

## 五唇兰大孢子发生的超微结构观察

伍成厚<sup>1,2</sup>, 李冬妹<sup>1</sup>, 梁承邨<sup>1</sup>, 叶秀麟<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650; 2. 漳州师范学院生物系, 福建 漳州 363000)

**摘要:** 五唇兰(*Doritis pulcherrima* Lindl.)大孢子母细胞在减数分裂前呈长圆形, 细胞核偏向珠孔端, 细胞呈现极性分化。大孢子母细胞第一次减数分裂形成二分体。随后, 二分体珠孔端的一个细胞退化, 合点端的一个细胞体积增大成为功能大孢子。功能大孢子进行第二次减数分裂, 形成二核胚囊。这一过程属于双孢子葱型胚囊的大孢子发生类型。珠孔端的二分体细胞(大孢子)在退化过程中质膜保持完好, 液泡数量增多, 染色质高度凝集, 具有细胞程序死亡的部分特征。功能大孢子的细胞器和染色质分布均匀。功能大孢子合点端的细胞壁上有发达的胞间连丝, 二核胚囊期胞间连丝消失。在功能大孢子靠近合点端一侧有吞噬结构, 其内含有结构模糊的细胞器。

**关键词:** 五唇兰; 大孢子; 细胞程序死亡; 超微结构; 兰科

中图分类号: Q944.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)01-0045-04

## Ultrastructural Observations on Megasporogenesis in *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae)

WU Cheng-hou<sup>1,2</sup>, LI Dong-mei<sup>1</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>1</sup>, YE Xiu-lin<sup>1\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Department of Biology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou 363000, China)

**Abstract:** Megasporogenesis in *Doritis pulcherrima* collected from Hainan Province was observed under transmission electron microscope. The megasporocyte is elliptical before the initiation of meiosis with its nucleus migrating toward the micropylar end and polarization being seen. The megasporocyte undergoes the first meiotic division, giving rise to two dyad cells. After meiosis I, the chalazal dyad cell expands in size and differentiates into functional megaspore at the expense of the micropylar dyad cell. The functional megaspore undergoes the second meiotic division resulting in the formation of a binucleate embryo sac. The developmental pattern of the megasporogenesis in *Doritis pulcherrima* is of bisporic Allium type. Some characters of the programmed cell death such as integrated plasma membrane, increasing amount of vacuoles, and highly compressed chromatin appears during the degeneration of the micropylar dyad cell, while the organelles distribute uniformly and the chromatin diffuses in the functional megaspore. Some plasmodesmata occur on the chalazal cell wall of the functional megaspore but they disappear at the stage of binucleate embryo sac. Phagosomes with degenerated organelles are visible in functional megaspore at chalazal side.

**Key words:** *Doritis pulcherrima* Lindl.; Megaspore; Programmed cell death; Ultrastructure; Orchidaceae

五唇兰 (*Doritis pulcherrima* Lindl.) 为兰科 (Orchidaceae) 五唇兰属植物, 产于我国海南岛, 亦分布于东南亚一些国家<sup>[1]</sup>, 是一种很有开发前景的野生兰花。Yasugi<sup>[2]</sup>和唐源江等<sup>[3]</sup>曾从光镜水平对五唇

兰的胚囊发育过程作过描述, 本文报道五唇兰大孢子发生过程中超微结构的观察结果, 为五唇兰的开发利用提供科学依据。

收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-03-17

基金项目: 广东省重大科技专项(2003A2010401); 福建省青年科技人才创新项目资金(2004J052)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

## 1 材料和方法

**材料** 试验材料五唇兰产于我国海南省,植株从野外采回后种植在中国科学院华南植物园的温室内。

**方法** 在五唇兰开花期间进行人工授粉,每个花葶授基部的 2 朵花,并剪除花葶的其余部分。授粉后 32–38 d 采样,取子房中部的胚珠(带少量的胎座组织、体积约 0.5 mm<sup>3</sup>),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%锇酸 4℃再固定 12 h。梯度酒精脱水,环氧丙烷过渡后,包埋在 Epon-812 中。先用玻璃刀作半薄切片(厚度 2 μm)确定位置,再用钻石刀做超薄切片(厚度 80 nm),铜网收集,醋酸双氧钼和柠檬酸铅双染, JEM-1010 透射电镜观察并照相。

