

水芹花药发育中Ca²⁺分布特征研究

傅劭^{1*}, 许林¹, 李清源¹, 王湛昌¹, 陈宝林¹, 叶安华²

¹武汉市农业科学院林业果树研究所, 武汉430075

²武汉市农业科学院蔬菜科学研究所, 武汉430065

摘要:应用焦锑酸钾沉淀技术对水芹发育花药中的Ca²⁺分布特征和生理功能进行分析。在小孢子母细胞的胼胝质壁中聚集了较多的钙沉淀颗粒, 其他部位较少。小孢子母细胞减数分裂后, 花药药壁和药隔组织中的钙沉淀颗粒明显增加。早期小孢子先在花粉外壁基柱层中聚集了较多的钙沉淀颗粒, 在小孢子质膜与花粉外壁之间也特异性聚集了许多钙沉淀颗粒。在小孢子形成大液泡过程中, 小孢子质膜内陷形成小液泡, 钙沉淀颗粒被包裹到小液泡中, 并被转移到大液泡中, 显示Ca²⁺参与了液泡的构建。小孢子不等分裂后, 二胞花粉中的大液泡分解, 细胞质内含物增加, 积累营养储存物——淀粉和脂滴。花粉中的钙沉淀颗粒明显减少, 而药壁的表皮和药室内壁细胞中的则增加。成熟花粉中钙沉淀颗粒很少, 但在花粉外壁的基柱层空隙中仍有许多钙沉淀颗粒分布。水芹花粉中的Ca²⁺分布的特点显示其在小孢子发育的液泡代谢过程具有重要的生理功能。

关键词:钙离子; 花药; 小孢子; 水芹; 花粉

Ca²⁺是生物体内一种重要元素, 具有很多生理功能。Ca²⁺不能合成, 也不能分解, 在生物体细胞中通过量变的方式调控细胞的很多生理活动和信号转导事件(贾如等2014)。生物体内Ca²⁺含量在特定时间和特定部位发生的时空变化特征是其量变的具体表现, 也是调控细胞分化机制的征兆, 与细胞特殊结构和生理功能变化有关。细胞中游离钙的微量变化是细胞刺激反应信号转导机制的关键环节之一, 已有大量的文章和专著报道(Miller等1997)。然而, 有关细胞中Ca²⁺的生理功能研究, 即在非刺激条件下, Ca²⁺对细胞分化的调控机制, 关系到个体、器官、组织和细胞发育的调控内容, 这方面研究还很少报道。

在早期花粉体外培养试验中发现: 花粉管生长具有向Ca²⁺浓度高的方向生长的特征(花粉萌发的向化性)(Mascarenhas和Machlis 1962)和花粉数量很少时很难离体萌发(花粉萌发的群体效应), 但在培养基内添加Ca²⁺就可以弥补花粉数量的缺陷, 促使花粉萌发(Brewbaker和Kwack 1963)。后来的研究发现花粉管顶端的Ca²⁺呈现梯度分布的特征, 与花粉管的极性生长有关(Rathore等1991; Miller等1992; Holdaway-Clarke和Hepler 1997)。为维持花粉管的极性生长, 花粉管顶端需保持高钙状态。在对雌蕊组织的钙分布研究中发现莴苣(*Lactuca saliva*, 邱义兰等2005)和烟草(*Nicotiana tabacum*, Ge等2009)的柱头和花柱组织中确实具有丰富的钙沉淀颗粒, 为体内花粉萌发和花粉管生长提供

了钙源。在小麦(*Triticaceae dumort*, Chaubal和Reger 1992)、珍珠粟(*Pennisetum glaucum*, Chaubal和Reger 1993)、烟草(Tian和Russell 1997)、油菜(*Brassica campestris*, 余凡立等1998)和莴苣(邱义兰等2007)胚囊Ca²⁺分布研究中, 也发现花粉管生长的终点——胚囊助细胞中钙沉淀颗粒最多, 证明了植物体内花粉管生长的向化性特征和胚囊细胞中通过Ca²⁺时空分布变化方式调控花粉管生长的规律。近年来, 在拟南芥中发现即将到达的花粉管引起助细胞Ca²⁺骤然爆发的震荡现象(Denninger等2014; Hamamura等2014; Iwano等2012; Ngo等2014), 进一步揭示了植物雌、雄配子体细胞相互作用中的Ca²⁺量变特征。

花药发育是一个非常复杂的调控过程(刘茜阳等2014), 但其具体的调控机制还不清楚。在花药发育中, Ca²⁺参与调控花药发育已有报道。Tian等(1998)发现光敏核不育水稻的花药中钙沉淀颗粒分布异常: 可育晚期小孢子中的钙沉淀颗粒较少, 而不育晚期小孢子中有较多的钙沉淀颗粒分布在细胞质中。孟祥红等(2000)在小麦雄性不育研究中发现, 与保持系可育花药相比, 不育花药的维管束细胞中有较多的钙沉淀颗粒。这些结果显示水稻和小麦花药发育中Ca²⁺的分布特征和参与

收稿 2017-07-07 修定 2018-01-08

资助 武汉市科技攻关计划项目(2015021388010001)。

* 通讯作者(261569206@qq.com)。

调控花药发育的迹象。本文以水芹发育花药为材料,探索水芹发育花药中的 Ca^{2+} 分布特征,结合花粉发育各环节中的形态特征,进而推测 Ca^{2+} 在水芹花粉发育中可能的生理功能。

