

烟草大孢子退化的超微结构观察

林美珍 葛丽丽¹ 田惠桥^{1*}(漳州卫生职业学院药理学系, 漳州 363000; ¹ 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要 烟草仅合点端的一个大孢子可发育成雌配子体, 珠孔端的其余3个大孢子都退化。在大孢子母细胞减数I, 多数细胞器聚集在细胞珠孔端, 而细胞合点端的细胞器较少。减数分裂完成后由二分体珠孔端细胞形成的两个大孢子率先同时退化, 而由二分体合点端细胞形成的第三个大孢子退化较晚, 显示与前两个大孢子的退化有时间和空间上的差异。

关键词 烟草; 减数分裂; 大孢子退化

高等植物有性生殖过程中, 大约有80%的被子植物大孢子母细胞经过减数分裂后形成4个单倍体大孢子, 其中只有合点端的一个大孢子能够继续发育形成雌配子体, 其他3个则退化^[1,2]。功能大孢子的发育和其他3个大孢子的退化是一个有趣的问题。尽管曾有一些关于大孢子发生形态的报道, 但是功能大孢子的发育和3个大孢子退化的具体机制仍然未知。由于这一过程发生在胚珠发育早期, 位于胚珠的深处, 目前对这一问题还没有很好的研究方法, 主要采用切片进行结构观察^[3,4], 进而推测其功能变化。理解清楚大孢子发生过程是研究其调控机制的基础。以前曾对几种高等植物的大孢子发生过程做过超微结构观察, 但不同植物种类中大孢子发生过程有很大差异。本研究对烟草大孢子发生过程进行了超微结构观察, 为深入研究烟草雌配子体发生规律提供信息。

1 材料与方法

实验材料为种植在厦门大学生命科学学院植物园的烟草品种大青叶(*Nicotiana tabacum* L. cv. Da Qing Ye)。先取不同长度的烟草花中的胚珠做石蜡切片观察, 以确定其外部形态特征与内部发育时期的对应关系, 筛选处于大孢子母细胞减数分裂时期的花外部形态特征。然后根据此相应的花外部形态特征, 取其减数分裂时期的胚珠迅速投入到用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)配置的2.5%戊二醛预固定液中, 在室温下固定3 h。然后用0.1 mol/L磷酸缓冲液换洗3次, 每次30 min。最后将胚珠转入到用0.1 mol/L磷酸缓冲液配置的1%锇酸后固定液中在4℃下固定过夜。约100个固定的胚珠用系列梯度丙酮脱水, Spurr树脂包埋。最后, 约20个包埋的胚珠用

Ultracutor超薄切片机进行超薄切片, 厚度为100 nm。切片经醋酸双氧铀染色30 min, 清洗晾干后用JEM-2100透射电子显微镜观察和拍照。

2 结果

烟草胚珠为倒生, 其雌配子体发育属于蓼型。由靠近珠孔端的一个珠心细胞发育为孢原细胞, 孢原细胞经过分化, 由楔形变为椭圆形, 形成大孢子母细胞。减数分裂之前的大孢子母细胞体积明显大于周围珠心表皮细胞, 细胞核位于中央。在其细胞质中分布有较多的小液泡和细胞器, 其细胞壁也没有呈现出特殊的结构。在大孢子母细胞外部仅有一层珠心表皮细胞, 整个胚珠和大孢子母细胞的轮廓清楚(图1A)。在高倍镜下观察, 大孢子母细胞及其周围的珠心细胞均含有较多的线粒体和质体, 质体的电子密度比线粒体深, 少数质体为杯状。在大孢子母细胞合点端的细胞质中质体较多(图1B), 而在珠孔端, 质体较少(图1C), 大孢子母细胞中的细胞器分布没有明显的差异。随着大孢子母细胞发育, 开始观察到这种细胞器极性分布的现象: 在大孢子母细胞的减数分裂I后期, 两组染色体已移动到细胞的合点端和珠孔端, 细胞中部的细胞器很少, 也都迁移到细胞的两极(图1D)。在高倍镜下观察, 大孢子母细胞的合点端细胞质中依然含有较多的质体(图1E), 而在其珠孔端的则较少(图1F), 呈现出极性分布。此时, 大孢子母细胞的细胞壁也发生变化即形成了局部加厚、电子密度低的透明层, 很可能是大孢子母细胞特有的胼胝质壁。

收稿日期: 2009-04-07 接受日期: 2009-06-23

国家自然科学基金资助项目(No.30670126)

