

# 微丝骨架动态参与花粉萌发的研究

徐霞<sup>1</sup>, 任海云<sup>2</sup>

(1. 南京医科大学细胞生物学与医学遗传学系, 江苏南京 210029; 2. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

**摘要:** 利用改进的 Alex-phalloidin 活细胞染色方法和激光共聚焦显微镜技术, 观察川百合 (*Lilium davidii* Duch) 花粉原生质体极性形成及萌发过程中微丝骨架的列阵变化。结果表明, 花粉原生质体从贮存状态, 经过水合、极性形成至萌发花粉管, 其微丝结构从短小的梭形体, 经过形成均匀的网状结构、向细胞边缘汇集的平行排列的束状结构, 逐渐变成多层连续环绕细胞的微丝束结构。用酪氨酸磷酸酶抑制剂苯肼化氧 (PAO) 处理花粉原生质体, 在微丝的汇合处, 肌动蛋白聚集成小的团块, 花粉的萌发受到抑制; 而利用酪氨酸磷酸酶抑制剂 genistein 处理细胞, 微丝结构的列阵变化与对照相似。结果说明, 在川百合花粉萌发过程中, 有某种酪氨酸磷酸酶参与了反应。

**关键词:** 微丝骨架; 花粉原生质体; PAO; 酪氨酸磷酸化

**中图分类号:** Q944.42; Q945.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)03-0007-05

**Study on pollen germination regulated by dynamics of actin cytoskeleton** XU Xia<sup>1</sup>, REN Hai-yun<sup>2</sup>  
(1. Department of Cell Biology & Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(3): 7-11

**Abstract:** The formation of the polarity of *Lilium davidii* Duch pollen protoplast and the dynamics of actin cytoskeleton were observed by non-fixation, Alex-phalloidin probing and confocal laser scanning microscopy. The results showed that the protoplast obtained from stored pollen contained the numerous crystalline fusiform bodies to constitute a storage form of actin. When stored pollen was hydrated, the actin cytoskeleton in the protoplast formed a fine network spreading uniformly. In the process of polarity formation and germination of pollen protoplast, actin filaments marshaled slowly to the brim, and then formed multilayer continuous actin bundles surrounding the cell. Furthermore, during the process of pollen germination, pollen was not sensitive to genistein, the inhibitor of tyrosine kinases, but another inhibitor of tyrosine phosphatase, phenylarsine oxido (PAO), can effectively disturbed pollen germination. When the pollen protoplast was treated with PAO, the actin gathered into a little mass at actin filaments junction, the pollen germination was inhibited. The results show that some tyrosine phosphatase is involved in pollen germination.

**Key words:** actin cytoskeleton; protoplast; PAO; tyrosine phosphorylation

花粉的萌发和花粉管的生长包含许多复杂的过程。早期利用化学固定染色方法所得到的观察结果显示, 微丝骨架在花粉管顶端形成浓密的网络结构<sup>[1]</sup>; 利用冷冻固定结合电镜及显微注射方法获得的结果表明, 花粉顶端不存在明显的微丝结构<sup>[2]</sup>; 然而, 利用基因重组技术将 GFP-mTalin 转入活体植株显示出在花粉管顶端存在短的微丝片断<sup>[3]</sup>。这些相互矛盾的结果被认为是由于所采用的微丝标记方法不同而造成的。尽管不同方法均有各自的缺陷, 但活细胞染色观察仍为研究者所青睐。

有研究表明, 蛋白质的可逆磷酸化参与了花粉萌发和花粉管生长过程的调节;  $Ca^{2+}$  依赖性蛋白激

酶最早被发现为花粉萌发与花粉管生长所必需<sup>[4]</sup>; MAPKs 也被发现参与烟草花粉的水合过程<sup>[5]</sup>; 最近的研究表明, 肌动蛋白解聚因子 ADF/cofilin 通过其第 6 位丝氨酸磷酸化作用调节其与肌动蛋白的结合和微丝解聚活性, 从而影响花粉管的极性生长<sup>[6]</sup>。但有关蛋白质酪氨酸磷酸化作用参与花粉萌发和花粉管生长调节的研究未见报道。

