

鹤顶兰大孢子发生的超微结构观察^{*}

李冬妹^{1,2}, 夏快飞^{1,3}, 叶秀^{1,3}, 梁承邨¹

(1. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650;

2. 顺德职业技术学院, 广东 顺德 528300;

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 观察鹤顶兰 *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. 大孢子发生超微结构的结果显示: 鹤顶兰大孢子发生过程中, 存在细胞质改组的现象。大孢子母细胞发生早期呈长圆形, 细胞核略偏合点端, 细胞质中有大量的细胞器和小液泡, 环状内质网中包裹着一些颗粒物和内含体; 大孢子母细胞继续生长, 先在珠孔端出现一个较大的液泡, 液泡随后移向合点端, 细胞核移至珠孔端, 此时环状内质网消失; 后期细胞质密度上升, 环状内质网再次出现; 当大孢子母细胞进入分裂期时, 环状内质网再次消失。

关键词: 鹤顶兰; 大孢子; 减数分裂; 细胞质改组; 超微结构

中图分类号: Q94.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) S2-0209-04

鹤顶兰 *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. 为兰科 (Orchidaceae) 观赏植物, 植株较高大, 总状花序艳丽夺目, 花期持久, 抗逆性较强, 非常具有应用前景。叶秀^{1,3}和 Tung 等在鹤顶兰大孢子发生、胚囊发育、双受精及胚柄发育过程中的细胞骨架变化、免疫荧光标记方面做了深入的研究^[1-4], 但其大孢子发生超微结构未有系统报道。本文报道鹤顶兰大孢子发生过程中超微结构的观察结果, 为鹤顶兰胚胎学的研究进一步提供资料。

1 材料和方法

实验材料为中国科学院华南植物园兰花试验园栽培的鹤顶兰。开花期间进行人工授粉, 然后采集不同发育时期的子房, 取其胚珠, 用 2% 戊二醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 6.8) 于室温下抽气固定 4 h。磷酸缓冲液冲洗后, 用 1% 的锇酸 4 °C 再固定 12 h。梯度酒精脱水, 环氧丙烷过渡, Epon-812 包埋。先用玻璃刀作半薄切片 (厚度 2 μm) 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, JEM-1010 透射电镜观察并照相。

2 结 果

2.1 大孢子母细胞

鹤顶兰的大孢子母细胞直接由孢原细胞发育而

来。在大孢子母细胞发育早期, 细胞呈长圆形, 细胞核大而且明显, 略微偏向合点端, 细胞壁上有大量的突起。细胞质中有丰富的细胞器, 大量的线粒体、质体、高尔基体和核糖体等绕核分布, 许多体积较小的液泡分散在细胞质中。细胞质中还可见少量体积较大的类脂体, 合点端有较多的环状内质网, 环状内质网中包裹着一些颗粒物和内含体 (图 1: a)。

大孢子母细胞继续生长, 细胞呈楔形, 细胞质内发生了明显的变化。细胞核处于细胞近中央的位置, 珠孔端出现一个较大的液泡, 细胞器主要分布在细胞中央及珠孔端, 合点端细胞器较少 (图 1: b)。与早期大孢子母细胞相比, 它的电子密度降低, 核糖体较少, 质体和线粒体结构模糊, 细胞质中仍有较多的环状内质网 (图 1: c)。

随着大孢子母细胞的继续生长, 大液泡的位置发生了改变, 由原来的珠孔端移到合点端, 细胞核染色质浓缩, 核膜完整 (图 1: d)。细胞质的密度明显下降, 细胞质中只有少数质体、类脂体清晰可见, 细胞核的位置略偏珠孔端。

接着核膜开始解体, 组成核的物质集中在珠孔端, 占据了大孢子母细胞近半的体积 (图 1: e)。珠孔端和合点端的细胞壁上均有明显突起 (图 1: f), 大液泡消失, 合点端有许多小液泡, 细胞器

