

离体梨花柱 S-RNase 对自体花粉管超微结构变化的影响

刘珠琴¹, 张绍铃^{1*}, 徐国华²

(¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²江苏教育学院生物系, 南京 210013)

摘要: 采用透射电子显微镜研究了离体条件下‘今村秋’、‘丰水’梨花柱 S-RNase 对‘今村秋’花粉管生长过程中花粉管超微结构的影响。‘丰水’花柱 S-RNase 处理的‘今村秋’花粉管(异体, 亲和)和对照花粉管结构在生长过程中表现正常, 即花粉管顶端生长区域充满细胞质和细胞器, 结构完整, 花粉管壁上没有胼胝质层分布。而‘今村秋’花柱 S-RNase 处理的‘今村秋’花粉管(自体, 不亲和)超微结构随时间的延长出现衰退现象。处理 3 h 时, 自体花粉管内充满细胞质和细胞器, 结构完整, 但在花粉管的极顶端分泌小泡融合, 并且此区域的细胞壁比后部的薄; 处理 8 h 后, 细胞器出现一定程度的衰退现象, 线粒体膨大, 嵴减少或消失, 内质网膨大并包围在液泡和其它细胞器周围, 液泡融合并侵蚀周围的细胞质和细胞器; 到 24 h 时, 自体花粉管内线粒体、内质网等细胞器消失, 只有靠近花粉管前端有少量细胞质存在, 细胞壁增厚, 并且有一层厚厚的胼胝质层紧靠细胞壁。结果表明, 花柱 S-RNase 能引起自体花粉管的衰退, 从而抑制自体花粉管生长。

关键词: 梨; 自交不亲和性; S-RNase; 花粉管; 超微结构

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0841-06

Effect of Pear Stylar S-RNase on Self-pollen Tube Ultrastructure in V itro

LU Zhu-qin¹, ZHANG Shao-ling^{1*}, and XU Guo-hua²

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Department of Biology, Jiangsu Institute of Education, Nanjing 210013, China)

Abstract: The effects of pear stylar S-RNase on compatible and incompatible pollen tube ultrastructure *in vitro* were studied with transmission electron microscope. Ultrastructure of compatible pollen tube and control was natural during growth, i.e. cytoplasm and organelles filled tube growth tip and their configurations were intact. There was no callose along the cell wall. While ultrastructure of incompatible tube degenerated gradually followed by treatment time. After treated for 3 h incompatible tube was full of cytoplasm and organelles. There was no callose along the cell wall. But secreting vacuoles fused at the apex of tube and the cell wall was thinner than that of others. Eight hours after treatment mitochondria appeared swelling, cristae decreased or disappeared, ER dilated and wrapped around vacuoles and other organelles, vacuoles fused and swallowed cytoplasm and organelles. After 24 h, mitochondria and ER disappeared, only a little of cytoplasm laid near the tube tip and the shank nearly were empty. Cell walls became thicker and a layer of callose laid along the cell walls. The result hits pear stylar S-RNase could cause degeneration of incompatible pollen tube and inhibited incompatible tube growth.

Key words: Pear; Self-incompatibility; S-RNase; Pollen tube; Ultrastructure

花粉管作为被子植物受精过程中雄性生殖单位的载体, 携带和传递精细胞到达胚珠, 从而实现精

收稿日期: 2007 - 01 - 30; 修回日期: 2007 - 04 - 19

基金项目: 高校博士学科点专项科研基金资助项目 (B200523); 江苏省博士后科研资助计划项目 (0501004B)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: nnzsl@sina.com.cn)

卵结合，完成受精作用。因此，植物花粉管的形成和生长特点是细胞生物学工作者十分重视的研究方向 (Lancelle & Hepler, 1992; Derksen et al, 1995; de Win et al, 1996; Li et al, 1999; Anderson et al, 2002)。Franklin-Tong (1999) 及 Pierson和 Cresti (1992) 根据已有的研究结果对花粉管生长过程中的顶端结构作了概括。

植物自交不亲和性 (Self-incompatibility, SI) 是植物雌蕊的柱头或花柱识别自体花粉或 *S* 基因相同的异体花粉，并抑制其萌发或生长的一种特性。它使得自体受精不能实现，只有遗传组成不同的异体花粉才能完成受精 (Nasrallah, 1972)。

