

# Histochemical Observation of Polysaccharides and Lipids on the Developing Anthers of *Solanum photeinocarpum*

Xiaojuan Guo, Jiaojiao Guo, Tiedan Song, Huiqiao Tian\*

School of Life Science, Xiamen University, Xiamen

Email: [hqtian@xmu.edu.cn](mailto:hqtian@xmu.edu.cn)

Received: Dec. 10<sup>th</sup>, 2013; revised: Dec. 30<sup>th</sup>, 2013; accepted: Jan. 6<sup>th</sup>, 2014

Copyright © 2014 Xiaojuan Guo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Xiaojuan Guo et al. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

**Abstract:** The distribution of polysaccharides and lipid drops in developing anther of *Solanum photeinocarpum* was studied. At the sporogenous cell stage, neither starches nor lipids were in anther wall cells. At the stage of microspore mother cells, some starches appeared in epidemic cells and endothecium cells and many lipids appeared in tapetal cells. At the tetrad stage, some polysaccharides appeared in middle layer cells. After microspores were released from tetrads, both starches and lipids appeared in epidemic cells, but both materials decreased at the late microspore stage. After the microspore division, early bicellular pollen began to accumulate polysaccharides, and the starches and lipids disappeared in anther wall cells. With the pollen development, many starches and some lipids were accumulated in the vegetative cell of the nearly mature pollen.

**Keywords:** *Solanum photeinocarpum*; Anther Development; Polysaccharides; Lipid

## 少花龙葵花药发育中多糖和脂滴的组织化学研究

郭笑娟, 郭娇娇, 宋铁蛋, 田惠桥\*

厦门大学生命科学学院, 厦门

Email: [hqtian@xmu.edu.cn](mailto:hqtian@xmu.edu.cn)

收稿日期: 2013年12月10日; 修回日期: 2013年12月30日; 录用日期: 2014年1月6日

**摘要:** 对少花龙葵花药发育中淀粉粒和脂滴的分布和转化过程进行组织化学研究。结果显示: 在造孢细胞时期幼小花药中没有营养物质积累; 在小孢子母细胞时期, 花药表皮和药室内壁细胞中出现淀粉粒, 同时在绒毡层细胞中出现了较多的脂滴; 在四分体时期, 中层细胞中出现淀粉粒, 而绒毡层细胞中的脂滴减少; 到小孢子早期, 花药表皮细胞中除淀粉粒外还出现了脂滴; 但到小孢子晚期, 药壁细胞中的淀粉和脂滴都明显减少; 在二胞花粉早期, 花粉开始积累淀粉粒, 药壁细胞中的淀粉和脂滴几乎消失; 在即将开花的成熟花粉中积累了大量淀粉粒和少量脂滴作为其存储物。

**关键词:** 少花龙葵; 花药发育; 多糖; 脂滴

### 1. 引言

被子植物花药结构复杂, 花药壁一般由表皮、药

---

\*通讯作者。

室内壁、中层和绒毡层4层细胞构成, 它们紧密相邻, 但形态、结构和功能却有很大差别。药室中的雄配子体发育过程复杂, 小孢子母细胞减数分裂后形成的单

倍体小孢子经有丝分裂产生大小差异明显的营养细胞和生殖细胞，由生殖细胞有丝分裂产生两个雄配子。在花药发育过程中，小孢子母细胞的胼胝质壁形成和四分体胼胝质壁的降解、小孢子中大液泡形成与二胞花粉中大液泡消失、绒毡层和中层细胞的中途退化等都是花药发育的特色<sup>[1]</sup>。被子植物成熟花粉中通常积累丰富的内含物，多为淀粉或脂滴，贮藏在营养细胞中，为以后花粉萌发和花粉管生长时利用。花粉中营养物质的积累具有一定的规律：一般在小孢子分裂后的二胞花粉时期开始大量积累营养物质<sup>[2-4]</sup>。然而，不同的植物花药发育规律不尽相同，积累的营养物质也有差别。不同植物花药发育中的营养物质积累规律还需要进行广泛探索。