* 收稿日期: 2005-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170061); 广东省科技计划资助项目 (C20304*2002A2040801); 广东省重大科技专项资助项目 (2003A2010401)

作者简介: 李冬妹 (1970 年生), 女, 在职博士研究生, 通讯联系人: 叶秀, E-mail: ldm415@163.com

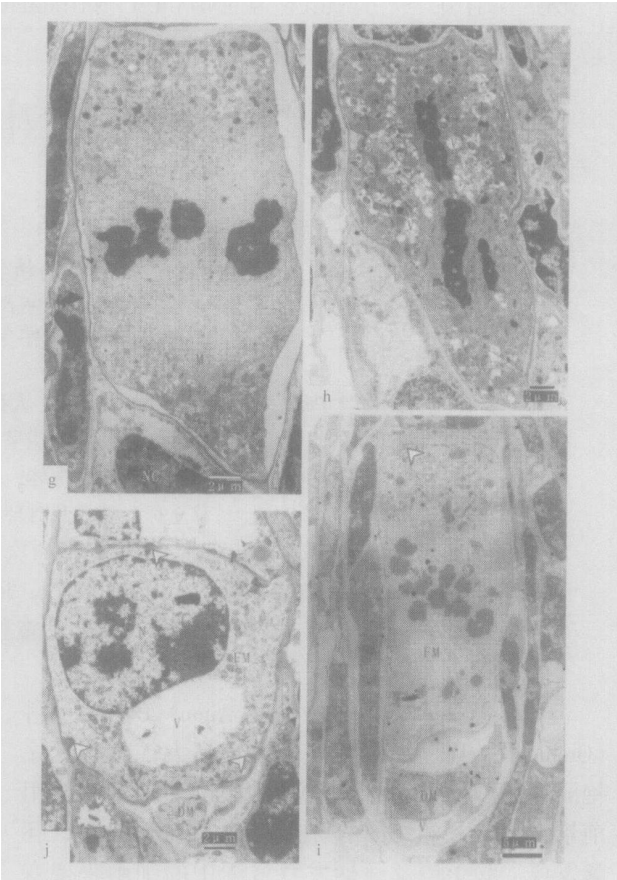
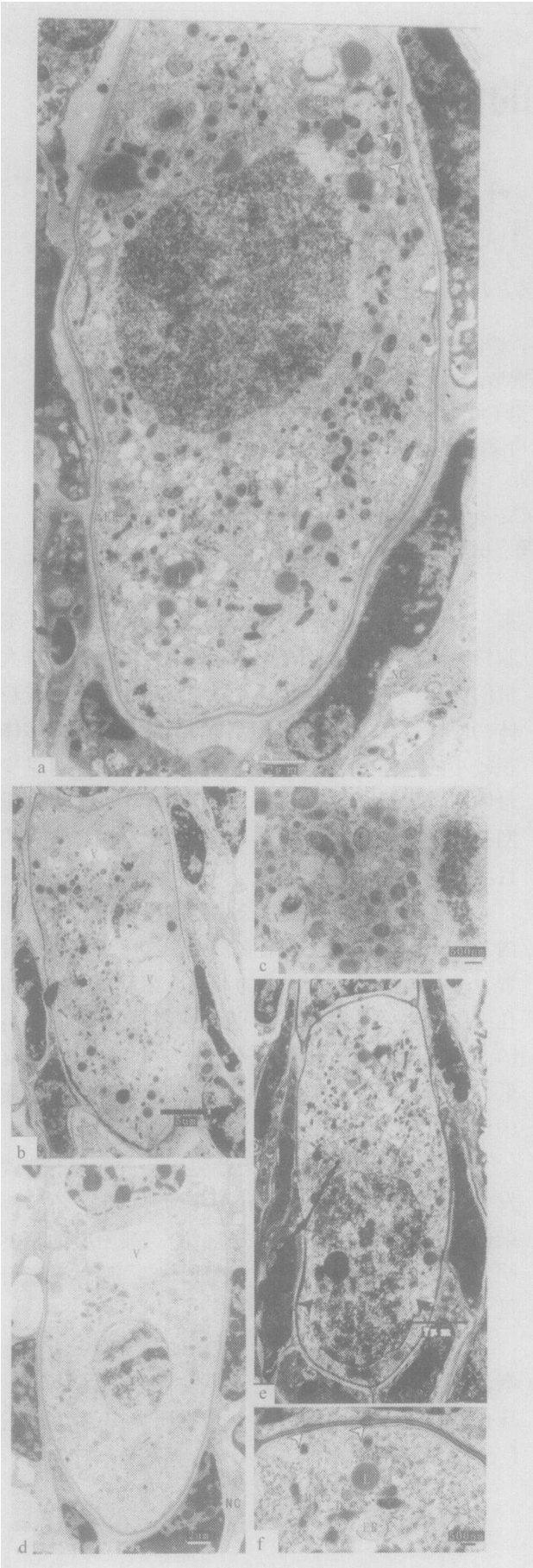


