

# 华南五针松种皮发育研究\*

## Studies on the Development of Seed Coats of *Pinus kwangtungensis*

陈健辉, 缪绅裕, 王厚麟, 钟文越

CHEN Jian-hui, MIAO Shen-yu, WANG Hou-lin, ZHONG Wen-yue

(广州大学生命科学学院, 广东广州 510006)

(School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong, 510006, China)

**摘要:** 运用石蜡切片法, 在透射电子显微镜和光学显微镜下观察华南五针松 (*Pinus kwangtungensis*) 种皮的形态结构和发育, 用 PAS 反应显示细胞内淀粉粒分布, 研究细胞内淀粉粒的含量。结果表明, 华南五针松的种皮的发育开始在大孢子母细胞发育的时期, 开始时在雌配子体的周围形成比较薄而且致密, 颜色较深的几层; 随着种子的不断发育, 从种子的横切面可见, 种皮可以明显分为外种皮, 中种皮和内种皮三部分。这三部分种皮的形态结构各有不同: 外种皮是几层扁平状硬化薄壁细胞; 中种皮细胞较多, 细胞层较厚, 细胞较大, 形状不规则, 壁厚; 内种皮细胞受到发育的胚的挤压, 比较扁平, 排列紧密。另外, PAS 反应显示出, 中种皮与内种皮所含的淀粉粒比较丰富, 特别是在种子发育的初期, 形成了一层富含淀粉粒的细胞层, 这层细胞所含的淀粉粒随着种子的发育越来越少, 这与种子发育过程需要分解淀粉粒为细胞分裂提供能量有关。

**关键词:** 种皮 发育 淀粉粒 华南五针松

中图分类号: Q944 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2008)04-0431-05

**Abstract** Paraffin section technique was applied in the study of the development of the seed coat of *Pinus kwangtungensis*. The results showed that the development of seed coat follows with the development of the megaspore mother cell. In the development of female gametophyte, a thin, dense and dark layer of cells formats around the female gametophyte. With the development of seed, from the cross section, the seed coat is normally composed of three layers: an outer layer, a middle layer and an inner layer. The structures of these three layers are difference. The outer layer of the seed coat consists of several layers of sclerified parenchyma cells whose major axis are flat. The middle layer of the seed coat is thicker in which the cells are bigger and irregular. Squeezed by the developmental embryo, the cells which arrange closely in the inner layer of seed coat are flat and small. In addition, the method of PAS was applied to appear the circumstance of distribution of starch grains. The conclusion shows that the inner layer and the middle layer of seed coats have a lot of starch grains. Especially in the early period of the seed development, it formats a layer which contains many starch grains. These starch grains will reduce graduate with the seed's development. This may be relate with the need of energy to support the cells division which provided by the resolve of the starch grains.

**Key words** seed coat, development, starch grains, *Pinus kwangtungensis*

收稿日期: 2008-01-27

作者简介: 陈健辉 (1966-), 男, 副教授, 主要从事植物形态和植物发育方面的研究。

\* 广东省自然科学基金 (04009527) 和广东省科技计划项目 (2004B33301023) 资助。

松科 (Pinaceae) 植物在我国分布广, 是我国最有价值的一类工业用材及荒山造林树种。国内外对松科植物的研究呈现多样化, 包括茎、叶、球果的解剖学观察<sup>[1-9]</sup>、形态结构的综合观察<sup>[10]</sup>、以及树脂道的发生发育的研究<sup>[11, 12]</sup>, 等等。前人对松属植物种子

的形态结构也有一些研究报道,比如:用扫描电子显微镜对部分裸子植物假种皮的微观形态进行研究<sup>[13]</sup>,对种子、种皮外部形态进行观察和研究<sup>[14,15]</sup>。但是,这些研究多只涉及种子表面形态的观察,对于种皮内部结构的变化尚未谈到。作为中国特有的二级保护植物华南五针松(*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang)<sup>[16]</sup>,是生于广东、湖南、广西等地海拔700~1700m的山地针叶阔叶混交林或悬崖上的保护植物。华南五针松又名广东松或广东五针松,属裸子植物松科松属常绿乔木,喜温暖湿润气候,适合生长在多石的山顶和山脊,耐干旱瘠薄,在土层深厚、排水良好的酸性土壤中生长最快。目前华南五针松已经处于渐危状态<sup>[17]</sup>。因此,不少学者对华南五针松的生理特性<sup>[18]</sup>、种群动态<sup>[19]</sup>、群落特征<sup>[17,20,21]</sup>等方面进行研究,有学者对华南五针松在舜皇山国家森林公园完好保存的原因进行了研究,认为当地华南五针松保存完好与当地古地理、古地层、古气候及当地人文有关系<sup>[22]</sup>。但是,目前华南五针松形态结构方面的报道仅有1篇<sup>[23]</sup>,种子方面的研究没有见报道。本实验主要从形态学角度,通过对华南五针松种皮的不同发育期进行解剖学研究,总结、归纳其种皮发生的特点和生长发育规律,揭示其适应生长在特定环境的结构特征,为进一步了解华南五针松的生存和发育状况,从而更好地保护华南五针松的生长、繁殖,防止物种衰退提供理论依据。

