

青阳参小孢子发生和雄配子体发育

王定康¹ 孙桂芳² 翟书华¹ 赵 铮¹ 王 斌¹

(1. 昆明学院生物系 昆明 650214 ;2. 昆明医学院临床技能中心 昆明 650031)

摘 要 利用常规石蜡制片技术、荧光显微技术、光镜细胞化学技术、电子显微镜技术对青阳参小孢子发生和雄配子体发育进行了详细观察。结果显示,小孢子孢原细胞起源于皮下组织并在两个地方分化,孢原细胞平周分裂形成初生壁层和初生造孢层,初生壁层细胞再经过平周分裂形成2层细胞,其中最内一层即为绒毡层,绒毡层为分泌型绒毡层,既为小孢子发育提供营养来源,又分泌分泌物形成包围花粉粒的膜;初生造孢层细胞直接行使小孢子母细胞的功能;成熟花粉粒中含有大量淀粉粒、蛋白质、内质网、叶绿体、脂体和大液泡;包围花粉粒的膜和花粉粒之间的膜含有蛋白质成分和脂类成分;小孢子细胞核分裂形成营养细胞和生殖细胞,营养细胞和生殖细胞间没有细胞板形成,生殖细胞呈透镜型、比营养细胞小。

关键词 青阳参 小孢子发生 雄配子体

中图分类号 S567.2 文献标识码 A 文章编号 1673-5102(2011)04-0392-05

Microsporogenesis and Male Gametophyte Development of
Cynanchum otophyllum Schneid

WANG Ding-Kang¹ SUN Gui-Fang² ZHAI Shu-Hua¹ ZHAO Zheng¹ WANG Bin¹

(1. Biology Department, Kunming University, Kunming 650214 ;2. Clinical Skill center, Kunming Medical College, Kunming 650032)

Abstract Using traditional paraffin wax section, fluorescence microscopy, cytochemistry and TEM techniques, the microsporogenesis and male gametophyte development of *Cynanchum otophyllum* Schneid were observed in detail. The results showed that the anthers are 2-locular; the archesporium is hypodermal in origin and differentiates at two places; the archesporial cells divide periclinally to form a primary parietal layer and the primary sporogenous layer; the parietal layer then divides to form the tapetum; the tapetum is formed by 1-2 layers cells and is of the secretory type, it provides food materials to the developing microspores and the secretion to form the membrane of pollinium; the primary sporogenous cells function directly as the microspore mother cells; there are some starch grains, protein, endoplasm, chloroplast, lipocyte and vacuole existed in mature pollens; the membrane of pollen and pollinium contains protein and lipid; the nucleus of the microspore divides to produce the vegetative and generative nuclei; no true cell plate is formed but the cells are separated by a clear concave space; the generative cell is lenticular in outline and smaller in size than the vegetative cell.

Key words *Cynanchum otophyllum* Schneid, microsporogenesis, male gametophyte

萝藦科是双子叶植物中具有花粉块这一特殊结构的代表科。青阳参(*Cynanchum otophyllum* Schneid)隶属萝藦科(Asclepiadaceae)鹅绒藤属(*Cynanchum*)。花两性,为我国特有的一种药用植物。具有祛风除湿、解毒镇痉、补气益肾、强筋壮骨、活血散淤、祛痰止咳、解狂犬毒等功效^[1],是生产“青阳参片”和“排毒养颜胶囊”的主要原料。由

于对青阳参野生资源的无序采挖,造成野生资源匮乏,亟待进行人工种植以满足市场需要。

目前,对青阳参的研究主要集中在形态^[2]、资源、化学成分与药理^[3-7]、组织培养和愈伤组织的诱导^[8-9]等方面,王定康等^[10]对青阳参花部综合特征及其传粉适应性进行过报道,发现青阳参花结构非常复杂,存在“花多果少”的现象,这成为制约

青阳参种植业发展的瓶颈。为此,本文对青阳参小孢子的发生及雄配子体的发育进行了观察,旨在为青阳参生殖生物学和发育生物学研究提供基础资料,也为解决青阳参的繁殖问题、制定有效繁殖措施提供理论依据。此外通过观察还对青阳参花的着粉腺和转运臂的形成进行了讨论。有关青阳参小孢子发生和雄配子体发育的研究还未见报道。

