

水稻成熟花药和花粉的结构和组织化学研究*

周一兵

(北京大学生物系, 北京 100871)

摘 要

用乙二醇甲基丙烯酸脂(简称 GMA)和环氧树脂 Epon812 包埋的薄切片方法对水稻成熟花药和花粉的结构进行了观察,并对各种结构的性质和细胞中的后含物做了细胞化学的分析。对成熟花药的绒毡层膜及乌氏体的研究采用了分离技术,做了显微和超微观察。证明水稻成熟花药壁和花粉除具一般禾本科植物特征外,还揭示了花药壁表皮上可能有硅质,药壁表皮细胞内含有脂类颗粒,药室内壁具纤维素质的纤维状加厚;发现花粉粒中除了贮存有大量淀粉颗粒外,还含有脂类,成熟花粉中营养核与两个精细胞及两个精细胞间联系紧密;并讨论了薄切片的优越性,绒毡层膜的意义及其上细胞印迹的来源。

关键词: 水稻; 花药; 花粉; 薄切片; 组织化学

引言

水稻生殖过程的研究在育种上有重要的意义。水稻的胚珠和雌配子体的结构以及受精作用,国内外都有过一些报道^[10, 12],而花药和雄配子的研究尚少。木原等^[15]曾用经典的石蜡切片法观察了花粉的发育,但只是强调了雄核形成过程中花粉二次收缩、产生生殖细胞和营养细胞的减数分裂、生殖细胞产生两个精子的有丝分裂的纺缍丝取向问题,对成熟花粉粒的结构及后含物没做讨论;最近 Raghavan^[13]用 GMA 包埋的薄切片法对水稻的花药和花粉粒的发育做了较详细的研究,但他主要讨论的是花药的长度与花粉粒成熟程度的关系等形态发生的问题,对成熟花药和花粉的结构和细胞化学方面的研究仍未涉及。因此,本实验用薄切片法和细胞化学方法,对水稻成熟花药和花粉的细微结构和组成成分做了较详细的研究。

材料和方法

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 取自北京农业大学实验田,为梗稻品种“越父”。

从生长正常的植株上采集成熟的花药,在 0.1mol/L (pH 7.3) 磷酸缓冲液配制的 3% 戊二醛溶液中固定 4h,上述缓冲液清洗后,材料分成两部分处理。

光镜薄切片 GMA 样品 清洗后材料经各级酒精脱水,转入 GMA 中渗透和包埋,

* 本文在胡适宜教授指导下完成,特此感谢。

在 Leitz 1512 型切片机上切成 $1\mu\text{m}$ 薄片。

光镜薄切片和电镜超薄切片 Epon 812 样品 材料用 1% 锇酸后固定 1-2h, 系列酒精脱水, 经环氧丙烷和树脂渗透后, 包埋在 Epon 812 中。样品在 Leitz 1512 型切片机上切成 $1\mu\text{m}$ 薄片供光镜组织化学染色用; 样品在 LKB-III 型超薄切片机上切 $700\text{\AA}$, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色, 观察和记录在 JEM-100cx 透射电镜下进行。

一. 鉴定各种成分的细胞化学方法

1. GMA 薄切片

- (1) 甲苯胺蓝-O(简称 T. B. O.) 染色作为一般形态观察^[9]。
- (2) 高碘酸-锡夫(简称 PSA)反应鉴定多糖类物质^[1]。
- (3) 纤维素的测试: 用 0.01%(w/v) 荧光增白剂(Calcofluor) 染色 1min^[5]。
- (4) 孢粉素物质的测试: 用 0.03%(w/v) 派洛宁 B 黄色组分染色 1-2min^[2]。
- (5) 胼胝质的测试: 用 0.005% 水溶苯胺蓝染色 1-2min^[5]。

各种荧光试剂染色后制片经蒸馏水洗涤、稍吸干, 用 40% 甘油封藏, 然后在 Olympus 显微镜(BH-RFL-W)下观察及拍照。上述几种荧光观察都用紫外光激发。

2. Epon 812 薄切片

- (1) 脂类的鉴定: 用苏丹黑 B 染色^[7]。
- (2) 蛋白质的鉴定: 用考马斯蓝 R 染色^[7]。

二. 成熟花药绒毡层膜的分离方法

成熟花药用 FAA 固定液固定 12h 以上, 经 70% 酒精洗一次, 用 Erdtman 乙酰解法处理^[4]。

1. 光镜观察的样品

(1) 解剖镜下取形态完整的绒毡层膜囊(内含花粉粒), 置于载玻片上, 吸去多余水分, 封于 50% 甘油中, 用漆沿圆盖片周围封固。

(2) 将理想的绒毡层膜小块转移到涂有粘贴剂的载玻片上, 干燥后用 1% 番红水溶液染色 5min, 蒸馏水洗 2-3 次, 各级酒精脱水, 经 1/2 酒精 + 1/2 二甲苯过渡, 在二甲苯中透明 10min, 树胶封固。