1 材料与方法

水芹(*Oenanthe stolonifera* D. C)采自湖北省武汉市农业科学院蔬菜科学研究所。水芹为多年生植物,在武汉地区每年7~8月份开花。不同发育时期的水芹花药通过压片大致确定发育时期后,分为小孢子母细胞、四分体、小孢子早期(单核中位)、小孢子晚期(单核靠边)、三胞早期和三胞晚期(成熟)5个时期取样。各发育时期的花药先置于含2.5%戊二醛、1%焦锑酸钾、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0)配制的前固定液中,室温固定3 h。用含1%焦锑酸钾和50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液配制的洗涤液换洗3次,每次30 min。之后将前固定的花药转入含1%锇酸、1%焦锑酸钾和50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液配制的后固定液中,在4°C下过夜。次日用相同的洗涤液换洗3次,每次30 min。然后用浓度梯度系列丙酮脱水,Spurr树脂包埋。包埋的花药用Leica Ultracut R型超薄切片机切为80 nm厚度的切片。JEM-100CXII透射电子显微镜观察和拍照。

2 实验结果

2.1 小孢子母细胞时期水芹花药中的 Ca^{2+} 分布特征

在造孢细胞时期之前,幼小水芹花药内部的结构很难分清,均为一些未分化的细胞构成。造孢细胞排列紧密,无胞间隙,仅从位于花药中央区别为造孢细胞。造孢细胞发育为小孢子母细胞后有几个明显的形态变化:小孢子母细胞由原来的不定型变为圆型;细胞之间有很大的胞间隙空间;细胞表面形成很厚的胼胝质壁。此时,花药结构清晰,各组织细胞可被确定。水芹花药的结构和大多数被子植物的花药结构相似,具有典型的4层花药壁细胞,由外向内分别是表皮、药室内壁、中层和绒毡层。4层药壁细胞均为扁形,在切片的二维图像中呈长形。药壁的绒毡层细胞之内是药室,雄性生殖细胞在此发育成花粉。药室中的小孢子母细胞被厚厚的胼胝质壁包裹(图1-A)。小孢子母细胞的核位于细胞的中部,具有较大的核质

比。细胞中有很多细胞器,但体积较小,尤其是小液泡的数量较多。此时正是胼胝质壁形成过程,较多的小液泡可能与胼胝质中的多糖代谢有关。在小孢子母细胞中钙沉淀颗粒较少,零星分布于细胞质中,但在细胞表面的胼胝质壁中分布了较多的细小钙沉淀颗粒(图1-B)。在药壁组织的绒毡层细胞中,细胞核较大,细胞器丰富,有一些较大的液泡,其中分布有明显的钙沉淀颗粒。这些液泡多数分布在靠药室部位。在绒毡层细胞的内切向壁部位也聚集有一些钙沉淀颗粒。绒毡层细胞中的 Ca^{2+} 分布特征呈现其向药室中转运 Ca^{2+} 的迹象(图1-C)。但在邻近的中层细胞中,钙沉淀颗粒很少。与中层相邻的药室内壁细胞中,也有较多的钙沉淀颗粒,分散在细胞质中,但在与中层细胞相邻的细胞内切向面上聚集了较多的钙沉淀颗粒(图1-D)。此时,花药维管束已分化,在导管细胞内腔壁边缘积累了较大量的钙沉淀颗粒。

2.2 四分体时期水芹花药中的 Ca^{2+} 分布特征

小孢子母细胞经过减数分裂后形成由4个小孢子组成的四分体。水芹小孢子母细胞的减数分裂过程为同时型,形成的4个小孢子呈四面体型被包裹在共同的胼胝质壁中,小孢子之间也由胼胝质壁分隔(图1-E)。四分体小孢子的细胞核位于中央,细胞质中有很多较小的细胞器,尤其是质体的电子密度较高,可明显区别。四分体小孢子的液泡化程度很低,细胞中没有明显的液泡。小孢子中的钙沉淀颗粒很少,但在包裹小孢子的胼胝质壁中有很多钙沉淀颗粒,其中继承小孢子母细胞的外围胼胝质壁中的钙沉淀颗粒较多,而分隔小孢子之间的隔壁中较少(图1-F)。此时,药隔薄壁细胞高度液泡化,分布有许多钙沉淀颗粒(图1-G)。药壁的表皮细胞液泡化增加,细胞中液泡占大部分体积,细胞质被挤到了细胞边缘。相邻的药室内壁细胞的形态结构变化不大,但其里面的中层细胞体积明显增大,液泡化程度增加。药壁最内层的绒毡层细胞体积也增大,细胞质含有较多的线粒体和质体等细胞器,质体多分布于细胞核周围,同时也含有一些内质网和少量的淀粉粒(图1-H)。

