

甜菜无融合生殖单体附加系 M14 大孢子发生期间细胞壁胼胝质的变化

申 业¹ 申家恒^{2,*} 郭德栋¹ 方晓华³ 刘丽萍¹

(¹ 黑龙江大学生命科学学院生物工程系, 黑龙江哈尔滨 150080; ² 哈尔滨师范大学生命与环境科学学院生物系, 黑龙江哈尔滨 150080; ³ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080)

摘 要: 应用脱色苯胺蓝诱导荧光法观察了甜菜单体附加系 M14 (*Beta vulgaris* L., VV + 1C, 2n = 18 + 1) 正常有性生殖与二倍体孢子生殖时, 大孢子发生期间细胞壁内胼胝质的变化。结果表明, 非型 (*Allium odorum*-type) 胚囊大孢子发生时, 自大孢子母细胞的珠孔端细胞壁内出现胼胝质荧光, 并逐渐扩展到整个细胞壁, 中期 I 至末期 I 细胞壁呈现胼胝质荧光。二分体时, 珠孔端大孢子细胞壁内胼胝质荧光消失, 二分体之间的横壁以及合点端功能大孢子的侧壁上荧光明显。二倍体功能大孢子的合点端细胞壁内的胼胝质荧光消失。单核胚囊形成后, 其细胞壁内无胼胝质荧光, 而退化的大孢子细胞壁胼胝质荧光显著。蝶须型 (*Antennaria*-type) 胚囊大孢子发生时, 大孢子母细胞、二倍体功能大孢子的细胞壁均无胼胝质荧光。蓼型 (*Polygonum*-type) 胚囊大孢子母细胞减数分裂时, 其珠孔端细胞壁出现胼胝质荧光, 并逐渐扩展到整个细胞壁。二分体、三分体、四分体时期, 胼胝质荧光主要存在于大孢子之间的横壁上, 侧壁内胼胝质荧光较弱。退化的大孢子细胞壁胼胝质荧光明显, 功能大孢子细胞壁上缺少胼胝质荧光。此外, 还讨论了大孢子母细胞减数分裂与细胞壁内沉积胼胝质之间的相关性。

关键词: 甜菜单体附加系 (*Beta vulgaris* VV + 1C, 2n = 18 + 1); 兼性无融合生殖; 大孢子发生; 胼胝质
中图分类号: S566

Dynamics of Callose Deposition in Cell Walls during Megasporogenesis in the Apomictic Monosomic Addition Line M14 of *Beta corolliflora* of Sugar Beet

SHEN Ye¹, SHEN Jia-Heng^{2,*}, GUO De-Dong¹, FANG Xiao-Hua³ and LIU Li-Ping¹

(¹ Department of Biological Engineering, College of Life and Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang; ² Department of Biology, College of Life and Environment Science, Harbin Normal University, Harbin 150080, Heilongjiang; ³ Institute of Genetic and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Callose in cell walls was observed by the callose aniline-blue fluorescence during megasporogenesis in line M14, a chromosome 9 monosomic addition line of *Beta corolliflora* Zoss. (*Beta vulgaris* L., VV + 1C, 2n = 18 + 1), in which the modes of reproduction are facultative apomixis, diplosporous and sexual reproduction. The results are as follows: *Allium odorum*-type—Callose first occurs in the wall of megasporocyte from the micropylar end, then gradually envelops the whole cell. Megasporocyte is surrounded by the wall with callose during metaphase I, anaphase I and telophase I. At dyads stage, callose in micropylar end begins to disappear, and callose fluorescence displays in the transverse walls between dyads and side walls of the diplosporous functional megaspore in chalazal end. As development goes on, callose fluorescence disappears in the chalazal wall of diplosporous functional megaspore. No callose fluorescence shows in the wall of mononuclear embryo sac after its formation, while thick callose deposits in the wall of the degenerative megaspore. *Antennaria*-type—There is no callose deposition in the wall from megasporocyte stage to diplosporous functional megaspore stage all along. *Polygonum*-type—During the process of megasporocyte meiosis, callose occurs first in the wall of megasporocyte from micropylar end, then gradually envelops the whole cell. Callose exists mainly in transverse walls during dyad, triad and tetrad stages, a little in side walls. Thick callose deposits in the walls of degenerative megaspores, while little in the wall of functional megaspore. In addition, correlations between the meiosis and callose deposition in the wall of megasporocyte have been discussed.

