

硼对百合花粉萌发过程中细胞内游离钙离子的影响

郭光明^{1,3} 张福锁^{1*} 尚忠林² 张锡梅³

(1 中国农业大学农业部植物营养学重点开放实验室, 北京 100094;

2 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 3 西北农林科技大学生命科学院, 杨陵 712100)

摘要 利用激光共聚焦显微镜观察低温装载有钙离子荧光探针 fluo-3 的百合花粉细胞内游离钙离子与培养基中硼酸的关系, 发现硼酸处理的百合花粉细胞内游离钙离子浓度明显高于无硼酸处理, 而且硼酸浓度有关。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼酸处理在 10 min 内显著诱导增加细胞内游离钙离子浓度; 而培养某中加入有 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 或非特异性质膜钙离子通道抑制剂 La^{3+} 则不能诱导游离钙离子浓度升高。结果表明硼能促进细胞外的钙离子进入细胞内, 维持百合花粉细胞内游离钙离子较高的浓度。

关键词 fluo-3; 硼酸; 细胞内游离钙离子浓度; 花粉萌发

中图分类号 Q 944.44; Q 945.12

Effects of Boron on Cytosolic Ca^{2+} in Germinating Pollen Grain Cells of *Lilium davidii* Dutchartre

Guo Guangming^{1,3} Zhang Fusuo¹ Shang Zhonglin² Zhang Ximei³

(1 Key Laboratory of Plant Nutrition, Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2 College of Life Sciences of Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

3 College of Life Sciences of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract The relationship between cytosolic Ca^{2+} and H_3BO_3 in incubation medium for lily pollen grain cells was investigated via laser confocal scanning microscope. It was demonstrated that H_3BO_3 treatment could increase cytosolic Ca^{2+} concentration, and such effect was dose-dependent on H_3BO_3 concentration in incubation medium. Meanwhile, the time-course of the strengthening effect of H_3BO_3 treatment on the cytosolic Ca^{2+} was recorded and demonstrated that the addition of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3BO_3 in incubation medium could rapidly increase the cytosolic Ca^{2+} concentration in ten minutes. But such cytosolic Ca^{2+} increase by H_3BO_3 addition in incubation medium was not observed in the incubation medium of Ca^{2+} chelating agent EGTA or unspecific plasmalemma Ca^{2+} channel inhibitor La^{3+} . Taken together the results above, we suggest that boron has a role in maintaining certain long-term steady higher cytosolic Ca^{2+} concentration in the germinating lily pollen grain cells.

Key words fluo-3; boron; cytosolic Ca^{2+} concentration; pollen germination

上世纪的二三十年代硼就被证明是高等植物必需的微量营养元素, 但在植物体内的作用机理还不清楚^[1]。一般认为硼实现其生物学功能是其与含有顺式邻羟基的化合物如果胶、糖蛋

收稿日期: 2002-01-14; 修回日期 2002-08-16

国家自然科学基金资助项目 (39870480, 39790100)

* 张福锁, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物营养生理与遗传。联系作者。北京圆明园西路 2 号



白及糖脂等大分子物质形成结构稳定的硼酸酯^[2,3]。在质外体中硼绝大多数与细胞壁中的果胶类物质鼠李半乳糖醛酸-II (RG-II) 形成 B-RG-II 二聚体结构, 参与构成细胞壁的果胶网络, 稳定细胞壁的结构^[4,5]。硼与果胶类物质结合形成的携带有负电荷的 B-RG-II 二聚体复合物可以作为钙离子结合位点, 而硼亏缺使这些位点减少, 导致细胞壁区域结合钙数量减少, 使游离钙离子浓度增加^[6]。细胞内游离钙离子一般保持浓度较低的稳态, 细胞感受外界刺激就会打破这一稳态, 使钙离子由胞内钙库或胞外钙库进入胞内, 增加细胞内游离钙离子, 然后诱发下游一系列依赖钙离子的生理生化反应, 引起细胞适应性的反应^[7,8]。细胞质钙稳态的变化可以影响质膜的功能, 如细胞内游离钙离子增加, 可以促进质膜 K^+ 通道关闭而减少 K^+ 的泄漏^[9]。但是目前还没有直接实验证实硼与质膜有直接的相互作用。硼与果胶类物质 RG-II 结合引起胞外钙库细胞壁区域游离钙离子浓度的变化是否可以影响胞内钙稳态的变化。百合花粉是研究植物细胞生长发育最常用的实验体系, 且硼是百合花粉萌发所必需的营养元素, 硼亏缺明显抑制其花粉萌发与花粉管的生长^[10]。因此本研究采用百合花粉细胞为材料研究硼对细胞内钙稳态的影响, 以期进一步阐明硼在植物体内的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