1 材料和方法

材料采自昆明学院生物系实验基地内盆栽的青阳参植株。在开花期间,连续采集不同发育时期的花芽,然后用 FAA 固定,爱氏苏木精整体染色,按常规石蜡切片法制片,切片厚度 $8 \sim 10 \mu\text{m}$,BX60 Olympus 显微镜下观察并摄影,部分制片按汞—溴酚蓝法显示蛋白质、苏丹 IV 染色法显示脂类^[11]、碘—碘化钾染色法显示淀粉。部分材料用 2.5% 的戊二醛和 2% 的锇酸双固定,逐级酒精脱水,铂—钯离子镀膜, JEM-1011 透射电镜下观察并照相。

2 实验结果

2.1 小孢子发生

青阳参花药 2 室(图版 I :A, R)。幼嫩花药横切片显示孢原细胞起源于表皮下的原始细胞并且在两个地方分化。每个地方包括约 $4 \sim 7$ 个细胞形成一排(图版 I :B),孢原细胞平周分裂形成初生壁层和初生造孢层(图版 I :C),初生壁层细胞再经过平周分裂形成 2 层细胞,其中最内的一层即为绒毡层。绒毡层具有分泌功能,是分泌型绒毡层,由 $1 \sim 2$ 层紧密排列的单核细胞组成(图版 I :D),这些细胞中细胞质较浓稠,既为小孢子的发育提供营养来源,又分泌分泌物形成包围花粉粒的膜。

初生造孢层细胞直接发育并行小孢子母细胞的功能(图版 I :E)。此时,包围花粉块的膜还未形成。通过连续的切片观察,小孢子母细胞排列成 $6 \sim 8$ 排,每排约 $5 \sim 6$ 个细胞(图版 I :F),从花药横切面观察,每排约有 $5 \sim 6$ 个镰刀状的小孢子母细胞,这些小孢子母细胞在减数分裂的早期形态比较长(图版 I :D)。

在一个花药内部小孢子母细胞的减数分裂过程同步进行。在第一次减数分裂的中期 I,能见到有 18 个二价体(图版 I :G),两次减数分裂过程中,纺锤体的方向总是与小孢子母细胞的长轴平行(图版 I :H)。小孢子母细胞经过第一次减数分裂

后形成一个二分体,再经过一次减数分裂后形成一个四分体连在一起(图版 I :I),此时包围花粉粒的膜已经形成。小孢子最初为四边形且有规律地排列成一行,后来随着花粉块的长大和变圆其形状和位置发生了变化。尽管如此,花粉粒从没有互相分开而是紧密联系在一起形成一个花粉块,成熟的花粉粒由绒毡层分泌物形成的膜紧包着,此时绒毡层已消失(图版 I :J),可看到成熟花粉块中有一些败育的花粉。组织化学显示成熟花粉粒中含有大量淀粉粒(图版 I :K),但在绒毡层未消失前则不存在淀粉粒。包围花粉粒的膜和花粉粒之间的膜被汞—溴酚蓝染成蓝色,说明其成分含有蛋白质(图版 I :L)。汞—溴酚蓝染色显示成熟花粉粒中还含有大量蛋白质(图版 I :M),包围花粉粒的膜被苏丹 IV 染液染成橙黄色,显示膜含有脂类成分(图版 I :N)。进一步通过 NaOH 1% 溶解实验观察到包围花粉粒的膜能被溶解,花粉粒散开,说明膜的成分主要是孢粉素类物质,图中也可看到一些败育的花粉(图版 I :O)。在透射电镜下观察,成熟的花粉粒里含有内质网、叶绿体、线粒体和大液泡(图版 I :P),花粉粒形状不规则,花粉粒外有由孢粉素形成的外壁将花粉粒联系在一起,外壁与包围花粉粒形成花粉块的膜连在一起(图版 I :Q),均由绒毡层分泌而来。

2.2 雄配子体发育

刚形成的小孢子细胞质较浓稠,细胞核位于中央。后来,小孢子体积增大,核的位置逐渐向边移动接近细胞壁,细胞核分裂(图版 I :T)形成营养细胞和生殖细胞,营养细胞和生殖细胞间没有细胞板形成,生殖细胞呈透镜型、细胞质浓稠比营养细胞小,营养细胞有大液泡(图版 I :U)。没有观察到生殖细胞的分裂过程。

