

云南红豆杉小孢子发生和雄配子发育的研究方法比较^{*}

王兵益, 苏建荣, 张志钧

(中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要:以云南红豆杉为实验材料, 比较了石蜡切片法、洋红简易染色法和整体染色透明法研究小孢子发生过程的效果, 分析了用石蜡切片法及离体培养法研究雄配子体发育优缺点. 在离体培养中, 对比了不同的蔗糖质量浓度、培养温度及染色方法对实验结果的影响, 从而为针叶树种雄性生殖系统发育过程研究提供参考. 结果显示: 整体透明染色法操作简单, 能够反应小孢子发育过程中各个阶段的细胞结构, 是用于小孢子发育过程研究的比较理想的方法; 对于雄配子体发育过程的研究, 需要用石蜡切片法与离体培养法相结合, 在离体培养中, 采用雄球花表面灭菌, 自然散粉, 低糖低温培养有利于防止污染, 洋红染色法方便快捷, 不需要特别的设备, 是离体培养时比较理想的染色方法.

关键词:云南红豆杉; 小孢子发生; 雄配子发育; 研究方法

中图分类号: Q 944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)03-0302-06

云南红豆杉(*Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu)是分布于缅甸和不丹北部及中国西南地区的红豆杉属(*Taxus*)植物^[1], 发表于1975年^[2]. 因为富含抗癌药物紫杉醇, 云南红豆杉倍受关注, 也正是因为其具有重要的药用价值, 云南红豆杉自然种群曾遭到严重破坏, 其保护地位也不断攀升, 分别于1986, 1993年和1999年被列为云南省二级保护植物、林业部二级保护植物和国家一级保护植物. 红豆杉科植物起源古老, 与罗汉松科(Podocarpaceae)、粗榧科(Cephalotaxaceae)植物具有共同的祖先, 特殊的系统地位使其在科学研究中具有重要的价值.

同红豆杉属其它种相似, 云南红豆杉小孢子发生和雄配子体形成过程极其漫长, 小孢子成熟时为单核, 传粉后还需要在漫长的萌发过程中进行3次分裂, 最后形成成熟雄配子体, 并产生用于受精的精子^[3]. 对于红豆杉属小孢子发生和雄配子发育过程的研究从19世纪就开始了^[4], 早期的主要研究方法是石蜡切片法, 用苏木精或番红、固绿染

色^[4~6], 随后发展到用超薄切片、电镜观测^[7,8]或离体培养、荧光染色^[9,10]. 但直到现在为止, 由于不同的研究者使用的研究方法不同, 只分别看到了雄性生殖系统发育的某些方面, 所以可能得出不同的结论, 例如, 雄配子形成过程中各阶段的产物究竟是细胞, 还是核, 分裂产物是否相等, 精子形成后是否继续分裂等^[5,9]. 即使用相同的方法, 由于方法中的操作细节或部分条件的改变也可能改变实验的结果, 例如, 同样使用离体培养, DAPI染色, 欧洲红豆杉(*T. baccata*)和太平洋红豆杉(*T. brevifolia*)的雄配体发育所需的时间及某些细节存在较大的差异^[9,10], 但由于实验条件的不一致, 很难判断这种差异是物种之间的差异还是由于实验本身造成的. 因此, 如何根据需要来选择恰当的研究方法和实验条件是研究红豆杉雄性生殖系统的关键步骤. 本文以云南红豆杉为材料, 比较了用不同制片及染色方法研究小孢子发生的优、缺点, 并且讨论了不同的培养及染色方法在雄配子体的发育过程的区别.

^{*} 收稿日期: 2008-03-20

基金项目: 中国科技部科研院所社会公益研究专项资助(2004DIB3J104); 中国科技部“十五”科技支撑项目资助(2006BAD18B03); 加拿大阿尔伯塔大学益客基金会资助; 中国林科院资源昆虫研究所所长基金资助(riri200703Z).

作者简介: 王兵益(1976-), 男, 陕西人, 博士生, 助理研究员, 主要从事植物生殖生物学方面的研究.

通讯作者: 苏建荣(1970-), 男, 云南人, 博士, 副研究员, 主要从事植物种群生物学方面的研究.