少花龙葵(*Solanum photeinocarpum* Nakamura et Odashima)，别名白花菜，是茄科(Solanaceae)茄属(*Solanum*)一年生直立草本，主要分布在广东、广西、海南、贵州、福建、台湾等省<sup>[5]</sup>。少花龙葵全草可入药，具清热解毒、散血消肿功效，常用作治疗痢疾、肺热咳嗽、扁桃体炎、牙龈出血等<sup>[6,7]</sup>。其果实可提取褐、蓝染料<sup>[7]</sup>。对少花龙葵的化学成分<sup>[8]</sup>、生理特性<sup>[9]</sup>已有报道，对其雌雄生殖器官的发育尚未见报道。本文对少花龙葵花药发育中多糖和脂滴类营养物质的分布进行观察，揭示该种植物花药发育过程中的营养物质积累特征。

## 2. 材料与方法

分别取孢原细胞，小孢子母细胞，四分体，小孢子早期，小孢子晚期，二胞花粉早期和二胞花粉晚期等不同发育时期的少花龙葵(*Solanum photeinocarpum* Nakamura et Odashima)花药，迅速置于含 2.5%戊二醛、50 mmol/L 二甲胍酸钠(pH 7.0)缓冲液配制的前固定液中，室温固定 3 h。用 50 mmol/L 二甲胍酸钠(pH 7.0)缓冲液换洗固定后的花药 3 次，每次 30 min，再转入到含 1% 锇酸、50 mmol/L 二甲胍酸钠(pH 7.0)缓冲液配制的后固定液中，在 4℃ 下固定过夜。次日用相同的洗涤液洗涤 3 次，每次 30 min。固定花药梯度系列丙酮脱水后，E812 树脂包埋。用 Leica Ultracut R 型超薄切片机制作半薄切片，切片厚 1 μm。染色步骤参照胡适宜和徐丽云的方法<sup>[10]</sup>，用高碘酸-希夫反应(Periodic Acid-Schiff stain, PAS)标记细胞中的多糖类物质，呈红色；用苏丹黑 B 复染细胞中的脂类物质，

呈黑色。用 Leica DMR 显微镜观察与拍摄。

## 3. 结果

### 3.1. 造孢细胞时期花药

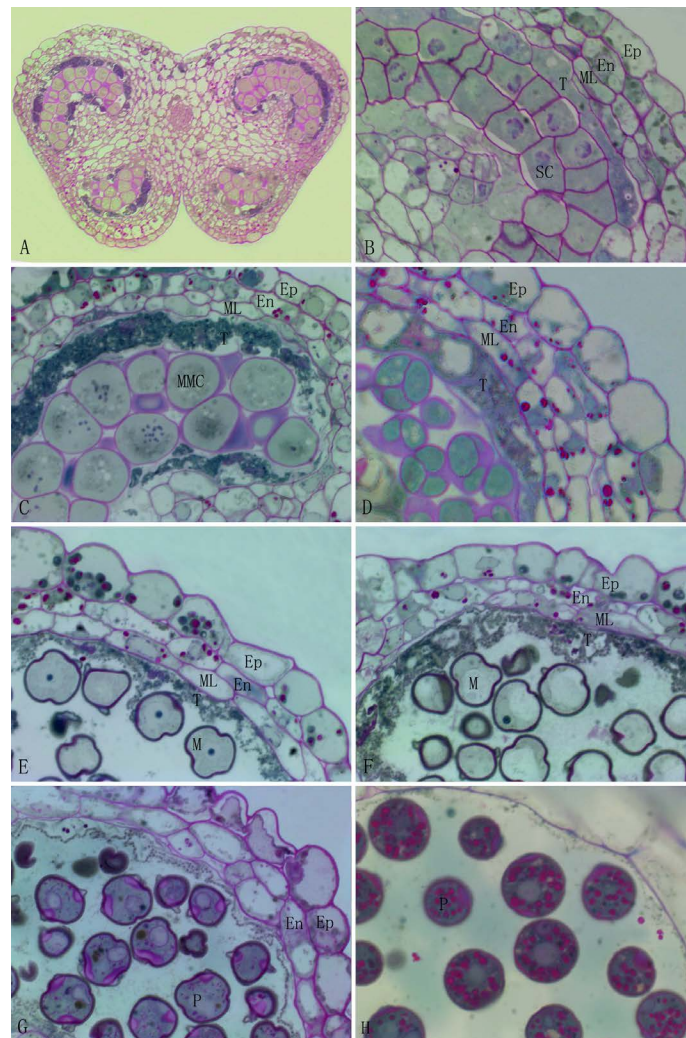
少花龙葵幼小花药横切面呈蝶型。花药内部中间的维管束通过药隔薄壁组织与左右对称的 4 个药室相连。药室中的两列造孢细胞呈马蹄形分布(图 1A)。造孢细胞体积较大，紧密排列，细胞壁较均匀，细胞中不含大液泡。花药壁由 4 层细胞组成，由外向内分别是表皮、药室内壁、中层和绒毡层。四层药壁细胞的形态没有很大差异，但细胞质内含物不同，表皮细胞的液泡化程度最高，而最内层的绒毡层细胞液泡化程度最低，含有浓厚的细胞质。向表皮的绒毡层细胞扁平，而向药隔的细胞较大并径向伸长，呈异型绒毡层现象。此时，整个花药中既没有淀粉也没有脂滴积累，仅细胞壁染成红色，为纤维素多糖(图 1B)。

