

# 百合科山韭小孢子发生及雄配子体发育

刘晓瑞<sup>1</sup>, 陈祖铿<sup>2</sup>, 苏立娟<sup>1</sup>, 赵云云<sup>1</sup>, 刘家熙<sup>1\*</sup>

(1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; 2. 系统与进化植物学国家重点实验室, 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要:**利用石蜡切片对葱属植物山韭(*Allium senescens* L.)的小孢子发生及雄配子体形成进行了研究。结果表明:山韭花药具4个药室,花药壁由表皮、药室内壁、中层和绒毡层4层细胞组成,属分泌型绒毡层。小孢子母细胞减数分裂的胞质分裂为连续型。成熟花粉为二胞型,偶见三胞型。在小孢子母细胞减数分裂和单核小孢子中出现许多异常行为,如染色体拖曳,落后染色体和后期桥,以及产生微核等,这可能是导致花粉败育的原因之一。

**关键词:** 山韭; 小孢子; 花粉; 减数分裂; 异常行为

中图分类号: Q944.58

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)02-0153-07

## Microsporogenesis and Development of Male Gametophyte in *Allium senescens* L. (Liliaceae)

LIU Xiao-rui<sup>1</sup>, CHEN Zu-keng<sup>2</sup>, SU Li-juan<sup>1</sup>, ZHAO Yun-yun<sup>1</sup>, LIU Jia-xi<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China; 2. State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** The microsporogenesis and development of male gametophyte of *Allium senescens* L. were studied using method of paraffin section. The anther was found to be 4-sporangiate. The anther wall includes 4 layers: epiderm, endothecium, middle layer and secretory tapetum. Successive cytokinesis in the microspore mother cells (MMCs) follows meiosis. Most mature pollen grains are 2-celled type, rarely 3-celled type. In addition, there are some abnormal phenomena at meiosis of MMCs and uninucleate microspores, including laggard chromosome, chromosome fragments, bridges, double-bridges, micronuclei and so on. These abnormal phenomena is one reason which resulted in abortive pollen.

**Key words:** *Allium senescens* L.; Microspore; Pollen; Meiosis; Abnormality

山韭(*Allium senescens* L.)为百合科(Liliaceae)葱属根茎组(*Allium* L. Sect. *Rhiziridium* G. Don)多年生草本植物,花色白或紫红或淡紫。野生山韭,资源丰富,其花蕾品质优良,多含胡萝卜素、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C、钙、磷、铁等多种营养素,是健肾开胃之佳品<sup>[1]</sup>。葱属植物世界上约有 500 种,分布于北半球。我国有 110 种(包括变种和引进的外来种),主要分布在东北、华北、西北和西南地区<sup>[2]</sup>。席湘媛<sup>[3]</sup>、远彤等<sup>[4]</sup>分别对葱属植物大葱(*Allium fistulosum* L.)及大蒜(*Allium sativum* L.)的花粉发育过程

进行过研究,栾兆水等<sup>[5]</sup>在对 2 个野生韭菜种细叶韭(*Allium tenuissimum* L.)和山韭的花粉母细胞减数分裂过程的研究中,发现山韭小孢子母细胞减数分裂过程中的异常减数分裂行为频率平均为 17.31%。而山韭小孢子发生及雄配子发育的整个过程国内外均未见报道。本文研究了山韭小孢子母细胞减数分裂、小孢子有丝分裂,到成熟花粉形成的详细过程以及在花粉发育过程中花药壁结构的相应变化,为研究该植物提供了胚胎学及有性生殖资料,为探讨葱属植物在百合科中的分类地位及

亲缘关系提供依据,进而为百合科胚胎学及单子叶植物类群进化提供更多孢粉学和生殖生物学方面的资料。

## 1 材料和方法

实验材料山韭(*Allium senescens* L.)分别采自中国科学院植物研究所植物园的栽培植株和河北雾灵山的野生植株。2006年6月底至7月初,采集不同发育时期的花蕾和小花,经 FAA 固定液固定后转入 70% 乙醇中,保存于 4℃ 冰箱。常规石蜡切片法<sup>[6]</sup>制片,切片厚度 8 μm,用苏木精、PAS、PAS-苏木精、番红-固绿染色,在 Nikon E600 型光学显微镜下观察并摄影。同时选取各个时期的花粉,分别用 1 μg ml<sup>-1</sup> DAPI 染色 10 min, 0.01% 水溶性苯胺蓝溶液染色 10~15 min, 紫外光激发并显微照相,观察染色体和胼胝质壁动态。