1 材料与方法

用于实验的雄球花和胚珠都采自云南省禄丰县一平浪林场的云南红豆杉人工林。

小孢子发生过程采用了常规石蜡切片法、洋红染色压片法和整体染色透明法。用 Nikon Eclipse E800 显微镜镜检并拍照。

雄配子体活体萌发研究的材料是自然受精的胚珠,石蜡切片及染色的方法同上。雄配子体的离体萌发过程操作如下:采集 30 个成熟但没散粉的雄球花,经表面消毒后插入瓶中放在超净工作台上,等自然开裂后,将小孢子散在装有液体培养基的凹玻片上,再将凹玻片放在垫有湿润滤纸的培养皿中,然后用保鲜膜密封。除蔗糖的质量浓度梯度外,培养基的其他成分参照 Brewbaker 的培养基^[11]:100 mL 液体培养基中含蔗糖 10 g, H_3BO_3 1×10^{-2} g, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 3×10^{-2} g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2×10^{-2} g, KNO_3 1×10^{-2} g。除温度梯度外,都在 25℃ 下暗培养,每隔 3~5 d 检测 1 次,分别用醋酸洋红染色和 DAPI 染色。醋酸洋红染色前用多聚甲醛固定 20 min。DAPI 染色前先用多聚甲醛固定后,再用磷酸缓冲液处理 3 次,每次 5 min,染色时间 5 min。在 Zeiss 荧光显微镜上观测并拍照。

离体培养设置了 3 个温度梯度(15, 25, 32℃)及 3 个蔗糖质量浓度(每 100 mL 5, 8, 10 g)的培养基,每个处理培养花粉 20 盒。培养及观测方法同上。

2 结果与分析

2.1 小孢子发生 石蜡切片法是传统的研究方法,技术成熟,只需常规药品,成本低,不仅能用于小孢子的发育生物学观测,而且能提供在小孢子囊、甚至整个雄球花中小孢子的发育和分布状况,是研究植物小孢子发育过程的主要方法之一^[12,13]。用石蜡切片法能够观察到云南红豆杉小孢子囊中发生的变化,也能够准确地判断出小孢子发生的主要阶段,如小孢子母细胞阶段细胞密度较小,体积大,染色质明显(如图 1a);减数分裂阶段四分体或二分体之间界限明显,但四分体或二分体内部结构不明显,且不能辨别二分体与四分体(如图 1b);在小孢子成熟阶段,能辨别部分细胞形态,但结构不明确(如图 1c)。另外,石蜡切片法的实验过程比较复杂,环节多,且不宜用于小孢子发生过