### 3.2. 小孢子母细胞时期花药

花药由造孢细胞发育到小孢子母细胞产生了 3 个明显特征：小孢子母细胞体积增加到最大；形成了较厚的、不均匀的胼胝质壁；同时小孢子母细胞之间形成了较大的胞间隙。在小孢子母细胞时期，两列疏松排列的小孢子母细胞由以前的方形转变为圆形，细胞表面形成了一层不均匀加厚的、多糖性质的胼胝质壁。小孢子母细胞核位于细胞中央，细胞质中没有明显的大液泡。此时，组成花药壁的 4 层细胞中，表皮、药室内壁和中层细胞没有明显变化，但绒毡层细胞的细胞质浓缩，呈现出与以前明显不同的黑色。在表皮细胞和药室内壁细胞中出现少量淀粉粒(图 1C)。

### 3.3. 四分体时期花药

小孢子母细胞减数分裂后，形成四个聚集在一起的四分体。少花龙葵小孢子母细胞在减数分裂 I 不形成细胞壁，在减数分裂 II 才在 4 个子核之间形成细胞壁，小孢子发生为同时型，4 个小孢子的排列为等四面体型。四分体小孢子除了体积比小孢子母细胞小外，细胞结构没有很大差异，细胞内既没有淀粉也没有脂滴。在四分体时期，药壁表皮细胞体积明显增大，呈现高度液泡化，细胞内有少量淀粉粒；药室内壁细胞和中层细胞的体积较以前也有所增加，含有较多的淀



**Figure 1.** Histochemical observation of polysaccharides and lipids on the developing anthers of *Solanum photeinocarpum*: (Ep: Epidermal cell; En: Endothecium cell; ML: Middle layer cell; T: Tapetal cell; SC: Sporogenous cell; MMC: Microspore mother cell; M: Microspore; P: Pollen) (A) A young anther transverse section of *Solanum photeinocarpum*, showing four horseshoe locules.  $\times 100$ ; (B) Anther wall consists of epidermal (Ep), endothecium (En), middle layer (ML) and tapetal cells (T) at the stage of sporogenous cell.  $\times 1000$ ; (C) Microspore mother cells (MMC) were wrapped by red callose wall. Some starches appeared in the epidermal and endothecium cells and many lipids in the tapetal cells.  $\times 1000$ ; (D) Some starches appeared in the middle layer cells at the tetrad stage.  $\times 1000$ ; (E) The nucleus of early microspore located in the centre. Tapetal cells degenerated. Some lipids appeared in epidermal cells besides starches.  $\times 1000$ ; (F) The late microspore formed a single large vacuole and its nucleus moved to edge.  $\times 1000$ ; (G) The early bicellular pollen began to accumulate starches, and in anther wall cells there were neither starches nor lipids. The middle layer cells also degenerate.  $\times 1000$ ; (H) There were many starches and some lipids accumulated in the mature pollen.  $\times 1000$