以兰州产的百合 (*Lilium davidii* Dutchartre) 花粉细胞为实验材料, 用花开但未散粉的花药收集花粉, 自然干燥后储存于 -75°C 冰箱内待用。

1.2 花粉培养

实验前 3 d 从 -75°C 冰箱内取出花粉放置在 -20°C 冰箱内待用。先在 4°C 恒温箱中置 12 h, 在 25°C 湿盒内水合 1 h, 然后取少量花粉播种在 1.5 mL 的 EP 管中的培养基上, 低速振荡以除去花粉分泌的油脂, 最后在 25°C 的恒温培养箱中培养 1 h。

花粉培养基主要成分: 蔗糖 $292\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $1.27\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KNO_3 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、丁二酸 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双蒸馏水, pH 5.5。

EGTA (ethylene glycol-bis (β -aminoethyl) ether N,N,N',N'-tetraacetic acid) 处理的培养基是在去除 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 的上述原培养基上加入浓度为 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA。

LaCl_3 的 2 个浓度处理是在原培养基上分别加入浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LaCl_3 。设硼酸浓度 $0.01\sim 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 花粉粒细胞 fluo-3 的装载

fluo-3 是一种单波长钙离子荧光指示剂探针, 其结合或未结合钙离子的最大吸收波长和发射波长均相同。但后者的 fluo-3 自身荧光强度比较低, 而结合钙离子后荧光强度大幅度升高, 且在激光激发后产生强烈的荧光, 荧光探针自身的基础荧光对钙离子测定不会造成明显影响^[12]。单纯的 fluo-3 不能通过质膜, 因此设计采用 fluo-3 脂溶性的 fluo-3AM, 可以较容易穿越质膜并在胞内酯酶作用下水解为 fluo-3 的离子形式。但常温下由于细胞壁区域酯酶的水解作用使装载进去百合花粉细胞内 fluo-3 的数量很少, 难以有效检测细胞内游离钙离子变化。因此本实验采用 Shang 等改进的百合花粉细胞 4°C 低温解育装载的方法^[11], 使细胞壁酯酶保持较低的活性, 保证有足够数量的 fluo-3 进入细胞内, 以便更准确地反映细胞内游离钙离子的变化。本实验 fluo-3 采用 fluo-3AM (Molecular Probe 产品), 用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的无水二甲亚砜 (DM SO) 溶解, 配制成 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 加入到 $50\text{ }\mu\text{L}$ 培养过的花粉悬浮液中, 振荡混匀至

fluo-3AM 终浓度为 $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 置于 4°C 恒温箱中低温孵育 2 h, 然后用原培养基低速离心洗涤 3 次, 以去除未装载进细胞内的 fluo-3AM, 最后在 25°C 静置 1 h, 使已进入细胞内的 fluo-3AM 在胞内酯酶的作用下充分水解为能与游离钙离子结合的离子形态。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

将装载有钙离子荧光探针 fluo-3 的百合花粉细胞悬浮液滴加在载波片上周围涂有聚四氟乙烯 (teflon) (涂层厚 $50 \mu\text{m}$, 直径 5mm) 的小池中, 上面盖盖玻片。

激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad MRC-1024 型), 采用 Kr/Ar 激光, 激发波长 488nm , 发射波长 522nm , Nikon 物镜 $20\times/0.5$, Nikon 目镜 $10\times/25$, 步距 $4 \mu\text{m}$, 对每一个细胞样品取 10~20 个连续光学切片。使用 LaserSharp 2000 软件获取原始图像数据, Laserpix 图像处理软件分析荧光强度的变化, 取连续光学切片中荧光强度最大值作为细胞荧光强度的近似值, 重复 3 次, 取 60 个花粉细胞的平均值。获取原始图像数据的光学系统参数为 Laser 3% Iris 6.0 Gain 80% Offset 0, 测细胞内荧光强度的时间进程参数为: 循环时间 30s , 循环次数 40。

