

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2017.20152

许自龙, 汪阳东, 陈益存, 高暝, 徐刚标, 何关顺. 山鸡椒雄花花芽发育形态解剖特征观察[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 152~163

Xu ZL, Wang YD, Chen YC, Gao M, Xu GB, He GS. Observation of the morphological and anatomical characteristics of male flower bud development in *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(2): 152~163

山鸡椒雄花花芽发育形态解剖特征观察

许自龙^{1,2}, 汪阳东², 陈益存², 高暝², 徐刚标^{1*}, 何关顺³(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004; 2. 中国林科院亚热带林业研究所, 杭州 311400;
3. 广西壮族自治区田林县林业局, 广西百色 530000)

摘要: 采用体视显微镜、扫描电镜和石蜡切片技术对山鸡椒(*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.)雄花花芽分化发育的外部形态和内部解剖结构进行了观察研究。结果显示: (1)山鸡椒雄花花芽分化发生可分为5个时期, 即未分化期、花序原基分化期、苞片原基分化期、花原基分化期和花器官分化期, 其中花器官分化期又可细分为花被原基分化期、雄蕊原基分化期和雌蕊原基分化期; 各相邻分化时期存在一定重叠现象; 花期从翌年1月上旬至3月下旬。(2)雄花成熟结构中具有独特的雄蕊蜜腺, 蜜腺绿色且形态不规则, 着生于内轮雄蕊基部, 分布于花丝两侧, 夹在内外轮雄蕊的花丝之间, 与内轮花丝紧密相连。(3)雄蕊花药四室, 花药壁发育属于基本型; 腺质绒毡层; 小孢子母细胞减数分裂过程中胞质分裂属于连续型; 成熟花粉为2-细胞花粉粒; 成熟花粉粒外壁刺突较多, 刺突基部膨大, 外壁露出部分粗糙, 无薄壁区, 有少数小穿孔。(4)山鸡椒雄花中绝大多数雌蕊发育至腹缝线卷合形成子房室时停止, 柱头发育不良或者败育, 花柱缩短或缺失, 不能受精, 直到开花结束, 即发生退化。本研究明确了山鸡椒雄花花芽发育发生各个阶段时间、形态变化特点及外部形态变化特征, 山鸡椒小孢子发生、雄配子体发育至散粉期变化特点和规律以及雄花中退化雌蕊发育的进程, 可为山鸡椒优良品种选育、调控花期和提高结实率提供一定的参考。

关键词: 山鸡椒; 雄花; 花芽分化; 退化雌蕊

中图分类号: Q944.58

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)02-0152-12

Observation of the morphological and anatomical characteristics of male flower bud development in *Litsea cubeba* (Lour.) Pers.

Xu Zi-Long^{1,2}, Wang Yang-Dong², Chen Yi-Cun², Gao Ming², Xu Gang-Biao^{1*}, He Guan-Shun³

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

2. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, China; 3. Forestry

Bureau of Tianlin County, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Baise, Guangxi 530000, China)

Abstract: To clarify the process of flower bud development in male flowers of *Litsea cubeba* (Lour.) Pers., we investigated the differentiation and development of the morphology and anatomy of male flower buds using stereomicroscopy, paraffin technology, and scanning electron microscopy. The results showed that: (1) The differentiation period of the male flower bud in *L. cubeba* was divided into five stages, including undifferentiation, inflorescence primordium differentiation, bract primordium differentiation, flower primordium differentiation, and floral organ differentiation, with the last stage further subdivided into perianth primordium differentiation, stamen primordium differentiation, and pistil primordium differentiation. There

收稿日期: 2016-08-28, 退修日期: 2016-10-20。

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目“林木顶端分生组织发育及环境适应机制研究”(201504101)。

This work was supported by a grant from the special funds of the Forest Public Welfare Industry Research “Study on the development of apical meristem and environmental adaptation mechanism” (201504101).

作者简介: 许自龙(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为细胞遗传学(E-mail: 18726089100@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: gangbiaoxu@163.com)。

was some overlap in each differentiation stage. Flowering was from early January to late March the following year. (2) Mature *L. cubeba* males had unique irregular green stamen nectaries, which were borne at the base of the inner stamens, distributed on both sides of the filaments, intertwined with the filaments of the inner and outer stamens, and closely connected with the inner filaments. (3) Each anther had four pollen sacs and the development of the anther wall followed the basic model. The tapetum was glandular. Microspores were continuous during meiosis cytokinesis, and mature pollen grains were 2-pollen cells with very few microspore abortion during development. There were more spikes in ripe pollen exine, which was base dilated, and the exposed portion of the outer wall showed a rough, non-thin wall area, with a few small perforations. (4) Most pistils were arrested when the suture of abdominal cells formed into a peritoneal cavity. Therefore, the pistil had no stigma, and the style was shortened or missing, which process was called degradation. Fertilization did not happen until the end of flowering. The process was called degradation. We directly obtained the characteristics and patterns of male flower bud development, as well as the corresponding external morphogenesis, microsporogenesis, male gametophyte development, shedding, and development process of the pistillode in *L. cubeba*. These results provide a reference for the florescence regulation, selection and breeding of superior varieties of *L. cubeba*.

Key words: *Litsea cubeba* (Lour.) Pers.; Male flowers; Flower bud differentiation; Pistillode

山鸡椒(*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.)，又名山苍子、山姜子等，隶属于樟科(Lauraceae)木姜子属(*Litsea*)，小乔木或落叶灌木，雌雄异株，广泛分布于东南亚地区和我国长江以南的广西、安徽和浙江等省^[1]，是主产于我国的重要香料植物资源之一，也是一种具有优良开发利用潜力的木本油料植物。山鸡椒果实、花和叶均含有精油，主要成分是柠檬醛，广泛应用于化工行业(化妆品、香皂等)以及中医药行业^[1]。我国是山鸡椒精油最大的生产国和出口国，出口额占该项世贸总额的70%左右^[2]。随着经济贸易全球化，人民生活水平逐步提高，山鸡椒油的需求量也日益加大，价格也逐年攀升，但目前山鸡椒精油主要来自天然野生资源，其产量低，无法满足市场需求，因此，提高精油产量，培育出品质好、结实率高的优良品种迫在眉睫^[3]，亟待改善我国山鸡椒研究及开发利用现状。

近年来，有关山鸡椒的研究主要集中在生态资源调查^[4]、以播种、扦插和组织培养等技术为主的苗木繁殖研究^[1,2]、精油抑菌及抗氧化作用等生理生化方面的研究^[5]、精油提取和成分分析以及合成香料应用^[2-4]等方面。而花芽发育对植物开花的数量、质量以及坐果率都有直接影响，它是决定山鸡椒精油产量和品质不可忽略的因素之一^[6]；

花芽发育不仅是营养生长转向生殖生长的重要形态标志，也是山鸡椒栽培措施的重要理论依据之一^[7]；花芽发育是山鸡椒花发育中关键的阶段，也是复杂形态建成的关键过程^[8]。同时，樟科植物大多为雌雄同株，山鸡椒是樟科植物中罕见的雌雄异株，因此山鸡椒花芽的发育与形成，对研究樟科系统进化和性别分化具有重要的科学意义。目前尚未见对山鸡椒花芽发育形成系统进行研究的报道。我们利用体视显微镜、扫描电镜和石蜡切片技术对山鸡椒雄花花芽分化发育过程进行观察，研究雄配子体发育和形态解剖进程变化以及雌蕊退化特点，探讨花芽形态建成的内在规律以及外部形态和内部解剖结构的相关性，了解山鸡椒有性生殖的特征，以期为其成花和雌蕊退化生理机制研究及取材提供依据，为调控花期、提高结实率和选育优良品种等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于2015年4月1日至2016年2月24日，从浙江省杭州市富阳区城市森林公园(30°3'N、119°57'E，海拔48 m)内选取长势良好的两株山鸡椒(*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.)雄株，每隔5~7 d采样1次，每次采集20~30个混合芽或花

