鹤顶兰珠心细胞程序性死亡的超微结构研究

李冬妹1 何梦玲2 梁承邺3 叶秀粦3*

('顺德职业技术学院,佛山 528300; 2广东药学院中药学院,广州 510006; 3中国科学院华南植物园,广州 510650)

摘要 应用电子显微镜对鹤顶兰(Phaius tankervilliae (Aiton) Bl.)珠心细胞进行了观察,结果 发现,珠心细胞程序死亡(programmed cell death, PCD)过程中伴随着液泡破裂、染色质凝聚、细胞 质解体等明显特征。在鹤顶兰功能大孢子形成之前,大孢子母细胞的侧细胞壁存在明显的内突。 随着胚囊体积的逐渐增大,衰退珠心细胞残留的细胞壁叠合在一起,从而使胚囊壁不断加厚。胚囊 成熟前,合点端珠心细胞与胚囊之间有胞间连丝相连。合点端珠心细胞的细胞质状态,特别是液泡 形态与大孢子母细胞、功能大孢子、成熟胚囊时期的细胞状态高度相似。结果表明,衰退的珠心 细胞不仅为胚囊的扩大提供空间,同时也为胚囊的发育提供营养,合点端珠心细胞对胚囊发育内环 境的稳定性起着重要的屏障作用。

关键词 鹤顶兰; 珠心细胞; 程序死亡; 胚囊发育; 超微结构

Ultrastructural Observations of Programmed Cell Death of the Nucellar Cells in *Phaius tankervilliae* (Aiton) Bl.

Li Dongmei¹, He Mengling², Liang Chengye³, Ye Xiulin^{3*}

(¹Shunde Polytechnic, Foshan 528300, China; ²School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; ³South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract Nucellar cells in *Phaius tankervilliae* (Aiton) Bl. were observed under transmission electron microscope. Some distinct characteristics were found during the programmed cell death (PCD) of nucellar cells in *P. tankervilliae*, such as the vacuole splinter, demonstrating the chromatin condensation and cytoplasm disorganization. Many protuberances were present at the megasporocyte cell wall adjacent to the lateral nucellar cells before the formation of the functional megaspore. With the enlargement of the embryo sac, the thickening embryo wall became visible due to the superposition of the vestigial nucellar cell wall. Before maturation of embryo sac, the plasmodesmata connected nucellar cells and embryo sac at the chalazal end. The state of chalazal nucellar cell cytoplasm, especially the morphology of vacuole, was highly similar to that of megasporocyte cell, the functional megaspore and mature embryo sac. The results showed that nucellar cells played important roles in embryo sac development, and PCD of nucellar cells offers space and nutrition to the enlarged embryo. At the same time, the nucellar cell at the chalaza end make a stable interior condition for embryo sac development.

Key words *Phaius tankervilliae* (Aiton) Bl.; nucellar cell; the programmed cell death (PCD); embryo sac development; ultrastructure

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31370365)

*Corresponding author. Tel: +86-20-83835652 , E-mail: xlye@scib.ac.cn

收稿日期: 2014-04-14 接受日期: 2014-07-28

国家自然科学基金(批准号: 31370365)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 020-83835652, E-mail: xlye@scib.ac.cn

Received: April 14, 2014 Accepted: July 28, 2014

网络出版时间: 2014-10-16 13:13 URL: http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0128.html

珠心通常被认为是暂时性的组织,一直没有引起植物学家足够的关注,因此关于珠心细胞的研究 报道并不多见。目前珠心细胞的研究^[1-3]也主要局限 于从细胞程序死亡(programmed cell death, PCD)的 角度研究珠心细胞衰亡。通常认为,珠心细胞在胚 囊(雌配子体)形成及受精后胚和胚乳发育过程中逐 渐被侵蚀,最后大多数被子植物的珠心组织完全消 失或只剩下一些残迹。