1.5 花粉萌发率的测定

用培养基在 25°C 培育花粉 2 h, 然后统计 700~1200 粒花粉计算萌发率, 萌发率 = 已经萌发的花粉粒数 / 统计的花粉粒总数。花粉萌发的标准以花粉管的长度超过花粉粒的长轴直径为准, 为了便于对比, 采用相对萌发率, 它是在所采用不同浓度的硼酸培养基中假定最佳刺激萌发的萌发率为 100, 其他的萌发率与之相比即为各自的相对萌发率。

2 实验结果

2.1 硼对百合花粉萌发的影响 (图 1)

在有硼培养基中培养的百合花粉萌发率明显高于无硼培养基培养的萌发率, 且生长畸形花粉管数量减少。在硼酸低浓度区域随着硼酸浓度的增加花粉的萌发率也随之增加, 当硼酸浓度增加到 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 花粉的萌发率也达到了最大值, 此后继续增加培养基中的硼酸浓度, 花粉萌发率反而开始下降。由此可知, 硼酸浓度在 $0.01\sim 10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内对百合花粉的萌发起促进作用, 其中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是硼酸促进百合花粉萌发的最佳浓度。

2.2 硼对百合花粉细胞内游离钙离子浓度的影响 (图 2)

硼处理的百合花粉细胞内游离钙离子浓度明显高于无硼处理的浓度, 并且这种细胞内游离钙离子变化是剂量依赖型的, 即依赖于培养基中的硼酸浓度, 随硼酸浓度升高而升高。由图 1、图 2 可以看出 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸诱导的细胞内游离钙离子浓度是启动百合花粉萌发的最佳浓度, 高于或低于这一浓度均会抑制花粉的萌发。

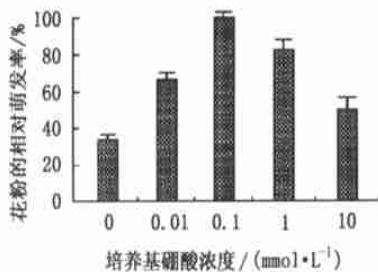


图 1 硼酸对百合花粉萌发率的影响

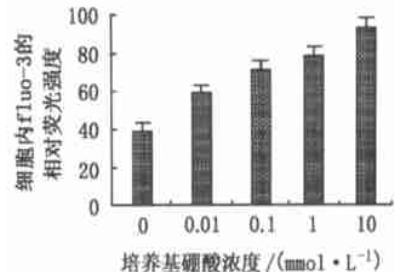


图 2 硼酸对百合花粉细胞内游离钙离子浓度的影响

2.3 硼诱导百合花粉细胞内游离钙离子浓度的时间进程变化过程(图 3)

$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸可以在较短的 10 min 内诱导百合花粉细胞内游离钙离子浓度升高, 细胞的相对荧光强度由硼酸处理前较低的 37.5 增加到 53.8, 以后就维持这一水平并有轻微波动。而在对照无硼酸处理的百合花粉细胞内钙离子没有升高, 反而可能由于激光的漂白作用, 细胞的相对荧光强度表现为轻微下降的趋势。由此可见硼酸可以在短时间内诱导百合花粉细胞内游离钙离子浓度升高。

2.4 胞外钙离子参与硼酸诱导百合花粉细胞内游离钙离子的增加过程(图 4)

在正常存在钙离子的培养基中加入 $0.1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼酸可以明显地增加胞内游离钙离子浓度, 但是在没有钙离子且存在 $2.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ 螯合剂 EGTA 或存在非特异性的质膜钙离子通道抑制剂氯化镧的培养基中, 百合花粉细胞内游离钙离子浓度几乎没有变化, 说明细胞外的钙离子通过质膜的钙离子通道进入细胞内, 参与了硼酸诱导百合花粉细胞内游离钙离子浓度增加这一过程。

