

叶籽银杏拟胚珠的形态发育及变异特性

李士美, 李保进, 邢世岩*, 王 芳

(山东农业大学林学院, 山东泰安 271018)

摘 要: 以山东省沂源县中国首次发现的叶籽银杏为试材, 对其变异特性、“叶生拟胚珠”的形态发育过程、叶脉以及叶和胚珠的形态进行了研究。结果发现, 叶生拟胚珠的发育过程可分为发端期、形成期、增大期和成熟期。每个叶上叶生拟胚珠 1~8 个, 但只有一个能正常发育。叶籽银杏的叶片可以分为多裂型、全缘型、二裂型、叶生拟胚珠叶和变形叶, 叶色分绿色和斑叶两种类型; 与正常胚珠相比, 首次发现叶生拟胚珠的数量和着生部位差异较大, 发生时间具滞后性和异时性。叶生拟胚珠的形成期比正常胚珠滞后 15 d, 而且在授粉期的叶生拟胚珠上始终未发现“传粉滴”的出现; 叶生拟胚珠按其着生位置分为单裂单生型、单裂簇生型、双裂簇生型、多裂单生型和散生型 5 种; 叶籽银杏正常叶叶脉具有闭合型、W 型、V+W 型和双 V+W 型的网结联合, 而叶生拟胚珠叶的叶脉有单弧形、双弧形和多弧形 3 种类型。对叶籽银杏这一特异观赏种质的变异特性及系统发育进行了讨论。

关键词: 银杏; 叶生拟胚珠; 形态发育

中图分类号: S 664.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 01-0001-06

Morphological Development of Ovule-like Organ on the Leaf and Variation Characteristics of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak (Oha tsuki)

LI Shimei, LI Bao-jin, XING Shi-yan*, and WANG Fang

(Forestry College, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Many features of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak, the one which was firstly found at Yiyuan County of Shandong Province in China, were continually observed and the comparative morphology research was conducted, including the variation characteristics, the morphological development of ovule-like organ on the leaf blade and veins of leaf. The results of analysis showed that the development of the ovule-like organ on the leaf blade is comprised of initial stage, formation stage, expansion stage and mature stage. There were one to eight ovule-like organs on each leaf, but only one developed normally. The leaves were divided into five types, i.e. multilobed type, nonlobed type, bilobed type, the leaf with ovule-like organ and deformation leaf, leaf color into two types, i.e. green and variegated types. Compared with normal ovules, ovule-like organ on the leaf blade displayed variation in insertion, heterochrony and hysteresis in development of ovule-like organ on the leaf blade, which was reported for the first time. The ovule-like organ lagged behind the normal ovule for fifteen days at initial stage, moreover no pollination drop was found on the ovule-like organ. The ovule-like organ on the leaf blade was divided into five types according to the insertion on the leaf, i.e. unilobed solitary type, unilobed clustered type, bilobed clustered type, multilobed solitary type and adspersed type. The vein of normal leaf could be separated into four types according to anastomoses, i.e. closed type, W type, V+W type and double V+W type. And that of the phyllosporous leaf was classified into three types, i.e. uni-arcuate, biarcuate and multi-arcuate type. The variation characteristics and the phylogeny of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak were discussed in the paper.

Key words: *Ginkgo biloba*; Ovule-like organ on the leaf; Morphological development

收稿日期: 2006 - 07 - 22; 修回日期: 2006 - 10 - 30

基金项目: 林业部 ‘948’ 项目 (98-4-16)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xingsy@sdau.edu.cn)

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 雌雄异株, 雌雄球花均为腋生。1891年 Shirai发现银杏有不正常种子形成 (Sakisaka, 1927)。1896年 Fujii首次报道了银杏叶片上有畸形胚珠现象, 1927年 Makino才首次把叶籽银杏定为一个变种: *Ginkgo biloba* var *epiphylla* Mak (郭善基, 1993), 并被 Matsudam、Yatoh、吉冈金市等人先后引用。陈鹏等 (2004) 则根据银杏种核形态特征, 将叶籽银杏作为一个品种列入长子类 (long stone type)。美国育种学家 Santamour也将叶籽银杏作为一个品种, 即 ‘Ohatsuki’。目前, 日本已发现 20余株叶籽银杏, 我国山东、湖北、广西等地亦有 20余株, 然而直到 20世纪 60年代初在欧洲和美洲均没有发现叶籽银杏的报道 (邢世岩, 2004)。