2.3 小孢子早期水芹花药中的 Ca^{2+} 分布特征

大多数植物的四分体胼胝质壁将解体,原处

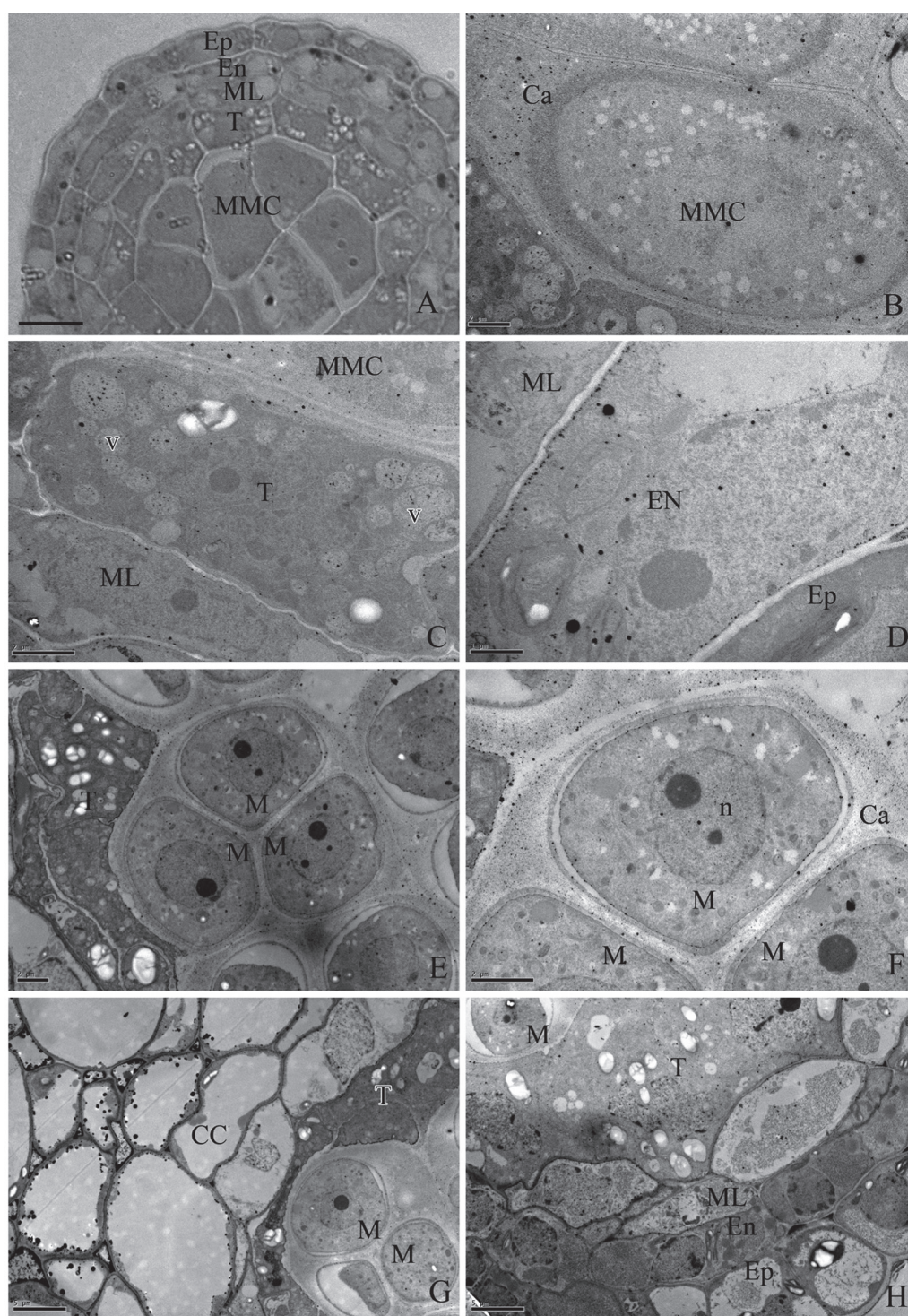


图1 小孢子母细胞时期和四分体时期水芹花药钙颗粒分布特征变化
 Fig.1 Change in feature of calcium distribution during the development of *O. stolonifera* anthers
 at the stage of microsporocyte and tetrad

Ep: 表皮; En: 药室内壁; GC: 生殖细胞; M: 小孢子; ML: 中层; MMC: 小孢子母细胞; n: 细胞核; o: 脂滴; P: 花粉; T: 绒毡层; s: 淀粉; VN: 营养核; v: 液泡; CC: 药隔细胞。下图同此。A: 水芹花药药室, 标尺=40 μm ; B: 小孢子母细胞外部的胼胝质壁中细小的钙沉淀颗粒, 标尺=2 μm ; C: 药壁的绒毡层细胞中含钙沉淀颗粒的小泡, 标尺=2 μm ; D: 药壁的药室内壁细胞中钙沉淀颗粒, 标尺=1 μm ; E: 水芹小孢子母细胞减数分裂后形成的等四面体四分体, 标尺=2 μm ; F: 四分体小孢子中很少的钙沉淀颗粒, 标尺=2 μm ; G: 药隔薄壁细胞较多的钙沉淀颗粒, 标尺=5 μm ; H: 药壁绒毡层细胞中较少钙沉淀颗粒, 标尺=5 μm 。

于胼胝质壁中等四面体排列的4个小孢子相互分离,形成单个的游离小孢子。水芹小孢子的外形呈椭圆形(图2-A)。早期小孢子的液泡化程度很低,几乎没有明显的液泡,细胞核位于中央(通常的单核中位期),细胞质中有丰富的小细胞器,甚至积累少量的淀粉(图2-B)。大多数植物小孢子发育中有2个明显的形态结构变化:形成表面的花粉外壁和内部的大液泡。花粉外壁的形成系由绒毡层分泌的孢粉素物质构建,形成具有种属特征的花粉外壁。水芹花粉外壁由3层构成,分别为覆盖层、基柱层和基足层。在基柱层中,聚集了大量钙沉淀颗粒,在小孢子质膜上也有一些钙沉淀颗粒聚集(图2-B)。水芹小孢子中的液泡发生过程比较特殊,显示 Ca^{2+} 与液泡的发生有关。游离小孢子最初在质膜与花粉外壁之间聚集大量的钙沉淀颗粒,呈特异性分布(图2-C)。随着小孢子的发育,小孢子质膜形成不规则的内陷(图2-D)。夹在花粉外壁和质膜之间的钙沉淀颗粒依然很明显。随着质膜内陷逐步扩大,形成了类似的吞噬小泡,进入细胞质中形成小液泡(图2-E)。在此过程中,质膜外的钙沉淀颗粒也转移到小液泡中。