去壁的花粉原生质体很容易吸收染料及药物,

收稿日期: 2005-04-27

作者简介: 徐霞(1979-), 女, 江苏泰州人, 硕士, 助教, 主要从事肿瘤细胞生物学的研究。

在适宜的条件下还能萌发出正常的花粉管<sup>[7]</sup>。本文以川百合花粉原生质体为材料,以微量 DMSO 为渗透剂、Alex-phalloidin 为探针的荧光标记并结合共聚焦显微镜技术,研究了蛋白质酪氨酸磷酸化作用参与花粉原生质体在极性形成、花粉管萌发及花粉管生长过程中微丝骨架的列阵变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

川百合 (*Lilium davidii* Duch) 成熟花粉 2003 年采自兰州郊区,风干后 -20℃ 保存,备用。

### 1.2 试剂

葡聚糖硫酸钾 (potassium dextran sulfate, PDS, 上海华顺), 纤维素酶 (cellulase, Onozuka R-10, Serva, Japan), 果胶酶 (pectinase, Serva), 磷酸缓冲液 ( $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖、0.1% PVP, pH 5.8), genistein (Sigma), 苯砷化氧 (phenylarsine oxido, PAO, Sigma)。

### 1.3 花粉原生质体的分离纯化与培养

取 0.1 g 花粉,搅拌除脂,用 400 目不锈钢滤网过滤,并将花粉转入装有 2 mL 酶液、直径为 5 cm 的培养皿中。酶液含 0.5% 葡聚糖硫酸钾、1.5% 纤维素酶和 1.5% 果胶酶,由改良 White 培养液配制, pH 5.8。29℃ 黑暗中水浴 3 h。取酶解产物,以  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清液。用磷酸缓冲液配制 24% 的 Percoll 梯度溶液,将原生质体平铺于液面上,  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  水平离心 5 min,取夹层处白色原生质体层,重新置于 Percoll 梯度溶液中,重复该步骤,至原生质体纯度达 90% 以上。将洗净的原生质体置于改良 White 培养液 (含  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA) 中培养。培养的原生质体密度为  $10^4 \sim 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 1.4 染色方法

花粉原生质体微丝的染色方法参照 Pierson 方法<sup>[1]</sup>。材料不经固定,取 40  $\mu\text{L}$  培养的原生质体置 0.5 mL 离心管中,加 20  $\mu\text{L}$  透膜液 (透膜液由蒸馏水配置,含  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EGTA,  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01% NP-40, 1.5% DMSO,  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖, pH 6.9), 再加入 10  $\mu\text{L}$  终浓度为 60

$\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Alex-phalloidin (由改良 White 培养液配制, pH 6.9), 黑暗中染色 8 ~ 10 min。用双面胶在载玻片上制备流动小室,将反应体系注入流动小室中,待观察。

### 1.5 原生质体处理

genistein 处理:将纯化的原生质体置于含  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  genistein (母液由 DMSO 配制) 的培养液中孵育 2 h,待观察。

PAO 处理:将纯化的原生质体分别置于含 3.5、10.0 和  $35.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO (母液由 DMSO 配制) 的培养液中孵育 2 h,待观察。

### 1.6 共聚焦显微镜观察

采用 Olympus IX 70 共聚焦显微镜,激发光为氩离子激光器 (FV-LA-AR), 488 nm, 10 mW。滤过片为 BA510 IF, 图像用软件 Fluoview 4.0 处理。