蕾。采样部位自顶芽向下第3个腋芽至第8个腋芽之间。其中,9月中旬至10月中旬为小孢子形成及减数分裂期,每隔3 d采样1次。

1.2 实验方法

1.2.1 体视显微镜观察

样品带回实验室,分成2份。一份置于体视显微镜(Leica S8APO)下进行解剖观察并拍照,然后置于FAA(福尔马林:乙酸:70%乙醇=1:1:18)固定液中固定,放入4℃冰箱保存;另一份置于4%戊二醛溶液中固定,放入4℃冰箱保存。

1.2.2 石蜡切片制备^[9]

常规石蜡切片法制片,经脱水、浸蜡、切片、脱蜡、染色、中性树胶封片等步骤制成切片(厚度6~10 μm),用改良爱氏苏木精-伊红染色,于显微镜下观察并拍照。

1.2.3 荧光观察

取散粉期花粉,经0.01 mol/L PBS磷酸缓冲液冲洗3次(每次5~10 min),然后用0.1 μg/L DAPI染色10 min,用0.01 mol/L PBS磷酸缓冲液清洗3次,最后于荧光显微镜下观察、拍照。

1.2.4 扫描电镜观察

参考许淑珺等^[10]的方法制备扫描电子显微镜材料。用0.1 mol/L的PBS磷酸缓冲液2 h内冲洗3次,每次40 min,然后用乙醇系列浓度梯度脱水30%、50%、70%、80%、90%,每次15 min,用100%无水乙醇脱水3次,每次10 min,用叔丁醇清洗3次,每次10 min,再用CO₂临界点干燥仪进行干燥,用碳双面胶带将样品固定在样品台上,离子溅射仪进行镀铂金,在扫描电子显微镜(飞纳高分辨率专业版Phenom Pro)下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 山鸡椒成熟雄花外部形态结构

山鸡椒的雄花簇集排列于花序轴上,花序轴基部着生4枚黄绿色苞片,苞片一般包裹着4到10朵小花,多数5朵(图版I:1),小花(图版I:2)在花序轴顶端部位排列成圆顶形,顶端呈伞形花序。小花由外到内依次由花被片、雄蕊群和退化雌蕊组成,花被片白色,两轮,每轮3瓣,交叉排列;雄蕊群3轮,每轮3枚,雄蕊基部有大量柔毛(图版I:11),而且在第3轮雄蕊基部出现黄绿

色形状不规则的蜜腺,雄蕊群中央是单个退化雌蕊(图版I:3,11)。

2.2 雄花花芽分化发生及其外部形态

依据雄花花芽各部分分化情况,山鸡椒花芽的发育过程可分为5个时期:未分化期、花序原基分化期、苞片原基分化期、花原基分化期和花器官分化期。其中花器官分化期又可细分为:花被原基分化期、雄蕊原基分化期和雌蕊原基分化期。

未分化期:4月初至5月下旬,混合芽(图版I:4)长约3~4 mm,青绿色,芽顶端尖细,逐渐生长变大,表面出现白色柔毛,鳞片出现分化。花序原基出现之前,未分化期包含两个阶段:营养生长期和生理分化期。由于营养生长期和生理分化期细胞形态变化相似,不能明显区分,仅观察到混合芽中叶原基形成(图版II:1)。

花序原基分化期:5月下旬至7月上旬,混合芽(图版I:5)逐渐变为椭圆状,基部变宽、变大,其鳞片表面出现红点,颜色由绿变红。花序原基包裹在鳞片中,不可见。花序原基出现(图版II:2),位于已分化的叶原基和外层鳞片之间,细胞排列紧密,呈半圆形凸起。

苞片原基分化期:7月上旬至8月中旬,混合芽形态与上个时期基本相似,鳞片红点继续增加,红色加深,花芽依然不可见(图版I:6)。花原基生长点变宽变平变大,在其边缘区形成凸起,即苞片原基(图版II:3)。随着细胞分化发育,苞片原基逐渐生长形成4枚苞片,包裹着生长点区域。

花原基分化期:8月中旬至8月下旬,混合芽中叶芽周围出现青绿色花芽,花芽外披鳞片,位于叶芽和鳞片之间,一般有2~4个花芽(图版I:7)。苞片形成之后,先由中轴生长点中心形成凸起,然后从内部周围也形成凸起,即花原基(图版II:4)。

花器官分化期:8月下旬至9月下旬,混合芽中花芽的生长高度逐渐超过叶芽约2~3 mm,花梗和花蕾清晰可辨,花芽青绿色加深,花蕾似圆形,叶芽和鳞片长度近似,随着花芽继续分化,叶芽继续生长分化,鳞片渐渐枯萎脱落(图版I:8,9,10)。随着花原基的发育,进入花器官分化期。

花器官分化期可进一步细分为:花被原基分化期(图版II:5)、雄蕊原基分化期(图版II:6)和雌蕊原基分化期(图版II:7)。花被原基分化期:花

原基生长点逐渐变平、变宽,继而在花原基边缘产生凸起,即花被原基形成。雄蕊原基分化期:花被原基分化很快,迅速形成两轮花被,类似锥体形,渐变宽,包裹着生长点区域,花被生长发育过程中,在花被内侧相继出现两轮凸起,即为雄蕊原基的形成。雌蕊原基分化期:随着原基细胞的分裂和分化,雄蕊生长迅速,单个雄蕊似长条形。9月上旬,小花中心生长点产生像锥体的凸起,即雌蕊原基。雌蕊原基发育较雄蕊原基晚,雄蕊原基围绕着雌蕊原基。随着花被、雄蕊和雌蕊进一步发育,花萼伸长,逐渐形成伞形花序。

2.3 雄蕊及雄配子体的发育分化

2.3.1 花药壁的发育

花蕾形成早期,花药壁发育开始于表皮下的孢原细胞(图版Ⅲ:1)进行的平周分裂,形成外层的初生壁细胞和初生造孢细胞,之后初生壁细胞继续进行平周分裂,形成内外两层次生壁细胞(图版Ⅲ:2),外层的次生壁细胞进一步分化为药室内壁和中层,内层的次生壁细胞则分化为中层和绒毡层。药室内壁(1层)、中层(2层)、绒毡层(1层)以及表皮(1层)共5层细胞组成完整的花药壁(图版Ⅲ:17)。

次生造孢细胞时期,表皮细胞开始径向延长,纵向加厚,似矩形,花药壁分化为药室内壁、中层和绒毡层,但是绒毡层与次生造孢细胞紧密连接在一起,不可分辨(图版Ⅲ:3)。小孢子母细胞形成至减数分裂时期,明显发生变化的是药室内壁加厚似矩形,表皮细胞被油细胞部分覆盖(图版Ⅲ:17),中层清晰,绒毡层扁平或椭圆状,单核或双核(图版Ⅲ:4,7)。四分体时期,绒毡层变形,开始降解(图版Ⅲ:11),药室内壁细胞木质化纤维状,中层细胞出现退化,至花粉成熟散粉期间,表皮细胞部分退化但仍宿存(图版Ⅲ:18),药室内壁纤维化程度达到最大,中层细胞部分退化,绒毡层完全降解消失(图版Ⅲ:19,20)。