2.4 小孢子晚期水芹花药中的 Ca^{2+} 分布特征

大多数被子植物小孢子中的小液泡融合形成一个大液泡,占据了细胞的大部分空间,将细胞核和细胞质挤到边缘(单核靠边期),使小孢子形成明显极性,为其不等分裂做好准备。在形成大液泡时,原来聚集在小液泡中的钙沉淀颗粒也随液泡的融合而转移到大液泡中(图2-F)。进入大液泡中的钙沉淀颗粒似有溶解的迹象,除了局部区域有大的钙沉淀颗粒外,液泡中的大部分区域为絮状物。但在液泡膜部位,有明显的一层钙沉淀颗粒(图2-G)。水芹成熟花粉外形为棒状,但小孢子由于大液泡的膨压,其切片二维图像呈椭圆形。小孢子中的大液泡占据了细胞的大部分空间,将细胞核挤到小孢子长轴极的一端(图2-H)。小孢子发育进入晚期,即通常所说的单核靠边期。在最终的晚期小孢子中,大液泡中的钙沉淀颗粒基本溶解,消失。大液泡中原来的絮状物也消失,仅在液泡膜部位仍有一层钙沉淀颗粒分布(图2-I)。在小孢子的质膜部位,钙沉淀颗粒比以前减少,但仍有一层钙沉淀颗粒分布。在花粉外壁的基柱层空隙中也仍有许多钙沉淀颗粒聚集。

2.5 成熟花粉早期水芹花药中的 Ca^{2+} 分布特征

具有极性的小孢子进行一次高度不等分裂,形成一个小的生殖细胞和一个大的营养细胞,先构成二胞花粉。营养细胞继承了原小孢子绝大部分细胞质,包括大液泡。位于长形花粉一极的生殖细胞体积较小,细胞质含量较少,具有很大的核质比。二胞花粉发育的明显变化是营养细胞中的大液泡分解、消失,营养细胞内含物增加,积累营养储存物——淀粉和脂滴。在营养细胞中大液泡分解为小液泡的过程中,细胞质基质增加,电子密度增大,同时一些淀粉粒围绕在细胞核周围。水芹长形花粉具3个萌发孔,呈等三角的方式排列赤道线上(图3-A)。与此同时,花药壁中的4层细胞仍保留,但形态结构发生明显变化。绒毡层细胞的外形不确定,与附近的花粉粒有很大关系。绒毡层细胞内有很多各种形态的细胞器,包括线粒体和较小的液泡,但没有大液泡。绒毡层细胞内只有少数零散分布的钙沉淀颗粒。与绒毡层相邻的中层细胞高度液泡化,大液泡将细胞质都挤到边缘区域。在大液泡中有一些较小的钙沉淀颗粒(图3-B)。此时的药室内壁细胞的内切向壁和径向壁加厚,细胞质内含物很少。在高度液泡化的表皮和药室内壁细胞中分布有较多的钙沉淀颗粒(图3-C)。随着二胞花粉的发育,营养细胞中的大液泡完全消失,花粉中的钙沉淀颗粒已很少,但在花粉外壁中的钙沉淀颗粒仍保留。原来特异性聚集在营养细胞核周围的淀粉粒分散到细胞质中。在绒毡层细胞质中钙沉淀颗粒也比以前增加(图3-D)。二胞花粉时期,花药中的 Ca^{2+} 分布呈现由花粉中向药壁体细胞回流的迹象。

2.6 成熟花粉时期水芹花药中的 Ca^{2+} 分布特征

水芹成熟花粉属于三胞花粉型,花粉成熟前的生殖细胞进行一次有丝分裂,形成了2个精细胞,和营养细胞一起构成三胞花粉。开花前一天,水芹成熟花粉细胞质的电子密度很高,其中积累了大量的淀粉粒(图3-E)。但高倍放大条件观察下,在花粉细胞质中也分布了许多脂滴。在成熟花粉细胞质中,钙沉淀颗粒很少(图3-F)。水芹成熟花粉中积累的主要营养物质是淀粉和脂滴。与大多数植物花药绒毡层细胞中途退化不同,水芹的绒毡层细胞可部分保留到开花时期,虽然在成熟绒毡层细胞中各种细胞器难以鉴别,但其外形和结

