

# 大叶杨小孢子发生的组织化学观察\*

朱 彤 李文钊

(中国林业科学研究院林业研究所)

## 摘 要

大叶杨早期雄花以小孢子母细胞阶段越冬。大量淀粉粒贮存于花药表皮和药室内壁,并在减数分裂过程中向花药内部移动,逐渐消耗殆尽。与此同时,绒毡层细胞和小孢子母细胞逐渐积累多糖。绒毡层细胞始终含丰富的DNA、RNA、蛋白质。RNA和蛋白质在小孢子发生过程中表现一致性的分布和含量变化。

小孢子母细胞在减数分裂前期I细线期开始沉积胼胝质壁。胼胝质为颗粒状沉积,逐渐连结成片,于中期I完全包裹小孢子母细胞。以后胼胝质壁加厚,于中期II及后期II达到最厚。四分体形成后,由四分体中央向各向辐射形成胼胝质侧隔壁。四分体多排列为四面体形,偶尔可见左右对称形、十字交互形排列。后期四分体周缘胼胝质壁溶解消失,小孢子释放。侧壁最后被溶解。

**关键词** 大叶杨; 小孢子发生; 组织化学

杨属植物的小孢子发生过程,已在白杨组、黑杨组和青杨组植物中有过零散报道<sup>[1,4,5,8,14]</sup>,但详细描述并不多见。至于小孢子发生过程中的物质动态,研究工作较少<sup>[16]</sup>,以杨柳科植物为材料的组织化学研究则尚未报道。本文较为详细地报道大叶杨组(Sect. *Leucoides* Spach)大叶杨的小孢子发生过程中的DNA、RNA、蛋白质、淀粉及胼胝质的动态,以期探明大叶杨小孢子发生过程中的组织化学变化和其生理意义。

## 一、材料和方法

大叶杨(*Populus lasiocarpa* Oliv.)雄花材料于1983—1985年冬采自湖北宜昌,次年元月水培,定时取样。材料以50%乙醇配制的FAA固定液固定,常规石蜡法包埋,切片。切片厚8—12 $\mu$ 。

形态学观察用铁矾苏木精染色,固绿对染或PAS复染。组织化学定位以Feulgen反应染DNA<sup>[9]</sup>;以甲基绿-派洛宁法染RNA<sup>[11]</sup>;用PAS反应鉴定不溶性多糖<sup>[9]</sup>;用汞-溴酚蓝法

本文于1988年2月2日收到。

• 中国科学院科学基金资助的课题。

本文承蒙湖北宜昌地区大老岭林场提供实验材料,谨致谢忱。

染总蛋白质<sup>[13]</sup>；以0.05%水溶性苯胺蓝(0.1M磷酸缓冲液配制, pH为8.5)染色, 蓝紫光激发诱导胼胝质荧光<sup>[13]</sup>。

## 二、观察结果

**DNA:** 越冬的小孢子母细胞核大,对Feulgen反应呈弱反应,表明常态DNA处于低水平。进入减数分裂时期,小孢子母细胞的染色质丝和染色体对Feulgen反应均呈强正反应,染色质丝上可见念珠状染色粒,显示出DNA含量的上升(图版I,图1、2)。减数分裂后形成的小孢子对Feulgen反应呈弱反应(图版I,图3)。表皮细胞、药室内壁细胞和中层外层细胞在小孢子发生过程中,核对Feulgen反应始终为弱反应(图版I,图1—3)。绒毡层细胞在越冬的花药中即已分化完全,核中DNA含量较高,从花药横切来看,绒毡层细胞核的DNA含量相对最高(图版I,图1);当小孢子母细胞进行减数分裂时,核中DNA含量有所增加,尤其是分裂中的细胞核(图版I,图2);减数分裂后,核中DNA染色反应增加(图版I,图3)。