叶籽银杏作为银杏家族中的特异种质, 不仅对研究银杏的起源和演化有重要意义, 同时也具有重要的观赏价值。目前关于叶生拟胚珠的研究存在的主要问题是: (1) 仅是发现地点、生长特性、形态学上的简单观察和描述; (2) 对叶籽银杏的种子及叶形态变异未见报道; (3) 对叶生拟胚珠的形态发生及生长规律缺乏研究。本研究以我国首次在山东省沂源县大贤山织女洞林场发现的一株叶籽银杏为试材, 对正常胚珠、叶生拟胚珠、叶形态变异特性及叶生拟胚珠的形态发育过程进行了研究, 以期对叶籽银杏的系统进化、分类地位以及遗传多样性的研究奠定基础。

1 材料与方法

树龄约 400年, 高 25.3 m, 干高 3 m, 胸径 102.2 cm, 树冠呈长卵形, 冠幅东西长 20.5 m, 南北长 16.3 m, 每年均有叶生拟胚珠形成, 但发生的部位及数量变异较大。

由于树体高大, 利用钢管和架板搭筑了固定架, 南北跨度 10 m, 东西长 2 m, 高 8 m。共分 2.5、5和 8 m 3个层面。在 2005年 3~9月和 2006年 3月观察叶籽银杏树的正常胚珠、叶生拟胚珠的形态发生及生长动态, 分期采样并用 FAA固定和低温保存, 进行室内测定。

鲜叶经水煮沸排气软化后, 用 2%~3%的氢氧化钠水溶液在室温下浸泡 12 h左右, 再用清水冲洗, 过氧化氢漂白, 0.5%的甲基绿染色 30 min, 流水冲洗。用吸水纸压平吸干后用 Olympus BH2进行观察照相。叶脉弧度的计算参考张海星 (1996) 的方法。

2 结果与分析

2.1 叶生拟胚珠的形态发育过程

观察发现, 叶生拟胚珠的发育阶段分为发端期 (图版, 1)、形成期 (图版, 2、3)、增大期 (图版, 4、5) 和成熟期 (图版, 6)。4月11日, 叶籽银杏处于展叶初期, 未发现变异叶片。正常胚珠长 0.2 cm, 质量 0.16 g。4月21日, 正常叶片完全展开, 正常胚珠质量 0.4 g (图版, 7), 具叶生拟胚珠的叶片出现皱褶和扭曲, 叶片的裂刻数 1~3个, 比正常叶片明显增加, 叶生拟胚珠处于发端期 (图版, 1)。4月27日, 异常叶片的裂刻加深并在裂刻基部加厚 (图版, 2)。此时正常胚珠珠孔出现传粉滴 (pollination drop), 处于最佳授粉期 (图版, 8)。与正常胚珠相比, 由于叶生拟胚珠发育滞后, 从发育时期上已不具备自然授粉的条件。5月8日, 异常叶片严重畸形, 并在加厚处产生了颗粒状的突起, “拟胚珠”形态明显可见 (图版, 3), 处于形成期。正常胚珠授粉完成, 珠孔闭合, 质量 1.28 g (图版, 9)。5月18日, 叶生拟胚珠成型, 长 0.45 cm, 宽 0.27 cm, 质量 0.7 g (图版, 4), 处于增大期。正常胚珠长 0.8~1.0 cm, 质量 2.04 g (图版, 10)。未授粉的正常胚珠大量脱落, 但叶生拟胚珠在授粉期始终未见“传粉滴”。6月4日, 有部分叶生拟胚珠发生萎缩脱落, 正常发育的叶生拟胚珠质量达 0.9 g (图版, 5), 此时正常胚珠质量已达 2.76 g (图版, 11)。9月23日, 叶生拟胚珠和正常胚珠已经成熟 (图版, 6、12), 质量分别达 4.26和 12.64 g。