2.3.2 小孢子发生

山鸡椒雄花3轮能育雄蕊,每轮3枚共9枚雄蕊,花药有4个花粉囊,中间有药隔组织隔开,成熟时花粉囊纵向瓣裂(图版Ⅰ:13)。

9月上旬,在雄蕊原基出现后不久,表皮细胞内形成立旺盛的孢原细胞(图版Ⅲ:1),孢原细胞体积比周围细胞较大,细胞核大,染色深。9月

中旬,孢原细胞平周分裂形成初生壁细胞和初生造孢细胞(图版Ⅲ:2),两种细胞紧密排列,细胞核染色深。随着初生造孢细胞进行连续的垂周分裂和平周分裂形成次生造孢细胞,9月下旬,次生造孢细胞有丝分裂形成的早期小孢子母细胞出现,这些细胞排列紧密,近圆形,细胞核染色明显(图版Ⅲ:3)。绒毡层与小孢子母细胞紧密排列在一起似球体无法分辨。10月初,早期的小孢子母细胞逐渐分开,小孢子母细胞体积变大,胞质着色浅,胞质和细胞壁间出现胼胝质,小孢子母细胞成熟(图版Ⅲ:4)。

10月上旬至中旬,小孢子母细胞进入减数分裂,减数分裂时间约15 d。小孢子母细胞依次经过间期(图版Ⅲ:4)、前期Ⅰ(图版Ⅲ:5)、中期Ⅰ(图版Ⅲ:6)、后期Ⅰ(图版Ⅲ:7)、末期Ⅰ(图版Ⅲ:8),完成减数分裂Ⅰ期,末期Ⅰ出现细胞板,形成细胞壁,形成两个子细胞即二分体。随后,直接进入减数分裂期Ⅱ(可能分裂时间太短,未观察到前期Ⅱ和中期Ⅱ),后期Ⅱ(图版Ⅲ:9)两个子细胞包裹在胼胝质里,子细胞明显出现两个核分布于两极位置,至末期Ⅱ(图版Ⅲ:10),由于纺锤体空间位置不同而最终形成的四分体呈四面体型、十字交叉型和左右对称型3种四分体,四分体型和十字交叉型四分体较多。10月下旬,四分体解体,发育成游离的小孢子(图版Ⅲ:11)。

2.3.3 雄配子体发育

10月下旬,四分体发育而释放的4个小孢子游离在花粉囊中,体积较小,呈圆形,核大,细胞壁薄(图版Ⅲ:11)。11月上旬,游离小孢子的体积逐渐增大,内外壁逐渐发育形成,随着内外壁生长发育成熟,内壁和外壁层次逐渐清晰。与此同时,小孢子核向内壁边缘移动,进入单核靠边期(图版Ⅲ:12)。此后,细胞核在靠近壁的位置发生分裂,形成两个大小相似的核,一个靠近细胞壁,另一个位于细胞中间,小孢子进入双核期(图版Ⅲ:13)。12月初,随着山鸡椒进入休眠期,小孢子也逐渐进入休眠期阶段(图版Ⅲ:14),小孢子内的两个核不明显,细胞质变浓郁,外壁出现了许多凸起。随着温度的回升,翌年1月中旬,4个花粉囊分别开裂,花粉粒中营养核位于中间,呈圆形;生殖核变长条形,围绕在营养核周围,同时,外壁纹路中有许多明显的凸起即刺突形成,

2-细胞成熟花粉粒(雄配子体)发育成熟(图版Ⅲ: 15, 16)。

成熟的花粉粒呈球形, 直径 20 μm 左右, 表面遍布很小的刺状纹饰, 纹饰密集而整齐, 刺突基部膨大, 刺突间距约 1 ~ 2 μm 。花粉粒表面有极少数小穿孔但未观察到薄壁区(图版Ⅰ: 15, 16)。

在雄配子体发育过程中, 有花粉败育现象, 发生在减数分裂结束、四分体释放之后, 小孢子形状畸形, 胞核不可见, 花粉的细胞质中空瘪, 最后只剩下空的花粉壁(图版Ⅲ: 21)。从造孢细胞发生至花粉成熟, 花药壁发生了一系列变化进程, 详见表 1。

2.4 雄花中雌蕊形成及退化

9月上旬, 雌蕊原基出现(图版Ⅱ: 7), 细胞染色深, 排列紧密, 似锥体状。随着原基细胞的分

裂和分化, 雌蕊原基体积也逐渐变大变长变宽。9月下旬, 雌蕊(图版Ⅱ: 8)发育形状似鹅卵石, 慢慢形成子房室, 子房室似三角星形。此后至花成熟过程中雌蕊的发育基本停止, 极少数出现胚珠原基(图版Ⅱ: 9)。其外形与雌花雌蕊(图版Ⅰ: 14)相比, 柱头发育不良或败育, 花柱缩短或缺失, 不能受精(图版Ⅰ: 11, 12)。

3 讨论

3.1 山鸡椒雄花花芽分化及内外部形态变化

确定花芽分化的各个时期及对应的外部形态变化, 可为植物采取合理栽培管理措施和调控花期提供参考, 对生产和育种具有重要意义^[11]。野外实地观测和石蜡切片观察发现, 山鸡椒雄花花芽分化时间长, 整个时期持续 150 d 左右, 相邻的分化时

表 1 小孢子发育阶段与花药壁发育进程
Table 1 Microspore development stages and anther wall development

时间 Date	小孢子发育阶段 Development stage of microspore	花药壁发育 Development of anther wall		
		表皮细胞 Epidermis	药室内壁 Endotheca endothecium	中层细胞 Middle layer
9月上旬 Early Sep.	孢原细胞 Archesporial cell	形状不规则 Irregular shape	无 None	无 None
9月中旬 Mid-Sep.	形成初生造孢细胞 Formation of primary sporogenous cells	近似矩形 Rectangle-like	扁平 Flat shape	不能区分 Non-separable
9月下旬 Late Sep.	形成次生造孢细胞 Formation of secondary sporogenous cells	似矩形, 径向延长, 纵向加厚 Rectangle-like, radial extension, longitudinal thickening	单层, 扁平 Single, flat shape	两层, 扁平 Two layers, flat shape
10月初 Early Oct.	形成小孢子母细胞 Formation of microspore mother cells	似矩形, 纵向加厚 Rectangle-like, longitudinal thickening	单层, 加厚似矩形 Single, thickening rectangular	两层, 扁平 Two layers, flat shape 似椭圆状, 单核或者双核 Oval shape, single- or dual-core
10月上旬 Early Oct.	小孢子母细胞开始减数分裂 Microspore mother cells begin meiosis	似正方形, 油细胞覆盖 Square-like, oil cell covered	似矩形 Rectangle-like	同上一时期 Same as above
10月中旬 Mid-Oct.	四分体形成 Formation of tetrads	似正方形, 油细胞数目增加 Square-like, number of oil cells increase	开始木质化 Becoming lignified	开始退化 Beginning to degenerate
10月下旬 Late Oct.	四分体解体 Disorganization of tetrads	同上一时期 Same as above	进一步木质化 Further lignified	部分退化 Partially degraded 进一步解体 Further disorganized
11月上旬 Early Nov.	单核花粉粒 Mononuclear pollen	开始退化 Beginning to degenerate	高度木质化 Highly lignified	进一步退化 Further degradation 仅剩残迹 Only trace remaining
11月下旬 Late Nov.	二核花粉粒 Binucleate pollen	进一步退化 Further degradation	同上一时期 Same as above	部分消失, 但仍然宿存 Some disappeared, still remnants 消失 Disappeared
2月中旬 Mid-Feb.	散粉 Shedding of pollen	部分消失, 但仍然宿存 Some disappeared, still remnants	同上一时期 Same as above	同上一时期 Same as above -

注: “-”表示发育过程结束。

Note: “-” development finished.

