

巴戟天花药发育过程中多糖和脂滴分布特征

郑松¹, 魏冬梅¹, 林美珍², 田惠桥^{1,*}

¹厦门大学生命科学学院, 福建厦门361005; ²漳州卫生职业学院药理学系, 福建漳州363000

摘要: 巴戟天花药发育中多糖和脂滴类物质的分布呈现一定的规律: 减数分裂之前, 花药壁的绒毡层细胞中有少量脂滴, 其他细胞中脂滴和淀粉粒都很少。四分体时期, 四分体小孢子中开始出现脂滴, 绒毡层细胞中的脂滴较以前增加, 其他细胞中的脂滴和淀粉粒仍然很少。小孢子早期, 游离小孢子在其表面形成了花粉外壁, 靠外壁下方有一层周缘分布的多糖物质。绒毡层细胞中的脂滴明显减少。发育晚期的小孢子中形成一个大液泡, 细胞质中出现淀粉粒; 同时在药壁和药隔组织中也出现了淀粉粒。此时绒毡层退化。在二胞花粉早期, 花粉中积累了大量淀粉粒和一些脂滴。但在成熟的花粉中(二胞花粉晚期), 淀粉粒消失, 只有一定数量的脂滴保留。巴戟天成熟花粉中积累的营养物质主要为脂滴。

关键词: 巴戟天; 花药; 多糖; 脂类

Distribution Feature of Polysaccharides and Lipids in the Developing Anthers of *Morinda officinalis* How

ZHENG Song¹, WEI Dong-Mei¹, LIN Mei-Zheng², TIAN Hui-Qiao^{1,*}

¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; ²Department of Pharmacy, Zhangzhou Medical Vocational College, Zhangzhou, Fujian 363000, China

Abstract: Distribution of polysaccharides and lipids in the developing anthers of *Morinda officinalis* How was regular. There were a few lipid drops in the sporogenous cells of young anthers, while neither lipid drops nor starches were found in other anther cells. Before the meiosis of microspore mother cells, some lipids appeared in tapetal cells. The size of tapetal cells began to increase at this stage. At the stage of tetrad, the lipids in the tapetal cells increased, and many lipid drops accumulated in the cells. Some lipids also appeared in tetrad microspores at this time. There were still no starches in young anther cells, and only cell wall of the cells formed anther wall and callose wall in tetrads displayed the feature of polysaccharides. During microspore development, the lipids in tapetal cells decreased evidently. The lipids in the young microspore also disappeared. There were still no starches in anther. At late microspore stage, some starches accumulated in microspore and appeared in anther wall and connective cells. Tapetal cells degenerated at this stage and the lipid drops concentrated to form lipid block. At early stage of 2-celled pollen, the vegetative cell accumulated a large number of starches, which disappeared with pollen development. Lipids were the main nutritional material accumulated in mature pollen of *M. officinalis*.

Key words: *Morinda officinalis* How; anther; polysaccharides; lipid

高等植物的花药结构复杂, 其发育是一个变化剧烈的过程, 如小孢子母细胞减数分裂期间的细胞质改组、胼胝质壁的形成与降解、大液泡的形成与消失、花粉内外壁的形成、绒毡层细胞的降解、花粉粒中营养物质的积累与转化等。除了上述花药组成细胞的形态和结构发生明显变化以外, 花药发育的另一个显著特点是以花粉为中心的营养物质单向运输和转化, 尤其是小孢子有丝分裂形成二胞花粉后开始积累大量的营养储存物以供成熟花粉萌发时利用。然而, 通常在二胞花粉时期, 绒毡

层细胞已退化和解体, 营养物质是如何转运到花粉中的还不清楚。在雄性不育研究中已显示花药中的营养物质代谢是小孢子正常发育的基础, 营养物质代谢不正常往往导致了花粉败育(Steer 1977; Renzickova和Dickson 1982; Pacini等1985; Ku等2003)。然而有关高等植物花药中的营养物质分布

收稿 2009-11-07 修定 2009-12-25

资助 国家自然科学基金(30970275)和福建省漳州市科技局课题(Z2008038)。

* 通讯作者(E-mail: hqtian@xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486)。

的研究结果在不同植物中有差异,不同植物花粉积累的营养物质是脂类或糖类,在花药组织和细胞中这2种物质的运输方式和转化机制还不清楚。为了揭示高等植物花药发育中营养物质运输和转化规律,需要在更多植物中进行详细探讨。