## 2 结果

### 2.1 小孢子发生

小孢子发生开始于小孢子母细胞减数分裂,结束于花粉第一次有丝分裂。山韭花药壁在造孢组织形成时已具备四层尚无明显分化的细胞(图版 I :1),包裹着造孢细胞。在小孢子母细胞时期花药壁由外向内分化为表皮、药室内壁、中层和绒毡层(图版 I :2),其中绒毡层细胞明显增大,细胞质浓且液泡小而少;小孢子母细胞由孢原细胞经造孢细胞发育而来,其形态与周围的药壁组织明显不同,呈大致等径的多边形,细胞体积大,核大,质浓,可见 1~2 个核仁,无明显液泡,偶尔可见小孢子母细胞间染色质的穿壁现象(图版 I :3)。减数分裂前期 I 的细线期,染色质凝聚,呈细线团状,之后染色质逐渐加粗,分散到整个细胞核,依次进入偶线期、粗线期、双线期和终变期。中期 I 时,配对的同源染色体排列在赤道板上(图版 I :4)。后期 I,同源染色体分离,重新形成核膜、核仁,接着进行胞质分裂,并在赤道面上出现胼胝质的细胞板,由中央向四周延伸,最后与胼胝质外壁相连形成二分体(图版 I :5)。

随后进行减数分裂的第二次分裂,两组姐妹染色单体或互相平行或垂直,或呈不同角度分离(图版 I :6),形成左右对称形(图版 I :7a)、T 形(图版 I :7b)、不规则形(图版 I :8)、四面体形(图版 I :9a)和直列式(图版 I :7c,9b)的四分体。4 个小孢子包

藏在共同的胼胝质壁中,各小孢子之间也被胼胝质壁所分隔(图版 I :10)。此时,中层消失,绒毡层达到充分的发育,出现大液泡(图版 I :7)。

### 2.2 雄配子体形成

随着胼胝质壁解体,小孢子从四分体中游离出来,呈半球形,细胞核较大,位于中央,绒毡层细胞内的大液泡聚集在靠近药室内壁的一侧,将绒毡层的细胞质及细胞核挤向花药室一侧(图版 I :11)。而在小孢子有丝分裂之前绒毡层就已过早退化,在花粉囊中,部分药室内壁细胞彼此相互嵌入,95% 的小孢子收缩形成马蹄形败育细胞(图版 I :12),其细胞核和细胞质较正常小孢子明显退化。

早期小孢子核在贴近花粉壁的位置进行有丝分裂,经过前期(图版 I :13a)、中期(图版 I :14a)、后期(图版 I :13b)、末期(图版 I :14b)4 个时期,由不均等的胞质分裂形成大小不等的营养细胞和生殖细胞,两细胞之间形成弧形的细胞壁,呈 PAS 负反应。小孢子有丝分裂以后,绒毡层细胞就逐渐解体。生殖细胞核逐渐脱离花粉壁,游离在营养细胞的细胞质中,呈狭长的梭形(图版 II :15)。山韭成熟花粉属 2-细胞型,但偶尔也能见到 3-细胞花粉(图版 II :17)。二胞花粉时,药壁仅由表皮和药室内壁组成(图版 II :16),绒毡层细胞完全退化,药室内壁细胞径向扩展,细胞内贮藏物质消失,从内切向壁发生细胞壁的不均匀带状加厚,径向地向外和向上延伸到接近外切向壁的位置,而外切向壁仍然保持薄壁状态(图版 II :18,19)。山韭绒毡层细胞始终只含一个细胞核,在解体过程中,与百合科其它种属的情况相同,细胞核始终保持原位,故属分泌型绒毡层。

### 2.3 花粉个体发育过程中的异常现象

山韭小孢子母细胞减数分裂过程中多见异常现象:中期 I、中期 II 的染色体拖曳(图版 I :4, II :20);后期 I、后期 II 的落后染色体(图版 II :21)和染色体桥(图版 II :22,23);2 个二分体分裂不同步,出现三分体(图版 II :24,25),由于减数分裂中的异常,产生含 1~3 个微核的二分体和四分体,甚至在某些四分体中有 1~2 个子细胞仅具微核而无细胞核(图版 II :26,27)。在形成的单核小孢子中,含 1~2 个微核的异常孢子(图版 I :11)约占小孢子总数的 14.5%。