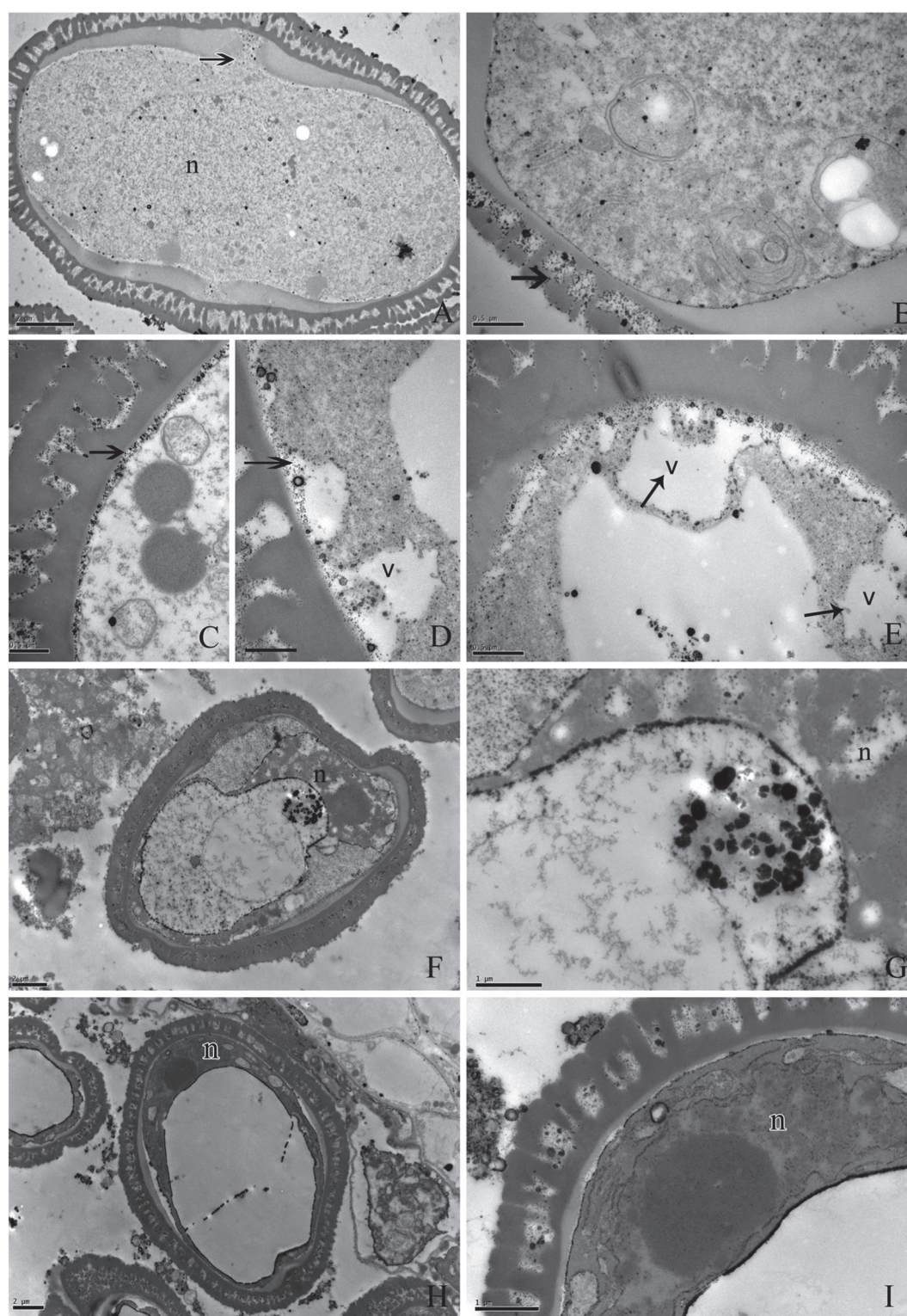


图2 小孢子时期水芹花药钙颗粒分布特征变化

Fig.2 Change in feature of calcium distribution of *O. stolonifera* anthers at microspore stage

A: 早期小孢子, 标尺=2 μm; B: 早期小孢子细胞质, 标尺=0.5 μm; C: 小孢子在质膜与花粉外壁, 标尺=1 μm; D: 部分质膜通过内吞形成小液泡, 标尺=0.5 μm; E: 小液泡融合成较大的液泡, 标尺=0.5 μm; F: 大液泡将细胞核和细胞质挤到边缘, 标尺=2 μm; G: 大量的钙被转移到大液泡中, 标尺=1 μm; H: 小孢子发育晚期, 标尺=2 μm; I: 大液泡仅在液泡膜部位有较多钙沉淀颗粒, 标尺=1 μm。箭头所指为钙颗粒。

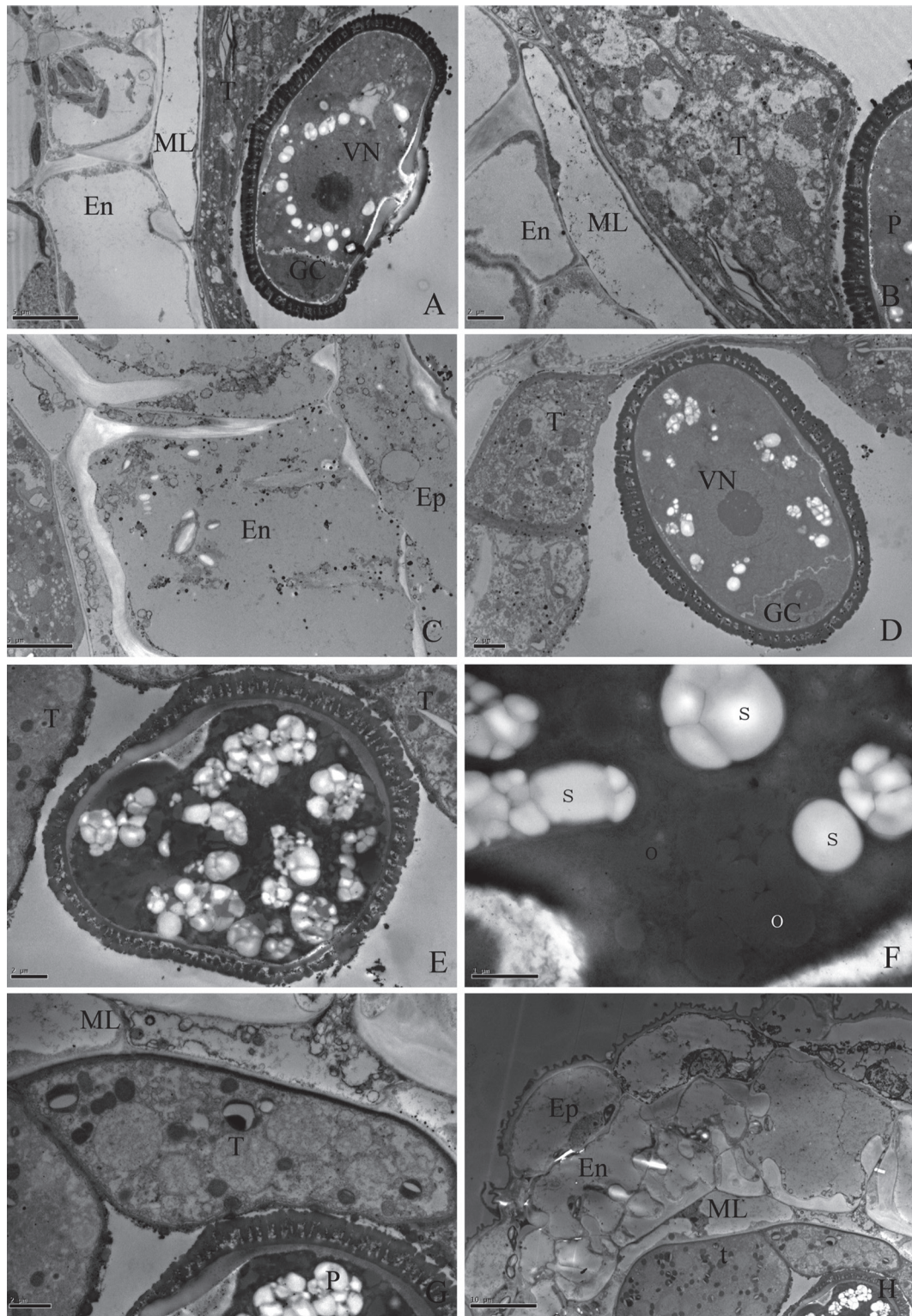


图3 成熟期水芹花药钙颗粒分布特征变化

Fig.3 Change in feature of calcium distribution of *O. stolonifera* anthers at the stage of mature pollen

