

沙田柚自交不亲和花柱糖蛋白产生的时空关系

薛妙男, 李楠, 张杏辉, 杨继华

Q944.44

(广西师范大学生物系, 广西桂林 541004)

Q946.032

摘要: 用辣根过氧化物酶标 ConA 电镜细胞化学方法研究沙田柚不同发育时期的花柱通道细胞中糖蛋白的合成、分布和运输途径的动态变化。四分体期至开花期, 在沙田柚花柱通道细胞中, 内质网(ER)合成糖蛋白呈颗粒状定位于核膜腔, 内质网膜腔, 质膜与细胞壁之间电子透明层中。授粉后 1~3 d, 内质网结构形态改变, 由完整圆形变为开放, 并囊泡化, 大量线粒体集中于囊泡区, 形成类似于哺乳动物腺外分泌细胞的高尔基区。内质网合成的糖蛋白在高尔基区膜囊中经糖基转移酶作用进一步浓缩凝集, 形成与识别有关的糖蛋白, 经高尔基小泡运送至通道细胞外壁。讨论了定位于通道细胞外壁的糖蛋白在沙田柚配子体型不亲和识别中的作用及与识别部位的关系。

关键词: 沙田柚; 自交不亲和; 花柱; 细胞化学; 超微结构; 糖蛋白; 发育期 识别

中图分类号: Q944.44 文献标识码: A

The time and space relations on the glycoprotein forming from self-incompatibility style of shatinyu

XUE Miao-nan, LI Nan, ZHANG Xing-hui, YANG Ji-hua

(Biological Department, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Using Concanavalin A-Horseradish peroxidase conjugates, a cytochemical method, the dynamic changes on synthesis, distribution and transport ways of the glycoproteins from the stylar passage cell of shatinyu (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.) in the distinct developing stages were researched. The glycoproteins synthesized in the endoplasm reticulum (ER) of the passage cell of shatinyu from the tetrad stage to the flowering stage showed granular shape. They were located in the cavities of nuclear membrane and ER membrane, and the electronic transparent-layer between plasmalemma and cell wall. In the first three day after pollinating, ER altered its shape, and its spiral was united and became vesiculation. A vast amount of mitochondrions concentrated in the vesicle zone and formed a Golgi zone similar to secretory cell outside the gland of mammal. The glycoproteins were enriched and coagulated continuously in the vesicle of Golgi zone by glycosyl transferases and formed the discernible glycoproteins. The glycoproteins were transported to the outer wall of passage cell through

收稿日期: 1999-07-15

作者简介: 薛妙男 (1937-), 女, 教授, 从事植物生殖生物学研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3976007)

the Golgi vesicle. The role of glycoproteins on the discernment of gametophyte self-incompatibility of shatinyu and the relations of the glycoproteins with discerning sites were discussed.

Key words: Shatinyu (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.); self-incompatibility; style; cytochemistry; ultrastructure; glycoprotein

目前,在配子体自交不亲和茄科植物中已分离出S基因编码的花柱蛋白,定性为糖蛋白^[1-3],存在于花柱引导组织细胞外空间^[5,6],并能抑制离体条件下自花粉管生长^[7]。近年来,我们对沙田柚(*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.)自交不亲和性研究提示,花粉管停止生长是在授粉后第三天花柱1/2处,花粉管沿通道细胞内缘生长,属配子体型不亲和^[8]。开花,授粉后花柱提取液能选择性抑制花粉管生长^[9]。为弄清与雌雄识别有关糖蛋白在沙田柚中产生的时空关系,我们采用辣根过氧化物酶标ConA电镜细胞化学方法对不同发育时期1/2花柱通道细胞中糖蛋白合成分泌运输及定位分布进行研究。探讨花柱中糖蛋白发生的时空变化与花粉管受阻的关系,花粉管与花柱识别部位,为分离纯阶级S蛋白提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料采自桂林广西柑桔研究所沙田柚园地的15 a生酸砧结果树。

