

麻疯树小孢子发育的超微结构研究

刘焕芳^{1,2,3}, 廖景平^{1,2*}, 吴国江¹

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 广东省数字化植物园重点实验室, 广州 510650; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:用透射电镜观察了麻疯树(*Jatropha curcas* L.)小孢子发育的超微结构。小孢子母细胞时期内质网和质体较多;减数分裂和四分体时期,细胞处于明显的代谢活跃状态,细胞器丰富,主要有内质网、线粒体、质体、高尔基体和球状体;在小孢子发育早期和晚期,线粒体和内质网仍较丰富;小孢子经过高度的不对称分裂后,形成较大的营养细胞和较小的生殖细胞,营养细胞中细胞器数量明显减少,含大量的淀粉和脂类物质,生殖细胞中脂类物质丰富;表皮、药室内壁和中层细胞在小孢子母细胞和四分体时期淀粉粒丰富,小孢子时期明显减少,绒毡层从小孢子母细胞至小孢子发育晚期的细胞器都很丰富,主要为内质网、质体和线粒体,为二胞花粉发育奠定基础。

关键词:麻疯树;小孢子发育;超微结构;绒毡层;淀粉;脂类

中图分类号:Q944.57

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2007)02-0107-08

Ultrastructure of Microspore Development in *Jatropha curcas* L.

LIU Huan-fang^{1,2,3}, LIAO Jing-ping^{1,2*}, WU Guo-jiang¹

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Key Laboratory of Digital Botanical Garden in Guangdong, Guangzhou 510650, China; 3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The ultrastructure of microspore development in *Jatropha curcas* L. was observed under transmission electron microscopy. Many endoplasmic reticulums and plastids are present at microsporocyte stage. Organelles including endoplasmic reticulum, mitochondria, plastids, dictyosome and sphaeroplasts are rich in microspore at meiosis and tetrad stages. And mitochondria and endoplasmic reticulum are still abundant during early and late microspore stages. The microspore divides into a large vegetative cell and a small generative cell. The vegetative cell abounds with starch grains and the generative one is rich in lipids. A great number of starch grains occur in epidermis, endothecium and middle layers at microsporocyte and tetrad stages, and are remarkably reduced at microspore stage. The tapetum is rich in organelles from microsporocyte stage till late microspore stage, mainly including endoplasmic reticulum, plastids and mitochondria. Starch grains and lipids supply nutrients for the pollen development.

Key words: *Jatropha curcas* L.; Microspore development; Ultrastructure; Tapetum; Starch grains; Lipids

麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 属于大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属, 原产美洲热带地区, 我国广泛分布于广东、广西、云南、四川、贵州、台湾、福建和海南等省区^[1-2]。麻疯树耐干旱贫瘠, 可用于

荒山造林, 是一种多用途植物, 在工业用油、生物病虫害防治、新药开发、染料和肥料等方面具有广泛的应用价值^[3-4]。迄今为止, 关于麻疯树的研究, 多集中在其化学成分、毒理药理研究^[5-8]、核型^[9]和花粉形

收稿日期: 2006-08-16 接受日期: 2006-11-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2003C201033, 2005B20801009, 2006B20201009), 国家自然科学基金项目 (39870087, 30370099, 40332021), 中国科学院方向性项目 (KSCX2-SW-130) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

态^[10]等方面,而对其胚胎学研究报道较少。作者曾对麻疯树小孢子发生及雄配子体发育进行观察(另文报道),本文在前文基础上对麻疯树小孢子发育的超微结构进行观察研究,为花粉发育生物学增添资料。

1 材料和方法

研究材料麻疯树(*Jatropha curcas* L.)采自中国科学院华南植物园药园。凭证标本(刘焕芳 003)保存在中国科学院华南植物园标本馆(IBSC)。于 2005 年 6 月上旬采集不同发育阶段的花序,取花药,用 2%戊二醛(pH7.0 磷酸缓冲液配制)和 1%锇酸双重固定,系列酒精脱水,环氧丙烷过渡, Epon812 包埋后,先用 LKB-11800 切片使用玻璃刀切成厚度为 2 μm 的半薄切片,甲苯胺蓝染色后在光学显微镜下初步观察以确定花药的发育时期,然后用 Leika Ultra S-2 切片钻石刀切片,厚 80–90 μm , 2% (w/v) 醋酸双氧铀染色 60–90 min, 6% (w/v) 柠檬酸铅染色 15 min, 日本电子 TEM-1010 电子显微镜 90 kV 观察并拍照。