A: 小孢子分裂后形成一个小的生殖细胞和一个大的营养细胞, 标尺=5 μm ; B: 药壁的绒毡层和中层细胞中的钙沉淀颗粒, 标尺=2 μm ; C: 高度液泡化的药室内壁和表皮细胞中的钙沉淀颗粒, 标尺=5 μm ; D: 二胞花粉的细胞质, 标尺=2 μm ; E: 开花前一天的即将成熟花粉, 标尺=2 μm ; F: 放大后的成熟花粉细胞质, 标尺=1 μm ; G: 开花前一天药壁中部分保留的绒毡层细胞, 标尺=2 μm ; H: 药壁保留的4层结构, 标尺=10 μm 。

构仍保持完好,无退化的迹象。绒毡层细胞向药室方向的内切壁也保留完整,其上分布有一些颗粒状物质,而在其外侧的中层细胞也仍保留高度液泡化的特征(图3-G)。在中层细胞的外侧,表皮和药室内壁细胞也仍是高度液泡化状态,与绒毡层细胞形成明显差别。药室内壁细胞的内切向壁和径向壁加厚很明显,这是药室内壁细胞的特征。表皮细胞的细胞核位于内侧的细胞边缘区域。表皮细胞的表面加厚,形成突起特征。在高度液泡化的药室内壁和表皮细胞中,钙沉淀颗粒也明显减少(图3-H)。

3 讨论

被子植物的雄配子体虽然高度简化,只有3个细胞(1个营养细胞和2个精细胞)组成,但却具有非常特殊的功能。与体细胞分化相比,花粉中的雄配子体形成通过骤变方式完成:小孢子母细胞分裂形成4个小孢子的减数分裂过程使二倍体细胞变为单倍体细胞。小孢子分裂形成1个大的营养细胞和1个小的生殖细胞,两细胞不但形态、结构差异明显,且命运也决然不同。此后,生殖细胞分裂形成的2个精细胞也是与一般植物体细胞的结构和功能有明显不同。花粉发育过程中发生的一系列明显的形态和结构的变化,最终使3个细胞组成的雄配子体具有特殊功能。花粉发育的调控机制一直是植物有性生殖中研究热点领域(Gómez等2015)。

3.1 水芹花药中的Ca²⁺分布特征

花药发育中Ca²⁺具有重要作用,不育花药中的Ca²⁺也显示了异常分布现象。探索花药发育中Ca²⁺的生理功能需先搞清楚Ca²⁺分布的时空特征,结合雄性生殖细胞的发育事件,通过Ca²⁺分布特征分析其在花药发育中的生理功能。Górska-brylass等(1997)发现一种吊兰植物(*Chlorophytum elatum*)二胞花粉中生殖细胞与营养细胞中的Ca²⁺含量不同,生殖细胞中含有更多的钙沉淀颗粒,暗示Ca²⁺可能调控了2个细胞的分化。烟草花药发育中,花粉母细胞的胼胝质壁中特异性出现了许多钙沉淀颗粒。在小孢子发育时期,小孢子细胞质中的钙沉淀颗粒呈现出与液泡代谢相伴随的特异性分布。小孢子大液泡形成后,液泡中聚集了一些较大的钙沉淀颗粒。在二胞花粉时期,花粉中的钙沉淀

颗粒明显减少。烟草的结果显示在小孢子母细胞的胼胝质壁和小孢子的液泡中钙沉淀颗粒的数量特异地高(郑茂忠等2005)。在莴苣(*Lactuca sativa*)花药中,减数分裂后,早期小孢子中钙沉淀颗粒增加。晚期小孢子形成大液泡后钙沉淀颗粒明显减少(Qiu等2009)。最近,在油茶(*Camellia oleifera*)中发现在小孢子母细胞的胼胝质壁中有大量的钙沉淀颗粒。减数分裂后随着小孢子发育,许多钙沉淀颗粒先出现在小孢子小液泡中,随着小液泡融合形成大液泡,Ca²⁺转移到大液泡中(Wei等2015)。该结果证实了Ca²⁺在小孢子中的动态分布轨迹,与小孢子液泡代谢有关。在本实验中,水芹花粉发育中的钙沉淀颗粒分布也呈现两个特异时空高峰期:小孢子母细胞时期的胼胝质壁和小孢子时期的液泡。水芹花粉中的Ca²⁺分布特征与烟草,油茶中的相似,呈现出特征与小孢子母细胞胼胝质壁构建和小孢子液泡代谢的发育事件有关。