3 讨论

萝藦科植物的花药有 4 室的(如 *Cryptostegia*)和 2 室的(如 *Caralluma*)。本实验中观察到青阳参的花药有 2 室。Rendle^[12]将萝藦科从夹竹桃科分离出来,主要由于夹竹桃科植物的花药多为 4 室,花粉的转运机制和萝藦科植物不一样。萝藦科植物的花粉粒常常以花粉块的形式存在,而夹竹桃科的花粉粒不形成花粉块常常以四分体的形式存在^[13],因此,从形态学证明了青阳参从属于萝藦科。

无论花药是 4 室的还是 2 室的,在报道过的萝

摩科植物中,孢原细胞均起源于皮下组织,但就花药是4室的植物看其起源于皮下组织的4个地方,而花药是2室的植物在2个地方分化^[14],绒毡层具有分泌功能,是分泌型绒毡层,而且初生造孢层细胞直接行使小孢子母细胞的功能^[14~15],这与本实验观察青阳参的结果一致,然而在关于小孢子母细胞减数分裂过程的报道中,大多数报道小孢子在花粉块内的发育过程就像在本实验对青阳参观察的结果一样是同步进行的^[14,16],但 Deshpande & Jonega^[15]在 *Leptadenia* 中发现小孢子母细胞形成营养细胞和生殖细胞的过程并不同时进行。

绒毡层由初生壁层细胞分裂形成,包围着小孢子母细胞,为小孢子母细胞的分裂提供营养物质和能量,包围花粉块的膜在小孢子母细胞分裂过程中(图版 I :A,D,E,H)还未形成,花粉粒成熟后,绒毡层逐渐降解(图版 I :V),包围花粉块的膜由绒毡层分泌形成(图版 I :J),成熟花粉粒中已含有内质网、叶绿体、线粒体、淀粉粒和液泡等(图版 I :P)。这与 Biswas^[16]在 *Daemia extensa* 中报道的结果一致。

青阳参的两个分别来源于不同花药的花粉块由着粉腺通过转运臂连接着,通过传粉昆虫将1个传粉单位(1着粉腺、2转运臂和2花粉块)从花粉囊中拔出并带走以达到传粉的目的^[10]。然而,就着粉腺和转运臂的形成机制,不同的作者有不同的看法,Woodson^[17]认为着粉腺仅由绒毡层形成,而 Rao & Rao^[14]、Biswas^[16]和 Deshpande & Jonega^[15]认为着粉腺是由柱头边缘部分的一些分泌细胞分泌而来,Deshpande & Jonega^[15]认为转运臂来源于绒毡层的分泌物,而 Biswas^[16]则认为转运臂是由柱头边缘部分的一些分泌细胞的分泌物向下滴和绒毡层的分泌物通过解体的花药壁向外线状溢出联合形成,待这些分泌物干后固化而形成转运臂。通过扫描电镜观察(图版 I :S)发现,转运臂的表面非常光滑,而且连接着粉腺和花粉块的两端似乎有缝隙,并不像是由分泌物形成的,而着粉腺表面有一些皱纹,似乎由某种分泌物形成。

