

洋葱小孢子母细胞减数分裂过程中微管分布变化

张亚楠¹, 王雅英², 王宏毅³, 林石明³, 田惠桥^{1,*}

¹厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005; ²厦门医学高等专科学校, 福建厦门 361008; ³厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建厦门 361026

摘要:应用间接免疫荧光标记技术和激光共聚焦扫描显微镜成像技术观察洋葱小孢子母细胞减数分裂过程中微管分布变化。减数分裂之前,小孢子母细胞中的微管较短,呈辐射状,由细胞核表面向四周扩散。减数分裂开始后,细胞质中的一部分微管蛋白聚集成纺锤体微管,控制染色体的分布。进入减数分裂I后期,纺锤体微管变为牵引染色体移向两极的着丝粒微管和连接纺锤体两极的极丝微管。之后,所有微管集中在两个核之间,构成成膜体。然后,微管解聚成微管蛋白弥散在细胞质中。减数分裂I完成后,二分体2个子细胞中的微管蛋白又聚集成2个纺锤体微管,开始减数分裂II过程。经过减数分裂II中期,2个二分体细胞中的微管再次集中在2个细胞核之间形成成膜体,隔离2个细胞核。此后,微管蛋白解聚,弥散分布在小孢子细胞质中。

关键词: 洋葱; 小孢子发生; 微管

Microtubule Distribution and Change during Meiosis of Microspore Mother Cells of *Allium cepa* L.

ZHANG Ya-Nan¹, WANG Ya-Ying², WANG Hong-Yi³, LIN Shi-Ming³, TIAN Hui-Qiao^{1,*}

¹School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; ²Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361008, China; ³Inspection and Quarantine Technology Center, Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian 361026, China

Abstract: Microtubules change during microsporogenesis of *Allium cepa* was studied using immunofluorescence and confocal laser scanning photomicrographic techniques. Before meiosis of microspore mother cells, the microtubules in the cell cytoplasm were short and spread from nucleus to periplasm. At the beginning of meiosis, the microtubulin in the cells concentrated to form spindle microtubules for regular chromosome position. After metaphase I, some spindle microtubules became centromeric microtubules which shorted to pull chromosomes toward two polarities and some polar microtubules which connected two polarities. In telophase I, centromeric and polar microtubules disappeared completely, and some new microtubules accumulated between two nuclei to form phragmoplast. Then, phragmoplast microtubules depolymerized as microtubulin to disperse in the cytoplasm of two dyad cells. At the beginning of meiosis II, the tubulin in two dyad cells accumulated again to form spindle microtubules to regulate chromosome movement. In the telophase of meiosis II, microtubules accumulated again between two dyad nuclei to form phragmoplast for two nuclei separation. Then, the microtubules depolymerized to become microtubulin and dispersed in cytoplasm of tetrad microspores.

Key words: *Allium cepa*; microsporogenesis; microtubule

在高等植物的有性生殖过程中,对雄性细胞中的细胞骨架变化动态已有一些报道,包括花粉发育后期的生殖细胞和精细胞中的细胞骨架做了较多的研究;成熟花粉萌发时的细胞骨架也有很多研究,揭示了花粉萌发时细胞骨架的变化动态与花粉萌发的启动关系(Tanaka 和 Wakabayashi 1992)。在生长的花粉管中,花粉管的极性生长特征和活跃的细胞

器运动及精细胞的位置分布也与细胞骨架的特征有关(Heslop-Harrison和Heslop-Harrison 1989; Lancelle和Hepler 1991; Pierson 和 Cresti 1992; Terasaka 和

收稿 2010-07-01 修定 2010-09-07

资助 国家自然科学基金(30970275)。

* 通讯作者(E-mail: hqtian@xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486)。

