

水稻中央细胞发育期间超微结构变化的观察

刘向东 卢永根 徐是雄* 徐雪宾

(华南农业大学农学系, 广州 510642) *(香港大学植物学系, 香港薄扶林道)

摘要 本文通过透射电镜对水稻受精前胚囊中央细胞发育过程中超微结构的变化进行观察。结果表明, 八核胚囊形成后很快就进行细胞化形成7个细胞, 其中刚形成的中央细胞由1个大液泡、2个极核(珠孔端和合点端各1个)和一些含有丰富细胞器的胞质组成。中央细胞以后的发育主要是极核的发育和极核周围胞质的变化。极核发育经历以下过程: a. 2个核都膨大呈“椭圆”形。核周围胞质呈不对称分布。b. 2个核分别向胚囊中央移动并相互靠近。之后2个极核调整排列方式, 由纵排(即与胚囊纵轴平行)变成横排。此时期有细胞质“桥”联结珠孔端卵器、2个极核和合点端反足细胞器。c. 横排的极核移向卵器, 并排列于卵细胞之上。此时胚囊未明显膨大, 但极核相靠近的两边核膜有许多处已形成“融合桥”, 核周围的胞质也起较大的变化, 如质体内淀粉消失和光面内质网增加等。极核进一步发育直至胚囊成熟期间, 极核排列方式及其周围胞质组成未观察到明显的变化, 但胚囊体积明显增大。

关键词 水稻; 胚囊发育; 中央细胞; 极核; 超微结构

AN ULTRASTRUCTURAL STUDY ON THE DEVELOPMENT OF CENTRAL CELLS IN RICE EMBRYO SAC

Liu Xiangdong Lu Yonggen Xu Shixiong (S. Y. Zee)* Xu Xuebin

(Department of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

*(Department of Botany, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong)

Abstract An ultrastructural study on the development of the central cell was carried out on rice (*Oryza sativa* L.). The results showed that following the formation of the eight nuclei in the embryo sac, cellularization took place resulting in the formation of seven cells. One of the cells situated in the centre of the embryo sac was the central cell. The central cell contained a large vacuole, two polar nuclei (located in micropylar part and chalzal end, respectively) and a large number of cytoplasmic organella. Further development of the central cell mainly involved changes in the orientation of the polar nuclei and the distribution of the cytoplasm. Changes in the orientation of the polar nuclei involved the following stages of development: a. The two polar nuclei increased in size and became elliptical in shape. On both sides of the polar nuclei the cytoplasm showed an asymmetrical pattern of distribution. b. The two polar nuclei moved to the central region of embryo sac. At this stage the two polar nuclei were close to each other and they were

lying ("one on top of the other") in parallel to the long axis of the embryo sac. When the polar nuclei moved to the central region of the embryo sac, a thick strand of cytoplasm (forming a cytoplasmic "bridge") became associated with the polar nuclei. The cytoplasm "bridge" ran from one end of the embryo sac to the other. c. The two polar nuclei began to move towards the egg cell and finally "sat" themselves on the top of the egg cell. The two polar nuclei had by now changed from a parallel (one on top of the other) to perpendicular (side by side) orientation (with respect to the long axis of the embryo sac). The side of the nuclear envelope of the two polar nuclei facing each other produced a lot of protrusions and fusion bridges throughout the different stages of development and reorientation of the polar nuclei. The cytoplasm surrounding the polar nuclei also went through some changes e. g. starch grains disappeared and smooth ER increased. Up till stage c the size of the embryo sac did not change much. But immediately after the completion of stage c the embryo sac greatly increased in size. The embryo sac then reached full maturity and apparently did not undergo any further changes.