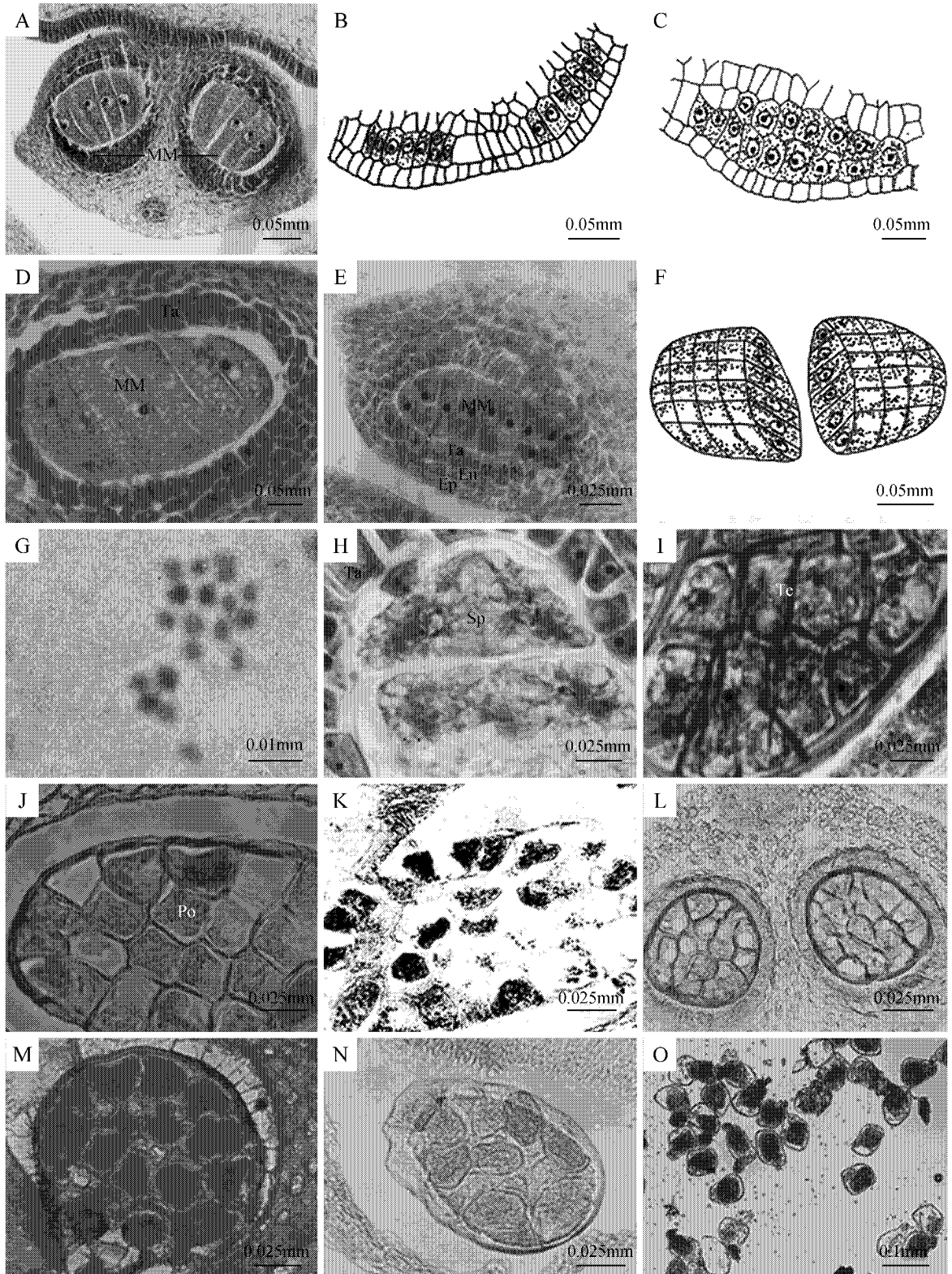
通过对大量的材料进行切片观察,发现青阳参花粉块里面的花粉有很多是败育的,另外青阳参的花粉—胚珠比仅为6.82^[10],与其它异花授粉植物相比非常低,这可能是影响青阳参坐果的原因

