

# 甜橙花粉中游离Ca<sup>2+</sup>与H<sup>+</sup>的分布

吴琼<sup>1</sup>, 曹立<sup>1,2</sup>, 张弛<sup>1</sup>, 郭启高<sup>1</sup>, 梁国鲁<sup>1</sup>

(1 西南大学园艺园林学院, 重庆, 400716; 2 中国农业科学院柑桔研究所)

**摘要:** 本研究利用激光共聚焦技术, 检测甜橙花粉中的游离Ca<sup>2+</sup>和H<sup>+</sup>的分布特性。结果表明, 甜橙花粉中, 游离Ca<sup>2+</sup>的主要分布区域为萌发沟孔附近, 在花粉中央也有少量分布, 呈现出极性分布的特点; H<sup>+</sup>也主要富集在萌发沟孔附近, 从萌发沟孔到花粉中央, 呈强<sup>+</sup>弱的梯度分布。

**关键词:** 甜橙; 花粉; 游离Ca<sup>2+</sup>; H<sup>+</sup>; 激光共聚焦

**中图分类号:** S 666.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1007-1431(2010)03-0009-03

## The Distribution of Free Calcium and H<sup>+</sup> of Sweet Orange Pollen

WU Qiong<sup>1</sup>, CAO Li<sup>2</sup>, ZHANG Chi<sup>1</sup>, GUO Qi-gao<sup>1</sup>, LIANG Guo-lu<sup>1</sup>

(1 College of Horticulture and Landscape architecture, Southwest University, Beibei Chongqing 400716; 2 Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)

**Abstract:** Laser confocal scanning microscopy was used to detect the distribution of free calcium and H<sup>+</sup> in sweet orange pollen. The results showed that the free calcium was concentrated in areas close to the germination furrow, and to a less extent, to the center of the pollen grain, indicating a polarity distribution. H<sup>+</sup> was mainly concentrated near the germination furrow too, and it showed a gradient distribution of high to low from the germination furrow to the center of the pollen.

**Keywords:** Sweet orange; Pollen; Free calcium; H<sup>+</sup>; LSCM

花粉萌发是高等植物有性生殖过程中的一个重要环节。而Ca<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>及硼等是促进花粉萌发的重要因素。研究表明, 花粉中Ca<sup>2+</sup>和H<sup>+</sup>的分布与动态变化对调节花粉萌发及后续生长有重要作用<sup>[1]</sup>。同时, 花粉及花粉管中Ca<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>的分布、动态变化也对后续的授精受精和胚胎发育过程有重要影响<sup>[2]</sup>。目前, Ca<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>的分布和变化研究已经成为探讨植物有性生殖特性的有效手段, 并在多种植物上取得了可喜的成绩<sup>[3-8]</sup>。但到目前为止, 尚无甜橙有性生殖过程中Ca<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>分布特性的相关研究报道。为此, 采用激光共聚焦技术, 对甜橙花粉中Ca<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>的分布进行研究, 以期为后续甜橙花粉萌发、授精受精过程、胚胎发育等相关研究奠定技术基础。

圃, 均为10年生枳砧的先锋橙、中育7号、434号甜橙和梨橙。取回大蕾期花蕾后, 剥出成熟花药, 自然阴干后, 4℃保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 花粉悬浮液制备及花粉水合 每试管加入5个自然阴干的成熟甜橙花药, 加BK培养液2 mL, 轻微振荡。吸取花粉悬浮液于1.5 mL离心管中, 离心去上清液, 后加适量BK液, 25℃水合2小时。

1.2.2 荧光探针标记 取1.2.1中的水合花粉悬浮液46 μL, 加入200 μg/L SNARF/AM和200 μg/L fluo-3/AM各2 μL, 混匀后4℃、暗条件下轻微振荡孵育90分钟。孵育完成后, 在暗条件下用BK溶液离心洗涤3次, 再加入BK培养液50 μL。

1.2.3 激光共聚焦显微观察 将装载、孵育好的甜橙花粉悬液滴在载玻片上, 加盖盖玻片。Leca TCS SP<sub>2</sub>激光共聚焦显微镜扫描, 采用Kr/Ar和He/Ne激发, 激发波长分别为488<sup>[9]</sup>和534 nm, 发射波长为516和543~623 nm<sup>[10]</sup>, 双通道同时扫描。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料取自中国农业科学院柑桔研究所种质资源