1.2 方法

根据我们1994年对沙田柚雌雄发育及相关性研究的结果,沙田柚雌雄发育基本上是同步的,所以采用花粉发育阶段作为花信发育阶段的形态指标进行采集,分别采取四分体、单核期、双核期、开花期、开花授粉后第1、2、3 d的1/2共柱部位(花粉管受阻部位),将表皮、皮层薄壁细胞切除,切取带有花柱通道细胞部分的组织块(1 mm×2 mm)。根据简令成(1991)补充修改建立的植物糖蛋白酶标ConA电镜技术方法^[11],材料按固定、轻度酶解细胞壁,结合ConA,连接辣根过氧化物酶和酶活反应,后固定、脱水、包埋,切片,染色,观察,摄影等步骤进行。

对照包括:(1)实验样品不经过ConA的结合反应;(2)反应物不加底物。

2 结果

2.1 四分体至单核期

核周区质体聚集,在外层细胞质中,有丰富的管状和小泡状膜囊正在连接融合形成内质网潴泡,在核外膜和内质膜可见到少量糖蛋白出现(图版 I: 1),为内质网合成期。

2.2 单核至双核期

在分泌端切面上有数10条管状内质网,平行层状排列,内质网膜上有糖蛋白分布(图版 I: 2),并将内质网膜上合成的蛋白质糖基化,形成颗粒状进入内质网腔中(图版 I: 3),是蛋白质合成最旺阶段。

2.3 双核至开花期(经历5~7 d)

管状条形内质网弯曲成同心螺旋,核糖体解聚,电子密度降低,内质网上产生大量芽生小泡,将合成糖蛋白运送至质膜与细胞外壁之间电子透明层中,经外排进入角质层下腔。内质网中糖蛋白由合成逐步停止转入到分泌运输阶段(图版 I: 4)

2.4 开花至授粉后1 d

内质网囊泡化,核糖体解聚,致使内质网改变原来结构形态,由同心螺旋变为开放,大量线粒体集中分布于内质网囊泡内,在细胞核上方靠分泌端形成一个类似于哺乳动物腺外分泌细胞的高尔基区(即植物细胞中的液泡系),糖蛋白在这里浓缩凝结形成分泌颗粒,经高尔基小泡运送到细胞纤维素外壁(图版Ⅱ:5)。

2.5 授粉后2~3 d

高尔基体肥大萎缩,囊泡扩张,定位于纤维外壁上的糖蛋白比授粉后第一天有明显增加,一直维持到花粉管通过,糖蛋白才消失(图版Ⅱ:6)。

未经 ConA 处理、反应物不加底物,在双核期,开花前和授粉后都没有观察到上述标志酶反应图像(图版Ⅱ:7、8),说明借助酶标 ConA 的超微细胞化学技术显示不同发育时期花柱通道细胞糖蛋白合成分泌,运输分布是可靠的。

3 讨 论

(1) 沙田柚1/2花柱通道细胞内质网中糖蛋白合成起始于单核期,双核期最旺,开花前糖蛋白合成停止转入分泌,通过芽生小泡运送到质膜与壁之间电子透明层,外排至角质层下腔。开花授粉后1~3 d,内质网构型改变并囊泡化,大量线粒体聚集囊泡区,在细胞核上方靠分泌端形成一个类似哺乳动物腺外分泌细胞的高尔基区^[12],它是核外膜,内质网膜分化形成高尔基膜囊的过渡形态,成为开花后通道细胞中氧化还原中心,糖蛋白在这里浓缩凝结成分泌颗粒,经高尔基小泡运送到细胞纤维素外壁。用酶标 ConA 细胞化学方法表明了不同发育时期的通道细胞中糖蛋白合成分泌运输及实位分布变化与内质网结构形态,数量、分布的改变紧密相连,是一种高度特殊结构与明显功能的分泌型细胞。

(2) 用细胞化学方法研究动物的人体腺细胞膜上糖蛋白合成分布已有大量工作^[13,14],在植物方面还未见到有花柱通道细胞中糖蛋白的时空关系的报道。我们的研究表明沙田柚通道细胞中内质网形态结构特征,糖蛋白合成部位,运输途径,同豚鼠胰腺外分泌细胞相似^[15],说明动植物腺外分泌细胞在结构和功能上的一致性。