2 结果

2.1 造孢细胞期

在造孢细胞时期,造孢细胞排列紧密,呈多边形,细胞核明显且位于细胞的中央,核质中还含有额外核仁,在细胞质中分布有较多的小液泡和细胞器,细胞器主要是电子密度较高的质体、内质网和高尔基体(图版 I:1)。

在花药内部分化出造孢细胞的同时,花药的药壁组织也开始分化,基本可将药壁从外向内区分为表皮、药室内壁、中层和绒毡层四层细胞。其中,药壁外面 3 层细胞的细胞质浓厚、细胞核中的核仁明显,每个细胞都含有少量的液泡,细胞器稀少。绒毡层细胞中含有极少量的小液泡,细胞器较少,只有零星的质体分布。

2.2 小孢子母细胞期

在小孢子母细胞时期,花粉母细胞的形状已基本呈圆形,在细胞外形成胼胝质壁(图版 I:2),壁上有胞质通道(图版 I:3)。内质网丰富,核糖体很多,出现一定数量的高尔基体和球状体(图版 I:4)。

在花药壁的表皮、药室内壁和中层细胞中,形成较大的液泡,积累了一些淀粉粒,而在其他细胞

器中的淀粉粒数量较少。绒毡层的细胞发生了明显的变化,细胞径向伸长,其厚度要大于其它 3 层细胞。在绒毡层细胞中出现了一些液泡及其它细胞器,细胞器主要有线粒体、内质网和造粉质体(图版 I:5)。

2.3 小孢子母细胞减数分裂期

小孢子母细胞在减数分裂时期处于孤立的状态,它被胼胝质包围,切断了与绒毡层的联系,分裂前原生质发生收缩,细胞质中细胞器含量极为丰富。内质网数量极多,有的与质体和线粒体相连,此时有部分细胞质出现被内质网或同心圆的双膜包被的现象,推测是为了保护细胞质中部分核糖体免遭降解(图版 I:6)。质体、线粒体、高尔基体和微体的数量也多,有的质体中开始沉积脂类物质(图版 I:6, 7),球状体数量增多(图版 I:8)。

花药壁的表皮、药室内壁和中层继续液泡化,含大量的淀粉粒。绒毡层在靠近药室一侧开始形成大液泡,细胞质内造粉质体较多,还含有造油体、球状体、高尔基体和线粒体(图版 I:9, II:10)。

2.4 四分体时期

花粉母细胞被厚厚的胼胝质壁包围,减数分裂为连续型,四分体呈四面体形或十字形排列(另文发表)。四分体细胞的细胞核较大,核仁明显,其细胞质中液泡增多增大并开始出现少量的脂滴(图版 II:11)。随着发育,四分体细胞的体积明显增大,细胞质膜发生波纹状加厚,并开始沉积电子密度较大的黑色物质(图版 II:12)。可能是花粉外壁最早形成的沉淀物,为以后由绒毡层转运来的孢粉素物质提供沉淀模型。

四分体时期药壁中的表皮、药室内壁以及中层细胞液泡化明显,细胞质中仍含有很多的淀粉粒。绒毡层细胞在靠近药室一侧形成很大的液泡(图版 II:13),细胞质内含大量的内质网、造粉质体和造油体(图版 II:14)。在四分体后期,药壁中的表皮、药室内壁以及中层细胞液泡化更加明显,细胞质被挤到了细胞边缘,只占很少一部分。药室内壁和中层没有细胞器出现,绒毡层的大液泡解体消失,形成的降解物可能提供营养以满足小孢子发育的需要,此时绒毡层内仍含有大量的造粉质体和造油体(图版 II:15)。

2.5 小孢子发育早期

随着包围四分体的胼胝质壁溶解,四分体中的

4个小孢子彼此分离。游离小孢子早期形状不规则,呈皱缩状(图版 II:16),小孢子外壁已经形成一连续的单层结构,上面径向分布着一些基柱状结构,此时内壁尚未发育。含有一个位于中央的较大的细胞核,细胞质浓厚,液泡较大,细胞质中细胞器丰富,主要为线粒体和内质网,线粒体多为球形和椭圆形,脊很明显(图版 II:17)。在药壁细胞中,表皮和药室内壁的液泡化增强,细胞仍为长方形,表皮外表面细胞壁增厚,中层细胞变为扁平,淀粉粒含量极少(图版 II:18)。绒毡层细胞的径向壁变得不明显,胞质中内质网含量极为丰富,呈弯曲垛叠状(图版 III:19)。