收稿日期: 2010-04-25; 修回日期: 2010-05-10

作者简介: 吴琼(1984), 男, 在读硕士, 主要从事果树发育生物学研究。

通信作者: 梁国鲁。E-mail: lianggl@swu.edu.cn

## 2 结果与分析

### 2.1 $Ca^{2+}$ 分布特点

试验结果表明,在 4 个品种甜橙的花粉中,花粉

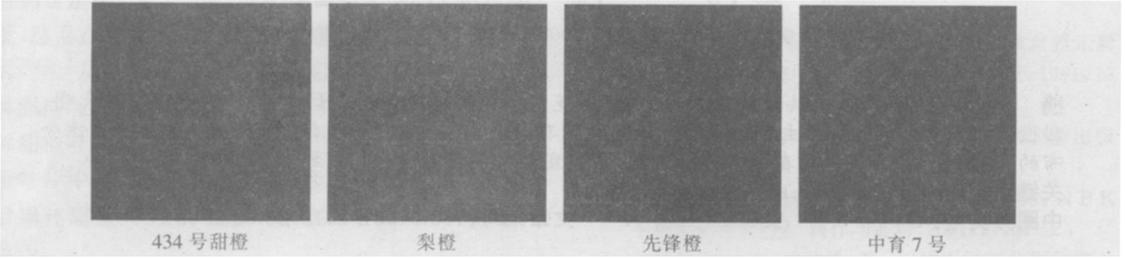


图 1 甜橙花粉的游离  $Ca^{2+}$  分布

### 2.2 $H^+$ 分布特点

如图 2 所示,在 4 个品种甜橙的花粉中,  $H^+$  也已经部分向萌发孔附近聚集。而  $H^+$  荧光信号在花

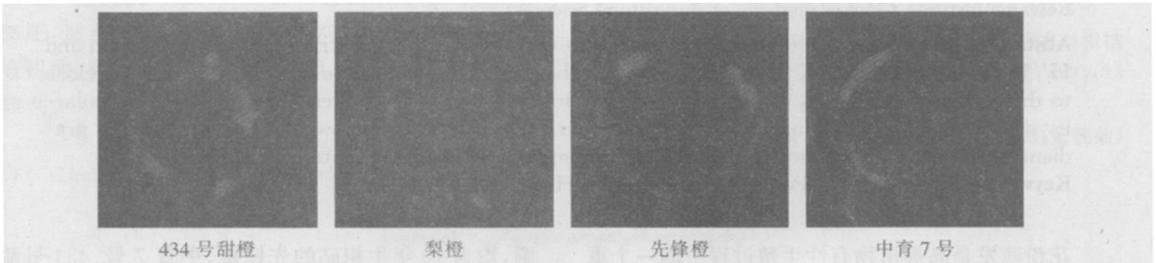


图 2 甜橙花粉的  $H^+$  分布

### 2.3 $Ca^{2+}$ 分布与 $H^+$ 分布特点比较

在 4 个品种的花粉中,  $Ca^{2+}$  和  $H^+$  分布从花粉萌发沟孔到花粉中央的相对荧光强度都呈现出由强到弱的分布趋势。梨橙、434 号甜橙和中育 7 号  $Ca^{2+}$  最高荧光强度分别为 102、115 和 116, 比先锋橙(133)低; 而先锋橙的最低荧光强度为 31, 比其他 3 个品种都要高。先锋橙的  $H^+$  相对荧光强度最大值为 250, 明显高于其他 3 个品种; 但是 4 个品种的  $H^+$  相对荧光强度最小值差异不明显(见表 1)。

表 1 不同甜橙品种  $Ca^{2+}$ 、 $H^+$  相对荧光强度值

品 种	$Ca^{2+}$ 相对荧光强度		$H^+$ 相对荧光强度	
	最大值	最小值	最大值	最小值
先锋橙	133	31	250	27
梨橙	102	0	169	34
中育 7 号	116	14	136	32
434 号甜橙	115	0	196	32