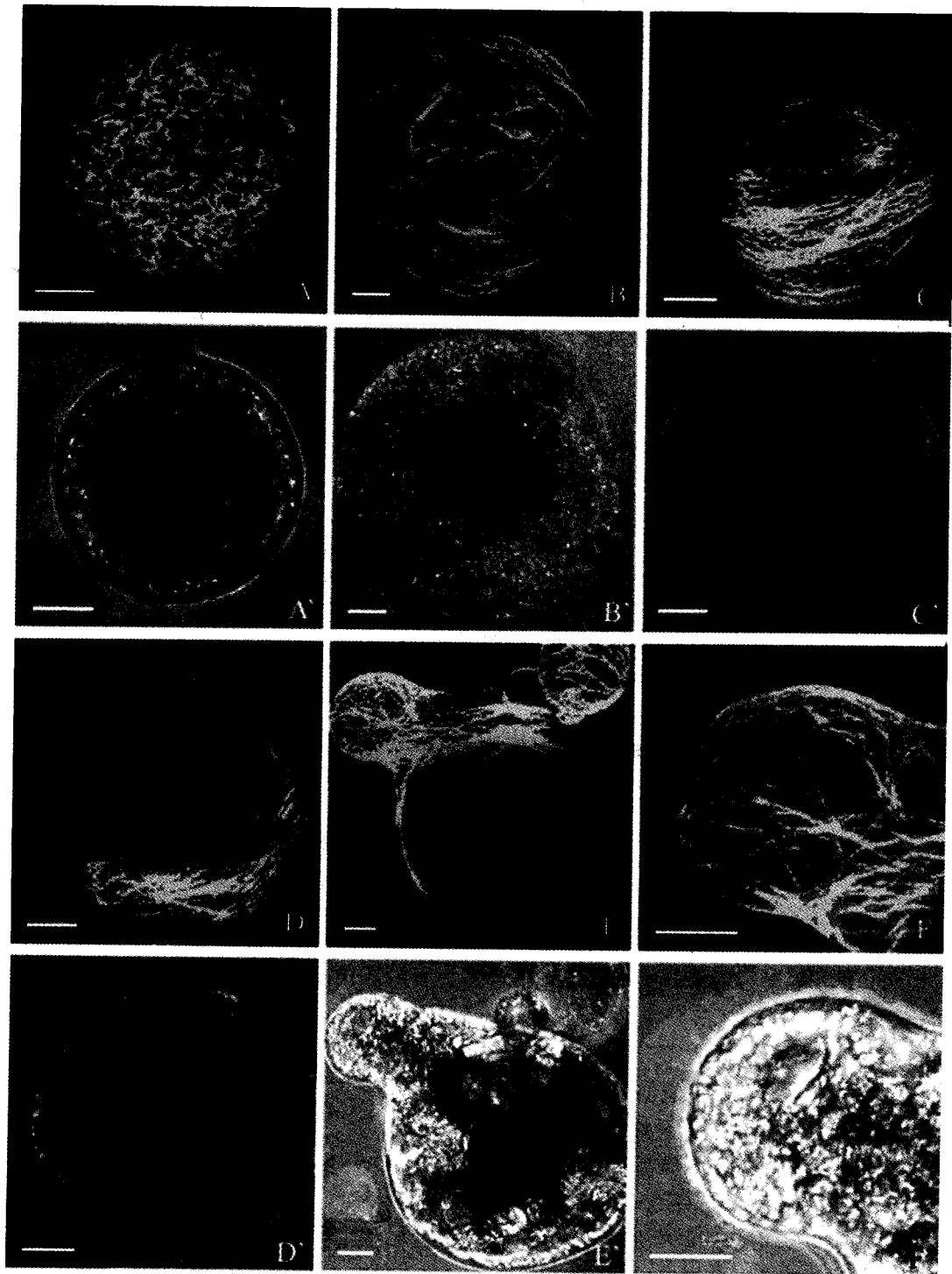
### 1.7 花粉处理及观察

川百合花粉经 4℃ 水合过夜,置花粉萌发液 (15% 蔗糖、0.01% 硝酸钾、0.02% 硫酸镁、0.01% 硼酸、0.03% 硝酸钙, pH 5.6) 中, 26℃ 黑暗培养 2 h 后观察。花粉萌发液中 genistein 浓度 (母液由 DMSO 配制) 分别为 5.0、15.0、25.0、35.0 和  $50.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , PAO 浓度 (母液由 DMSO 配制) 分别为 3.5、15.0、25.0、30.0 和  $35.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。普通显微镜观察计数并计算花粉萌发率。萌发率计算所取花粉数大于 200 粒,实验重复 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 原生质体极性形成及萌发过程中微丝的列阵变化