2. 透射电镜观察的样品

将长约 2mm 的绒毡层膜小方块捞到无支持膜的 300 目铜网上, 干燥后用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色后, 在 JEM-100 cx 透射电镜下观察和记录。

观察结果

一. 成熟花药壁

水稻成熟花药壁只有表皮和药室内壁细胞保持完整, 中层已解体, 只留下一些原生质体的残迹, 腺质型绒毡层细胞完全自溶。

表皮 为一层扁长形细胞构成的完整细胞层,外切向壁覆盖着连续的角质层,可被苏丹黑B着色。用荧光增白剂染色的诱发荧光观察,发现表皮细胞的外切向壁有许多亮点(图版Ⅱ:15),推测这些颗粒物质是硅质的。用PAS和苏丹黑B染色,发现表皮细胞内贮有一定数量的脂类颗粒,但缺少淀粉(图版Ⅱ:11,12),而且电镜结果也证实了这一点(图1),这是以前未见报道的。

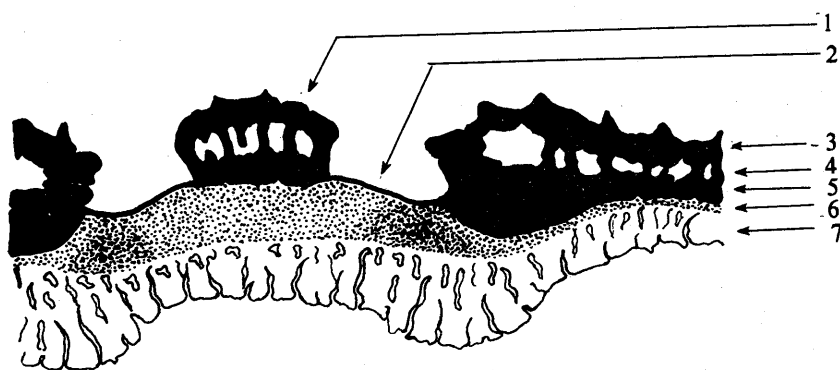


图1 禾本科花粉粒萌发孔处示壁的结构

Fig.1 Aperture region of a grass pollen grain to identify various structural features of the wall

1. 塞子 Operculum; 2. 孢粉素层 Sporopollenin lamella; 3. 覆盖层 Tectum; 4. 基粒棒层 Bacula;
5. 外壁内层 (3、4、5组成外壁) Nexine (The exine consists of tectum, bacula and nexine);
6. Z层 Zwischendörper layer; 7. 内壁 Intine

药室内壁 只有一层细胞,花药发育成熟时期,药室内壁达到最高度的发育,细胞变为径向延长,细胞壁从内切向壁向外向上发生带状加厚,外切向壁仍为薄壁的。这种加厚壁可被PAS反应强烈染色,用荧光增白剂染色时,可以看到诱导出的明亮的蓝白色光(图版Ⅱ:16)。

绒毡层膜 是围绕整个绒毡层的抗乙酰解的膜,它象一个囊包围着所含的花粉粒,这在许多植物中都有报道^[4,11]。Bancroft(1967)对禾本科植物的绒毡层膜进行过详细的研究,指出其中多达100种存在这种结构。在薄切片上也能分辨出此膜的存在,特别是在其上布满了乌氏体,可被多种染色方法着色,显示得十分清楚(图版Ⅱ:11,12)。光镜下可看到它是小圆球,紧密排列在绒毡层膜上。在电镜下可看到绒毡层膜和乌氏体的细微结构(图版I:1,2,4,)。乌氏体以索与绒毡层膜或远或近的联结着,乌氏体中心有一电子透明的区域,周围是一层厚的电子致密层(图版I:5-7,9)。此层的厚度均一,有孔道和疣状突起(图版I:4,5),派洛宁黄色组分染色的荧光,显示表明是孢粉素性质的(图版Ⅱ:14)。

花药经乙酰解处理,可获得完整的包围着花粉粒的绒毡层膜囊(图版I:10)。在绒毡层膜小片的整体制片中,乌氏体被1%番红水溶液染成红色,它们密布在膜上,并形成多边形的类似细胞状的轮廓(图版Ⅱ:19,20)。