程中立体结构的观测。

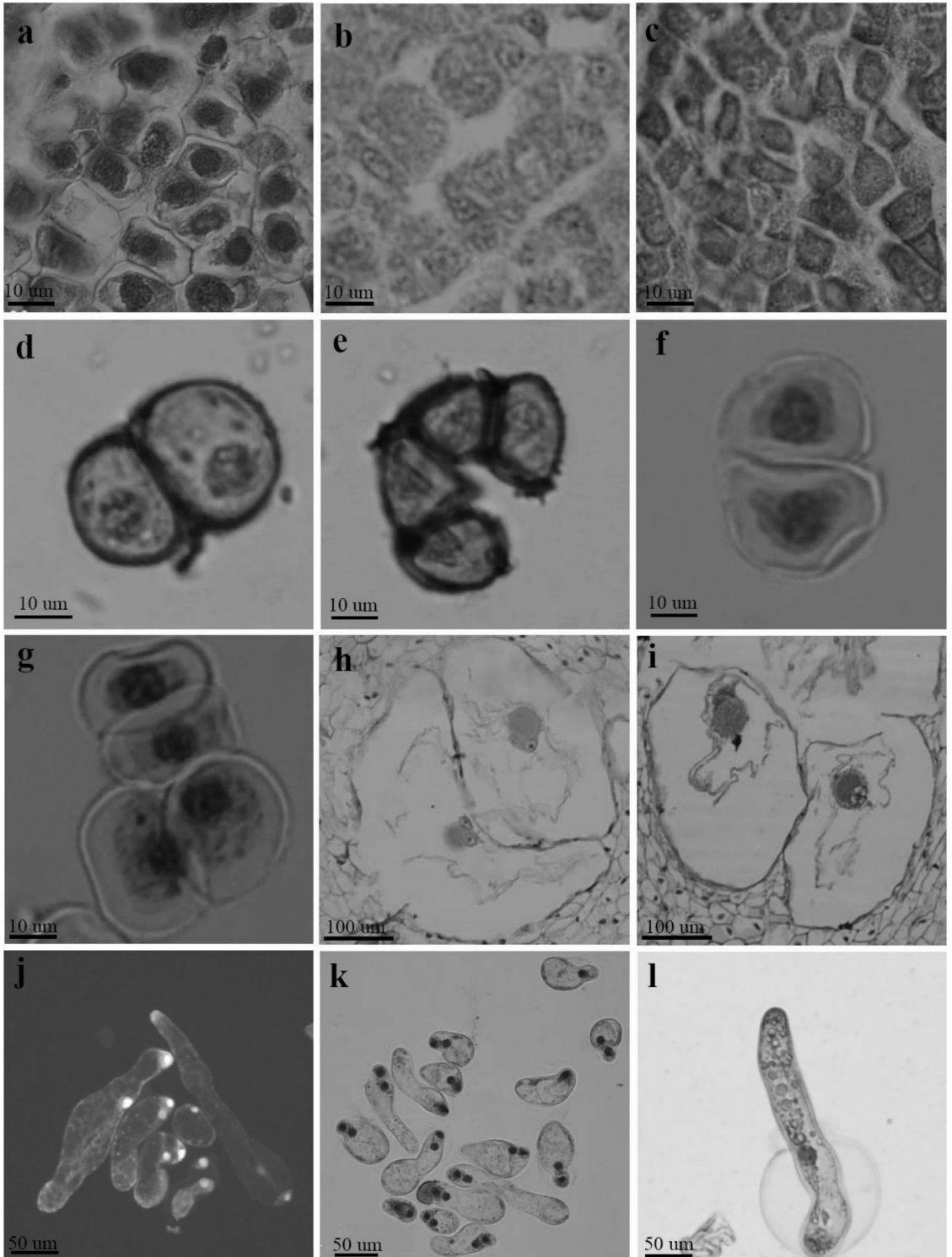
用简易洋红染色压片法不仅能够判断小孢子囊中小孢子的发育状态,而且能够比较清楚的反映各个阶段的细胞形态,如二分体时期细胞呈半圆形(如图 1d),细胞核比较明显,四分体的结构比较清楚,细胞轮廓清晰(如图 1e)。但不能反应小孢子在小孢子囊中的分布状况及小孢子囊的发育状况。

整体透明染色法是研究被子植物常用的方法之一,很少应用于裸子植物小孢子发育过程的研究^[14],本研究也是这种方法的新尝试。同石蜡切片法相比,其造作简单,不需要切片及复杂的染色过程,不仅能够清楚地辨别细胞的外部形态,而且,也能看到清晰的内部结构,如二分体(如图 1f)和四分体(如图 1g),不仅细胞轮廓清晰,内部结构也非常清楚,尤其是细胞核非常明显。同时,整体染色透明法也能准确判断小孢子发生的阶段,而且很清晰地反映出小孢子发生过程中各个阶段细胞形态和内部结构。主要缺点同洋红染色压片法一样,不能反应小孢子在小孢子囊中的分布状况及小孢子囊的发育状况。

2.2 雄配子体发育 用石蜡切片法研究雄配体的发育最大的优点就是能够反映雄配子体发育的真实过程,不论是用苏木精染色(如图 1h),还是用蕃红-固绿(如图 1i)对染都能取得较好的效果,且能够区分雄配子体中细胞质及细胞核。但由于云南红豆杉雄配体发育的时间较长,需要定期采样,所以工作量大,而且需要一定数量的雌性植株。另外,由于每张切片只能反映某些局部的横断面,要了解整个结构的立体形态,必须要有连续的切片,这也对制片设备和技术提出了更高的要求。

