

研究论文

烟草小孢子母细胞减数分裂过程中微管分布变化

王雅英¹ 张亚楠² 王宏毅³ 林石明³ 田惠桥^{2*}¹ 厦门医学高等专科学校, 厦门 361008; ² 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005;³ 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 厦门 361026)

摘要 应用间接免疫荧光标记技术和激光共聚焦扫描显微镜成像技术观察了烟草小孢子母细胞减数分裂过程中微管的分布变化。在减数分裂前期, 小孢子母细胞中的微管较短, 随机分散在细胞质中。在减数分裂中期, 细胞质中微管形成纺锤体, 控制染色体的分布。进入减数分裂 I 后期, 部分纺锤体微管将两组染色体拉向两级。在减数分裂 II 中期, 细胞中的微管又形成两个纺锤体。在减数分裂 II 后期, 纺锤体微管解聚为微管蛋白分散在细胞质中。胞质分裂发生在四个细胞核形成之后, 通过细胞核之间的质膜向内缢缩分隔四个细胞核, 产生四个小孢子。

关键词 烟草; 减数分裂; 微管

在植物细胞分裂过程中, 细胞骨架调控了细胞分裂方向、染色体的运动和新细胞壁的形成^[1]。在高等植物的有性生殖过程中, 生殖细胞中的细胞骨架研究一直是一个活跃的领域。这些研究包括花粉萌发时的细胞骨架变化特征^[2]; 花粉管极性生长中的细胞骨架分布特征以及细胞器的运动和生殖细胞与两个精细胞在花粉管中的定位^[3-7]; 雌性胚囊细胞中的细胞骨架分布变化与精细胞的运动^[8-10]; 卵细胞受精后启动胚胎发生过程^[11]等。减数分裂是高等植物有性生殖的一个关键事件, 大、小孢子母细胞连续分裂两次, 形成单倍体的孢子。Brown^[12]和 Lemmon^[13]在上世纪 80~90 年代对兰花小孢子发生中细胞骨架特征做了系统的研究。Shamina^[14]对多种单子叶植物和双子叶植物的小孢子母细胞进行了初步的微管骨架分布特征的对比研究; 重点观察了单子叶植物小孢子母细胞减数分裂时的微管骨架的分布特征。张正海等^[15]对小胡杨小孢子发生中微管骨架的变化进行了荧光显微镜观察。他们发现许多小孢子中的微管分布异常, 推测这些异常现象可能是因为小胡杨是小叶杨与胡杨杂交后代的原因。被子植物小孢子发生有两种类型, 同时型和连续型。本实验对烟草(同时型)小孢子母细胞减数分裂过程中的微管变化进行了观察, 探索其减数分裂过程中的微管特征。

1 材料与方法

烟草品种“大青叶”(Nicotiana tabacum L. cv.

Da Qing Ye)种植在厦门大学植物园内。取开花前减数分裂期的花药固定。固定液为 4% 多聚甲醛和 5% 甘露醇、PIPES 50 mmol/L 缓冲液(pH 6.9)、EGTA 5 mmol/L、MgSO₄ 2 mmol/L。固定液中附加 10% 的二甲基亚砜(DMSO)和 1% 的 Triton X-100。花药在室温固定 1 h 后用 PIPES 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 min。取出花药, 在涂有多聚赖氨酸溶液的载玻片上, 轻压花药使药室内的细胞散出。

酶解: 将 1% 的蜗牛酶(PIPES 缓冲液配制)覆盖于细胞之上, 室温保湿酶解 10~15 min。酶解后, 用 PIPES 缓冲液洗 3 次。

免疫反应预处理: 用 1% 的牛血清蛋白溶液(PIPES 缓冲液配制, pH 6.9)覆盖细胞 1 h, 并用磷酸缓冲液(PBS)洗三次。磷酸缓冲液含 NaCl 138 mmol/L、KCl 2.68 mmol/L、KH₂PO₄ 1.47 mmol/L、Na₂HPO₄ 8.1 mmol/L。

微管免疫反应: 经上述处理过的细胞, 先与一抗——鼠抗微管蛋白(Sigma, PBS 缓冲液稀释, 稀释度为 1 : 350)反应, 在一定湿度中 37℃温育 1 h, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min。再用二抗——FITC (fluore-scein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素)标记的羊抗小鼠 IgG (Sigma, PBS 缓冲液稀释, 稀释度为