2.2 叶生拟胚珠的变异特性

叶籽银杏叶生拟胚珠的变化主要体现在叶生拟胚珠数量、着生部位的变异及发生时间的滞后性、

异时性 4 个方面。5 月 8 日，随机取 3 个枝调查发现，在发生叶生拟胚珠的主枝上叶生拟胚珠叶的发生率约为 13%。每米长枝具叶生拟胚珠的短枝数平均为 6，发生率为 8.2%，具叶生拟胚珠的短枝上发生叶生拟胚珠的叶片占 11.6%。其中发生 1 个和 3 个叶生拟胚珠的叶片比例最大，均为 25%；发生 2 个和 4 个叶生拟胚珠的叶片的比例分别为 18.75% 和 12.5%；发生 5 个、6 个和 8 个叶生拟胚珠的叶片的比例均为 6.25%。叶生拟胚珠产生在叶缘或叶基处，而且均着生在叶片的背面。根据其着生位置可以分为单裂单生型（图版，19）、单裂簇生型（图版，20）、双裂簇生型（图版，21）、多裂单生型（图版，22）和散生型（图版，23）。

叶生拟胚珠的产生具有明显的异时性。6 月 4 日时，处于发端期的叶生拟胚珠叶占调查总数的 15%，处于形成期的占 27.5%，而此时产生最早的叶生拟胚珠叶已达 0.9 g（图版，5）。叶生拟胚珠的产生还具有明显的滞后性，即与正常胚珠相比叶生拟胚珠的产生晚 15 d，因此错过了最佳授粉期。

2.3 叶籽银杏的叶形和叶色

叶籽银杏的叶片总体上分叶生拟胚珠叶和无叶生拟胚珠叶两种。据叶形和裂刻数可分成多裂型（图版，13）、全缘型（图版，14）、二裂型（图版，15）、叶生拟胚珠叶（图版，16）和变形叶（图版，17）。据叶色又可以分成黄绿相间的斑叶（图版，18）和绿色叶（图版，14、15）。

2.4 叶籽银杏的叶脉

2.4.1 正常叶网结脉 网结脉是指 2 条相邻的叶脉相互靠近并汇合为一条，在此过程中，2 条叶脉维管束中的输导组织完全汇合成一束，从而形成一个闭合的脉间区现象。在所观察的 155 枚成熟叶片中，22 枚具有网结脉，占 14.2%。根据二叉分枝的数量和连接后产生的叶脉中二叉分枝的有无，可以将网结脉划分为闭合型（图 1，A）、W 型（图 1，B）、V+W 型（图 1，C）和双 V+W 型（图 1，D）。

2.4.2 叶生拟胚珠叶的叶脉 叶生拟胚珠叶周围的叶脉由于围绕叶胚珠而产生了弧度。单弧型：叶生拟胚珠发生在叶片下部的一侧，发生处叶脉围绕叶生拟胚珠向一侧弯曲产生弧度（图 1，E），弧度在 $45^{\circ} \sim 105^{\circ}$ 之间。双弧型：叶生拟胚珠在叶片的一个裂刻处产生，其两侧的叶脉都向叶生拟胚珠方向弯曲产生弧度，其弧度大小差别很大，为 $39.3^{\circ} \sim 98.2^{\circ}$ （图 1，F）。多弧型：叶生拟胚珠在多个裂刻处产生，叶生拟胚珠周围的叶脉基本上呈对称分布（图 1，G），平均弧度均为 68.6° 。

