

一串红花粉发育过程中外壁糖蛋白的透射电镜观察

庄金慧¹, 胡国富¹, 李凤兰¹, 吕寻艳², 胡宝忠¹

(1. 东北农业大学 生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150030 2. 鹤岗市园林管理处, 黑龙江 鹤岗 154100)

摘要: 研究采用细胞化学技术, 用钉红对一串红 5 个不同发育阶段的花粉进行染色、经透射电镜对其外壁糖蛋白进行定位观察, 探讨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。结果表明: 糖蛋白在单核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: 一串红; 花粉; 糖蛋白

中图分类号: S 681.4; Q 942.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)03-0165-03

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]。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^[2]。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^[3]。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^[4]。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^[5]。一串红是异花授粉植物, 对其花粉壁是否有糖蛋白存在, 它的来源如何, 至今尚无报道。为探讨这些问题, 试验采用钉红染色法对一串红花粉外壁糖蛋白进行电镜细胞化学定位观察, 研究不同发育时期花粉外壁糖蛋白的形成及动态变化过程。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为美国一串红太阳神系列中的正红品种。分别采集一串红花粉发育的四分体时期、单核花粉时期、双核花粉时期的花药及成熟花粉。

1.2 试验方法

采用钉红染色法^[6]。将试验材料分成 2 组: 一组经钉红染色处理, 方法是将选定的各个时期的试验材料, 用含有 1 500 mg/L 钉红的二甲砷酸钠缓冲液 (pH 6.8, 50 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 1 000 mg/L 钉红的二甲砷酸钠缓冲液 (pH 6.8, 50 mmol/L) 清洗干净。之后用含有 1 000 mg/L 钉红的二甲砷酸钠缓冲液 (pH

6.8, 50 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 2~3 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 结果与分析

采用钉红染色法对一串红花粉外壁糖蛋白进行了电镜细胞化学定位观察, 研究不同发育时期花粉外壁糖蛋白的形成及动态变化过程。

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 4 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, 在四分体后期有大量糖蛋白出现, 并且在绒毡层附近密度较大, 有物质分散向室内小孢子运动、沉积的趋势 (图 1-1)。

2.2 单核花粉时期

小孢子释放后, 核位于中央, 花粉壁已经开始形成, 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, 绒毡层细胞的继续解体, 大量的高电子密度的糖蛋白与钉红复合物继续向花粉外壁沉积, 并均匀分布在基粒棒之间的空隙中 (图 1-2), 随着进一步发育, 会发现在外壁沉积的颗粒较小的糖蛋白与钉红复合物逐渐减少, 而在内壁外表面出现颗粒状的复合物 (图 1-3、4)。

2.3 双核花粉时期

绒毡层的分解几乎殆尽, 但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, 双核出现。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, 糖蛋白呈现颗粒较大, 沉积在外壁外层基粒棒之间的空

第一作者简介: 庄金慧 (1982-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物分子生物学与生殖生物学。

通讯作者: 胡宝忠。

收稿日期: 2007-10-16

隙中及外壁内层的细小间隙里, 并有向萌发孔周围集中的趋势(图 1-5)。

2.4 成熟花粉

成熟的花粉, 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, 有时可见三核花粉粒, 生殖细胞已游离到营养细胞的细胞质中。经钉红处理的材料中, 花粉外壁覆盖层表面几乎无糖蛋白分布, 大量糖蛋白以颗粒状主要分布在萌发沟内(图 1-6)。