收稿日期: 2010-09-09 接受日期: 2010-11-04

国家自然科学基金(No.30970275)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0592-2186486, E-mail: hqtian@xmu.edu.cn

1 : 200) 反应, 在一定湿度的条件中 37℃ 温育 1 h, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min。对照实验不加第一抗体。

细胞核的标记: 先配制的 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-二脒基-2-苯吡唑) 母液 (1 mg/ml), 用 PBS 缓冲液 1 : 300 稀释水溶液对细胞染色 5 min, 随即用 PBS 缓冲液冲洗。

封片后用 Leica 共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 及其图像处理系统进行观察, FITC 激发波长为 488 nm, DAPI 激发波长为 364 nm。

2 结果

在小孢子母细胞时期, 小孢子母细胞的最明显特征是被一层厚厚的胼胝质壁包围 (图 1A)。在细胞质中大部分微管蛋白呈弥散分布, 已形成的微管较短, 呈随机分布在细胞质中 (图 1B)。此时, 小孢子母细胞核中的染色质已凝聚为染色体 (图 1C), 表明其已进入减数分裂前期。小孢子母细胞的核位于细胞中央, 体积很大, 占据了细胞的很大空间 (图 1D)。当小孢子母细胞进入减数分裂 I 中期时 (图 1E), 细胞中的微管蛋白组合成纺锤体微管 (图 1F), 染色体集中排列在