Key words Rice (*Oryza sativa*); Embryo sac; Central cell; Polar nuclei; Ultrastructure

植物生殖细胞发育过程超微结构的变化规律对于进一步开展生殖过程分子细胞生物学研究具有重要的作用。近几年已有不少学者对有关问题进行研究^[1-6]。水稻生殖细胞发育某个阶段(如成熟的花粉和胚囊等)的超微结构已有报道^[7,8],但发育不同阶段的超微结构及其变化规律却未见深入报道,特别是未见对胚囊内各细胞(包括卵细胞、助细胞、反足细胞和中央细胞等)发育期间的超微结构进行系统研究,这与水稻作为重要的粮食作物是不相称的。为此,我们以具代表性水稻品种 IR36 作为材料,对水稻胚囊和花粉形成与发育过程中的细微变化作深入系统的研究,为进一步开展水稻生殖分子生物学研究提供细胞学依据。

本文报道水稻未受精胚囊中央细胞发育期间超微结构的变化。有关水稻中央细胞及其极核的细胞学前人已作了一些研究。杨立炯^[9]、戴伦炎等^[10]和星川清新^[11]在光学水平上对水稻中央细胞中的极核移动和排列方式作了描述。董健等^[8]对开花前一天、即将开花和开花后 6 h 的极核进行超微结构的研究。本文是在这些研究的基础上进一步的研究。

1 材料与方 法

供试材料为水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种 IR36, 于 1995 年早季种植于华南农业大学教学实验场。田间管理按常规方法进行。当小穗发育至 8 mm 长并开始转绿时,以小穗宽度作为粗略的指标,对不同发育时期的胚囊进行固定。固定方法是,挑出子房先用 3% 戊二醛和 1.5% 聚甲醛混合液室温固定 4 h,然后在 4℃ 过夜,二甲胍酸钠缓冲液 (pH7.2) 冲洗三次后转入 1% 锇酸固定 2 h(室温),二甲胍酸钠缓冲液冲洗后用乙醇脱水,TAAB 包埋,钻石刀切片(个别材料作连续切片),经醋酸双氧铀和柠檬酸铅先后染色后,在 Joel × 100 电子显微镜下观察。

2 观察结果

水稻八核胚囊形成后,很快就进行细胞化形成 7 个细胞,即合点端 3 个反足细胞,珠孔端

1个卵细胞和2个助细胞, 胚囊中央1个中央细胞。中央细胞占胚囊大部分空间, 包含中央大液泡、2个极核(珠孔端和合点端各1个)和一些含有许多线粒体, 内质网、核糖体和造粉体的细胞质。中央细胞的胞质主要位于壁的附近和极核的周围。刚形成的中央细胞大小约为 $80 \times 100 \mu\text{m}$ 。中央细胞进一步的发育主要是极核的发育和极核周围胞质的变化。极核的发育经历以下过程:

a. 位于珠孔端和合点端的极核都膨大成“椭圆”形(图版 I: 1,2; 图 1a)。珠孔端的极核位于2个助细胞交界处的侧边, 中间隔着一层细胞质; 合点端的极核紧靠反足细胞, 中间隔一层薄的细胞质, 胞质内含有许多线粒体。珠孔端和合点端的极核周围的胞质都呈不对称分布(图版 I: 1,2; 图 1a), 各自左右两侧细胞质多, 上下2端(即朝合点和朝珠孔2端)细胞质少。左右2侧的胞质也呈不对称, 其中一端多, 另一端则少, 胞质少的一端细胞器数量较多, 特别是其中的造粉体。

b. 膨大后的极核分别向胚囊中央移动并相互靠近(图版 I: 4; 图 1b)成纵列。此时极核的核仁内有许多“小液泡”, 与其之前的时期相似。在极核移动的过程中, 周围的胞质也随之移动, 形成1条联结珠孔端卵器、中间2个极核和合点端反足细胞器的细胞质“桥”(图版 I: 6; 图 1b), 该细胞质“桥”内含有大量的线粒体, 内质网、造粉体、核糖体和一些高尔基体。细胞质“桥”一直存在到胚囊近成熟。细胞质“桥”两侧为大液泡。