**RNA:** 形态静止期小孢子母细胞核仁对派洛宁染色呈强正反应,富含RNA,细胞质浓厚,亦含RNA(图版I,图4)。进入减数分裂的小孢子母细胞核仁仍富含RNA,但细胞质的RNA染色反应有所减弱(图版I,图5)。经减数分裂形成的小孢子的RNA染色结果类似分裂前期I的小孢子母细胞,含量和分布没有明显的变化(图版I,图6)。表皮细胞、药室内壁细胞和中层细胞在小孢子发生过程中,无论核仁还是细胞质,RNA含量始终处于低水平(图版I,图4—6)。小孢子母细胞早期,绒毡层细胞的细胞质和细胞核的RNA含量仅次于小孢子母细胞的含量,为壁层细胞之首(图版I,图4)。小孢子母细胞减数分裂时,绒毡层细胞的细胞核和细胞质RNA含量较前有所增加(图版I,图5)。小孢子母细胞减数分裂后,绒毡层核中RNA染色反应有所减弱(图版I,图6)。

**蛋白质:** 小孢子母细胞在减数分裂前和减数分裂中,细胞质浓厚,蛋白质的含量一直处于高水平(图版I,图7、8)。而减数分裂后形成的单核小孢子其蛋白质含量略有下降(图版I,图9)。表皮细胞和中层细胞蛋白质含量一直较低,且在减数分裂过程中随着细胞的液泡化而对彗-溴酚蓝反应有所减弱(图版I,图7—9)。绒毡层细胞在减数分裂前的小孢子母细胞时期即富含蛋白质,蛋白质含量在花药中仅次于小孢子母细胞(图版I,图7)。当小孢子母细胞进行减数分裂时,绒毡层细胞的细胞质浓厚,蛋白质含量极丰富,被总蛋白质染色反应着色很深(图版I,图8)。小孢子母细胞减数分裂形成小孢子后,绒毡层蛋白质反应略有减弱(图版I,图9)。

**多糖:** 形态静止期的小孢子母细胞不含淀粉粒及PAS正反应物质(图版I,图10)。但在以后的减数分裂中及减数分裂后的时期里,小孢子母细胞中逐渐被PAS反应所着色(图版I,图11、12)。小孢子母细胞时期,表皮细胞富含大颗粒淀粉,至小孢子母细胞减数分裂I时开始消耗减少,减数分裂前期I偶线期时消耗殆尽(图版I,图10、11)。药室内壁细胞在小孢子母细胞阶段亦含大量淀粉粒,消耗速度较表皮细胞稍慢。中层细胞在小孢子母细胞阶段早期不含淀粉粒,当小孢子母细胞减数分裂、表皮和药室内壁细胞贮藏的淀粉粒减少时,中层细胞则开始积累淀粉粒,积累的淀粉粒在减数分裂过程中被消耗(图版I、图10、11)。因此,

在小孢子时期，表皮、药室内壁和中层细胞中不存在淀粉粒(图版 I，图 12)。和小孢子母细胞一样，绒毡层细胞在小孢子母细胞早期不含淀粉粒和可溶性多糖(图版 I，图 10)。至小孢子母细胞减数分裂时，绒毡层细胞的细胞质对 PAS 反应呈正反应，即使在油镜下镜检也未见细胞质中含细小的淀粉粒，可能这些 PAS 正反应物质为可溶性多糖(图版 I，图 11)。单核小孢子时期，开始退化的绒毡层细胞对 PAS 反应的着色减弱(图版 I，图 12)。

**胼胝质：**小孢子发生过程伴随着胼胝质壁的形成和消失。胼胝质的沉积开始于小孢子母细胞减数分裂前期 I 的细线期。此时，小孢子母细胞的细胞质和细胞壁之间开始出现空隙，并在这些空隙处开始出现胼胝质颗粒的黄绿色荧光。由于小孢子母细胞原生质体和细胞壁之间的空隙并不一定先出现于细胞角隅处，故这些荧光也不集中于细胞角隅处(图版 II，图 1、2)。以后，胼胝质荧光逐渐加强，并由密集的点连结成片(图版 II，图 3、4)。至中期 I 时，胼胝质壁已完全包围小孢子母细胞(图版 II，图 5)。由减数分裂中期 I 至末期 I，胼胝质壁进一步加厚，荧光加强，尤其是细胞角隅处(图版 II，图 5—7)。中期 II 至后期 II，胼胝质壁达到最大厚度(图版 II，图 8、9)。减数分裂末期 II，小孢子母细胞除继续加厚周缘胼胝质壁外，开始形成分隔小孢子的侧向胼胝质壁。首先，在小孢子母细胞中央出现胼胝质反应的荧光，以后这些荧光沿小孢子侧壁方向辐射蔓延，在四分体早期与周缘胼胝质荧光汇合(图版 II，图 10、11)。随后，各个四分体的周缘胼胝质壁先后消失，部分小孢子释放。最后消失的是四分体的侧壁，因此小孢子完全游离(图版 II，图 12—16)。