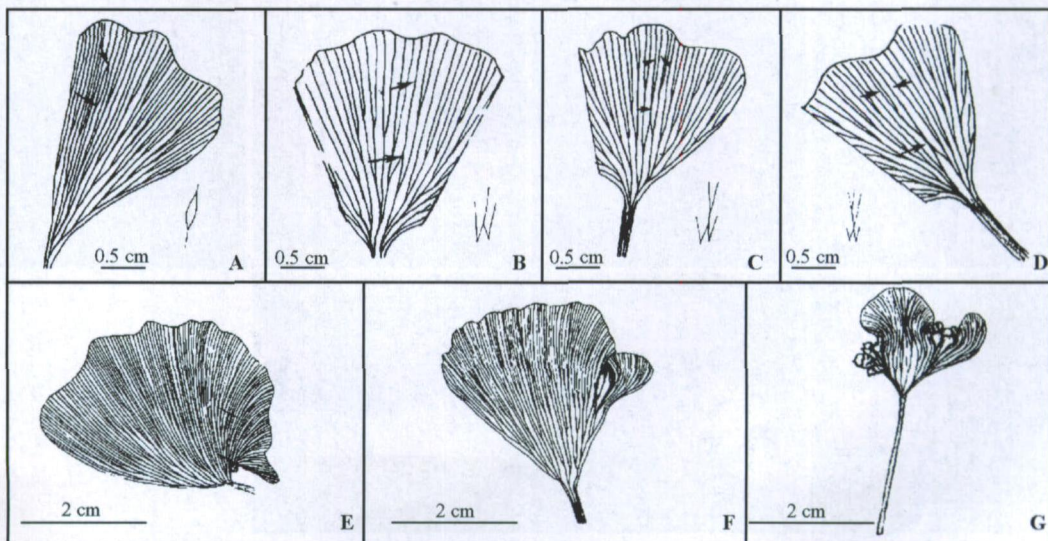


图 1 叶籽银杏正常叶网结脉（A，B，C，D）和叶生拟胚珠叶的叶脉（E，F，G）

Fig. 1 Anastomoses of normal leaf (A, B, C, D) and the veins of leaf with ovule-like organ (E, F, G) of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla*



图版说明: 1~6, 叶生拟胚珠发育过程 (日期分别为 04 - 20, 04 - 27, 05 - 08, 05 - 18, 06 - 04, 09 - 23); 7~12, 正常胚珠发育过程 (日期分别为 04 - 20, 04 - 27, 05 - 08, 05 - 18, 06 - 04, 09 - 23); 13~18, 叶籽银杏叶形和叶色的变异; 19~23, 叶籽银杏叶生拟胚珠的变异。

Explanation of plates: 1 - 6, The development of the ovule-like organ on the leaf (at date of 04 - 20, 04 - 27, 05 - 08, 05 - 18, 06 - 04, 09 - 23); 7 - 12, The development of the normal ovule (at date of 04 - 20, 04 - 27, 05 - 08, 05 - 18, 06 - 04, 09 - 23); 13 - 18, The variation of the leaf shape and leaf color in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak; 19 - 23, The variation of the ovule-like organ on the leaf

3 讨论

3.1 叶籽银杏的变异

叶籽银杏单个叶上叶生拟胚珠数 1~8 个, 但也许是因营养水平的限制, 最终只有一个能正常发育, 其它均退化 (Sakisaka, 1927)。与正常胚珠不同, 作者首次发现叶生拟胚珠具有明显的异时性, 表明叶生拟胚珠的分化和发育机制与正常胚珠可能有本质上的差异, 这也许与叶生拟胚珠“叶柄与种柄非合二为一”有关。与正常胚珠相比, 叶生拟胚珠形成期滞后, 因而错过了自然最佳授粉期, 而且作者在非授粉期的叶生拟胚珠上始终没有发现“传粉滴”(pollination drop)出现, 并最终导致了不可育种子形成。该发现首次从叶生拟胚珠发育角度解释了国内外诸多学者认为“叶籽银杏种子”没有正常胚, 进而不育的机理。叶生拟胚珠发生的多变性究竟是与其遗传基因还是与所处的环境有关还有待进一步研究。目前已经发现一些同源异型盒基因(homeobox gene), 如 *KNOTTED1* (*KN1*) 和类似 *KN1* 的 *KNA T1* 基因, 这类基因能导致叶基的近轴面形成异位的分生组织(ectopic meristems), 进而发育形成叶生花序 (Mcmanus & Veit, 2002)。Lin 和 Miller (2002) 将大麦的同源盒基因 *KNOX-1* 和 *KNOX-2* 基因导入到烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中, 转基因烟草产生了叶附生花序(epiphyllous inflorescences)。

通常银杏叶片的脉序, 为二叉分枝型, 即没有联合的现象, 但是 Amothte 和 Howard (1959) 发现银杏叶片有多种网结联合。作者也发现叶籽银杏有 4 种类型的网结联合, 并将叶生拟胚珠叶片分为单弧型、双弧型和多弧型 3 种脉序类型。曾有学者从分子系统学研究, 认为银杏同苏铁类非常相近。叶籽银杏中这种明显类似苏铁属小叶的网结联合是简单的、基本的、原始的, 这对理解叶籽银杏的系统进化和发育具有一定的意义。