Niitsu 1994; Cai 等 1997; Tiwari 和 Polito 1998)。然而, 有关高等植物减数分裂过程中细胞骨架变化的研究则不多。冯九焕等(1999)从雄性不育的角度研究了水稻小孢子发生过程中的微管骨架变化及其与不育花粉败育的关系。正常水稻品种‘IR36’和光温敏核雄性不育系‘培矮64S’的水稻小孢子发生过程中均形成了前期的核周微管、中期的纺锤体微管和末期的成膜体微管。但不育系的部分小孢子母细胞在减数分裂前期微管构型表现出一些细微变化, 微管排列紊乱, 粘成束状, 推测这些变化可能与部分小孢子的败育有关。张正海等(2008)对小胡杨小孢子发生中微管骨架的变化进行了荧光显微镜观察, 发现许多异常现象, 推测这些异常现象可能是由于小胡杨是小叶杨与胡杨杂交后代。遗憾的是, 用荧光显微镜看到的图像不清楚, 尤其是染色体与微管骨架分布部位很难判断。有关洋葱小孢子母细胞减数分裂中的细胞骨架研究已有报道(杨军等 2001), 但作者是用电镜切片方法。最近, Shamina (2005)对多种单子叶植物和双子叶植物的小孢子母细胞进行了微管骨架对比研究; 进一步发现单子叶植物小孢子母细胞的胞质分裂时纺锤体骨架的向心运动是成膜体形成的基础(Shamina 等 2007)。本实验观察了洋葱小孢子母细胞减数分裂过程中的微管变化, 探索其减数分裂过程中的微管骨架分布特征。

材料与方法

1 材料

将市售洋葱(*Allium cepa* L.)球茎种植在校园内, 在开花期取减数分裂期不同发育阶段的花药固定。固定液为4%多聚甲醛和5%甘露醇、PIPES 50 mmol·L⁻¹缓冲液(pH 6.9)、EGTA 5 mmol·L⁻¹、MgSO₄ 2 mmol·L⁻¹。固定液中附加10%的二甲基亚砜(DMSO)和1%的Triton X-100。花药在室温固定1 h后用PIPES缓冲液冲洗3次, 每次5 min。取出花药, 在涂有多聚赖氨酸溶液的载玻片上, 轻压花药使药室内的细胞散出。

2 方法

2.1 酶解 将1%的蜗牛酶(PIPES缓冲液配制)覆盖于细胞之上, 室温保湿酶解10~15 min。酶解后, 用PIPES缓冲液洗3次。

2.2 免疫反应预处理 用1%的牛血清蛋白溶液(PIPES缓冲液配制, pH 6.9)封闭细胞1 h, 并用磷酸缓冲液(PBS)洗3次。磷酸缓冲液含NaCl 138 mmol·L⁻¹、KCl 2.68 mmol·L⁻¹、KH₂PO₄ 1.47 mmol·L⁻¹、Na₂HPO₄ 8.1 mmol·L⁻¹。

2.3 微管免疫反应 经上述处理过的细胞, 先与一抗——鼠抗微管蛋白(Sigma, PBS缓冲液稀释, 稀释度为1:350)反应, 在一定湿度的条件下37℃温育1 h, PBS缓冲液冲洗3次, 每次10 min。再用二抗——异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗小鼠IgG (Sigma, PBS缓冲液稀释, 稀释度为1:200)反应, 在一定湿度的条件下37℃温育1 h, PBS缓冲液冲洗3次, 每次10 min。对照实验不加第一抗体。

2.4 细胞核的标记 先配置4',6-二脒基-2-苯吲哚(4',6-diamidine-2-phenylindole, DAPI)母液(1 mg·mL⁻¹), 用时用PBS缓冲液1:300稀释水溶液将细胞染色5 min, 随即用PBS缓冲液冲洗。

封片后用Leica共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)及其图像处理系统进行观察, FITC激发波长为488 nm, DAPI激发波长为364 nm。

实验结果

在小孢子母细胞时期, 小孢子母细胞的细胞核很大, 外部被一层厚厚的胼胝质壁包围(图1-A)。细胞中微管荧光呈网状分布于细胞质当中, 但在分裂前期的细胞核表面荧光强度较亮, 呈放射状向外分布, 而在细胞周质中的微管荧光较弱。在细胞质中有一些微管蛋白呈弥散状分布(图1-B)。

随着小孢子母细胞的进一步发育, 进入减数分裂I中期, 其细胞质中的部分微管蛋白组装形成纺锤体, 呈现较强的荧光(图1-C), 用DAPI标记的染色体荧光显示为蓝色, 分布在纺锤体的中部(图1-