相比之下,用小孢子的离体培养法研究雄配子体发育的操作简单,且能够反映雄配体的发育过程。但是由于离体培养容易受培养条件的影响,使得雄配体的发育时间及发育过程的细节可能不能反映其真实的发育状况。防止污染和保持足够的水分及营养是花粉管生长的必要条件,对于生长缓慢的针叶树花粉管来说,如何解决这 2 个问题是雄配子体离体培养的关键。培养基和培养器皿都可以通过灭菌消毒来消除污染源,然而花粉携带的污染源很难消除,本文采用先表面消毒,再水培的方法成功地培养了云南红豆杉的花粉,大大降低了污染的概率。其次,本文通过在培养皿中加水并密封培养为配子体发育提供充足水。最长的培养时间达到

60 d, 为长时间的花粉培养提供了一种实用方法.



a: 小孢子母细胞(石蜡切片法); b: 二分体及四分体(石蜡切片法); c: 小孢子(石蜡切片法); d: 二分体(洋红染色压片法); e: 四分体(洋红染色压片法); f: 二分体(整体透明染色法); g: 四分体(整体透明染色法); h: 胚珠中的雄配子体(石蜡切片法, 苏木精染色); i: 胚珠中的雄配子体(石蜡切片法, 蕃红-固绿对染); j: 二细胞雄配子体(离体培养, DAPI 染色); k: 二细胞雄配子体(离体培养, 洋红染色); l: 带有营养层的雄配子体(离体培养, 洋红染色)

图 1 用不同方法研究小孢子发生及雄配子体发育的结果

Fig. 1 The results of different methods for sporogenesis and microgametogenesis

离体培养后用 DAPI 染色,细胞核明显,很容易判断雄配子体发育的状况和核的分裂情况,如二核时期的雄配子体(如图 1j)。但由于对设备要求较高,而且图像质量在很大程度上取决于荧光显微镜的质量和采集水平。另外,用 DAPI 染色只能识别细胞核,对核以外的结构的分辨很困难。相比之下,用洋红染色不仅操作简单,而且在普通显微镜下就能够辨别细胞结构。虽然用洋红染色的雄配子体细胞核不如用 DAPI 染色的明显,但是细胞形态却更加清楚,不仅能区分各个细胞核(如图 1k),还能将雄配子体外的结构及其它细胞内容物显示出来,如营养层(如图 1l),用 DAPI 染色是很难发现的。用 DAPI 和洋红染色时,特别要注意固定这个关键步

骤,如果材料不固定,花粉管很容易破裂,尤其是在花粉萌发到后期时。在离体培养中,如果没有特别需求,用洋红染色完全可以代替用 DAPI 染色,从而减少实验环节。

通过不同的蔗糖质量浓度和培养温度比较,随着温度的上升,污染的概率明显增大(图 2);随着蔗糖质量浓度的升高,污染的概率也逐渐上升(图 3)。蔗糖质量浓度对雄配子体发育速度的影响不明显,但温度对雄配子体发育速度的影响较大(图 4),在 32℃,由于污染及培养基被蒸发的原因,雄配子体只发育到第 2 次分裂,总之,高温下的发育速度明显快于低温下的发育速度。

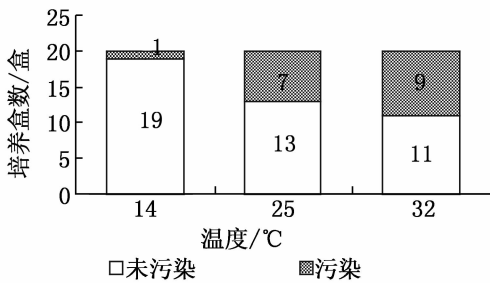


图 2 在不同培养温度下的污染

Fig. 2 The contamination of microspores cultured in different temperature

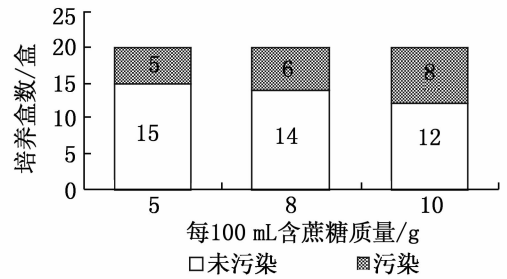


图 3 在不同蔗糖浓度下的污染

Fig. 3 The contamination of microspores cultured in different sucrose concentration

