

学校编码: 10384
学号: 200426054

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

洋葱花药发育过程中 ATPase 的分布特征

**The Distribution of ATPase During the Anther Development
of *ALLIUM CEPA* L.**

吕 丹

指导教师姓名: 田惠桥教授
专业名称: 发育生物学
论文提交日期: 2007年4月17日
论文答辩时间: 2007年5月28日
学位授予日期:

答辩委员会主席: 杨盛昌副教授
评阅人:

2007年5月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	6
1 H ⁺ -ATPase 的类型.....	6
1.1 质膜 H ⁺ -ATPase.....	7
1.2 液泡膜 H ⁺ -ATPase.....	7
1.3 线粒体型 H ⁺ -ATPase.....	7
2 花粉发育.....	8
2.1 小孢子母细胞减数分裂的变化.....	8
2.2 小孢子发生过程中胼胝质壁的动态变化.....	10
2.3 小孢子的极性与不对称分裂.....	11
2.4 花粉壁.....	11
3 花药壁发育.....	13
3.1 表皮、药室内壁、中层.....	13
3.2 绒毡层.....	14
4 药隔组织.....	17
5 花药中的 ATPase 分布.....	18
6 研究目的.....	19
第二章 材料与方法.....	20
1 材料.....	20
2 方法.....	20
2.1 Mg ²⁺ -ATPase 超微细胞化学定位操作流程.....	20
2.2 电镜制样相关药品配置.....	21
第三章 实验结果与分析.....	24
1 造孢时期 ATPase 的分布.....	24
2 小孢子母细胞时期 ATPase 的分布.....	24

3 二分体、四分体时期 ATPase 的分布	25
4 小孢子早期 ATPase 的分布	26
5 小孢子晚期 ATPase 的分布	28
6 二胞花粉 ATPase 的分布	29
7 成熟花粉时期 ATPase 的分布	30
图版及图版说明	31
第四章 讨论	45
1 其他植物花药中的 ATPase 特征	45
2 花粉发育过程中 ATPase 的分布变化	45
2.1 细胞核中 ATPase 分布.....	45
2.2 花粉壁中 ATPase 分布.....	46
2.3 萌发孔中 ATPase 分布.....	47
2.4 生殖细胞壁中 ATPase 分布.....	47
3 药壁组织中 ATPase 分布	49
4 药隔组织 ATPase 分布	50
参考文献	52
致谢	62

CONTENTS

Chinese Abstract.....	1
English Abstract.....	3
Chapter 1 INTRODUCTION.....	6
1 The types of H ⁺ -ATPase.....	6
1.1 Plasmalemma H ⁺ -ATPase.....	7
1.2 Tonoplast H ⁺ -ATPase.....	7
1.3 Mitochondrium H ⁺ -ATPase.....	7
2 Development of microspores.....	8
2.1 Variety during the meiosis of microspore mother cell.....	8
2.2 The development of callose wall in microspore.....	10
2.3 The polar and dissymmetric division of microspore.....	11
2.4 The pollen wall.....	11
3 Development of anther wall.....	13
3.1 Epidermis, endothecium, middle layer.....	13
3.2 Tapetum.....	14
4 The connective of anthers.....	17
5 The distribution of ATPase in anther.....	18
6 The purpose of this study.....	19
Chapter 2 MATERIALS and METHODS.....	20
1 Material.....	20
2 Methods.....	20
2.1 Localization of Mg ²⁺ -ATPase.....	20
2.2 Preparation of material in electron microscope.....	21
Chapter 3 RESULTS and ANALYSIS.....	24
1 ATPase distribution in archesporial cell.....	24
2 ATPase distribution in microspore mother cell.....	24

3 ATPase distribution in dyad and tetrad	25
4 ATPase distribution in early microspore	26
5 ATPase distribution in late microspore	28
6 ATPase distribution in bicellular pollen	29
7 ATPase distribution in mature pollen	30
Figures and Explanation	31
Chapter 4 DISCUSSIONS.....	45
1 ATPase characters in anthers of other plants	45
2 Distribution of ATPase during the pollen development.....	45
2.1 ATPase distribution in nucleus.....	45
2.2 ATPase distribution in pollen wall.....	46
2.3 ATPase distribution in germ pore.....	47
2.4 ATPase distribution in the wall of generative cell	47
3 ATPase distribution in the anther wall	49
4 ATPase distribution in the connective	50
References.....	52
Acknowledgements.....	62