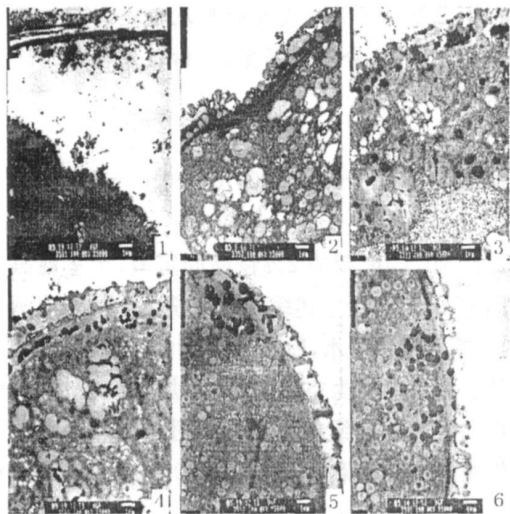


图 1 花粉不同发育时期糖蛋白的变化

注 1. 四分体末期; 2. 单核花粉 I 期; 3. 单核花粉 II 期; 4. 单核花粉 III 期; 5. 双核花粉; 6. 成熟花粉。

3 讨论

有关花粉壁蛋白与柱头表膜蛋白的研究已有一些报道。Knox^[7] 在美洲黑杨×银白杨的杂交中发现, 银白杨花粉与美洲黑杨不亲和是由于绒毡层组织合成的一种特异蛋白, 授粉后释放出来并与柱头上的特异蛋白进行相互识别的反应, 从而决定了花粉管能否萌发而进入柱头。

董耿等^[3] 以 6 个纯合 S 基因型和一个杂合 S 基因型(SgSi)的大白菜自交不亲和株系为材料, 提取了花粉壁蛋白和柱头表膜蛋白。并用花粉壁蛋白处理相同 S 基因型的柱头, 可诱导乳突细胞的胼胝质反应, 处理不同基因型的柱头, 可“蒙导”自交亲和。用等电聚焦法分析花粉壁蛋白和柱头表膜蛋白中的糖蛋白, 发现其等电点因 S 基因不同而特异。由此推测, 花粉壁蛋白和柱头表膜蛋白中的识别物质是 S 基因特异糖蛋白。这也充分肯定了蛋白质尤其是糖蛋白在识别过程中的重要作用, Clarke A E^[8] 等也有此类报道。

杨中汉等^[4] 在对丝瓜和西葫芦花粉壁糖蛋白方面进行研究, 用伴刀豆球蛋白 A (简称 ConA) 亲和层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析, 从西葫芦花粉壁中分离出 3 条有 PAS 阳性反应的糖蛋白条带。

张英华等^[9] 将萝卜柱头表面浸出液经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 考马斯亮蓝和过碘酸-Schiff 试剂染色, 显示出明显的蛋白质和糖蛋白带。

Clarke 等^[10] 从唐菖蒲 (*Gladiolus gandavensis* Van Houtte) 花粉和柱头表面分别提取到 5% 和 23% 的糖蛋白。进一步的分析发现, 花粉壁含 5 种糖蛋白。Ferrari 等^[11] 在甘蓝 (*Brassica oleraceae* var. *Caitata* L.) 柱头中分离出一个控制细胞间识别的糖蛋白。

在以上的研究中, 都已经突出显示出糖蛋白在花粉和柱头之间的识别具有不可缺少的作用, 而且还表明糖蛋白的种类比较多, 能控制识别反应的恰恰是他们之间具有差异的糖蛋白。

在试验中, 对花粉发育的 4 个连续时期中, 糖蛋白的形成与积累方向的化学定位进行了分析。结果表明一串红花粉内, 外壁都有糖蛋白存在, 这与张明珍^[5]、张杏辉^[6] 等研究一致。其来源于绒毡层细胞, 而绒毡层细胞内部都没有观察到糖蛋白, 其他外壁完整的花粉里未发现糖蛋白颗粒。证明钉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^[12]。

在整个花粉发育过程中, 是在四分体解体时开始发现有大量糖蛋白从绒毡层释放出来, 而且颗粒较小, 即在花粉发育过程中, 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分外壁及萌发孔周围。单核后期至双核初期, 糖蛋白分泌和运输活动达到高峰, 随后减弱。到双核后期, 糖蛋白的分泌和转运活动基本停止。这与张杏辉^[6] 的结果基本一致。但在该试验中还发现, 糖蛋白在向花粉外壁沉积的过程中, 先是以非常小的颗粒沉积到花粉外壁的间隙中, 而在单核花粉的不同时期, 发现花粉内壁上表面有较大颗粒糖蛋白出现, 而且随着继续的发育, 这种较大颗粒糖蛋白逐渐增多, 而细小颗粒糖蛋白则逐渐减少, 出现这种现象是否可以说明, 糖蛋白以小分子状态由绒毡层分泌, 输送到花粉外壁沉积的过程中, 会发生聚合性反应, 形成所需要的不同分子量的高分子糖蛋白, 最后聚集在萌发沟内的乳突细胞的间隙中, 此现象待进一步证实。

