

# 拟南芥授粉前后花粉与乳突细胞的超微结构

马纪峰 王秀玲\*

(山东农业大学生命科学院, 作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018)

**摘要** 利用透射电子显微镜技术, 对自交亲和植物拟南芥授粉前后花粉和乳突细胞的超微结构进行了观察。发现花粉和柱头乳突细胞一些未经报道的超微结构特征, 可能与拟南芥花粉和乳突细胞的识别及花粉管生长相关: (1)成熟花粉中, 电子透明的、体积较大的小液泡(直径200~1 000 nm)呈均匀分布。部分小液泡内含有膜状结构物质, 推测可能是膜的一种储存形式, 与花粉萌发时大量出现的小囊泡有关。(2)花粉萌发时, 小液泡由均匀分布变为不均匀分布。(3)授粉前后的乳突细胞顶端和侧端的内壁上有明显的壁内突结构, 粘附的花粉开始萌发时的乳突细胞壁内突处可观察到直径50~100 nm的小泡存在, 表明拟南芥乳突细胞具有一定的分泌功能。

**关键词** 拟南芥; 授粉; 花粉; 乳突细胞; 超微结构

花粉和柱头的相互作用主要包括花粉的粘附、水合和花粉萌发及花粉管生长等过程<sup>[1]</sup>。长期以来以花粉和花粉管为研究对象的报道较多, 已经证明花粉壁中的蛋白、长链脂、多糖和花粉内微丝骨架、Ca<sup>2+</sup>等参与花粉与柱头的识别反应及花粉管的极性生长<sup>[2-8]</sup>。最近一些研究表明柱头在授粉过程中也起着重要作用, 柱头成熟时为花粉萌发提供必要的物质与识别信号<sup>[9-10]</sup>。拟南芥等植物的柱头为干柱头, 这类柱头的表面产生乳头状细胞(乳突细胞)。乳突细胞表面由一层角质层覆盖, 允许水和大分子物质穿过<sup>[11]</sup>。乳突细胞壁由内壁和外壁组成, 花粉释放某些酶来分解乳突细胞壁中的纤维素和半纤维素<sup>[12-13]</sup>, 使花粉管穿过外壁在乳突细胞内壁和外壁间生长<sup>[14]</sup>。目前, 对植物自交不亲和的机制研究较多, 对自交亲和的机理了解较少, 拟南芥为典型的自交亲和植物。本研究利用电子显微镜技术, 观察拟南芥授粉前后花粉和乳突细胞的超微结构特征, 以期为研究拟南芥等植物的自交亲和机制提供新的形态学方面的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以Columbia型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为实验材料。拟南芥生长在20~22 °C、湿度为60%~70%的温室内, 生长期光强为120 μmol/m<sup>2</sup>·s, 光周期为14 h光照和10 h黑暗。

### 1.2 实验方法

选生长健壮植株花序中间的花作为实验材料。首先, 选第2天要开放的花蕾, 小心去除雄蕊。第2天7:00~8:00进行人工授粉。分别于授粉15 min、30 min后取花, 去除花萼、花瓣和雄蕊, 迅速投入预冷的2.5%戊二醛4 °C固定, 再经1%锇酸后固定。未进行人工授粉的材料作为未授粉的成熟雌蕊在同样的条件进行固定。固定后的材料经乙醇系列脱水, 丙酮置换, Epon812包埋。经半薄切片定位后, 在Reichert-Jung切片机制成超薄切片, 柠檬酸铅-醋酸双氧铀双染, JEM-100S透射电镜观察和照相。

## 2 结果

### 2.1 授粉过程中花粉内小泡和多层膜结构

拟南芥成熟花粉粒呈长椭球形(图1A), 除含有丰富的线粒体和内质网等细胞器外, 细胞质内含有大量的电子透明、体积大小不一的(直径200~1 000 nm)小液泡呈均匀分布(图1A)。授粉15 min后, 粘附在乳突细胞上的花粉粒经过水合后, 开始萌发。水合后的花粉呈球形, 电子透明的小液泡仍然为均匀分布(图1B, 左侧花粉)。开始萌发的花粉内, 小液泡的分布发生变化, 在靠近萌发处的细胞质里基本观察不到