## 3 讨论

4 个甜橙品种的游离  $Ca^{2+}$  的分布特点是以萌发沟孔为最高、以花粉中央为其次、其他区域均极少

中央游离  $Ca^{2+}$  信号分布明显比处于花粉边缘的萌发孔附近弱。游离  $Ca^{2+}$  已经向萌发孔聚集, 表现出极性分布的特征(见图 1)。

花粉中央只有极少量的分布。这种极性分布的梯度与  $Ca^{2+}$  的分布特点相同, 也是从萌发孔到花粉粒中央呈现出由强到弱的特点。

量地不均匀分布, 从萌发孔到花粉中央呈现出由强到弱的梯度分布特点。这与 Shanjin Huang<sup>[7]</sup> 和 Megumi Iwano<sup>[8]</sup> 在松针科植物和云杉上获得的结果一致。 $H^+$  分布从花粉萌发沟孔到花粉中央也呈现出由强到弱的特点, 存在  $H^+$  分布梯度, 与前人在百合等植物上的研究结果一致<sup>[5-6, 11-12]</sup>。但是  $H^+$  分布差异幅度要小于  $Ca^{2+}$  分布的差异幅度。不同甜橙品种在  $Ca^{2+}$  和  $H^+$  分布的相对荧光强度值上存在一定差异, 但无明显变化趋势。本文的研究结果可以为后续有性生殖的相关研究提供参考。但对于不同分布特性对后续授粉受精及胚胎发育的影响, 以及能够通过改变外环境中的  $Ca^{2+}$  和 pH 值, 从而人工调控甜橙田间授粉受精过程, 尚需对花粉管萌发、人工授粉后花粉与柱头的互作、花粉在柱头上的生长及精卵融合过程中的  $Ca^{2+}$ 、 $H^+$  动态变化等相关内容做进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Holdaway-Clarke TL, Feij JA, Hackett GR, et al. Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular

- calcium influx is delayed [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1999-2010
- [2] Welch R M. Micronutrient nutrition of plants [J]. *Critical Reviews in Plant Science*, 1995, 14: 49-82
- [3] Herth W, Reiss H D, Hartmann F. Role of calcium ions in tip growth of pollen tubes and moss protonema cells [A]. Heath IH, eds. *Tip growth in plant and fungal cells* [M]. San Diego, CA: Academic Press, 1990: 91-118
- [4] Mark A. Messerli, Robert Cr ton, Lionel F. Jaffe and Kenneth R. Robinson. Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  during pollen tube growth [J]. *Devel Biol*, 2000, 222: 84-98
- [5] Feijo J A, Sainha S J, Hackett G, et al. Growing pollen tubes have a constitutive alkaline band on the clear cap and a growth-dependent acidic tip [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144: 483-496
- [6] Fricker M D, White N S, Obermeyer G. pH gradients are not associated with tip growth in pollen tubes of *Lilium longiflorum* [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110: 1729-1740
- [7] Shanjin Huang. A Gelsolin-like Protein from *Papaver rhoeas* Pollen (PrABP80) Stimulates Calcium-regulated Severing and Depolymerization of Actin Filaments [J]. *J Biol Chem*, 2004(22): 23364-23375
- [8] Megumi Iwano, Hiroshi Shiba, Teruhiko Miwa.  $\text{Ca}^{2+}$  Dynamics in a Pollen Grain and Papilla Cell during Pollination of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004(136): 3562-3571
- [9] 尚忠林, 王永飞, 钱洪. 百合花粉细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  的荧光测定法 [J]. *植物生理学通讯*, 2001, 31(4): 319-324
- [10] 周文彬, 邱保胜. 植物细胞内 pH 值的测定 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 34(6): 724-728
- [11] Gibbon B C, Kropf D L. Cytosolic pH gradients associated with tip growth [J]. *Science*, 1994, 263: 1419-1421
- [12] Messerli M A, Danuser G, Robinson K R. Pulsatile influxes of  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112: 1497-1509

(责任编辑: 鲁玉洋; 英文编辑: 董朝菊)

## 《中国果树志·柑橘卷》正式出版发行

由中国农业科学院柑橘研究所周开隆、叶荫民主编的《中国果树志·柑橘卷》(以下简称《柑橘志》), 2010年1月由中国林业出版社正式出版发行。

《柑橘志》是在《中国果树志》总编辑委员会的指导下, 由中国农业科学院柑橘研究所主持, 全国广大科技工作者通力协作编写而成。该书图文并茂, 采用国际标准16开本, 精装本出版, 定价148元。

该书的编写始于20世纪60年代, 由于种种原因, 编写一度中断。1981年, 《柑橘志》作为《中国果树志》的一部志卷, 在中国农业科学院柑橘研究所的组织下, 全国有柑橘分布的省(市、区)科技工作者共同努力重新编写, 历经近30年时间, 最终完成该书

的编写工作并出版发行。

《柑橘志》是一部优秀的科技文献专著和科普用书。全书分为十三章, 共456页、80余万字, 有彩图317幅, 收集各类柑橘品种533个, 全面概述了我国柑橘的栽培历史、地理分布、植物学分类和农业技术特点等, 并重点介绍了柑橘类果树三属(枳属、柑橘属、金柑属)植物的种类、品种的形态特征及经济价值。

《柑橘志》的出版, 将为研究柑橘起源、演化、分类及种质的开发利用, 充分发挥柑橘的生物学潜力提供较为完整的资料, 对我国柑橘业的发展和科学研究具有深远意义。

中国农业科学院柑桔研究所(重庆 400712)

谭志友