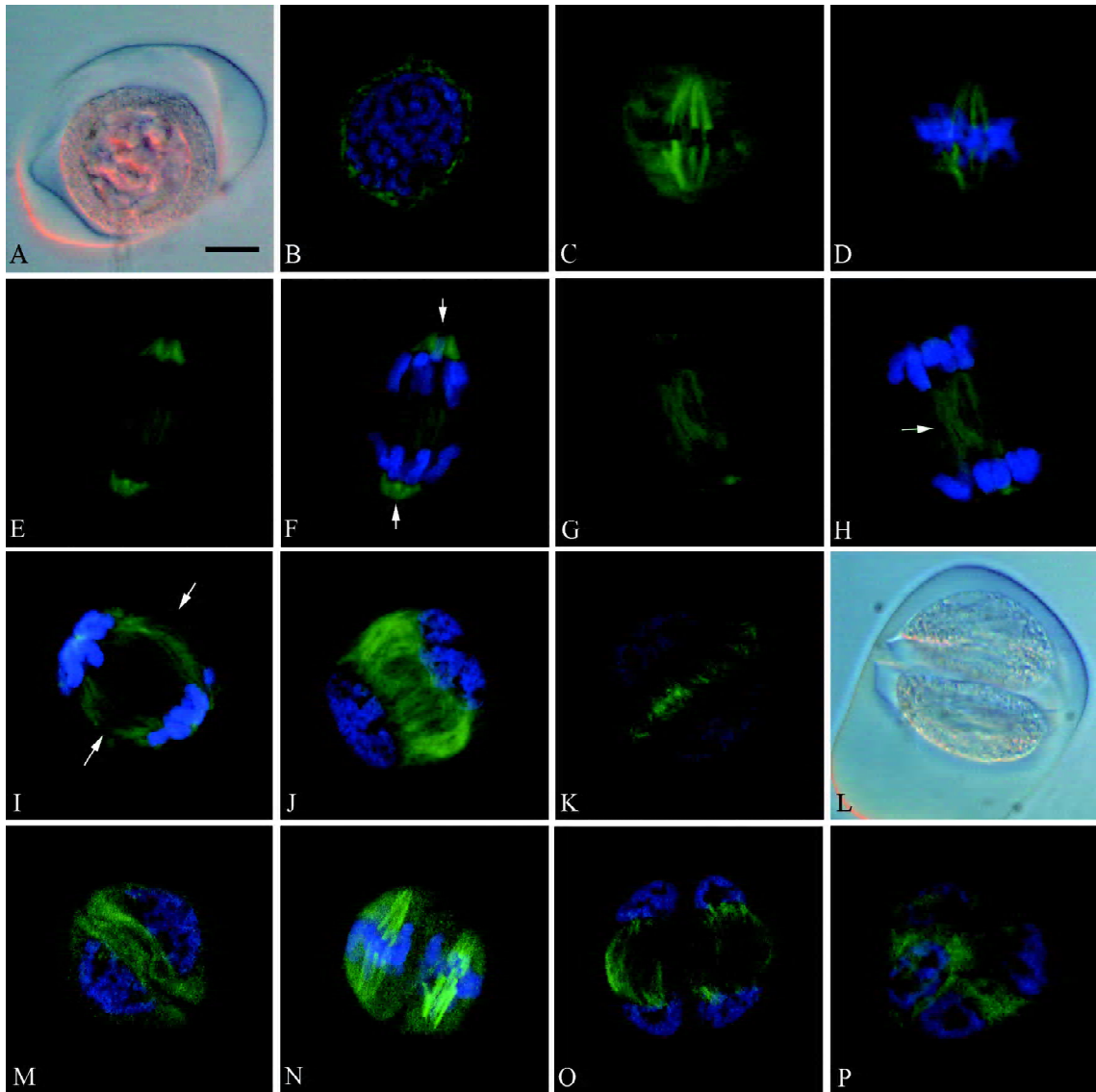


图1 洋葱小孢子母细胞减数分裂过程中微管分布变化

Fig.1 Microtubule distribution and change during meiosis of microspore mother cell of *A. cepa*