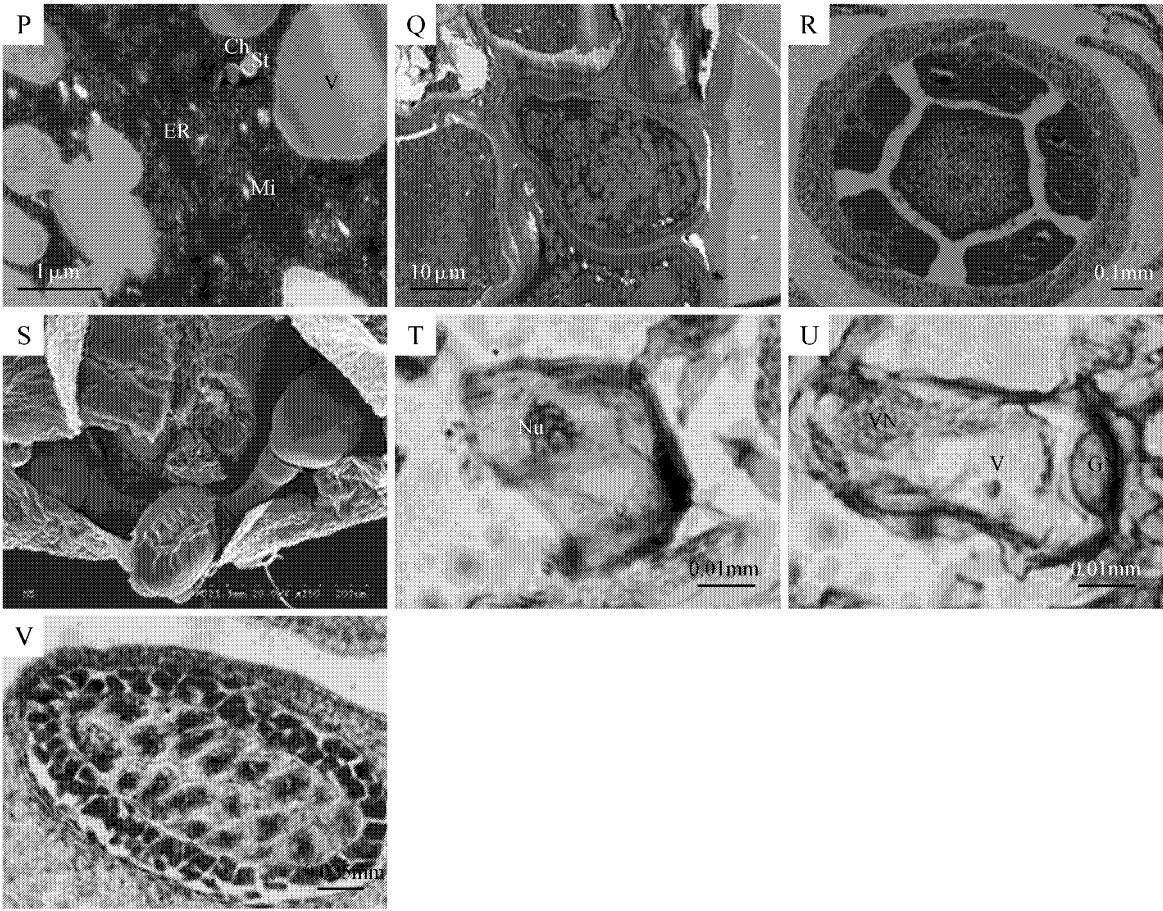
之一。

由于青阳参的染色体较小,其染色体数目还不是很肯定。

参 考 文 献

1. 罗天浩. 森林药物资源学[M]. 北京:国际文化出版公司,1994.
2. 朱兆云. 云南天然药物图鉴.第2卷[M]. 昆明:云南科技出版社,2004.
3. 木全章. 滇产青阳参植物的药理和临床研究[J]. 药物通信,1979(1):35.
4. 木全章,周茜兰. 青阳参化学成分的研究[J]. 药学报,1983a,18(5):350-362.
5. 木全章,周茜兰. 青阳参的成分研究[J]. 云南植物研究,1983b,5(1):99-103.
6. 木全章,陆建荣,周茜兰. 青阳参中抗癫痫成分—青阳参贰甲和乙的结构[J]. 中国科学(B辑),1985,8:724-730.
7. 裴印权,曹龙光,谢淑娟,等. 青阳参的中枢药理研究[J]. 北京大学学报:医学版,1981,13(3):213-217.
8. 赵沛基,甘烦远,殊娜,等. 青阳参组织培养及愈伤组织的成分分析[J]. 植物学通报,2003,20(5):565-571.
9. 刘秀贤,李正红,邓疆. 青阳参的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2006,42(5):902.
10. 王定康,孙桂芳,翟书华,等. 青阳参花部综合特征及其传粉适应性[J]. 云南植物研究,2009,31(1):8-14.
11. 孙敬三,钱迎倩. 植物细胞学研究方法[M]. 北京:科学出版社,1987:134,136,149.
12. Rendle A B. Classification of Flowering Plant[M]. Cambridge:Dicotyledons,1938.
13. Erdtman G. An Introduction to Pollen Analysis[M]. Waltham:Chronica Botanica Company,1943.
14. Rao C V, Rao S R. Embryology of *Cryptostegia grandiflora* and *Caralluma attenuate*[J]. J Indian bot Soc,1954,33:453-472.
15. Deshpande B D, Joneja P. Studies in Asclepiadaceae I. Morphology and embryology of *Leptadenia pyrotechnica* Decn[J]. Phytom,1962,19(1):73-84.
16. Biswas J. Embryological Studies In *Daemia Extensa* Bl[J]. Indian Botan Soc,1957,36:217.
17. Woodson R E. The North American Asclepiadaceae. I. Perspective of the genera[J]. Missouri Botan Garden,1941,28:193.