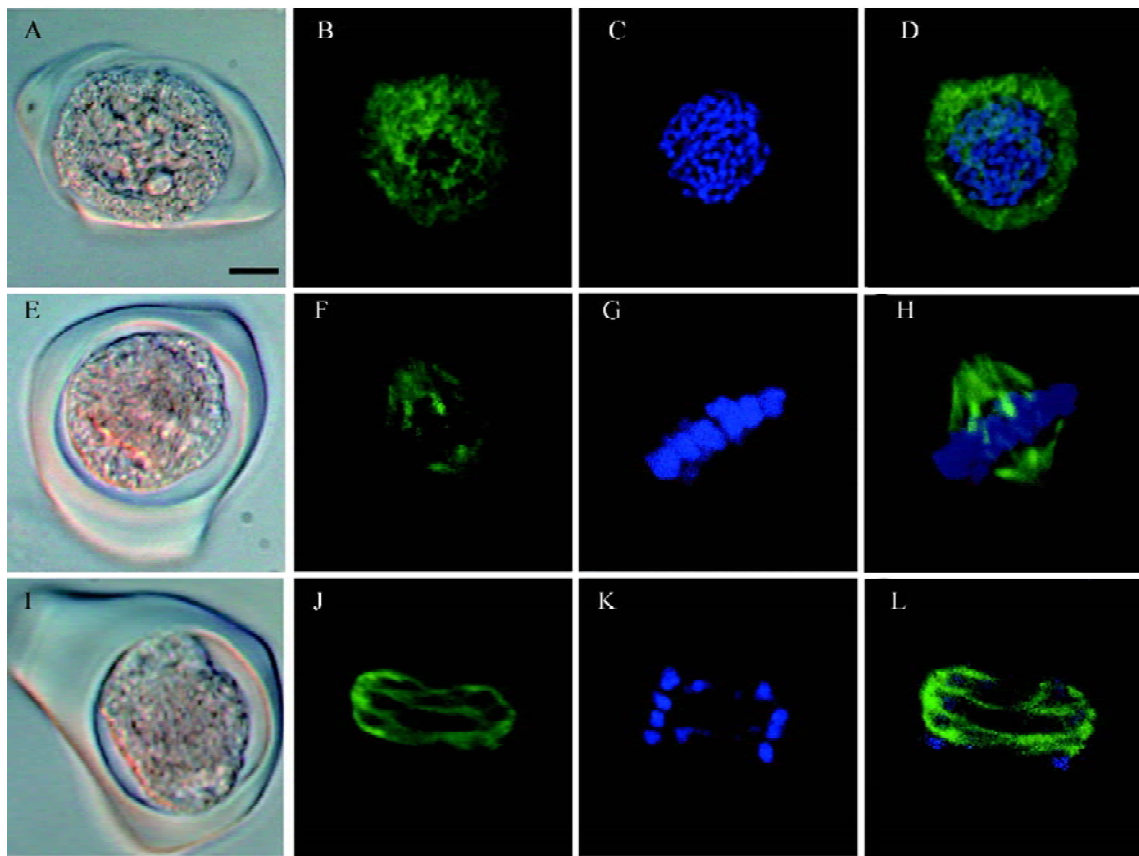


图 1 小孢子母细胞减数分裂 I 的微管分布

A: 减数分裂前的小孢子母细胞被一层很厚的胼胝质壁包裹; B: 小孢子母细胞中的微管分布; C: 小孢子母细胞核中的染色体状态; D: B 和 C 合并后显示染色体和微管分布状态; E: 减数分裂 I 中期的小孢子母细胞; F: 小孢子母细胞减数分裂 I 中期的纺锤体微管; G: 在赤道板的染色体分布; H: F 和 G 合并后显示减数分裂 I 中期小孢子母细胞中的染色体和微管分布状态; I: 减数分裂 I 后期的小孢子母细胞; J: 小孢子母细胞在减数分裂 I 后期的纺锤体微管; K: 两组染色体移向纺锤体两极; L: J 和 K 合并后显示减数分裂 I 后期小孢子母细胞中的染色体和微管分布状态。

Fig. 1 Microtubule configuration in MMCs at meiosis I

A: a microspore mother cell (MMC) was rounded by a thick callose wall at prophase of meiosis; B: MT distribution in a MMC; C: chromosomes in the nucleus of a MMC; D: figures B and C were merged to show the MT and chromosome distribution; E: a MMC at metaphase of meiosis I; F: spindle MTs in metaphase of meiosis I in a MMC; G: chromosome distribution in the equatorial plate; H: figures F and G were merged to show the MT and chromosome distribution in a MMC at metaphase of meiosis I; I: a MMC at anaphase of meiosis I; J: spindle MTs in anaphase of meiosis I in a MMC; K: two sets chromosomes separated to move two poles of a spindle; L: figures J and K were merged to show the MT and chromosome distribution in a MMC at anaphase of meiosis I.

纺锤体的赤道板部位(图 1G 和图 1H)。当小孢子母细胞进入减数分裂 I 后期时(图 1I), 纺锤体的两极变宽, 中间仍有一些的微管相连(图 1J), 两组染色体已分开, 从赤道板处分别向两极移动(图 1K)。可以看出, 此时的纺锤体两极的微管荧光亮度比中间强(图 1L)。烟

草小孢子母细胞的减数分裂属同时型, 细胞核的减数分裂 I 结束后, 在两个子核之间不形成细胞壁, 也就没有由两个细胞组成的二分体阶段。减数分裂 II 开始后, 在同一小孢子母细胞中(图 2A)又形成了两个纺锤体(图 2B), 由于两个纺锤体的纵轴交叉排列, 不在一