Key words: Monosomic addition line in sugar beet (*Beta vulgaris* L., VV + 1C, 2n = 18 + 1); Facultative apomixis; Megasporogenesis; Callose

基金项目: 黑龙江省基金委员会资助项目 (C9908)、国家高新技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (J99-A-01-4) 和国家自然科学基金项目 (30470114)。

作者简介: 申业 (1970-), 女, 讲师, 博士, 从事植物分子与发育生物学研究。

* 通讯作者 (Corresponding author): 申家恒。E-mail: hsdshenjiaheng@yahoo.com.cn; Tel: 0451-88068652

Received (收稿日期): 2005-03-28; Accepted (接受日期): 2005-10-04.

关于被子植物大孢子发生时细胞壁内胼脂质的变化,前人已做过很多研究^[1-7]。因胼脂质的变化与植物功能大孢子的分化与发育存在一定的联系^[1,4,5],引起人们的关注。在无融合生殖的物种里,大孢子发生时,细胞壁内没有胼脂质的沉积,并被认为可能是无融合生殖开始的结果^[8]。也有人认为,大孢子母细胞细胞壁无胼脂质沉积是二倍体孢子形成区别于有性生殖的特征之一^[9]。甜菜单体附加系M14是兼性无融合生殖体,存在正常的有性生殖以及二倍体孢子生殖。研究有性生殖与二倍体孢子生殖中大孢子发生期间细胞壁内胼脂质的变化,有可能为鉴别有性生殖与二倍体孢子生殖之间的区别提供细胞学标记。

1 材料和方法

1.1 材料

研究试材为甜菜单体附加系M14(*Beta vulgaris* L.,VV+1C,2n=18+1)。栽培甜菜(*Beta vulgaris* L.)为本实验室培育的非整倍体的初级三体PT6(VV+1,2n=19),带有无融合生殖特性的野生种白花甜菜(*Beta corolliflora* Zoss,CCCC,2n=4x=36)引种于英国皇家植物园。以栽培甜菜为母本,白花甜菜为父本进行杂交,获得真实杂种VC88-1(VVCC,2n=4x=36),再以栽培甜菜回交,产生带有白花甜菜染色体的甜菜单体附加系。经形态学与细胞学鉴定,获得9种类型的单体附加系,其中M14为带有白花甜菜第9号染色体的栽培型(IX)单体附加系。白花甜菜染色体携带无融合生殖基因,使原来只进行有性生殖的栽培甜菜可以高效表达无融合生殖特性^[10,12]。

材料种植于黑龙江大学植物园内,自1998至2002年,每年6月中旬至7月下旬摘取不同发育期的花蕾进行固定并保存。

1.2 方法

材料经卡诺固定液(纯酒精:冰醋酸=3:1)固定1~2h,转入70%酒精保存。爱氏苏木精整体染色,常规石蜡法制片,切片厚度为8μm。按Jensen的方法^[13]改用0.05%水溶性脱色苯胺蓝染色30min用以鉴别胼脂质。分别用Olympus BH-2型光学显微镜和Olympus BH-RFL型荧光显微镜在u激发,阻挡滤光片为Y475nm的条件下观察和照相。

2 结果与分析

甜菜单体附加系M14为兼性无融合生殖体,其中二倍体孢子生殖胚囊类型又分为非型和蝶须型,

有性生殖胚囊为蓼型(另文报道)。自大孢子母细胞至单核胚囊发育时期的胚珠切片经脱色苯胺蓝染色后,用于研究大孢子发生期间细胞壁胼脂质的变化。

2.1 二倍体孢子发生过程细胞壁胼脂质的变化

2.1.1 非型(*Allium odorum*-type)胚囊发育类型

二倍体孢子生殖胚囊的发生起始于大孢子母细胞,大孢子母细胞经减数分裂I产生二分体。珠孔端一个二分体细胞退化,合点端一个二分体细胞分化为二倍体功能大孢子。未发生减数分裂II。由二倍体功能大孢子经过3次连续的有丝分裂形成八核胚囊,进而分化为七细胞胚囊。卵细胞的染色体组为VV+0.2n=18+0或VV+2C.2n=18+2。