A: 洋葱小孢子母细胞; B: 小孢子母细胞中的微管呈放射状, 从细胞核表面向四周扩散; C: 小孢子母细胞减数分裂 I 中期形成纺锤体微管; D: 小孢子母细胞减数分裂 I 中期的纺锤体微管与染色体的分布; E: 减数分裂 I 后期, 示着丝粒微管缩短将染色体拉向两极; F: 着丝粒微管(箭头)与染色体整合后的分布; G: 减数分裂 I 后期, 着丝粒微管基本消失, 只剩下中间的极丝微管; H: 微管与染色体整合后的分布; I: 减数分裂 I 后期, 极丝微管消失, 新出现了“桶状”微管(箭头); J: 两核之间的微管变短、增多; K: 两核之间的微管减少, 但在中间出现一条较亮的微管“线”; L: 2 个二分体细胞; M: 二分体 2 个细胞中的微管解聚为微管蛋白弥散分布在细胞质中; N: 二分体 2 个细胞在减数分裂 II 中期又重新形成纺锤体微管; O: 二分体 2 个细胞在减数分裂 II 后期, 又重新形成“桶状”微管; P: 减数分裂完成后的四分体。所有图片均放大 700 倍, 标尺 = 10 μm 。

D)。细胞质中除纺锤体微管外, 仍有一定量的微管蛋白分布, 使细胞质呈现绿色弥散荧光。进入减数分裂 I 后期, 纺锤体微管分为 2 类: 牵引染色体的着丝粒微管和连接纺锤体两极的极丝微管(pole-pole

fibers)。着丝粒微管变短, 荧光较强, 把染色体分别拉向两极; 在两组分离的染色体之间的极丝微管较长, 较细, 连接纺锤体两极, 荧光也较弱(图 1-E、F)。随着着丝粒微管继续变短, 将染色体拉到两极

后,它形成扁平的帽状结构,荧光明显减弱。而连接两组染色体的极丝微管仍然保留(图 1-G、H)。然后,两极之间的丝状微管逐渐消失,从两极的极帽区域辐射形成了许多新的弧形极丝,形成一个“桶形”结构,“桶”中央原来的极丝微管完全消失(图 1-I)。随着移向两极的染色体逐渐凝缩成团,2个细胞核之间的微管荧光明显增加,而细胞两极将形成细胞核的区域微管荧光则明显减少(图 1-J)。进入减数分裂I末期,2个细胞核之间的微管荧光开始减弱,细胞两极的染色质凝聚成扁平的细胞核形态。虽然在2个细胞核之间的微管明显减弱,但在未来要形成细胞板的位置,微管荧光依然较强,形成一条较亮的荧光带(图 1-K)。

减数分裂I结束后,发生了胞质分裂形成2个子细胞,构成二分体(图 1-L)。在减数分裂II前期,二分体2个细胞中没有明显的微管结构,而在细胞质中的微管蛋白弥散分布(图 1-M),细胞核中的染色质也开始解聚形成染色体。2个二分体细胞进入减数分裂II中期后,由微管蛋白组装的2个微管纺锤体分别出现在2个细胞中,染色体位于纺锤体中间(图 1-N)。2个二分体细胞进入减数分裂II末期后,纺锤体微管荧光减弱,又重新出现了“桶状”微管结构连接细胞的两极,使2个细胞核分别位于细胞的两端(图 1-O)。减数分裂结束后,形成由4个小孢子组成的四分体,小孢子中的大部分微管解聚成微管蛋白又重新弥散在细胞质中,只在每个小孢子核的表面上保留一些微管骨架(图 1-P)。

讨 论

细胞中的微管是由微管蛋白聚集组装形成,微管蛋白和微管处于一种动态平衡状态,在不同时期,随着微管功能变化,二者的比例发生变化。本实验中洋葱小孢子母细胞减数分裂过程中的微管有4种类型:(1)在细胞分裂间期,微管以很小的微管片段或解聚为微管蛋白弥散分布在细胞质中;(2)减数分裂前的核周微管,呈现由细胞核向外放射状;(3)分裂中期的纺锤体微管;(4)分裂后期的成膜体微管。

