

花粉分化的和脱分化的第一次 有丝分裂的比较观察

陆 文 樑

(中国科学院植物研究所, 北京)

摘 要

本文通过对小麦花粉正常分化过程的第一次有丝分裂过程的活体连续观察, 及与离体培养条件下, 脱分化的第一次有丝分裂过程的比较, 找到了这两次分裂在细胞学上的差异。这些差异主要表现在核的位置, 细胞质的位置, 纺锤体的轴向及新细胞壁的形状与位置上。作者认为: (1) 差异从细胞分裂的一开始就存在, 因此致使细胞脱分化的关键时刻不在细胞周期的分裂期而在间期, 从而不同意纺锤轴轴向的改变是脱分化启动原因的说法。(2) 造成差异的原因可能与脱分化时丧失极性有关。

在组织和细胞培养中, 研究脱分化启动的重要性表现在以下两个方面: 在实践上, 这是组织和细胞培养得以成功的先决条件。如果培养中不能诱导外植体细胞脱分化启动, 培养就失败。在理论上, 脱分化过程是使生命时钟逆转的过程。一个细胞不管它的分化处于什么阶段, 只要能诱导它脱分化, 就可以使这个细胞的分化发生逆转, 回到胚性状态, 然后像一个受精卵那样发育形成胚状体长成植株, 或先形成愈伤组织而后再分化形成植株。

促使细胞脱分化启动的因素, 大体可分为细胞外部的和细胞内部的两种。在菸草离体花粉培养一文^[1]中, 我们着重讨论了细胞外部的因素, 认为在花药离体培养中, 逐渐死亡的细胞所产生的物质可能起着重要的作用。本文着重报道细胞内部的因素, 即脱分化第一次有丝分裂的细胞学特点。在花药培养上对脱分化第一次分裂一直有过一些讨论, 中心是分化过程中花粉第一次有丝分裂纺锤轴轴向的改变, 是不是致使这次分化的细胞分裂转变为脱分化的细胞分裂的原因。有的作者^[2-4]认为是; 有的作者^[5]认为不是。然而这些讨论都因为没有直接证据, 而不能得出较为肯定的结论。为了探索这个问题, 我们以小麦为材料, 对分化过程的花粉第一次有丝分裂进行了活体连续观察, 并与离体培养下脱分化第一次有丝分裂的细胞学变化作了对比, 从而初步找到了分化和脱分化分裂两者的细胞学差异, 现报道如下。

一、材料和方法

1. 实验用材料 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 栽培种 348。材料取自北京市农业科学院作物研究所。大田种植。

2. 花粉分化的细胞学观察 穗子从大田取回后作花药的醋酸洋红涂片, 观察花粉的细胞学变化, 在这基础上对花药作活体涂片, 并立即在相差显微镜下观察和照相。

3. 花粉脱分化的细胞学观察 先将花粉发育时期处于单核晚期——两核初期的花药接种在 $N_6^{[6]}+2, 4-D1$ 毫克/1+K0.5 毫克/1+蔗糖 6%+琼脂 0.8% pH5.8 的培养基上, 在 26°C 光照条件下培养 6—10 天, 然后用卡诺固定液(乙醇: 冰醋酸=3:1)固定, 醋酸洋红涂片观察。

二、结果和讨论

1. 分化过程的花粉第一次有丝分裂

小麦花粉分化过程的细胞学变化以往的观察尚不够仔细, 为了与脱分化的细胞学变化进行对比, 我们在醋酸洋红涂片观察的基础上, 用相差显微镜对花粉分化的第一次有丝分裂的全过程作了活体连续观察。

(1) 分裂前核和胞质的定向移动

在花粉第一次有丝分裂前小孢子的细胞核经历了一个定向的移动过程。在小孢子从四分体中释放出来以后, 核居正中并无液泡(图版 I, 1)。进一步发育小孢子中出现了一些小液泡, 受液泡的挤压核靠近花粉壁(图版 I, 2)。随着液泡的增大和合并, 最后终于形成了一个液泡。与此同时受大液泡挤压而紧贴花粉壁的细胞核逐渐移向萌发孔对面(图版 I, 2, 3), 并停留在这个位置上进行花粉第一次有丝分裂。