## 讨 论

### (一) 胼胝质的积累和消失

前人对被子植物小孢子发生中胼胝质积累的初始位点给予注意<sup>[2,3,10]</sup>。大叶杨小孢子发生中胼胝质的积累开始于小孢子母细胞各面细胞壁均一的颗粒状沉积，细胞角隅处的胼胝质积累速度较高，但表现不出明显的先后沉积顺序。这与在小麦、熊足铁筷子(*Helleborus foetidus*)和落葵中胼胝质的积累方式不同<sup>[2,3,10]</sup>。

胼胝质壁的消失，在大叶杨中则表现出明显的先后顺序，这种顺序与其和绒毡层的相对位置有关，进一步证实胼胝质壁的消失是绒毡层细胞分泌的胼胝质酶作用的结果。

由于胼胝质壁的形成孤立了正在进行减数分裂的小孢子母细胞和以后形成的四分体，因此，胼胝质壁的形成被认为是小孢子母细胞减数分裂的先决条件，而在后期则是减数孢子自发地转为小孢子的前提<sup>[2,7,10]</sup>。在大叶杨中，胼胝质壁完全包裹小孢子母细胞是在减数分裂中期 I，对落葵、熊足铁筷子等植物的研究也证实这一点<sup>[3,10]</sup>。这意味着小孢子母细胞的孤立化于减数分裂中期 I 形成，后于减数分裂的启动，因此这种孤立化不能作为将小孢子母细胞导向减数分裂的先决条件。

### (二) 营养物质的贮藏、运输和利用

与其他许多植物一样<sup>[14,15]</sup>，大叶杨小孢子母细胞的营养源位于表皮及药室内壁。这些细胞中贮存有大量淀粉粒。随着花药的发育，这些淀粉粒逐渐向内转移，最终成为 PAS 阳性物质出现于绒毡层和新形成的小孢子中。具体过程如图 1 所示。

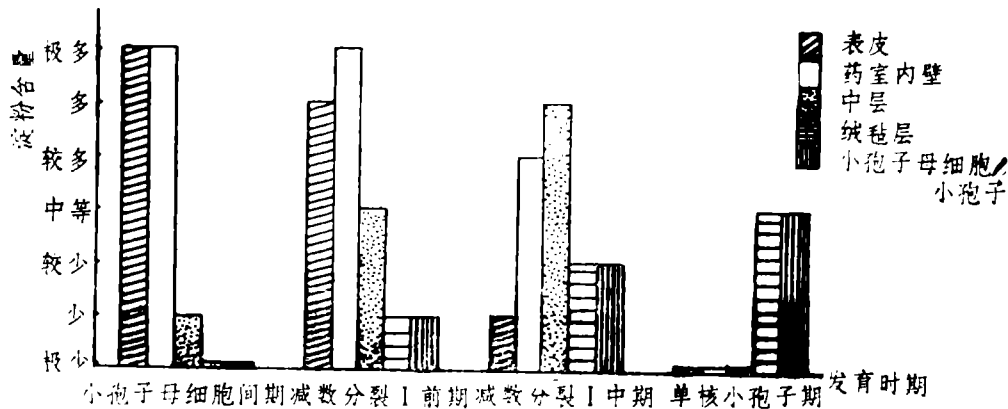


图1 示大叶杨小孢子发生过程中淀粉消长关系

大叶杨小孢子发生过程中蛋白质的消长则不如淀粉粒消长起伏大，其含量明显地与细胞生理活跃程度成正相关。基于这些事实，我们认为蛋白质的作用更多的是作为功能蛋白质和结构蛋白质参与代谢，而发育中所需的营养主要来源于贮存的淀粉粒。