我们在对鹤顶兰(Phaius tankervilliae (Aiton) Bl.)胚囊发育和受精作用进行研究时发现,珠心细胞 与胚囊发育存在明显的相关性。观察不同发育时期 珠心细胞的变化或许可以更好地从结构与功能的角 度理解珠心细胞PCD的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为中国科学院华南植物园兰花实验 温室栽培的鹤顶兰开花植株,2011年3月中旬~5月中 旬, 于花开次日上午9:00前后进行人工授粉, 保留每 个花葶授基部的2朵花, 剪除花葶的其余部分, 每天 授粉3个花葶。连续40 d依次选取合适的开花植株 进行人工授粉, 授粉后第50 d即可获得发育10~50 d 的子房。

1.2 方法

采集发育正常的子房,取子房中部的胚珠,在 2%戊二醛(0.1 mol/L磷酸缓冲液,pH6.8)室温下抽气 固定4 h, 0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗,再用1%的锇酸 4 °C固定12 h。梯度乙醇脱水,环氧丙烷过渡,Epon-812包埋。先用玻璃刀作半薄切片(厚度2 μm),光学 显微镜下观察确定位置,再用钻石刀超薄切片(厚度 80 nm),铜网收集,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染,日 本电子公司JEM-1010透射电镜观察并照相,加速电 压为100 kV。

2 结果

鹤顶兰珠心细胞直接由孢原细胞外边的表皮



所有图片均珠孔端朝下。A: 大孢子母细胞早期, 侧珠心细胞及合点端珠心细胞有明显液泡; B: 继续发育的大孢子母细胞, 侧珠心细胞液泡破裂, 染色质凝聚; C: 图B方框部分放大, 箭头示合点端珠心细胞与大孢子母细胞间的细胞壁突起; D: 即将进行分裂的大孢子母细胞, 核膜已解体。侧珠心细胞衰退明显, 合点端珠心细胞液泡消失; E: 图D方框1部分放大, 示细胞壁突起; F: 图D方框2部分放大, 示胞间连丝和细胞壁突起。Gc: 高尔基体; Mp: 大孢子母细胞; Nu: 细胞核; Nc: 珠心细胞; V: 液泡。

The micropyle faces downwards in all figures. A: at early megasporocyte stage, vacuoles are visible in nucellar cells; B: at developing megasporocyte stage, vacuole splinter and condensation of the chromatin in the lateral nucellar cells can be seen; C: higher magnification of the square in B showing protuberances at the cell wall between the megasporocyte and the nucellar cell at the chalaza end; D: before megasporocyte undergoing meiosis, the karyotheca is disorganizing. The lateral nucellar cells are obviously obsolescent with no obvious vacuole in the nucellar cell at the chalaza end; E: higher magnification of square 1 in D showing protuberances at the cell wall; F: higher magnification of square 2 in D showing protuberances at the cell wall between the megasporocyte and the nucellar cell at the chalaza end. Gc: golgi complex; Mp: megasporocyte; Nu: nucleus; Nc: nucellar cell; V: vacuole.

图1 大孢子母细胞时期 Fig.1 The stage of megasporocyte 细胞发育而成, 孢原细胞直接发育为大孢子母细胞, 随着大孢子母细胞的发育, 位于两侧的珠心细胞和 合点端珠心细胞也在发生相应的变化。

2.1 大孢子母细胞时期

大孢子母细胞发育早期,位于两侧珠心细胞和 合点端珠心细胞的结构完整,可见明显的细胞核和 液泡(图1A),其中一侧珠心细胞液泡化明显。合点 端珠心细胞细胞核体积大,核膜完整,有一明显的液 泡。

随着大孢子母细胞的生长, 侧珠心细胞呈长条 形, 开始出现衰退现象。衰退的珠心细胞靠近大孢 子母细胞一侧的细胞壁松解, 未见明显大液泡, 细胞 核的形状变得不规则, 核物质占据侧珠心细胞的大 部分体积(图1B)。合点端珠心细胞未见明显变化, 但其液泡体积与大孢子母细胞内的液泡体积都有明 显变小。合点端珠心细胞与大孢子母细胞有胞间连 丝连通(图1C)。

