

应用水稻花粉离体萌发体系观察花粉管内微丝分布

叶俊钗, 肖轲, 姚家玲*

(华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 采用非固定、DMSO 渗透和异硫氰酸标记的鬼笔环肽 (FITC-Ph) 染色方法, 观察水稻花粉离体萌发过程中花粉管内肌动蛋白微丝的形态和分布。结果表明: (1) 水稻花粉水合 2 min 后即可萌发, 花粉管生长速度在 600 ~ 1500 $\mu\text{m}/\text{h}$ 之间。 (2) 水合而未萌发的花粉粒中, 大量较短的梭形微丝束构成微丝网络结构, 萌发过程中花粉粒内的梭形微丝束松解, 部分微丝转移至萌发的花粉管内沿花粉管纵轴呈束状结构; 随着花粉管的伸长, 微丝束主要分布在花粉管中前端, 但在花粉管顶端区域始终未见明显的微丝束。 (3) 水合后不能正常萌发的花粉粒内肌动蛋白微丝呈弥散不规则分布, 在相同萌发时间生长迟缓的花粉管中, 微丝束较少, 且主要位于花粉管近萌发孔的部位。表明微丝骨架的形态和分布影响水稻花粉管的萌发和生长。

关键词: 花粉萌发; 水稻; 花粉管; 微丝

中图分类号: Q942.5

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0200-06

Visualization of Microfilament Distribution in Pollen Tubes through *in vitro* Rice Pollen Germination System

YE Jun-Chai, XIAO Ke, YAO Jia-Ling*

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Microfilament patterns during pollen germination and pollen tube growth were observed with no pre-fixation using dimethylsulphoxide (DMSO) as a permeabilising agent and FITC-Phalloidin as the stain. The main results were: (1) Pollen germinated after hydration for 2 min and growth speed of the pollen tube was between 600 – 1500 $\mu\text{m}/\text{h}$. (2) In the hydration of the pollen grains without germination, a number of short fusiform microfilaments constituted a network-like structure. In the germination process, some microfilaments gradually transferred to the pollen tube as the short fusiform microfilaments were released along the pollen tube longitudinally. For pollen tube elongation, microfilaments were mainly in the middle and front region of pollen tube, but there were no obvious microfilaments in the tip of pollen tube. (3) The distribution of microfilaments was diffuse and irregular in certain non-germination pollen. Some pollen germinated at same time but were shorter, with fewer microfilaments gathered in the region near the apertures. These results indicated that the distribution of microfilament cytoskeleton affected the germination and growth of rice pollen tubes.

Key words: Pollen germination; Rice; Pollen tube; Microfilament

花粉粒萌发及花粉管生长是植物传粉受精的一个重要步骤, 影响植物的结实和作物产量。已有研究表明花粉管生长的物质基础来源于花粉管亚顶端细胞质中高尔基体产生的小泡^[1], Tang 等^[2]的研究发现这种向花粉管顶端移动的小泡能

被抗肌球蛋白的抗体标记, 这表明肌动蛋白微丝参与了小泡的运输。随后的报道表明微丝与花粉萌发及花粉管生长, 花粉管内原生质体流动等紧密相关^[3,4]。Geitmann 等^[5]对罂粟科自交不亲和性反应中花粉管微丝骨架变化的研究表明, 微丝骨

收稿日期: 2010-04-02, 修回日期: 2010-05-10。

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目 (J0730649); 国家自然科学基金资助项目 (30971551)。

作者简介: 叶俊钗 (1984 -), 女, 硕士研究生, 主要从事植物生殖生物学研究。

* 通讯作者: 姚家玲, 女, 教授, 博士, 主要从事植物发育生物学, 植物细胞生物学的教学与研究 (E-mail: yaojlm@ mail. hzau. edu. cn)。