3.2 叶籽银杏的系统发育

按照经典的茎枝理论, 花只能发生在茎枝顶端或叶腋, 而不可能发生在侧生附属器官叶上, 由此引发了叶生胚珠形态学本质的争议。Fujii (1896) 和 Sakisaka (1927, 1928, 1929) 根据对银杏畸形生殖器官的研究, 报道了银杏着生胚珠的结构所具有的长柄在形态学本质上为腋生的枝(caulome-organs), 而珠领向下伸延的短柄相当于大孢子叶的柄, 胚珠、叶生拟胚珠叶都是叶性器官(phyllome organs), 认为银杏的整个雌性生殖结构为一个孢子叶球。也有学者认为银杏的胚珠直接着生在次级轴上, 但这种观点很难解释叶生胚珠现象。目前, 较为广泛接受的是苞鳞—种鳞复合体学说(bract-scale and seed-scale complex), 即认为银杏短枝上的着生胚珠结构及下部的鳞片共同构成银杏大孢子叶球的苞鳞—种鳞复合体, 更确切地说就是将整个可育短枝视为银杏的一个复合大孢子叶球, 相当于松柏类的一个雌球果(傅德志和杨亲二, 1993; 杨永和傅德志, 2001)。苞鳞—种鳞复合体学说可以解释银杏的叶生胚珠现象和畸形胚珠现象。叶籽银杏的发生和银杏的雌配子体含有叶绿素具有粗光合能力(邢世岩和孙霞, 1996)也表明营养器官和生殖器官存在一定程度的同源性。

叶籽银杏的个体发育反应了银杏目系统发育过程的某些特性。对叶籽银杏的评价, 国内学者(马丰山和李建秀, 1991; 傅德志和杨亲二, 1993)多解释为“返祖现象”(atavism)。Sakisaka (1927, 1929)则认为叶籽银杏属于“衰老现象”(senile form)。基于发生形式的相似性, 认为其返祖的历史可以追溯到种子蕨亚纲(Pteridopemidae)(马丰山和李建秀, 1991), 而傅德志和杨亲二(1993)认为银杏类的祖先可能为古裸子植物科达类(Cordaites)。王伏雄和陈祖铿(1983)则认为银杏、苏铁和松杉类可能起源于共同的祖先, 而且裸子植物是单元发生的。基于对银杏雄球花和叶的形态发生的研究, Mundry 和 Stüzel (2003)认为银杏与松柏目(Coniferales)、买麻藤目(Gnetales)和科达目(Cordaitales)有较为密切的亲缘关系, 而与苏铁科(Cycadeceae)关系较远, 并且认为银杏目起源于针叶类植物(Coniferophyte)。周志炎(2003)认为银杏的演化趋势是叶片扁化、蹼化和

融合, 胚珠增大、数目减少、珠柄趋于消失。刘秀群等 (2005) 认为银杏雄球花的演化趋势是小孢子囊数目的减少和小孢子叶长度的缩短。叶籽银杏的多裂叶类似于中生代银杏类的拜拉 (*Baiera* Braun)、似银杏 (*Ginkgoites* Seward), 其叶生拟胚珠较小和发生叶生拟胚珠的短枝胚珠数目较多, 叶籽银杏的网结联合类似于蕨类和苏铁类的叶脉类型, 均体现了叶籽银杏的原始性。