大孢子母细胞继续生长,侧珠心细胞进一步衰退,合点端珠心细胞的液泡与大孢子母细胞的液泡

消失(图1D)。大孢子母细胞与侧珠心细胞相邻的细胞壁上可见明显的内突(图1E)。此时,侧珠心细胞的细胞质明显减少,线粒体内嵴减少甚至消失,但仍可见完整结构的高尔基体。合点端珠心细胞与大孢子母细胞有丰富的胞间连丝连通(图1F)。

2.2 功能大孢子时期

鹤顶兰大孢子母细胞经过减数分裂(图2A),形成直线排列的4个大孢子,其中珠孔端的3个大孢子 解体,合点端的一个大孢子发育成为功能大孢子(图 2B)。减数分裂过程中,侧珠心细胞衰退加剧,细胞 器基本解体,核膜开始解体,在个别液泡中可见有大 块的细胞质。合点端珠心细胞中可见丰富的线粒体 和油质体,油质体中可见明显的油滴,液泡中也有已 降解的细胞器(图2C)。

形成功能大孢子时,不同位置的侧珠心细胞衰 退的速度呈现出较明显的个体差异,近珠孔端有一 侧的珠心细胞几乎完全衰退,而对应位置另一侧的 珠心细胞呈絮状的细胞质里仍可见质体、内质网等 细胞器(图2D)。合点端珠心细胞有一明显大液泡,



A: 第一次减数分裂后期, 染色体移向细胞两端, 可见衰退得仅剩细胞壁的侧珠心细胞; B: 功能大孢子, 靠珠孔位置的大孢子正在解体; C: 图A方 框部分放大, 可见合点端珠心细胞内丰富的细胞器; D: 图B方框1部分放大, 示功能大孢子细胞壁内突; E: 图B方框2部分放大, 示合点端珠心细 胞与功能大孢子的胞间连丝。 Ep: 油质体; Fm: 功能大孢子; Mit: 线粒体; Nu: 细胞核; Nc: 珠心细胞; V: 液泡。

A: the stage of meiosis I in which the chromosomes move to opposite ends of the nuclear spindle. Some nucellar cells are not visible except for the cell wall; B: functional megaspore. The micropyle end megasporocytes are degenerating; C: higher magnification of square in A, many organelles are visible at the nucellar cell at the chalaza end; D: higher magnification of square 1 in B showing the protuberances at the functional megaspore cell wall; E: higher magnification of square 2 in B showing the plasmodesmata between the functional megaspore and the nucellar cell at the chalaza end. Ep: elaioplast; Fm: functional megaspore; Mit: mitochondrion; Nu: nucleus; Nc: nucellar cell; V: vacuole.

图2 功能大孢子时期 Fig.2 The stage of functional megaspore



A:功能大孢子第一次有丝分裂后期; B: 图A方框部分放大, 箭头所指为逐渐加厚的胚囊壁; C: 功能大孢子第一次有丝分裂后期的合点端珠心细胞, 液泡内可见紊状物; D: 四核胚囊; E: 图D方框1部分放大, 示衰退珠心细胞残留的细胞壁叠合在一起, 使胚囊壁不断加厚; F: 图D方框2部分放大, 箭头所指为胞间连丝; G: 成熟胚囊, 合点端可见形状清晰的三个反足细胞; H: 图G方框1部分放大, 示衰退的侧珠心细胞; I: 图G方框2部分放大, 示衰退的合点端珠心细胞, 箭头所指为位于另一合点端珠心细胞上的壁突起。Ac: 反足细胞; Ew: 胚囊壁; Nu: 细胞核; Nc: 珠心细胞; V: 液泡。

A: functional megaspore at the first mitotic division anaphase; B: higher magnification of square in A. Arrowheads show the thickening embryo wall; C: the nucellar cell at the chalaza end when functional megaspore is in the first mitotic division anaphase, and there are some membrane structures in the vacuole; D: 4-nucleate embryo sac; E: higher magnification of square 1 in D showing the thickening embryo wall for the vestige nucellar cell wall; F: higher magnification of square 2 in D showing the plasmodesmata; G: mature embryo sac. Three antipodal cells are located at the chalazal end; H: higher magnification of square 1 in G showing the degenerative lateral nucellar cells; I: higher magnification of square 2 in G showing the degenerative nucellar cell at the chalaza end, and arrowheads show the cell wall protuberances in another nucellar cell at the chalaza end. Ac: antipodal cell; Ew: embryo sac wall; Nu: nucleus; Nc: nucellar cell; V: vacuole.