(3) 我们用荧光显微镜观察到沙田柚花粉管从花柱通道细胞内缘生长,在授粉后第三天花柱1/2处受阻,属配子体不亲和^[3]。用开花后花柱提取液进行体外花粉萌发,能选择性抑制自交花粉管生长^[9],说明识别蛋白在开花后高效表达。用酶标 ConA 电镜细胞化学方法揭示不同发育时期1/2花柱处通道细胞中糖蛋白时空变化与沙田柚花粉管受阻时空变化是一致的。证实沙田柚花S蛋白基因表达位点及时间与花粉管受阻位点和时间是同时出现的,同 Comish EC 等研究一致^[15]。因此,可以这样认为,授粉后1~3 d,当1/2花柱通道细胞纤维外壁上糖蛋白积累到一定阈值,刚好花粉管生长达到花柱1/2处,花粉管壁与通道细胞纤维素外壁接触,外壁上糖蛋白转移到花粉管中,致使花粉管生长停止,说明定位于纤维外壁上的糖蛋白参与了花柱与花粉管之间的识别,从细胞水平上证实:1/2花柱通道细胞分泌面纤维外壁是沙田柚自交不亲和花柱和花粉管之间的识别部位。

参考文献:

- [1] Jahnen W, Batterham M P, Clarke A E *et al*. Identification, isolation, and Nterminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Plant Cell*, 1989, 1: 493~499

- [2] Khey-pour A, Bintrim S B, Jecger T R *et al.* S-Proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana* sequence diversity of pistil [J]. *Sex Plant Reprod*, 1990, **3**: 88~97
- [3] McClure B A, Haring V, Ebert P R *et al.* Self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases [J]. *Nature*, 1991, **342**: 955~957
- [4] Xu B, Grun P, Khey-Pour *et al.* Identification of pistil specific proteins associated with three self-incompatibility allele in *Solanum chacoense* [J]. *Sex Plant Reprod*, 1990, **3**: 54~60
- [5] Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L *et al.* Cloning of Cdna for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Nature*, 1986, **321**: 38~44
- [6] Bredemeijer GM, Blass J. S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca* [J]. *Theor Appl Genet*, 1981, **59**: 185~190
- [7] Jahnen W, Ivshwm, Batterham MP, Clarke AE. Inhibition of in vitro pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana glauca* [J]. *Plant Cell*, 1989b, **1**: 501~510
- [8] 薛妙男, 陈腾士, 杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察 [J]. 园艺学报, 1995, **22**: 127~132
- [9] 陈腾士, 杨小华, 薛妙男. 沙田柚花柱蛋白对花粉管生长的影响 [J]. 广西植物, 1998, **18** (2): 160~164
- [10] 薛妙男, 张莹, 麦适秋等. 沙田柚雌雄蕊发育及其相关性研究 [J]. 广西植物, 1993, **13** (2): 170~173
- [11] 简令成, 孙龙华, 史国顺. 冬小麦幼叶细胞膜糖蛋白的酶标 Con Ajn 电镜细胞化学研究 [J]. 植物学报, 1991, **33** (9): 667~673
- [12] 汪德耀. 普通生物学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988. 156~159
- [13] Hori T, Saito Y. Difference of lectin binding sites in pituitary adenoma cells [J]. *Histochem Cytochem*, 1983, **31**: 258~262
- [14] Roth J. ConA carbohydrate cytochemistry on thin sections by lectins [J]. *Histochem Cytochem*, 1982, **30**: 583~588
- [15] Cornish EC, Pettitt JM, Boning *et al.* Developmentally controlled expression of gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Nature*, 1987, **326**: 99~102

图版说明:

ER: 内质网; M: 线粒体; G: 高尔基体; P: 质体; W: 细胞壁; Nm: 核膜; Zy: 酶原粒; V: 小泡; Vac: 高尔基小泡; Gz: 高尔基区; SEL: 分泌层。

Explanation:

ER: Endoplasm reticulum; M: Mitochondrion; G: Golgisome; P: Plastid; W: Cell wall; Nm: Nuclear membrane; Zy: Zymogen; V: Vesicle; Vac: Golgi vesicle; Gz: Golgi zone; SEL: Secretory layer