摘 要

ATPase 是分解 ATP、提供能量的代谢酶，它在细胞中分布的部位与多少和细胞的特殊功能有密切联系。不同部位聚集的 ATPase 多寡可反映出该部位的生理活动的强弱，从而推断出细胞中特异功能的状况。本论文用磷酸铅沉淀法对洋葱 (*Allium cepa* L.) 花药发育过程中的 ATPase 分布变化作了详细观察，将花药发育的生物学事件与其细胞中 ATPase 的分布特征相结合分析洋葱花药的发育规律。结论如下：

在洋葱花粉母细胞以前的幼小花药中，各组成细胞中的 ATPase 反应颗粒都很少。在减数分裂时期，小孢子母细胞的一些细胞器中呈现出了 ATPase 反应颗粒，但所有细胞器都特异性地分布在细胞质的周缘区域，细胞的中央区域被染色体占据。在减数分裂后刚形成的四分体小孢子中 ATPase 反应颗粒没有明显增加。洋葱四分体小孢子就开始构建花粉外壁，在其内、外表面特异性地出现了一些 ATPase 反应颗粒。从四分体中游离出来的早期小孢子内 ATPase 反应颗粒依然不多，但在花粉外壁下方有一些 ATPase 反应颗粒特异性地积累，小孢子开始合成花粉内壁。随着小孢子的发育，其细胞质中的 ATPase 反应颗粒逐渐增多。在萌发孔处由于不断有小泡融合到内壁使其加厚，中间形成了一些径向的管状通道，其中沉积了许多 ATPase 反应颗粒。洋葱小孢子不形成大液泡，然而洋葱小孢子的细胞核还是位于花粉萌发孔对面，仍显示出了一种极性分布。在晚期小孢子的核仁和核质中有较多 ATPase 反应颗粒，细胞质中有一些小泡内也积累了明显的 ATPase 反应颗粒，萌发孔处仍然特异性地积累了大量的 ATPase，暗示着萌发孔是营养物质进入花粉的通道，可能与 ATPase 有关。晚期小孢子的不等有丝分裂形成二胞花粉，在营养及生殖细胞核中的 ATPase 反应颗粒较多，而在细胞质中较少。在生殖细胞脱离花粉内壁的过程中，大量的 ATPase 反应颗粒特异性地聚集在生殖细胞壁与花粉内壁相连的部位，随着生殖细胞不断向营养细胞内移动而逐渐减少。当生殖细胞完全进入到营养细胞中时，分布在生殖细胞壁上的 ATPase 反应颗粒也完全消失。以后，营养细胞中的 ATPase 反应颗粒逐渐增强而生殖细胞中的则逐渐减少。洋葱成熟花粉粒为二胞花粉，营养细胞质中弥散细小的 ATPase 反应颗粒，在萌发孔处仍可见有许多体积稍大的 ATPase 反应颗粒。

洋葱的花药壁由表皮、药室内壁、中层、绒毡层四层细胞组成。在花药发

育过程中表皮、药室内壁和中层细胞高度液泡化，细胞质中的 ATPase 反应颗粒一直很少，主要分布在质膜部位，表明这三层细胞的主要功能是物质的转运。绒毡层细胞内 ATPase 反应颗粒一直都是较多，且绒毡层细胞内切向面细胞膜上的 ATPase 反应颗粒要比外切向面上的多。ATPase 反应颗粒在绒毡层细胞质膜上的极性分布特征暗示着其向药室内定向转运营养物质的功能。

在洋葱花药的整个发育过程中，药隔薄壁细胞的质膜、细胞质、细胞壁及胞间隙上一直都有一定 ATPase 反应颗粒；而维管束薄壁细胞的细胞核在小孢子发育晚期后其 ATPase 反应颗粒有所减少，但在细胞质膜及胞间隙中的 ATPase 反应活性有所增加。显示体内的营养物质向花药中的转运除了共质体运输途径外，质外体运输活性随着小孢子的发育而增加。