收稿日期: 2011-02-24 接受日期: 2011-04-06

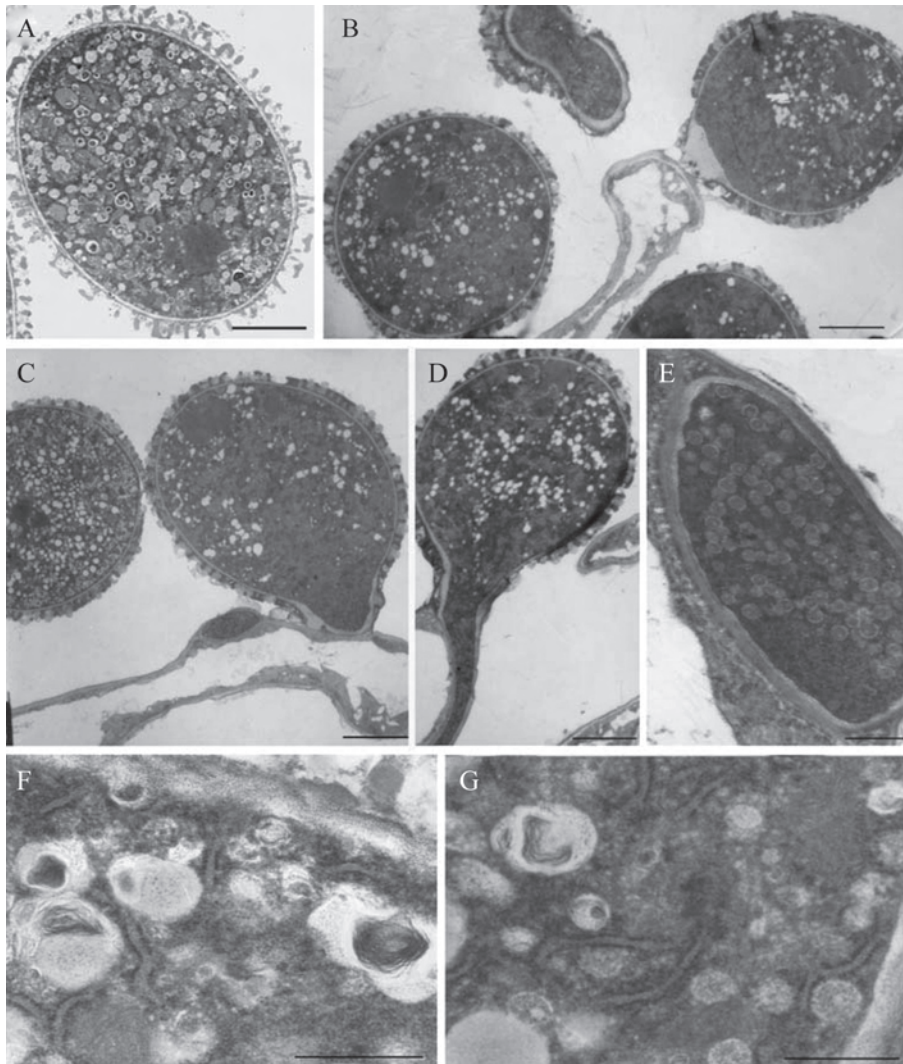
山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(No.BS2009SW035)和国家重大科学研究计划(No.2007CB947600)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0538-8247826, E-mail: xlwang@sdau.edu.cn