### 参 考 文 献

- [1] 李文细等, 1982, 小叶杨种子发育的胚胎学观察, 林业科学, 18, 113—119.
- [2] 胡适宜, 1983, 被子植物胚胎学, 人民教育出版社, 北京.
- [3] 徐汉卿, 1986, 落葵的花粉粒和胚囊的形成和发育, 云南植物研究, 8, 305—312.
- [4] 董源, 1982, 毛白杨胚胎学观察 I, 花药的结构及花粉的发育, 北京林学院学报, (4), 80—92.
- [5] 樊汝汶等, 1982, 响叶杨种子发育的胚胎学观察, 南京林产工业学院学报, (3), 116—128.
- [6] 樊汝汶等, 1983, 美洲黑杨无性系 I-63 花粉粒的发育和超微结构, 南京林产工业学院学报, (3), 13—18.
- [7] Bhojwani, S. S., S. P. Bhatnagar, 1979, The embryology of angiosperms (3rd. ed.), Vikas Publ. House. New Delhi.
- [8] Currier, H. B., 1957, Callose substance in plant cells, Amer. J. Bot., 44, 478—488.
- [9] Jensen, W. A., 1962, Botanical histochemistry, Freeman. San Francisco/London.
- [10] Kapil, R. N., Tiwari, S. C., 1978, Plant embryological investigations and fluorescence microscopy: an assessment of integration, Int. Rev. Cytol., 53, 291—331.
- [11] Kurnick, N. B., 1955, Pyronin Y in the methyl-green-pyronin histological stain, Stain Technol., 30, 213—230.
- [12] Mazia, D., P. A. Brawer and M. Alfert, 1953, The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue, Biol. Bull., 104, 57—67.
- [13] Nagaraj, M., 1952, Floral morphology of *Populus deltoides* and *P. tremuloides*, Bot. Gaz., 114, 222—243.
- [14] Panchaksharapa, M. G., C. K. Rudramuniyappa, 1974, Localization of nucleic acids and insoluble polysaccharides in the anther of *Zea mays* L, A histochemical study, Cytologia, 39, 153—160.
- [15] Vijayaghavan, R. R., K. Cheema, 1978, Cytochemistry of microspore mother cells in *Calotropis procere*, Phytomorphology, 28, 137—141.

## HISTOCHEMICAL STUDY OF MICROSPOROGENESIS IN *POPULUS LASIOCARPA* OLIVER

Zhu Tong      Li Wendian

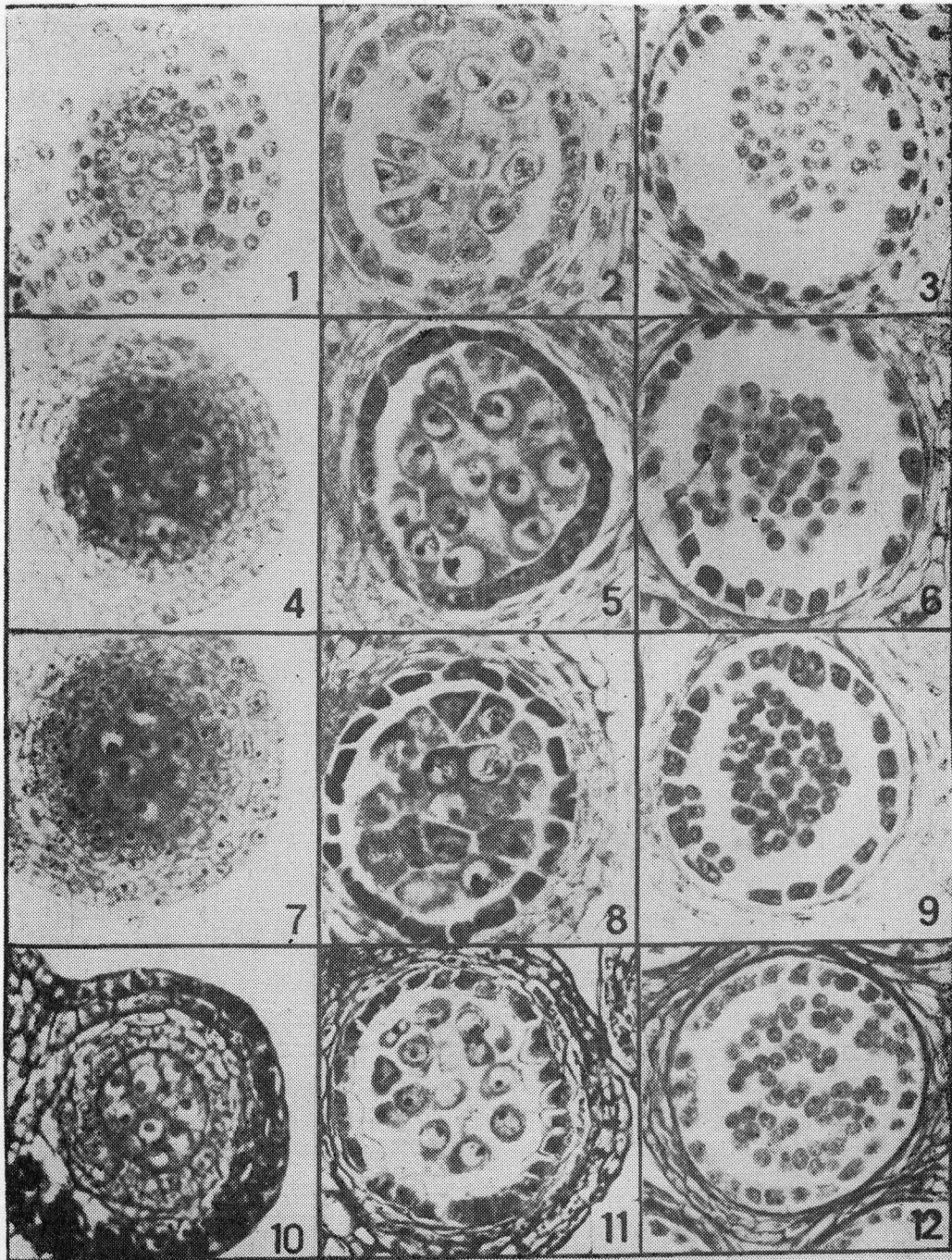
(The Research Institute of Forestry CAF)