**图 1.** 少花龙葵花药发育中多糖和脂滴的组织化学研究: (Ep: 表皮细胞; En: 药室内壁细胞; ML: 中层细胞; T: 绒毡层细胞; SC: 造孢细胞; MMC: 小孢子母细胞; M: 小孢子; P: 花粉); (A) 幼小花药横切面, 示四个马蹄形的药室。 $\times 100$ ; (B) 造孢细胞时期花药壁已分化出表皮(Ep)、药室内壁(En)、中层(ML)和绒毡层(T)细胞。 $\times 1000$ ; (C) 小孢子母细胞(MMC)被具有多糖成分的胼胝质壁包裹, 表皮和药室内壁细胞中含有少量淀粉粒, 绒毡层细胞中出现大量脂滴。 $\times 1000$ ; (D) 四分体时期的中层细胞中也出现淀粉粒。 $\times 1000$ ; (E) 早期小孢子的核位于中央, 绒毡层细胞已退化, 表皮细胞中除了多糖, 还出现脂滴。 $\times 1000$ ; (F) 晚期小孢子形成大液泡, 细胞核位于边缘。 $\times 1000$ ; (G) 早期二胞花粉中出现淀粉粒, 表皮和药室内壁细胞中的淀粉和脂滴消失, 中层细胞退化。 $\times 1000$ ; (H) 成熟花粉粒积累了大量淀粉粒和少量脂滴。 $\times 1000$

粉粒; 绒毡层细胞体积膨大, 细胞质中出现大液泡(图 1D)。

### 3.4. 小孢子早期花药

小孢子从四分体中释放后成游离小孢子。早期小

孢子中没有明显大液泡, 细胞核位于中央, 即通常所称的单核靠边期。游离小孢子已形成了花粉外壁, 但在花粉壁萌发孔部位, 外壁下方呈现出较厚的, 染成红色的花粉内壁。在小孢子早期, 花药表皮细胞内出现了淀粉和脂滴, 药室内壁和中层细胞中仍有一些淀



粉,但数量比以前减少。绒毡层细胞的体积明显减小,外形并不规则,细胞之间的界限难以识别,细胞质内含物明显减少(图 1E)。

### 3.5. 小孢子晚期花药

随着小孢子的发育,小孢子中出现大液泡,将细胞核和细胞质挤到细胞边缘,使小孢子产生了极性,进入小孢子晚期,通常也称为单核靠边期。晚期小孢子中仍无淀粉或脂滴积累。花药壁细胞与小孢子早期相比没有很大变化,表皮,药室内壁和中层细胞中仍有一些淀粉;绒毡层细胞也仍处于退化状态:没有细胞形态,细胞之间的界限不清,细胞内含物减少(图 1F)。在花药发育中,绒毡层细胞原生质体始终维持在原来的位置,直至完全分解。少花龙葵绒毡层属于腺质绒毡层。

### 3.6. 二胞花粉早期花药

极性小孢子的平周分裂产生两个大小不等的子细胞。两个子核中,贴近花粉壁的子核被平周排列的细胞板分隔,形成小的生殖细胞。大的营养细胞继承了原小孢子的大部分内含物,形成体积较大的营养细胞。最初形成的生殖细胞紧贴着花粉壁,外形呈透镜型。随着花粉的发育,营养细胞中的大液泡消失,生殖细胞脱离花粉壁,游离在营养细胞中,形成了细胞中包含细胞的现象。二胞花粉中虽没有淀粉粒积累,但细胞质中有红色,暗示二胞花粉中开始积累多糖物质。此时,花药壁由表皮细胞和药室内壁细胞两层完整细胞组成,绒毡层细胞已完全消失,中层细胞也已退化,仅留细胞残迹。表皮细胞和药室内壁细胞形态和结构完整,但其中的淀粉粒几乎完全消失(图 1G)。

### 3.7. 成熟花粉时期花药

在开花前一天,花粉已接近成熟。花粉体积达到最大,外形近似球形,内部充满内含物,除许多淀粉粒外还有一些脂滴。此时,中层细胞原生质体残迹几乎完全消失,花药壁仅由表皮和药室内壁两层细胞组成(图 1H)。