架的改变是由自交不亲和引起的,而微丝骨架的改变导致花粉管生长快速抑制。但之前的这类研究通常限于那些花粉易于离体保存且花粉管生长较慢的植物;水稻花粉离体存活时间较短且花粉萌发速度快^[6],因此到目前为止尚未见有关水稻花粉管微丝标记的报道。水稻作为世界上最重要的粮食作物,育种实践中发现导致一些品种间杂交结实率低的主要原因是传粉受精不良,进一步分析发现花粉萌发和花粉管生长缺陷是其主要障碍之一^[7]。因此,本研究采用 DMSO 渗透,非固定荧光探针标记法^[8]观察水稻花粉离体水合萌发以及花粉管伸长生长过程中花粉管内肌动蛋白微丝分布,为研究微丝骨架与水稻花粉管生长的关系奠定一定基础,为分析水稻品种间传粉不良的机理提供细胞学资料。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试水稻品种为籼稻明恢 63,种植于华中农业大学实验田中,自然条件下生长,常规方法栽培管理。在水稻开花期晴好天气上午 10:00 左右剪取颖壳即将张开的小花所在稻穗,插入装有清水的三角瓶中立即带回室内用于后续实验。

1.2 实验方法

1.2.1 水稻花粉离体萌发

(1) 萌发方法:取洁净载玻片,在其上滴上适量萌发液(萌发液成分为 20% 蔗糖 + 400 mg/L H_3BO_3 + 3 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ + 10 mg/L VB_1),之后用镊子取出花药,放进萌发液中,夹破花药使花粉粒释放,再将其轻轻散匀,置于 28℃ 萌发。

(2) 花粉萌发与花粉管长度测量:设置不同的萌发时间梯度,吸去萌发液后,分别用 4% 多聚甲醛溶液(50 mmol/L pipes 配制)固定,最后加盖盖玻片。在 Olympus BH₂ 型光学显微镜下观察花粉萌发状况,每个萌发时间梯度做 3 个重复,平均观测 30 个花粉管,用 Simpal PCI 软件测量各花粉管长度,求平均值,Origin 7.0 制图。

1.2.2 水稻花粉管中肌动蛋白微丝标记

镜检选取不同萌发时间且萌发状态较好的花粉管,吸去萌发液。参照 Pierson 等的染色方法^[8],FITC-Ph 用 PBS 缓冲液(pH 6.9)溶解,工作液浓度稀释为 5 mg/L,并加入 5% DMSO,置于 28℃ 黑暗环境染色 1 h,染色后直接封片。花粉水合过程

中肌动蛋白微丝的观察,则将新鲜花粉直接浸入染色液中 1 h 后封片。Olympus BX 61 荧光显微镜观察,激发光为蓝光, Sport Pursuit CCD 相机采集图象,照片用 Photoshop 7.0 处理。

2 结果与分析

2.1 水稻花粉离体萌发过程及特征

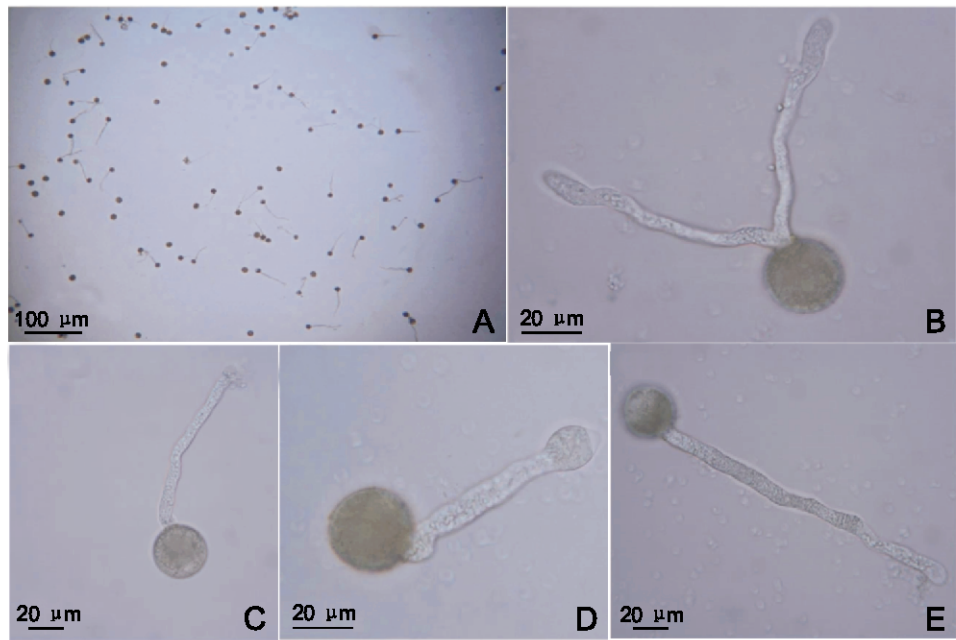
花粉活力较高时萌发状态好,萌发率较高(图 1: A)。多数花粉落入萌发液 2 min 时花粉管即从萌发孔中伸出来,且生长速度较快,5~6 min 后花粉管长度已达花粉粒直径的 2 倍。通过对不同萌发时间水稻花粉管长度的测量,计算出花粉管平均生长速度为 600~1500 $\mu\text{m}/\text{h}$,花粉管生长速度在不同的生长阶段有差别(见图 2),萌发早期生长速度最快,达 2700 $\mu\text{m}/\text{h}$ 。此外,大多数花粉管在生长至 140 μm 左右时顶端便开始破裂释放内含物(图 1: C),之后花粉管停止生长。同时我们还发现一些异常现象,如分叉形成 V、Y 等形状的花粉管(图 1: B);有些花粉管在生长较短时顶端便出现膨大(图 1: D);少数花粉管生长可长达 220 μm (图 1: E)。