花粉第一次有丝分裂前核的定向移动和最终在萌发孔对面的位置上停留, 以前认为这是由于萌发孔吸水, 使液泡在靠近萌发孔的一侧增大, 将核向萌发孔对面挤压的结果。然而, Поддубная-Арнольд^[7] 根据有的植物的小孢子在发育过程中并不形成大液泡, 却同样发生核的移动, 认为这是由于小孢子内某些物理、化学梯度变化的结果。我们的观察表明, 在花粉第一次有丝分裂以前, 小孢子核是定向移动到萌发孔对面, 然而在对花粉分化过程的观察中我们还发现, 在花粉第一次有丝分裂以后, 营养核又从萌发孔对面的位置上定向移动到萌发孔附近(图版 II, 15—18)。在花粉第一次有丝分裂前后核向着完全相反的两个方向定向移动, 用由于萌发孔吸水造成靠近萌发孔的大液泡增大对核产生压力, 使核被动的移动来解释显然是不能令人满意的, 因此, 我们比较同意后者的观点。

在花粉第一次有丝分裂前, 细胞质的定向移动发生在核定向移动以后和分裂即将开始以前。这时原来受大液泡挤压紧贴在花粉内壁上的细胞质流动加速, 在核向着萌发孔的一侧首先出现一股股线状细胞质, 以游动的方式向萌发孔方向伸展(图版 I, 4), 接着大量细胞质抗拒液泡的挤压向核的一侧运动, 在核的一侧聚集了一大团细胞质突出在大液泡中(图版 I, 5)。有时这股细胞质还能穿过大液泡到达花粉壁, 与贴着花粉壁的细胞质汇合形成环流。在细胞质定向集中到核一侧以后, 核的分裂接着就开始了。

关于细胞质定向移动和在固定部位集中的问题以前讨论得很少。从细胞质抗拒大液泡的挤压成团突出于大液泡中的现象, 我们推测: 1) 在花粉粒进行第一次有丝分裂以前细胞质已先进行了不均等分配, 使大部分细胞质集中到以后要形成营养核的一侧。2) 联系到花粉第一次有丝分裂时纺锤体不对称, 近壁端钝游离端尖的现象, 那么细胞质的不均等分配很可能是形成不对称纺锤体的原因之一。

(2) 分裂时细胞学变化的活体连续观察及分裂后营养核的定向移动

前期 核膜和核仁消失,染色体出现(图版 I, 6)。在我们的观察中核膜消失早于核仁。在相差显微镜下核仁的消失过程是这样的,它不是逐渐变小而消失,而是在大小不变的情况下只是逐渐变得透明最后消失。

中期 染色体集中排列在赤道板上(图版 I, 7)。从赤道板对于花粉壁的方向可以判断,这时纺锤体轴既不垂直于花粉壁又不平行于花粉壁,它对于花粉壁的方向基本上是倾斜的。

后期 染色体向两极移动(图版 I, 8—12)。在这一时期,可观察到纺锤体轴的方向,由原来对花粉壁的倾斜转变为对花粉壁的平行。与此同时,在分裂核一侧集中的细胞质也随着纺锤体逐渐向壁靠拢,但移动的速度稍慢于纺锤体。在这团细胞质与花粉壁接触后,就沿花粉壁逐渐向萌发孔方向转移。

末期 染色体逐渐消失,两个新的细胞逐渐形成(图版 II, 13, 14)。在后期就开始的分裂核一侧的细胞质向萌发孔方向的转移这时继续进行。染色体浓缩,颜色变浅,两个新的细胞核逐渐形成。与此同时,在两个核中间逐渐形成一层弧形的细胞壁,其弧形的突起面正对萌发孔。这表明,分裂过程中纺锤轴轴向的改变不会影响新形成的细胞壁的位置与形状。