3.2 Ca²⁺与小孢子母细胞胼胝质壁的关系

植物胼胝质壁形成的时间和部位特殊,Ca²⁺与胼胝质壁的联系还未有报道。很早就发现Ca²⁺与细胞壁成分的相互作用具有重要的生理功能,如细胞壁结构的稳定性、细胞顶端生长、细胞壁离子交换和调控细胞壁中的酶活性(Demarty等1984)。Ca²⁺与细胞壁中的果胶分子连接,在调节细胞壁的可塑性中具有重要的生理功能。花粉管顶端的果胶具酯化性质,不连接Ca²⁺,果胶的可塑性较强,有利于花粉管膨压的顶端生长;而花粉管亚顶端部位的果胶为非酯化果胶,可结合Ca²⁺,使果胶的刚性增加,使花粉管保持管状结构(Li等1994)。小孢子母细胞的胼胝质壁是一种临时性结构,只在减数分裂时产生。减数分裂后,四分体胼胝质壁降解,释放出小孢子。有关Ca²⁺与胼胝质壁多糖成分的关联还没有报道。但本研究中大量Ca²⁺特异性聚集在小孢子母细胞的胼胝质壁中很可能和胼胝质壁的结构或功能有关。

3.3 Ca²⁺与小孢子液泡代谢的关系

植物花粉发育中的液泡变化很明显。大多数植物在小孢子时期形成一个大液泡。二胞花粉时大液泡分解。小孢子中的大液泡将细胞核和细胞质挤到边缘,形成极性,为小孢子的不等分裂做准备,由小孢子进入雄配子体发育(Twell等1998)。在

早期的花药培养中, 离体培养的小孢子如果均等分裂, 将很容易导致单倍性的孢子体发育(Sunderland和Dunwell 1974)。因此, 小孢子中的大液泡形成是雄配子体发育的前奏。小孢子形成大液泡的现象早有发现(胡适宜2005), 但大液泡形成的调控机制则还不清楚(Yamamoto等2003)。

Pacini等(2011)认为花粉中的液泡来自: ①内质网池的膨大, ②内质网分隔部分细胞质并降解内含物形成, ③溶酶体膨大, ④由高尔基体小泡形成。在本研究中, 小孢子从四分体中释放后, 细胞中的钙沉淀颗粒增加, 并被特异性积累在花粉外壁以内、小孢子质膜外的部位(图2-C), 然后质膜通过内陷形成小液泡(图2-D和E)。在质膜内陷时, 一些钙沉淀颗粒也被包裹在其中(图2-D和E)。随着小液泡的融合, 小孢子中形成了大液泡, 小孢子中的 Ca^{2+} 也被集中到大液泡中(图2-F), 呈现出 Ca^{2+} 的动态分布轨迹。因此, 水芹花粉发育中的大液泡形成很可能是由 Ca^{2+} 调控的质膜内陷形成。

在植物细胞的液泡发生中, Ca^{2+} 参与调控机制还未被报道(Marty 1999)。根据大液泡中聚集大量钙沉淀颗粒的现象推测液泡中的 Ca^{2+} 可能起增加液泡水势的作用, 使液泡不断吸水膨大增强细胞的液泡化作用。另外, Ca^{2+} 具有促进细胞膜融合的作用, 小液泡中的 Ca^{2+} 也可能促进小液泡的融合, 有利于形成大液泡。小孢子分裂形成二胞花粉后, 营养细胞中的大液泡完成使命, 大液泡分解、消失, 其中的 Ca^{2+} 可能也通过分泌方式排出花粉。在成熟花粉中, 钙沉淀颗粒很少, 但在花粉外壁的基柱空隙中, 仍保留有许多钙沉淀颗粒, 可能是为以后花粉在柱头上萌发时利用。通过上述水芹花粉发育中的 Ca^{2+} 分布特征推测, Ca^{2+} 很可能参与了花粉中的液泡代谢活动。

参考文献(References)

- Brewbaker JL, Kwack BH (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer J Bot*, 50: 859–865
- Chaubal R, Reger BJ (1992). The dynamics of calcium distribution in the synergid cells of wheat after pollination. *Sex Plant Reprod*, 5: 206–213
- Chaubal R, Reger BJ (1993). Prepollination degeneration in mature synergids of *Pearl millet*: an examination using antimonate fixation to localize calcium. *Sex Plant Reprod*, 6: 225–238
- Demarty M, Morvan L, Thellier I (1984). Calcium and the cell Wall. *Plant Plant Cell Environ*, 7: 441–448
- Denninger P, Bleckmann A, Lausser A, et al (2014). Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 5: 4645–4657
- Ge LL, Tian HQ, Russell SD (2007). Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. *Amer J Bot*, 94: 1046–1060
- Ge LL, Xie CT, Russell SD, et al (2009). Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation. *Sex Plant Reprod*, 22: 87–96
- Gómez JF, Talle B, Wilson ZA (2015). Anther and pollen development: a conserved developmental pathway. *J Integr Plant Biol*, 57: 876–891
- Górska-Brylarska A, Butowt R, Rodriguez-Garcia MI (1997). Distribution of loosely-bound calcium in the vegetative and generative cells of the pollen grains in *Chlorophytum elatum*. *Biol Plant*, 40: 169–181
- Hamamura Y, Nishimaki M, Takeuchi H, et al (2014). Live imaging of calcium spikes during double fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 5: 4722–4731
- Holdaway-Clark TL, Feijo JA, Hackett GR, et al (1997). Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell*, 9: 1999–2010
- Hu SY (2005). *Reproductive Biology of Angiosperms*. Beijing: Higher Education Press (in Chinese with English abstract) [胡适宜(2005). 被子植物生殖生物学. 北京: 高等教育出版社]
- Iwano M, Ngo QA, Entani T, et al (2012). Cytoplasmic Ca^{2+} changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells. *Development*, 139: 4202–4209
- Jia R, Lei MQ, Xu JN, et al (2014). Research progress of Ca^{2+} channel and the effect of Ca^{2+} on plant resistance mechanism in plant cells. *Plant Physiol J*, (12): 1791–1800 (in Chinese with English abstract) [贾如, 雷梦琦, 徐佳妮等(2014). 植物细胞中钙通道的分布及其在植物抗逆机制中作用的研究进展. *植物生理学报*, (12): 1791–1800]
- Li YQ, Chen F, Linskens HF, et al (1994). Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod*, 7: 145–152
- Liu QY, Luo Y, Li Q, et al (2014). Epigenetic regulation in angiosperm gamete development. *Plant Physiol J*, (12): 1801–1808 (in Chinese with English abstract) [刘茜阳, 罗云, 李桥等(2014). 被子植物配子形成过程中表观遗传学调控. *植物生理学报*, (12): 1801–1808]
- Marty F (1999). Plant vacuoles. *Plant Cell*, 11: 587–599
- Mascarenhas JP, Machlis L (1962). Chemotropic response of *Antirrhinum majus* pollen to calcium. *Nature*, 196: 292–293