大孢子母细胞减数分裂前期I的细线期(图版I-1)细胞壁内尚未出现胼脂质荧光(图版I-2)。终变期时(图版I-3),珠孔端细胞壁上的胼脂质黄绿色荧光较弱,而在细胞的中部,胼脂质荧光很强(图版I-4)。图版I-5为早中期I,核膜消失,染色体开始向赤道面移动。图版I-6显示早中期I,细胞中部的细胞壁上沉积较多的胼脂质。此时,下方已进入中期的细胞,其壁内反而没有任何荧光出现,表明此细胞壁内没有胼脂质的沉积,这个细胞很可能为蝶须型胚囊的起始细胞——二倍体功能大孢子。图版I-7为典型的中期I,在大孢子母细胞珠孔端壁与侧壁上胼脂质荧光明显(图版I-8)。图版I-9为后期I,两组子染色体向两极移动,大孢子母细胞的细胞壁呈现较均匀的荧光(图版I-10)。图版I-11、13为末期I,两子核已形成,子核间出现成膜体,此时大孢子母细胞被胼脂质的细胞壁包围,珠孔端的横壁以及侧壁上的胼脂质荧光较强(图版I-12,14)。图版I-15为末期I,两子核间的成膜体内形成细胞板并向侧壁延伸。刚形成的细胞板有微弱的荧光,表明细胞板内有胼脂质的沉积。此时,细胞板至珠孔端的细胞壁内胼脂质荧光较弱,而在细胞板至合点端的细胞壁内仍然有胼脂质的沉积,尤其是左侧壁内的胼脂质荧光非常明显(图版I-16)。二分体时期(图版I-17),可见到横壁上存在较强的黄绿色荧光,二分体的珠孔端细胞壁上的荧光很弱,而二分体合点端的细胞侧壁上仍见到较强的荧光(图版I-18)。自末期I细胞板出现后,二分体合点端细胞壁的荧光较弱直至消失(图版I-16,18)。二分体的珠孔端细胞呈现退化迹象,而合点端细胞纵向延伸,增大细胞体积(图版I-19)。二分体珠孔端细胞的细胞壁中已无荧光,只在宿存的合点端的二倍体功能大孢子的珠孔端横壁以及侧壁中有

胼胝质荧光,合点端的细胞壁内无胼胝质荧光(图版 I-20)。图版 II-21 的二分体珠孔端细胞已退化,合点端的细胞分化为二倍体功能大孢子,细胞内出现液泡,成为二倍体孢子生殖胚囊的原始细胞。在二倍体功能大孢子珠孔端横壁上以及侧壁上仍可见胼胝质荧光(图版 II-22)。当二倍体功能大孢子发育成为单核胚囊时(图版 II-23,25),单核胚囊的细胞壁的荧光较弱并消失。相反,在退化的珠孔端细胞的位置上明显可见胼胝质荧光(图版 II-24,26)。

2.1.2 蝶须型 (*Antennaria*-type) 胚囊发育类型

起始于大孢子母细胞,不经减数分裂,而直接分化为二倍体功能大孢子后,经3次有丝分裂形成八核胚囊,经细胞化发育成为二倍体的雌配子体。卵细胞的染色体组为 $VV + 1C, 2n = 18 + 1$ 。

大孢子母细胞时细胞壁上没有胼胝质荧光(图版 II-27,28),而当大孢子母细胞直接分化为二倍体功能大孢子并进入分裂中期时,其细胞壁上仍没有胼胝质的荧光(图版 II-29,30)。

2.2 有性生殖时,大孢子发生过程中细胞壁胼胝质的变化

有性生殖起始于大孢子母细胞,经减数分裂形成线形排列的4个大孢子,珠孔端3个退化,合点端为单倍体功能大孢子,功能大孢子发育成单核胚囊,后经3次连续的有丝分裂产生八核胚囊,进而经细胞分化发育成为七细胞蓼型胚囊。

自大孢子母细胞到二分体形成,大孢子母细胞细胞壁内胼胝质的变化与非型胚囊大孢子母细胞细胞壁内胼胝质的变化基本相同。图版 III-31 为二分体阶段,其细胞内均呈现末期 II。图版 III-32 为其荧光图像,二分体细胞之间的横壁以及合点端细胞的右侧细胞壁具强烈的胼胝质荧光。图版 III-33 为三分体时期,合点端先形成2个大孢子,而珠孔端的二分体细胞仍处在末期 II,二者的分裂处于不同步的状态。图版 III-34 表明,三分体的横壁上以及合点端大孢子的侧壁上有较强的胼胝质荧光。随着线形四分体的产生(图版 III-35),自珠孔端的大孢子与第2个大孢子以及第3个大孢子之间的横壁上仍可见强烈的荧光,而第3个大孢子与合点端大孢子之间的横壁上荧光很弱,除合点端功能大孢子的侧壁以及合点端细胞壁缺乏胼胝质荧光外,其余3个即将退化的大孢子周围的细胞壁内均有较弱的胼胝质荧光。图版 III-37 为珠孔端3个大孢子退化,只有合点端的大孢子发育成为单倍体功能大孢子。此时退化的大孢子被强烈的胼胝质荧光所包围。唯有功能大