分裂结束后,位于萌发孔一侧的大细胞是营养细胞,位于萌发孔对侧的凸透镜状的小细胞是生殖细胞。这时,受大液泡挤压,核和胞质又紧贴在花粉壁上,而在分裂结束后紧靠着生殖细胞的营养核开始了定向移动,从萌发孔对面沿花粉壁逐渐移向萌发孔附近(图版 II, 15—18)。

为了弄清花粉分化的第一次有丝分裂的连续过程,我们进行了活体连续观察。由于观察是在花粉离体的状态下进行的,所以存在着两种可能性:一种是与在位的情况基本一致;另一种则差别很大。我们将本观察与固定材料的观察相比较,未发现什么差别,并且在本观察中离体状态下最终形成的营养细胞与生殖细胞的形状与位置(图版 II, 14),与即时观察的材料(图 15)也比较一致。因此可以认为,本观察与在位的真实情况基本一致。观察中发现的分裂中纺锤轴与壁的关系,从开始时倾斜以后转变为平行的现象,虽然还不能最后确证它是不是一个普遍的现象,但可能有助于对 Nitsch 认为分化的第一次有丝分裂中纺锤轴与壁的关系是倾斜的,而 Wilson 则认为在平行的情况下也可以进行这次分裂的争论作出解释。

2. 脱分化过程的花粉第一次有丝分裂

花粉脱分化的第一次有丝分裂具有正常的前期、中期、后期和末期。但在离体培养条件下这次分裂有它本身的特点:

(1) 在脱分化第一次有丝分裂前,核在花粉中的位置是不断变化的,因此分裂时核可以处在花粉中任何位置上(图版 II, 19—23)。不过由小孢子核进行的脱分化第一次分裂(按 B 途径发育的花粉),核基本上位于花粉粒的中部(图版 II, 19—22);由营养核进行的脱分化第一次有丝分裂(按 A 途径发育的花粉粒),核往往偏离中部(图版 II, 23)。

(2) 经过 6—10 天离体培养,那些进行脱分化有丝分裂的花粉已合成了一定数量的细胞质,大液泡正在逐渐消失中(图版 II, 19—23)。

(3) 细胞质在分裂核周围的分布比较均匀,无论是小孢子核还是营养核进行的脱分化有丝分裂,都没有观察到细胞质有在核一侧集中的趋势(图版 II, 20—23)。

(4) 分裂末期形成的细胞板基本平直,从细胞板与萌发孔的相对位置来判断,细胞板的方向是随机的(图版 II, 21—23)。

关于离体培养下花粉粒脱分化启动的原因目前还存在着争论。Vazart^[1]最早提出脱分化分裂的先决条件是,花粉第一次有丝分裂时必须形成不完全的生殖细胞壁。Sunderland 等^[2]进一步发展了这种观点,认为形成不完全的生殖细胞壁的原因是花粉第一次有丝分裂时纺锤轴轴向的不正常。Nitsch 等^[3]根据在菸草上的观察指出,花粉分化的第一次有丝分裂,纺锤轴与壁的关系是倾斜的,而脱分化第一次有丝分裂,纺锤轴与壁的关系是垂直或平行的。这些人的观点可以综合为:由于花粉分化的第一次有丝分裂的纺锤轴轴向发生改变,致使生殖细胞壁不能正常形成是脱分化启动的原因。然而也有人不同意这种看法, Wilson 等^[4]根据大麦材料的观察指出,不管小孢子第一次有丝分裂的纺锤轴是垂直于花粉壁,还是平行于花粉壁,都能进行分化的或脱分化的第一次有丝分裂。因此他认为,决定这次分裂是分化的还是脱分化的与纺锤轴的轴向没有关系。我们认为,对脱分化启动的原因所以存在着不同看法主要是因为缺乏直接证据。正像 Dunwell^[4]指出的:要对这个问题作出正确的评价,在营养核和生殖核在有丝分裂过程中位置变化缺乏证据的情况下是困难的。我们进行了花粉分化的第一次有丝分裂的活体连续观察,初步得到了这次有丝分裂过程中核位置变化的一些证据。在我们的试验条件下观察到的结果表明,在分化的第一次有丝分裂过程中,纺锤轴轴向本来就是有变化的,这个变化对生殖细胞壁的形状与方向不会产生影响。因此,脱分化启动的原因是由于花粉分化的第一次有丝分裂的纺锤轴轴向发生改变,致使生殖细胞壁不能形成的说法似乎不能同意。又根据脱分化第一次有丝分裂各时期的观察,发现分裂时核的位置,细胞质的分布,纺锤体的形状及子细胞的大小、位置与功能上,这次分裂与分化的第一次有丝分裂相比有着明显的差异(具体见表 1)。这种差异甚至在分裂以前就已经存在(如分裂前核和胞质的位置上的差别)。这表明,脱分化的分裂不是由于分化的第一次有丝分裂过程中某个阶段(如纺锤轴的方向)发生变化而使得这次分裂向脱分化方向转化的。它是一次崭新的分裂。这样,致使花粉粒在离体培养下脱分化启动的关键时刻,可能不在细胞周期的分裂期而是在间期。