图3 胚囊发育时期 Fig.3 The stage of embryo sac development

液泡内可见自噬泡和絮状物。功能大孢子与侧珠心 细胞、合点端珠心细胞之间均有丰富的胞间连丝连 接(图2D和图2E),功能大孢子的侧壁明显厚于横向 细胞壁(图2E)。

2.3 胚囊发育时期

功能大孢子第一次有丝分裂后期, 近珠孔端两侧的珠心细胞均已明显衰退, 其中一个珠心细胞仅剩不完整的细胞壁和少许降解碎片(图3A), 同侧另一珠心细胞核膜开始解体, 但仍可见结构完整的内质网、线粒体(图3B)。合点端珠心细胞与功能大孢子时期相似, 有一明显大液泡, 液泡内可见絮状物(图3C)。

四核胚囊(图3D)阶段的侧珠心细胞细胞质基本

消失, 细胞壁膨胀。衰退珠心细胞残留的细胞壁叠 合在一起, 胚囊壁增厚(图3E)。合点端珠心细胞液 泡体积变小, 液泡内可见絮状物, 合点端珠心细胞与 胚囊之间仍有胞间连丝相连(图3F)。成熟胚囊时期 (图3G)近珠孔端的珠心细胞成长条形, 切向壁与向 外突出呈弧形的胚囊壁相叠合, 细胞壁纤维素微纤 丝松解(图3H), 合点端紧邻胚囊的珠心细胞大液泡 消失, 细胞器基本解体。此时, 胚囊未见有胞间连丝 与外界相连, 但紧邻衰退的合点端珠心细胞的正常 珠心细胞壁上有明显突起(图3I)。

3 讨论

Gunawardena^[4]根据PCD诱导因素的不同将

PCD分为发育性细胞死亡和环境因素诱导的细胞死 亡。鹤顶兰胚囊发育过程中珠心细胞的PCD显然属 于发育性细胞死亡,且不同位置珠心细胞的衰退速 度呈现出较明显的个体差异。

PCD在植物的生长发育过程中起着重要作用^[5]。 鹤顶兰胚囊发育过程中侧珠心细胞发生衰退,随着 功能大孢子体积的逐渐增大,残留的细胞壁叠合在 一起,从而使胚囊壁不断加厚,这一现象与水稻相 似^[6]。贺新强等^[5]认为,许多植物的PCD过程与细胞 内Ca²⁺水平的升高有密切的关系。我们在鹤顶兰胚 囊发育过程中Ca²⁺分布的超微细胞化学定位研究中 也发现,解体珠心细胞液泡内密集着Ca²⁺,但关于鹤 顶兰珠心细胞PCD发生的机制我们认为有必要进行 更深入的研究^[7]。胚囊发育作为生殖生长的中心部 位,其体积扩大对珠心细胞造成的压力是否是珠心 细胞PCD的诱因之一,或许可以通过胚珠的离体培 养加以证实,但侧珠心细胞的PCD,无疑为胚囊体积 的扩大提供了空间。