目前有关植物自交不亲和性机理的研究虽然已经深入到雌蕊自交不亲和 *S* 基因的克隆及其产物的表达特性、分离纯化及功能和花粉表达的 *F-box* 基因 (*SFB*) 的鉴定等分子机理研究，领域 (Takatama & Isogai, 2005; 吴华清等, 2005; McClure & Franklin-Tong, 2006)，但对自交不亲和性表达过程中花粉管超微结构的研究仅在矮牵牛 (de Nettancourt et al, 1973) 和罂粟科虞美人 (Geimann et al, 2004) 中有过报道。

梨是典型的配子体型自交不亲和性果树，花粉管在沿花柱向子房生长途中受到抑制而停止生长。关于梨花粉管超微结构的研究也仅见于 Uwate和 Lin (1980) 的报告，而有关花柱 *S-RNase* 对花粉管超微结构的影响到目前为止还未见报道。

作者在对梨自交不亲和性机理已有的研究基础之上进一步研究了梨花柱 *S-RNase* 对自体 and 异体花粉管超微结构的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试材采自江苏省高邮市果树实验场的成龄结果梨树。采集开花前 1~2 d 的‘今村秋’ (Imamuraaki, *S* 基因型为 S_1S_6) 和‘丰水’ (Housui, *S* 基因型为 S_3S_5) 花蕾，切取花柱，称鲜质量后贮存于液氮中备用，同时收集‘今村秋’花粉，常温下干燥后 -20℃ 保存。

1.2 花柱 *S-RNase* 分离纯化、定量及纯度和活性的检测

参照 Hiratsuka等 (2001) 的方法，从梨花柱中分离纯化出花柱 *S-RNase*，经平衡透析后贮存于 -80℃ 冰箱中备用。

花柱 *S-RNase* 的定量参照 Bradford (1976) 的方法，纯度检测参照 Hiratsuka等 (2001) 的方法，活性测定参照 Brown和 Ho (1986) 的方法。

1.3 花粉培养

花粉萌发所用的培养基为 10% 的蔗糖，15% 的聚乙二醇 (PEG) 4000，0.01% H_3BO_3 ，0.03% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ，0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.01% KNO_3 溶解于 $20\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ MES 缓冲液后调 pH 至 6.5。

‘今村秋’和‘丰水’花柱 *S-RNase* 直接添加到液体培养基里，*S-RNase* 的终浓度均为 $1.25\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，而后接种‘今村秋’花粉，于 25℃ 黑暗条件下分别培养 3、8、24 h 后分别取样进行电镜取样。

以不添加任何花柱 *S-RNase* 的花粉培养基为对照。

1.4 电镜制片观察

参照王侯聪和杨善民 (1997) 的方法略加改动。将培养后的花粉用 $0.1\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 配置的 3% 戊二醛固定液固定 3 h 后，琼脂包埋，再于 3% 戊二醛固定液中 0℃ 下固定 24 h 后用锇酸固定 4 h，系列丙酮脱水，环氧树脂 Epon 812 渗透、包埋，LKB-V 型超薄切片机切片。切片厚度约 70 nm，醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色，JEM-1200EX 透射电镜观察拍照。

2 结果与分析

2.1 培养 3 h时自体 and 异体花粉管超微结构的变化

当花粉培养 3 h时, 花粉萌发, 长出花粉管, 管内细胞质均匀分布于自体 and 异体以及对照花粉管的顶端生长区域。

各种细胞器清晰可见。花粉管前端富含线粒体和内质网, 线粒体嵴清晰, 内质网形态结构正常。虽然分泌小泡 (直径约为 100 ~ 200 nm) 也富集在花粉管的顶端, 并且部分与花粉管壁融合 (图版, 1 ~ 3), 但在紧贴自体花粉管极顶端细胞壁处特别密集, 并且部分分泌小泡相互融合, 形成更大的液泡, 与花粉管壁融合。

异花和对照花粉管顶端区域的细胞壁分布较均匀, 花粉管壁上没有胼胝质层沉积 (图版, 1, 2), 但自体花粉管细胞壁分布不均匀, 极顶端细胞壁比花粉管后部的细胞壁薄, 花粉管内细胞壁上没有胼胝质层存在 (图版, 3)。