### Abstract

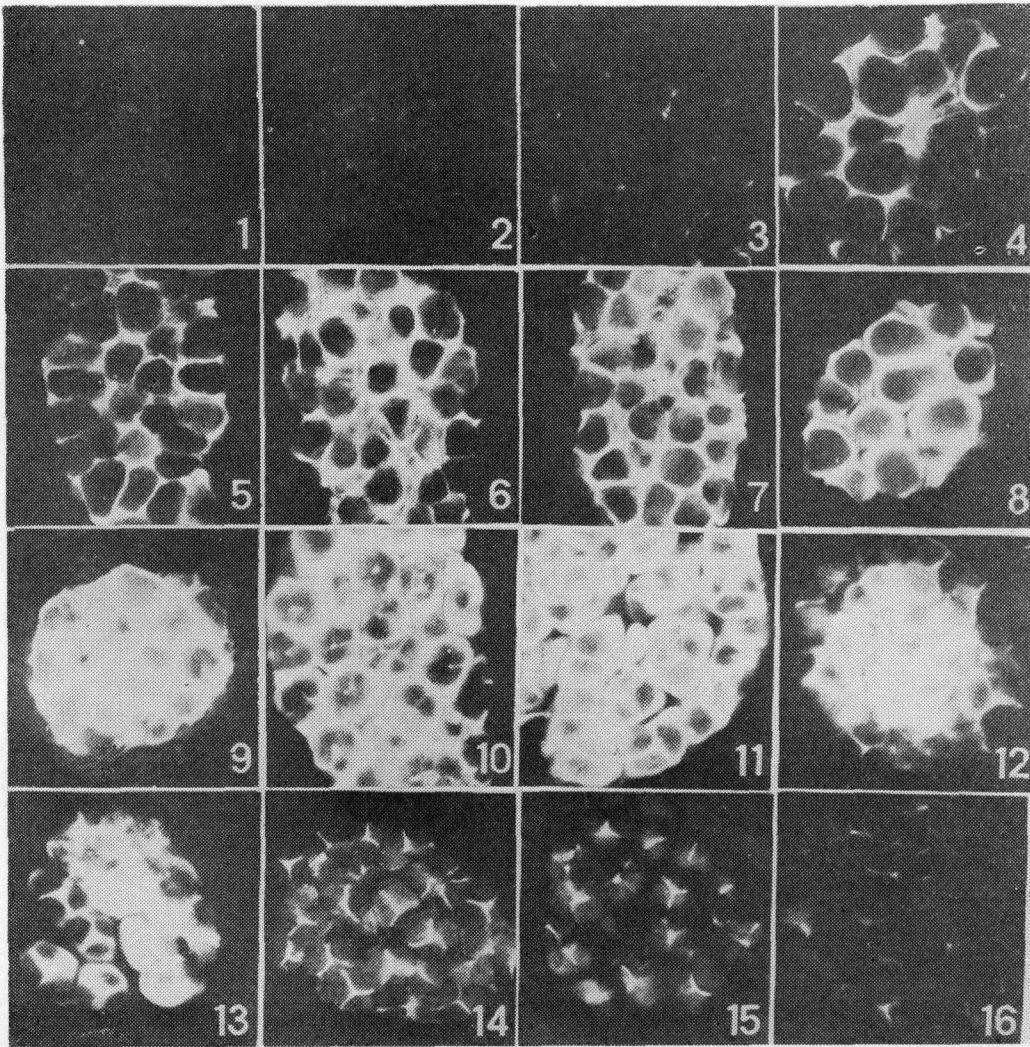
The male flowers of *Populus lasiocarpa* survive the winter in PMCs stage. Meanwhile, a large number of starch grains accumulate in the outer wall layers show a successive decrease in starch grains content in them, but retaining rich starch grains in the inner ones. Finally, all of the starch grains disappear from the wall layers and high concentration of soluble polysaccharides is further synthesized and maintained in tapetum and PMCs. Tapetal cells always contain rich DNA, RNA and protein. The changes of the content and the distribution of RNA are similar to those of the protein during microsporogenesis.