分离的绒毡层膜片在透射电镜下可以清楚看到:绒毡层膜的外层,即与绒毡层原生质邻接

的一层,以表面观具许多穿孔(图版 I : 7),所以称它为穿孔层,穿孔的大小不完全一样。在穿孔层之上是乌氏体层,乌氏体由连索将其悬挂在穿孔层之上。从表面上看,连索好象也构成不规则的网状,即以前称为网状层的结构。现在我们认为,带状连索不是单独的一层,而是与乌氏体构成一个复合结构,向药室一面的乌氏体以连索与穿孔层相连。

二. 成熟的花粉

水稻的花粉是三细胞型,在花粉壁内包含着一个营养细胞和两个精细胞。

花粉壁 成熟的花粉壁可见明显的分层,这里采用 Heslop-Harrison(1979)的原则命名^[11]。

光镜观察表明,水稻的花粉壁大致分为覆盖层、基粒棒层、外壁内层和内壁(图版 II : 14, 16-18),电镜观察可以进一步看到覆盖层上有微孔、内壁上有孔道等(图版 I : 2,3),花粉壁的性质已经确定^[4,11],GMA薄切片用派洛宁 B 黄色组分和荧光增白剂染色的荧光观察,显示出呈黄色荧光的孢粉素的外壁与呈蓝白色荧光的纤维素的内壁(图版 II: 14,16)。

Vithanage and Knox 在研究向日葵花粉发育中报道,在外壁内层含有胼胝质^[14]。在水稻中,我们也曾用脱色苯胺蓝溶液染色,只在外壁内层和内壁之间看到少量不连续的微弱荧光点,表明水稻成熟的花粉壁中极少或没有胼胝质。

花粉内含物 花粉的内含物主要指贮存在营养细胞细胞质内的物质。水稻花粉内含物中大量的的是淀粉。用 PAS 反应染色时,堆积的淀粉粒即使在 1 μ m 的薄切片上也相互重叠。用苏丹黑 B 染色 Epon 812 包埋的薄切片,揭示了水稻成熟花粉中存在一定数量的脂类颗粒(图版 II:12),这是以前未见报道的。用考马斯蓝 R 或酰胺黑染色 Epon 812 和 GMA 薄切片,细胞质内均为弱反应,而内壁及萌发孔处塞子下为强烈的正反应(图版 II: 13)表明水稻成熟花粉中不存在贮存形式的蛋白体,而壁层内,尤其是萌发孔处有大量蛋白质存在,这可能与自交的亲和性等蛋白识别问题有关。

营养核 在水稻成熟花粉中,营养核呈变形虫状,有大而明显的核仁,在切面上表现出各种形态,而且它常与一个精子紧密的连结,有时二者似仅一壁之隔,有时营养核长的外突与精细胞延伸的细胞质相接近(图版 II: 17,18)。

精细胞 水稻成熟花粉中两个精子在切面上表现出各种形态,大多数呈纺锤形,一般精细胞一端细胞质延伸成尾状,细胞核有浓厚的染色质和明显的核仁,而且两个精子间也有紧密的联系。虽说在同一切面上同时显示两个精细胞不容易,但我们还是在若干张切片中看到了两个精细胞或头对头、或并列或有细胞质连结的现象,至于营养核与精细胞及一对精细胞之间是否连结成雄性生殖单位,还有待进一步的研究^[9]。

讨 论

一. 薄切片的优越性

水稻的花药很小,而且花粉粒中有大量的淀粉,一般厚度的石蜡切片染色后整个花粉粒中充满淀粉粒,其中营养核和精细胞以及壁的结构很难观察清楚。本实验采用塑料包埋的薄切

片方法可克服这些缺点, GMA 和各种环氧树脂包埋的样品, 可以在普通切片机上用玻璃刀切到 $1-3\ \mu\text{m}$ 的薄片, 这样极大地提高了分辨率, 在高倍的光镜下就可以观察到较细微的结构, 如花粉壁的各层结构, 营养核和精子的形态及相互联系。由于这样的薄切片不需脱蜡脱水等繁琐步骤, 可直接进行各种组织化学测定、荧光、免疫荧光等试验。在研究细胞和组织的结构成分及贮存的物质时, 塑料包埋的薄切片比传统的石蜡切片有很大的优越性。