## 1 材料与方法

实验用的华南五针松不同发育时期的胚珠、种子,采自广东乳源南岭国家级自然保护区。采集地点海拔为1080~1320m。2005年3月到11月期间,采集不同生长期的华南五针松大孢子叶球和成熟球果,即时用卡诺氏固定液固定或用戊二醇固定液固定,低温保存,备用。根据不同的观察目的,采用不同的制片方法制作玻片观察。

### 1.1 形态结构观察材料制片

用卡诺氏固定液固定,爱氏苏木精整体染色,常规石蜡切片法切片,切片厚度为10 $\mu$ m,中性树胶封固,置于Olympus显微镜下观察并摄影。

### 1.2 组织化学观察材料制片

用卡诺氏固定液固定,按常规石蜡切片法切片,切片厚度10 $\mu$ m,PAS反应法(高碘酸-席夫反应法)染色,鉴定淀粉粒,中性树胶封固,用Olympus显微镜观察并摄影。

### 1.3 透射电子显微镜观察材料制片

取珠被、种皮材料,用戊二醇-锇酸双重固定,系列酒精脱水,环氧丙烷过渡,Epon812环氧树脂包埋,Philips-400型透射电子显微镜观察并摄影。

## 2 观察结果

### 2.1 受精前珠被发育的特点

华南五针松大孢子叶球发育早期胚珠比较幼嫩,从早期大孢子叶球上取下的珠鳞还不能看到明显成型的胚珠,只能看到珠鳞基部有白色微突出的结构,这时通过珠鳞横切面可以看到雌配子体已经开始发育。在大孢子母细胞时期,围绕大孢子母细胞的细胞形状近似圆形,细胞质浓厚,如原分生组织;珠心组织紧靠在这些细胞外,细胞的切向轴比径向轴稍大,细胞质不如雌配子体细胞浓厚;珠被细胞位于珠心组织细胞外,多层,由外到内分化程度逐渐减弱,随着发育和分化的深入,区别更加明显(图1)。此时用PAS反应显示淀粉的分布情况可以看出,在幼嫩胚珠时期,雌配子体细胞没有淀粉粒的分布,珠被外层细胞有少量淀粉粒的分布。

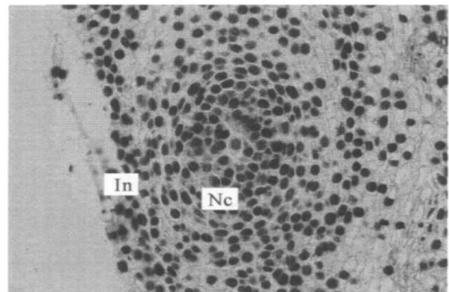


图1 珠鳞横切面( $\times 600$ )

Fig. 1 Transverse of ovuliferous scale( $\times 600$ )

In 珠被, Nc 珠心 In Integument, Nc Nucellus.

在透射电子显微镜下可见:幼嫩珠被的外层细胞尚处于分化阶段,细胞壁较薄,其大液泡还没有形成,仅有小而分散液泡,细胞核电子密度较大,核质分布较为均匀;细胞质浓厚,细胞具丰富的具膜细胞器,这些细胞器散布、较多靠边分布(图2A);线粒体较小,呈近球形,有的两层膜尚未发育完善,细胞器内具双层膜结构(图2B)。同时可以看见明显的噬铁颗粒,脂质体也开始形成。