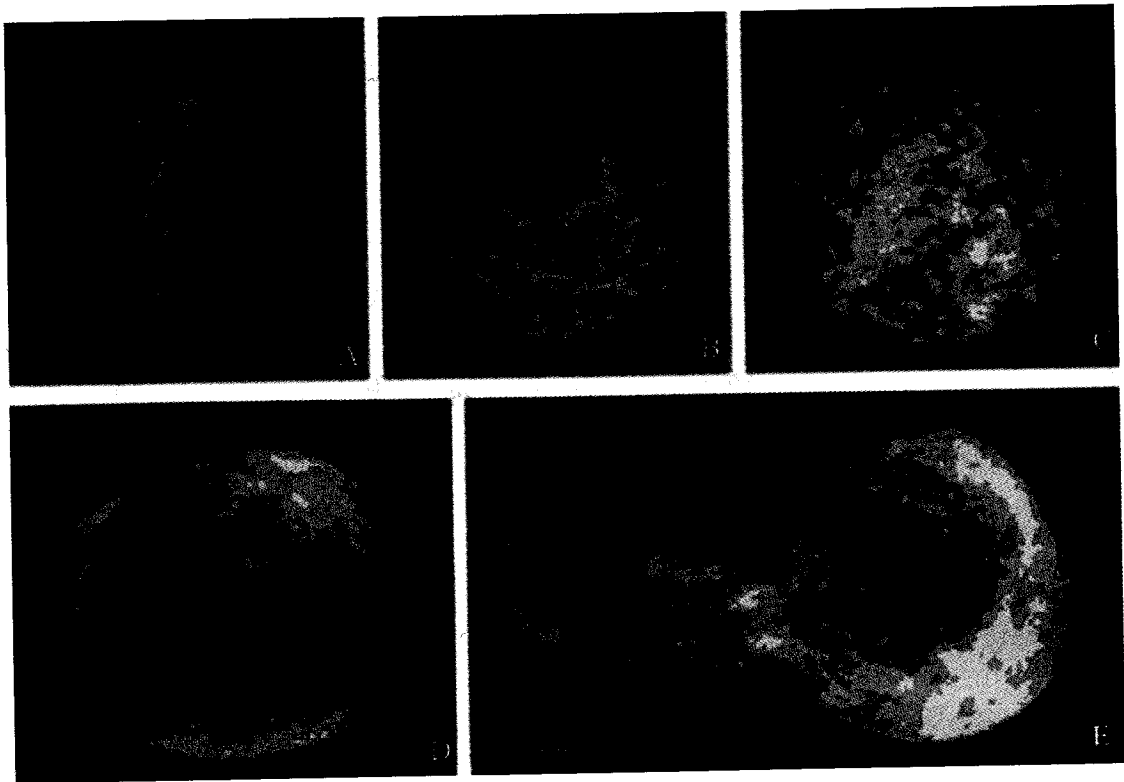
川百合花粉原生质体极性形成及萌发过程中微丝的列阵变化见图 1。未水合的花粉原生质体中微丝以短小的梭形体形式存在 (图 1-A); 经水合除壁后的原生质体中的微丝骨架呈紧密的均匀网状结构 (图 1-B); 培养的最初 2 h 内,微丝逐渐向边缘汇集,形成大的纺锤状结构,纺锤的两极指向细胞长轴的两极,而在中心处,则逐渐形成一个相对缺少微丝的区域 (图 1-C); 培养 2 ~ 4 h 后,原生质体内形成许多多层连续环绕排列的微丝束 (图 1-D); 培养 4 h 后,原生质体开始萌发,在花粉管刚突出时,微丝束形成的突起连续延伸至花粉管内,这时原生质体内的微丝仍是连续循环排列的 (图 1-E)。在