孢子的细胞壁无胼胝质荧光(图版 III-38)。

2.3 非型胚囊、蝶须型胚囊所占比例的统计

由于有性生殖胚囊与二倍体孢子生殖胚囊在发育上从单核胚囊以后在细胞形态学上基本相同,二者难以区别。蝶须型胚囊、非型胚囊与蓼型胚囊在大孢子发生期间的鉴别,大孢子母细胞至单核胚囊期,细胞壁内的胼胝质变化则可作为依据之一,将蝶须型胚囊与非型胚囊、蓼型胚囊区分开。根据非型胚囊发生时二分体图像以及二分体细胞中一个细胞退化,一个细胞保留;而蓼型胚囊的大孢子发生时二分体、三分体、四分体以及三个细胞退化,一个功能大孢子保留的图像,又可将非型胚囊与蓼型胚囊分开。

我们选取的胚珠制片是在大量制片中挑出的能够识别不同发育时期的胚珠,具有随机性。共观察55个胚珠,属于非型胚囊发育的28个,发生率为50%;属于蝶须型胚囊发育的21个,发生率为40%;属于蓼型胚囊发育的6个,发生率为10%。

上述结果表明,甜菜单体附加系 M14 为兼性无融合生殖体,以二倍体孢子生殖为主要的繁殖方式,而以有性生殖为次要繁殖方式。

3 讨论

3.1 二倍体孢子生殖时大孢子发生期间胼胝质的变化模式

二倍体孢子形成过程中,无融合生殖体的大孢子母细胞壁缺乏胼胝质的积累,因此,大孢子母细胞通过有丝分裂形成胚囊。这已经在大量无融合生殖的物种中被提及,甚至被认为是鉴定二倍体孢子生殖的方法之一^[8]。

Crane 等对披碱草属二倍体孢子形成无融合生殖种 *Elymus rectisetus* 的研究表明,大孢子母细胞壁上无胼胝质沉积^[14]。Carman 等比较了披碱草 (*Elymus rectisetus*) 中有性生殖和无融合生殖大孢子发生期间胼胝质分布,与正常减数分裂相反,二倍体孢子生殖的大孢子母细胞的细胞壁上都无胼胝质沉积^[15]。这个结果已经在几个二倍体孢子生殖的禾本科植物中得到证实。

在小麦 (*Triticum aestivum*) 和二倍体孢子生殖的披碱草 (*Elymus rectisetus*) 杂交的 BC₁ 中,有性生殖的大孢子母细胞壁有胼胝质沉积,而进行无融合生殖的大孢子母细胞壁上没有胼胝质沉积^[16]。在进行二倍体孢子生殖的 *Elymus resisetus*、*Tripsacum* 和 *Poa nemoralis* 的大孢子母细胞细胞壁上缺乏胼胝质^[17]。

甜菜单体附加系 M14 的二倍体孢子生殖的蝶须型胚囊发生时,大孢子母细胞不进行减数分裂,直接分化为二倍体功能大孢子,再经有丝分裂形成二倍体的雌配子体。因而大孢子母细胞壁上缺乏胼质,这与上述文献报道一致。甜菜单体附加系 M14 的染色体组为 $VV+1C, 2n=18+1$, 蝶须型胚囊产生的卵细胞的染色体组也为 $VV+1C, 2n=18+1$, 表明亲子两代染色体组完全相同,蝶须型是真正的二倍体孢子生殖胚囊。上述结果进一步证明,将无融合生殖中大孢子母细胞壁缺乏胼质的积累作为二倍体孢子形成的一个显著的细胞学标记^[8]是完全正确的。

在非型胚囊发生时同样起始于大孢子母细胞,但是启动了减数分裂,经历了减数分裂I,而没能进行减数分裂II。大孢子母细胞壁内胼质的变化与正常减数分裂时相似,这在以往的研究中没有见到详细报道。表明在无融合生殖植物中大孢子发生期间胼质的更替出现和暂留与是否启动减数分裂过程有关。