山韭小孢子第一次有丝分裂中会产生 2 类异

常花粉:其中较多的一类为同型花粉,即花粉粒内具2个大小、形态相同的细胞核(图版Ⅱ:15,16),有的类似于生殖核,有的类似于营养核;另一类是具微核的花粉(图版Ⅱ:28),来自具微核的小孢子。具微核的小孢子一般停留在单核期不分裂,也可进行一次分裂形成1个含微核的二细胞花粉,但具微核的花粉都呈退化迹象,没有发育前途。

### 3 讨论

山韭花粉发育特征与百合科的花粉发育特征基本相同<sup>[7]</sup>,小孢子母细胞减数分裂时的胞质分裂为连续型,四分体多呈不规则的排列,也有左右对称形、T形、交叉形和直列式。花药壁4层,属分泌型绒毡层。成熟花粉以2-细胞型为主,偶见3-细胞型,这与Khaleel和Mitchell<sup>[8]</sup>报道的葱属各种的花粉同时有2-细胞和3-细胞二种类型一致。这种现象在百合科其他种属中是不常见的。

山韭花药壁由4层细胞组成,表皮、药室内壁、中层和绒毡层各一层,与重楼属(*Paris* L.)(2层中层)<sup>[9]</sup>、百合属(*Lilium* L.)<sup>[10-11]</sup>和黎芦属(*Veratrum* L.)(3层中层)、以及大百合属(*Cardiocrinum* (Endl.) Lindl.)(1层表皮、2层药室内壁、4~5层中层、2层绒毡层)相比,有明显简化的趋势。

百合科植物的花被片、花药壁及子房壁细胞中常见到针晶体结晶<sup>[12-14]</sup>,在我们研究的菝葜属(*Smilax* L.)、舞鹤草属(*Maianthemum* Web.)、黎芦属及棋盘花属(*Zigadenus* Michx.)植物中,也见到大量的束状针晶体结晶。Dahlgren和Chiffored<sup>[15]</sup>与Bjornstad<sup>[16]</sup>认为草酸钙结晶的存在与否可作为百合科植物重要的系统学性状,本研究中无论是野生的还是栽培的山韭,其花药壁及花瓣中都未见到结晶,同时在苍葱(*Allium victorialis* L.)的石蜡切片里也未见到,席湘媛<sup>[3]</sup>对大葱的研究中也没有提及。因此结晶的有无可否作为支持将葱属另立一科的一个依据还需要对更多的葱属植物进行研究。

在山韭小孢子母细胞减数分裂过程中,同一药室内的小孢子母细胞减数分裂基本同步,同一花药不同药室的减数分裂也基本同步,但同一朵花中不同花药之间的减数分裂不一定完全同步,相差2~3个时期。小孢子有丝分裂起步很不一致,故在同一花粉囊中,同时存在单核小孢子与2-细胞花粉,但在花药开裂之前,同一花药的所有花粉均发育成熟。这种花粉发育过程中的不同步性在百合科其

他种属植物中也常见到<sup>[3-4,13,17]</sup>,是植物适应环境的一种进化表现,对种群繁殖具有重要意义。

山韭小孢子母细胞减数分裂期间出现各种染色体行为的异常,在玉簪花(*Hosta ventricosa*)<sup>[18]</sup>、兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor*)<sup>[19]</sup>中也曾有报道。异常减数分裂行为与不育性有无关系是一个有争议的问题,李雪等认为小孢子母细胞减数分裂异常是导致兰州百合花粉败育的主要原因<sup>[19]</sup>,而秦泰辰和刘大文<sup>[20]</sup>却认为,异常减数分裂偶有发生,多数情况下并不能直接导致小孢子母细胞败育,不是导致雄性不育的主要原因,但可能是小孢子停止发育的潜在因素。张寿洲等<sup>[21]</sup>认为小孢子母细胞减数分裂中出现的多态性倒位、染色体互锁、落后单价体、不均等分裂,异形配对以及各种原因形成的断片都会影响配子的发育,但并不是100%的配子都败育,如双染色单价桥仅50%的配子败育,因此从理想数字看成熟花粉测定中其败育数应低于小孢子母细胞减数分裂的异常比例。

Mariani等<sup>[22]</sup>在绒毡层细胞内特异表达的启动子与细胞毒素的mRNA酶基因融合,导致了绒毡层的破坏,从而成功地诱导了烟草的雄性不育。值得注意的是,山韭绒毡层细胞在小孢子有丝分裂以后逐渐解体,花粉正常发育;小孢子有丝分裂之前绒毡层的完全退化往往导致整个花药败育;在小孢子有丝分裂之前绒毡层细胞核开始解体的花粉囊中,仍有8.4%~24.3%的发育正常的小孢子。