期存在一定的重叠现象。花芽形成之后还要经过2个月左右的低温休眠阶段, 花期是翌年1月上旬至3月下旬。尽管不同品系、营养物质及气候、温度、地理条件等差异会对花芽分化和形态变化产生显著影响, 不能简单依据季节或发育时期准确判断花芽分化阶段, 但是很多研究结果认为花芽发育外部形态与内部解剖结构之间存在一定的相关性, 可为遗传育种和栽培管理提供依据^[12]。如郝晨等^[13]依据刺槐(*Robinia pseudoacacia* Linn)花器形态特征判断雌雄花发育阶段的研究, 为刺槐花器官离体培养接种外植体的选择提供了依据; 宋兴舜等^[14]发现白桦(*Betula platyphylla* Suk)花外部形态变化与花发育进程相对应, 此结果为花和胚胎发育机理等研究的取材提供了参考; 早实核桃(*Juglans regia* L.)雌花芽外部的变化可以直观反映内部结构的变化, 为研究花芽分化时期提供了方便、快捷和直观手段^[12]。本研究山鸡椒雄花花芽分化外部形态和其解剖结构也具有一定相关性。如混合芽鳞片青绿色, 无红色斑点, 则表明花芽处于未分化期; 混合芽鳞片上红色斑点全覆盖, 鳞片稍微张开, 且观察不到绿色花蕾, 则表明花芽处于花原基分化期; 混合芽中花芽的生长高度逐渐超过叶芽约2~3 mm, 花梗和花蕾清晰可辨, 花芽青绿色加深, 花蕾似圆形, 则表明处于花器官分化期。所以, 依据山鸡椒的外部形态判断花芽分化发育阶段是可行的, 可为花芽分化、人工授粉等相关研究的适时取材提供科学依据。

3.2 山鸡椒独特的雄蕊蜜腺结构

山鸡椒与萝藦科的老瓜头(*Cynanchum komarovii* Al. Iljiniski)^[15]一样, 雄花成熟结构中具有独特的雄蕊蜜腺。戴大临等^[16]认为山鸡椒雄花蜜腺是特化的多细胞腺体, Fahn^[17]则认为樟科花的蜜腺属于变异的花药。随着现代分子生物学的发展, 一定程度上为蜜腺的起源提供了证据, 如在拟南芥属(*Arabidopsis*)植物中^[18], 花蜜腺控制基因独立于花器官形成基因之外并且只限于花的第三功能区发生, 表明其起源与某部分花器官有关但是其产生分化有着自身规律。山鸡椒雄蕊蜜腺的起源, 则需要更多可靠的生物学证据支撑。对于虫媒花而言, 花蜜腺的功能是产生蜜汁吸引传粉者帮助其传粉^[15], 而山鸡椒属风媒花^[19], 所以其雄蕊蜜腺功能不是帮助传粉, 推测山鸡椒雄花蜜腺可能与花器

官的某部分生长发育有关, 而其具体功能还有待进一步研究。

3.3 山鸡椒雄花中雌雄蕊发育

以传统形态学特征为依据的樟科各分类系统中, 花药药室数目是划分各类群极为重要的特征^[20]。Bpm^[21]对澳洲樟科植物进行修订时发现, 倘若没有花药药室的区分, 则很难对山胡椒属(*Lindera* Thunb.)和木姜子属(*Litsea* Lam.)种类进行划分, 山鸡椒雄花花药四室, 为山鸡椒划分到木姜子属提供了基本依据。樟科植物小孢子的绒毡层既有腺质绒毡层也有变形绒毡层, 而且绒毡层类型也可帮助理解各类群间的亲缘关系^[22], 山鸡椒小孢子绒毡层表现为腺质绒毡层^[23], 此特征有利于研究山鸡椒与樟科其他种间的亲缘关系。减数分裂的胞质分裂方式中, 连续型存在于大多数单子叶植物中, 同时型常出现在双子叶植物中^[23], 而本研究与之相反, 山鸡椒小孢子母细胞减数分裂过程中胞质分裂属于连续型。在山鸡椒同一花蕾中各小花的花粉囊发育和瓣裂的时间存在一定的不同步性, 这一方面可能是为了延长山鸡椒雄花传粉时间, 有利于受精过程, 另一方面可能是为了减少花期内恶劣环境对其散粉的不良影响^[24]; 也有研究认为这是植物为延长传粉期和适应环境的表现^[25]。此外, 山鸡椒有极少数小孢子在发育过程中出现花粉细胞质空瘪、只剩下空花粉壁的败育现象, 这可能是绒毡层发育异常, 导致小孢子收缩变形, 干扰了减数分裂的正常过程^[26]。植物花粉粒形态学特征是植物分类的重要性状和依据, 汤庚国等^[26]将国产樟科花粉形态分为7种类型并进行了系统研究, 他将山鸡椒花粉划分为木姜子型, 并且发现山鸡椒花粉直径29~50 μm, 外壁刺突较稀疏, 基部不膨大, 外壁露出部分平滑, 有薄壁区和小穿孔; 而本研究观察发现山鸡椒花粉直径大小(约为20 μm)与无根藤型相似, 刺突基部膨大与檫木型类似, 这与前人研究结果存在明显差异, 可能是花粉适应不同地域而出现的生长差异^[27], 但导致这种差异的具体原因还有待进一步研究。

花器官退化现象反映了植物类群的祖先状态, 对植物的系统发育研究具有重要价值^[28]。Wallander等^[29]对木犀科中雌雄同体、雄性两性异株和雌雄异株3种繁育系统研究认为, 雌雄同体繁育系统属祖先繁育系统。Wallander^[30]通过系统发育

分析认为, 在白蜡树属(*Fraxinus*)中, 雌雄异株是雌雄同体通过雄性两性异株进化形成的, 而且某些风媒传粉的物种已经独立进化为雌雄异株繁育系统。另外, 雌雄异株作为一种衍生状态从未向其他繁育系统进化^[31]。Xu 等^[32]对桂花(*Osmanthus fragrans* L.)雌蕊退化研究发现, 雄性两性异株是雌雄同体进化为雌雄异株过程的桥梁。山鸡椒花器官退化现象不仅反映了山鸡椒的祖先繁育状态, 而且对山鸡椒种群的系统发育提供了一定的理论证据, 也为山鸡椒种群进化趋势提供了线索。花器官退化原因是复杂的, 可能是为了减少自交衰退^[33], 也可能为了降低雌雄功能的干扰^[34], 这还需要通过与近缘类群花器官发育间进行比较或通过系统进化学、分子生物学等多种方法进行分析, 以揭示其退化的原因。