A - F: Alex-phalloidin 染色所显示的微丝结构 The actin cytoskeleton stained by Alex-phalloidin. A: 未水合的原生质体 Dehydrated protoplast; B: 水合刚除壁后的原生质体 Achieved protoplast after hydrated pollen; C: 培养 2 h 后的原生质体 The protoplast cultured for 2 h; D: 培养 3.5 h 后的原生质体 The protoplast cultured for 3.5 h; E: 培养 6 h 后花粉管内的微丝排列 The actin cytoskeleton array in pollen tube cultured for 6 h; F: 图 E 中花粉管顶端放大后显示的微丝骨架结构 Actin cytoskeleton networks in the magnified image of top of pollen tube in Figure E. A' - F': 图 A - F 的透射光图像 The penetrating images of Figure A - F. Bar = 10  $\mu$ m.

图1 微丝骨架在川百合花粉原生质体的极性重建及花粉管萌发过程中的列阵变化

Fig. 1 The reorganization of actin cytoskeleton during the formation of pollen protoplast polarity and pollen tube growth of *Lilium davidii* Duch



A:  $3.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO 处理 4 h 后的原生质体 The protoplast exposed to  $3.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO for 4 h; B:  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO 处理 4 h 后的原生质体 The protoplast exposed to  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO for 4 h; C:  $35.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO 处理 4 h 后的原生质体 The protoplast exposed to  $35.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO for 4 h; D:  $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  genistein 处理 2 h 后的原生质体 The protoplast exposed to  $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  genistein for 2 h; E:  $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  genistein 处理 6 h 后的原生质体 The protoplast exposed to  $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  genistein for 6 h. Bar =  $10 \mu\text{m}$ .

图 2 苯肼化氧(PAO)和 genistein 对川百合花粉原生质体中微丝骨架的影响  
Fig. 2 The effects of PAO and genistein on actin cytoskeleton in pollen protoplast of *Lilium davidii* Duch

花粉管最初形成时,原生质体内的微丝一直延伸至花粉管的顶部,在顶部依然有较浓密的微丝网络(图 1 - F)。

## 2.2 通过磷酸化作用调节微丝骨架影响花粉萌发

用酪氨酸磷酸酶抑制剂苯肼化氧(PAO)处理,对川百合花粉原生质体中微丝骨架有一定的影响。用  $3.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO 处理原生质体,微丝不能正常边缘化,微丝交叉点上肌动蛋白开始凝集(图 2 - A);用  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO 处理原生质体,肌动蛋白凝集现象更为明显(图 2 - B);用  $35.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PAO 处理原生质体,微丝动态变化发生极大改变,微丝交叉处的肌动蛋白凝成较大团块,团块间仍然由微丝相连(图 2 - C)。

酪氨酸磷酸酶抑制剂 genistein 对花粉原生质体的萌发无明显影响,用  $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  genistein 处理原生质体,原生质体仍然能形成正常的极性(图 2 - D);原生质体可以萌发,但花粉管生长异常,在伸长的花粉管内微丝呈点状、短棒状、片装等多种形态

(图 2 - E)。因此,酪氨酸磷酸酶的作用在花粉管中可能表现的较为明显。

利用上述使用的抑制剂对未去壁的川百合花粉进行处理并观察其对花粉萌发的影响,结果见表 1。

表 1 苯肼化氧(PAO)和 genistein 对川百合花粉萌发影响的比较  
Table 1 Comparison of influences of PAO and genistein on pollen germination of *Lilium davidii* Duch

| 抑制剂<br>Inhibitor | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$<br>Concentration | 萌发率/%<br>Germination rate |
|------------------|--|---------------------------|
| PAO              | 3.5  | 60                        |
|                  | 15.0   | 40                        |
|                  | 25.0   | 38                        |
|                  | 30.0   | 28                        |
|                  | 35.0   | 0                         |
| Genistein        | 5.0  | 60                        |
|                  | 15.0   | 58                        |
|                  | 25.0   | 57                        |
|                  | 35.0   | 55                        |
|                  | 50.0   | 52                        |