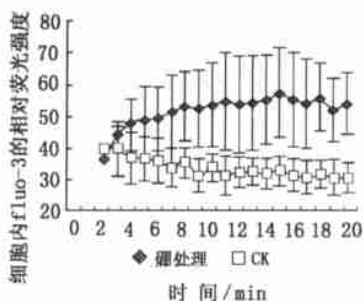


图 3 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸处理对百合花粉细胞游离钙离子浓度影响的时间进程

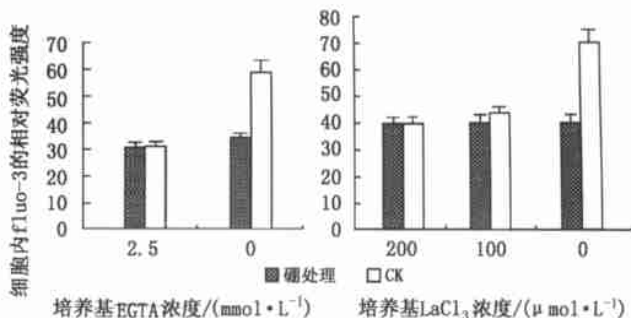


图 4 EGTA 和氯化镧对百合花粉细胞内游离钙离子浓度的影响(硼酸 $0.1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导百合花粉)

3 结论与讨论

1) 细胞内的游离钙离子是细胞感受刺激的第二信使, 它的浓度可以响应外界环境刺激而迅速变化, 进而引起钙离子下游的靶蛋白如 CaM (钙调素)、CDPK (CaM 依赖的蛋白激酶) 等活性的变化, 调节细胞内许多生理生化反应, 从而转导细胞感受的胞外刺激, 以适应环境^[13]。花粉的萌发与花粉管的伸长生长是一个复杂的生理生化反应过程, 该体系已被越来越多地用作研究细胞生长的分子调控机理, 近年来的许多研究结果证明细胞外的钙离子参与了这一过程^[14, 15]。硼对质外体结合钙离子和游离钙离子有影响, 硼有可能对细胞内游离钙离子也产生影响。本研究利用性能稳定的钙离子荧光探针 fluo-3AM 和激光共聚焦显微镜技术, 首次检测了外界硼酸对百合花粉细胞内游离钙离子的影响, 发现硼酸处理可以明显增加细胞内游离钙离子浓度, 而且其增加量与培养基中的硼酸浓度呈剂量依赖关系, 随着硼酸浓度增加细胞内游离钙离子浓度也随之增加。同时为了确定硼酸对花粉萌发的影响, 还测定了硼酸对花粉萌发率的影响, 发现 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸的促进作用最大, 缺硼培养的花粉萌发率很低可能与细胞内此时较低的游离钙离子浓度有关, 而 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸维持了细胞内最佳的启动花粉萌发的游离钙离子浓度, 因此, 花粉的萌发率也表现为最高。

2) 为了探索硼的原初作用机理, 研究重点越来越注意集中在硼对植物细胞作用的早期效应。过去人们对硼对植物的效应研究持续的时间很长, 一般为几个小时、几天甚至几个月, 这很

难区分究竟那些效应是原初反应,观察到的结果往往是一些次级的,或者3级、4级的效应。为了观察硼对细胞内游离钙离子浓度影响的短期效应,本实验在短时间内跟踪了硼对细胞内游离钙离子浓度影响的时间变化过程,发现外加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸可以在短时间内(10 min)即可明显增加细胞内游离钙离子,使其达到启动花粉萌发的最佳浓度,然后维持这一浓度并伴有稍微的波动,由此可见,细胞内游离钙离子变化也是硼对细胞作用的早期效应。