4 结论

山鸡椒雄花花芽发育过程中, 花芽分化从花序原基出现到苞片原基分化、再到花原基分化期和花器官分化期等一系列连续的发育进程, 最后到雄花成熟开放, 整个生长周期约1年。同时, 雄花发育过程中形成了独特的、形态不规则的雄蕊蜜腺, 与内轮花丝紧密相连。雄蕊花药四室, 花药壁发育属于基本型; 腺质绒毡层; 小孢子母细胞减数分裂过程中胞质分裂属于连续型; 山鸡椒四分体排列方式有四分体型、左右对称型和十字型3种, 成熟花粉为2-细胞花粉粒; 成熟花粉粒外壁刺突较多, 刺突基部膨大, 外壁露出部分粗糙, 无薄壁区, 有少数小穿孔。山鸡椒雄花中绝大多数雌蕊发育退化。本研究不仅丰富了山鸡椒花发育的理论基础, 也为山鸡椒资源的保护和开发利用提供了重要的参考价值。

参考文献:

- [1] Guo Q, Zeng KW, Gao XL, Zhu ZX, Zhang SY, Chai XY, Tu PF. Chemical constituents with NO production inhibitory and cytotoxic activities from *Litsea cubeba* [J]. *J Nat Med*, 2014, 69(1): 94–99.
- [2] 陈学恒. 我国山苍子资源利用现状和产业化前景评述 [J]. *林业科学*, 2003, 39(4): 134–139.
- Chen XH. Comments on use of resources situation and industrial prospect of *Litsea cubeba* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2003, 39(4): 134–139.
- [3] 王旭, 杨关锋. 我国山苍子开发利用的现状与发展对策 [J]. *经济林研究*, 2010, 28(3): 136–139.
- Wang X, Yang GF. Situation and development strategy of *Litsea cubeba* exploitation [J]. *Nonwood Forest Research*, 2010, 28(3): 136–139.
- [4] 崔永忠, 廖声熙, 崔凯, 刘方炎, 汪阳东, 陈益存. 贵州山区山苍子苗年生长规律 [J]. *林业科学研究*, 2013, 26(4): 501–505.
- Cui YZ, Liao SX, Cui K, Liu FY, Wang YD, Chen YC. Study on the growth of one-year-old *Litsea cubeba* seedlings in mountainous area of Guizhou Province [J]. *Forest Research*, 2013, 26(4): 501–505.
- [5] 李芳, Yaru S, Howard H, Kevin O'S. 不同提取方法山苍子油的化学成分与抗氧化活性分析 [J]. *林业科学*, 2015, 51(3): 124–131.
- Li F, Yaru S, Howard H, Kevin O'S. Chemical component and activity analysis of *Litsea cubeba* extracts obtained by different extraction methods [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(3): 124–131.
- [6] 曲波, 张薇, 陈旭辉, 李楠, 崔娜, 李天来. 植物花芽分化研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(24): 109–114.
- Qu B, Zhang W, Chen XH, Li N, Cui N, Li TL. Plants flower bud differentiation research progress [J], *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(24): 109–114.
- [7] 何燕红, 艾叶, 吴颖, 郭蕾, 包满珠. 孔雀草花芽分化和花药发育 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(2): 18–24.
- He YH, Ai Y, Wu Y, Guo L, Bao MZ. Flower bud differentiation and anther development of *Tagetes patula* L. [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(2): 18–24.
- [8] 史洪琴. 大紫花芽形态分化观察 [J]. *吉林农业: 学术版*, 2010(9): 58–58.
- Shi HQ. Studies on morphological differentiation of big purple flower buds [J]. *Jilin Agriculture: Academic Edition*, 2010(9): 58–58.
- [9] 刘雄盛, 徐刚标, 梁文斌, 肖玉菲. 濒危植物水松小孢子发生和雄配子体发育的研究 [J]. *植物科学学报*, 2014, 32(1): 58–66.
- Liu XS, Xu GB, Liang WB, Xiao YF. Studies microsporogenesis and development of male gametophytes in endangered species *Glyptostrobus pensilis* [J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(1): 58–66.
- [10] 许淑珺, 吴林芳, 胡晓颖, 徐信兰, 沈浩, 叶万辉. 桂味荔枝花器官的发生和发育过程研究 [J]. *广西植物*, 2012, 32(2): 167–172.
- Xu SJ, Wu LF, Hu XY, Xu XL, Shen H, Ye WH. Floral organogenesis and development of *Litchi chinensis* Sonn. cv. Guiwei [J]. *Guizhou Agricultural University*, 2012, 32(2): 167–172.
- [11] 陈英敏, 徐国辉, 王贺新, 朱玉, 王蜀, 刘家训, 陈杉艳, 刘芳. 不同蓝莓品种花芽形成及二次开花特征 [J]. *北方果树*, 2016(4): 6–10.
- Chen YM, Xu GL, Wang HX, Zhu Y, Wang S, Liu JS,