## 2 结果

### 2.1 大孢子母细胞

五唇兰的大孢子母细胞直接由孢原细胞发育而来,细胞体积增大拉长,细胞核大而明显。在减数分裂前,大孢子母细胞呈长圆形,细胞核偏向于珠孔一端,当核膜尚完整时,核仁逐渐消失,染色质开始凝集;细胞质中可见许多小液泡(图版 I:1)。细胞显示极性分化:合点端细胞质含量多,液泡丰富,分布大量的线粒体、高尔基体、内质网等细胞器(图版 I:2);珠孔端细胞质少,液泡缺乏,线粒体、类质体等细胞器的分布较密集(图版 I:3)。

### 2.2 二分体

五唇兰大孢子母细胞第一次减数分裂形成二分体,两个二分体细胞(大孢子)大小基本相等。随后,二分体珠孔端的一个细胞开始退化,合点端的一个细胞体积增大,成为功能大孢子(图版 I:4)。

功能大孢子内的细胞器分布均匀,细胞核较大偏向于合点端,染色质在细胞核内分布均匀,没有明显的核仁。功能大孢子与珠孔端退化的大孢子之间的细胞壁增厚,未见胞间连丝存在。功能大孢子与合点端珠心细胞之间胞间连丝发达,在同一切面上可以看到 6 条胞间连丝。胞间连丝深入到珠心细胞内,成为合点端珠心细胞向功能大孢子输送营养物质的通道。在功能大孢子靠近合点端珠心细胞的一侧有吞噬结构,其内含有结构模糊的细胞器(图版 I:4,5)。

珠孔端退化的大孢子,质膜完好,细胞质减少,细胞的大部分体积由细胞核占据,染色质高度凝

集,核膜不完整。液泡数量增多,形状不规则,在一些液泡内含有结构模糊的物质(图版 I:4,6)。

### 2.3 二核胚囊

功能大孢子随后进行第二次减数分裂,形成二核胚囊(图版 I:7)。两个子核位于胚囊的两端,二核之间有巨大的中央液泡。珠孔端的一个细胞核体积较大,有明显的核仁,细胞质也较多;合点端的细胞核和细胞质的体积均较小,合点端细胞核在同一切面上未见核仁。

二核胚囊期,胚囊与合点端珠心细胞之间的胞间连丝消失,整个胚囊壁未见有胞间连丝存在。

## 3 讨论

五唇兰的大孢子发生前人有不同的报道。Yasugi<sup>[2]</sup>报道五唇兰大孢子发生属单孢子蓼型胚囊的大孢子发生类型,即大孢子母细胞连续两次减数分裂形成四分体,随后珠孔端的 3 个大孢子退化,合点端一个大孢子发育为功能大孢子;功能大孢子再连续 3 次有丝分裂形成八核胚囊。唐源江等<sup>[3]</sup>认为应属双孢子葱型胚囊的大孢子发生类型,即大孢子母细胞第一次减数分裂形成二分体,珠孔端的大孢子退化,合点端的大孢子体积增大发育成功能大孢子,随后进行第二次减数分裂形成二核胚囊,再连续两次有丝分裂形成八核胚囊。Yasugi<sup>[2]</sup>虽然报道五唇兰胚囊发育为单孢子蓼型,但仅有二分体和成熟胚囊的照片,未见四分体及其他的胚囊发育时期。本文试验中功能大孢子是从二分体合点端的一个细胞发育而成,和唐源江等<sup>[3]</sup>的观察结果一致,从超微结构的层面进一步确定五唇兰的大孢子发生属于双孢子葱型胚囊类型。