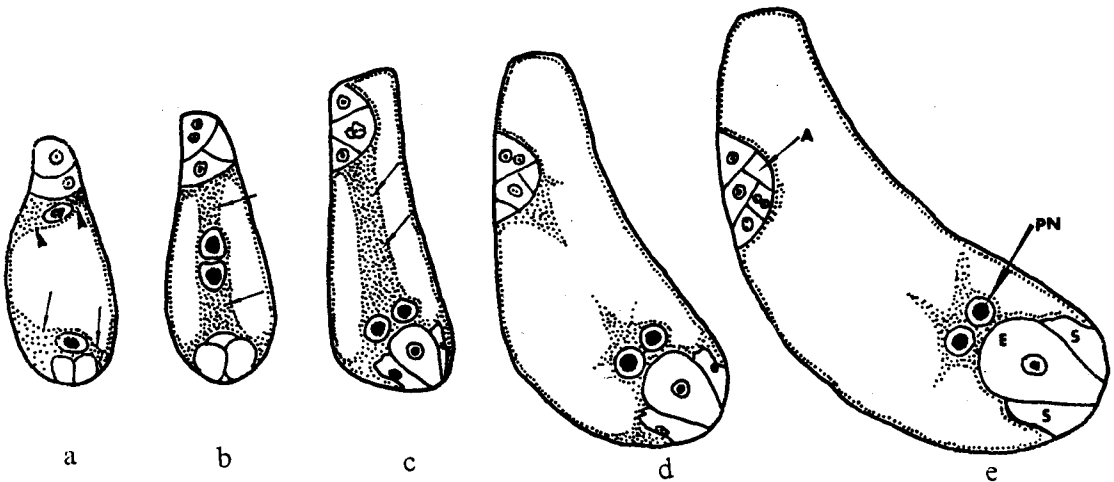


图1 水稻胚囊发育期间不同阶段中央细胞形态和内部结构变化示意图

Fig. 1 Diagrams showing morphological and structural changes of central cell during different stages of 8-nucleate embryo sac development in rice

S—助细胞 Synergid; A—反足细胞 Antipodal; E—卵细胞 Egg cell; PN—极核 Polar nucleus

a. 膨大的极核和不对称胞质(箭和箭头), 图中的卵细胞和1个反足细胞未显示; b. 2个极核移向中央并相互靠近, 示细胞质“桥”(箭), 图中的卵细胞未显示; c. 2个极核并排于卵器上方, 示细胞质“桥”仍然存在 a. The enlarging polar nuclei and the asymmetric pattern of distribution of the cytoplasm (arrow and arrowhead). Egg cell and one of the antipodal cells are not shown; b. The two polar nuclei have moved to the central region of the embryo sac. The two nuclei are very close to each other. A cytoplasmic “bridge” is shown (arrow). Egg cell is not shown. c. The two polar nuclei lying on the top of the egg cell in a side by side position. The cytoplasmic “bridge” (arrow) persists.

相靠近的2个极核开始成纵列(即与胚囊纵轴平行),均呈“馒头状”(图版I:4)。以后则观察到2个极核形状发生改变,相靠近核膜的2端突出(图版I:5)。2个极核核膜之间包裹一团含有大量核糖体和一些内质网的胞质,胞质中不含质体。2核外围的胞质组成与其之前的时期的胞质组成基本相似。在极核移向卵器期间,极核的排列方式由原来的纵排变成横排。

c. 横排的极核移向卵器,最后排列于卵细胞之上(图版I:3;图1c)。此时极核本身及其周围胞质都发生较大的变化,2个极核相靠近的两边核膜多处融合在一起,形成“融合桥”(图版I:3)，“融合桥”之间的胞质内含有线粒体、质体和核糖体等细胞器。极核的核仁变成球形,中间的“小液泡”数量减少,出现个别稍大的“液泡”。极核周围造粉体消失,出现许多带状光面内质网和脂滴等。此时胚囊的大小约为 $90 \times 100 \mu\text{m}$,未明显膨大。