因此,我们推测山韭小孢子母细胞减数分裂中出现的各种异常、绒毡层发生和分化的异常以及开花期的环境条件都可能是导致花粉败育的原因,更进一步的原因有待于深入的研究。

### 参考文献

- [1] Yuan M H(袁苗禾), Liu S D(刘石达), Quan Y M(全育民). Studying and developing the wild chives [J]. *Sci Techn Food Ind* (食品工业科技), 1989(3): 3-8. (in Chinese)
- [2] Wang F Z(汪发赞), Tang J(唐进). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 14* [M]. Beijing: Science Press, 1980: 170-242. (in Chinese)
- [3] Xi X Y(席湘媛). A comparative study of anther and pollen development in male-fertile and male-sterile Green Onion (*Allium fistulosum* L.) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1991, 33 (10): 770-775. (in Chinese)
- [4] Yuan T(远彤), Lu W S(鲁文锁), Cao H(曹红), et al. Study on the embryo of *Allium sativum* L. The development of stamen and the genesis of microspore [J]. *Henan Sci* (河南科学), 1999, 17: 10-15. (in Chinese)

- [5] Luan Z S(栾兆水), Zhang D Q(张东芹). Study on the meiosis of pollen mother cells in 2 species of wild leek [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 1994(1): 24–25. (in Chinese)
- [6] Li Z L(李正理). The Technology of Making Sections in Plant Tissues [M]. Beijing: Science Press, 1978: 129–137. (in Chinese)
- [7] Davis L G. Systematic Embryology of the Angiosperms [M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1966: 49–50, 157–159.
- [8] Khaleel T F, Mitchell B B. Cytoembryology of *Allium textile* Nels. & Macbr. [J]. Amer J Bot, 1982, 69(6): 950–956.
- [9] Liang H X(梁汉兴), Zhang X L(张香兰). The microsporogenesis and formation of male-gametophyte of two species in *Paris* L. [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 1984, 6(4): 435–440. (in Chinese)
- [10] Wang C S, Walling L L, Eckard K J, et al. Immunological characterization of a tapetal protein in developing anthers of *Lilium longiflorum* [J]. Plant Physiol, 1992, 99: 822–829.
- [11] Wang C S, Walling L L, Eckard K J, et al. Patterns of protein accumulation in developing anthers of *Lilium longiflorum* correlate with histological events [J]. Amer J Bot, 1992, 79(2): 118–127.
- [12] Chen Z K(陈祖铿), Wang F X(王伏雄), Li Z L(李芝莉). Investigation on embryology of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. Acta Phytotaxon Sin(植物分类学报), 1990, 28 (3): 223–227. (in Chinese)
- [13] Su L J(苏立娟). Study on the pollen morphology and pollen development of Liliaceae [D]. Beijing: Capital Normal University, 2006: 37–65. (in Chinese)
- [14] Rao G Y(饶广远), Pan K Y(潘开玉), Hong D Y(洪德元). Embryological studies on *Convallaria majalis* L. [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1995, 37(12): 963–968. (in Chinese)
- [15] Dahlgren R M T, Clifford H T, Yeo P F. The Families of the Monocotyledons [M]. Berlin: Springer Verlag, 1985: 520.
- [16] Bjornstad I N. Comparative embryology of Asparagoideae—Polygonateae, Liliaceae [J]. Nytt Mag Bot, 1970, 17: 169–207.
- [17] Mao X W(毛学文). Cytological observations of microsporogenesis and pollen development in *Chloerophytum capense* var. *variegatum* Hort [J]. J Gansu Sci(甘肃科学学报), 1998, 10 (4): 78–80. (in Chinese)
- [18] Li F X(李凤霞), Chen S(陈珊), Tan X G(谭兴光), et al. Study on abnormal meiosis in *Hosta ventricosa* Stearn [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci)(云南大学学报: 自然科学版), 1999, 21: 161–162. (in Chinese)
- [19] Li X(李雪), Chen L M(陈丽梅), Du J(杜捷), et al. Observations on abnormal meiosis of pollen mother cells in *Lilium davidii* var. *unicolor* [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin(西北植物学报), 2003, 23 (10): 1796–1799. (in Chinese)
- [20] Qin T C(秦泰辰), Liu D W(刘大文). Cytoplasmic mechanism of microsporogenesis in cytoplasmic male-sterile lines of maize [J]. Acta Agri Shanghai(上海农业学报), 1990, 6(1): 9–14. (in Chinese)
- [21] Zhang S Z(张寿洲), Pan K Y(潘开玉), Zhang D M(张大明), et al. Observation on abnormal meiosis of pollen mother cells in *Peaonia suffruticosa* subsp. *sponotanea* [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1997, 39(5): 397–404. (in Chinese)

- [22] Mariani C, De Beuckeleer M, Treuttner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene [J]. Nature, 1990, 347: 737–741.