### 2.2 种皮分化期发育的特点

在大孢子母细胞进行减数分裂时,雌配子体细胞、珠心组织细胞和珠被组织细胞快速分裂,形成致密的细胞群,在珠鳞腹面形成明显突起,此时发育进

入种皮分化期。随着珠鳞的发育,从大孢子叶球上取下的珠鳞已经可以看到明显的胚珠,这时从珠鳞的腹面可以看到胚珠的外形,颜色较浅就是胚珠,能与珠鳞明显区别。从珠鳞基部的横切面可见:珠被细胞多层,细胞分裂速度没有珠被早期分裂那么快,但是细胞体积开始增大,细胞壁逐渐增厚,珠被细胞较珠心细胞排列紧密(图 3A)。此时用 PAS 反应显示淀粉的分布情况可以看出,在靠近珠心的珠被细胞内的淀粉粒含量非常丰富。

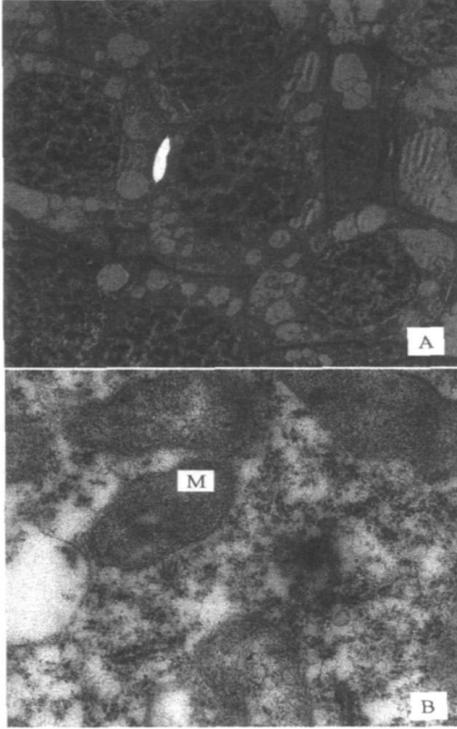


图 2 外层珠被细胞超微结构

Fig. 2 Ultra-structure of integument cell of outer layer  
A× 2300; B× 24000; M: 线粒体 M: Mitochondrium.

随着受精的开始和种鳞的发育,原珠被外层细胞开始出现加厚,雌配子体细胞、珠心细胞的细胞壁薄,雌配子体细胞与珠心细胞,珠心细胞与珠被细胞之间产生明显的间隙,此时珠被细胞开始出现分化,先形成可明显区别的外层区、中层区、内层区,以后这三个区域的细胞在细胞壁、细胞形态等方面出现较大的变化而形成明显的外种皮,中种皮,内种皮三部分,他们分别由受精前珠被的外层区、中层区、内层区细胞发育而来的,开始外种皮 2~4 层,分化程度最高,细胞壁不均匀加厚明显,细胞质稀疏;中种皮 4~8 层细胞核大,细胞排列紧密,切向轴与径向轴的比值不如外种皮大;内种皮 3~5 层分化程度最低,切

向轴与径向轴的比值在三层种皮最小(图 3B)。以后种皮继续发育,层数也逐渐增加。通过 PAS 反应显示,内种皮和中种皮细胞内的淀粉粒数量较发育早期要少,外种皮细胞基本不含淀粉粒(图 4)

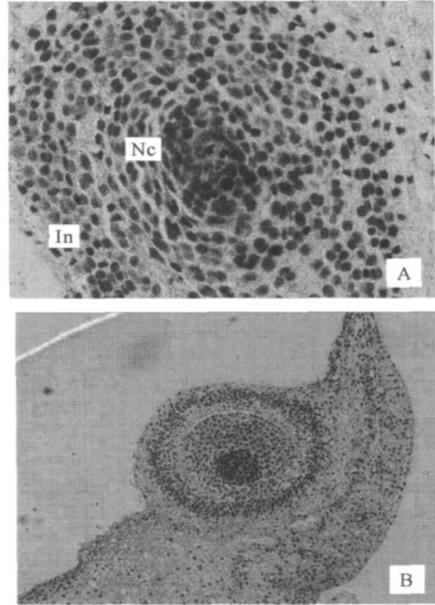


图 3 珠鳞横切面

Fig. 3 Transverse of ovuliferous scale

A× 580, B× 280 In 珠被, Nc 珠心, In Integument, Nc Nucellus.