3. 两种分裂的比较

为了找出在分化方向上绝然相反的两种分裂过程在细胞学上的差异,和分析造成这种差异的原因,我们将这两种分裂进行了比较,列于表 1。

通过对比可以发现,虽然这两种分裂在细胞学上的差异表现在各个方面,然而最终都可以

表 1 花粉分化的和脱分化的第一次有丝分裂的比较

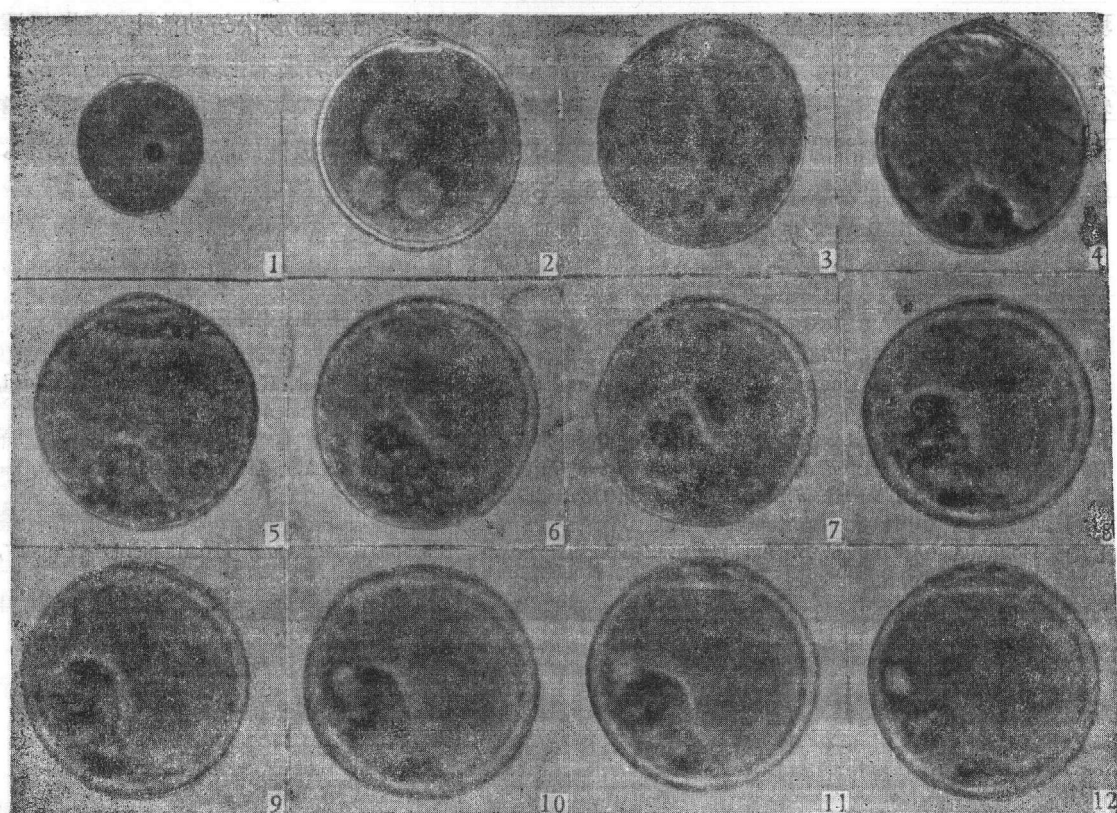
	分化的第一次有丝分裂	脱分化的第一次有丝分裂
分裂前细胞核的位置	必定在萌发孔对面紧靠花粉壁的部位	在花粉粒中没有确定的位置
分裂前和分裂中细胞质的位置	除一部分细胞质紧贴花粉壁外,有一大部分细胞质集中在核向着萌发孔的一侧	细胞质在核的周围分布比较均匀
大液泡	在分裂过程中大液泡始终存在	分裂时大部分花粉的大液泡已趋于消失
纺锤体	纺锤体不对称,近壁端钝游离端尖。在后期向末期转化的阶段,纺锤轴的轴向发生变化	在分裂过程中纺锤体对称
新细胞壁	分裂后形成的细胞壁呈弧形,其位置必定正对萌发孔	分裂后形成的新细胞壁平直,与萌发孔没有特定的位置关系
子细胞	具特定的位置,特定的形态与特定的功能	两个子细胞不具特定的形状,位置与功能