二. 绒毡层膜上细胞印迹的来源

本实验对绒毡层膜和马氏体作了较详细的观察。从分离的绒毡层膜的整体封片可见乌氏体在绒毡层膜上的分布是不均匀的, 而是呈规则的多边形形状, 似细胞印迹。因为绒毡层膜位于绒毡层细胞的内切向壁一侧, 所以过去一般认为多边形形状是绒毡层细胞的印迹。但结合我们在花药纵切面的切片上看到的每两个花粉粒的交界处绒毡层膜向药室腔内折叠的现象, 我们推测所见的多边形轮廓是花粉粒在绒毡层膜上的印迹。为此, 我们拟做一个实验: 在绒毡层细胞消失之前测量它的大小, 并对同一时期的绒毡层膜上细胞状轮廓、花粉粒的大小也进行测量, 比较它们之间大小的关系, 有可能得出确切的结论。

参考文献

- [1] 朱激, 高碘酸-锡夫反应作为一种染色方法在组织学上的应用。植物学报, 1963, 11(2): 155-164.
- [2] 朱激, 派洛宁 B 的一个黄色组分作为孢粉素荧光染料的试验。植物学通报, 1983, 1(1): 53-55.
- [3] 胡适宜、朱激、徐丽云, 小麦雄配子体的超微结构。植物学报, 1981, 23(2): 85-91.
- [4] 胡适宜, 被子植物胚胎学。高等教育出版社, 1987, 20-51.
- [5] 胡适宜、杨坚, 春兰花粉壁的结构及其与花粉粘合的关系。植物学报, 1989, 31(6): 414-421.
- [6] 胡适宜, 雄性生殖单位和精子异型性研究的现状。植物学报, 1990, 32(3): 230-240.
- [7] 胡适宜、徐丽云, 显示环氧树脂厚切片中多糖、蛋白质和脂类的细胞化学方法。植物学报, 1990, 32(11): 841-846.
- [8] 徐是雄等, 稻的形态与解剖。农业出版社, 1982.
- [9] 徐丽云、胡适宜, 环氧树脂厚切片的染色。植物学通报, 1986, 4(1-2): 108-110.
- [10] 戴伦焰、曾子中, 水稻胚囊的形成与发育。武汉大学学报, 1966, 66: 3-8.
- [11] Johri, B. M.(Ed.), Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
- [12] Jones, T. J. and T. L. Rost, Histochemistry and Ultrastructure of Rice Zygotic Embryogenesis. Amer. J. Bot. 1989, 76: 504-520.
- [13] Raghavan, V., Anther and Pollen Development in Rice. Amer. J. Bot., 1988, 75: 183-196.
- [14] Vithanage, H. I. M. V. and R. B. Knox, Pollen Development and Quantitative Cytochemistry of Exine and Intine Enzyme in Sunflower. Ann. Bot., 1979, 44: 95-106.
- [15] 木原均、平吉功, 稻花粉粒の发达。农业与园艺, 1942, 27(1): 1-5.

STRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES ON MATURE ANTHER AND POLLEN GRAIN OF RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

Zhou Yibing

(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

Abstract

A study on the structure of mature anther and pollen grain of rice is conducted with both GMA and Epon 812 semi-thin sections by using light microscope; meanwhile, the compositions of wall materials and ergastic substance of cells are tested with different histochemical methods. The isolated tapetal membranes are studied by using both light microscope and electron microscope. It is demonstrated that anther wall and pollen wall of rice have the general characteristics of Gramineae. There are silicious grains in the epiderm cells of anther probably. Lipid grains are found both in epiderm cells of anther and in pollen grains. The endothecium of anther and the intine of pollen are cellulose in nature, the exine of pollen and the wall of Utricle body are sporopollenin in nature. Close associations between the vegetative nucleus and the two sperms are observed and discussed. The source of the cell-print on tapetal membrane and the advantages of the semi-thin sectioning to the paraffin sectioning are also discussed.

Key words: *Oryza sativa* L.; Anther; Pollen grain; Semi-thin sectioning; Histochemistry

图版说明

B — 基粒棒; C — 角质层; E — 表皮细胞; En — 药室内壁; ML — 中层; Sp — 精细胞; T — 绒毡层;
UB — 乌氏体; VN — 营养核;

图版 I

1. 花药壁的结构。×7 900;
2. 花粉壁的结构。“△”示外壁外层的通道; “**”示内壁的微孔。×13 000;
3. 萌发孔的结构。示塞子结构 ↓ 示 Z 层。×7 700;
4. 乌氏体与绒毡层和花粉壁的关系。×31 000;
5. 乌氏体的结构。中央为电子透明区, 外壁上有通道(↑)。×27 000;
6. 乌氏体的分布。×10 000;
7. 穿孔层和悬挂乌氏体的索。×20 000;
8. 图版 I: 10 的部分放大, 示绒毡层膜在花粉粒间的内折。×200;
9. 穿孔层。×25 000;