2.2 培养 8 h后自体 and 异体花粉管超微结构的变化

培养 8 h后, 异体花粉管的超微结构与对照的花粉管相差不大, 均具有丰富的线粒体和内质网。线粒体结构完整, 嵴清晰, 电子密度高 (图版, 4, 5); 内质网呈扁平状态, 且与花粉管的轴向平行 (图版, 6)。

而自体花粉管的超微结构与异体的完全不同, 出现了一定程度的衰退现象。线粒体发生膨大, 双层被膜消失, 内部变空, 有的仅有少量嵴残留或已经看不见内部嵴的存在 (图版, 7, 8); 花粉管中出现了显著加厚的内质网, 内质网槽库膨大, 有的形成不规则形状, 有的盘绕形成同心内质环, 并包围和消化一定的细胞器如液泡等 (图版, 9, 10); 贴壁的细胞质中充满了大小不等的液泡, 有的液泡膜变得不清晰, 相互融合, 有的细胞器濒临液泡边缘。有的液泡膜已经消失, 能明显看到液泡侵蚀周围细胞质和细胞器或与细胞壁融合的现象 (图版, 8)。

2.3 培养 24 h后自体 and 异体花粉管超微结构的变化

培养 24 h后, 对照和异体花粉管前端富含细胞质基质、直径约为 100 ~ 200 nm 的小泡和直径为 1 ~ 2 μm 的液泡, 这些大液泡可能是由分泌小泡聚合而成。另外花粉管前端还含有线粒体以及内质网, 并且细胞质中有少量的质体 (图版, 11, 12)。

自体花粉管与其它花粉管相比, 超微结构呈现出更深程度的衰退趋势。

花粉管前端只有少量的细胞质基质分布, 且只能在顶端看到少量的液泡, 线粒体、内质网等其它细胞器已经看不见, 而花粉管的亚顶端呈现电子透明区、空泡化; 自体花粉管的细胞壁也比异体的厚得多, 并且有厚厚的胼胝质层紧靠细胞壁 (图版, 13, 14)。

3 讨论

用从活体花柱中分离纯化出的 S-RNase来进行体外花粉处理, 能够克服活体条件下花柱组织结构 and 花粉管结构不易分清的缺点, 在离体培养中可以排除活体花柱中除 S-RNase以外的其它物质对花粉管超微结构的影响, 研究结果能够直接反映 S-RNase对自体花粉管结构影响的特点。

本研究表明, 自体 (添加自体花柱 S-RNase) 和异体 (添加不同品种花柱 S-RNase) 及对照 (不添加 S-RNase) 花粉管顶端区域的结构差异随处理时间而加大。异体花粉管的超微结构特点与对照相同, 细胞质均匀分布于花粉管的顶端生长区域, 内质网、线粒体以及分泌小泡等细胞器也分布于此区域, 且结构完整, 细胞壁上没有胼胝质层。该结果与 Franklin-Tong (1999) 报道的植物花粉管顶端区域的结构特点相似。

自体花粉管的超微结构变化有不同的特点, 随着花粉管生长时间的延长, 其顶端区域结构发生衰

退现象。主要表现在以下几个方面：

花粉管壁：在自体花柱 S-RNase处理初期（3 h），花粉管的细胞壁前端没有胼胝质沉积，但随着处理时间的延长（24 h），自体花粉管前端细胞壁明显比异体花粉管的厚，并且在花粉管细胞壁上形成一层厚厚的胼胝质层。Deamaley等（1999）在对欧洲油菜（*Brassica napus*）的研究中注意到，胼胝质的形成与花粉和柱头的亲和性有关，当花粉与柱头不亲和时，常易导致胼胝质的产生。Kuboyama和 Takeda（2000）也发现在两个没有亲缘关系的物种之间进行种间授粉时，也会导致花粉管壁中胼胝质的大量沉积。这些结果进一步表明了花粉管壁胼胝质层的形成可能是自体花粉管生长受到抑制的一个原因。

细胞质基质：随着培养时间的延长，自体花粉管内细胞质基质逐渐减少，直至 24 h时仅在花粉管前端少量存在，分析原因可能是花柱 S-RNase进入自交授粉的花粉管细胞质中与其中的一些物质发生相互作用，使细胞质中的内容物溶解，花粉管内出现空腔，而细胞质基质是真核细胞的重要结构成分，它能完成细胞质与环境、细胞核以及细胞器之间的物质运输、能量交换、信息传递等，很多重要的中间代谢反应也是在细胞质基质中进行的（丁明孝，1994）。因此自体花粉管内细胞质基质的减少也可能是其生长受到抑制的一个原因。