## 图版说明

T: 绒毡层 Tapetum; Ep: 表皮 Epidermis; ML: 中层 Middle layer; En: 药室内壁 Endothecium; VN: 营养细胞核 Vegetative nucleus; VC: 营养细胞 Vegetative cell; GC: 生殖细胞 Generative cell; SP: 精细胞 Sperm cell.

1~5, 11, 13~19, 23, 26~28: 苏木精染色 Stained by Hematoxylin; 6, 8~9, 20, 22, 24: DAPI 染色 Stained by DAPI; 7, 25: PAS-苏木精染色 Stained by PAS-Hematoxylin; 10: 苯胺蓝染色 Stained by Aniline blue; 12: PAS; 21: 番红-固绿染色 Stained by Safranin/Fast Green.

## 图版 I

1. 造孢时期的花药, 最外 4 层示花药壁细胞, 内部为造孢细胞;
2. 小孢子母细胞时期的花药, 箭头(↑)示具有四层细胞的花粉囊壁;
3. 小孢子母细胞间染色质的穿壁现象;
4. 小孢子母细胞减数分裂中期 I, 箭头(↑)示中期 I 拖曳染色体;
5. 小孢子母细胞减数分裂末期 I;
6. 小孢子母细胞减数分裂后期 II, 两组姐妹染色单体呈不同角度分离;
7. 四分体: a. 左右对称形; b. T 形; c. 直列式;
8. 四分体排列异常, 箭头(↑)示微核;
9. 四分体: a. 四面体形; b. 直列式, 箭头(↑)示微核;
10. 四分体的胼肌质壁荧光;
11. 单核小孢子时期, 箭头(↑)示含 1~2 个微核的异常孢子;
12. 败育单核小孢子;
13. 小孢子有丝分裂: a. 前期; b. 后期;
14. 小孢子有丝分裂: a. 中期; b. 末期;

## 图版 II

15. 2-细胞成熟花粉, 生殖细胞棒状伸长; 同型花粉;
16. 二胞花粉时花药壁仅由表皮和药室内壁组成;
17. 成熟的 3-细胞花粉, 箭头(↑)示营养细胞核和生殖细胞核;
- 18~19. 示花粉散发时药室内壁结构;
20. 箭头(↑)示小孢子母细胞减数分裂中期 II 拖曳染色体;
21. 箭头(↑)示后期 I 落后染色体;
- 22~23. 小孢子母细胞减数分裂 II, 染色体桥;
24. 后期 II, 染色体分离不同步及染色体桥;
25. 三分体;
- 26~27. 具 1~3 个微核的二分体和四分体;
28. 具微核的二胞花粉.