2.2 水稻花粉离体萌发及花粉管伸长过程中肌动蛋白微丝的动态变化

水稻花粉粒经 FITC-Ph 染色,水合而未萌发时,我们观察到花粉粒内存在梭形的肌动蛋白微丝,它们在花粉粒中形成一个复杂的网络状结构(图 3: A),这与徐是雄等^[9]在水合未萌发的姜花花粉粒中观察到的结果一致。

水稻花粉管生长达 60 μm 左右时,我们观察到原先存在于花粉粒中梭状的肌动蛋白微丝大部分发生松解转变为细丝状,接近萌发孔的花粉管部分荧光特别强烈,微丝在此处汇聚(图 3: B),表明花粉粒中的肌动蛋白微丝在花粉萌发过程中逐渐转移至花粉管内。花粉管的中部分布一些长的且与花粉管平行的微丝束,但在花粉管顶端部分没有观察到肌动蛋白微丝,整个顶端呈现无荧光的暗区(图 3: B, 箭头)。

花粉管长达 100 μm 左右时,花粉管内布满与花粉管长轴平行的微丝束(图 3: C),有些相互平行的微丝束之间还出现交联状的网络结构,同时花粉管的顶端区域观察不到明显荧光(图 3: C, 箭头)。但在某些花粉管内我们观察到彼此之间呈螺旋盘绕的粗束状肌动蛋白微丝(图 3: D, 箭头),而在



A. 花粉萌发; B. V 形异常花粉管; C. 花粉管(长达 140 μm 时)顶端破裂释放内含物; D. 顶端膨大的较短花粉管; E. 花粉管生长长达 220 μm 。
A. Pollen germination; B. Abnormal V-shaped tube; C. Up to 140 μm , most pollen tubes began to rupture and release the inclusions; D. The tip of some shorter pollen tubes appeared swollen; E. Some pollen tubes grow up to 220 μm .

图 1 水稻花粉离体萌发特征

Fig. 1 Some features of *in vitro* rice pollen germination

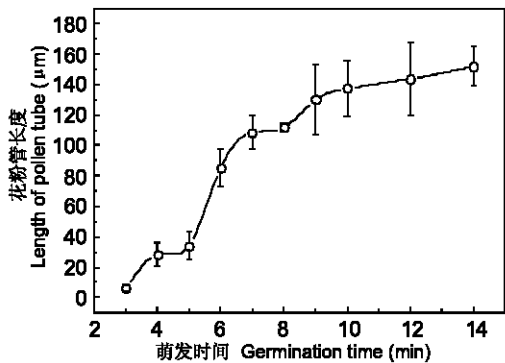


图 2 不同萌发时间水稻花粉管生长速度

Fig. 2 Growth speed of rice pollen tubes under different germination times

花粉管顶端区域仍未观察到明显的微丝结构。花粉萌发时间超过 10 min 后,花粉管在标记过程中极易破裂,因此我们没有观察到更长花粉管中的微丝分布状况。

有些花粉粒在萌发液中停留时间较长但仍不萌发,染色结果显示,这些花粉粒内肌动蛋白微丝在中央区域呈弥散不规则分布(图 3:F),或花粉粒内微丝数量较正常水合萌发的花粉少(图 3:G)。此外,在一些花粉粒萌发时间较长但花粉管生长缓慢的较