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

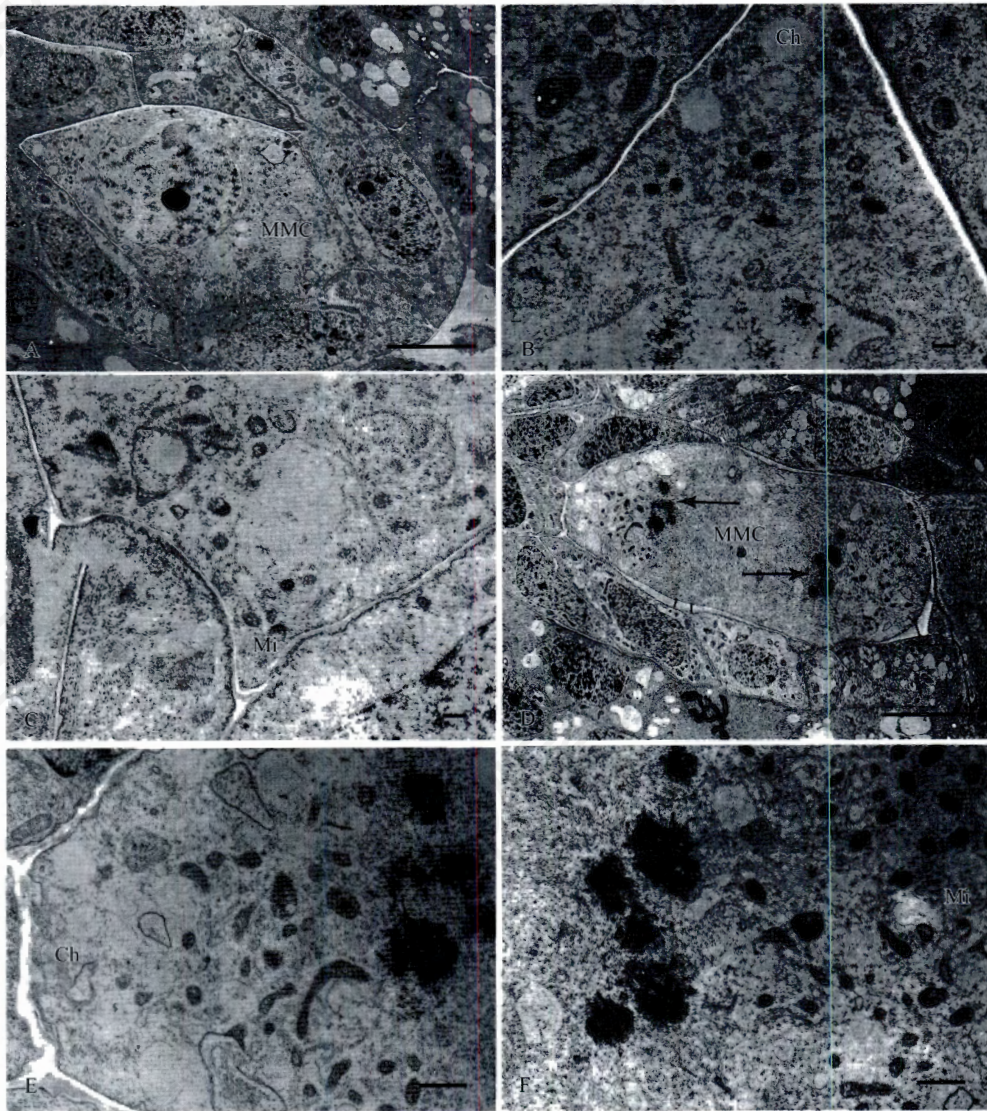


Fig.1 Meiosis of the megaspore mother cell (MMC)

A: a MMC in an ovule. Bar=10 μm ; B: enlargement of (A), showing the organelle distribution in the chalazal end (Ch) of MMC. Bar=1 μm ; C: enlargement of (A), showing the organelle distribution in the micropylar end (Mi) of MMC. Bar=1 μm ; D: a MMC in the anaphase I of MMC meiosis, most organelles and chromosomes (arrows) display bipolar distribution. Bar=10 μm ; E: enlargement of (D), showing less organelle accumulated in the chalazal end (Ch) of MMC. Bar=1 μm ; F: enlargement of (D), showing more organelle accumulated in the micropylar end (Mi) of MMC. Bar=1 μm .