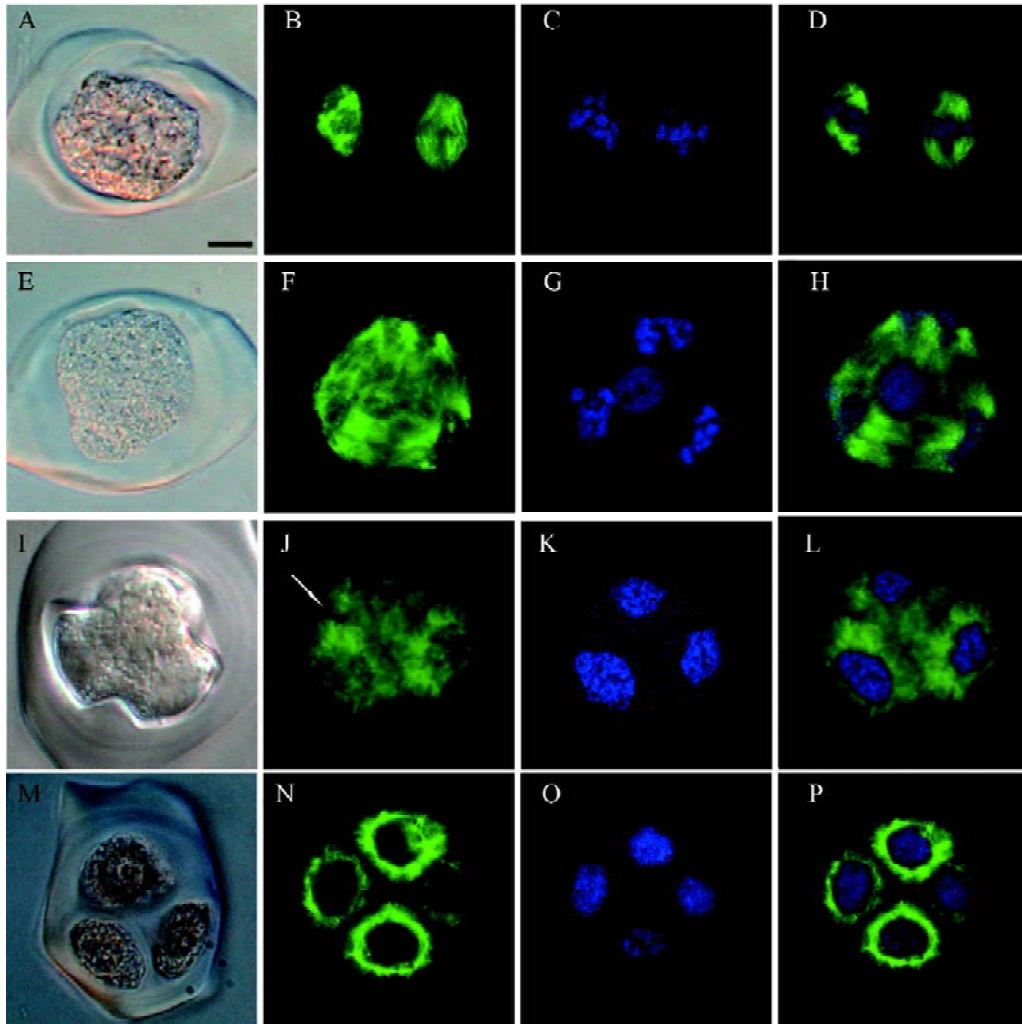


图 2 小孢子母细胞减数分裂 II 的微管分布

A: 处于减数分裂 II 中期的小孢子母细胞; B: 同一小孢子母细胞中的两个纺锤体; C: 同一小孢子母细胞中的两组染色体分布; D: B 和 C 合并后显示在减数分裂 II 中期的染色体和微管的分布; E: 处于减数分裂 II 后期的小孢子母细胞; F: 处于减数分裂 II 后期的小孢子母细胞中的微管分布; G: 小孢子母细胞中的四组染色体的等四面体分布; H: F 和 G 合并后显示减数分裂 II 后期的小孢子母细胞中染色体和微管的分布; I: 处于减数分裂 II 末期的小孢子母细胞表面开始形成分裂沟; J: 处于减数分裂 II 后期的小孢子母细胞中的微管分布; K: 小孢子母细胞中的四个核呈四面体分布; L: J 和 K 合并后显示处于减数分裂 II 末期小孢子母细胞中的染色体和微管分布; M: 减数分裂完成后的四分体; N: 四分体小孢子中的微管分布; O: 四分体中的四个细胞核; P: N 和 O 合并后显示四分体小孢子中的微管和核的分布。

Fig. 2 Microtubule configuration in MMCs at meiosis II

A: a MMC at metaphase of meiosis II; B: two spindles appeared in the same cytoplasm; C: the distribution of two sets of chromosomes in the same cytoplasm; D: figures B and C were merged to show the MT and chromosome distribution in a MMC at metaphase of meiosis II; E: a MMC at anaphase of meiosis II; F: MT distribution in a MMC at anaphase of meiosis II; G: the tetrahedral distribution of four sets of chromosomes in the MMC; H: figures F and G were merged to show the MT and chromosome distribution in a MMC at anaphase of meiosis II; I: a MMC at telophase of meiosis II, its surface began to form contractile furrows; J: MT distribution in a MMC at telophase of meiosis II; K: four nuclei is tetrahedral distribution in the cytoplasm of a MMC; L: figures J and K were merged to show the MT and chromosome distribution in a MMC at telophase of meiosis II; M: a microspore tetrad after meiosis; N: MT distribution in the tetrad microspores; O: four nuclei in the tetrad. P: figures N and O were merged to show the MT and nucleus distribution in tetrad.