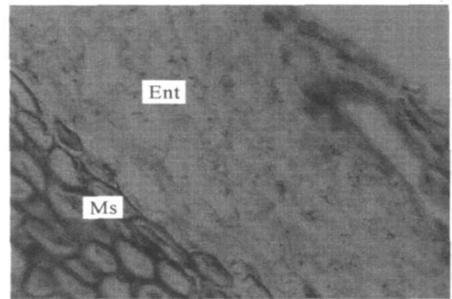


图 4 种皮横切面(× 540)

Fig. 4 transverse of seed coat(× 540)

Ent 内种皮, Ms 中种皮. Ent Endotesta, Ms mesotesta.

在透射电子显微镜下可见幼嫩的种皮外层细胞:细胞壁出现加厚,其大液泡没有形成,小液泡数量变少,体积增大,细胞核电子密度分布不均匀;细胞质浓厚,具脂体、双层膜的小泡及少量线粒体、内质网等细胞器(图 5);淀粉粒较大,包被在膜内;线粒体较小,呈近球形,两层膜比较清晰,内膜向内折叠。以后的外层细胞,细胞壁加厚明显,并呈现念珠状。

### 2.3 种皮分化后期发育的特点

在种皮分化后期,种子逐渐成熟,从种鳞的横切

面可见:种皮三层结构分化清晰,这个时期外层、中层种皮细胞的细胞壁明显加厚,细胞也较前期大,外层种皮细胞排列紧密,切向轴大于径向轴,细胞壁形成不规则加厚,成为硬化的薄壁细胞,但加厚的程度远低于中层;中层种皮细胞层数较多,细胞较大,细胞壁较厚,形成特殊“厚壁组织”,细胞形态不规则;细胞核开始较大,内含物较多,颜色较深。内种皮,细胞比较扁平,细胞切向轴较大,细胞壁较薄,排列紧密(图6图7A图7B)。种皮细胞从分化前期进入分化期经历了一个逐渐变化的过程,种皮细胞分化前期,细胞体积较小,由于分裂速度比较快,所以细胞致密,显微镜下可见呈现较深的颜色,随着细胞逐渐分化,细胞体积逐渐增大,分裂放缓,细胞逐渐分裂成多层,各层细胞形态开始有所不同,外层、中层细胞壁逐渐加厚,种皮细胞形态也与开始有所区别,外层细胞壁形成不规则突起,中层细胞壁逐渐增厚,排列也较其紧密,内层细胞快速增大。

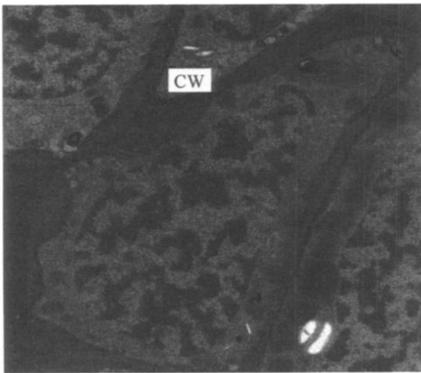


图5 早期外层种皮细胞超微结构(× 2730)

Fig. 5 Ultra-structure of young seed coat cell of outer layer(× 2730)

CW: 细胞壁 CW: Cell wall.

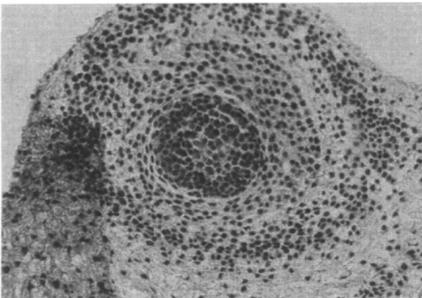


图6 种鳞横切面(× 560)

Fig. 6 Transverse of seminiferous scale(× 560)