小液泡的存在(图1B, 右侧花粉)。已经萌发的花粉内, 在形成花粉管的部位密集分布大量电子密度中等、体积较小的分泌小泡(直径约100 nm)。电子透明的小液泡只分布萌发部位外的细胞质内(图1C, 右侧花粉)。授粉后30 min, 花粉管在乳突细胞的内壁和外壁间生长, 小液泡只存在于远离花粉管的花粉细胞

质内, 花粉管内没有这种小液泡存在(图1D和图1E)。

有些电子透明的小液泡内还存在多层膜结构物质。在水合前的成熟花粉中该结构较多(图1A和图1F)。水合后、萌发中的花粉细胞内有些小液泡中也含有这种膜状的结构物质(图1G)。推测这种多层膜结构物质可能是一种膜的储存形式, 与花粉萌



A: 一个水合前的成熟花粉粒, 电子透明的小液泡均匀分布在花粉细胞内; B, C: 授粉15 min后, 萌发中(B, 右侧的花粉粒)和已经萌发(C, 右侧的花粉粒)的花粉内电子透明的小液泡变成不均匀分布, 但水合后、萌发前的花粉(B、C中左侧的花粉粒)中这种小液泡仍为均匀分布; D, E: 授粉30 min后, 花粉管已经在乳突细胞内生长, 花粉纵切(D)和花粉管横切(E), 显示电子透明的小液泡只分布在花粉管之外的部位; F: 水合前的成熟花粉粒, 很多电子透明的小液泡内存在多层膜结构; G: 萌发后的花粉中有些小液泡内含有的膜结构物质; 图A~图D中Bar=5  $\mu\text{m}$ , 其余为500 nm。  
A: a mature pollen grain before hydration. Electron-transparent vacuoles were symmetrical distribution in pollen; B, C: pollen grains on stigmatic papillae 15 min after pollination. Showing the polar distribution of electron-transparent vacuoles in the pollens germinating (B, right pollen grain) and had germinated (C, right pollen grain). These vacuoles were still symmetrical presence in the pollens after hydration and before germination (left pollen grains in B and C); D, E: pollen tubes had elongated in stigmatic papillae cells 30 min after pollination. The pollen in vertical section, showing the polar distribution of these vacuoles (D). There were no vacuoles in the pollen tube (E, transverse section of pollen tube); F: abundant membrane structures are present in these vacuoles of mature pollen grain before hydration; G: these membrane structures can be found in some vacuoles of pollen after pollen germination; Bar= 5  $\mu\text{m}$  in A, B, C and D; 500 nm in E, F and G.