10. 乙酰解后的花药,示包围着花粉粒的透明的绒毡层膜囊。×59。

图版 II

11. Epon812 薄切片 PAS 加苏丹黑染色,示多糖和脂类。↑示表皮细胞内脂类颗粒。×880;
 12. Epon812 薄切片苏丹黑染色,示花粉粒内和药壁内的脂类颗粒。↑示表皮细胞内脂类颗粒。×1 300;
 13. Epon812 薄切片考马斯蓝染色,示塞子下的强烈正反应。↑示塞子。×1 400;
 14. GMA 薄切片派洛宁 B 黄色组分染色,示孢粉素质的外壁(u)和乌氏体。×1 400;
 15. GMA 薄切片荧光增白剂染色,示花药表皮上的颗粒。×1 200;
 16. GMA 薄切片荧光增白剂染色,示纤维素质的花粉粒内壁和药壁的纤维层。×1 300;
 17. GMA 薄切片 T.B.O 染色,示营养核与两个精细胞间的联系。×1 500;
 18. GMA 薄切片 T. B. O. 染色,示营养核与一精细胞的联系。×1 500;
 19. 绒毡层膜经 1% 番红水溶液染色后,示细胞状多边形印迹。×1 000;
 20. 图版 II: 19 的部分放大,示乌氏体的中央透明区。×1 500。

Explanation of Plates

B — Bacula; C — Cuticle; E — Epiderm Cell; En — Endothecium; ML — Middle Layer; Sp — Sperm;
 T — Tapetum; UB — Ubisch Body; VN — Vegetative Nucleus; Vn — Vegetative nucleolus.

Plate I

1. Electron micrograph showing the ultrastructure of the anther wall. ×7 900;
 2. Electron micrograph showing the ultrastructure of the pollen wall. Note the channels on the tectum (△) and the pores on the intine (*). ×13 000;
 3. The ultrastructure of the aperture, showing the operculum and the Z-layer (arrow). ×7 700;
 4. Electron micrograph showing the relationship among Ubisch body, tapetum and exine. ×31 000;
 5. The ultrastructure of Ubisch bodies, showing the low electron density center and the channels on the wall (arrow). ×27 000;
 6. The electron micrograph showing the distribution of the Ubisch bodies. ×10 000;
 7. Electron micrograph of an isolated tapetal membrane, showing the fenestrated layer and the reticulum interlinkings between the Ubisch bodies and the fenestrated layer. ×20 000;
 8. An enlarged portion of Fig. 10, showing the shrinkage of the tapetal membrane between pollen grains. ×200;
 9. Electron micrograph showing the fenestrated layer of the tapetal membrane. ×25 000;
 10. Light micrograph showing an acetolysis-resistant tapetal membranous sac. ×59

Plate II

- 11-13. Epon 812 semi-thin sections, light micrographs.
 11. Stained with PAS and Sudan black B, showing lipids in the epiderm cell (arrow) and in the pollen grains, polysaccharides in the pollen grains. ×880;

12. Stained with Sudan black B, showing the lipids in the epiderm cell (arrow) and the pollen grain. $\times 1\,300$;
13. Stained with Coomassie brilliant blue R, showing the positive reaction under the operculum (arrow). $\times 1\,400$;
- 14–16. GMA semi-thin sections, stained with different fluorescent dyes, fluorescence micrographs.
14. Stained with yellow fraction of pyronin B, showing the deposition of sporopollenin on the exine and the wall of Ubisch body (with yellow fluorescence). $\times 1\,400$;
- 15–16. Stained with Calcofluor white M2R.
15. Showing the grains on the epiderm cell of anther. $\times 1\,200$;
16. Showing the cellulose on the intine and the endothecium. $\times 1\,300$;
- 17–18. GMA semithin sections, stained with T. B. O., light micrographs.
17. Showing the close association between the Vegetative nucleus and the two sperm cells. $\times 1\,500$;
18. Showing the close association between the vegetative nucleus and the sperm cell. $\times 1\,500$;
- 19–20. Light microscope photographs of the portion of flattened tapetal membrane stained with 1% safranin solution.
19. Showing the configuration of several tapetal cells which acted as template for its formation. $\times 1\,000$;
20. Showing the transparent center of the Ubisch bodies. $\times 1\,500$.



