞型花粉粒,多数花粉粒形状不规则,干瘪(图3i、j)。花粉生活力测定表明,成熟‘大岛樱’平均花粉萌发率高达72.64%(图3k),而供试的2个重瓣品种均未见有花粉萌发,花粉败育(图3l、m)。另外单瓣‘大岛樱’同一花药不同药室中小孢子的发育基本同步(图3n),供试的2个重瓣品种不同药室中小孢子发育极少同步(图3o、p)。

3 结论与讨论

3.1 单瓣樱花雌、雄蕊发育的特点

单瓣‘大岛樱’在北京地区9月底形成雄蕊原基,10月上旬形成雌蕊原基,11月底雄蕊花药中出现小孢子母细胞后花芽开始休眠,翌年2月底在子房内壁上才会出现胚珠原基。其雌雄配子体的发育不同步,雄蕊中出现小孢子四分体时,珠心中大孢子母细胞才开始减数分裂。其大小孢子与雌雄配子体的发育模式在形态上与其近缘种桃(*Prunus persica*)、李(*Prunus americana*)和杏(*Prunus ameniaca*)相似,如小孢子四分体均为四面体型,成熟花粉二细胞型;倒生胚珠,双珠被,厚珠心,大孢子四分体直线型排列,胚囊发育方式属蓼型^[3-5]。但其雌、雄蕊发育在时间上同北京地区的山桃(*Prunus davidiana*)和一些栽培桃品种有很大的差异^[3]。

3.2 重瓣樱花雌、雄蕊发育的特异性分析

重瓣樱花‘一叶’和‘普贤像’花药瓣化,花药中小孢子母细胞出现的时间较单瓣晚,从小孢子母细胞减数分裂到单核花粉期所用时间较单瓣‘大岛樱’短,一方面可能源于,品种间的差异,另一方面也可能是由于后期日平均气温升高,花发育的进程加快。在‘普贤像’中,少数花萼筒上长出异位心皮,开花后有些异位心皮未完全愈合的子房内壁上着生1~2个败育胚珠;在‘一叶’中,少数雌蕊子房部分未完全叶化,子房内壁上着生1~2个败育胚珠。胚珠在雌蕊叶化的重瓣樱花中发生和发育,说明胚珠和雌蕊的发育是一个相对独立的过程。从进化的角度来看,胚珠可能是起源最早的花器官,心皮可以看作是变态的叶^[6];因此,胚珠完全可能不依赖心皮发育,樱花这种雌蕊叶化,败育胚珠裸露很可

能是一种返祖现象。不同花在形态上的差异可能源于所观察的樱花单株是一种在遗传上稳定的嵌合体。相对草本模式植物而言,木本植物有着独特的生长发育模式,这种同株花异型现象的发育遗传学机制有待进一步研究。

