

# 阳春砂花药发育过程的组织化学研究

林美珍<sup>1</sup> 杨毅<sup>1</sup> 朱云<sup>2</sup> 田惠桥<sup>2\*</sup><sup>1</sup>漳州卫生职业学院 药学系,漳州 363000; <sup>2</sup>厦门大学生命科学院,厦门 361005

**摘要:**用环氧树脂包埋的半薄切片经PAS反应和苏丹黑染色,研究阳春砂花药发育中的多糖和脂类物质分布特征。结果发现小孢子母细胞和四分体小孢子中积累了一些脂滴,但没有淀粉。阳春砂小孢子母细胞和四分体没有胼胝质壁。晚期小孢子中除了仍有很多脂滴外,细胞核周围开始出现淀粉粒;成熟花粉粒贮存丰富的淀粉粒和脂滴,且花粉壁由多糖物质构成。阳春砂花药壁结构比较特殊:花药壁由10余层细胞组成;最内层的绒毡层细胞在小孢子时期开始解体,细胞质转变为脂滴,供花粉吸收。开花时,花药壁由表皮和几层薄壁细胞以及径向壁纤维加厚的变形细胞组成。

**关键词:**阳春砂;花药发育;淀粉;脂滴

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.001

## Histochemistry Study on Developing Anthers of *Amomum villosum* Lour.

LIN Mei-zhen<sup>1</sup>, YANG Yi<sup>1</sup>, ZHU Yun<sup>2</sup>, TIAN Hui-qiao<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacy Zhangzhou Health Vocational College Zhangzhou 363000, China;<sup>2</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract:** Anther development of *Amomum villosum* Lour. were studied using epoxy resin semi-thin sections with periodic acid-Schiff's technique and Sudan black staining method. The results showed that microspore mother cells and tetrad microspores accumulated numerous lipids but no starches. The late microspore began appear starches around the nucleus beside lipids. Mature pollen grains accumulated abundant polysaccharide starches and lipids. Pollen wall was stained red, suggesting its polysaccharide feature. The anther wall of *A. villosum* consists of more than ten layers of cells. The tapetal cells degenerated at microspore stage and its cytoplasm transform into lipids for the microspore absorbing. At anthesis, the mature anther wall included epidermis and some layers of parenchymal cells and several layers of endothecium cells with an evidently thickened radial wall.

**Key words:** *Amomum villosum* Lour.; anther development; starch; lipid

阳春砂(*Amomum villosum* Lour.)是中国四大南药之一,也是我国珍稀濒危的药用植物,历来被视为“医林珍品”,在中医药界享有盛誉。阳春砂的原产区是广东省阳春市,为姜科豆蔻属多年生草本植物,植株高达2.0~3.0 m,具根状茎和直立茎。根状茎匍匐地面;直立茎散生,不分枝,基部膨大成球状。叶2列,叶片长披针形,叶鞘开放,抱茎。穗状花序生于根状茎的花亭上。蒴果椭圆形,果皮被软刺。阳春砂果实入药称“春砂仁”。味辛,性温,具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎等功效<sup>[1]</sup>。

阳春砂由于花器官构造特殊即柱头高于花药,

较难自花授粉,且花序生于地面的根状茎上,被繁茂的地上茎和叶所遮盖,昆虫难于传粉,自然授粉结实率低,阻滞了阳春砂的可持续发展,也引起了学者的广泛关注。于志忱和韩德聪<sup>[2]</sup>研究了阳春砂小孢子母细胞的减数分裂和花粉粒发育,钱南芬等<sup>[3]</sup>曾对阳春砂进行雌配子体发育与受精过程做了详细的观察,高伟<sup>[4]</sup>也曾经就药用植物阳春砂生殖生物学特性做了初步研究。本文采用超薄切片和植物组织化学方法研究阳春砂的花药发育过程,揭示花药发育特征,从而为寻找新的授粉技术和提高授粉结实率提供理论依据,也为被子植物生殖生物学增添新的研究内容。

## 1 材料与方法

实验材料来自于福建省漳州市长泰县山重村阳

收稿日期:2014-12-15 接受日期:2015-02-15

基金项目:福建省教育厅科技项目(JA12437);漳州市科技计划项目(Z2011060)