巴戟天是我国著名的“四大南药”之一。主要含有糖类、维生素C、多种氨基酸和甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚、大黄素-甲醚等蒽醌类化合物;具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风湿、固精髓、增强性欲、抗衰老、抗肿瘤和抗抑郁的功效(中华人民共和国卫生部药典委员会2005)。对巴戟天花药发育还没有进行详细研究,对其花药发育中营养物质的积累和转化特征研究还是空白。本实验研究巴戟天花药发育中营养物质的分布和转化特征,期望揭示巴戟天花药发育中营养物质运输和转化特征。

材料与方法

试验材料采自福建省漳州市南靖县和溪镇种植的巴戟天(*Morinda officinalis* How)。巴戟天通常在5~6月开花。在巴戟天的开花期,分别取不同发育时期的花药,迅速投入用50 mmol·L⁻¹, pH为7.0的磷酸缓冲液配制的2.5%戊二醛的前固定液中,室温固定3 h。前固定后的花药用相同缓冲液洗涤3次,每次30 min。在相同缓冲液配制的1%锇酸后固定液中于4℃下过夜。之后,用相同的缓冲液洗涤3次,每次30 min。然后,用系列梯度丙酮脱水,EPon812树脂渗透与包埋所取的各个时期的花药。包埋的花药用Leica Ultracut R型超薄切片机做成1 μm厚的半薄切片。花药细胞中多糖和脂类物质的染色步骤参照胡适宜和徐丽云(1990)的方法,采用高碘酸-席夫反应(PAS反应)标记细胞中的多糖物质,呈现红色,淀粉粒为红色颗粒。用苏丹黑B复染细胞中的脂类物质,呈现黑色,脂滴为黑色颗粒。Leica DMR显微镜观察与摄影。

实验结果

1 造孢细胞时期

巴戟天的造孢细胞位于花药中部,其体积比周围的药壁和药隔细胞大,呈单排马蹄形排列。在造孢细胞中没有淀粉粒多糖积累,但有零星的脂滴分

布。造孢细胞外的花药壁已分化为4层:表皮、药室内壁、中层和绒毡层。表皮、药室内壁和中层细胞的液泡化程度较高,细胞中的内含物较少。绒毡层细胞的外形很不规则,细胞内也有一些液泡,但细胞质较其他3层药壁细胞浓厚,染色较深,呈现出一定区别。绒毡层细胞中也有零散的小脂滴分布。表皮细胞的壁呈明显的红色,表明其纤维素性质的细胞壁合成较早(图1-a)。

2 小孢子母细胞时期

小孢子母细胞的体积比造孢细胞增大很多,各细胞间出现了较大的胞间隙。小孢子母细胞最明显的特征是被一层厚厚的胼胝质壁包围,使小孢子母细胞之间的联系中断。胼胝质壁呈红色证实其为多糖类物质。小孢子母细胞中没有多糖颗粒,脂滴依然很少(图1-b)。

在药壁组成细胞中,表皮和药室内壁细胞液泡化程度增加,在细胞中形成了一个液泡将细胞质挤到细胞周缘区。原来呈圆形的细胞这时变为整齐的方形细胞。中层细胞此时已被挤压为很薄的一层片状细胞。而绒毡层细胞则相反,它们径向增大了3~5倍,细胞外形呈长条形,在细胞质中脂滴比以前增加,主要分布在靠近药室腔的细胞质中,呈现极性分布(图1-c)。

3 四分体时期

巴戟天小孢子母细胞减数分裂后形成的4个小孢子通常呈四面体排列。四分体小孢子被共同的胼胝质壁包围和分割,在四分体小孢子中积累了一些脂滴。在药壁组成细胞中,表皮、药室内壁和中层细胞没有明显的形态变化,多糖颗粒和脂滴依旧很少。但在绒毡层细胞中,脂滴比以前明显增多。同时绒毡层细胞壁也呈现红色,细胞的液泡化程度增加(图1-d)。

4 小孢子早期

四分体胼胝质壁被溶解后,小孢子被释放成游离状,进入小孢子发育的早期。早期小孢子的体积明显增大,已形成了3层的花粉外壁结构,呈现黑色,表明花粉外壁主要由脂类物质组成。在外壁之下的细胞质中,有一层明显的红色多糖积累,但在中央的细胞质中,既没有淀粉粒多糖也没有脂滴分布。这时期的花药壁组成细胞中,绒毡层细胞的体积变小,细胞质中的脂滴数量明显减少。表皮、