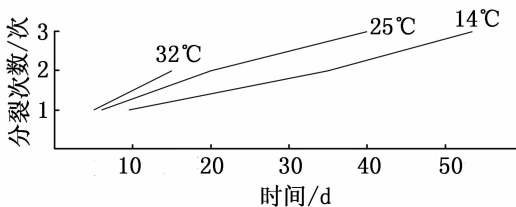


图 4 雄配子体在不同培养温度下的发育曲线

Fig. 4 The development curve of male gametophytes cultured in different temperature

3 讨论

雄性生殖系统的发育过程是种子植物生活史的重要组成部分,将最终产生用于受精的雄配子。在漫长的进化过程中,植物产生了各种各样的雄性生殖系统发育机制。被子植物的雄性生殖系统的发育过程相对简单,而且研究也比较深入,发展了一系列的用于被子植物雄性生殖系统发育的研究方法^[15~18]。相比之下,裸子植物的雄性生殖系统的发育过程复杂,而且不同类群间差异较大,很难直

接应用被子植物的研究方法,因而发展也相对滞后^[6]。针叶树是裸子植物的重要组成部分,它的雄配子体发育过程在植物进化史上占有重要地位,是连接有吸盘的花粉管(如苏铁和银杏)和被子植物的快速生长花粉管的桥梁^[6]。然而,由于多数针叶类植物的树形高大,雄配子体发育过程漫长,给研究者在采样和观测过程中带来很多困难,如花粉长时间的培养方法及与之对应的染色、观测方法等。因而,发展更多的适用于裸子植物生殖生物学的研究方法是裸子植物生殖生物学发展的前提和基础。

从本文涉及的几种用于小孢子发生和雄配子体发育研究方法来看,每种方法各有利弊,根据研究目的选择恰当的方法可以达到事半功倍的效果。例如,如果仅仅只是了解小孢子的发育的节律,用醋酸洋红染色方便快捷,且能满足需要;在研究发育节律的同时,还要了解小孢子发生过程中内部结构的变化,则要用整体透明染色法;要观察小孢子发生过程中某些特殊物质的分布和变化及更微观

的结构,则要借助其它的染色方法,如荧光染色或其它特异性染料.另外,要全面研究小孢子发生和雄配体的发育过程,单使用一种方法很难满足研究需求,最好结合多种研究方法,例如,在研究雄配子体发育时,采用石蜡切片法和离体培养法相结合,不仅能研究其发育节律,而且也便于观测其发育过程中的细节.由于不同的研究方法可能看到不同的侧面,在比较前人的研究结果时,一定要考虑到研究方法的差异,同时,如果采用前人在相近物种上使用过的方法,在不影响实验效果的前提下,尽可能同前人的研究方法和实验条件保持一致,这样,不仅便于同前人的研究结果比较,也为以后的研究者积累更多的可以参照的资料.

参考文献:

- [1] 郑万钧,傅立国.中国植物志(第七卷)[M].北京:科学出版社,1978.
- [2] 郑万钧,傅立国,诚静容.中国裸子植物[J].植物分类学报,1975,13(4):56-89.
- [3] FERNANDO D D, LAZZARO M D, OWENS J N. Growth and development of conifer pollen tubes[J]. Sex Plant Reprod,2005,18: 149-162.
- [4] DUPLER A W. Staminate strobilus of *Taxus canadensis*[J]. Botanical Gazette,1919,68:345-366.
- [5] DUPLER A W. The gametophytes of *Taxus canadensis* marsh[J]. Botanical Gazette,1917,64:115-136.
- [6] STERLING C. Gametophyte development in *Taxus cuspidata*[J]. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 1948,75 (2):147-165.
- [7] PENNELL R I, BELL P R. Microsporogenesis in *Taxus baccata* L: the development of the archaesporium[J]. Annals of Botany,1985,56:415-427.
- [8] PENNELL R I, BELL P R. Microsporogenesis in *Taxus baccata* L: the formation of tetrad and development of the microspores[J]. Annals of Botany,1986,57: 545-555.
- [9] PENNELL R I, BELL P R. The development of the male gametophyte and spermatogenesis in *Taxus baccata* L[J]. Proceedings of the Royal society of London, series B,1986,228:85-96.
- [10] ANDERSON E D, OWENS J N. Microsporogenesis, pollination, pollen germination and male gametophyte development in *Taxus brevifolia* [J]. Annals of Botany,2000,86:1 033-1 042.
- [11] BREWBAKER J L, KWACK B H. The essential role of Calcium in pollen germination and pollen tube growth[J]. American Journal of Botany, 1963, 50: 859-865.
- [12] 徐涛,常艳芬,杜文银.松风草大小孢子发生与雌雄配子体的形成研究[J].云南大学学报:自然科学版,2006,28(S1):356-360.
- [13] 杨桂英,马绍宾.药用植物粉叶小檗花药发育、小孢子发生和雄配子体形成[J].云南大学学报:自然科学版,2006,25(增刊):137-141.
- [14] 李国平,黄群策.用整体染色透明法观察油松花粉粒的结构[J].郑州大学学报:理学版,2005,37(2):44-47.
- [15] 胡适宜.植物胚胎学研究方法(一)花粉活力的检测[J].植物学通报,1993,10(2):60-62.
- [16] 胡适宜.实验二 花粉发育时期的检查和花粉壁性质的鉴定[J].植物学通报,1993,10(3):51-52.
- [17] 胡适宜.实验三 花药绒毡层膜的分离及绒毡层膜用于光镜和电镜观察的样品制作方法[J].植物学通报,1993,10(4):54-55.
- [18] 胡适宜.植物胚胎学实验方法(五)检查花粉在柱头上萌发和花粉管在花柱中生长的制片法[J].植物学通报,1994,11:58-60.

A comparison and evaluation of methods for sporogenesis and male gametogenesis studying in *Taxus yunnanensis*

WANG Bing-yi, SU Jian-rong, ZHANG Zhi-jun

(The Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China)

Abstract: By using *Taxus yunnanensis* as experiment material, different methods including paraffin embed, squashed with aceto-camine and stain-clearing, methods of sporogenesis, paraffin embedded samples and cultured in vitro methods for microgametogenesis were used and evaluated. In cultured in vitro methods, the

influence of culture temperature, the sucrose concentration of medium and staining methods on the results was studied. The results can be summarized as follows:stain-clearing technique is a better method for sporogenesis due to its simple operation and better results. Raffin embedded samples and cultured in vitro are necessary methods in gametogenesis,and in vitro,sterilizing on surface and releasing microspores by itself,low temperature and low sucrose concentration are helpful to eliminate contamination. It is convenient that male gametogenesis in vitro be stained by aceto-carmin.

Key words: *Taxus yunnanensis* ;sporogenesis;microgametogenesis;methods

* * * * *

(上接第 301 页)

Abstract: For esterification of free fatty acid in high acid value *Jatropha curccas* L. seed oil with methanol,ST(SO₄²⁻/TiO₂) solid acid prepared by directly calcining cheap industrial metatitanic acid has high activity. FTIR studies suggested that ST solid acid possessed pyrosulfate structure with high bond order and high covalent S=O. The intensive inductive effect of S=O made the neighboring unsaturated coordinated titanium atom to have strong Lewis acidity, which converted protonic acidic sites when the catalyst absorbed water. The protonic acidity increased with the S content increasing. During preparing ST solid acid, the sulfate was effectively binded to the titania surface through the solid phase reaction of sulfate with titania. At the same time,SO₃ generated by decomposition of partial sulfate was absorbed in situ and formed solid acid structure. The strong acid site increased and the weak acid site decreased with the calcination temperature increasing. Since the surface sulfate decomposed at higher calcination temperature, the amount and strength of acid site decreased sharply, which induced the decreasing of the esterification activity of the ST solid acid. For the esterification of free fatty acid in high acid value *Jatropha curccas* L. oil with methanol, the acid site in H₀ between -12.70 and -8.2 has better catalytic activity. The ST solid acid catalysed esterification proceeds through a reaction routine of protonating fatty acid, which conducts nucleophilic addition with methanol and then deprotonating.

Key words: sulfated titania;one-step preparation;structure;esterification mechanism