关键词：洋葱；花药；ATPase

Abstract

ATPase is a kind of metabolic enzyme that decomposes ATP to provide energy. ATPase distribution is closely related to the cell special function which needs some energy. Therefore, the amount of ATPase accumulated in different parts of a cell can display the amount of ATP in this part, which can also reflect this metabolic strength occurring in the place. In this study, we investigated the dynamic distribution in the anther cells of onion (*Allium cepa* L.) during their development using ATPase-lead nitrate depositional method. The mechanism of anther development of onion will be better understood once the characters of anther development are linked together with ATPase distribution. The results as follows:

During early anther development, few ATPase precipitates appeared in the cells of anther at the stage of microspore mother cells. When microspore mother cells divided, some ATPase precipitates were located in some organelles which mainly distributed in peripheral region of the cell during meiosis, while the central regions were occupied by chromosomes. There were still few ATPase precipitates in the tetrad microspores. Microspores of onion began to form the exine on its surface and some ATPase precipitates accumulated on the two sides of exine. ATPase precipitates did not increase at all in the cytoplasm of young microspore just released from the tetrad. Meanwhile the microspore began to synthesize its intine and many ATPase precipitates specifically accumulated in the intine. With the development of young microspore, the precipitates increased in its cytoplasm. At the same time, some small vacuoles fused with the intine of germ pore making it thickened and forming some tubular channels intermediate where a large number of ATPase precipitates located. No a large vacuole formed during the microspore development of onion. However the nucleus of microspore can still locate in the region in opposite germ pore, showing a kind of polar state. There were more ATPase precipitates in nucleolus and karyoplasm of microspore, and its cytoplasmic vesicles also contained some significant ATPase precipitates. The germ pore accumulated a lot of ATPase too, suggesting that the pore was a gate that the nutritional substances entered into microspore, and ATPase

involved in this process. The polar microspore divided inequilaterally and formed a 2-cellular pollen grain after its mitosis. ATPase precipitates accumulated more in both nuclei of vegetative cell and generative cell but less in the cytoplasm. When the generative cell detached from the intine of pollen, abundant ATPase precipitates specially accumulated in the place where generative cell connected. With generative cell detaching from intine, abundant ATPase precipitates appeared in the region of intine where generative cell attached, suggesting more energy consumed during this process. When the generative cell was completely suspended in the cytoplasm of the vegetative cell, the precipitates on the wall of the generative cell entirely disappeared. With pollen development, the number of ATPase precipitates gradually increased in the vegetative cell but it did not happened in generative cell, which displayed a difference of ATPase precipitates both cells. The mature pollen of onion was 2-cellular, and in the cytoplasm of the vegetative cell scattered some tiny ATPase precipitates.

The anther wall of onion was composed of four layers of cells, namely, epidermis, endothecium, middle layer and tapetum. At early stage of anther development, epidermis, endothecium, and middle layer became high vacuolization, and few ATPase precipitates were in their cytoplasm. However, there were some precipitates located on their plasma membranes, suggesting their function of transporting nutriment. The quantity of ATPase precipitates of tapetal cells was the highest in the cells of anther wall. The inner surface of tapetum also accumulated more ATPase precipitates than the outer side. The polar distribution of ATPase precipitates of tapetal cells indicated their primary function of transporting nutrition materiel into locule.

During anther development, the ATPase precipitates in the plasma membrane, cytoplasm, the cell walls and cellular gap of the somatic cells in connective tissue also displayed some changes, which might reflect state of transporting material into anther. The nutrition materiel can be transported into the locule not only by symplast approach, but also by apoplast approach during anther development.