Callose spots are deposited among PMCs at leptotene stage. Gradually the spots connect with each other to form plates which completely surround the PMCs at metaphase I. By metaphase II and anaphase II, the callose plates deposit at its maximum of thickness. With the formation of tetrads, callose deposition starts on the center of the tetrads, and then extends rapidly along the four cells, separating them from each other. A great majority of tetrads are tetrahedral, seldom isobilateral.

**Key words:** *Populus lasiocarpa*; microsporogenesis; histochemistry



大叶杨各期花药横切。1.—3.小孢子发生过程中DNA的分布和消长, Feulgen反应, 固绿对染(1.小孢子母细胞间期, 560×; 2.减数分裂前期Ⅰ, 470×; 3.小孢子释放时期, 350×); 4.—6.小孢子发生中RNA的分布和消长, 甲基绿-派洛宁染色(4.小孢子母细胞间期, 600×; 5.减数分裂前期Ⅰ, 700×; 6.小孢子释放时期, 350×); 7.—9.小孢子发生中总蛋白质的分布和消长, 汞-溴酚蓝染色(7.小孢子母细胞间期, 530×; 8.减数分裂前期Ⅰ, 400×; 9.小孢子刚被释放时期, 320×); 10.—12.小孢子发生中多糖的分布和消长, PAS反应, 苏木精对染(10.小孢子母细胞间期, 530×; 11.减数分裂前期Ⅰ, 410×; 12.小孢子被释放时期, 336×)。



1.—16. 小孢子母细胞减数分裂过程中胼胝质的消长, 水溶性苯胺蓝染色, 蓝紫光激发荧光,  $375\times$  (1. 小孢子母细胞排列开始疏松, 胼胝质尚未开始积累; 2. 前期 I 细线期, 颗粒状胼胝质沉积于小孢子母细胞质壁间的空隙; 3. 前期 I 偶线期, 胼胝质开始在角隅处加厚; 4. 前期 I 粗线期, 胼胝质继续在角隅处加厚, 并开始逐渐包围小孢子母细胞; 5. 中期 I, 胼胝质壁基本上已将小孢子母细胞包围; 6. 后期 I, 胼胝质壁加厚; 7. 末期 I, 胼胝质壁的加厚表现在周缘小孢子母细胞; 8. 中期 II, 胼胝质壁进一步加厚; 9. 后期 II, 胼胝质全面加厚, 发出强烈荧光; 10. 末期 II, 小孢子母细胞由中央向细胞四周形成胼胝质的细胞板; 11. 小孢子四分体完全被胼胝质包围; 12. 小孢子四分体靠近绒毡层的壁被分解; 13. 小孢子四分体之间疏松, 周缘胼胝质壁减薄; 14. 小孢子四分体周缘胼胝质壁完全被分解; 15. 小孢子四分体进一步散开; 16. 小孢子四分体侧壁被分解, 小孢子散开)。