随着发育,游离小孢子形状变为圆形,小孢子含有1个位于中央的较大的细胞核,此时花粉内壁开始形成(图版 III:20)。在药壁细胞中,表皮、药室内壁和中层细胞中重新出现少量淀粉粒。绒毡层细胞中细胞器含量仍很丰富,主要为内质网、线粒体和造粉质体(图版 III:21)。

2.6 小孢子发育晚期

小孢子发育的晚期是以形成大液泡为标准。小孢子中的大液泡将细胞核挤到了细胞一侧,使小孢子处于极性状态,为其进行不均等分裂做好准备(图版 III:22)。小孢子细胞质内的细胞器仍较为丰富,主要是线粒体,线粒体体积显著增大,内脊明显,球状体又开始出现(图版 III:23)。花粉内壁和基柱也在进一步发育过程中,基柱之间充满了从绒毡层降解下来的物质。

在药壁组成细胞中,表皮和药室内壁仍然高度液泡化,但是淀粉粒明显减少,中层进一步压缩呈扁平状。绒毡层细胞的结构发生了显著的变化:细胞的径向壁基本消失,使整个绒毡层连成整体。绒毡层细胞内出现了大量的大小均一的小泡和很多的油滴,内质网也较多,绒毡层物质正在向药室内移动(图版 III:24),以供给花粉发育所用。

2.7 二胞花粉期

小孢子通过1次高度不对称的分裂,形成了大小不等,形态、结构不同的营养细胞和生殖细胞,大的营养细胞继承了原来小孢子的大部分细胞质,而小的生殖细胞只含有少量的细胞质(图版 III:25)。生殖细胞的细胞质中含有大量的脂类物质和少量的淀粉粒,营养细胞中的细胞器数量明显减少,细

胞器形状不明显,含有大量的淀粉粒和较多的脂类物质,细胞核内亦含有一定数量的脂滴(图版 III:26)。此时花粉内壁已完全形成,内壁厚度大于外壁。

这时药壁的绒毡层和中层已经完全降解,只剩下表皮和药室内壁,但表皮和药室内壁细胞也几乎为液泡所占据,细胞质被挤到了细胞边缘,只占很少一部分。绒毡层和中层降解后的残留物仍然吸附在药室内壁细胞上(图版 III:27)。

3 讨论

麻疯树花粉发育的各时期,核糖体及多聚核糖体丰富,具很多内质网、高尔基体及小泡和线粒体,显示出蛋白质、糖类及其它物质合成及运输的活跃,为小孢子的减数分裂、四分体的形成、游离小孢子的生长、生殖细胞与营养细胞的形成提供蛋白质、糖类及其它物质。小孢子母细胞减数分裂时,内质网含量极为丰富,可能与小孢子壁物质合成有关,高尔基体丰富,可能因为有大量的壁物质需要转运,表明内质网和高尔基体参与小孢子壁的发育^[11-12]。此时期部分细胞质被内质网或同心圆的双膜包被,推测是为了保护细胞质中部分核糖体免遭降解,这种现象在白菜(*Brassica campestris* L.)^[13]花粉发育过程中也曾观察到。有的内质网与质体和线粒体相连,可能有利于它们之间的物质运输,这种现象在大葱(*Allium fistulosum*)^[14]花粉的发育过程中也出现过。此时期,球状体数量也增多,球状体为残留部分细胞壁的球形体,一般由革兰氏阴性细菌所形成,其功能未见相关资料报道。

麻疯树小孢子二胞花粉期,营养细胞的细胞质中开始沉积大量的淀粉,生殖细胞的细胞质中含有少量的淀粉和较多的脂滴。麻疯树淀粉积累始期与番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[15]和老鹳草(*Geranium wilfordii*)^[16]的相同,比苏丹凤仙花(*Impatiens suhanii*)^[17]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[18]、大葱^[14]和小麦(*Triticum aestivum*)^[19]的要晚。番茄和老鹳草均是在生殖细胞脱离花粉壁后,营养细胞细胞质的质体开始沉积淀粉。苏丹凤仙花的花粉母细胞减数分裂的前期即含有造粉质体,但在小孢子外壁形成期,质体内的淀粉粒消失。拟南芥是在小孢子大液泡期开始积累淀粉。大葱和小麦淀粉积累始期是小孢子有丝分裂后期。淀粉和脂肪均为花粉的能量贮备,为二胞花粉进一步发育成熟准备了物质