3) 为了进一步证明是否细胞外的钙离子参与了硼酸诱导的百合花粉细胞内游离钙离子浓度增加这一过程,对百合花粉做了2种处理:一个培养基中没有钙离子且存在 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA,另一个培养基中存在非特异性的质膜钙离子通道抑制剂 La^{3+} ,发现这2种处理可以明显抑制硼酸诱导百合花粉细胞内游离钙离子浓度增加的效应,由此可以说明细胞外的钙离子参与了这一过程,并且硼酸是作用于质膜上的钙离子通道使钙离子进入细胞内的,但是目前还不能确定硼酸诱导增加的细胞内游离钙离子是全部来源于细胞外的钙离子,也可能有部分甚至大部分来自于细胞内的钙库,因为细胞内还存在着一种钙动员钙的机制,即细胞外少量钙离子进入细胞启动这一机制,细胞内钙库打开释放出钙离子^[16],于是细胞内外的钙离子共同组成硼酸诱导而增加的细胞内游离钙离子。由此推测硼可能借助于细胞内游离钙离子的变化引起钙离子下游靶蛋白、靶酶活性的变化,进而可能调节细胞的多种生理反应。这一研究结果为进一步探索硼在植物细胞中的原初作用机理提供了新的实验证据。

本研究的大部分工作在河北师大细胞生物学重点实验室完成,期间受到中科院孙大业院士的指正,谨表感谢。

参 考 文 献

- 1 Goldbach H E. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: suggestions for further research and methodological requirements. *J Trace Microprobe Technol*, 1997, 15: 51~ 91
- 2 Shelp B J. Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Gupta U C, ed. *Boron and Its Role in Crop Production*. CRC Press Inc, 1993, chapter 4: 53~ 85
- 3 Loomis W D, Durst R W. Chemistry and biology of boron. *BioFactor*, 1992, 3: 229~ 239
- 4 Fleischer A, Titel C, Ehwald R. The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cell. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1401~ 1410
- 5 Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, et al. Borate-rhamnogalacturonan-11 bonding reinforced by Ca^{2+} retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol*, 1999, 119: 199~ 203
- 6 Muhling K H, Wimmer M, Goldbach H E. Apoplastic and membrane-associated Ca^{2+} in leaves and roots as affected by boron deficiency. *Physiol Plant*, 1998, 102: 179~ 184
- 7 Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium. *Plant Cell*, 1999, 11: 691~ 706
- 8 Gilroy S, Bethke P C, Jones R L. Calcium homeostasis in plants. *J Cell Sci*, 1993, 106: 453~ 462
- 9 Tester M, MacRobbie E A C. Cytoplasmic calcium affects the gating of potassium channels in the plasma membrane of *Chra corallina*: a whole-cell study using calcium-channel effectors. *Planta*, 1990, 180: 569~ 581
- 10 Yang X D, Sun S Q, Li Y Q. Boron deficiency causes changes in the distribution of major polysaccharides of pollen tube wall. *Acta Bot Sin*, 1999, 44: 1169~ 1176
- 11 Shang Z L, Mal G, Wang X C, Sun D Y. Effect of extracellular calmodulin on the cytosolic Ca^{2+}

- concentration in lily pollen grains Acta Bot Sin, 2001, 43: 12~ 17
- 12 Takahashi A, Camacho P, Lechleiter J D, et al Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 1999, 79: 1089~ 1125
- 13 Trewavas A. Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves *Plant Physiol*, 1994, 120: 1~ 6
- 14 Frankling-Tong V E. Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell*, 1999, 11: 727~ 738
- 15 Reiss H D, Herth W, Nobile R. Development of membrane- and calcium - gradients during pollen germination of *Lilium longiflorum*. *Planta*, 1985, 163: 84~ 90
- 16 Zheng Y F. Calcium channel and calcium release channel *Acta Biophys Sin*, 1992, 8: 735~ 744

简讯

科技部正式批准建设植物生理学与生物化学国家重点实验室

为进一步加强基础研究工作,完善国家重点实验室总体布局,科技部决定在植物生理生化开放实验室和作物水分养分高效利用分子生理学实验室的基础上组建并重点建设“植物生理学与生物化学国家重点实验室”。依托单位为中国农业大学、浙江大学。聘任武维华教授为实验室主任,匡廷云院士为学术委员会主任,建设时间为一年。

我校申报成功两个教育部重点实验室

我校两个实验室被批准为教育部重点实验室:植物-土壤相互作用实验室,主任张福锁教授,学术委员会主任石元春院士;现代精细农业系统集成研究实验室,主任韩鲁佳教授,学术委员会主任汪懋华院士。