- Chen SB, Liu F. Flower bud formation and secondary flowering characteristics of different blueberry cultivars [J]. *Northern Fruits*, 2016(4): 6–10.
- [12] 高英, 董宁光, 张志宏, 张俊佩, 裴东. 早实核桃雌花芽分化外部形态与内部结构关系的研究[J]. 林业科学, 2010, 23(2): 241–245.
- Gao Y, Dong NG, Zhang ZH, Zhang JP, Pei D. Relationship between external morphology and anatomical structure of precocious walnut during pistillate flower-bud differentiation[J]. *Forest Research*, 2010, 23(2): 241–245.
- [13] 郝晨, 李云, 姜金仲, 刘洋. 四倍体刺槐大小孢子发育时期与花器形态的相关性[J]. 核农学报, 2006, 20(4): 292–295.
- Hao C, Li Y, Jiang JZ, Liu Y. The correlation between micro and mega sporogenesis development and morphology of flower organ of tetraploid black locust [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2006, 20(4): 292–295.
- [14] 宋兴舜, 李发兵, 宋福南, 李开隆, 刘雪梅. 白桦雌花发育的形态相关[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(7): 1–2.
- Song XS, Li FB, Song FN, Li KL, Liu XM. Morphological correlation of female flower development in *Betula platyphylla*[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2008, 36(7): 1–2.
- [15] 胡正海. 植物分泌结构解剖学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 72–123.
- Hu ZH. Plant Secretory Structures Anatomy[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2012: 72–123.
- [16] 戴大临, 孔立生. 山鸡椒雄花蜜腺形态发生的SEM研究[J]. 电子显微学报, 1993(1): 98–98.
- Dai DL, Kong LS. Male nectaries morphogenesis SEM study of *Litsea cubeba* (Lour.) Pers [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 1993(1): 98–98.
- [17] Fahn A. Secretory Tissues in Plants [M]. London: Academic Press, 1979: 51–113.
- [18] Baum SF, Eshed Y, Bowman JL. The *Arabidopsis* nectary is an ABC-independent floral structure[J]. *Development*, 2001, 128(22): 4657–4667.
- [19] 刘德胜, 方建民, 丁增发, 骆绪美. 山苍子的栽培和利用: 上篇[J]. 安徽林业科技, 2011, 37(1): 51–54.
- Liu DS, Fang JM, Ding ZF, Luo XM. *Litsea cubeba* cultivation and exploit: Part I [J]. *Anhui Forestry Science and Technology*, 2011, 37(1): 51–54.
- [20] 李捷, 李锡文. 世界樟科植物系统学研究进展[J]. 植物分类与资源学报, 2004, 26(1): 1–11.
- Li J, Li XW. Advances in Lauraceae systematic research on the world scale [J]. *Plant Diversity and Resources*, 2004, 26(1): 1–11.
- [21] Bpm H. A revision of Lauraceae in Australia (excluding *Cassytha*) [J]. *Aust Syst Bot*, 1989, 2(2): 135–367.
- [22] Heo K, Werff HVD, Tobe H. Embryology and relationships of Lauraceae (Laurales) [J]. *Bot J Linn Soc*, 1998, 126(4): 295–322.
- [23] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 44–47.
- Hu SY. Angiosperms of Reproductive Biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 44–47.
- [24] 韩逸洋, 李利平, 陈发菊, 杨林森, 梁宏伟. 宜昌润楠大、小孢子发生及雌、雄配子体发育的研究[J]. 湖北农业科学, 2014(10): 2352–2355.
- Han YY, Li LP, Chen FJ, Yang LS, Liang HW. The microsporogenesis, megasporogenesis, female and male gametophyte development of *Machilus ichangensis* Rehder & E. H. Wilson [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014(10): 2352–2355.
- [25] 周正立, 李志军, 龚卫江. 胡杨、灰叶胡杨开花生物学特性研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(2): 163–168.
- Zhou ZL, Li ZJ, Gong WJ, Gao S. Study on the flowering phenology in *Populus euphratica* Olivier and *Populus pruinosa* Schrenk[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2005, 23(2): 163–168.
- [26] 汤庚国, 向其柏. 樟科植物花粉形态研究[J]. 植物分类学报, 1995, 33(2): 161–170.
- Tang GG, Xiang QB. Pollen morphology study of Lauraceae[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1995, 33(2): 161–170.
- [27] Raj B, Werff HVD. A contribution to the pollen morphology of neotropical Lauraceae[J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1988, 75(1): 130–167.
- [28] 孙坤, 陈家宽, 陈之端. 综述被子植物系统学中花发育研究的进展及对今后研究的思考[J]. 植物分类学报, 1998, 36(6): 558–568.
- Sun K, Chen JK, Chen ZT. Progress in studies on floral development of angiosperms and some consideration on future studies [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1998, 36(6): 558–568.
- [29] Wallander E, Albert VA. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data[J]. *Am J Bot*, 2000, 87(12): 1827–1841.
- [30] Wallander E. Systematics of *Fraxinus* L. (Oleaceae) and evolution of dioecy[J]. *Plant Syst Evol*, 2008, 273(1–2): 25–49.
- [31] Gleiser G, Verdu M. Repeated evolution of dioecy from androdioecy in *Acer*[J]. *New Phytol*, 2005, 165: 633–640.
- [32] Xu YC, Zhou LH, Hu SQ, Hao RM, Huang CJ, Zhao HB. The differentiation and development of pistils of hermaphrodites and pistillodes of males in androdioecious *Osmanthus fragrans* L. and implications for the evolution to androdioecy[J]. *Plant Syst Evol*, 2014, 300(5): 843–849.
- [33] Walkerlarsen J, Harder LD. The evolution of staminodes in

angiosperms: patterns of stamen reduction, loss, and functional re-invention [J]. *Am J Bot*, 2000, 87 (10): 1367-84.

[34] Hammerling GJ. Secondary pollen presentation in angiosperms and its biological significance [J]. *Aust J Bot*, 1993, 41(5): 417-438.

图版说明

图版I：山鸡椒雄花成熟结构和混合芽外部形态以及雌雄花、花粉扫描电镜。ms: 成熟雄蕊; sn: 雄蕊蜜腺; pe: 退化雌蕊; Lb: 叶芽; S: 鳞片。1. 成熟山鸡椒雄花; 2. 成熟山鸡椒雄蕊(箭头示); 3. 雄蕊蜜腺(箭头示)和退化雌蕊(箭头示); 4. 未分化期; 5. 花芽原基分化期; 6. 苞片原基分化期; 7. 小花原基分化期; 8. 花被原基分化期; 9. 雄蕊原基分化期; 10. 雌蕊原基分化期(箭头示叶芽和鳞片); 11. 发育初期退化雌蕊(箭头示)和雄蕊蜜腺(箭头示); 12. 散粉期退化雌蕊(箭头示); 13. 4个花粉囊纵裂(箭头示); 14. 雌花雌蕊结构(箭头示); 15、16. 散粉期的花粉粒。

图版II：雄花花芽分化。Lp: 叶芽原基; fp: 花序原基; Lb: 叶芽; bp: 苞片原基; ffp: 花原基; b: 苞片; pp: 花被原基; sp: 雄蕊原基; p: 花被; S: 鳞片; s: 雄蕊; pd: 雌蕊原基; pe: 退化雌蕊; op: 胚珠原基。1. 叶芽原基; 2. 花序原基和叶芽; 3. 苞片原基; 4. 花原基和苞片; 5. 花原基和花被原基; 6. 雄蕊原基、花被、花原基、苞片和鳞片; 7. 雌蕊原基、雄蕊、花被和苞片; 8. 退化雌蕊(箭头示); 9. 退化雌蕊子房中的胚珠原基(箭头示)。

图版III：小孢子发生及雄配子体发育。ac: 孢原细胞; pc: 初生造孢细胞; sc: 次生造孢细胞; T: 绒毡层; ML: 中层; En: 药室内壁; Ep: 表皮; bs: 左右对称型; c: 十字型; t: 四面体型; mp: 单核花粉粒; up: 单核靠边花粉; rn: 生殖核; vn: 营养核; dp: 休眠期花粉。1. 孢原细胞(箭头示); 2. 初生造孢细胞(箭头示); 3. 次生造孢细胞(箭头示); 4. 减数分裂间期(箭头示)和绒毡层、中层、药室内壁、表皮; 5. 示减数I前期(箭头示)和绒毡层; 6. 减数I中期(箭头示); 7. 减数I后期(箭头示)和绒毡层; 8. 减数I末期(箭头示); 9. 减数II后期(箭头示); 10. 四分体3种排列方式: 左右对称型(箭头示)、十字型(箭头示)和四面体型(箭头示); 11. 单核花粉粒(箭头示)和绒毡层; 12. 单核靠边花粉(箭头示); 13. 生殖核(箭头示)和营养核(箭头示); 14. 休眠期花粉(箭头示); 15、16. 成熟花粉粒(箭头示); 17. 减数分裂期间的表皮、药室内壁、中层和绒毡层; 18. 散粉期的表皮、药室内壁和中层; 19、20. 散粉期纤维层细胞; 21. 花粉败育(箭头示)。