将它们归结到极性的原因上去。分化的第一次有丝分裂的各种细胞学特点, 归纳起来主要表现在核与胞质具特定的位置, 纺锤体具特定的形状和子细胞具特定的形状与功能上, 这些都是具极性的表现。脱分化的第一次有丝分裂的各种细胞学特点, 归纳起来主要是核和胞质没有特定的位置, 纺锤体和子细胞没有特定的形状和功能, 而这些都是失去极性的表现。这样, 通过对比似乎可以初步得出结论, 花粉分化的第一次有丝分裂是在具极性的状态下进行的分裂, 脱分化的第一次有丝分裂是在失去极性的状态下进行的分裂。

本工作承王伏雄教授审阅原稿提出宝贵意见, 特此致谢,

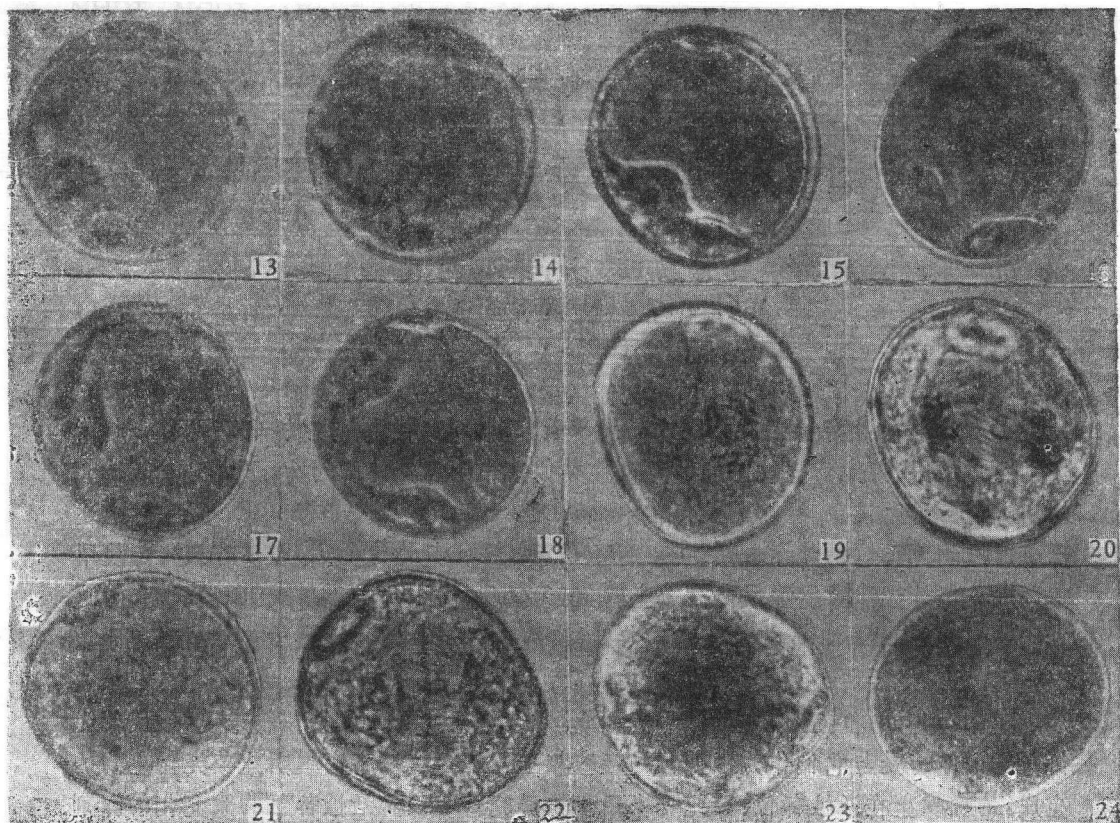
参 考 文 献

- [1] 陆文樑, 中国科学, 1978, 3:351—355.
- [2] Sunderland, N. & Dunwell, J. M., In *Tissue and Cell Culture* (Ed. Street, H. E.), Blackwells, Oxford, 1977, 223—265.
- [3] Nitsch, C., *C. R. Acad. Sci.*, 276D(1973), 303—306.
- [4] Dunwell, J. M., In *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Ed. Therp, T. A.), 1978, 103—112.
- [5] Wilson, H. M., et al., *J. Exp. Bot.*, 29(1978), 227—238.
- [6] 朱至清等: 中国科学, 1975, 5:484—490.
- [7] Поддубная-Арнольди, В. А., *Цитозмбриология покрытосеменных растений*, Издательство “Наука”, Москва, 1976, 85.