3.2 有性生殖胚囊的大孢子发生期间细胞壁内胼质的变化模式

许多研究者对被子植物大孢子发生期间的细胞壁胼质的变化进行过较多研究^[1,3,7]。尽管结果不尽相同,但在大多数植物中胼质的变化规律相似。在蓼型胚囊发生过程中,大孢子母细胞的细胞壁是胼质积累的主要部位,首先在大孢子母细胞的合点端细胞壁开始沉积胼质,在晚前期,尤其是在中期I,大孢子母细胞被胼质壁所包围,在二分体与四分体时期,各孢子之间横壁上胼质积累丰富。胼质总是从将发育成有功能大孢子的合点端壁开始减少和消失,最终功能大孢子的细胞壁缺少胼质,而退化的大孢子被富有胼质的细胞壁所包围,将无功能的退化大孢子与有功能的大孢子隔离^[1,3,6]。

在大孢子发生期间细胞壁内胼质的功能,一般被认为是作为一屏障,使大孢子母细胞与体细胞暂时“隔离”,进而使之能沿着自己的途径发育^[1,5];减数分裂产生的一些大孢子的退化是遗传决定的,并与胼质存在有关。被胼质壁包围的大孢子,从合胞体中单独出来将可能最终导致退化,而没有被胼质壁包围的大孢子终将成为功能大孢子^[18-19]。

甜菜单体附加系 M14 的有性生殖过程中,胚囊属于单孢子蓼型胚囊。在大孢子发生过程中,大孢子母细胞经前期I至中期I,细胞壁内胼质开始从珠孔端向合点端积累。二分体、三分体、四分体时,胼质主要积累于大孢子之间的横壁中,而侧壁内较少。胼质是从有功能大孢子的合点端壁开始

减少,功能大孢子细胞壁中无胼质积累,而退化的大孢子细胞壁内积累较多胼质。上述特征与蒙古黄芪(*Astragalus mongholicus* Bge)大孢子发生时细胞壁胼质的变化相似^[20],而与蓼型胚囊发生过程中胼质变化模式有所不同。因此,我们认为具有蓼型胚囊发育的植物,其大孢子发生期间细胞壁胼质变化可能有多种模式^[7]。

致谢:北京大学生命科学学院胡适宜教授始终关心本研究,成文后胡先生百忙之中审阅全文,并提出修改意见,特致谢意!

References

- [1] Bouman F. The ovule In: Johri B M ed. Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer-Verla, 1984. pp 123-157
- [2] Currier H B. Callose substance in plant cells. *Ame J Bot*, 1957,44:478-488
- [3] Folsom N W, Cass D D. Embryo sac development in soybean: ultrastructure of megasporogenesis and early megagametogenesis. *Can J Bot*, 1989,67: 2841-2849
- [4] Noher de Halac I. Callose deposition during megagametogenesis in two species of *Oenothera*. *Ann Bot*, 1980,46:473-477
- [5] Rodkiewicz B. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta*, 1970,93:39-47
- [6] Russell S D. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Can J Bot*, 1979, 57:1093-1110
- [7] Wang Y, Chen C, Ding H. Development of ovule and female gametophyte in *Rheum palmatum* L. *Phytomorphology*, 1992,42:71-79
- [8] Savidan Y J, Carman G, Dresselhaus T eds. The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering Mexico, DF: CIMMYT. IRD. European Commission DGV1 (FAIR), 2001. pp 44-63
- [9] Gao J-W(高建伟), Li Z-D(李忠德), Sun Q-X(孙其信), Liu J-Z(刘建中). Advance of apomixes in plant. *Bioeng Prog* (生物工程进展), 2000, 20(5):43-47(in Chinese with English abstract)
- [10] Guo D-D(郭德栋), Wang G-Z(王桂芝), Wang J-Z(王继志), Li H-Q(李汉卿). Studies on *Beta vulgaris* L. × *B. corolliflora* Zess interspecific crossing. In: Chinese Genetics Research(中国遗传学研究). Beijing: Chinese Science and Technology Press, 1991. pp 93-94(in Chinese)
- [11] Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华), Liu L-P(刘丽萍), Kang C-H(康传红), Li Y(李勇), Wang G-Z(王桂芝). Acquisition and identification of monosomic additional lines of apomictic beet. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), 2000,34(5):1-3(in Chinese with English abstract)
- [12] Guo D-D(郭德栋). Liu L-P(刘丽萍), Kang C-H(康传红). Reproductive transmission property of monosomic additional lines of apomictic beet. *J Natural Sci Heilongjiang Univ* (黑龙江大学自然科学学报), 2001,18(3):104-107(in Chinese with English abstract)
- [13] Yang H-Y(杨弘远). Fluorescence microscopy. In: Sun J-S(孙敬三), Qian Y-Q(钱迎倩) eds. Research Approach of Plant Cell Biology(植物细胞学研究方法). Beijing: Science Press, 1987. pp 218-248(in Chinese)
- [14] Crane C F, Carman J G. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from Eastern Australia and New Zealand. *Ame J Bot*. 1987, 74:477-496.
- [15] Carman J G, Crane C F, Riera-Lizarazu O. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomictic megasporogenesis in two hexaploid Australasian *Elymus* species. *Crop Sci*, 1991, 31:1527-1532
- [16] Peel M D, Carman J G, Liu Z-W, Wang R R C. Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus* (Nees in lehm.) A. Love Connor. *Crop Sci*, 1997, 37(3): 717-723