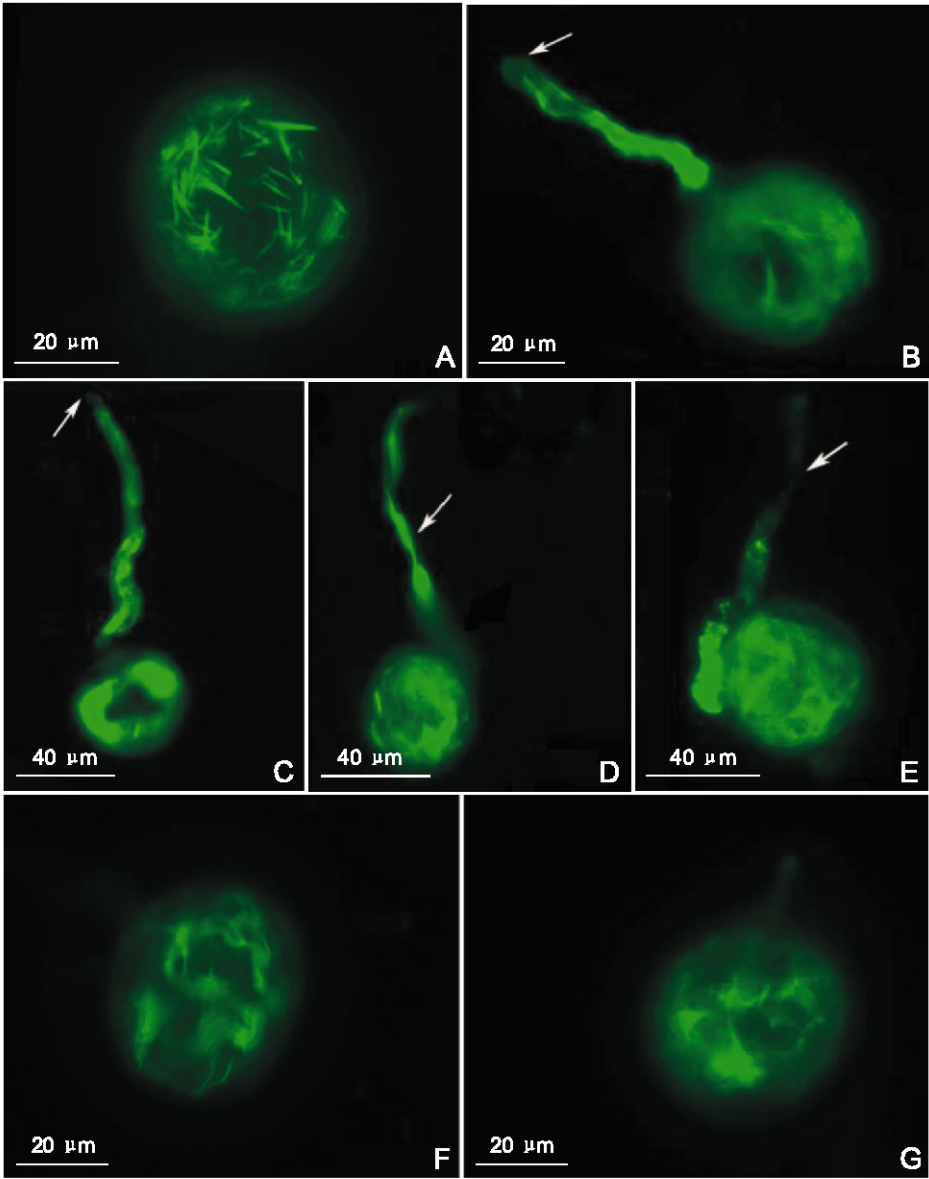
短花粉管中,仅在花粉粒及与萌发孔接近的花粉管部分观察到束状分布的微丝(图 3:E),而在花粉管的其他部分则观察不到明显荧光(图 3:E,箭头)。这些结果显示,花粉萌发和花粉管正常生长与微丝的形态和分布有直接关系。