- Meng XH, Wang JB, Li RQ (2000). Effect of photoperiod on calcium distribution in photoperiod-sensitive cytoplasmic male-sterile wheat during anther development. *Bull Bot* 42: 15–22 (in Chinese with English abstract) [孟祥红, 王建波, 利容千(2000). 光周期对光敏胞质不育小麦花药发育过程中Ca²⁺分布的影响. *植物学报*, 42: 15–22]
- Miller DD, Callaham DA, Gross DJ, et al (1992). Free Ca²⁺ in growing pollen tubes of *Lilium*. *J Cell Sci*, 101: 7–12
- Miller D, Hable W, Gottward J (1997). Connections: the hard wiring of the plant cell for perception, signaling, and response. *Plant Cell*, 9: 2105–2117
- Ngo QA, Vogler H, Lituiev DS, et al (2014). A calcium dialog mediated by the FERONIA signal transduction pathway controls plant sperm delivery. *Dev Cell*, 29: 491–500
- Pacini E, Jacquard C, Clément C (2011). Pollen vacuoles and their significance. *Planta*, 234: 217–227
- Qiu YL, Liu RS, Wei DM, et al (2009). Calcium distribution in developing anthers of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Ann Bot Fenn*, 46: 101–106
- Qiu YL, Liu RS, Xie CT, et al (2005). The dynamics of calcium distribution in stigma and style of lettuce (*Lactuca sativa* L.) Before and after pollination. *Acta Biol Exp Sin*, 38: 277–286 (in Chinese with English abstract) [邱义兰, 刘如石, 谢潮添等(2005). 莴苣授粉前后柱头与花柱中钙的分布变化. *实验生物学报*, 38: 277–286]
- Rathore KS, Cork RJ, Robinson KR (1991). A cytoplasmic gradients of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev Biol*, 148: 612–619
- Sunderland N, Dunwell JM (1974). Pathways in Pollen Embryogenesis. In: Street HE (ed). *Tissue Culture and Plant Science*. London: Academic Press, 141–167
- Tian HQ, Kuang A, Musgrave ME, et al (1998). Calcium distribution in fertile and sterile anther of a photoperiod-sensitive genic male sterile rice. *Planta*, 204: 183–192
- Tian HQ, Russell SD (1997). Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 202: 93–105
- Twell D, Ki Park S, Lalanne E (1998). Asymmetric division and cell fate determination in developing pollen. *Trends Plant Sci*, 3: 305–310
- Wei DM, Gao C, Yuan DY (2015). Calcium distribution during anther development in oil tea (*Camellia oleifera* Abel.). *J Am Soc Hortic Sci*, 140: 88–93
- Yamamoto Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I, et al (2003). Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 44: 1192–1201
- Yu LF, Liang SP, Yang HY, et al (1998). Ultracytochemical localization of calcium in micropyle and embryo sac of *Brassica napus* before and after pollination. *Bull Bot*, 40: 591–597 (in Chinese with English abstract) [余凡立, 梁世平, 杨弘远等(1998). 甘蓝型油菜授粉前后珠孔和胚囊中钙分布的超微细胞化学定位. *植物学报*, 40: 591–597]
- Zheng MZ, Yang YH, Guo J, et al (2004). The primary observation of calcium distribution during the anther development of tobacco. *J Xiamen Univ (Nat Sci)*, 43: 126–132 [郑茂钟, 杨延红, 郭娟等(2004). 烟草花药发育过程中钙动态分布的初步观察. *厦门大学学报(自然科学版)*, 43: 126–132]

Distribution characteristics of calcium of *Oenanthe stolonifera* during the anther development

FU Shao^{1,*}, XU Lin¹, LI Qing-Yuan¹, WANG Zhan-Chang¹, CHEN Bao-Lin¹, YE An-Hua²

¹*Institute of Forestry & Fruit Tree, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430075, China*

²*Institute of Vegetable, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430065, China*

Abstract: The technology of potassium antimonite precipitation was used to detect Ca²⁺ distribution characteristics in developing anther of *Oenanthe stolonifera*. In the callose wall of microspore mother cells some calcium precipitations accumulated, but less in other areas. After microspore mother cell meiosis, the calcium precipitates increased evidently in somatic cells and connectives of anther wall and many precipitates appeared in the baculum of exine of early microspore. Then many precipitates appeared between exine and plasma membrane of microspore. During microspore development and large vacuole formation, the plasma membrane of early microspore invaginated to form a small vacuoles, which fused to form a one. During the process, calcium precipitates were closely accompanied by vacuole formation. After microspore unequal division, the large vacuole of bicellular pollen was decomposed, the cytoplasm content increased and began to accumulate nutrition—starches and lipids. The calcium precipitates in bicellular pollen decreased sharply and increased in epidemic and endothecium cells. A few calcium precipitates accumulated in mature pollen but many still in baculum space of exine. The calcium distribution characteristic in developing anthers of *O. stolonifera* showed calcium an important physiologic function during vacuole metabolism of microspore.

Key words: anther; calcium; microspore; *Oenanthe stolonifera*; pollen

Received 2017-07-07 Accepted 2018-01-08

This work was supported by Wuhan Project of Scientific and Technological Breakthrough Plan (2015021388010001).

*Corresponding author (261569206@qq.com).