通过 PAS反应显示,在种皮分化后期的早段,内种皮和中种皮细胞内的淀粉粒数量较前一时期要

少,外种皮细胞基本不含淀粉粒(图7C)。在种皮分化后期的后段,仅在内层种皮的部分细胞含有少量淀粉粒。

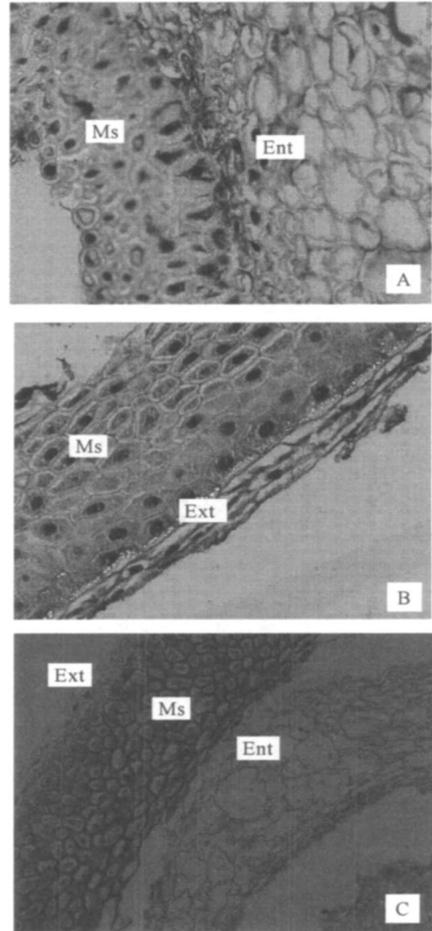


图7 种皮横切面(× 270)

Fig. 7 Transverse of seed coat(× 270)

Ent 内种皮, Ms 中种皮, Ext 外种皮。

Ent Endotesta, Ms Mesotesta, Ext Exotesta.

在透射电子显微镜下可见外层种皮细胞:细胞核电子密度较高,呈均匀分布;中央大液泡已经形成,含有较多脂质体、淀粉以及多种细胞器;细胞器中,线粒体数量多,形态大小各异,松散的分布在细胞质中,呈近圆形、椭圆形、长形(图8A),并且可以观察到内膜内折所形成的嵴;内质网形成扁平的条状或分枝,分布亦非常广泛。细胞具有许多噬钺颗粒,嗜钺颗粒数量不等,大小不一,着色灰暗,近球形,有的电子密度较大,有的电子密度中等。细胞壁不均匀增厚明显,具较为明显凹陷区域,有部分区域厚度超过  $5\mu\text{m}$ ,并可以看见明显的胞间连丝(图版8B)。

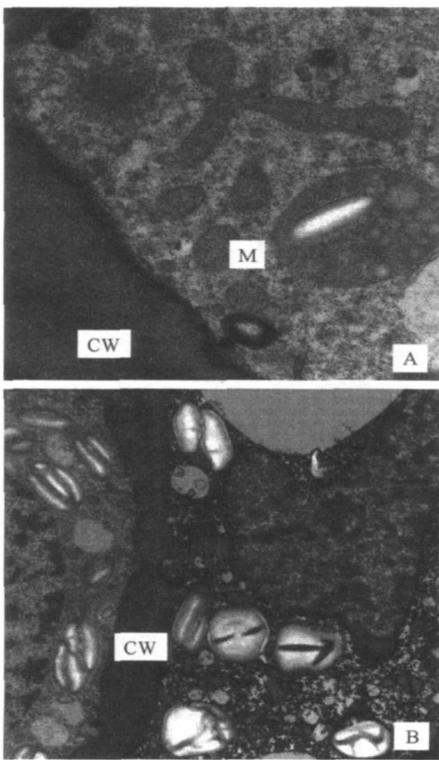


图8 外层种皮细胞超微结构

Fig. 8 Ultra-structure of seed coat cell of outer layer

A× 11300; B× 3000, M: 线粒体, CW: 细胞壁

M: Mitochondrium, CW: Cell wall.

### 3 讨论

#### 3.1 种皮发育的特点

华南五针松种皮由珠被发育而来。种皮的结构在各种植物的差异较大,既取决于珠被细胞层的数目,也取决于种皮在发育中的变化<sup>[10]</sup>。在光学显微镜下可以看到,华南五针松的种皮从大孢子母细胞开始有珠被发育,特别是在发育早期,珠被迅速发育,随着胚珠发育的不断成熟,珠被逐渐出现分化,形成的种皮可分化为三层结构:外种皮,中种皮,内种皮。三层种皮结构不同,与其不同的功能有关,外种皮位于种子最外层,开始是薄壁细胞,以后细胞壁逐渐增厚,形成不规则的致密结构,成为硬化的薄壁细胞层;从PAS反应的情况看,细胞的淀粉粒含量在整个发育阶段出现较少,消失较快,说明这层细胞不为胚的发育提供营养物质;且这部分细胞层数少,位于最外层,起着保护的作用。中种皮细胞个体较大,细胞层数多,细胞壁加厚较快,细胞核解体较慢;从PAS反应的情况看,在种子发育的初期这部分细胞含有较多的淀粉粒,以后逐渐变少,这是因为种子的发育,分解了一部分淀粉粒,提供给胚发育时所需要的能量,这部分细胞与胚发育时能量的提供有关,