3 讨论

3.1 水稻花粉离体萌发特征及花粉管微丝标记方法

陈士强等^[10]对水稻花粉离体萌发过程的研究表明,水稻花粉离体萌发很快,花粉管的生长速度可达 1400 ~ 1600 $\mu\text{m}/\text{h}$,花粉管长度超过花粉粒直径的 3 倍时顶端便开始破裂,其活体荧光观察结果表明花粉管约在授粉后 30 min 伸入子房。我们测量得出的花粉管平均生长速度为 600 ~ 1500 $\mu\text{m}/\text{h}$,这可能是测量所选取的萌发时间段不同或供试水稻品种不同所致。我们的实验显示,多数水稻花粉在萌发 12 min 时花粉管长度达 140 μm 左右顶端便开始破裂释放内含物而停止生长,可能是现有的离体萌发条件不能完全模拟活体环境所致。

花粉管微丝标记和观察的基础是获得良好的花粉离体萌发体系,水稻花粉在液体培养基中容易破



A. 水合花粉,示梭形微丝束组成的微丝网络; B. 萌发花粉,示花粉管中肌动蛋白微丝; C. 萌发 10 min 的花粉(花粉管长度 100 μm),示花粉管内肌动蛋白微丝; D. 花粉管内呈螺旋盘绕分布的粗束状肌动蛋白微丝; E. 萌发 10 min 的花粉,示花粉管内微丝的不正常分布; F. 水合花粉,示弥散分布的微丝; G. 水合后未萌发的花粉,示微丝数量较少。
A. Hydrated pollen grain, the microfilaments consist a network with many short fusiform bodies; B. Pollen germination, the distribution of microfilaments in the shorter pollen tube; C. The distribution of microfilaments when pollen tube length was about 100 μm after germination 10 min; D. The thick bundles of microfilament spiral coil in some pollen tubes; E. Abnormal distribution of microfilaments in the pollen tube after germination 10 min; F. Hydrated pollen grain, the microfilaments were diffuse in pollen; G. The number of microfilament is significantly less in certain non-germination pollen.

图 3 水稻花粉萌发过程中花粉及花粉管内微丝骨架分布

Fig. 3 Distribution of microfilaments in rice pollen and pollen tube during germination

裂,之前王胜华等^[11]在水稻,朱展望等^[12]在小麦花粉离体萌发研究中,通过加入与蔗糖适当配比的 PEG₄₀₀₀,减少萌发过程中花粉管的破裂。但我们在预备实验中发现培养基中添加 PEG₄₀₀₀ 对供试水稻花粉萌发率并无促进作用,相反在添加 PEG₄₀₀₀ 后花粉管顶端更易破裂。此外,PEG₄₀₀₀ 在清洗过程中

难以彻底洗脱会造成严重的荧光背景干扰,因此,用于水稻花粉管荧光染色的离体萌发体系中不宜添加 PEG₄₀₀₀。荧光素标记的鬼笔环肽染色方法是利用花粉离体萌发体系标记微丝的常用技术,但不同实验体系中材料的固定方法、荧光染料的配制等都可能影响微丝的标记和观察效果。Traas 等^[13]的研

究表明强烈的醛固定方法对肌动蛋白微丝有严重的破坏作用,之后 Pierson 等^[8]的研究表明 DMSO 可以促进花粉对荧光染料的通透性,用 DMSO 处理代替常规的化学固定能获得更清晰的微丝结构。我们的实验采用非固定、DMSO 渗透的鬼笔环肽(FITC-Ph)染色方法,获得了较好的水稻花粉管中微丝的图象,表明这种方法能较好地保存水稻花粉管的微丝结构。