被子植物的大孢子的发生有一个显著的特点,即大孢子母细胞减数分裂后,只有一个细胞发育为功能大孢子,其他的细胞出现有规律的退化<sup>[4]</sup>。到目前为止,人们尚不了解这些细胞退化的真正原因和机理。Bell<sup>[5]</sup>曾经推测,大孢子退化的性质可能属于细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡又称细胞程序死亡,是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程,这一过程受到严格的由遗传机制决定的程序性调控<sup>[6,7]</sup>。五唇兰大孢子发生过程的超微结构表明:珠孔端大孢子退化时,质膜皱缩但仍保持完整,细胞致密化,染色质高度凝集。这些变化特征与细胞凋亡的某些特征相似<sup>[8]</sup>,也支持了 Bell<sup>[5]</sup>的观点。动物细胞凋亡后期,细胞形态变化的重要特征是细胞核

碎片在细胞质中与细胞器等成分一起被细胞膜包裹成圆形的凋亡小体(apoptotic body), 进而被邻周细胞或巨噬细胞所识别、吞噬或自然脱落离开生物体<sup>[6]</sup>。植物体内没有巨噬细胞, 周围细胞对凋亡细胞的识别和吞噬并不常见, 那么植物体中的凋亡细胞是如何降解并消失得无影无踪的呢? 这一问题目前尚无定论。吉成均等<sup>[9]</sup>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。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。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并不随着质膜的皱缩和细胞质的致密化而减少, 相反, 在相当一段时间内液泡的数量不断增加; 同时在一些液泡中存在着结构模糊的物质, 这些物质可能是解体后的细胞器残迹。因此可以认为在五唇兰退化大孢子的死亡过程中液泡也扮演重要角色。

Rodkiewicz 和 Bednara<sup>[9]</sup>曾观察到在火烧兰(*Epipactis latifolia* All.)的大孢子发生过程中胚囊壁被胼胝体所包围, 整个胚囊壁仅在合点端有胞间连丝。Jane 和 Chiang<sup>[10]</sup>在芦竹(*Arundo formosana* Hack.)大孢子发生过程的超微结构研究中, 则观察到刚形成的两个二分体细胞之间的细胞壁上有胞间连丝, 此后这两个细胞之间形成了增厚的细胞壁。在五唇兰的大孢子发生过程中, 在功能大孢子与合点端珠心细胞之间有非常发达的胞间连丝, 二核胚囊时期这些胞间连丝又消失。胞间连丝是细胞之间进行物质和信息交流的重要通道, 五唇兰大孢子发生过程中胞间连丝的变化说明在这一胚囊发育阶段需要丰富的营养物质。

Willemse 等<sup>[11]</sup>在百合科的脂麻掌(*Gasteria verrucosa*)的大孢子发生过程中观察到极性分化现象。五唇兰大孢子发生过程中, 在大孢子母细胞减数分裂前期和二核胚囊期胚囊细胞也出现极性分化, 但在功能大孢子内细胞器的极性分布不明显, 其机理尚不清楚, 需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] Ji Z H(吉占和), Chen X Q(陈心启), Luo Y B(罗毅波), et al. Flora Reipublicae Popularis Vol. 19 [M]. Beijing: Science Press, 1999. 276-279. (in Chinese)
- [2] Yasugi S. Ovule and embryo development in *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae) [J]. Amer J Bot, 1983, 70(4):556-560.
- [3] Tang Y J(唐源江), Ye X L(叶秀萍), Chen Z L(陈泽濂). The studies of the female gametophyte development and the embryogenesis in *Doritis pulcherrima* Lindl. [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 1998, 6(4):289-292. (in Chinese)