起着保护种子及抵抗机械力量的作用。最内层种皮由几层薄壁细胞组成,这部分含的淀粉粒是最多的,细胞壁较薄,在靠近珠心的种皮细胞内的淀粉粒含量非常丰富,有利于物质的传递,这部分细胞由于胚的发育,常常被压扁,这些特点都有利于作为能量提供的场所,说明内种皮的主要功能在于为种子发育提供能量。

#### 3.2 华南五针松种皮结构对其繁殖的影响

华南五针松种皮位于种子的最外部,它的结构特点、细胞壁厚薄变化所导致的对物质通透性的变化以及细胞所含的成分的特点,都直接影响到种子的进一步发育,特别是外层的硬化种皮和中层的厚壁种皮对水分的进入具有较大的影响。华南五针松中种皮的特性既是其对生态环境<sup>[17, 20, 21]</sup>和生理<sup>[18]</sup>变化的适应,同时也影响到其的整体生长情况,从而形成在华南五针松群落中,华南五针松种群属于中衰至衰退种群<sup>[17, 19~ 21]</sup>。但是也有学者提出<sup>[22]</sup>不同地区的华南五针松种群的形成和发展具有各自的特性,因此保护濒危植物首要的手段是保护其生境,此外如何在多石的山顶和山脊上,在干旱、瘠薄的土层,形成有深厚、排水良好的酸性土层,是提高其自然繁殖的关键,只有使其种群的演替达到稳定,才能更好的了解和保护华南五针松这种处于渐危状态的保护植物。

#### 参考文献:

- [1] 桂耀林,李正理.中国松属(*Pinus*)针叶的比较解剖观察[J].植物学报,1963,11(1):44-58.
- [2] 姚璧君,胡玉熹.松柏类植物叶子的比较解剖观察[J].植物分类学报,1982,20(3):275-29.
- [3] 苏应娟.红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科植物叶片结构的比较观察[J].武汉植物学研究,1997,15(4):307-316.
- [4] Dilcher D L. Approaches to the identification of angiosperm leaf remains[J]. Bot Rev, 1974, 40 1-157.
- [5] Laubenfels D J. The external morphology of conifer leaves[J]. Phytomor Phology, 1953, 3 1-20.
- [6] 张振钰,高信曾.白皮松次生韧皮部的解剖学观察[J].植物学报,1984,26(2):145-150
- [7] 李正理,张新英.三种正常与矮化松树的木材比较解剖[J].植物学报,1985,27(4):354-360
- [8] 吴鸿,崔大方,胡正海.油松雌球果的发生和发育研究[J].植物学报,2000,42(4):353-357.
- [9] Tretyakova I N, Novoselova N V, Cherepovskii Yu A. Embryonal development of siberian Pine(*Pinus sibirica* Du Tour) with the annual cycle of ovulate cone development in the western Sayan mountains[J]. Russian Journal of Plant physiology, 2004, 51(1):120-126.

(下转第440页 Continue on page 440)

抑制作用 种子萌发对物种延续非常重要,种子发芽率和发芽速度的降低直接影响到本地植物在生态系统中的对资源和土壤养分上与其它物种及外来入侵植物的竞争能力<sup>[17]</sup>,将会破坏该生态系统的多年来形成的物种之间平衡

致谢:本研究的受试植物种子由广西植物研究所吕仕洪同志帮助采集,作者谨此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] Gordon A, Stevens J R, Chungshi Tang. Inhibition of seedling growth of crop by recirculating root exudates of *Bidens pilosa* L. [J]. Journal of Chemical Ecology, 1985, 11( 10): 1411-1425.
- [2] 李振宇,解炎.中国外来入侵种 [M].北京:中国林业出版社,2002 158.
- [3] 曾任森,骆世明.三叶鬼针草水抽提物他感作用与降雨量的关系 [J].华南农业大学学报,1995,16(4): 69-72.
- [4] 曾任森,骆世明.香茅、胜红蓟和三叶鬼针草根分泌物的化感作用研究 [J].华南农业大学学报,1996, 17(2): 119-120.
- [5] 王乃亮,马瑞君,孙坤,等.种菊科植物水浸液对黄帚囊吾种子萌芽期化感作用的研究 [J].兰州大学学报,2006,42(5): 56-61.
- [6] 赵厚本,邵志芳,杨义标,等.华南地区几种常见植物对薇甘菊的化感作用研究 [J].生态环境,2007,16(1): 130-134.
- [7] 杜毓超,李兆林,陈宏峰,等.广西灌江流域岩溶生态环境