3.2 水稻花粉管内肌动蛋白微丝分布与花粉管生长的关系

Pierson 等^[8]在麝香百合水合后的花粉中观察到网络状微丝,许多研究者在姜花^[9]、洋水仙^[14]、玉米^[15]的花粉以及川百合去壁后的花粉原生质体^[16]中也观察到类似的微丝形态。本实验在水稻水合而未萌发的花粉粒中观察到的微丝也呈复杂的网络状分布,这些微丝网络由较短的梭形微丝束组成。梭形微丝束最早在英地百合属植物(*Endymion non-scriptus*)^[17]未萌发的花粉粒中观察到,之后在紫萼花粉萌发沟^[18]中也观察到类似形态的微丝束。因此,由梭形微丝束组成的微丝网络可能是植物水合花粉粒中肌动蛋白微丝的一种常见形态。我们观察到不能正常萌发的水稻花粉粒内的微丝在花粉粒中央区域呈弥散状态,且微丝数量较正常水合萌发的花粉粒少。我们推测水合后花粉粒内梭形微丝网络对花粉管的形成有重要作用。

前人在多种植物的研究中证实,花粉管内微丝束的排列和分布与花粉管伸长生长的方向一致^[9,18,19],水稻花粉管内肌动蛋白微丝也是沿花粉管纵轴排列,有时微丝束之间还出现交联,这种现象在之前对紫萼^[18]花粉管微丝分布的研究中有过报道。本实验中我们观察到微丝束随着花粉管的伸长而延长,主要分布在花粉管中前端,而在那些萌发时间较长但生长较短的花粉管中,微丝主要在花粉粒及近萌发孔处的花粉管内聚集,在花粉管近顶端部位则观察不到明显的微丝结构,表明花粉管的不正常生长与花粉管中微丝的形态和分布有关。此外,在有些花粉管内我们观察到呈螺旋盘绕的粗束状肌动蛋白微丝,我们推测可能是相互交联平行分布的微丝束的一种变化形式,也可能是花粉管染色后未能及时观察而在染色液中停留时间过长所致。

在花粉管的顶端极性生长研究中,其顶端是否存在微丝结构一直是存有争议的问题。早期对烟草

等植物花粉管的研究表明微丝在花粉管顶端形成浓密的网络^[20]。而 Miller 等^[21]对百合花粉管的研究发现花粉管顶端并不存在明显的微丝结构,他们认为之前在某些植物中观察到的微丝骨架可能是化学固定引起的假象。之后李岩等^[22]利用免疫荧光定位及荧光染色法对百合花粉管内微丝与微管的双重标记结果显示,花粉管顶端未见明显的微丝束,但存在浓密的微管结构。我们的研究结果显示,水稻花粉管生长过程中其顶端也未见明显的微丝结构,从而支持花粉管顶端不存在微丝束的观点。

参考文献:

- [1] Mascarenhas J. Molecular mechanism of pollen tube growth and differentiation [J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 1303-1314.
- [2] Tang X, Hepler P K, Scordilis S P L. Immunochemical and immunocytochemical in identification of myosin heavy chain polypeptide in Nicotiana pollen tubes [J]. *J Cell Sci*, 1989, 92: 569-574.
- [3] Cai G, Moscatelli A. Cytoskeleton organization and pollen tube growth [J]. *Trends Plant Sci*, 1997, 2(3): 86-91.
- [4] Asada T, Colling D. Molecular motors in higher plants [J]. *Trends Plant Sci*, 1997, 2(1): 29-37.
- [5] Geitmann A, Snowman B N, Emons A M C, et al. Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 239-251.
- [6] 杨弘远. 水稻生殖生物学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005: 45-52.
- [7] Liu H Y, Xu C G, Zhang Q F. Male and female gamete abortions, and reduced affinity between the uniting gametes as the cause for sterility in an indica/japonica hybrid in rice [J]. *Sex Plant Reprod*, 2004, 17: 55-62.
- [8] Pierson E S. Rhodamine-phalloidin staining of F-actin in pollen after dimethylsulphoxide permeabilization [J]. *Sex Plant Reprod*, 1988, 1: 83-87.
- [9] 徐是雄, 叶秀舜. 姜花花粉萌发时花粉和花粉管内微丝结构变化的共焦镜观察 [J]. *植物学报*, 1993, 35(2): 813-818.
- [10] 陈士强, 王忠, 刘满希. 水稻花粉萌发及花粉管生长动态 [J]. *中国水稻科学*, 2007, 21(5): 513-517.
- [11] 王胜华, 陈放, 周开达. 水稻花粉离体萌发 [J]. *作物*