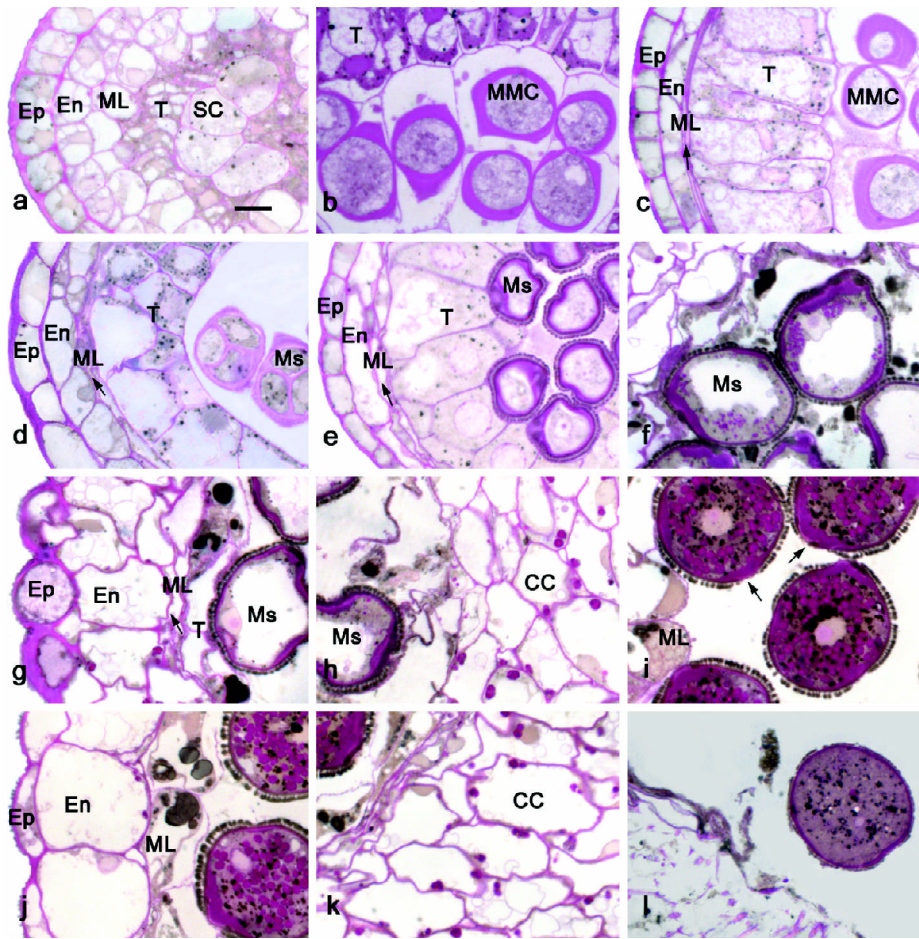


图1 巴戟天花药发育中的多糖和脂滴分布

Fig.1 Distribution of polysaccharides and lipids in the anthers of *Morinda officinalis* How

所有图片均放大540倍。(a)在造孢细胞时期,造孢细胞(SC)呈马蹄形排列,其细胞质中有少量的脂滴。花药壁已分化为4层:表皮(Ep)、药室内壁(En)、中层(ML)和绒毡层(T)。标尺=10 μm (下同)。(b)在小孢子母细胞时期,小孢子母细胞(MMC)被多糖性质的胼胝质壁包围。绒毡层细胞中出现少量的脂滴。(c)小孢子母细胞时期的药壁细胞中,表皮(Ep)、药室内壁(En)和中层细胞(ML)的体积由于绒毡层细胞的体积增大而变小,尤其是中层细胞变为一薄层(箭头)。(d)在四分体时期,四分体小孢子呈四面体排列,被共同的胼胝质壁包围。药壁细胞的表皮(Ep)、药室内壁(En)和中层细胞(ML,箭头)形态变化不大,绒毡层细胞中的脂滴明显增加。在四分体小孢子中,开始出现少数脂滴。(e)早期小孢子(Ms)形成了脂类性质的花粉外壁,外壁附近的细胞质中也有一层多糖性质物质。绒毡层细胞中的脂类物质明显减少。Ep:表皮;En:药室内壁;ML:中层细胞(箭头)。(f)在小孢子(Ms)晚期(单核靠边期),小孢子的体积明显增大,形成大液泡,将细胞核和细胞质挤到细胞边缘区。小孢子细胞质中开始聚集淀粉粒多糖。(g)小孢子晚期的绒毡层细胞(T)已明显退化,细胞减小。Ep:表皮;En:药室内壁;ML:中层细胞(箭头)。(h)小孢子(Ms)晚期的花药药隔薄壁细胞(CC)中出现淀粉粒。(i)在二胞花粉早期,花粉粒中聚集了很多红色淀粉粒和黑色脂滴颗粒。箭头示萌发孔部位。(j)二胞花粉早期的药壁细胞中,表皮(Ep)和药室内壁细胞(En)的液泡化增加。中层细胞(ML)也变形、退化。(k)同时期的药隔薄壁细胞(CC)中仍有一些淀粉粒。(l)成熟花粉粒中淀粉粒明显减少,以储存脂类为主。