1—12 花粉分化过程的细胞学变化。活体相差显微镜照相。

1. 刚从四分体中释放出来不久的小孢子，核居于小孢子正中，细胞质浓，无液泡；2. 进一步发育，小孢子体积增大，细胞质中出现液泡，核被挤向花粉壁；3. 小孢子的进一步发育，由许多小液泡合并成一个大液泡，与此同时核运动到萌发孔对面；4. 花粉第一次有丝分裂前夕。在核向着萌发孔的一侧出现一股股线状细胞质，以游动方式向萌发孔方向伸展；5. 许多线状细胞质合并成一大团，在核的一侧突出在大液泡中；6—14. 分化的花粉第一次有丝分裂过程。活体连续照相；6. 前期，核膜和核仁消失，出现染色体。在分裂核一侧突出在液泡中的细胞质依然存在；7. 中期，染色体排列在赤道板上，纺锤体近壁端钝游离端尖，纺锤体对于花粉壁的位置是倾斜的，突出于液泡中的细胞质依然存在；8—12. 后期，染色体拉向两极，突出于液泡中的细胞质依然存在。在染色体拉向两极过程中纺锤体轴向发生变化，从原来对于花粉壁的倾斜关系转变为平行关系，与此同时突出于液泡中的细胞质也随着纺锤体运动靠向花粉壁，在它和花粉壁接触后，即沿花粉壁向萌发孔方向运动。



13—18 花粉分化过程的细胞学变化。13, 14. 末期。逐渐形成两个新细胞。正对萌发孔的凸透镜状的小细胞是生殖细胞，靠近萌发孔的大细胞是营养细胞。新形成的细胞壁呈弧形。原来突出在液泡中的细胞质继续向萌发孔方向运动；15—18. 在花粉第一次有丝分裂以后，营养核沿花粉壁从萌发孔对面向萌发孔附近移动；

图 19—24. 花粉脱分化的第一次有丝分裂。醋酸洋红染色。

19. 前一中期。出现染色体逐渐排列到赤道板上；20. 后期。染色体拉向两极，纺锤体基本对称；21—23. 末期。可见到由胞质分裂纺锤体形成的细胞板；21, 22. 小孢子核脱分化第一次有丝分裂。23. 营养核脱分化第一次有丝分裂。生殖核位于分裂核的上方；24. 脱分化分裂形成两个细胞后又迅速地继续分裂。以上所有照片都 $\times 600$ 。