大孢子减数分裂 I 完成后, 中间形成一横壁, 产生由两个细胞组成的二分体(图 2A)。原来在大孢子母细胞中央部位的细胞器很少(图 1D), 但形成二分体后, 在分割二分体的横壁附近又出现了较多的细胞器, 尤其是质体。在二分体的两个细胞中, 细胞器的数量差异依然保留, 珠孔端的二分体细胞中仍含有较多的细胞器, 合点端的二分体细胞中则含较少的细胞器(图 2B)。

大孢子母细胞减数分裂 II 完成后, 产生由 4 个细胞组成的大孢子四分体(图 2C)。四分体的 4 个细胞

沿胚珠纵轴呈线性排列, 4 个细胞的体积差异明显。通过对多个四分体的形态进行连续切片分析发现四分体的 4 个细胞排列实际呈“S”型排列, 4 个细胞很难切在同一平面上, 即使 4 个细胞都切在同一片面上, 也很难反映出细胞的真实体积大小。

大孢子四分体珠孔端的两个大孢子系由二分体珠孔端的细胞分裂产生。而合点端的两个大孢子系由二分体合点端的细胞分裂产生, 二分体两个细胞之间在细胞器数量上的差异也影响到四分体中大孢子的退化, 表现为珠孔端同一来源的两个大孢子先开始