- [4] Hu S Y(胡适宜). Embryology of Angiosperms [M]. Beijing: Higher Education Press, 1982. 67-211. (in Chinese)
- [5] Bell P R. Megaspore abortion: a consequence of selective apoptosis? [J] Int J Plant Sci, 1996, 157:1-7.
- [6] Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants [J]. Plant Cell, 1997, 9:1157-1168.
- [7] Tian H Q(田惠桥). Programmed cell death during sexual reproduction in angiosperms [J]. J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报), 2002, 28(3):161-168. (in Chinese)
- [8] Ji C J(吉成均), Yang X(杨雄), Li Z L(李正理). Ultrastructural studies on megaspore formation in *Ginkgo biloba* [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1999, 41(12):1323-1326. (in Chinese)
- [9] Rodkiewicz B, Bednara J. Cell wall ingrowths and callose distribution in megasporogenesis in some Orchidaceae [J]. Phytomorphology, 1976, 26:276-281.
- [10] Jane W N, Chiang S H. Ultrastructure of megasporogenesis and early megagametogenesis in *Arundo formosana* Hack. (Poaceae) [J]. Int J Plant Sci, 1996, 157(4):418-431.
- [11] Willemse M T M, Bednara J. Polarity during megasporogenesis in *Gasteria verrucosa* [J]. Phytomorphology, 1979, 29:156-165.

## 图版说明

D: 高尔基体 Dictyosome; DM: 退化的大孢子 Degenerated megaspore; ER: 内质网 Endoplasmic reticulum; FM: 功能大孢子 Functional megaspore; L: 类质体 Lipid body; M: 线粒体 Mitochondrion; N: 细胞核 Nucleus; P: 质体 Plastid; V: 液泡 Vacuole.

图片均以珠孔端朝下 Micropylar downward in all figures.

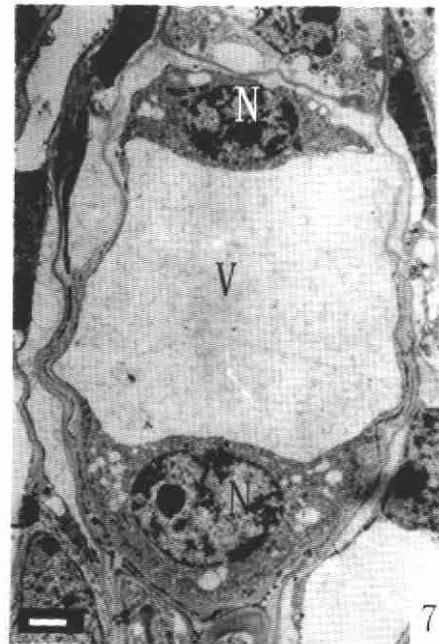
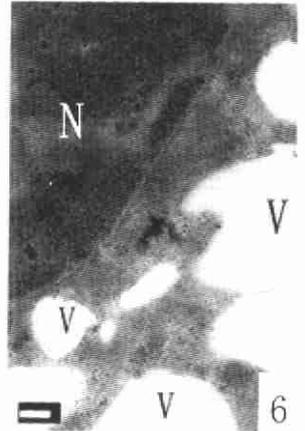
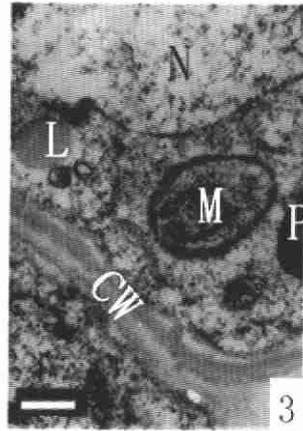
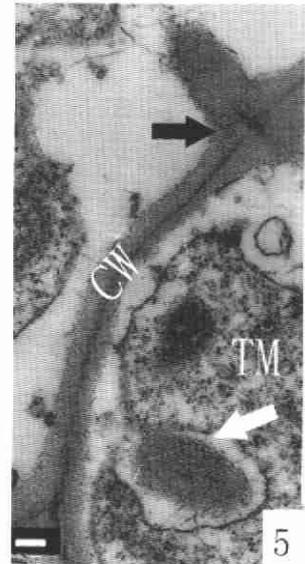
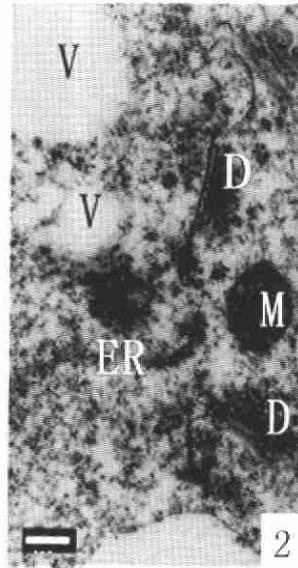
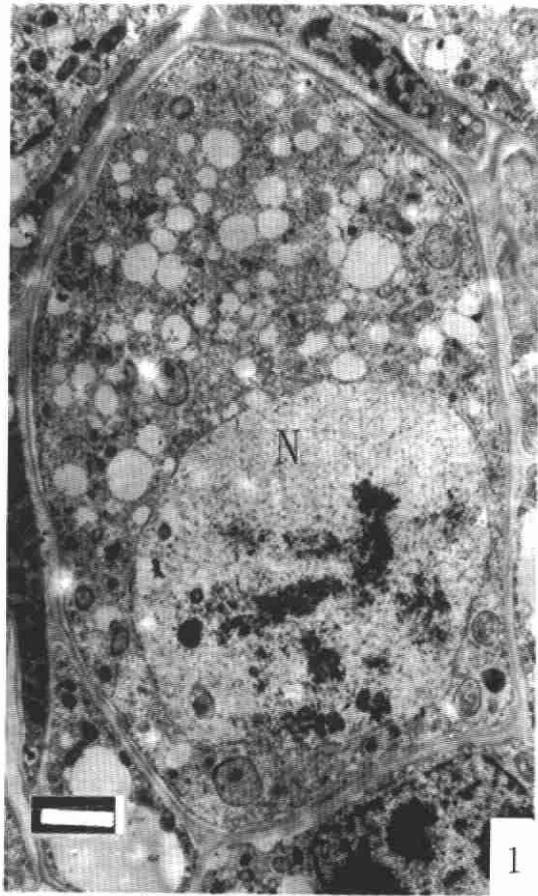
## 图版 I