References

- Amott, Howard J. 1959. Anastomoses in the venation of *Ginkgo biloba*. American Journal of Botany, 46 (6): 405 - 411.
- Chen Peng, He Feng-ren, Qian Bo-lin, Wei Jun, Wang Li. 2004. Seed type and their relative characteristics in *Ginkgo biloba* of China. Scientia Silvae Sinicae, 40 (3): 66 - 70. (in Chinese)
- 陈 鹏, 何凤仁, 钱伯林, 韦 军, 王 莉. 2004. 中国银杏的种核类型及其特征. 林业科学, 40 (3): 66 - 70.
- Fu De-zhi, Yang Qin-er. 1993. A new morphological interpretation of the female reproductive organs in *Ginkgo biloba* L., with a phylogenetic consideration on gymnosperms. Acta Phytotaxonomica Sinica, 31 (3): 309 - 317. (in Chinese)
- 傅德志, 杨亲二. 1993. 银杏雌性生殖器官的形态学本质及其发生意义. 植物分类学报, 31 (3): 309 - 317.
- Fu De-zhi, Yang Qin-er. 1994. A new morphological interpretation of the female reproductive organs in *Ginkgo biloba* L., with a phylogenetic consideration on gymnosperms. Acta Phytotaxonomica Sinica, 31 (4): 294 - 296. (in Chinese)
- 傅德志, 杨亲二. 1994. 银杏雌性生殖器官的形态学本质及其发生意义. 植物分类学报, 31 (4): 294 - 296.
- Fujii K. 1896. On the different views hitherto proposed regarding the morphology of the flowers of *Ginkgo biloba*. Botanical Magazine, 10 (108): 7 - 8, 13 - 15, 97 - 110.
- Guo Shan-ji. 1993. Fruit tree flora of China. *Ginkgo* volume. Beijing: Chinese Forestry Press: 78 - 96. (in Chinese)
- 郭善基. 1993. 中国果树志·银杏卷. 北京: 中国林业出版社: 78 - 96.
- Lin J X, Müller K J. 2002. Structure and development of epiphylls in knox-transgenic tobacco. Planta, 214: 521 - 525.
- Liu X Q, Hueber F M, Li C S, Wang Y F. 2005. Emendation of *Sonosaccus gracilis* Harris 1935, a gymnospermous pollen cone. Acta Phytotaxonomica Sinica, 43 (2): 182 - 190.
- Ma Feng-shan, Li Jian-xiu. 1991. *Ginkgo biloba*: the ovuliferous leaf and its phylogenetic implication. Acta Phytotaxonomica Sinica, 29 (2): 187 - 189. (in Chinese)
- 马丰山, 李建秀. 1991. 银杏叶生胚珠的发现及其系统意义. 植物分类学报, 29 (2): 187 - 189.
- Mananus M T, Veit B E. 2002. Meristematic tissues in plant growth and development. Sheffield: Sheffield Academic Press: 163 - 167.
- Mundry M, St üzel T. 2004. Morphogenesis of leaves and cones of male short-shoots of *Ginkgo biloba* L. Flora, 199 (5): 437 - 452.
- Sakisaka M. 1927. On the morphological significance of seed-bearing leaves of *Ginkgo biloba*. Botanical Magazine, 41: 273 - 278.
- Sakisaka M. 1928. The real nature of the epiphyllous fruits of *Ginkgo biloba* L. The Journal of Japanese Botany, 3: 253 - 269.
- Sakisaka M. 1929. On the seed-bearing leaves of *Ginkgo*. The Journal of Japanese Botany, 4: 219 - 235.
- Wang Fu-xiong, Chen Zu-keng. 1983. A contribution to the embryology of *Ginkgo* with a discussion on the affinity of the ginkgoales. Acta Botanica Sinica, 25 (3): 199 - 206. (in Chinese)
- 王伏雄, 陈祖铿. 1983. 银杏胚胎发育的研究—兼论银杏目的亲缘关系. 植物学报, 25 (3): 199 - 206.
- Xing Shi-yan. 2004. Germplasm appraisal and selection of *Ginkgo*. Beijing: Chinese Environment & Science Press: 501 - 509. (in Chinese)
- 邢世岩. 2004. 银杏种质资源评价与良种选育. 北京: 中国环境科学出版社: 501 - 509.
- Xing Shi-yan, Sun Xia. 1996. A review on the embryology of *Ginkgo biloba* with a discussion on the phylogenetic development. Journal of Wuhan Botanical Research, 14 (3): 279 - 286. (in Chinese)
- 邢世岩, 孙 霞. 1996. 银杏胚胎发育研究评述—兼论银杏系统发育. 武汉植物学研究, 14 (3): 279 - 286.
- Yang Yong, Fu De-zhi. 2001. Review on the megastobilus theories of conifers. Acta Phytotaxonomica Sinica, 39 (2): 169 - 191. (in Chinese)
- 杨 永, 傅德志. 2001. 松杉类裸子植物的大孢子叶球理论评述. 植物分类学报, 39 (2): 169 - 191.
- Zang Hai-xing. 1996. The application of the conversion of radian and angle on the measure of angle. Journal of Lishui Teachers College, 18 (5): 71 - 73. (in Chinese)
- 张海星. 1996. 弧度制与角度制的换算在角度计算中的应用. 丽水师专学报, 18 (5): 71 - 73.
- Zhou Zhi-yan. 2003. Mesozoic ginkgoaleans: phylogeny, classification and evolutionary trends. Acta Botanica Yunnanica, 25 (4): 377 - 396. (in Chinese)
- 周志炎. 2003. 中生代银杏植物系统发育、分类和演化趋向. 云南植物研究, 25 (4): 377 - 396.