- [17] Peel M D, Carman J G, Leblanc O. Megasporocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum L.*, and weeping lovegrass. *Crop Sci*, 1997, 37(3):724-732
- [18] Hu S-Y (胡适宜), Yang H-Y (杨弘远). Biology of Angiosperm Fertilization (被子植物受精生物学). Beijing: Science Press, 2002. pp 81-82 (in Chinese)
- [19] Koltunow A M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*, 1993, 5:1425-1437
- [20] Tian G-W (田国伟), Yin H (殷华), Wang H-Y (王好友), Shen J-H (申家恒). Observations of callose in cell walls during megasporogenesis in *Astragalus membranaceus* J Harbin Normal Univ (哈尔滨师范大学学报), 1996, 12(2):77-80 (in Chinese with English abstract)

图版说明

全部照片均为珠孔端朝上, 亮视野照片放大 1100 倍, 荧光照片放大 900 倍。

图版 I 二倍体孢子生殖(非型胚囊)

1, 2: 为同一切面的明视野照片与荧光照片。箭头示大孢子母细胞时期(细线期)无荧光。3, 4: 前期 I 的终变期。示大孢子母细胞珠孔端壁有较弱荧光, 细胞壁中部有较强荧光。5: 前中期 I, 箭头示一个进入中期的大孢子母细胞。6: 前中期 I 的荧光照片。箭头示中期细胞设有荧光, 可能是螺旋型胚囊的原始细胞。7, 8: 中期 I, 大孢子母细胞珠孔端壁以及右侧壁有强荧光。9, 10: 后期 I, 整个大孢子母细胞为胼脂质荧光所包围。11-14: 均为末期 I, 两子核形成, 出现成膜体, 整个大孢子母细胞为胼脂质荧光所包围。15, 16: 末期 I, 两子核之间的成膜体内形成细胞板, 箭头示细胞板部位有微弱荧光, 左侧壁上荧光强烈, 珠孔端细胞壁无胼脂质荧光。17, 18: 二分体时期, 箭头示二分体之间横壁上以及合点端大孢子的侧壁上荧光较强, 珠孔端大孢子细胞壁胼脂质荧光较弱。19, 20: 珠孔端大孢子开始出现退化迹象, 细胞壁无胼脂质荧光。箭头示二分体之间横壁以及合点端大孢子侧壁有胼脂质荧光, 而合点端壁无荧光。

图版 II 21~26 二倍体孢子生殖(非型胚囊)

21, 22: 二分体中珠孔端大孢子退化, 合点端的成为二倍体功能大孢子。箭头示二倍体功能大孢子的珠孔端壁与侧壁有胼脂质荧光, 而合点端壁无荧光。退化的二分体细胞壁内荧光微弱。23~26: 单核胚囊时期, 壁内的胼脂质荧光消失, 箭头示退化的二分体细胞壁有较强的胼脂质荧光。

图版 II 27~30 二倍体孢子生殖(螺旋型胚囊)

27, 28: 箭头示大孢子母细胞细胞壁无胼脂质荧光。29, 30: 箭头示二倍体功能大孢子有丝分裂中期, 细胞壁无胼脂质荧光。

图版 II 31~38 有性生殖(菱型胚囊)