不同类型的微管在细胞分裂中起着不同的作用:微管蛋白作为组装微管的前体物;核周胞质微管主要参与细胞器和细胞核的空间定位和细胞内物质的运输等功能;纺锤体微管主要是细胞分裂时将染色体聚集在特定区域并将其均匀地拉向两极,形成2个均等的子核;成膜体微管在最后的胞质分裂时起构建细胞板的作用,由其形成的细胞壁将细胞质分割成两部分,形成2个子细胞。细胞中的微管蛋白在特定时间内组装成微管骨架分布在特定空间形成特殊的结构调控减数分裂过程的顺利完成(朱澍 1996)。

通常有丝分裂时期可分为前期、中期、后期和末期4个时期。减数分裂与有丝分裂的最大区别在于减数分裂前期的核内染色体形态变化复杂。从细胞骨架变化的角度又可进一步细分出新的类型。Shamina (2005)将高等植物减数分裂的前中期(prometaphase)又划分为早前中期(early prometaphase)、中前中期(middle prometaphase)和晚前中期(late prometaphase)3个时期。在晚前中期,微管在将要产生赤道板的平面形成一圈环绕核的环状结构。当核膜破裂时,该环分解。该微管环可能为赤道板的形成预定了方位。Shamina等(2007)进一步研究了单子叶植物减数分裂I末期成膜体的形成过程,发现在减数分裂I末期,组成纺锤体的微管和一些新形成的微管向赤道板集中形成了成膜体,构成了连续型四分体的胞质分裂基础,产生了二分体。在本实验中,我们观察到洋葱小孢子母细胞在减数分裂中期,纺锤体至少由两种微管组成:连接两极的极丝微管,它们使纺锤体具有一定的空间结构;与染色体着丝粒相连的着丝粒微管,它们的缩短使染色体向两极移动。在两组染色体移动到两极后的末期,支撑纺锤体的极丝微管消失,而在2个核之间出现一些“桶状”的微管连接2个子核,使2个子核分布在一定细胞空间。然后,在“桶状”的中部,微管增加并缩短形成成膜体微管。因此洋葱成膜体微管是由新组建的微管重新构成,而不是由原有的极丝微管组成,这与小麦中的结果不同。

可能是洋葱着丝粒微管解聚后的微管蛋白又重新组合成了成膜体微管。

参考文献

- 冯九焕, 刘向东, 卢永根(1999). 水稻小孢子发生过程中微管骨架的初步研究. 华南农业大学学报, 20 (3): 1~5
- 杨军, 余春红, 王新宇, 郑国锴(2001). 洋葱花粉母细胞细胞内、细胞间微梁骨架的超微结构观察. 植物学报, 43 (4): 331~338
- 张正海, 康向阳, 刘明虎, 段乌拉(2008). 小胡杨小孢子发生及微管骨架变化. 北京林业大学学报, 30 (6): 36~40
- 朱澍(1996). 植物体细胞微管周期及微丝周期. 见: 徐是雄, 朱澍主编. 植物细胞骨架. 北京: 科学出版社, 60~83
- Cai G, Moscatelli A, Cresti M (1997). Cytoskeleton organization and pollen tube growth. Trends Plants Sci, 2 (3): 86~91
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1989). Myosin associated with the surfaces of organelles, vegetative nuclei and generative cells in angiosperm pollen grains and tubes. J Cell Sci, 94: 319~325
- Lancelle SA, Hepler PK (1991). Association of actin with cortical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. Protoplasma, 165: 167~172
- Pierson ES, Cresti M (1992). Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. Int Rev Cytol, 140: 73~125
- Shamina NV (2005). Formation of division spindles in higher plant meiosis. Cell Biol International, 29: 307~318
- Shamina NV, Gordeeva EI, Kovaleva NM, Serukova EG, Dorogova NV (2007). Formation and function of phragmoplast during successive cytokinesis stages in higher plant meiosis. Cell Biol International, 31: 626~635
- Tanaka I, Wakabayashi T (1992). Organization of actin and microtubule cytoskeleton preceding pollen germination. Planta, 186: 473~482
- Terasaka O, Niitsu T (1994). Differential roles of microtubule and actin-myosin cytoskeleton in the growth of *Pinus* pollen tubes. Sex Plant Reprod, 7: 264~272
- Tiwari SC, Polito VS (1988). Organization of the cytoskeleton in pollen tubes of *Pyrus communis*: a study employing conventional and freeze-substitution electron microscopy, immunofluorescence, and rhodamine-phalloidin. Protoplasma, 147: 100~112