图版 I 青阳参小孢子发生和雄配子体发育 A. 横切片示青阳参花药 2 室 ;B ,C. 幼嫩花药横、纵切片示意图显示孢原细胞 ;D. 绒毡层由 1~2 层紧密排列的单核细胞组成 ;E. 初生造孢层细胞直接行使小孢子母细胞的功能 ;F. 通过连续的切片观察 ,立体示意图示小孢子母细胞排列成 6~8 排 ,每排约 5~6 个细胞 ;G. 18 个二价体 ;H ,I. 四分体形成过程 ;J. 成熟的花粉粒由绒毡层分泌物形成的膜紧紧包着 ,此时绒毡层已消失 ;K. 组织化学显示成熟花粉粒中含有大量淀粉粒 ;L. 组织化学显示包围花粉粒的膜和花粉粒之间的膜成分含有蛋白质 ;M. 组织化学显示成熟花粉粒中含有大量蛋白质 ;N. 组织化学显示包围花粉粒的膜含有脂类成分 ;O. NaOH 1% 溶解实验说明膜的成分主要是孢粉素 ;P. 透射电镜下显示成熟的花粉粒里含有内质网、叶绿体、线粒体和大液泡 ;Q. 透射电镜下显示花粉粒形状不规则 ,相邻花粉粒由孢粉素形成的膜联系在一起 ,孢粉素形成的膜与包围花粉粒形成花粉块的膜连在一起 ;R. 花顶部横切片示青阳参单花合蕊冠的顶部 ;S. 扫描电镜照片示青阳参花的着粉腺和转运臂 ;T ,U. 小孢子细胞核分裂形成营养细胞和生殖细胞 ;V. 绒毡层逐渐降解形成花粉块的膜 Po. 花粉块 ;Ta. 绒毡层 ;Sp. 纺锤体 ;Te. 四分体 ;ER. 内质网 ;Ch. 叶绿体 ;V. 液泡 ;C. 着粉腺 ;T. 转运臂 ;MM. 小孢子母细胞 ;En. 药室内壁 ;Ep. 表皮 ;Mi. 线粒体

Plate I Microsporogenesis and development of male gametophyte in *C. otophyllum* A. Tranverse section showing the anther are 2-locular ;B ,C. Diagrammatic representation of T. s and L. s. of anther primordia respectively , showing archesporium ;D. The tapetum was formed by 1~2 layers cells and was of the secretory type ;E. The primary sporogenous cells functioned directly as the microspore mother cells ;F. Diagrammatic representation of the arrangement of microspore mother cells in a pollinium ;G. Metaphase I showing 18 bivalents ;H ,I. Stages in the formation of microspore tetrad ;J. T. s. of anther lobe with pollinium , surrounding by uninucleate tapetal cells , note the thick tapetal secretion enclosing the pollen mass ;K. Histochemistry showing a lot of starch grains existed in mature pollens ;L. Histochemistry showing the membrane of pollen and pollinium contained protein ;M. Histochemistry showing much protein in mature pollens ;N. Histochemistry showing the membrane of pollen and pollinium contained lipid ;O. Membrane of pollen and pollinium dissolved by NaOH 1% which showed the component was sporopollenin ;P. TEM showing a lot of endoplasm , chloroplast , lipocyte and vacuole existed in mature pollens ;Q. TEM showing the shape of pollens was irregular and the membrane of pollen and pollinium connected each other ;R. T. s. of flower bud at the level of stigmatic head ;S. SEM showing the corpusculum and translator arm ;T ,U. The nucleus of the microspore divided to produce the vegetative and generative nuclei ;V. Tapetal cells degraded and formed the membrane of pollinium Po. Pollinia ;Ta. Tapetum ;Sp. Spindle ;Te. tetrad ;ER. Endoplasm ;Ch. Chloroplast ;V. Vacuole ;C. Corpusculum ;T. Translator arms ;MM. Microspore mother cell ;En. Endothelial layer ;Ep. Epidermis ;Mi. Mitochondrias