个平面,通常难以同时看到两个清晰的纺锤体。但在两个纺锤体之间保持有明显的距离。在减数分裂 II 的中期,两组染色体分别排列在各自的纺锤体赤道板部位(图 2C 和图 2D)。到减数分裂 II 后期(图 2E),两个纺锤体解体,微管又分布在整個细胞质中(图 2F)。此时,四组染色体开始聚集成四个细胞核,呈四面体分布在同一细胞质中(图 2G)。组合后的图片显示细胞质中的微管呈现出由细胞核表面向外辐射的排列状态(图 2H)。细胞核减数分裂 II 完成后,小孢子母细胞开始发生胞质分裂(图 2I)。烟草小孢子母细胞的胞质分裂是从细胞核之间的质膜向内缢缩开始的。由细胞表面向内缢缩的分裂沟在细胞中间相聚,将四个核分隔开。在胞质分裂过程中,缢缩沟的前端并没有微管的特异性分布(图 2J),表明微管排列和质膜向内形成分裂沟之间没有直接的联系。四个细胞核依然呈四面体型分布,其中的染色质比以前进一步凝缩(图 2K)。细胞质中微管由细胞核表面向外辐射的现象更明显(图 2L)。减数分裂结束后,四个细胞核被新形成的细胞壁完全隔离,构成四分体(图 2M)。在四分体小孢子中,微管的荧光亮度比以前有所增加(图 2N),四个小孢子核中的染色质也进一步凝缩(图 2O),微管由细胞核表面向外辐射的状态依然保持,呈现出核表面的微管荧光较亮,而小孢子周质中微管荧光较弱(图 2P)。

3 讨论

被子植物小孢子发生有两种类型:一种是小孢子母细胞减数分裂过程类似两次连续的有丝分裂过程,减数分裂 I 末期在纺锤体中间形成了成膜体,其中的小泡融合构成细胞板,其扩展后形成细胞壁,分割两个细胞核,产生二分体后开始减数分裂 II。这种小孢子发生类型被称为连续型(successive type)。另一种是小孢子母细胞在减数分裂 I 结束时不形成新的细胞壁,而是形成一个二核细胞。在减数分裂 II 末期同时形成细胞壁,将四个细胞核分割成四分体小孢子。这种小孢子发生类型不形成二分体,四分体同时形成,被称为同时型(simultaneous type)。大多数单子叶植物属于前者;而大多数双子叶植物属于后者。被子植物小孢子发生的两种类型是植物有性生殖研究中的一个有趣的问题,但由于目前研究手段的局限性,对这两种类型的调控机制还很少研究,只有有一些微管骨架的研究。在连续型小孢子发生中,减数分裂末期的纺锤体赤道板处形成了由许多微管和

小泡组成的成膜体。成膜体的形成是胞质分裂的基础,这与体细胞的有丝分裂一样^[16]。Shamina 等^[17]研究了几种单子叶植物减数分裂 I 末期成膜体的形成过程,发现组成纺锤体的中部微管和一些新形成的微管向赤道板部位集中,形成了成膜体,构成了连续型小孢子发生的胞质分裂基础,产生了二分体。然而,对于大多数双子叶植物的同时型小孢子发生则没有成膜体的形成,减数分裂 I 结束后两个核之间不形成细胞壁。在这类小孢子发生的微管研究中, Brown 和 Lemmon^[13]认为细胞核表面的放射状微管在细胞质中具有分区的作用。减数分裂前,小孢子母细胞核表面的放射状微管在整个细胞质中只构成一个区域。在核减数分裂 I 末期,纺锤体中没有形成成膜体,其微管从赤道板部位断裂,重新又集中到两个子核的表面,呈放射状分布,以两个细胞核为中心在同一细胞质中组成两个区域。在减数分裂 II 末期,同一细胞质中的两个纺锤体依然没有形成成膜体,微管又集中到四个核的表面,呈放射状分布,在共同细胞质中组成了以核为中心的四个区域。然而,到目前为止,在同时型小孢子发生类型中,其细胞质分裂的调控机制研究还是空白。在本实验中,烟草小孢子母细胞在减数分裂末期纺锤体微管没有形成成膜体,不发生胞质分裂。直到减数分裂 II 结束时才通过细胞缢缩方式进行胞质分裂。在缢缩沟顶端的细胞质中,微管没有特异性的聚集,暗示着胞质分裂过程与微管没有直接关系。这就提出了两个问题: 1) 高等植物中小孢子母细胞减数分裂中同时型和连续性差异的关键是成膜体的形成,产生成膜体微管将进行连续的细胞分裂,不生成膜体微管将进行同时的细胞分裂,调控成膜体微管形成的机制是什么? 2) 在具有同时型的小孢子发生植物中,胞质分裂可能与微管无直接关系,其质膜收缩沟是否像在动物细胞分裂中由微丝调控^[18]? 这些都值得深入研究。

参考文献(References)

- 1 Derksen J, Wilms FHA, Pierson ES. The plant cytoskeleton: its significance in plant development. *Acta Bot Neerl* 1990; 39: 1-18.
- 2 Tanaka I, Wakabayashi T. Organization of actin and microtubule cytoskeleton proceeding pollen germination. *Planta* 1992; 186: 473-82.
- 3 Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y. Cytoskeletal elements, cell shaping and movement in the angiosperm pollen tube. *J Cell Sci* 1988; 91: 49-60.
- 4 Steer MW, Steer MJ. Pollen tube tip growth. *New Phytol* 1989; 111: 323-58.