在一定浓度范围内,PAO(酪氨酸磷酸酶的抑制剂)能有效的抑制花粉萌发;而酪氨酸磷酸激酶抑制剂 genistein 在一定浓度范围内,对花粉萌发无明显影响。

### 3 讨 论

本文利用改进的 Alex-phalloidin 活细胞染色方法,使用比传统方法低 70% 的透膜剂处理花粉原生质体以减少化合物对细胞的损害作用,然后通过激光共聚焦显微镜对花粉原生质体极性形成及萌发过程中微丝骨架的列阵变化进行了详细的观察,观察到了花粉原生质体的极性形成过程中微丝结构的变化规律。这一结果为深入研究其极性形成的机理奠定了基础,并为植物细胞极性建立的研究提供了有价值的细胞模型。

研究表明,信号转导途径与细胞骨架之间存在一条双向的信号通路。一方面,细胞骨架蛋白的被磷酸化通常导致微丝骨架列阵的重排,从而导致细胞的形变和细胞极化;另一方面,细胞骨架的重排,又影响了上游信号因子的活性,从而参与信号传导,使信号向正确的方向传递。

PAO 和 genistein 是 2 种常用于研究酪氨酸磷酸化的化合物。PAO 是酪氨酸磷酸化酶的抑制剂,在药理学实验中,它能抑制蛋白质的酪氨酸去磷酸化;genistein 是酪氨酸磷酸激酶的抑制剂,其作用与 PAO 相反。本文利用上述 2 种特异性化合物抑制酪氨酸磷酸化酶的活性,记录了它们在川百合花粉萌发过程中所产生的作用并以此来研究酪氨酸磷酸酶的作用机制。实验结果说明:在萌发过程中,酪氨酸磷酸激酶的抑制剂(genistein)在一定浓度范围内对花粉的萌发无明显影响,在培养过程中,原生质体中微丝极性能够重建,原生质体可以萌发,但花粉管的生长异常,在伸长的花粉管内微丝呈点状、短棒状、

片装等多种形态,因此,酪氨酸磷酸激酶的作用在花粉管中可能表现的较为明显。而用酪氨酸磷酸酶抑制剂 PAO 处理花粉原生质体,微丝的动态变化发生了极大的改变,微丝交叉处的肌动蛋白已凝成较大的团块,团块间仍然由微丝相连,这些交叉点可能起着微丝组织中心的作用,而抑制剂的作用,可能改变了微丝骨架结合蛋白或其上游因子的活性,从而影响微丝极性,使原生质体萌发受到了抑制,此过程说明,有某种酪氨酸磷酸酶参与了极性形成的反应。但是,在花粉萌发过程中,蛋白质酪氨酸可逆磷酸化究竟以何种机制通过调节微丝骨架参与了花粉萌发的调控仍然是一个值得探讨的问题。

#### 参考文献:

- [1] Pierson E S. Rhodamine-phalloidin staining of F-actin in pollen after dimethylsulphoxide permeabilization[J]. Sex Plant Reprod, 1988(1): 83-87.
- [2] 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(2): 123-132.
- [3] Fu Y, Wu G, Yang Z B. Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-Actin controls tip growth in pollen tubes[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 152(4): 1019-1032.
- [4] Estruch J J, Kadwell S, Merlin E, et al. Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91(19): 8837-8841.
- [5] Wilson C, Voronin V, Touraev A, et al. A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen[J]. Plant Cell, 2003, 112(9): 2093-2100.
- [6] Foissner I, Grolig F, Obermeyer G. Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid [J]. Protoplasma, 2002, 220(1-2): 1-15.
- [7] 徐是雄. 百合花粉原生质体中肌动蛋白微丝的荧光共聚焦观察[J]. 植物学报, 1992, 34(12): 907-911.

(责任编辑:张垂胜)