刘向东等[6]在研究水稻胚囊壁形成与发育时对 其营养需求及运输作如下推测:在八核胚囊细胞化 之前,存在两种营养来源,一是共质体途径,即通过 胞间连丝运送,这主要发生在近合点端和合点端胚 囊壁上。二是非共质体途径,即通过胚囊壁的渗透 直接运入胚囊,这种营养运输的方式发生在胚囊壁 的所有部位壁上。鹤顶兰功能大孢子形成之前,大 孢子母细胞的侧细胞壁存在明显的内突,而在胚囊 成熟前,合点端珠心细胞与胚囊之间可见胞间连丝 连接,这为胚囊发育的营养需求及运输提供了直观 的结构依据。衰退的侧珠心细胞不仅为胚囊的扩大 提供空间,同时也为胚囊的发育提供营养。而合点 端珠心细胞不仅是胚囊发育养分的重要通道,在胚 囊发育过程中,合点端珠心细胞的细胞质状态,特别 是液泡形态与大孢子母细胞、功能大孢子、成熟胚 囊时期的细胞状态高度相似(图1A、图1B、图1D、 图2G),因此,我们推测合点端珠心细胞对胚囊发育 内环境的稳定性起着一定的屏障作用。

鹤顶兰珠心细胞PCD过程中液泡的变化值得注

意。鹤顶兰大孢子母细胞初期,即将衰退的侧珠心 细胞液泡数量增多,这与五唇兰珠心细胞PCD过程 中液泡变化情况相似^[1]。液泡作为植物细胞所特有 的细胞器,通常认为它含有多种水解酶并兼有溶酶 体的作用,鹤顶兰珠心细胞PCD过程中液泡内存在 的碎片和膜状结构显然是液泡消化细胞器后留下的 残迹,因此,在鹤顶兰的珠心细胞PCD过程中液泡应 扮演了重要的角色。根据van Doorn^[8]对植物PCD的 分类,我们认为鹤顶兰珠心细胞的PCD和绝大数植 物发育性PCD一样,属于自溶性PCD。

参考文献 (References)

- 伍成厚,夏快飞,梁承邺,叶秀粦.五唇兰珠心细胞程序死亡的 超微结构观察.吉首大学学报(自然科学版)(Wu Chenghou, Xia Kuaifei, Liang Chengye, Ye Xiulin. Ultrastructural observations on programmed cell death of the nucellar cells in *Doritis pulcherrima*. Journal of Jishou University (Natural Science)) 2004; 25(4): 27-9.
- 2 田国伟, 申家恒. 小麦珠心细胞衰退过程中ATP酶的超微细胞化学定位. 植物学报(Tian Guowei, Shen Jiaheng. Ultracytochemical localization of ATPase activity in the degenerating nucellar cells of Wheat during degeneration. Acta Botanica sinica) 1996; 38(2): 100-4.
- 3 韦存虛, 蓝盛银, 徐珍秀. 水稻花后衰退珠心和胚乳发育 初期Ca²⁺的超微细胞化学定位. 电子显微学报(Wei Cunxu, Lan Shengyin, Xu Zhenxiu. Ultracytochemical localization of calcium in the degenerating nucellus and early endosperm cells of rice after flowering. J Chin Electr Microsc Soc) 2002; 21(1): 34-8.
- 4 Gunawardena AH. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. J Exp Bot 2008; 59(3): 445-51.
- 5 贺新强, 吴 鸿. 植物发育性细胞程序死亡的发生机制. 植物学 报 (He Xinqiang, Wu Hong. Mechanisms of developmental programmed cell death in plants. Chinese Bulletin of Botany) 2013; 48(4): 357-70.
- 6 刘向东, 徐是雄, 卢永根. 水稻胚囊壁的形成与发育观察. 植物 学报(Liu Xiangdong, Xu Shixiong, Lu Yonggen. Formation and development of embryo sac wall in rice. Acta Botanica Sinica) 1997; 39(11): 985-90.
- 7 李冬妹, 王亚琴, 叶秀粦, 梁承邺. 鹤顶兰胚囊发育过程中 Ca²⁺分布的超微细胞化学定位. 云南植物学研究(Li Dongmei, Wang Yaqin, Ye Xiulin, Liang Chengye. Ultracytochemical localization of calcium during embryo sac development in *Phaius tankervilliae* (Aiton) Bl. Acta Botanica Yunnanica) 2010; 32(6): 495-502.
- 8 van Doorn WG. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. J Exp Bot 2011; 62(14): 4749-61.