- 敏感性分析 [J].中国岩溶,2006,25(3): 220-227.
- [8] 曾任森.化感作用研究中的生物测定方法综述 [J].应用生态学报,1999,10(1): 123-126
  - [9] Tukey H B J. Leaching of metabolites from above ground plant parts and its implications [J]. Bulletin of Torrey Botanical Club, 1966, 93 385-401.
  - [10] 杜风移,于树华,马丹炜,等.三叶鬼针草对蚕豆根尖遗传毒理性的研究 [J].生态环境,2007,16(3): 944-949.
  - [11] 郑丽,冯玉龙.紫茎泽兰叶片化感作用对10种草本植物种子萌发和幼苗生长的影响 [J].生态学报,2005,25(10): 2782-2787.
  - [12] 韩利红,冯玉龙.发育时期对紫茎泽兰化感作用的影响 [J].生态学报,2007,27(3): 1185-1191.
  - [13] 杜风移,张苗苗,马丹炜,等.三叶鬼针草化感作用的初步研究 [J].中国植保导刊,2007,27(9): 8-11.
  - [14] Lin C C, Kao C H. Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves [J]. Plant Growth Regu, 2000, 30 151-155.
  - [15] 郁继华,张韵,牛彩霞,等.两种化感物质对茄子幼苗光合作用及叶绿素荧光参数的影响 [J].应用生态学报,2006,17(9): 1629-1632.
  - [16] 曹建华,袁道先.受地质条件制约的中国西南岩溶地区生态系统 [M].北京:地质出版社,2005 90-95.
  - [17] Weiner J, Wright D B, Castro S. Symmetry of below ground competition between *Kochia scoparia* individuals [J]. Oikos, 1997, 79 85-91.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 435页 Continue from page 435)

- [10] 林金星,胡玉熹.裸子植物结构图集 [M].北京:科学出版社,2000 169-225.
- [11] 吴鸿,贺游利,胡正海.日本金松皮层树脂道发育的研究 [J].西北大学学报:自然科学版,1996,26(6): 529-532.
- [12] 吴鸿, Martin M. 欧洲赤松树脂道上皮细胞树脂分泌方式研究 [J].植物学报,1999,41(2): 133-135.
- [13] 苏应娟,王艇,张宏达.部分裸子植物假种皮微形态特征及其分类学意义 [J].西北植物学报,1997,17(3): 392-398.
- [14] 王建中,王瑞勤,张玉钧,等.三种落叶松种子的比较形态与统计分析 [J].北京林业大学学报,1994,16(4): 38-45.
- [15] 刘玲玉,杨茜,粟淑媛.中国落叶松属植物种皮扫描电镜的观察 [J].阴山学刊,1999,15(2): 15-24.
- [16] 中国植物红皮书编委会.中国植物红皮书——稀有濒危植物:第 册 [M].北京:科学出版社,1991: 94
- [17] 张璐,苏志尧,陈北光.中国特有植物——华南五针松群落的种间关系 [J].生态学报,2006,26(4): 1063-

- 1072.
- [18] 周佑勋,段小平.华南五针松种子休眠生理的研究 [J].中南林学院学报,1993,13(2): 122-127.
- [19] 杜道林,刘玉成,苏杰.茂兰喀斯特山地广东松种群结构和动态初步研究 [J].植物生态学报,1996,20(2): 159-166.
- [20] 缪绅裕,王伟彤,曾阳金,等.广东石门台自然保护区广东松群落的基本特征 [J].广西植物,2004,24(5): 390-395.
- [21] 曾阳金,王厚麟,陈健辉,等.广东石门台保护区木龙顶广东松群落生态特征 [J].广州大学学报:自然科学版,2006,5(4): 39-43.
- [22] 唐昭颂,黄东骑.华南五针松在舜皇山国家森林公园完好保存的原因浅究 [J].湖南林业科技,2003,30(1): 70-73.
- [23] 陈健辉,缪绅裕,王厚麟,等.华南五针松幼茎发育研究 [J].广西科学,2007,14(2): 150-154.

(责任编辑: 邓大玉)