

16

89-91

砧板柚花粉发育过程外壁糖蛋白形成的透射电镜分析*

张杏辉 李楠 薛妙男

(广西师范大学, 桂林 541004)

5666.301
29461

摘要 采用细胞化学技术, 经钉红对砧板柚几个不同发育阶段的花粉进行染色显示, 用透射电镜对花粉外壁糖蛋白进行了细胞化学定位观察, 探讨了花粉发育过程中外壁糖蛋白的发生时期及输送到花粉壁的过程。研究表明, 花粉外壁糖蛋白在单核花粉时期由绒毡层细胞产生, 并被分泌到药室内, 输送到花粉外壁及萌发孔周围积累和贮存, 整个过程延续到花粉成熟。

关键词 砧板柚; 花粉; 糖蛋白

The electron microscopy analysis on the development of exine glycoproteins during the growth of Zhen Ban Yu pollen

Zhang Xinghui Li Nan Xue Miaonan

(Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Abstract By means of cytochemistry, Ruthenium red has been applied to show the staining display of pollen of Zhen Ban Yu (a variety of *Citrus grandis*) in its different growing phases and electron microscopy has been used to observe the cytochemistry localtion of glycoproteins of pollen. The text tried to make a study of glycoproteins in the producing and transmitting phase. The study showed that the pollen surface glycoproteins is produced by tapetum cell in mononuclear pollen phase and secreted to endothecium and then transmitted to exine surface of pollen for accumulation and store. The whole process continues till the pollen is mature.

key words Zhen Ban Yu (*Citrus grandis* L.); pollen; glycoproteins

糖蛋白是高等植物细胞壁中特有的一种结构蛋白, 普遍存在于高等植物细胞中。^[1,2] 现已确定, 在植物受精作用中花粉壁糖蛋白与柱头之间的识别反应在不亲和性上起着决定的作用^[3]。对于自交不亲和植物花粉与柱头的识别机制研究, 近年来取得了长足的进展, 识别作用主要在花粉壁糖蛋白和乳突表膜蛋白之间进行^[4,5]。然而以往有关花粉壁糖蛋白的报道几乎都是采用生化技术研究的成果^[6,7]。有关花粉外壁糖蛋白形成过程的细胞化学定位研究, 也仅是在少数几种植物上有过初步报道^[8]。砧板柚是沙田柚的一个重要授粉树种, 我们在进行沙田柚自交不亲和实验中, 对砧板柚花粉进行了研究。砧

1997-04-25 收稿

第一作者简介: 张杏辉, 男, 1963 年出生, 高级工程师, 从事电镜技术及植物细胞学研究工作。

* 国家自然科学基金资助项目

板柚是自交亲和的,对白交亲和植物花粉壁是否有糖蛋白存在,它的来源如何,至今尚无报道。为了探讨这些问题,我们采用钉红染色法对砧板柚花粉外壁糖蛋白进行了电镜细胞化学定位观察,研究了不同发育时期花粉外壁糖蛋白的形成及动态变化过程。现将所获结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

由广西柑桔研究所提供砧板柚花蕾,于4月中旬砧板柚花期,分别采集四分体时期、单核花粉时期、双核花粉时期的花药及成熟花粉作为实验材料。

1.2 方法

将实验材料分成两组,一组经钉红染色处理,方法是将选定的各个时期的实验材料切成 0.5 mm^3 大小的组织块,用含有 1500 mg/L 钉红的二甲砷酸钠缓冲液($\text{pH } 6.8, 50\text{ mmol/L}$)配制的 4% 多聚甲醛和 1% 戊二醛混合液,在室温黑暗条件下固定 24 h ,再用含有 1000 mg/L 钉红的二甲砷酸钠缓冲液($\text{pH } 6.8, 50\text{ mmol/L}$)清洗干净。之后用含有 1000 mg/L 钉红的二甲砷酸钠缓冲液($\text{pH } 6.8, 50\text{ mmol/L}$)配制的 2% 锇酸固定液,于室温黑暗条件下固定 12 h ,再用上述缓冲液清洗 $2\sim 3$ 次,双蒸水清洗 3 次,系列酒精脱水,Epon 812环氧树脂包埋,制成超薄切片,另一组作为空白对照,不加钉红染色,其他操作条件和步骤与前组相同。

所有超薄切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,在H-600型透射电镜下观察并拍片记录。

2 结果与讨论

2.1 四分体时期

这一时期,小孢子母细胞经减数分裂形成的四个小孢子在电镜下可看到被共同的胼胝质壁包围,而且在各个小孢子间都有胼胝质分隔,小孢子外壁尚未形成,经钉红染色的切片及对照均无糖蛋白显示(图版I:1)。

2.2 单核花粉时期

此时四分体胼胝质溶解,小孢子释放,刚释放的小孢子形状不规则,核位于中央,花粉壁开始形成,基粒棒出现,但不完整,发育仍很不完善,经钉红染色的材料中,可见绒毡层细胞开始退化,细胞壁外表而有大量高电子密度的糖蛋白与钉红复合物出现(图版I:2),并被排放进入花药室。与此同时,花粉外壁上也有大量高电子密度的糖蛋白钉红复合物附着沉积,但还没有进入初期形成的基粒棒之间的空隙中(图版I:2)。从观察结果可以推测,在单核花粉时期,花粉外壁糖蛋白在绒毡层细胞内大量合成,并被分泌进入药室,转运到正在形成的花粉外壁表面。