图 1 鹤顶兰大孢子发生的超微结构

Fig 1 Ultrastructural Observation on Megasporogenesis in *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl.

- a: 大孢子母细胞早期, 细胞长圆型, 细胞核位于细胞近中央, 箭头所指为细胞壁突起;
- b: 大孢子母细胞, 珠孔端出现较大液泡;
- c: 图 1 (b) 部分放大, 示细胞中央液泡、环状内质网、质体;
- d: 孢子母细胞, 大液泡位于合点端, 细胞质电子密度下降;
- e: 大孢子母细胞, 细胞核位于珠孔端, 核膜开始解体;
- f: 图 1: e 合点端放大, 示合点端细胞壁突起及细胞质的质体、高尔基体, 环状内质网;
- g: 减数分裂中期 I, 染色体整齐地排列在细胞中央的赤道板上;
- h: 减数分裂后期 I, 染色体移向细胞两极;
- i: 减数分裂中期 II, 染色体整齐地排列在细胞中央的赤道板上, 珠孔端退化大孢子的细胞质膜皱缩;
- j: 功能大孢子, 珠孔端有一大液泡, 珠孔端的大孢子细胞正在退化;

丰富, 质体、高尔基体清晰可见。与图 1: d 相比, 核糖体有所增加, 且细胞质中又有环状内质网出现 (图 1: f)。

2.2 减数分裂 I

减数分裂中期 I 时, 染色体整齐地排列在细胞中央的赤道板上, 细胞器在细胞的两极分布, 合点端细胞器多于珠孔端, 染色体周围细胞器少 (图 1: g)。减数分裂 I 后期, 染色体在纺锤体的牵引下移向细胞的两极, 细胞质中尤其是合点端积累了大量的类脂体, 还有大量的小液泡、类脂体、核糖体 (图 1: h)。

2.3 减数分裂 II

减数分裂 I 完成时形成不等大的二分体, 珠孔端细胞明显小于合点端细胞, 两个细胞先后进入减数分裂 II, 减数分裂 II 完成后形成大孢子四分体。通常是合点端一个大孢子处于分裂中期时, 珠孔端的其他大孢子已开始解体。有些珠孔端的二分体细胞不进行减数分裂 II, 合点端的二分体细胞进行减数分裂, 形成大孢子三分体。开始解体的珠孔端大孢子质膜皱缩, 细胞质中有明显的大液泡和少量的细胞器, 细胞核明显, 核膜完整。合点端大孢子处于分裂中期时, 合点端仍有更多的细胞器, 珠孔端只有少数类脂体 (图 1: i)。

2.4 功能大孢子

减数分裂 II 完成后, 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, 合点端的一个细胞发育成为功能大孢子。功能大孢子内有明显的细胞核, 位于合点端, 珠孔端有一大液泡, 细胞质中有大量的内质网出现。功能大孢子与珠孔端退化大孢子之间的细胞壁增厚, 在与合点端珠心细胞、侧面珠心细胞以及珠孔端正在退化的细胞之间均可见明显的细胞壁突起 (图 1: j)。