图1 拟南芥花粉粒的超微结构

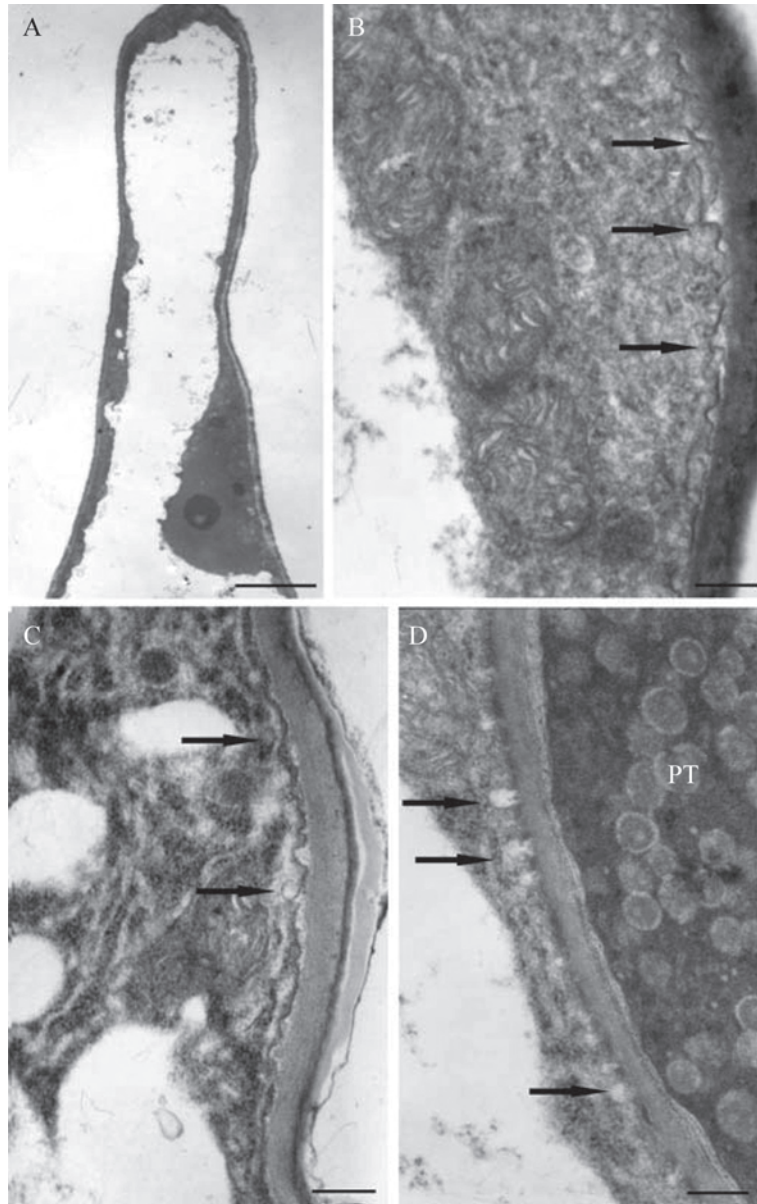
Fig.1 Ultrastructures of pollen grains of *Arabidopsis*

发时大量小泡的形成有关。

## 2.2 乳突细胞的壁内突结构

拟南芥在花开放前约两天左右柱头顶端分化出乳突细胞<sup>[15]</sup>。成熟柱头的乳突细胞细胞核位于细胞基部, 细胞中央被中央大液泡占据(图2A)。细胞质内含有丰富的线粒体和内质网等细胞器(图2B)。

在乳突细胞的顶端, 内壁向细胞内凸起形成壁内突结构(图2B)。授粉后15 min, 在黏附的花粉粒开始萌发的乳突细胞内, 在侧端的内壁上有壁内突结构, 且壁内突处可观察到直径50~100 nm的小泡存在(图2C)。授粉后30 min, 花粉管在乳突细胞内壁和外壁间生长, 与花粉管相邻的乳突细胞内壁上也有大量



A: 一个授粉前的乳突细胞; B: 细胞质含有丰富的线粒体等细胞器, 箭头示乳突细胞顶端内壁上的壁内突; C: 授粉后15 min, 粘附在乳突细胞上的花粉粒正在萌发中, 乳突细胞壁内突处出现50~100 nm的小泡(箭头); D: 授粉后30 min, 花粉管(PT)已经进入乳突细胞内壁和外壁间生长, 乳突细胞细胞质无解体特征, 侧端的内壁上有壁内突结构(箭头)。图A中Bar=5  $\mu\text{m}$ , 其余为200 nm。

A: a stigmatic papillae cell before pollination; B: the wall ingrowths on inner wall layer (arrows) and abundant organelles such as mitochondria in the cytoplasm; C: 50~100 nm vesicle (arrows) are present among these wall ingrowths of the stigmatic papillae when the adhered pollen grains are germinating 15 min after pollination; D: The papillae cell is not degraded and wall ingrowths (arrows) are still observed on the inner wall where the pollen tube (PT) is present 30 min after pollination. Bar= 5 $\mu\text{m}$  in A, 200 nm in B, C and D.