药室内壁和中层细胞的形态没有明显变化,除了细胞壁染成红色外,没有脂滴和多糖类物质的积累(图1-e)。

5 小孢子晚期

小孢子发育到后期,细胞中的大部分空间被一个大液泡占据,将细胞核挤到边缘,使小孢子呈现

极性。和以前相比,小孢子的体积进一步明显增大。在其细胞质中开始出现较多的淀粉粒多糖和少量的微小脂滴,主要分散于细胞质中和液泡边缘。在花粉外壁的下面,开始形成花粉内壁,特别是萌发孔处内壁较厚,呈明显的红色,表明其多糖的性质(图1-f)。巴戟天花药绒毡层细胞在小孢子

晚期时退化, 表现为细胞严重变形, 体积明显缩小, 其中形成了一些较大的脂类块状物。而表皮, 药室内壁和中层细胞则体积明显增大, 其中在中层细胞中还出现少量的淀粉粒。而表皮细胞的外切向壁呈现比内切向壁要厚(图1-g)。在药壁相对的药隔细胞中, 则仍有较多的淀粉粒颗粒(图1-h)。

6 二胞花粉时期

小孢子有丝分裂后形成由一个营养细胞和一个生殖细胞构成的二胞花粉, 其体积还会进一步增大。二胞花粉形成后, 原来的大液泡消失, 在营养细胞的细胞质中有很多大的淀粉粒和一些体积较小的脂滴。相比前一时期, 淀粉粒的数量明显增多, 体积也明显增大。此外, 在花粉萌发孔处的红色花粉内壁也比其他部位的厚(图1-i)。此时, 花药壁的表皮细胞呈片状, 在外切向壁的表面形成了一些突起。药室内壁细胞体积较以前继续增大, 略呈正方形。而中层细胞也发生了类似绒毡层细胞的退化, 细胞不规则, 内部出现一些大的脂滴(图1-j)。在药隔细胞中, 则仍有一些淀粉多糖颗粒(图1-k)。

7 成熟花粉时期

接近开花时, 成熟花粉粒中的淀粉粒数量明显减少, 体积较大的脂滴数量则增加。花粉细胞质呈现浅红色(图1-l)。巴戟天成熟花粉中的储存物主要是脂类物质。成熟花药壁的中层和绒毡层细胞残迹已经完全消失, 花药药壁只由高度液泡化的表皮和药室内壁细胞组成。

讨 论

被子植物花药发育中, 大分子营养物质的正常运输和转化是一个关键性环节。这些大分子营养物质在花药特定细胞、特定时间的运输和转化与花粉正常发育密切相关。虽然已对多种植物的花药做了组织化学研究, 但不同植物的花药显示出不同的结果。杨焕杰等(1996)在桔梗小孢子发育过程中发现: 减数分裂之前药壁表皮、药室内壁及中层细胞中的脂滴较多, 但随着发育递减。减数分裂后绒毡层细胞中的脂滴数量递增。小孢子分裂后, 花粉中开始积累脂滴和淀粉。他们认为绒毡层细胞不但具有对脂类物质的吸收、储存和转运的作用, 还可能具有将脂类转化为糖类物质的作用, 因为成熟花粉中积累了大量的淀粉和脂滴。尹增芳