## 4. 讨论

被子植物花药发育的一个特征是在成熟花粉中积累大量营养物质,为花粉落到柱头上、萌发花粉管

提供能量和结构物质基础。在花药发育中,体内其他营养器官提供的营养物质通过花药体细胞在特定的时间转运和转化被花粉吸收、积累。因此,花药发育中大分子营养物质运输和转化也是花药发育的重要特征。在不同的植物中,成熟花粉中积累的营养物质不同,在花药发育中营养物质的运输和转化不同。白菜<sup>[11]</sup>和水鬼蕉<sup>[12]</sup>的成熟花粉中积累了大量脂滴作为储存物;小麦<sup>[13]</sup>,芒果<sup>[14]</sup>和鹅掌楸<sup>[15]</sup>的成熟花粉中积累了大量的淀粉粒作为储存物;而枸杞<sup>[16]</sup>,凤仙花<sup>[17]</sup>和 *Ipomoea cairica*<sup>[18]</sup>的成熟花粉中同时积累了大量的淀粉粒和脂滴作为储存物。对于成熟花粉中既积累淀粉粒又积累脂滴的花粉类型,有些是二胞花粉中先积累淀粉,后出现脂滴,如凤仙花<sup>[17]</sup>和五爪金龙<sup>[18]</sup>,有些是二胞花粉中先出现脂滴后出现淀粉多糖,如枸杞<sup>[16]</sup>。表明在这类花粉中,营养物质有一个转化的过程。在本实验中,少花龙葵在二胞花粉之前,在花药壁的药室内壁和中层细胞中有淀粉粒积累。小孢子分裂形成二胞花粉后,营养细胞中开始积累多糖营养物质。少花龙葵的成熟花粉中积累了大量的淀粉粒和一定量的脂滴,与枸杞<sup>[16]</sup>,凤仙花<sup>[17]</sup>和 *I. cairica*<sup>[18]</sup>的花粉营养物质代谢过程相似。在少花龙葵的花粉中,也有一个将多糖转化为脂滴的过程。这是少花龙葵花粉营养物质代谢的特征。

花药绒毡层是花药壁最内层体细胞,具有转运及合成特异蛋白质、碳水化合物和脂类等功,对花粉发育起着极其重要的作用<sup>[19-21]</sup>。各种营养物质进入药室中均需通过绒毡层细胞的筛选。然而,绒毡层细胞在花药发育中途退化,营养物质如何被绒毡层细胞转运的规律还不清楚。在不同的植物中,绒毡层的退化时间不同,白菜<sup>[11]</sup>、洋葱<sup>[22]</sup>的绒毡层细胞分别在小孢子早期退化。番茄<sup>[23]</sup>、辣椒<sup>[24]</sup>则在小孢子后期发生,而烟草<sup>[25]</sup>在二胞花粉早期发生绒毡层的降解。绒毡层细胞退化后营养物质如何流入花粉还不清楚。然而,白菜<sup>[11]</sup>、枸杞<sup>[16]</sup>,凤仙花<sup>[17]</sup>和 *I. cairica*<sup>[18]</sup>的绒毡层细胞退化时,细胞内含物转变为很大的脂块为花粉提供营养物质。在本实验中,少花龙葵绒毡层细胞在小孢子早期就开始退化,到二胞花粉开始积累营养物质时,绒毡层细胞已完全降解。另外,少花龙葵绒毡层细胞退化后其细胞内含物也没有转化为脂块。因此,少花龙葵绒毡层细胞在花药发育中的营养物质转运和转化功能还有待研究。

## 5. 结论

花药发育的一个特征是花粉中积累大量营养物质为花粉萌发做准备。少花龙葵花药发育中营养物质积累呈现一定特征：在二胞花粉时期之前，花药中的营养物质——淀粉和脂滴只积累在花药的药壁组织中。小孢子分裂后，二胞花粉中开始积累淀粉粒，而药壁细胞中的淀粉和脂滴几乎消失。成熟花粉中积累了大量淀粉粒和少量脂滴作为其存储物。