图2 拟南芥乳突细胞的超微结构

Fig.2 Ultrastructures of stigmatic papillae cells of *Arabidopsis*



的壁内突存在(图2D)。这些结果表明这种壁内突结构在乳突细胞的内壁上普遍存在。

### 3 讨论

水合使花粉从一个非极性细胞转变为极性细胞, 细胞极性的建立是花粉粒被激活的表现<sup>[16]</sup>。目前还不知道极性信号是如何被感知并最终指导在单一位点形成花粉管的, 有报道认为可能是水、脂或离子作为信号分子<sup>[17-18]</sup>。在花粉萌发的部位钙离子浓度和微丝骨架呈极性分布, 并且该部位密布线粒体和分泌小泡<sup>[19-20]</sup>。一般认为这种分泌小泡含有胼胝质等花粉管壁的前体物质, 通过其分泌活动将这些物质在花粉管出现的部位沉积<sup>[19]</sup>。除这种分泌小泡呈极性分布外, 我们还观察到拟南芥花粉细胞质内电子透明的、体积大小不一的小液泡在花粉开始萌发时由均匀分布变为极性分布, 并且这种小液泡与分泌小泡的分布正好相反, 即小液泡只在远离萌发部位的细胞质内存在, 而在萌发处基本没有分布。小液泡由内质网膨大而成, 有报道在即将形成小液泡的内质网内有钙颗粒, 在已经形成的小液泡膜上也有特异吸附的钙颗粒<sup>[21]</sup>。并且花粉萌发时细胞内钙离子呈极性分布, 萌发部位具有较高的钙离子浓度<sup>[22]</sup>。根据我们的实验结果, 推测拟南芥花粉萌发时小液泡分布的改变可能与维持细胞内钙离子浓度梯度有关, 这一点需要进一步通过鉴定膜上的钙运输蛋白进行深入地研究。

我们以前在成熟的荞麦柱头细胞(无乳突细胞)壁上观察到壁内突结构的存在<sup>[23]</sup>。壁内突的存在表明细胞具有较强的分泌功能。荞麦柱头细胞上大量分布ATP酶也证明了这一点<sup>[23-24]</sup>。但乳突细胞存在壁内突结构尚未见报道。本研究在拟南芥授粉前后的乳突细胞顶端和侧端的内壁上都观察到了这种壁内突结构的存在。壁内突的存在大大增加了细胞质膜的面积, 有利于乳突细胞与外界进行充分的物质和信息交换, 表明在授粉过程中乳突细胞可能会通过分泌作用参与授粉过程中花粉和柱头的识别反应。在拟南芥花粉开始萌发的乳突细胞壁内突处, 50~100 nm小泡的存在进一步说明乳突细胞具有较强的分泌功能, 表明乳突细胞可能通过分泌某种(些)物质主动地参与花粉与柱头的识别过程。

### 参考文献 (References)

- 1 Hiscock SJ, Allen AM. Diverse cell signaling pathways regulate pollen-stigma interactions: The search for consensus. *New Phytol* 2008; 179(2): 286-317.
- 2 Zinkl GM, Zwiebel B, Grier DG, Preuss D. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: A species-specific interaction mediated by hydrophobic molecules in the pollen exine. *Development* 1999; 126(6): 5431-40.
- 3 Zinkl GM, Preuss D. Dissecting *Arabidopsis* pollen-stigma interactions reveals novel mechanisms that confer mating specificity. *Ann Bot* 2000; 85(Suppl A): 15-21.
- 4 Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer RL, Preuss D. Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 2000; 12(10): 2001-8.
- 5 Mayfield JA, Fiebig A, Johnstone SE, Preuss D. Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* 2001; 292(5526): 2482-5.
- 6 Swanson R, Edlund AF, Preuss D. Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 793-818.
- 7 Huang S, Blanchoin L, Chaudhry F, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *J Biol Chem* 2004; 279(22): 23364-75.
- 8 Wu Y, Yan J, Zhang R, Qu X, Ren S, Chen N, Huang S. *Arabidopsis* FIMBRIN5, an actin bundling factor, is required for pollen germination and pollen tube growth. *Plant Cell* 2010; 22(11): 3745-63.
- 9 Tung CW, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB. Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol* 2005; 138(2): 977-89.
- 10 Gao XQ, Zhu DZ, Zhang XS. Stigma factors regulating self-compatible pollination. *Front Biol* 2010; 5(2): 156-63.
- 11 Elleman CJ, Willson CE, Sarker RH, Dickinson HG. Interaction between the pollen tube and stigmatic cell wall following pollination in *Brassica oleracea*. *New Phytol* 1988; 109(1): 111-7.
- 12 Elleman CJ, Dickinson HG. Identification of pollen components regulating pollination-specific responses in the stigmatic papillae of *Brassica oleracea*. *New Phytol* 1996; 133(2): 197-205.
- 13 Suen DF, Wu SS, Chang HC, Dhugga KS, Huang AHC. Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: Potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. *J Biol Chem* 2003; 278(44): 43672-81.
- 14 Elleman CJ, Franklin-Tong VE, Dickinson HG. Pollination in species with dry stigmas: The nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol* 1992; 121(3): 413-24.
- 15 Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM. Early flower develop-