- 5 Lancelle SA, Hepler PK. Association of actin with cortical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. *Protoplasma* 1991; 165: 167-72.
- 6 Pierson ES, Cresti M. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *Int Rev Cytol* 1992; 140: 73-125.
- 7 Cai G, Moscatelli A, Cresti M. Cytoskeleton organization and pollen tube growth. *Trends Plants Sci* 1997; 2 (3): 86-91.
- 8 Huang BQ, Russell SD. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: Cytoskeletal modification in the embryo sac during synergid degeneration. *Planta* 1994; 194: 200-14.
- 9 Huang BQ, Fu Y, Zee SY, Hepler PK. Three-dimensional organization and dynamic changes of the actin cytoskeleton in embryo sacs of *Zea mays* and *Torenia fournieri*. *Protoplasma* 1999; 209: 105-19.
- 10 Fu Y, Yuan M, Huang BQ, Yang HY, Zee SY, O'Brien TP. Changes in actin organization in the living egg apparatus cells of *Torenia fournieri* during fertilization. *Sex Plant Reprod* 2000; 12: 315-22.
- 11 Webb MC, Gunning BES. The microtubular cytoskeleton during development of the zygote, proembryo and free-nuclear endosperm in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 1991; 184: 187-95.
- 12 Brown RC, Lemmon BE. Pollen development in orchids I. cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. *Protoplasma* 1991; 163: 9-18.
- 13 Brown RC, Lemmon BE. Nuclear cytoplasmic domains, microtubules and organelles in microsporocytes of the slipper orchid *Cypripedium californicum* A. Gray dividing by simultaneous cytokinesis. *Sex Plant Reprod* 1996; 9: 145-52.
- 14 Shamina NV. Formation of division spindles in higher plant meiosis. *Cell Biol Inter* 2005; 29: 307-18.
- 15 张正海, 康向阳, 刘明虎, 段乌拉. 小胡杨小孢子发生及微管骨架变化. *北京林业大学学报* 2008; 30(6): 36-40.
- 16 Heese M, Mayer U, Jürgens G. Cytokinesis in flowering plants: cellular process and developmental integration. *Curr Opin Plant Biol* 1998; 1: 486-91.
- 17 Shamina NV, Gordeeva EI, Kovaleva NM, Serukova EG, Dorogova NV. Formation and function of phragmoplast during successive cytokinesis stages in higher plant meiosis. *Cell Biol Inter* 2007; 31: 626-35.
- 18 Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 651-8.

Microtubule Distribution and Change during Meiosis of Microspore Mother Cells of *Nicotiana tabacum* L.

Ya-Ying Wang¹, Ya-Nan Zhang², Hong-Yi Wang³, Shi-Ming Lin³, Hui-Qiao Tian^{2*}

(¹Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China; ²School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ³Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Inspection and Quarantine Technology Center, Xiamen 361026, China)

Abstract The organization of microtubule cytoskeleton during tobacco microsporogenesis was observed. At the prophase of meiosis I of microspore mother cell (MMC), the microtubules in the cell are short and dispersive in cytoplasm. At the metaphase of meiosis I, the microtubules in the cell set up a spindle which makes chromosomes move at equatorial plate. When MMCs enter the anaphase of meiosis I, the spindle microtubules break. At the metaphase of meiosis II, the microtubules form two spindles in the same cytoplasm. In the telophase of meiosis II, spindle microtubules depolymerize and change from short segment to tubulin. Then the MMC begins to cytokinesis by cytoplasmic constriction to form contractile furrows, which separate four nuclei into four microspores. There was not evidence to show that microtubules participate in the cytokinesis directly.

Key words *Nicotiana tabacum* L.; meiosis; microtubule

Received: September 9, 2010

Accepted: November 4, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30970275)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2186486, E-mail: hqtian@xmu.edu.cn