基础。

麻疯树药壁的表皮、药室内壁和中间细胞在小孢子母细胞和四分体时期淀粉含量丰富,在游离小孢子时期淀粉含量急剧减少,可能是为小孢子的发育提供能量。绒毡层细胞在花粉发育过程中具有多种非常重要的功能:转运营养物质到药室中,合成胼胝质酶使四分孢子适时分离,指导花粉外壁的构建,提供花粉外壁中的识别蛋白^[20]。在麻疯树花药的发育过程中,绒毡层细胞的一个主要功能就是将多糖类营养物质转化为脂类物质。在游离小孢子期之前,绒毡层中贮藏了大量的造粉质体,在减数分裂以后的小孢子发育早期,绒毡层细胞中淀粉粒减少,开始出现脂类物质,到小孢子发育晚期,绒毡层细胞中出现大量的脂类物质,同时在小孢子内部也开始出现体积较小的脂类物质。这和白菜花药^[13]发育过程中出现的情况相同。

参考文献

- [1] Qiu H X (丘华兴). Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 44 (2) [M]. Beijing: Science Press, 1996:148. (in Chinese)
- [2] Chen J S (陈冀胜), Zheng S (郑硕). Toxic Plant in Chinese [M]. Beijing: Science Press, 1987:258. (in Chinese)
- [3] Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant unfulfilled promise [J]. Biom Bioen, 2000, 19:1-15.
- [4] Lin J (林娟), Zhou X W (周选围), Tang K X (唐克轩), et al. A survey of the studies on the Resources of *Jatropha curcas* [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2004, 12 (3):285-290. (in Chinese)
- [5] Nath L K, Dutta S K. Extraction and purification of curcain, a protease from the latex of *Jatropha curcas* Linn. [J]. J Pharm Pharmacol, 1991, 43:111-114.
- [6] Van A, Horsten S, Kettenes J, et al. Curcacycline A—a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* Linn. [J]. FEBS Letters, 1995, 358(3):215-218.
- [7] Naengchomnong W, Thebtaramonth Y, Wiriyachitra P, et al. Isolation and structure determination of two novel lathyrane from *Jatropha curcas* [J]. Ind J Chem, 1970, 8:1047.
- [8] Fagbenro A F, Oyibo W A, Anuformo B C. Disinfectant/ antiparasitic activities of *Jatropha curcas* L. [J]. East Afr Med J, 1998, 75 (9):508-511.
- [9] Puangpaka Soontornchainaksaeng & Thaya Jenjittikul. Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand [J]. Thai For Bull, 2003, 31:105-112.
- [10] Bahadur B, Ramanujam C G K, Murthy G V S, et al. A representative analysis of LM and SEM studies of *Jatropha L.* pollen (Euphorbiaceae) [J]. Geophytology, 1998, 28:69-75.
- [11] Skvarla J J, Rowley J R. Ontogeny of pollen in *Poinciana* (Leguminosae). I. Development of exine template [J]. Rev Palaeobot Patynol, 1987, 50:292-311.
- [12] Perez- Munoz C A, Jernstedt J A, Webster B D. Pollen wall development in *Vigna vexillata* II. Ultrastructural Studies [J]. Amer J Bot, 1993, 80 (10):1193-1202.
- [13] Xie C T (谢潮天). Cytological and molecular biological research on a genic male sterile Chinese cabbage (*Brassica campestris L.*) [D]. Xiamen: Xiamen University, 2005. (in Chinese)
- [14] Xi X Y (席湘媛). Observations on ultrastructure of pollen development from microsporocyte to early two-celled pollen in Welsh Onion (*Allium Fistulosum*) [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2000, 22 (2):161-165. (in Chinese)
- [15] Polowick P L, Sawhney V K. An ultrastructural study of pollen development in tomato (*Lycopersicon esculentum*). I. Tetrad to early binucleate microspore stage [J]. Can J Bot, 1993, 71:1039-1047.
- [16] Weber M. Apertural chambers in *Geranium*: development and ultrastructure [J]. Sex Plant Reprod, 1996, 9:102-106.
- [17] Van Went J, Cresti M. Cytoplasmic differentiation during tetrad formation and early microspore development in *Impatiens sultani* [J]. Protoplasma, 1989, 148:1-7.
- [18] Kuang A, Musgrave M E. Dynamics of vegetative cytoplasm during generative cell formation and pollen maturation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Protoplasma, 1996, 194:81-90.
- [19] Mizelle M B, Sethi R, Ashton M E, et al. Development of the pollen grain and tapetum of wheat (*Triticum aestivum*) in untreated plants and plants treated with chemical hybridizing agent RH0007 [J]. Sex Plant Reprod, 1989, 2:231-253.
- [20] Hu S Y (胡适宜). Embryology of Angiosperm [M]. Beijing: Science Press, 1984. (in Chinese)