3 讨 论

Dickinson^[5] 将大孢子母细胞减数分裂过程中发生的有规律的变化称为细胞质改组, 并提出细胞质涉及孢子体向配子体转化的观点。此后, 在部分植物大孢子发生过程中也观察到细胞质改组的现象^[9], 我们观察发现: 鹤顶兰大孢子母细胞减数分裂过程中也存在细胞质改组现象。

鹤顶兰大孢子母细胞发生早期, 细胞质密度大, 核糖体多, 一些环形内质网内包含一些内容物 (图 1: a, c), 中期细胞质密度下降, 核糖体减少, 环状内质网消失 (图 1: d), 后期细胞质密度上升, 环状内质网再次出现 (图 1: f)。当大孢子母细胞进入分裂期时, 环状内质网再次消失 (图 1: g, h, i, j), 这些变化特征与细胞质改组的特征相似^[9]。李灵等^[6] 研究小麦大孢子形成过程中的超微结构变化时也注意到大孢子母细胞减数分裂过

程中, 核糖体密度在前期 I 显著降低, 到中期 I 才完全恢复。我们同样认为: 核糖体的部分消除可能可以中断一些孢子体物质的形成, 而核糖体密度的恢复则对减数分裂及孢子发育成配子体是重要的。但有关环状内质网的形成原因和所起作用则有待于进一步探讨, 因为环状内质网在大孢子母细胞的不同时期出现 (图 1: a, c, f), 而内质网作为调节蛋白质合成与运输、细胞应激反应和细胞内钙水平的细胞器, 其形态的变化可能不仅仅是对核糖体起保护作用, 使核糖体和一些细胞器及内含物在减数分裂中免遭破坏。鹤顶兰大孢子母细胞发育过程中细胞质改组说明孢子体向配子体转化的过程不单纯是染色体数目的变化, 细胞质中也进行着一系列复杂而有序的变化, 细胞质和细胞核相互作用, 使孢子体向配子体的转化顺利进行。

兰科植物中墨兰、五唇兰等大孢子发生的超微结构研究有过详细的报道^[7-9], 大孢子中通常有体积较小的液泡存在, 推测可能与兰科植物一个子房内有大量的胚珠且成熟胚囊小有关, 细胞的生长主要是由于细胞核增大和细胞内容物增多。然而, 在鹤顶兰大孢子发生过程中, 大孢子母细胞发生的早期, 细胞内有大量的小液泡, 随着大孢子母细胞的生长, 小液泡先在珠孔端合并成一个较大的液泡 (图 1: b), 最后在合点端形成一个大液泡 (图 1: d)。细胞核的位置随液泡位置的变化而相应发生改变, 最初偏向合点端, 最后位于珠孔端。细胞器的极性分布也与液泡的变化有关, 大孢子母细胞发生的早期, 极性不明显; 大液泡出现时, 细胞器集中在细胞的中央和珠孔端; 将要进入减数分裂时, 大液泡消失, 核物质几乎占据了大孢子母细胞珠孔端的全部空间, 细胞器移向合点端。液泡是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。吉成均等^[10] 在观察裸子植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 大孢子发生过程时, 认为液泡的作用值得注意。伍成厚等^[9] 发现五唇兰大孢子发生过程中, 珠孔端退化的大孢子中液泡的数量在相当一段时间内不断增加, 同时在一些液泡中存在着结构模糊的物质, 因此认为在五唇兰退化大孢子的死亡过程中起着重要的作用。鹤顶兰大孢子发生过程中, 也可观察到一些液泡中有结构模糊的物质, 可能是细胞器解体后的残迹, 因此液泡在细胞质改组过程中可能也起着一定的作用。

前人研究发现^[3]: 鹤顶兰大孢子母细胞减数分裂 I 完成后形成二分体, 二分体的两个细胞先后进入减数分裂 II, 近珠孔端的细胞先分裂, 合点端的细胞后分裂, 通常近珠孔端的核分裂已进入分裂后