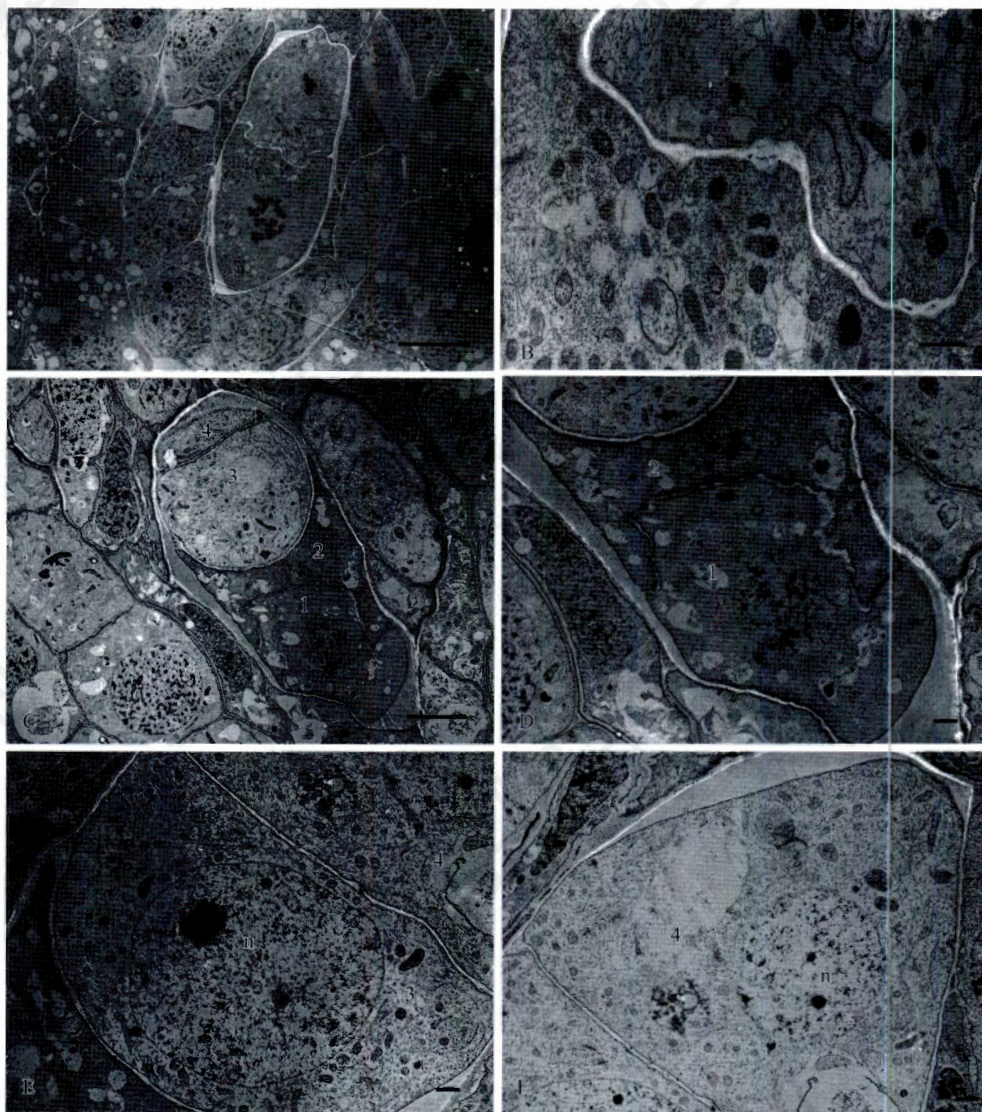


Fig.2 Formation of the megaspore dayd and the megaspore tetrad in an ovule

A: a dayd in an ovule. Bar=10 μm ; B: enlargement of (A), more organelles accumulate in the micropylar cell of the dyad than in the chalazal cell. Bar=1 μm ; C: a megaspore tetrad in an ovule, number represents position of four megaspores. Bar=5 μm ; D: two megaspores in micropylar end displayed higher electron density than the other two megaspores, number represents position of four megaspores. n: nucleus. Bar=1 μm ; E: the third megaspore (3) contained more organelles than the fourth one (4), but it did not show degeneration at this time. n: nucleus. Bar=1 μm ; F: the chalazal-most megaspore (functional megaspore, 4) contained less organelles and lower electron density than the third one. n: nucleus. Bar=1 μm .

退化。最先出现的差异是两个大孢子细胞质电子密度增加,比合点端的两个大孢子的高,使其易于识别(图2C)。除了细胞质电子密度增加外,这两个将要退化的大孢子细胞核中,染色质开始聚集成染色较深的团块,两个细胞之间的细胞壁也显得不规则(图2D)。而合点端的两个大孢子的电子密度较低,细胞核中染色质也没有凝聚成团,尤其是以后要退化的第3个大孢子(图2E)与最靠合点端的第4个大孢子(图2F)之间此时结构相似,细胞中都含有丰富的细胞器,两个大孢子之间的细胞壁比较规则。但两个细胞之

间也出现了一些细微的差异:第3个大孢子中则没有明显的小液泡(图2E),而最靠合点端的第4个大孢子,即将来的功能大孢子中出现了一些小液泡(图2F)。

当珠孔端的两个大孢子明显退化后,相邻的第3个大孢子与第4个大孢子之间也开始出现了形态上的差异:由于第4个大孢子中的液泡较大较多,其体积比第3个大孢子明显大,而第3个大孢子的电子密度比第4个大孢子的高,使两个细胞在形态和结构上出现差异。此外,这两个大孢子的细胞核结构也开始不同,在第4个大孢子的细胞核中染色质仍呈分散

状态,而将要退化的第3个大孢子的细胞核中开始出现了明显的染色质凝聚现象(图3A、图3B)。这些结构差异预示着第3个大孢子开始退化。当功能大孢子的细胞核分裂形成二核胚囊后,第一和第二退化大孢子已基本消失,同时第三个退化大孢子也只有—些电子密度很高的细胞残迹。二核胚囊的两个细胞核最初相距较近,位于细胞中央。在胚囊的两端有两个较大的液泡(图3C)。在多个胚囊中都发现二核胚囊中部的横壁向内突入生长,似有将胚囊切割为两

个细胞的倾向(图3D)。随着二核胚囊的进一步发育,大液泡移动到胚囊中央,而将两个细胞核挤到胚囊的两端(图3E),在其细胞质中,不完全横壁的依然存在,但其顶端并未与胚囊壁相连(图3F)。

3 讨论

被子植物大孢子母细胞减数分裂形成的4个大孢子在参与形成雌配子体时依植物种类不同有呈现不同,有些植物的4个大孢子(核)共同组成雌配子体;