图版说明

AM—造粉质体; C—胼胝质; D—高尔基体; En—药室内壁; Ep—表皮; ER—内质网; E—造油体; Gc—生殖细胞; GN—生殖核; L—脂滴; Mb—微体; MI—中层; MMC—小孢子母细胞; M—线粒体; N—细胞核; P—质体; S—淀粉粒; SP—球状体; V—液泡; Vc—营养细胞; VN—营养核。

图版 I

1. 小孢子造孢细胞中的质体和高尔基体, 标尺=500 nm; 2-5. 小孢子母细胞期。2. 被胼胝质壁包围的小孢子母细胞, 标尺=5 μm; 3. 胞质通道(箭头), 标尺=1 μm; 4. 内质网、高尔基体和球状体, 标尺=200 nm; 5. 绒毡层中的造粉质体和内质网, 标尺=200 nm; 6-10. 小孢子母细胞减数分裂期。6. 内质网与质体和线粒体相连, 标尺=1 μm; 7. 线粒体和高尔基体, 标尺=200 nm; 8. 球状体, 标尺=2 μm; 9. 绒毡层内造粉质体和造油体, 标尺=200 nm。

图版 II

10. 绒毡层内球状体、线粒体和高尔基体, 标尺=200 nm; 11-15. 四分体时期; 11. 液泡和脂滴, 标尺=200 nm; 12. 花粉外壁波纹状加

厚(箭头), 标尺=2 μm ; 13. 绒毡层靠近药室一侧形成大液泡, 标尺=2 μm ; 14. 绒毡层内的内质网、造粉质体和造油体, 标尺=200 nm; 15. 绒毡层内的内质网、线粒体、造粉质体和液泡降解物(箭头), 标尺=500 nm; 16-21. 小孢子发育早期。16. 游离小孢子早期形状不规则, 外壁上已形成柱状结构(箭头), 标尺=5 μm ; 17. 线粒体, 标尺=200 nm; 18. 表皮、药室内壁和中层液泡化明显, 标尺=1 μm 。

图版 III

19. 绒毡层的内质网, 标尺=200 nm; 20. 花粉内壁开始形成(箭头), 标尺=2 μm ; 21. 绒毡层内的线粒体和内质网, 标尺=200 nm; 22-24. 小孢子发育晚期。22. 单核靠边期小孢子, 标尺=5 μm ; 23. 线粒体和球状体, 标尺=200 nm; 24. 绒毡层内含大量的脂滴(箭头), 标尺=5 μm ; 25-27. 二胞花粉期。25. 大的营养细胞和小的生殖细胞, 标尺=10 μm ; 26. 营养细胞中含大量淀粉粒和较多的脂滴, 生殖细胞中含少量淀粉粒和大量的脂滴, 标尺=2 μm ; 27. 绒毡层和中层降解后的残留物(箭头)仍吸附在药室内壁细胞上, 标尺=10 μm 。

Explanation of plates

AM—Amyloplast; C—Callose; D—Dictyosome; En—Endothecium; Ep—Epidermal cells; ER—Endoplasmic reticulum; E—Elaioplast; Gc—Generative cell; GN—Generative nucleus; L—Lipid; Mb—Microbody; Ml—Middle layers; MMC—Microspore mother cells; M—Mitochondrion; N—Nucleus; P—Plastids; S—Starch grains; SP—Sphaeroplast; V—Vacuole; Vc—Vegetative cell; VN—Vegetative nucleus.

Plate I

Plastids and dictyosome in sporogenous cells, bar=500 nm; 2-5. Microsporocyte stage. 2. Microsporocyte surrounded by callose, bar=5 μm ; 3. Cytoplasmic channels (in the direction of arrow), bar=1 μm ;