和樊汝汉(1998)对中国鹅掌楸小孢子发生过程做了细胞化学研究, 发现该种植物的花药壁组织在小孢子母细胞时期含有较多的脂类物质和淀粉粒。但在小孢子发育过程中, 脂类物质仅集中在小孢子的壁上, 而随着绒毡层细胞中淀粉粒的减少, 小孢子内含有丰富的淀粉粒, 暗示绒毡层细胞中的多糖物质被小孢子吸收为储存物。在白菜细胞核雄性不育花药中, 在减数分裂以后的小孢子发育时期, 在可育花药药隔细胞中积累的淀粉粒消失, 绒毡层细胞中出现了大量的脂类颗粒, 在小孢子内部也出现一些体积较小的脂类颗粒。反映出白菜小孢子时期是营养物质运输的高峰期, 体内转运的多糖物质经绒毡层细胞转化为脂类供花粉吸收(谢潮添等2004)。在枸杞花药发育中, 药隔和药壁组织最先出现淀粉粒, 接着在绒毡层中出现脂滴, 表明体内向花药转运的营养物质是多糖, 但在绒毡层细胞中, 多糖物质被转化成脂类物质供花粉粒吸收(徐青等2006)。洋葱花药减数分裂后, 花药壁的绒毡层细胞中的脂滴明显增加, 表明此时是体内营养物质向花药中运转的主要时期, 但在小孢子中的脂滴一直很少。二胞花粉早期, 绒毡层细胞已退化, 其中的脂类物质聚集成大的脂滴, 作为花粉营养物质的来源。然而, 二胞花粉的营养细胞先表现出了旺盛的糖代谢, 积累了大量的淀粉粒, 然后才出现脂滴。在成熟花粉中, 淀粉粒消失, 只保留了许多脂滴作为存储物(魏冬梅等2007)。在巴戟天的花药发育中, 四分体时期的绒毡层细胞中脂类物质明显增加, 小孢子形成花粉外壁后, 绒毡层细胞中的脂类物质减少, 可能是绒毡层细胞中的脂类物质用于合成花粉外壁。以后花药体细胞中出现淀粉粒多糖, 晚期小孢子中也开始积累淀粉粒。在早期二胞花粉中, 淀粉粒的积累达到高峰, 但随着花粉的发育又最终被转化为脂类物质。巴戟天成熟花粉中的主要储存物质为脂类。巴戟天花药发育中大分子营养物质的代谢特点是: 晚期小孢子就开始积累淀粉粒(图1-f), 而以前的研究结果都是在二胞花粉中才开始积累淀粉或脂滴。具有大液泡的晚期小孢子的主要活动是进行有丝分裂, 形成由生殖细胞和营养细胞构成的二胞花粉, 然后营养细胞才开始积累营养物质, 但巴戟天小孢子在分裂前就积累淀粉粒的现象与小孢子分裂有什么关系或联系还需要进一步研

究。这也反映出花药发育中营养物质代谢的一种多样性。

参考文献

- 胡适宜, 徐丽云(1990). 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, 32 (11): 841-846
- 魏冬梅, 菅明霞, 邓桦, 郑松, 田惠桥(2007). 洋葱花药发育过程中的细胞化学研究. 分子细胞生物学报, 40 (6): 452-457
- 谢潮添, 杨延红, 朱学艺, 田惠桥(2004). 白菜细胞核雄性不育花药的细胞化学观察. 实验生物学报, 37 (4): 295-302
- 徐青, 王仙琴, 田惠桥(2006). 枸杞花药发育过程中脂滴和淀粉粒的分布特征. 分子细胞生物学报, 39 (2): 103-110
- 杨焕杰, 田国伟, 申家恒(1996). 桔梗小孢子发生和雄配子体发育的细胞化学研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 12 (3): 84-90
- 尹增芳, 樊汝汉(1998). 中国鹅掌楸小孢子发生的细胞化学研究. 植物学通报, 15 (3): 34-38
- 中华人民共和国卫生部药典委员会(2005). 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 61-62
- Ku S, Yoon H, Suh HS, Chung YY (2003). Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta*, 217: 559-565
- Pacini E, Franchi GG, Hesse M (1985). The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Syst Evol*, 149: 155-185
- Renzickova SA, Dickinson HG (1982). Ultrastructural aspects of storage lipid mobilization in the tapetum of *Lilium hybrida* var. *enchantment*. *Planta*, 155: 400-408
- Steer MW (1977). Differentiation of the tapetum in *Avena*. I. The cell surface. *J Cell Sci*, 25: 125-138