1. 减数分裂前的大孢子母细胞, 标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ; 2. 图 1 部分放大, 示合点端的液泡、高尔基体、内质网和线粒体, 标尺 = 200 nm; 3. 图 1 部分放大, 示珠孔端的类质体、线粒体和质体, 标尺 = 500 nm; 4. 二分体后期, 示珠孔端一个细胞正在退化, 合点端一个细胞体积增大成为功能大孢子, 白色箭头(↑)示功能大孢子与合点端珠心细胞之间的胞间连丝, 标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ; 5. 图 4 部分放大, 黑色箭头(↑)示功能大孢子在合点端的胞间连丝, 白色箭头(↑)示吞噬结构, 标尺 = 200 nm; 6. 图 4 部分放大, 示退化大孢子的细胞核和液泡, 标尺 = 200 nm; 7. 二核胚囊, 示液泡和细胞核, 标尺 = 2  $\mu\text{m}$ .

## Explanation of plates

### Plate I

1. The megasporocyte before the initiation of meiosis, bar = 2  $\mu\text{m}$ ;
2. Enlarged view of a portion of chalazal end in Fig. 1, showing vacuole, dictyosome, endoplasmic reticulum, and mitochondrion, bar = 200 nm;
3. Enlarged view of a portion of micropylar end in Fig. 1, showing lipid body, mitochondrion, and plastid, bar = 500 nm;
4. Dyad at late stage, with micropylar cell degenerated and a chalazal cell enlarged into functional megaspore, the white arrow (↑) showing plasmodesmata, bar = 2  $\mu\text{m}$ ;
5. Enlarged view of a portion of Fig. 4, the black arrow (↑) showing the plasmodesmata and the white arrow (↑) showing phagosome in chalazal end of functional megaspore, bar = 200 nm;
6. Enlarged view of a portion of Fig. 4, showing the nucleus and vacuoles in degenerated megaspore, bar = 200 nm;
7. Binucleate embryo sac, showing the nuclei and vacuoles, bar = 2  $\mu\text{m}$ .



伍成厚等: 图版 I

WU Cheng-hou et al.: Plate I