\* 通讯作者 Tel: 86-013600979201; E-mail: hqtian@xmu.edu.cn

春砂种植地 经福建师范大学生命科学学院刘剑秋教授鉴定为阳春砂 *Amomum villosum* Lour.。阳春砂花期 5~6 月,果期 8~9 月。在花期,取不同发育阶段的花药,迅速投入用 50 mmol/L、pH 7.0 的二甲胍酸钠缓冲液配制的 2.5% 戊二醛前固定液中,室温固定 3 h。固定后的花药用相同缓冲液洗涤 3 次,每次 30 min。清洗后的花药再用 50 mmol/L、pH 7.0 的二甲胍酸钠缓冲液配制的 1% 锇酸后固定液在 4℃ 下固定过夜。次日用相同的缓冲液洗涤 3 次,每次 30 min。固定后的花药用系列梯度丙酮脱水, Epon 812 树脂包埋。用 Leica Ultracut R 型超薄切片机做半薄切片,切片厚 1 μm。染色步骤参照胡适宜和徐丽云<sup>[5]</sup>(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,呈现红色颗粒为多糖;用苏丹黑 B 复染细胞中的脂类物质,呈黑色颗粒为脂滴。用 Leica DMR 显微镜观察与拍摄。

## 2 实验结果

### 2.1 小孢子母细胞时期

阳春砂的小孢子母细胞体积大,细胞核被染成

红色,暗示其中存在多糖,细胞质中却分布着一些小脂滴。与其它植物不同的是阳春砂小孢子母细胞不形成厚厚的胼胝质壁,只是包被着一层薄的多糖性质的细胞壁,且细胞间隙中充满了多糖物质。

植物花药壁的结构通常由四层细胞构成:表皮、药室内壁、中层和绒毡层。但阳春砂的花药壁比较特殊,由多于四层的细胞组成,最外层的表皮由 1 列扁平的细胞构成;药室内壁和中层难于区分,由 10 余层细胞组成,且细胞壁被染成红色,说明是多糖性质;绒毡层细胞中分布有红色的淀粉颗粒,细胞呈长条形与其它药室壁细胞垂直排列(图 1A)。

### 2.2 四分体时期

阳春砂小孢子母细胞的减数分裂为连续型,形成的四分体有 5 种排列方式<sup>[2]</sup>。本实验中所观察到的四分体多数以“左右对称”方式排列,即呈“田”字型或三核线形排列,四分体时期的小孢子呈半圆形或半月形,被染成红色的多糖细胞壁分割包围着(图 1B)。随着四分体细胞壁的溶解,小孢子被释放,小孢子细胞壁增厚,在多糖性质的细胞壁中淹埋分布着刺状的棘突,这些棘突既不染成黑色,也不染成红色,指示棘突既不是由脂质物质组成,也不是由

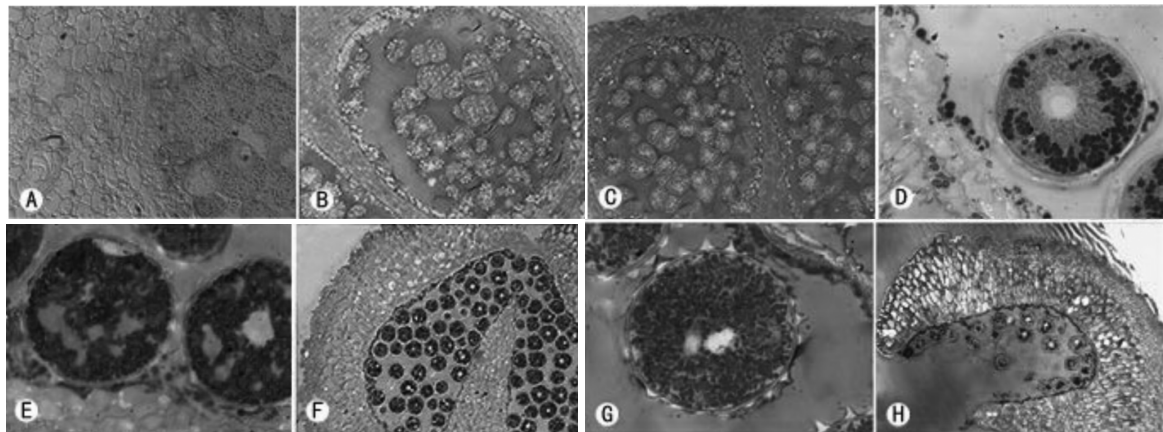


图 1 阳春砂花药发育的各个时期

Fig. 1 Different phases of developing anthers of *A. villosum*

注: A: 小孢子母细胞中分布有脂滴(×40); B: 四分体小孢子由二层薄壁包裹(×10); C: 绒毡层细胞表面出现脂滴(×10); D: 小孢子细胞核周围出现淀粉粒(×100); E: 生殖细胞呈透镜形紧贴花粉壁,绒毡层细胞完全退化(×100); F: 二胞花粉时期的花药壁包括表皮、药室内壁和中层(×10); G: 成熟花粉中贮存丰富的脂滴和淀粉粒(×100); H: 成熟花药壁包括表皮、多层薄壁细胞和径向壁加厚的药室内壁细胞层(×10)