- ment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1990; 2(8): 755-67.
- 16 Edlund AF, Swanson R, Preuss D. Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell* 2004; 16(Suppl): 84-97.
- 17 Feijo JA, Malho R, Obermeyer G. Ion dynamics and its possible role during *in-vitro* pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 1995; 187(1-4): 155-67.
- 18 Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C. Lipids are required for directional pollen tube growth. *Nature* 1998; 392(6678): 818-21.
- 19 Johnson SA, McCormick S. Pollen germinates precociously in the anthers of *raring-to-go*, an *Arabidopsis* gametophytic mutant. *Plant Physiol* 2001; 126(2): 685-95.
- 20 Mazina S, Matveeva N, and Ermakov I. Determination of a position of a functional pore in the tobacco pollen. *Tsitologiya* 2002; 44(1): 33-9.
- 21 谢潮添, 魏冬梅, 田惠桥. 高等植物雄性不育的细胞生物学研究进展. *植物生理与分子生物学学报* 2006; 32(1): 17-23.
- 22 Gu YQ, Vernoud V, Fu Y, Yang Z. ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *J Exp Bot* 2003; 54(380): 93-101.
- 23 王秀玲, 高新起. 荞麦柱头和花柱的结构及ATP酶的超微细胞化学定位. *西北植物学报* 2002; 22(5): 1221-4.
- 24 高新起, 王秀玲. 荞麦亲和与不亲和授粉后柱头和花粉管中ATP酶的超微细胞化学定位. *实验生物学报* 2002; 35(1): 47-53.

## Ultrastructures of Pollen and Papillar Cell of *Arabidopsis* during Pollination

Ma Jifeng, Wang Xiuling\*

(College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Taian 271018, China)

**Abstract** We investigated the ultrastructures of pollen grains and stigmatic papillae cells before and after pollination of *Arabidopsis* by using transmission electron microscopy. We found some structures, not being reported previously, may be involved in the interaction between the pollen grains/tubes and the papillae cells. (1) In mature pollen grains, the electron-transparent vacuoles 200~1 000 nm are even distribution in cytosol, and some membrane structures are present in those vacuoles, especially the pollen before hydration. (2) The even distribution of vacuoles is changed to polar distribution after pollen germination. (3) Wall ingrowths were found in the inner wall of the papillar cells before and after pollination, which means papillar cells maybe function actively in pollination of *Arabidopsis*.

**Key words** *Arabidopsis*; pollination; pollen; stigmatic papillae; ultrastructure

Received: February 24, 2011 Accepted: April 6, 2011

This work was supported by Research Fund for the Outstanding Young Scientists Foundation Grant of Shandong Province (No.BS2009SW035) and Major Research Plan from Ministry of Science and Technology of China (No.2007CB947600)

\*Corresponding author. Tel: 86-538-8247826, E-mail: xlwang@sdau.edu.cn