Key words: *Allium cepa* L.; Anther; ATPase;

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

物质代谢、能量转换和信息传递是细胞生命活动的三个重要方面。ATPase 是分解细胞中的 ATP 以获得能量的代谢酶，在生物体细胞内广泛存在。ATPase 水解 ATP，为各种细胞的运动、物质运输、信号传导、细胞内物质的合成与分解等代谢活动提供能量^[1]，它广泛存在于细胞核、细胞质、细胞壁、线粒体和叶绿体等膜系统和非膜性系统^[1-6]。真核细胞中，线粒体和叶绿体的 ATPase 主要是合成 ATP，其余部位 ATPase 是水解 ATP 以获取生物能量的代谢酶^[1]，探索 ATPase 在细胞中的分布状态是研究细胞生理状态的一种重要手段^[2, 7]。

以往的许多研究发现，在同一器官的不同发育时期、不同发育状态下，或在同一时期不同器官的细胞中，ATPase 的分布状况不同，呈现出一种时空的变化，与植物组织的功能、发育状态、细胞的生理密切相关^[1-9]。大量的实验结果表明：在植物细胞中，ATPase 的反应产物主要位于细胞壁，质膜，细胞核，核仁，胞间连丝^[5-9]。ATPase 还分布于特定细胞的内质网，液泡膜，细胞间隙；也有研究表明，在细胞质，线粒体和叶绿体上也存在反应产物；同时 ATPase 还分布于特定的细胞器上，如花药绒毡层淀粉粒，巨嗜泡上^[9]。通常认为：细胞间隙和细胞壁上的 ATPase 主要参与物质的质外体运输过程；胞间连丝、质膜、内质网、高尔基体、液泡、小泡、核膜等膜系上的 ATPase 主要参与物质的分泌和共质体运输过程^[1]；而线粒体，叶绿体片层内的 ATPase 主要参与 ATP 的合成过程^[9]；同时核质中的 ATPase 与染色质的组装和空间生理形态的折叠有关^[10]。ATPase 在细胞中的多少可反映出细胞代谢程度的高低；细胞中局部区域 ATPase 的多少又可反映出细胞某一功能的状态。

植物细胞存在多种类型的 ATPase，其在细胞内的分布位置不同，功能亦存在差异。从功能上，ATPase 存在三种类型： Mg^{2+} -ATPase(H^+ -ATPase)参与质子转运，与能量代谢密切相关^[11]； Ca^{2+} -ATPase 参与细胞 Ca^{2+} 的转运，与信号转导有关^[12-13]； Na^+ , K^+ -ATPase 参与 Na^+ , K^+ 离子运输^[14]。本文主要研究的是 H^+ -ATPase 在洋葱花药的分布特征。

1 H^+ -ATPase 的类型

H^+ -ATPase 存在于动、植物细胞的质膜和各种内膜系统中，在代谢系统中起着非常重要的作用。现已知生物膜 H^+ -ATPase 有三大类：质膜上的 H^+ -ATPase (P

型)、线粒体内膜和叶绿体的类囊体膜上的 H^+ -ATPase (F 型) 和液泡膜上的 H^+ -ATPase (V 型)。不同类型的 H^+ -ATPase 其活性都依赖于二价阳离子, 其中 Mg^{2+} 对于酶的活性是必须的, 可依据不同的抑制剂对其抑制性予以区分^[15]。

1.1 质膜 H^+ -ATPase

质膜 H^+ -ATPase 是由 Hodges 等 (1972) 首先发现的, 他们以纯化的质膜微囊为材料发现其具有膜结合的 ATPase 水解活力^[16]。此后, 人们分别用质膜微囊和重组脂酶体发现伴随 ATP 水解有跨膜 H^+ 的转运^[17-19], 因此认为 ATPase 是一种质子泵。目前认为, 由质膜 H^+ -ATPase 产生的跨膜质子电动势是植物细胞跨膜物质运输的原初动力^[7]。该酶还参与植物生长发育等诸多生理生化过程, 因而被称为植物细胞的“主宰酶”(master enzyme)^[7,20]。它在能量代谢、物质的吸收和运输等生理功能上具有重大意义, 主要表现在以下几个方面: 调控细胞内环境 pH; 产生跨膜质子电势, 促进离子及分子的运输; 控制细胞伸长生长; 控制种子萌发; 影响气孔和叶柄活动; 参与植物极性生长过程^[21]。