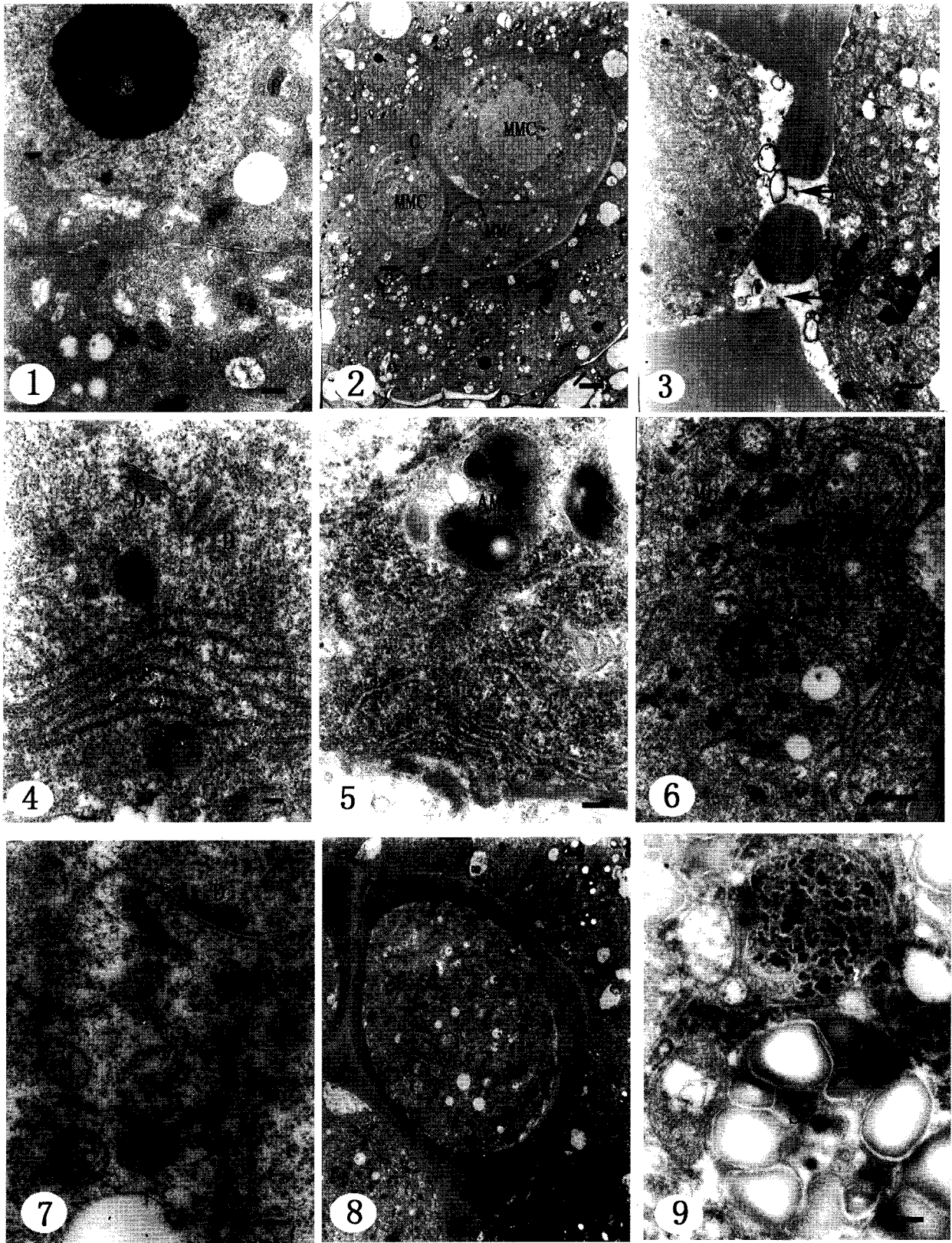
4. Endoplasmic reticulum, dictyosome and sphaeroplasts, bar=200 nm; 5. Amyloplasts and endoplasmic reticulum in tapetum, bar=200 nm; 6-10. Microspore mother cells in meiosis. 6. Endoplasmic reticulum connected with plastids and mitochondria, bar=1 μm ; 7. Mitochondria and dictyosome, bar=200 nm; 8. Sphaeroplast, bar=2 μm ; 9. Amyloplast and elaioplast in tapetum, bar=200 nm.

Plate II

10. Sphaeroplast, mitochondrion and dictyosome in tapetum, bar=200 nm; 11-15. Tetrad stage. 11. Vacuole and lipids, bar=200 nm; 12. The ectexine of the pollen is thickening (in the direction of arrow), bar=2 μm ; 13. Large vacuoles near the microsporangium in tapetal cells, bar=2 μm ; 14. Endoplasmic reticulum, amyloplast and elaioplast in tapetum, bar=200 nm; 15. Endoplasmic reticulum, mitochondrion, amyloplast and the degraded substance in tapetum (in the direction of arrow), bar=500 nm; 16-21. Early microspore stage. 16. The pollen wall contracted and the bacula on the ectexine (in the direction of arrow), bar=5 μm ; 17. Mitochondrion, bar=200 nm; 18. Clearly-vacuolated epidermis, endothecium and middle layers, bar=1 μm .