31, 32: 有性生殖的二分体。各二分体细胞已进入末期 II, 箭头示 2 个细胞之间的横壁以及侧壁荧光明显。33, 34: 有性生殖的三分体。合点端已形成二个大孢子而珠孔端的细胞停留在末期 II, 箭头所示三分体的横壁上以及合点端大孢子右侧壁上有荧光。35, 36: 有性生殖的四分体。箭头示珠孔端大孢子向下的第一横壁与第二横壁有较强荧光, 第一、二、三个大孢子的侧壁上可见微弱荧光, 合点端的大孢子壁无胼脂质荧光。37, 38: 有性生殖的功能大孢子。箭头所示珠孔端的 3 个大孢子退化, 大孢子壁有强荧光; 而合点端大孢子有功能, 其细胞壁上无荧光。

Explanation of Plates

The micropyle is in upward position in each picture.

Pictures are in light microscope ($\times 1100$) and in fluorescence microscope ($\times 900$)

Plate I Diplospory (*Allium odorum*-type)

Fig. 1, 2: Two pictures of the same section by the light and fluorescence microscopes. There was no callose fluorescence in the wall of megasporocyte at the stage of leptotema (shown by the arrow). Fig. 3, 4: Megasporocyte in diakinesis, showing weak callose fluorescence in the micropylar wall of megasporocyte and strong fluorescence in middle wall. Fig. 5: Megasporocyte in early metaphase I. Another megasporocyte underneath (shown by the arrow) was in metaphase. Fig. 6: Fluorescence picture of megasporocyte in early metaphase I, there was no callose fluorescence in the underneath megasporocyte (shown by the arrow), which may be the initial cell of *Antennaria*-type. Fig. 7, 8: Metaphase I, showing strong callose fluorescence in micropylar wall and the right side wall of megasporocyte. Fig. 9, 10: Anaphase I, showing callose-containing wall enveloped the whole cell. Fig. 11-14: Telephase I, megasporocyte surrounded by callose-containing wall, daughter nuclei and phragmoplast formed. Fig. 15, 16: Telephase I, cell plate occurred in the phragmoplast between daughter nuclei, and with weak fluorescence (shown by the arrow), the left side wall with strong fluorescence and micropylar wall without fluorescence. Fig. 17, 18: Dyad. Strong fluorescence was shown in transverse wall and the side walls of chalazal megaspore, while weak fluorescence in micropylar megaspore wall. Fig. 19, 20: The beginning of abortion of micropylar megaspore, and without callose deposition in the wall of it. Fluorescence in transverse wall of dyad and the side wall of chalazal megaspore (shown by the arrow), while without fluorescence in chalazal wall.

Plate II (21-26) Diplospory (*Allium odorum*-type)

Fig. 21, 22: Micropylar cell of the dyad degenerated and the other developed into functional megaspore. Diplosporous functional megaspore (shown by the arrow) was with fluorescence in micropylar wall and side walls, while without fluorescence in chalazal wall. The wall of degenerated cell of dyad was with weak fluorescence. Fig. 23-26: Mononuclear embryo sac, showing callose disappeared gradually at this stage, and thick callose deposited in the wall of degenerative cell of dyad.

Plate II (27-30) Diplospory (*Antennaria*-type)

Fig. 27, 28: Without callose fluorescence in the wall of megasporocyte (shown by the arrow). Fig. 29, 30: Diplosporous functional megaspore in metaphase of mitosis, without callose fluorescence in the wall of it.

Plate III (31-38) Sexual reproduction (*polygonum*-type)

Fig. 31, 32: Dyad at the stage of Telephase II, showing prominent callose fluorescence in side wall and transverse wall between the two cells (shown by the arrow). Fig. 33, 34: Triad. The chalazal cell of former dyad was divided into two megaspores and micropylar one not, fluorescence appeared in the transverse wall of triad and right side wall of the chalazal megaspore (shown by the arrow). Fig. 35, 36: Four megaspores, the micropylar 2 transverse walls (shown by the arrow) with strong fluorescence, side walls (shown by the arrow) of the micropylar 3 megaspores with weak fluorescence, and the wall of chalazal megaspore (shown by the arrow) without fluorescence. Fig. 37, 38: Functional megaspore, showing three micropylar megaspores degenerated (shown by the arrow), with strong fluorescence in the wall of it, while without fluorescence in the wall of chalazal functional megaspore.