- 学报,2000,26(5): 609-612.
- [12] 朱展望,张改生,牛娜. 小麦花粉的离体萌发研究[J]. 麦类作物学报,2007,27(1): 12-15.
- [13] Traas J A, Doonan J H, Rawlins D J, et al. An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cell and associates with the dividing nucleus[J]. *J Cell Biol*, 1987, 105: 387-395.
- [14] 徐是雄,李春贵,朱激. 洋水仙花粉和花粉原生质体中肌动蛋白微丝的共焦显微镜观察[J]. 植物学报, 1993,35(1): 12-19.
- [15] 周嫦,杨弘远,徐是雄. 玉米花粉与唐菖蒲花粉原生质体中肌动蛋白微丝的荧光显微镜观察[J]. 植物学报, 1990,32(9): 657-662.
- [16] 徐霞,任海云. 微丝骨架动态参与花粉萌发的研究[J]. 植物资源与环境学报,2005,14(3): 7-11.
- [17] Heslop-Harrison Y M, Tiezzi Cresti A, Ciampolini F. Actin during pollen germination[J]. *J Cell Sci*, 1986,86: 1-8.
- [18] 朱激,李春贵,胡适宜. 用非固定的荧光探针方法观察紫萼花粉管肌动蛋白纤丝的形式[J]. 植物学报, 1991,33(1): 1-6.
- [19] Li W, Yi M L, Yan L. Comparison of F-actin fluorescent labeling methods in pollen tube of *Lilium davidii* [J]. *Plant Cell Rep*, 2005,24: 266-270.
- [20] Derksen J, Rutten T, Amstel T V, et al. Regulation of pollen tube growth[J]. *Acta Bot Neerl*, 1995,44(2): 93-119.
- [21] Miller D D, Lancelle S A, Hepler P K. Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips[J]. *Protoplasma*, 1996,195: 123-132.
- [22] 李岩,阎隆飞,徐是雄. 百合花粉及花粉管内微丝和微管的分布[J]. 植物学报, 1998,40(10): 890-894.

(责任编辑:王豫鄂)

书 讯

《水华蓝藻生物学》一书由藻类学家胡鸿钧研究员编著,已于2011年4月下旬由科学出版社出版。这是国内第一部有关水华蓝藻的综合性参考书。

该书共分为9章,较系统地论述了水华蓝藻的形态、细胞结构、分类、生态、毒素种类、毒性、毒理、分子生物学的研究概况以及蓝藻水华发生机理。共收录整理了国内外已报道的水华蓝藻26属89种。根据2009年最新研究,将水华蓝藻中种类最多的属——鱼腥藻属分为了3个属,即:长孢藻属、大孢藻属和鱼腥藻属,鱼腥藻属为底栖类群。束丝藻属也根据最新观点,对过去的分类作了相应的调整,从而使该书的分类与国外分类系统一致。所有“目”、“科”、“属”、“种”均有形态特征描述和检索表,以及国内、外分布;每个物种附有一至多幅线条图,多数种还附有黑白或彩色照片。本书收录了全球所有已知水华蓝藻产生的毒素及生物活性物质的化学结构、毒理和产生毒素的水华蓝藻,同时还介绍了水华蓝藻产生的有潜在应用价值的生物活性物质和某些脂肪酸(二元酸等),并对已经开发成保健品的某些水华蓝藻作了简要的讨论。在水华蓝藻分子生物学研究概况一章,较系统地论述了相关的分子遗传学基础。在水华蓝藻发生机理一章,作者深入地分析了国内、外较流行的观点,提出了微囊藻水华发生的“信号假说”,供专家学者讨论。

本书可供高等院校生命科学学院、环境科学学院从事相关研究工作的教学和科研人员,以及环境科研、监测单位科技人员参考。

购书联系单位:北京科学出版社生命科学分社

联系电话:010-64012501;定价:68.00元