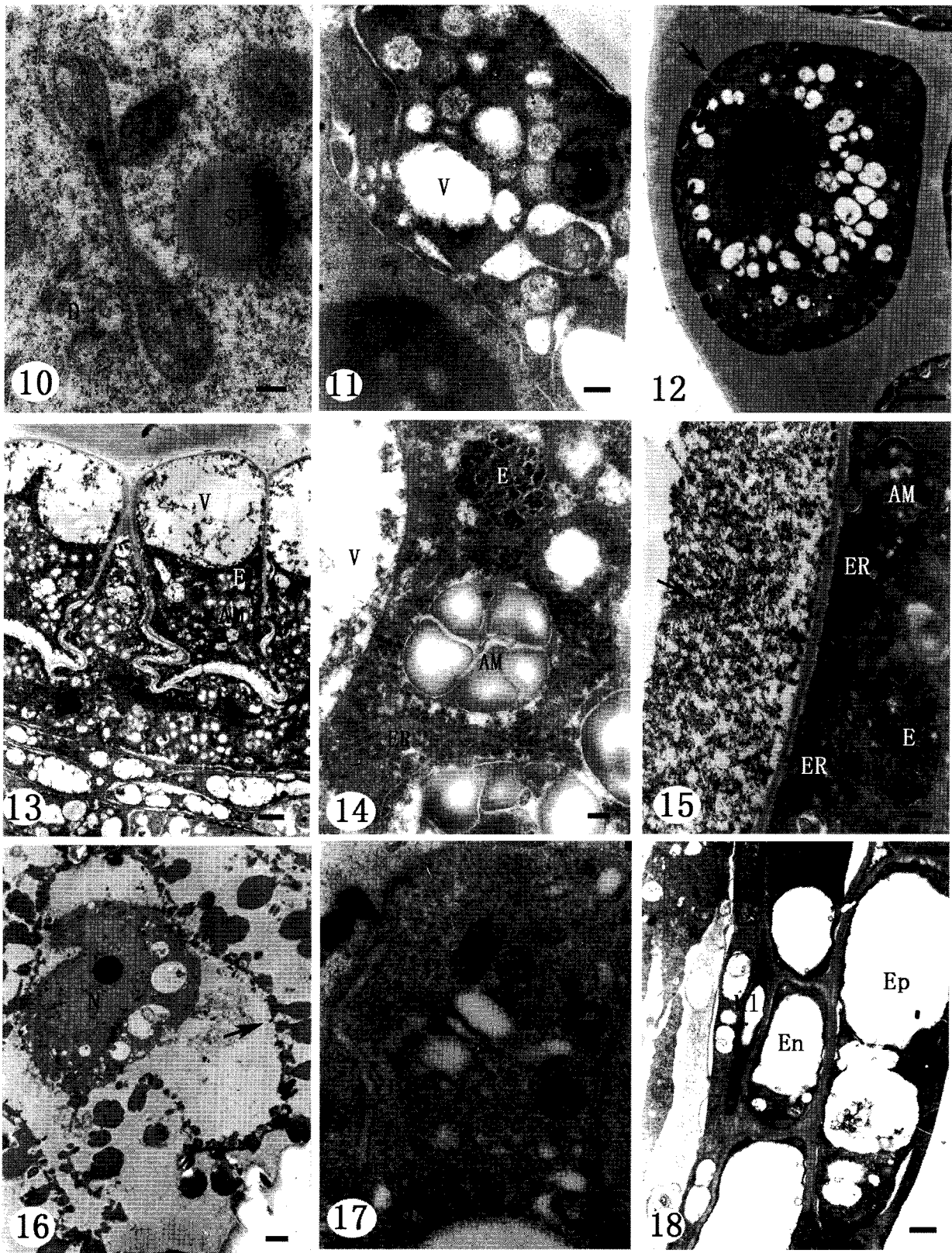
Plate III

19. Endoplasmic reticulum in tapetum, bar=200nm; 20. Initiation of intine (in the direction of arrow), bar=2 μm ; 21. Mitochondrion and endoplasmic reticulum in tapetum, bar=200 nm; 22-24. Late microspore stage. 22. Uninucleate microspore with the nucleus displaced to one side, bar=5 μm ; 23. Mitochondrion and sphaeroplast, bar=200 nm; 24. Lipids in tapetum (in the direction of arrow), bar=5 μm ; 25-27. Two-celled pollen. 25. A large vegetative cell and a small generative cell, bar=10 μm ; 26. Starch grains and lipids abundant in the vegetative cell but poor in the generative cell, bar=2 μm ; 27. The remains degenerated from tapetum and middle layers adhere to the endothecium, bar=10 μm .