d. 极核进一步发育至胚囊成熟期间,极核排列方式及其周围胞质组成未观察到明显的变化,但胚囊体积明显增大(图1d,e)。

3 讨论

植物中央细胞的超微结构已有研究^[4,5,8],但有关极核在发育过程中形态的变化和排列方式改变及其机理等却未见报道。本文通过连续切片对水稻极核的观察,发现水稻极核在发育过程中,其形状的变化有一定的规律性;当合点和珠孔两端的极核膨大时,极核呈“椭圆”形,两头稍尖,其长轴与胚囊纵轴垂直;当两个极核在中央相互靠近成纵列时,极核变成“馒头”状,即上极核朝合点端部分的周边呈圆弧状,朝向珠孔端部分的周边较平直,下极核刚好相反;当两个极核横排于卵细胞上方时,极核形状变得不规则,彼此相靠近的核膜之间许多处形成“融合桥”。位于胚囊中部的2个极核移向卵器期间,极核还出现较为特殊的形状变化,这种形状变化的发生实现了极核由原来的纵排变成横排。据观察,初步认为极核由纵排变成横排的过程可能是:先是在中央相互靠近的上下两个极核,它们相邻的核膜各有一端(角端,图版I:5)突出,其中上极核突出方向朝下(即朝珠孔端),下极核突出方向朝上(即朝合点端),此期间极核核膜内的核质也随之充满突出部分,这样核形状改变的同时核的位置也相应改变。以后2个极核突出部分体积逐渐加大,由于2个极核的交界面始终未发生改变,所以随着突出部分的进一步加大,就逐渐实现了极核由纵排变成横排(图2)。极核的移动早已被人们所认识,但如何实现这种位移却未见报道。本文的结果显示,极核是通过形状改变实现位移的,与低等生物亚

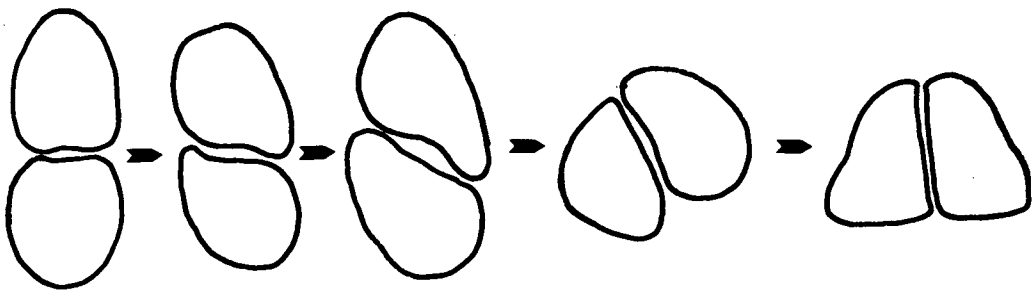


图2 极核排列方式改变过程示意图

Fig. 2 Diagrams showing the process of re-orientation of the two polar nuclei from an "one on top of the other" position to a "side by side" position

米巴的运动相似。值得一提的是,2个极核实现位移的全过程发生在胚囊明显膨大前,而胚囊明显膨大主要发生在此过程之后。这种发育方式使极核移动距离缩短,以利此过程快速地完成。

极核核仁在极核移动过程中,其形态结构也发生较大的变化,在2个极核移向卵细胞上方之前,极核核仁外形不规则,内部有许多“小液泡”;当2个极核移到卵细胞上方时,核仁变成圆形,内部“液泡”减少。以上结果似乎显示极核在移向卵器上方前,其代谢较为活跃。

有关极核周围胞质的变化曾有报道^[4,5],但由于有关作者以胚囊大小或受精前的不同天数作为观察时期,所以较难作出较有规律性的归纳。本文采用极核发育过程具有明显特征变化且易捕捉到的阶段作为观察的时期,对其周围的胞质进行观察,发现以下规律:

a. 极核周围的胞质状况有较大的变化幅度,具体表现在:两个极核移向中央之前,极核周围的胞质呈不对称分布,胚囊中央为大液泡所占据;在2个极核移向中央并相互靠近时,极核周围胞质随之移动,形成细胞质“桥”,此“桥”联结珠孔端的卵器、中央的2个极核和合点端的反足细胞器;到胚囊成熟时,细胞质“桥”消失,极核周围的胞质相对变得较少。

b. 细胞器变化明显。其中最为突出是造粉体和内质网的变化,在极核移向卵器上方之前,极核周围有大量的造粉体和短管状的内质网;当极核到达卵细胞上方时,质体内的淀粉粒消失,出现许多的带状内质网,这种淀粉粒消失可能与极核移动的耗能有关。