## 参考文献 (References)

- [1] 胡适宜 (2005) 被子植物生殖生物学. 高等教育出版社, 北京, 29-92.
- [2] Rudramuniyappa, C.K. and Annigeri B.G. (1985) Histochemical observations on the sporogenous tissue and tapetum in the anther of *Euphorbia*. *Cytologia*, **50**, 39-48.
- [3] Tiwari, S.C. and Gunning, E.S. (1986) An ultrastructural cytochemical and immunofluorescence study of postmeiotic development of plasmodial tapetum in *Tradescantia virginiana* L. and its relevance to the pathway of sporopollenin secretion. *Protoplasma*, **133**, 100-144.
- [4] Calzoni, G.L., Speranza, A., Caramiel, T.R., et al. (1990) Wall ultrastructure and biochemical features of the *Juglans regia* L. and *Juglans nigra* L. Male gametophyte. *Sex Plant Reprod*, **3**, 139-146.
- [5] 全国草药汇编编写组 (1996) 全国中草药汇编(第二版). 人民卫生出版社, 北京, 265-266.
- [6] 邓汝铭, 黄瑞松, 苏青等 (1999) 少花龙葵的生药研究. *广西中医药*, **5**, 44-46.
- [7] 徐淑元, 孙怀志, 谭雪 (2002) 保健野生蔬菜——少花龙葵的栽培技术. *广西园艺*, **4**, 30-31.
- [8] 李芸瑛, 黄丽华, 陈雄伟 (2006) 野生少花龙葵营养成分的分析. *中国农学通报*, **2**, 101-102.
- [9] 赵则海 (2008) 发育时期对少花龙葵光合生理特性及代谢产物的影响. *生态环境*, **1**, 312-316.
- [10] 胡适宜, 徐丽云 (1990) 显示环氧树脂厚切片中多糖、蛋白质和脂类的细胞化学方法. *植物学报*, **11**, 841-846.
- [11] 谢潮添, 杨延红, 朱学艺等 (2004) 白菜细胞核雄性不育花药的细胞化学观察. *实验生物学报*, **4**, 295-302.
- [12] 包晗, 宋玉燕, 马燕等 (2011) 水鬼蕉花药发育中的多糖和脂滴组织化学研究. *植物生理学报*, **6**, 565-569.
- [13] 李东霄, 李淦, 冯素伟等 (2013) 温敏核不育小麦可育和不育花药的细胞化学观察. *作物学报*, **5**, 878-884.
- [14] 马燕, 邓炜, 田惠桥 (2011) 芒果花药发育的细胞化学研究. *广西植物*, **3**, 338-341.
- [15] 尹增芳, 樊汝汶 (1998) 中国鹅掌楸小孢子发生的细胞化学研究. *植物学通报*, **3**, 34-37.
- [16] 徐青, 王仙琴, 田惠桥 (2006) 枸杞花药发育过程中脂滴和淀粉粒的分布特征. *分子细胞生物学报*, **2**, 103-110.
- [17] 杨淑娟, 魏冬梅, 成诚等 (2013) 凤仙花花药发育中多糖和脂滴组织化学研究. *西北植物学报*, **9**, 1786-1791.
- [18] Liu, R.S., Qiu, Y.L., Wei, D.M., et al. (2011) Distribution of starch and neutral lipids in the developing anthers of *Ipomoea cairica*. *Annales Botanici Fennici*, **48**, 256-262.
- [19] El-Ghazaly, E.G. and Jensen, W.A. (1987) Development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen. II. Histochemical differentiation of wall and Ubisch bodies during development. *American Journal of Botany*, **74**, 1396-1418.
- [20] Pacini, E., Franchi, G.G. and Hesse, M. (1985) The tapetum: Its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution*, **149**, 155-185.
- [21] Pacini, E. and Franchi, G.G. (1991) Diversification and evolution of the tapetum. In: Blackmore, S. and Barnes, S.H., Eds., *Pollen and Spores: Patterns of Diversification*. Systematics Association, Clarendon, Oxford, 301-316.
- [22] 魏冬梅, 菅明霞, 邓桦等 (2007) 洋葱花药发育过程中的细胞化学研究. *分子细胞生物学报*, **6**, 451-457.
- [23] 袁亦楠, 朱德蔚, 连勇等 (2000) 番茄雄性不育突变体小孢子发育的细胞学研究. *华北农学报*, **3**, 61-65.
- [24] 邱义兰, 刘珠丽, 李红等 (2008) 辣椒细胞质雄性不育花药败育及淀粉粒分布的细胞学观察. *分子细胞生物学报*, **4**, 283-293.
- [25] 罗玉英, 李怀军, 刘玉乐等 (1998) 转基因雄性不育烟草花药绒毡层及花粉发育的特点. *遗传*, **4**, 51.