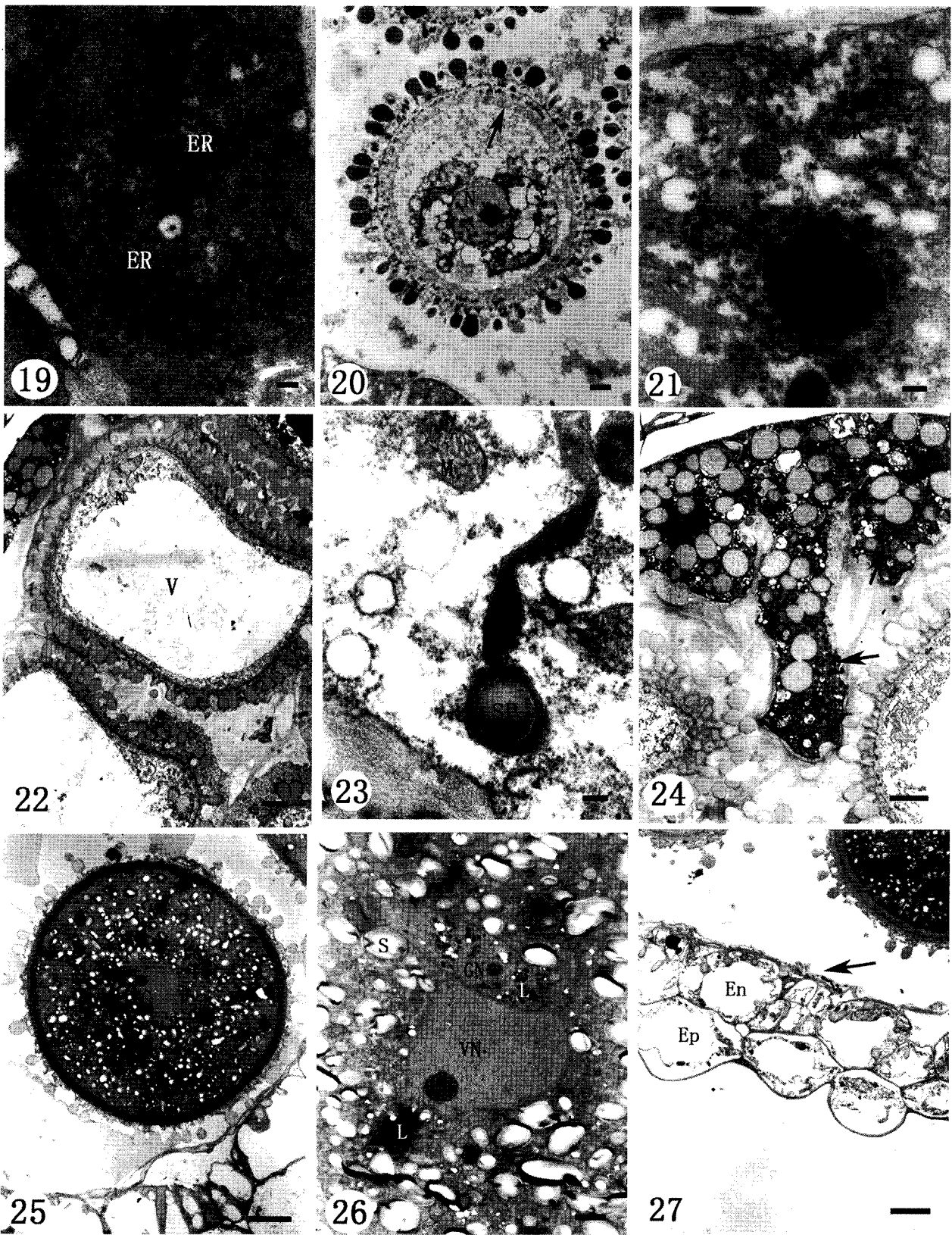
刘焕芳等:图版 I

LIU Huan-fang et al.: Plate I



刘焕芳等: 图版 II

LIU Huan-fang et al.: Plate II



刘焕芳等:图版 III

LIU Huan-fang et al.: Plate III