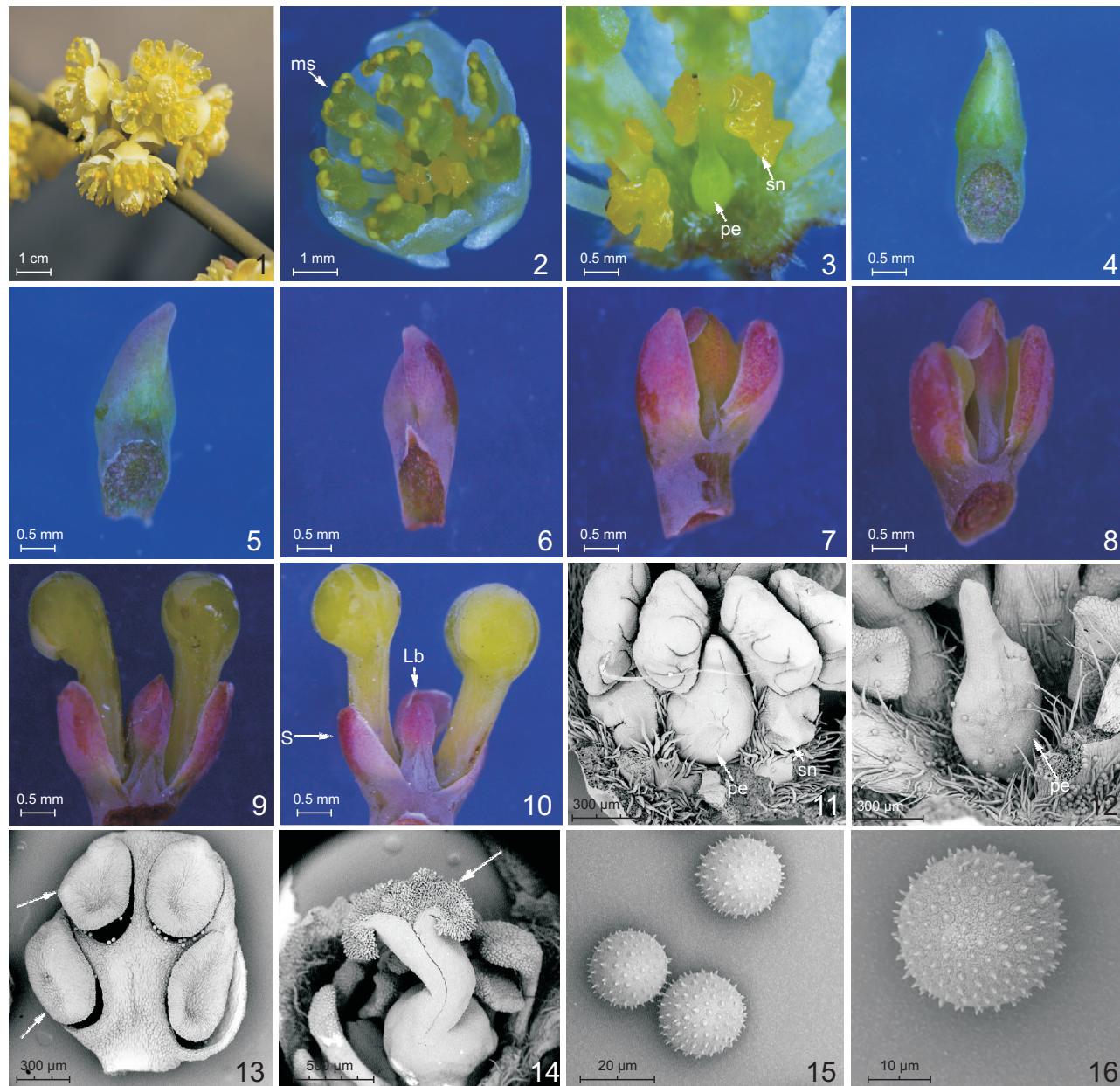
Explanation of plate

Plate I：Mature male flower structure and external morphology of mixed buds and male and female flowers, pollen scanning electron microscopy. ms: Mature stamens; sn: Stamens of nectaries; pe: Pistillode; Lb: Leaf bud; S: Scale. 1. Mature male flowers of *Litsea cubeba* (Lour) Pers; 2. Mature stamens (arrow) of *Litsea cubeba* (Lour) Pers; 3. Stamens of nectaries (arrow) and pistillode (arrow); 4. Undifferentiated stage; 5. Inflorescence primordium stage; 6. Bract primordium stage; 7. Flower primordium differentiation; 8. Floral organ differentiation; 9. Stamen primordium differentiation; 10. Pistil primordium differentiation (arrow shows leaf bud and scale); 11. Early development of pistillode (arrow) and stamens of nectaries (arrow); 12. Shedding of pistillode (arrow); 13. Four interhemispheric pollen sacs (arrow); 14. Female flower pistil structure (arrow); 15,16. Shedding of pollen grains.

Plate II：Male flower bud differentiation. lp: Leaf bud primordia; fp: Flower buds primordia; Lb: Leaf buds; bp: Bract primordia; ffp: Floret primordia; b: Bracts; pp: Perianth primordia; sp: Stamen primordia; p: Perianth; S: Scale; s: Stamens; pd: Pistil primordia; pe: Pistillode; op: Ovule primordia of pistillode ovary. 1. Leaf bud primordia; 2. Flower buds primordia and leaf buds; 3. Bract primordia; 4. Floret primordia and bracts; 5. Floret primordia and perianth primordia; 6. Stamen primordia, perianth, floret primordia, bracts, and scale; 7. Pistil primordia, stamens, perianth, and bracts; 8. Pistillode (arrow); 9. Ovule primordia of pistillode ovary (arrow).