Note: A: Microspore mother cells contained some lipids (×40); B: Tetrad microspores has two thin cell walls (×10); C: Some lipids appeared on the surface of tapetal cells (×10); D: Starch granules appear around the microspore nucleus (×100); E: A lentiform generative cell sticks to the inner surface of the pollen wall. Tapetal cells degenerated (×100); F: Anther wall of 2-celled pollen included epidermis, endothecium, middle layer (×10); G: Mature pollen contains numerous lipids and starches (×100); H: The mature anther wall included epidermis and some layers of parenchymal cells and several layers of endothecium cells with a thickened radial wall (×10).

多糖物质构成。四分体小孢子细胞核位于中央,细胞质中有丰富的脂滴,但未见显红色的多糖淀粉。

四分体时期的花药壁仍由表皮、药室内壁、中层和绒毡层组成,且药室壁的形态结构没有明显的变化,只是绒毡层细胞形状不规则,原来细胞中的多糖转化成脂滴,许多脂滴分布在绒毡层与四分体小孢子之间,表明此时绒毡层细胞很活跃地为四分体小孢子发育提供脂类物质(图1C)。

### 2.3 小孢子时期

随着四分体小孢子的释放,游离小孢子的体积有所增大,变为规则的圆形。此时小孢子已形成了一层多糖性质的完整壁,原来淹埋在细胞壁中的锥形棘突现出在小孢子表面。在小孢子中央围绕细胞核的周围出现许多显红色的多糖淀粉,这表明淀粉的合成与细胞核有密切关系,脂滴则分布在细胞质的周质中。在花药壁的组成细胞中,除了绒毡层细胞进一步解体,细胞严重变形,聚集了许多脂滴外,其它药壁细胞没有明显变化(图1D)。

### 2.4 二胞花粉时期

小孢子不均等分裂后产生一个体积较小的生殖细胞和一个体积较大的营养细胞,进入二胞花粉时期。早期的二胞花粉中,营养细胞核先移到细胞的中央,生殖细胞呈透镜状贴在花粉壁内侧。在营养细胞的细胞质中除了仍有很多脂滴外,也分布一些淀粉粒。此时花药壁的绒毡层已退化为残迹,在花药壁内侧与花粉粒之间分布着一些脂滴物质(图1E)。

随后,二胞花粉的生殖细胞离开花粉壁移向营养细胞中央,靠近营养核。生殖细胞和营养核既不染成红色也不染成黑色,显示二者多糖物质很少,脂类物质也不多。但在生殖核与营养核周围的细胞质中却充满了红色的多糖淀粉和黑色的脂滴。花药壁的表皮,细胞壁增厚;药室内壁细胞的径向壁纤维化增厚,中层只为一列横向延长的细胞,花药壁内侧分布许多脂滴(图1F)。

### 2.5 开花期

临近开花时,花粉粒中的生殖细胞呈梭形,位于营养细胞中央与营养核相邻。在营养细胞中充满了脂滴和淀粉粒。开花期的花粉壁显示红色,暗示主要成分是多糖物质。花粉外壁的表面布满了锥形棘突,这一结构有利于传粉(图1G)。开裂的花药壁细胞依然保持有10余层,包括数层径向壁纤维化加厚的药室内壁细胞和几层薄壁细胞以及最外面的一

层表皮细胞,这些细胞的细胞壁被染成红色,显示为纤维素性质(图1H)。

## 3 讨论

被子植物花药发育过程中,花粉作为“库”在其发育后期积累营养物质供以后花粉萌发利用。花药中营养物质的运输、转化和代谢与花粉发育密切相关,营养物质代谢异常往往伴随着花粉败育<sup>[6]</sup>。不同植物花粉发育中运输、转化和积累营养物质的时期和方式不同,大多数植物在二胞花粉时开始积累营养物质<sup>[7]</sup>。成熟花粉所贮存的大分子营养物质主要是脂类和淀粉,有的以淀粉为主,如中国鹅掌楸<sup>[8]</sup>;有的以脂类为主,如枸杞<sup>[9]</sup>;有的则兼有之,如桔梗的花粉积累脂滴和淀粉粒<sup>[10]</sup>。本实验中,阳春砂从小孢子母细胞到四分体时期,细胞首先积累营养物质是脂滴,而没有多糖淀粉;小孢子释放后开始积累淀粉;花粉成熟时则积累了丰富的脂滴和淀粉。阳春砂花粉在小孢子时期就开始积累营养物质,且在发育的不同阶段积累的营养物质不同,显示其特殊性。