期, 而合点端的核还在分裂中期。而我们在进行超微结构的研究时还观察到鹤顶兰产生两个大小不等的二分体细胞, 有些胚囊珠孔端的二分体细胞不进行第二次减数分裂, 因而只产生三个大孢子。珠孔端细胞较小, 当合点端二分体细胞处于减数分裂 II 中期时, 珠孔端的二分体细胞洗经减数分裂 II 的细胞已开始有退化的趋势, 质膜皱缩, 细胞质中有明显的大液泡和少量的细胞器 (图 1: i)。这一现象在花叶开唇兰 (兰科) 的大孢子发生中也有过报道^[11], 报统计花叶开唇兰三分体与四分体的比例为 132 :10, 而鹤顶兰大孢子发生过程中四分体所占的比例也高于三分体类型, 原因何在需进一步研究。

参考文献:

[1] TUNG S H, YE X L, ZEE S Y, et al. The microtubular cytoskeleton during megasporogenesis in the Nun orchid, *Phaius tankervilleae*[J] . New Phytol, 2000, 146: 503—513.

[2] 叶秀麟, 杨子德, 徐是雄, 等. 鹤顶兰胚囊发育过程中微管变化的共焦显微镜观察[J] . 植物学报, 1996, 38 (9): 677—685.

[3] YE X L, YEUNG E C, ZEE S Y. Sperm movement during

double fertilization of a flowering plant, *Phaius tankervilleae* [J] . Planta, 2002, 215: 60—66.

[4] YE X L, ZEE S Y, YEUNG E C. Suspensor development in the Nun orchid, *Phaius tankervilleae*[J] . Int J Plant Sci, 1997, 158: 704—712.

[5] DICKINSON H G. Cytoplasmic differentiation during microsporogenesis in higher plants[J] . Acta Soc Bot Pol, 1981, 50: 3—12.

[6] 李灵, 吉成均, 尤瑞麟. 小麦大孢子发生过程中超微结构研究[J] . 北京大学学报: 自然科学版, 2001, 37(4): 444—453.

[7] KUDLICKA K, KURAS M. Ultrastructure of meiocyte in ovules of *Orchis* and *Epipactis*[J] . Bull Acad Polon Sci, Ser Sci Biol, 1979, 26: 833—837.

[8] TUNG S H, YE X L, YEUNG E C, et al. Ultrastructure aspects of megasporogenesis in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae)[J] . Lindleyana, 1999, 14: 178—192.

[9] 伍成厚, 李冬妹, 梁承邨, 等. 五唇兰大孢子发生的超微结构观察[J] . 热带亚热带植物学报, 2005, 13(1): 45—48.

[10] 吉成均, 杨雄, 李正理. 银杏大孢子形成的超微结构研究[J] . 植物学报, 1999, 41(12): 1323—1326.

[11] 张振珏, 陈裕, 林坤瑞. 花叶开唇兰[J] . 热带亚热带植物学报, 1996, 4(2): 14—17.

Ultrastructural Observation on Megasporogenesis in *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl.

LI Dong mei^{1,2}, XIA Kuai fei^{1,3}, YE Xiu lin¹, LIANG Cheng ye¹

(1. South China Botany Garden, The Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China;
2. Shunde Polytechnic, Guangdong Shunde 528300, China;
3. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Megasporogenesis in *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. was observed under transmission electron microscope. Cytoplasmic reorganization takes place during the megasporogenesis of *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. . The megasporocyte is elliptical with its nucleus migrating toward the chalazal end and many organelle and small vacuole being seen during the prophase, some grains and inclusion are visible in the ringed ER. With the megasporocyte developing, a bigger vacuole appears in the micropyle end, then it migrating toward the chalazal end with the nucleus in the micropyle end, ringed ER disappears in this phase. The cytoplasmic density is increased and ringed ER appears again soon after. When the megaspore undergoes meiosis, ringed ER disappears again.

Key words: *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl.; megaspore; meiosis; cytoplasmic reorganization; ultrastructure