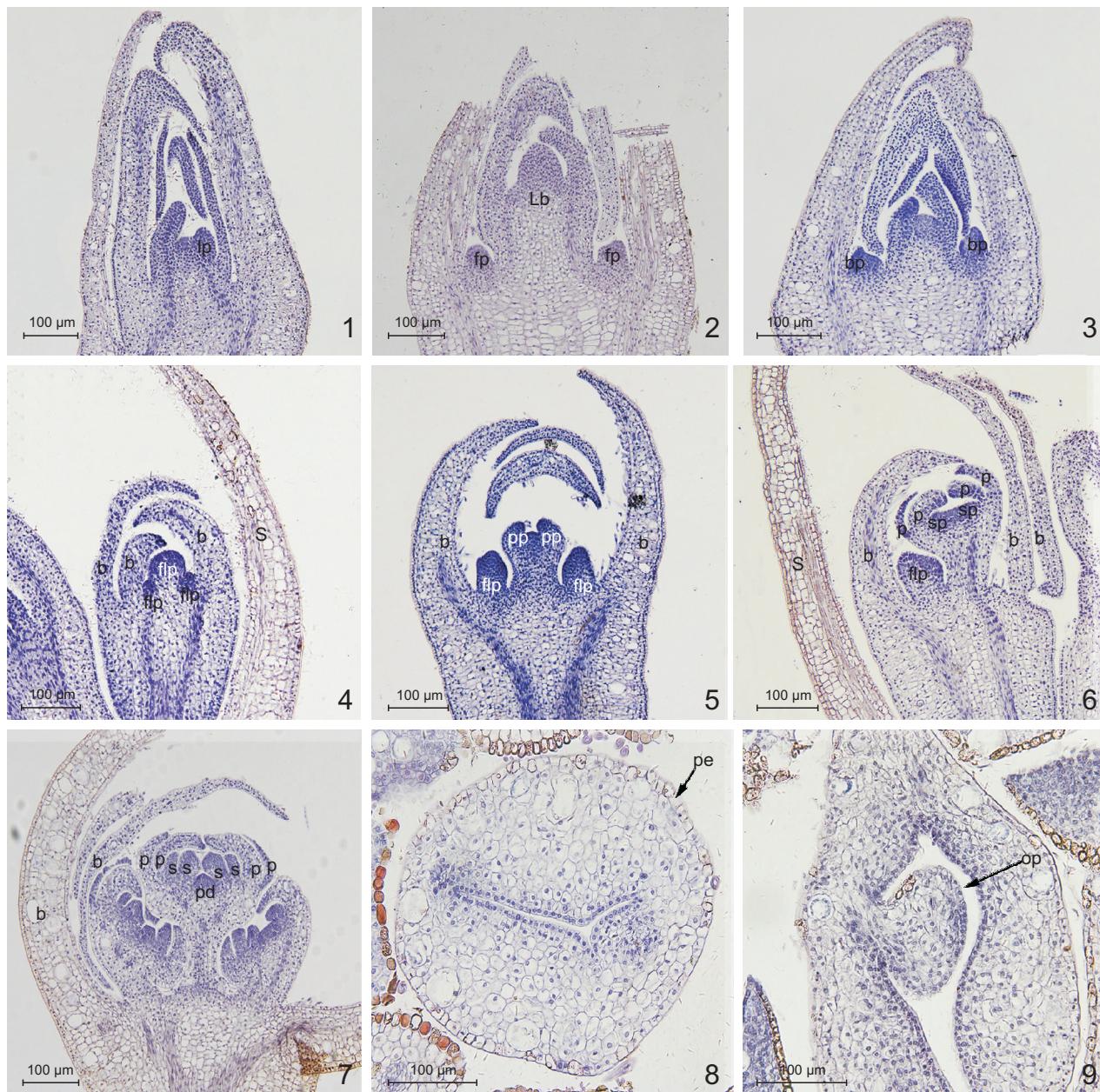
Plate III：Microsporogenesis and development of male gametophytes. ac: Archesporial cells; pc: Primary sporogenous cells; sc: Secondary sporogenous cells; T: Tapetum; ML: Middle layer; En: Endotheca endothecium; Ep: Epidermis; bs: Bilateral symmetry; c: Cross; t: Tetrahedral; mp: Mononuclear pollen; up: Uninucleate pollen; rn: Reproductive nucleus; vn: Vegetative nucleus; dp: Dormant pollen. 1. Archesporial cells (arrow); 2. Primary sporogenous cells (arrow); 3. Secondary sporogenous cells (arrow); 4. Interphase of meiosis (arrow) and tapetum, middle layer, endotheca endothecium, epidermis; 5. Prophase of meiosis I (arrow) and tapetum; 6. Metaphase of meiosis I (arrow); 7. Anaphase of meiosis I (arrow) and tapetum; 8. Telophase of meiosis I (arrow); 9. Anaphase of meiosis II (arrow); 10. Tetrad arrangement of three kinds: bilateral symmetry (arrow), cross (arrow), and tetrahedral (arrow); 11. Mononuclear pollen (arrow) and tapetum; 12. Uninucleate pollen (arrow); 13. Reproductive nucleus (arrow) and vegetative nucleus (arrow); 14. Dormant pollen (arrow); 15, 16. Mature pollen grains (arrow); 17. Epidermis, endotheca endothecium, middle layer, and tapetum during meiosis; 18. Shedding of epidermis, endotheca endothecium, and middle layer; 19, 20. Shedding of fibrous layer; 21. Pollen abortion (arrow).

许自龙等: 图版 I

Xu Zi-Long *et al.*: Plate I

See explanation at the end of text

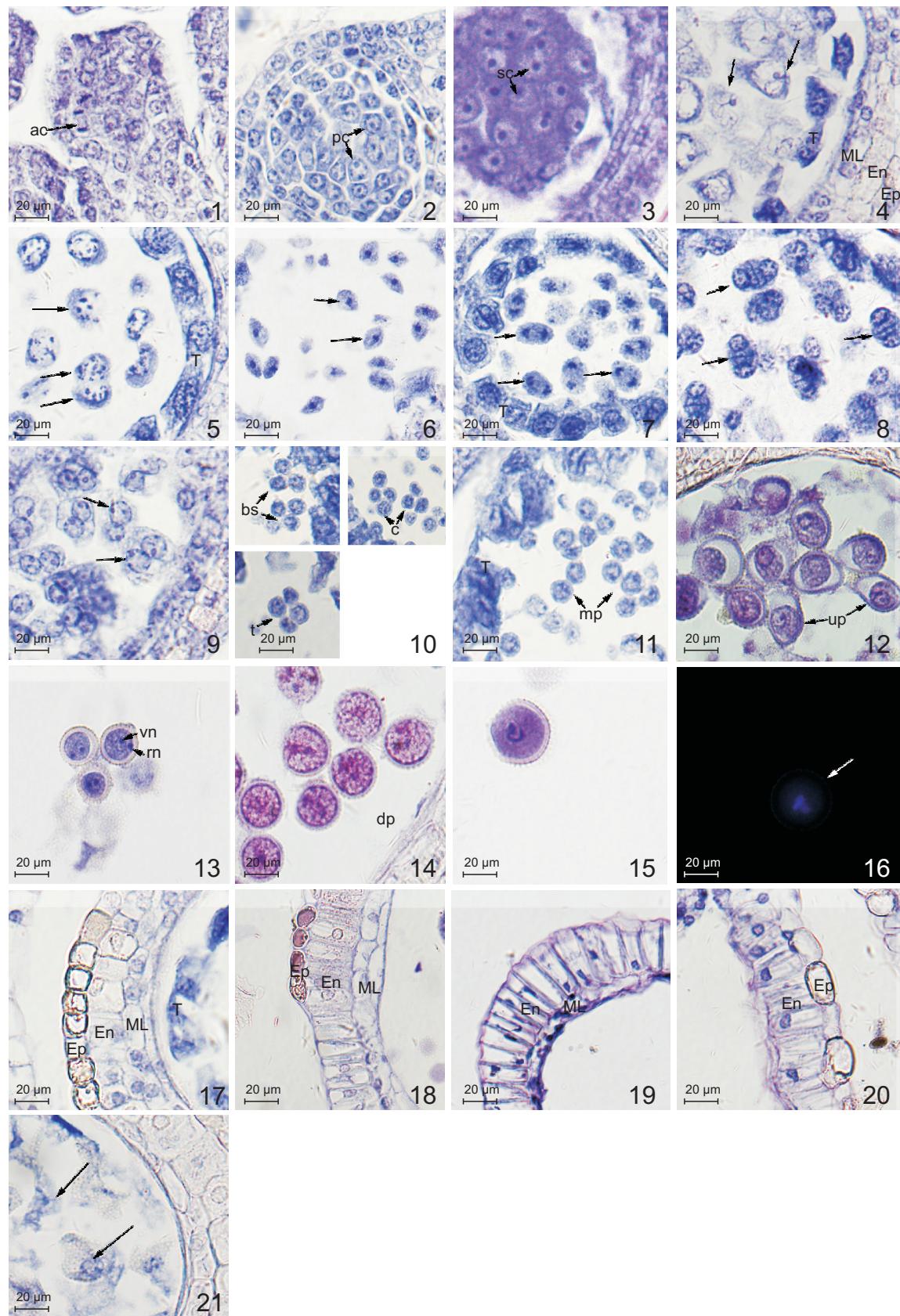
许自龙等: 图版II

Xu Zi-Long *et al.*: Plate II

See explanation at the end of text

许自龙等: 图版III

Xu Zi-Long et al.: Plate III



See explanation at the end of text

(责任编辑:张平)