小孢子积累营养物质的途径是运输和转化,花药壁的绒毡层细胞在小孢子发育中执行着营养物质的运输和转化功能<sup>[11]</sup>。然而本研究中,阳春砂的花药在小孢子母细胞时期,绒毡层分布有多糖淀粉,而小孢子母细胞却积累脂滴,这意味着小孢子母细胞能吸收多糖并转化为脂类物质。随着小孢子的发育,在小孢子细胞核周围开始出现淀粉粒,绒毡层开始解体,细胞质物质转变为脂滴供小孢子吸收,说明小孢子具有将脂类物质转化为多糖淀粉的能力。在绒毡层细胞已退化为残迹并将细胞中的物质转变为脂滴后,花粉中积累的多糖淀粉却逐渐增加,这暗示着阳春砂花粉自身能将脂类物质转化为糖类物质。在阳春砂花药发育中,花粉既能直接吸收绒毡层细胞的脂类物质,又能将脂类物质转化为多糖淀粉,这是阳春砂花粉发育的另一个重要特征。

在阳春砂花药发育中,小孢子母细胞缺少典型的胼胝质壁是一个有趣的现象。被子植物的孢子母细胞的一个特质是形成胼胝质壁,胼胝质壁在减数分裂中起重要功能<sup>[11]</sup>。然而阳春砂小孢子母细胞没有胼胝质壁但仍可进行减数分裂,这对今后胼胝质壁的功能研究提供了方向。阳春砂花粉壁呈现多糖性质是其花粉的另一特征,这种现象在其它植物中尚未见报道。被子植物的花粉外壁通常由胡萝卜

素和类胡萝卜素酯的孢粉素物质构成,花粉外壁在保护花粉以及授粉时的识别作用方面具有重要功能<sup>[11]</sup>。阳春砂花粉的多糖外壁是否具有孢粉素性质的功能? 这些问题有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I 236.
- 2 Yu ZC (于志忱), Han DC (韩德聪). Microspore mother cell meiosis and pollen grain development research on *Amomum villosum* Lour. *Acta Sci Nat Univ* (中山大学学报), 1982 4: 78-85.
- 3 Qian NF (钱南芬), Zhang ZJ (张振珏). Observation on female gametophyte development and fertilization process of *Amomum villosum* Lour. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1984 26: 365-371.
- 4 Gao W (高伟). Study of reproductive biological characteristics of medicinal plant *Amomum villosum* Lour. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), PhD. 2011.
- 5 Hu SY (胡适宜), Xu LY (徐丽云). Cytochemical method of display polysaccharide protein and lipid in epoxy resin thick slices. *Acta Botan Sin* (植物学报), 1990 32: 841-846.
- 6 Li DX (李东霄), Li J (李淦), Fen SW (冯素伟) et al. Cytochemical observation of fertile and sterile anthers of a thermosensitive wheat. *Crop J* (作物学报), 2013 39: 878-884.
- 7 Tian HQ (田惠桥), Zhu XY (朱学艺). Reproductive Biology of Angiosperms (被子植物生殖生物学). Beijing: Science Press 2012. 1-15.
- 8 Yin ZF (尹增芳), Fan RW (樊汝汉). Microsporogenesis cell chemical research on *Liriodendron chinensis*. *Bull Botan* (植物学通报), 1998 15(3): 34-38.
- 9 Xu Q (徐青), Wang XQ (王仙琴), Tian HQ (田惠桥). Distribution characteristics of lipid drops and starch in the anther development process of *Lycium barbarum* L. *J Mole Cell Biol* (分子细胞生物学报) 2006 39: 103-110.
- 10 Yang HJ (杨焕杰), Tian GW (田国伟), Shen JH (申家恒). Cytochemical study of microsporogenesis and male gametophyte development of *Platycodon grandiflorus*. *Nat Sci J Harbin Normal Univ* (哈尔滨师范大学自然科学学报), 1996 12(3): 84-90.
- 11 Hu SY (胡适宜). Reproductive Biology of Angiosperms (被子植物生殖生物学). Beijing: Higher Education Press, 2005. 29-92.