2.3 双核花粉时期

绒毡层细胞进一步退化自溶,细胞壁已消失,初期质膜外表面糖蛋白大量分泌呈颗粒状,随后分泌减弱,进入药室的糖蛋白仍在不断输送到花粉外壁上。这一时期,花粉呈圆形或椭圆形,细胞内出现大量颗粒状后含物,双核出现,即雄配子体形成。此时花粉壁发育已比较完整,外壁可看到明显的内外两层,覆盖层、柱状层及底层已基本定形,被运输到花粉外壁的糖蛋白已渗入到外壁外层基粒棒之间的空隙中及外壁内层的细小间隙里,贮存在这些部位,同时糖蛋白有向萌发孔周围集中的趋势(图版I:3)。这个时期糖蛋白的活动主要表现为初期分泌和运输旺盛,随后减弱。

2.4 成熟花粉粒

花粉从双核出现开始,大约 10 d 左右即可发育成熟。此时的花粉,其壁已发育完全,各层完

整, 明显可见, 花粉内积累大量营养物质, 双核明显可见, 生殖细胞已移到花粉中央部位 (图版 1: 4)。经钨红处理的材料中, 花粉外壁覆盖层表面几乎无糖蛋白分布, 大量糖蛋白主要分布在外壁外层基粒棒之间的空隙及萌发孔周围, 呈均匀的层状或颗粒状, 外壁内层的细小间隙中, 也有少量糖蛋白呈间断线状分布 (图版 1: 4, 5)。至此, 花粉外壁糖蛋白形成过程完成。

通过电镜定位观察, 经钨红染色的砧板柚花粉外壁有糖蛋白存在, 而未染色处理的对照组切片中, 没有观察到花粉外壁糖蛋白 (图版 1: 6)。此外, 在所有切片中, 花粉及绒毡层细胞内部都没有观察到糖蛋白, 证明钨红只能显示细胞外部糖蛋白, 而不能进入完整细胞内部, 这与文献结果相符^[9]。至于砧板柚花粉是否存在内壁蛋白, 还需研究证实。从对砧板柚花粉的研究结果可以断定, 自交亲和植物的花粉至少是有外壁糖蛋白存在的, 其来源于绒毡层细胞。有报道认为, 花粉外壁糖蛋白除了由绒毡层细胞分泌而来外, 也可以由花粉原生质产生后经由内壁通过萌发孔转运而来, 但本实验无法证实这种观点。在花粉成熟过程中, 糖蛋白有向萌发孔周围集中的趋势, 但值得注意的是, 花粉萌发孔的周围是缺少外壁的, 糖蛋白除了来源于绒毡层细胞外, 是否有部分由花粉原生质产生并并入到萌发孔壁, 这值得作进一步的深入研究。

3 结 论

砧板柚花粉外壁有糖蛋白存在, 其来源于绒毡层细胞。在花粉发育过程中, 从单核花粉时期开始, 糖蛋白由绒毡层细胞分泌到药室并转运到花粉外壁外及萌发孔周围, 单核后期至双核初期, 糖蛋白分泌和运输活动达到高峰, 随后逐渐减弱, 到双核后期, 即花粉成熟, 糖蛋白的分泌和转运活动基本停止。与此同时, 随着花粉外壁的不断发育成熟, 被运输到花粉外壁的糖蛋白开始渗入到外壁外层基粒棒之间的空隙中及外壁内层的细小间隙里, 最终被积累和贮存在这些部位。

参 考 文 献

- 1 简令成, 孙龙华, 孙德兰. 几种植物细胞表面糖蛋白的电镜细胞化学及其与植物抗逆性的关系. 实验生物学报, 1986, 19 (3): 261~271
- 2 贾忠祥, 周玉岩, 孙郁杜. 大豆叶片细胞表面糖蛋白形态与功能的研究. 电子显微学报, 1995, 14 (4): 252~254
- 3 胡适白. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社, 1982. 46~51
- 4 董 耿, 李曙轩. 大白菜花粉壁蛋白和柱头表膜蛋白与自交不亲和的关系. 园艺学报, 1993, 20 (4): 363~368
- 5 翟 波, 刘后利. 甘蓝型油菜与诸葛菜杂交时花粉与柱头的识别反应. 中国油料, 1996, 18 (1): 1~3
- 6 Clarke A. E, Knox R. B. Cell recognition in flowering plants. *Quar Rev Biol*, 1978, 53: 3~28
- 7 杨中议, 朱广疆, 曹宗巽. 西葫芦花粉壁糖蛋白的进一步研究. 植物学报, 1984, 26 (1): 45~51
- 8 张明珍, 刘智慧, 郑常文等. 诸葛菜花粉壁糖蛋白的电镜细胞化学观察. 植物学通报, 1994, 11 (会议论文集): 60
- 9 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学及中国协和医科大学出版社, 1990. 188~213