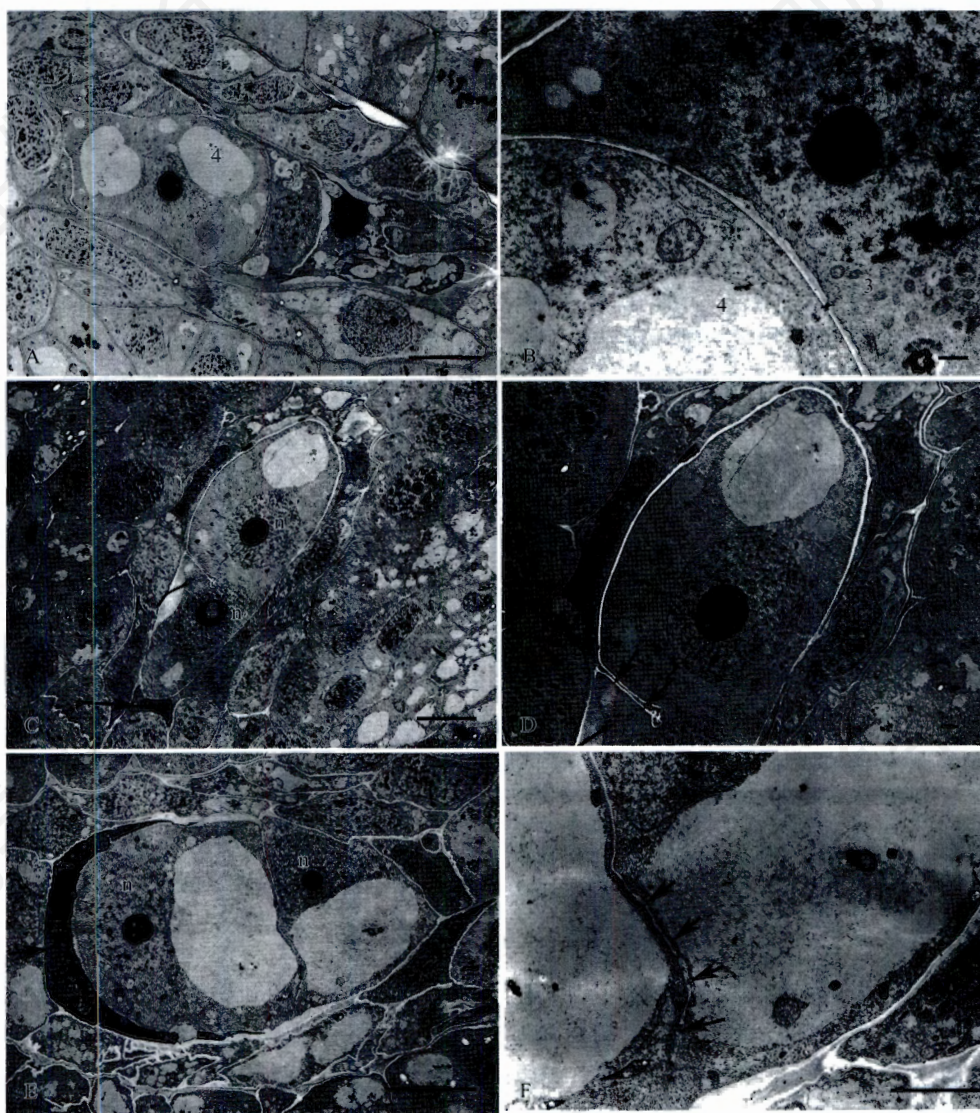


Fig.3 Formation of the functional megaspore

A: when two micropylar megaspores degenerated, the third one increased its electron density, which is a sign of degeneration. Number represents position of four megaspores. Bar=10 μ m; B: enlargement of (A), the third megaspore (3) displayed the chromatin condensing, and more organelles than the fourth one (4). Bar=1 μ m; C: a binuclear embryo sac. Arrow shows the remnant of third degenerative megaspore. n: nucleus. Bar=10 μ m; D: enlargement of (C), showing an incomplete cell wall in the middle part of the sac (arrows). Bar=1 μ m; E: another binuclear embryo sac. Arrow shows the remnant of third degenerative megaspore. n: nucleus. Bar=10 μ m; F: enlargement of (E), showing an incomplete cell wall in the middle part of the sac (arrows). Bar=1 μ m.

有些植物的2个大孢子(核)组成雌配子体, 另外两个退化; 而大多数植物只有一个大孢子形成雌配子体, 另外3个退化。由于4个大孢子是减数分裂的产物, 4者之间的遗传基础可能是不同的。此外, 在每种类型中又有一些区别, 如在大多数植物单孢子型胚囊中, 由合点端的1个大孢子发育为雌配子体, 珠孔端的3个退化(蓼型)。少数植物是由珠孔端的1个大孢子发育为雌配子体, 而合点端的3个退化(待宵草型)^[5]。不同雌配子体的发育类型也是一种植物有性生殖多样性的反映。在莨苳四分体中, 珠孔端的3个大孢子依次逐个退化^[6]。而在本研究中, 烟草减数分裂产生的四分体中, 珠孔端的2个大孢子先同时退化。当这2个大孢子完全退化后, 珠孔端起的第三个大孢子才出现退化迹象。显然, 烟草4个大孢子的命运在二分体时就已预定。二分体合点端的细胞与珠孔端的细胞在细胞结构和生理功能上可能存在差异, 从而导致减数分裂II后, 珠孔端2个大孢子率先同时退化。而第三个大孢子来源于二分体的另一个细胞, 它的退化则稍晚发生。烟草中3个退化的大孢子可能具有不同的诱导机制。