1.2 液泡膜 H^+ -ATPase

植物液泡膜 H^+ -ATPase 是一种多寡聚酶, 分子量约为 450-600KD, 包括外周蛋白 (V_1) 和膜结合蛋白 (V_0) 两部分: V_1 由 5-7 种亚基组成, 有 ATP 的结合位点, 催化 ATP 的水解; V_0 主要由 16KD 亚基组成, 参与质子的跨膜转运^[22]。 V_1 和 V_0 分离导致酶活性丧失。植物液泡膜 H^+ -ATPase 有着不同于 P 型和 F 型的抑制特性和离子激活特性^[25]。

液泡膜 H^+ -ATPase 的生物功能是消耗 ATP, 跨膜向液泡内转运质子使之酸化从而产生质子跨膜梯度, 为各种离子和代谢物的跨膜运输提供动力, 以此影响细胞膨压和细胞体积的增大^[24]。实验表明质子电势梯度对蛋白质的分类是非常重要的, 然而, 植物生理的独特性, 包括营养运输、开花、抗逆作用, 以及保卫细胞的运动, 小泡和分生组织的特有功能中都有 H^+ -ATPase 的参与^[25]。液泡膜 H^+ -ATPase 的生物功能很大程度上受到 pH 值、温度的影响, 因此它同植物的抗盐性和抗冻性有密切的关系^[26]。

1.3 线粒体型 H^+ -ATPase

此种类型的 H^+ -ATPase 存在于线粒体内膜和叶绿体类囊体膜上。由两部分组成: 嵌合于线粒体内膜及叶绿体类囊体膜内的 CF_0 和突出于膜表面的较亲水的

CF₁。此酶由九种不同亚基组成，总分子量为 550KD^[27]。叶绿体和线粒体分别通过光合磷酸化和氧化磷酸化作用合成 ATP，这是和其它二种 H⁺-ATPase 最大的不同。这种 ATP 合成酶在所有活细胞中起着将其它能量用于合成生物中的能量通货——ATP 的能量转换作用^[27]。

2 花粉发育

高等植物花粉发育是一个形态、结构快速变化过程，期间发生了明显的细胞质重组、细胞核的移动，小孢子的不等分裂等骤变型的细胞分化过程^[28]。这些细胞形态上的发育特征与 ATPase 分布的关系是研究花粉发育的一个新课题，需要结合花粉发育的特征对其 ATPase 的分布及功能做深入分析。

2.1 小孢子母细胞减数分裂的变化

小孢子是小孢子母细胞减数分裂的产物，是配子体的第一个细胞。揭示减数分裂过程变化与小孢子发生、发育的关系一直是人们研究的热点之一^[28]。

2.1.1 细胞质重组

在减数分裂过程中，被子植物小孢子母细胞内部发生了深刻的变化，小孢子母细胞为适应减数分裂的需要，保持着较高的代谢水平，随着核的巨变，细胞器及内含物均发生了变化。早在 1971 年，有学者对紫露草属 (*Tradescantia*) 和百合属 (*Lilium*) 进行了详尽的电镜研究^[29]。在百合属植物减数分裂前，胞质中的核糖体数量下降，核分裂期间核糖体数量恢复，线粒体和质体也发生了显著的变化。前期 I 时，线粒体逐渐失去内部的结构，变为球形，仅保留少量的嵴，基质电子较不透明；减数分裂后再开始分化，至小孢子发育时，线粒体又发育出有嵴的正常结构。质体也有类似的脱分化和再分化的变化：细线期质体失去淀粉及片层系统减退，到粗线期时，结构达到最大的简化。质体的再分化是在四分体时期开始，其发达的片层和淀粉重新出现^[30]。研究证实，这一现象也存在于其它植物中^[31-39]。Dickinson 称这种现象为胞质重组，是减数分裂的特征，因为由二倍的孢子体向单倍的配子体转变需要特殊的环境，细胞质的改组可消除旧的孢子体的影响，为新的配子体发育做好准备^[29]。细胞质改组主要涉及核糖体、质体和线粒体等细胞器结构和数量上的变化。在陆地棉中也观察到了类似的细胞质改组现象：减数分裂前期 I 的细线期到偶线期，核糖体密度显著降低，粗线期至双线期至极低水平；同时线粒体和质体的基质电子密度增高，内部结构变得模糊；到中

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库