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[J]. 试验生物学报, 1986, 19(3): 261-271.
- [2] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1982: 46-51.
- [3] 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[J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 363-368.
- [4] 杨中汉, 曹宗巽. 丝瓜和西葫芦花粉壁蛋白和理化生物学特性[J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 75-83.
- [5] 张明珍, 刘智慧, 郑常文. 诸葛菜花粉壁糖蛋白的电镜细胞化学观察[J]. 植物学通报(会议论文集), 1994(11): 60.
- [6] 张杏辉, 李楠. 砧板柚花粉发育过程外壁糖蛋白形成的透射电镜分析[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 89-91.
- [7] Knox R B. Role of pollen-wall proteins as recognition substances in

移栽大树夏季管护的三点体会

张 胜, 曹锦明

(姜堰市林业局林业中心 江苏 姜堰 225500)

摘 要: 移栽大树的夏季管护是移栽的难点。要做好移栽大树的夏季管护, 主要有三点: 保持树体的水分代谢平衡和加强肥水管理及病虫害防治。

关键词: 移栽大树; 夏季; 管护

中图分类号: S 723.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001—0009(2008)03—0167—02

目前, 城市园林建设和绿色通道的景观建设中直接移植大树的情况已经相当普遍, 随之带动苗木生产者培育大规模苗木数量急剧上升。无论是绿化施工移植的大树, 还是苗圃生产移植的大树, 都有一个如何提高成活率的问题, 否则, 将会造成资源的极大浪费和施工、生产单位重大的经济损失。在大树移栽过程中, 最重要的是越夏的管护, 夏天管理上去了, 成活率就有了保证, 因此如何做好移栽树木的夏季管护是移栽能否成功的关键环节。

第一作者简介: 张胜(1979-), 男, 大专, 林业助理工程师, 现从事林业技术推广和病虫害防治工作。E-mail: zhangsheng7008@163.com。
收稿日期: 2007—10—26

针对当前越夏的管护谈三点体会。

1 保持移栽树体的水分代谢平衡

这是移栽大树成活和安全越夏的关键所在。而要保持树体水分代谢平衡, 具体需要做好树体地上部分保湿和地下部分促新根。

1.1 地上部分保湿措施有裹干、喷水、遮荫等

1.1.1 裹干 用草绳、蒲包、苔藓等材料严密包裹树干和比较粗壮的分枝。上述包扎物具有一定的保湿性和保温性。经包干处理后, 一可避免强光直射和干风吹袭, 减少树干、树枝的水分蒸发; 二可贮存一定量的水分, 使枝干经常保持湿润; 三可调节枝干温度, 减少高温和低温对枝干的伤害, 效果较好。目前, 有些地方采用

interspecific in compatibility in poplars[J]. Nature, 1972 (237): 381-383.

[8] Clarke A E, Gleeson P, Harrison S, Knox R B. Pollen stigma interaction; identification and characterization of surface components with recognition potential[J]. Proc Acad Sci USA, 1979, 76 : 3358-3369.

[9] 张英华, 杨中汉. 萝卜柱头表膜糖蛋白的研究. 植物学报, 1983, 26 (6): 544-549.

[10] Clarke A E, Knox R B. Cell recognition in flowering plants[J]. Quar. Rev. Biol, 1978 531: 3-28.

[11] Ferrari T E, Bruns D, Wallace D H. Isolation of a plant glycoprotein involved with control of intercellular recognition[J]. PlantPhysiol, 1981, 67: 274-277.

[12] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学及中国协和医科大学出版社, 1990: 188-213.

The Electron Microscopy Analysis on the Development of Exine Glycoproteins During the Growth of Pollen in *Salvia splendens*

ZHUANG Jin-hui, HU Guo-fu, LI Feng-lan, LV Xun-yan, HU Bao-zhong
(1. Life Science College of Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China;
2. Gardening Bureau of Hegang Hegang, Heilongjiang 154100, China)

Abstract: By means of cytochemistry, Ruthenium red had been applied to show the staining display of pollen of *Salvia splendens* in its different growing phases and electron microscopy had been used to observe the cytochemistry localotion of glycoproteins of pollen . The aims was to make a study of glycoproteins in the producing and transmitting phase . The study showed that the pollen surface glycotetins was 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 was mature.

Key words: *Salvia splendens*; Pollen; Glycoproteins