3.3 樱花重瓣花成花原因分析

单瓣与重瓣日本晚樱花器官虽然形态差别很大,但其遵循着相同的径向发育模式,由外至内依次是由萼片、花瓣、雄蕊和心皮构成的4轮花器官。目前,ABCE模型较成功地解释了被子植物花器官的形态建成,它包含功能部分重叠又相互作用的A、B、C和E共4类花器官特征决定基因,其中A+E决定萼片的发生,A+B+E决定花瓣的特征,B+C+E决定雄蕊的发育,C+E决定心皮的形态建成;该模型还认为,A类和C类基因相互抑制对方活性;不同花在形态上的巨大差别主要是对这种基本模式修饰的结果^[7-9]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,AGAMOUS(AG)是参与雄蕊和雌蕊特征决定的C类基因^[10];当AG基因功能丧失时,其雄蕊完全瓣化,形成重瓣花,与此同时,心皮也发生同源异型转变,变成一朵由萼片和花瓣不断嵌套的新花^[11]。研究表明,AG基因第2个内含子中的顺式作用元件CArG和其上游70bp左右的LFY蛋白结合位点对维持AG正常的表达区域,确立其C类基因的功能起着关键作用,其核苷酸序列的改变均能导致C功能区内缩,使雄蕊或外轮雄蕊瓣化,形成重瓣花^[12-13]。相对单瓣樱花而言,重瓣樱花花瓣数量增多,雄蕊数量显著减少,而且花药瓣化,其C功能区明显内缩,但其表达区内缩是否由樱花AG同源基因启动子区的转录调控元件的改变引起,还有待进一步研究。通常情况下,AG同源基因表达区的内缩仅会导致重瓣花的形成,并不会导致雌蕊叶化,如重瓣金露梅(*Potentilla fruticosa*)和扶桑(*Hibiscus rosasinensis*)^[14]。在拟南芥中,C类基因AG、SHATTERPOOF1(SHP1)、SHP2和D功能基因SEEDSTICK(STK)是参与雌蕊和胚珠正常发育的重要转录因子^[10],但樱花SHP和STK同源基因是否通过转录调控或功能改变参与决定雌蕊叶化,有待深入研究。植物花器官的形态建成过程取决于一个复杂的涉及多基因的分子遗传调控网络体系,花器官的多样化实际上可以理解为此个调控体系的调整和修饰。从樱花重瓣花的表型来看,其花瓣增多、雌雄蕊的不正常发育很可能源于C功能区基因的功能部分缺失,但这种功能缺失是发生在转录前、转录调控水平还是翻译后蛋白质的表观修饰水平,并不清楚,参与的基因是单个还是多个,仍有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] BREWBADER J L , KWACK B H. The essential role of calcium ion in pollen tube germination and pollen tube growth [J]. *American Journal of Botany* , 1963 , 50 : 859-865.
- [2] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法 (一): 花粉生活力的测定 [J]. *植物学通报* , 1993 , 10 (2) : 60-62.
- [3] 张潞生, 潘季淑, 刘军, 等. 桃早花种类雌雄配子体发育特性的研究 [J]. *园艺学报* , 1994 , 21 (1) : 13-16.
- [4] 桂明珠, 李桂琴, 李燕华. 李的大小孢子及雌雄配子体发育研究 [J]. *东北农业大学学报* , 1994 , 25 (1) : 89-96.
- [5] 胡宝忠, 李桂琴, 桂明珠, 等. 杏大小孢子与雌雄配子体发育 [J]. *东北农业大学学报* , 1997 , 28 (2) : 179-185.
- [6] ENDRESS P K. Angiosperm floral evolution: Morphological developmental framework [J]. *Advances in Botanical Research* , 2006 , 44 : 1-61.
- [7] COEN E S , MEYEROWITZ E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature* , 1991 , 353 (6339) : 31-37.
- [8] THEISSEN G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house [J]. *Current Opinion in Plant Biology* , 2001 , 4 : 75-85.
- [9] KRIZEK B A , FLETCHER J C. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide [J]. *Nature Reviews Genetics* , 2005 , 6 : 688-698.
- [10] PINYOPICH A , DITTA G S , SAVIDGE B , et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development [J]. *Nature* , 2003 , 424 : 85-88.
- [11] BOWMAN J L , SMYTH D R , MEYEROWITZ E M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis* [J]. *Development* , 1991 , 112 : 1-20.
- [12] SIEBURTH L E , MEYEROWITZ E M. Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically [J]. *Plant Cell* , 1997 , 9 : 355-365.
- [13] CAUSIER B , BRADLEY D , COOK H , et al. Conserved intragenic elements were critical for the evolution of the floral C-function [J]. *Plant Journal* , 2009 , 58 : 41-52.
- [14] BOWMAN J L. Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels [J]. *Journal of Biosciences* , 1997 , 22 (4) : 515-527.

(责任编辑 赵 勃)

本刊 2010 年第 5 期要目预告

- 李 悦等:油松种子园无性系花期同步指数稳定性分析
- 康向阳等:关于杨树多倍体育种的几点认识
- 李 伟等:团花树木葡聚糖转葡糖苷酶 cDNA 克隆及序列分析
- 崔彬彬等:白杨细胞质遗传的细胞学机理 I. 生殖细胞和精细胞中细胞器 DNA 的存在状况
- 陈金焕等:胡杨中两个新 DREB 类基因的克隆、序列分析及转录激活功能研究
- 商书交等: *UBL5* 基因的结构与功能研究
- 龙 萃等:毛白杨 *MdSPDS1* 基因遗传转化体系优化的研究
- 卫尊征等:我国东北及华北地区小叶杨形态及生理性状遗传多样性研究
- 张国君等:栽培模式对四倍体刺槐饲料林生物量和叶片营养的影响
- 欧阳芳群等:补光措施对黑云杉种源苗木生长的影响