细胞器：培养一段时间后，自体花粉管内线粒体发生膨大、线粒体内嵴少量存在或者消失。线粒体作为细胞内重要的功能细胞器，它的结构状态若受到损伤，必然会引起其功能的失调，进而影响到整个细胞的稳态平衡（Selga et al，2005）；在自体花粉管生长过程中，液泡膜的部分或全部消失使细胞液中所含消化酶外溢，侵蚀周围的细胞质或细胞器；内质网的增生及其槽库扩张和融合常常包围并消化残存的细胞质和细胞器，产生自噬结构（Kerr et al，1972），加速细胞的衰亡。自体花粉管内细胞器结构的变化与动物及部分植物细胞发生细胞程序性死亡时细胞器的结构变化相似（Kwong et al，1999；彭远英等，2003），因而推测在梨自交不亲和性（自体）花粉管生长过程中也发生了细胞程序性死亡。

作者认为，梨自体花粉管生长过程中所发生的结构上的衰变是自体花粉管生长受到抑制的原因之一，且由于这种结构衰老与细胞程序性死亡的细胞学特点相似，其衰退过程可能是一种细胞程序性死亡的过程，但梨自体花粉管生长过程是否是细胞程序性死亡的过程还需要从生化等方面进一步验证。

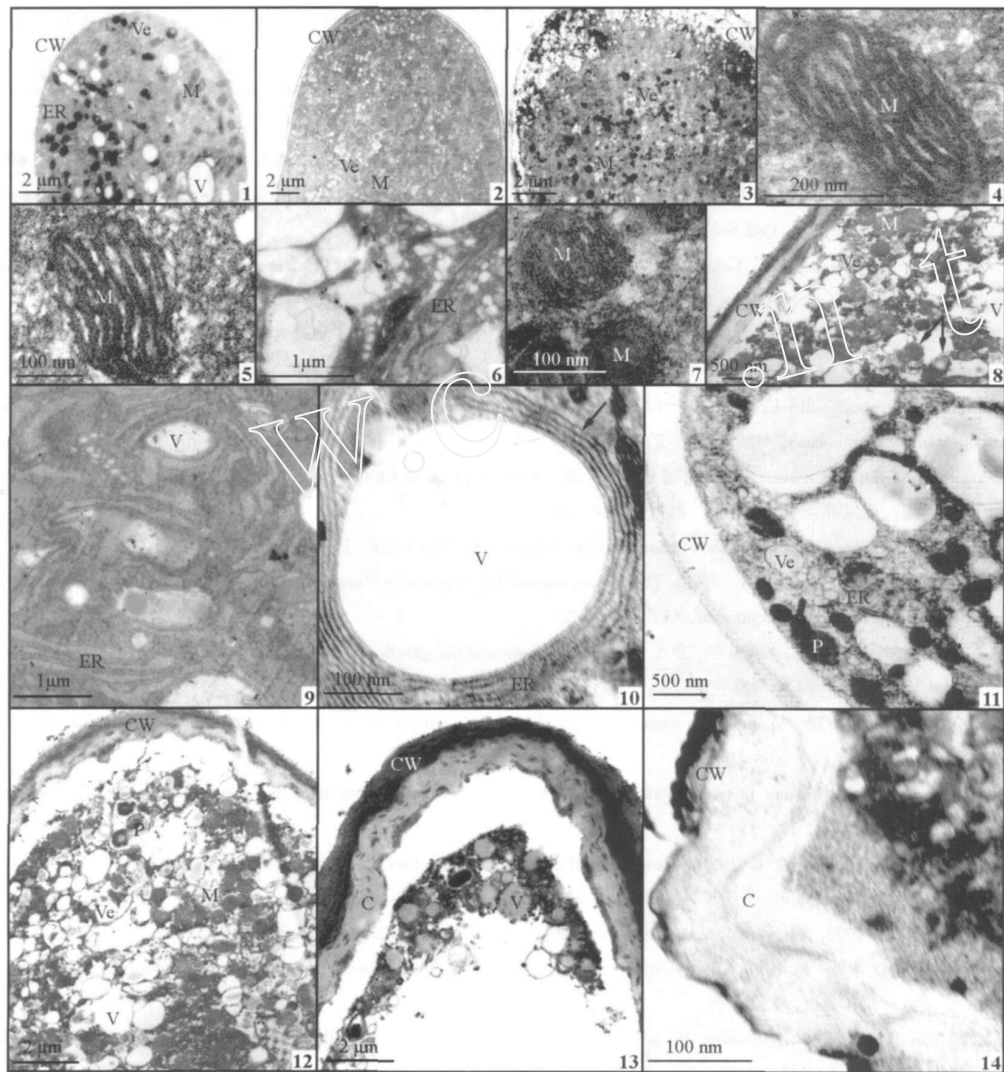
Explanation of plates:

1 - 3. Ultrastructure of pollen tubes 3 h after culture (1, 2. Ultrastructure of control and compatible pollen tubes was natural; 3. Self-incompatible pollen tubes, the cell wall was thinner than that of others, and secreting vacuoles specially accumulated and fused at their apexes).

4 - 10. Ultrastructure of pollen tubes 8 h after culture [4, 5. Control and compatible pollen tubes had intact mitochondria with cristae clarity and electron density in the matrix; 6. ERs were flat in compatible pollen tubes; 7. Swollen mitochondria in incompatible pollen tubes, cristae decreased or disappeared; 8. In incompatible pollen tubes, cristae of mitochondria disappeared. Vacuole membrane blurred or disappeared. Vacuoles swallowed cytoplasm and organelles or fused with cell wall (arrow); 9. ER cisternae in incompatible pollen tubes dilated and arranged in irregular shapes; 10. ERs in incompatible pollen tubes became concentric circularity and wrapped around vacuoles (arrow)].

11 - 14. Ultrastructure of pollen tubes 24 h after culture (11. Protoplasm, mitochondria, ERs, and plastids at apex of control pollen tubes; 12. Protoplasm, mitochondria, and ERs at apex of compatible pollen tube; 13. Only a little of protoplasm but no organelles such as mitochondria and ERs lay at apex of incompatible pollen tubes. Electron transparentized at subapex of tubes. A layer of callose lay along the cell wall; 14. Cell wall incassated in incompatible pollen tubes).

CW: Cell wall; M: Mitochondrion; V: Vacuole; Ve: Secreting vacuole; ER: Endoplasmic reticulum; C: Callose; P: Plastid



图版说明：

1~3. 培养 3 h 后花粉管的超微结构 (1, 2 对照和异体花粉管, 结构正常; 3 自体花粉管, 极顶端细胞壁比其后部薄, 分泌小泡特别密集, 有的相互融合)。

4~10. 培养 8 h 后花粉管的超微结构 [4, 5. 对照和异体花粉管内线粒体, 结构完整, 嵴结构清楚, 电子密集; 6 异体花粉管中内质网呈扁平状态; 7. 自体花粉管线粒体膨大, 嵴减少或消失; 8 自体花粉管线粒体内嵴消失, 液泡膜变得模糊不清或消失, 分泌小泡相互融合形成大的液泡, 包围在其它细胞器周围, 侵蚀周围的细胞质和细胞器或与细胞壁融合 (箭头处); 9 自体花粉管内质网膨胀成不规则形状; 10. 自体花粉管内质网成同心圆状包围在液泡周围 (箭头处)]。

11~14. 培养 24 h 后花粉管的超微结构 (11. 对照花粉管顶端区域富含细胞质基质, 含有线粒体、内质网、质体等细胞器; 12. 异体花粉管顶端区域富含细胞质基质、线粒体等细胞器; 13. 自体花粉管顶端只有少量的细胞质基质存在, 但没有线粒体、内质网等细胞器, 在花粉管的亚顶端呈现电子透明区, 细胞壁上有一层厚厚的胼胝质层; 14. 自体花粉管细胞壁厚)。