## Explanation of plates

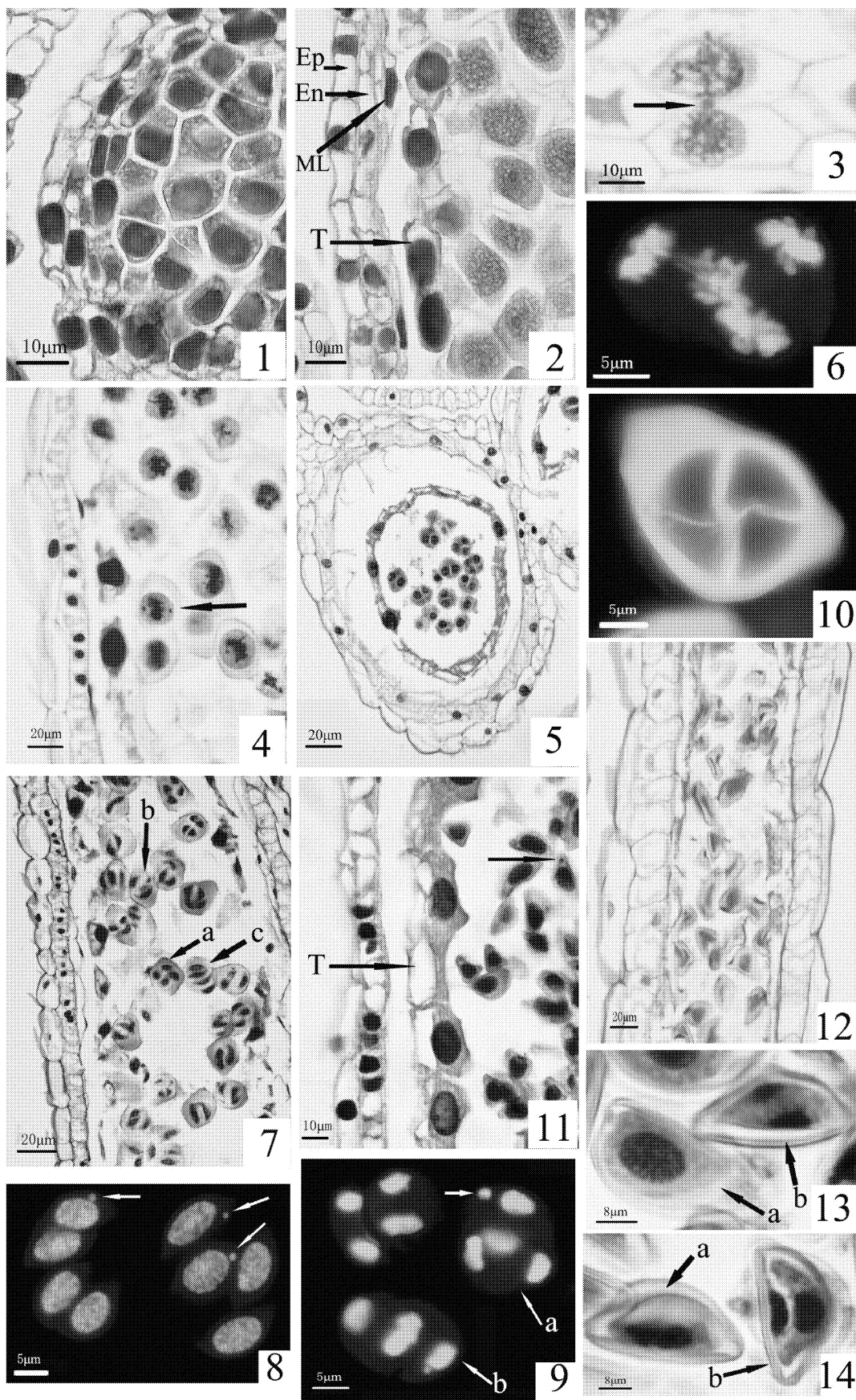
### Plate I

1. Sporogenous anther tissue, 4 layers outside are anther wall, sporogenous cells are inside;
2. MMCs surrounded by anther wall with four layers in a pollen sac;

3. MMCs with cytoplasmic connection;
4. Metaphase I of MMCs meiosis with straggling (arrow);
5. Telophase I of MMCs meiosis;
6. Anaphase II of MMCs meiosis with irregular array of the chromosome;
7. Tetrads : a. Isobilateral tetrad; b. T-shaped tetrad; c. Linear tetrad;
8. Irregular array of tetrad with micronuclei (arrow);
9. Tetrads with micronuclei (arrow): a. Tetrahedral tetrad; b. Linear tetrad;
10. Callose wall fluorescence of tetrad;
11. Uninucleate microspore and abnormal microspores with 1 ~ 2 micronuclei (arrow);
12. Abortive uninucleate microspores;
13. Microspore mitosis: a. Prophase; b. Anaphase;
14. Microspore mitosis: a. Metaphase, b. Telophase;

## Plate II

15. 2-celled mature gametophyte, showing clavate generative cell, and the pollen grains with two equal nuclei;
16. At maturity the wall remains two layers: the epidermis and endothecium;
17. 3-celled pollen with a vegetative and two sperm cells;
- 18 ~ 19. Structure of anther endothecium when pollen grains shed;
20. Metaphase II of MMCs meiosis with straggling (arrow);
21. Anaphase I with laggard chromosome (arrow);
- 22 ~ 23. Meiosis II, Chromosome bridge;
24. The loss of synchronization in segregation with chromosome bridge;
25. Tritrad;
- 26 ~ 27. Dyad and tetrad with 1 ~ 3 micronuclei;
28. 2-celled pollen with a micronucleus.



刘晓瑞等:图版 I

LIU Xiao-ru et al.: Plate I