二分体2个细胞的命运则与减数分裂I的细胞器极性分布有关。在减数分裂之前, 大孢子母细胞中的细胞器的分布没有明显差异。但到大孢子减数分裂I中期时, 细胞器的分布显示出明显的极性, 珠孔端的细胞器明显多于合点端, 这种细胞器极性分布可能使两个子细胞的命运不同。这种细胞器分布差异也是减数分裂产生4个大孢子过程中最早出现的差异特征。

在植物有性生殖过程当中, 在多个特定的发育时期和特定部位都有细胞中途夭折现象。过去将这些器官发育过程中的细胞中途夭折现象统称为退化。如在胚珠内, 早就发现为了给雌配子体的扩张提供足够的空间, 胚囊周围的珠心细胞在不断退化^[7]。目前对植物有性生殖过程中这些细胞退化现象已经用细

胞程序性死亡的观点和思路进行研究^[8,9]。雌配子体形成时的大孢子退化也是一种细胞程序性死亡^[10]。最近, 在莨苳中首次发现钙离子与大孢子退化有关, 珠孔端第一个大孢子在结构显示退化之前, 其细胞中的钙沉淀颗粒减少。然后, 即将开始退化的第二个大孢子中的钙沉淀颗粒也明显减少, 而第三和第四个大孢子中则有较多的钙沉淀颗粒。当第三个大孢子开始显示结构退化之前, 细胞中的钙颗粒也明显减少。而合点端的功能大孢子中一直含有较多的钙沉淀颗粒, 表现为退化大孢子细胞中的钙水平降低可能启动了细胞程序性死亡^[6]。烟草胚囊虽然也是蓼型, 但其3个大孢子的退化过程与莨苳不同, 其调控机制可能也不同, 值得深入研究。

参考文献(References)

- [1] Maheshwari P. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*, New York: McGraw-Hill Book Co. Inc, 1950, 84-153
- [2] Haig D. New perspectives on the angiosperm female gametophyte, *Bot Rev*, 1990, 56(3): 236-274
- [3] Schulz P, Jensen WA. Prefertilization ovule development in *Capsella*: the dyad, tetrad, developing megaspore, and two nucleate gametophyte, *Can J Bot*, 1986, 64(4): 875-884
- [4] Webb MC, Gunning BES. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. I. Megasporogenesis, including the microtubular cytoskeleton, *Sex Plant Reprod*, 1990, 3(4): 244-256
- [5] 胡适宜. 被子植物生殖生物学, 北京: 高等教育出版社, 2005, 107-117
- [6] 邱义兰, 刘如石, 谢潮添, 等. 莨苳大孢子发生过程中钙的分布动态, *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(4): 374-382
- [7] Russell SD. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*, *Can J Bot*, 1979, 57(2):1093-1110
- [8] Wu HW, Cheung AY. Programmed cell death in plant reproduction, *Plant Mol Biol*, 2000, 44(3): 267-281
- [9] 田惠桥. 被子植物有性生殖过程中的细胞程序死亡, *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(3): 161-168
- [10] Bell PR. Megaspore abortion: a consequence of selective apoptosis?, *Intl J Plant Sci*, 1996, 157(1): 1-7

The Ultrastructural Observation on Megaspore Degeneration of Tobacco

Mei-Zhen Lin, Li-Li Ge¹, Hui-Qiao Tian^{1*}

(Department of Pharmacy, Zhangzhou Medical Vocational College, Zhangzhou 363000, China;

¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Three megaspores of a tetrad of tobacco will degenerate after meiosis of megaspore mother cell and only chalazal-most one develops. In meiosis I, more organelles of the megaspore mother cell move toward the micropylar end and while fewer toward the chalazal end. After meiosis, a tetrad of four megaspores is formed. Then the two micropylar megaspores, which come from the micropylar cell of the dyad, degenerate first. Afterwards, the third megaspore, which comes from the chalazal cell of the dyad, begins to degenerate, suggesting a temporal and spatial degenerative difference with the former two.

Key words megaspore degeneration; meiosis; tobacco

Received: April 7, 2009 Accepted: June 23, 2009

This work was supported by the National Science Foundation of China (No.30670126)

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