CW: 细胞壁; M: 线粒体; V: 液泡; Ve: 分泌小泡; ER: 内质网; C: 胼胝质; P: 质体。

References

- Anderson J R, William S, Bedinger P. 2002. 2, 6-dichlorobenzonitrile, a cellulose biosynthesis inhibitor, affects morphology and structural integrity of petunia and lily pollen tubes. *J. Plant Physiol*, 159: 61 - 67.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 - 254.
- Brown P H, Ho T H D. 1986. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid. *Plant Physiol*, 82: 801 - 806.
- de Nettancourt D, Devreux M, Bozzini A, Cresti M, Pacini E, Sarfatti G. 1973. Ultrastructural aspects of the self-incompatibility mechanism in *Lycopersicon peruvianum* Mill. *J. Cell Sci*, 12: 403 - 419.
- de W in A H N, Knuiman B, Pierson E S, Geurts H, Kengen H M P, Derksen J. 1996. Development and cellular organization of *Pinus sylvestris* pollen tubes. *Sex Plant Reprod*, 9: 93 - 101.
- Deamaley J D W, Clark K M, Heath I B, Lew R R, Goring D R. 1999. Neither compatible nor self-incompatible pollinations of *B. russica napus* involve reorganization of the papillar cytoskeleton. *New Phytol*, 141: 199 - 207.
- Derksen J, Rutten T L, Lichtscheidl I L, de W in A H N, Pierson E S, Rongen G M. 1995. Organelle distribution, exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *Protoplasma*, 188: 267 - 276.
- Ding Ming-xiao. 1994. Cytoplasm matrix. *Bulletin of Biology*, 29 (8): 9 - 11. (in Chinese)
- 丁明孝. 1994. 细胞质基质. *生物学通报*, 29 (8): 9 - 11.
- Franklin-Tong V E. 1999. Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell*, 11: 727 - 738.
- Geimann A, Franklin-Tong V E, Emons A C. 2004. The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* pollen causes early and striking alterations to organelles. *Cell Death and Differentiation*, 11: 812 - 822.
- Hiratsuka S, Zhang S L, Nakagawa E, Kawai Y. 2001. Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S- γ protein in the Japanese pear. *Sex Plant Reprod*, 13 (4): 209 - 215.
- Kerr J, Wyllie A, Currie A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239 - 257.
- Kuboyama T, Takeda G. 2000. Genomic factors responsible for abnormal morphology of pollen tubes in the interspecific cross *Nicotiana tabacum* \times *N. glauca*. *Sex Plant Reprod*, 12: 333 - 337.
- Kwong J, Choi H L, Huang Y, Chan F L. 1999. Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. *Cell Tissue Res*, 298: 123 - 136.
- Lancelle S A, Hepler P K. 1992. Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma*, 167: 215 - 230.
- Li H, Bacic A, Read S M. 1999. Role of a callose synthase zymogen in regulating wall deposition in pollen tubes of *Nicotiana glauca*. *Planta*, 208: 528 - 538.
- McClure B A, Franklin-Tong V. 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta*, 224: 233 - 245.
- Nasrallah M E. 1972. Genotype, protein, phenotype relationships in self-incompatibility of *B. russica*. *Genet Res*, 20: 151 - 160.
- Peng Yuan-ying, Peng Zheng-song, Yu Ke-fang. 2003. Changes in apoptotic cell ultrastructure. *Chinese Journal of Cell Biology*, 25 (5): 280 - 283. (in Chinese)
- 彭远英, 彭正松, 喻可芳. 2003. 凋亡细胞的超微结构变化. *细胞生物学杂志*, 25 (5): 280 - 283.
- Pierson E S, Cresti M. 1992. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *Int Rev Cytol*, 140: 73 - 125.
- Selga T, Selga M, Pavla V. 2005. Death of mitochondria during programmed cell death of leaf mesophyll cells. *Cell Biology International*, 29: 1050 - 1056.
- Takayama S, Isogai A. 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 467 - 489.
- Uwate W J, Lin J. 1980. Cytological zonation of *P. avium* L. pollen tubes *in vivo*. *J. Ultrastruct Res*, 71 (2): 173 - 184.
- Wang Hou-cong, Yang Shan-min. 1997. Ultrastructure of *Vicia faba* pollen germination *in vitro*. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 36 (1): 153 - 157. (in Chinese)
- 王侯聪, 杨善民. 1997. 蚕豆花粉体外萌发的超微结构观察. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 36 (1): 153 - 157.
- Wu Hua-qing, Zhang Shao-ling, Wang Hong-tao, Qu Hai-yong, Liu Zhao-long. 2005. Self-pollen recognition and rejection in flowering. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 25 (3): 593 - 606. (in Chinese)
- 吴华清, 张绍铃, 王洪涛, 屈海泳, 刘招龙. 2005. 高等植物自花花粉的识别与拒绝. *西北植物学报*, 25 (3): 593 - 606.