从水稻极核形态和位置的变化,以及极核周围胞质的变化可以看出,水稻八核胚囊形成后明显经历两个阶段:一是极核的运动阶段,此期间胚囊未明显增大,极核周围胞质内含有淀粉粒;二是胚囊增大阶段,此期间极核本身的排列方式不再改变,但极核周围胞质却发生较大的变化。

致谢:香港大学电镜室的工作人员为本研究提供许多方便。香港大学理学院晒相室协助本研究大量照片的冲晒。此外,香港大学植物学系佟穗海和谭志辉博士给予本研究许多的帮助。本研究得到香港RGC的部分资助。在此一并致谢。

参考文献

- 1 Engell K. Embryology of barley IV. Ultrastructure of the antipodal cells of *Hordeum vulgare* L. cv. Bomi before and after fertilization of the egg cell. *Sex Plant Reprod*, 1994, 7:333-346
- 2 Folsom M W, Cass D D. Embryo sac development in soybean: cellularization and egg apparatus expansion. *Can J Bot*, 1990, 68:2135-2147
- 3 Polowick P L, Sawhney V K. An ultrastructural study of pollen development in tomato (*Lycopersicon esculentum*) II. Pollen maturation. *Can J Bot*, 1993, 71:1048-1055
- 4 Wilms H J. Ultrastructure of the developing embryo sac of spinach. *Acta Bot Neerl*, 1981, 30:75-99
- 5 Yan H, Yang H Y. Ultrastructure of the developing embryo sac of sunflower (*Helianthus annuus*) before and after fertilization. *Can J Bot*, 1991, 69:191-202
- 6 Zaki M, Kuijt J. Ultrastructural studies on the embryo sac of *Viscum minimum*: II. Megagametogenesis. *Can J Bot*, 1994, 72:1613-1628
- 7 周一兵. 水稻成熟花药和花粉的结构和组织化学研究. *热带亚热带植物学报*, 1993, 1(1):39-46
- 8 董健, 杨弘远. 水稻胚囊超微结构的研究. *植物学报*, 1989, 31(2):81-88
- 9 杨立炯. 稻之胚胎发育与授精之研究. *中华农学会报*, 1947, 185:1-15

10 戴伦焰, 曾子申. 水稻胚囊形成与发育. 武汉大学学报(自然科学版), 1964, 2:97-110

11 星川清新, 蒋彭炎, 许德海译. 稻的生长. 上海: 上海科学技术出版社, 1980, 222-223

图版说明

S—助细胞; A—反足细胞; M—线粒体; P—质体; V—液泡; ER—内质网; G—高尔基体
图版中珠孔端位置位于照片的下部(除特别注明外)。

1. 示珠孔端极核(箭头)和不对称胞质(箭)(珠孔端位于照片的左侧); $\times 2500$
2. 示合点端的极核(箭头)和不对称胞质(箭)(珠孔端位于照片的上方); $\times 2500$
3. 示2个极核并排于卵细胞(未显示)上方, 箭头所指为“融合桥”; $\times 4000$
4. 示2个极核移向中央并相互靠近; $\times 2000$
5. 示2个极核核膜相靠近的两端突起(箭头); $\times 6000$
6. 示细胞质“桥”。 $\times 5765$

Explanation of plate

S— Synergid; A— Antipodal cell; M— Mitochondrion; P— Plastid; V— Vacuole; ER— Endoplasmic reticulum; G— Dictyosome. The micropylar end is on the lower part of photographs except indicated otherwise.

1. Polar nucleus (arrowhead) and asymmetric cytoplasm (arrows) in the micropylar region. The micropylar end is on the left side of the photograph; $\times 2500$
2. Polar nucleus (arrowhead) and asymmetric cytoplasm (arrows) in the chalazal region. The micropylar end is on the upper side of the photograph; $\times 2500$
3. The two polar nuclei (side by side) attach themselves closely to the top region of the egg cell (not shown). The arrowhead shows a "fusion bridge"; $\times 4000$
4. The two polar nuclei have moved to the central region of the embryo sac. The two nuclei are very close to each other; $\times 2000$
5. Nuclear membrane protrusions (arrowheads) are obvious in the gap region between the two polar nuclei; $\times 6000$
6. The cytoplasmic "bridge". $\times 5765$