

文章编号: 1000-6281(2022) 01-0053-08

裸子植物和被子植物花粉管生长机制的细胞学比较

郑茂钟^{1,2}, 林立^{1,2}, 叶宏萌^{1,2}, 华伟平^{1,2}

(1. 武夷学院生态与资源工程学院 福建 武夷山 354300; 2. 福建省生态产业绿色
技术重点实验室 福建 武夷山 354300)

摘 要 为了比较裸子植物和被子植物花粉管生长机制,本研究利用激光共聚焦显微镜、全内反射荧光显微镜、透射电子显微镜观测比较了青杆、雪松、烟草和百合花粉管中 FM4-64 染色的时间变化特性和波动特性、囊泡移动速度、单位时间内细胞壁体积的增加。结果发现:与被子植物烟草和百合花粉管相比,裸子植物青杆和雪松花粉管中 FM4-64 荧光强度前期增加速度慢,后期降低速度慢,表明裸子植物花粉管的胞吞和胞吐速率明显低于被子植物花粉管。其次,裸子植物中的青杆和雪松花粉管中分别只有 28% 和 34% 的囊泡在移动,且多数囊泡移动速度小于被子植物烟草和百合花粉管,揭示了裸子植物花粉管中单位时间内能移动到顶端进行胞吐作用的囊泡的数量要少于被子植物的。然而裸子植物青杆和雪松花粉管单位时间内需要增加的细胞壁体积大于被子植物烟草花粉管。这些结果暗示着来自囊泡的细胞壁前体物质的积累对裸子植物和被子植物花粉管顶端细胞壁的增加的贡献是不同的。

关键词 花粉管; 被子植物; 裸子植物; 胞吐; 胞吞; 生长机制

中图分类号: Q256; Q336; Q274 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1000-6281.2022.01.009

花粉管是裸子植物和被子植物有性生殖过程中最重要的结构之一,其在将植物精细胞核运输到卵细胞进行授精作用的过程中起着至关重要的作用。与此功能相适应,花粉管生长仅限定在顶端,侧面不伸长,形成一种有半球形顶端的圆柱形细胞。由于花粉管这种特殊的生长模式及其在植物有性生殖过程中的重要作用,大量研究报道了花粉管结构、组成和生长机制^[1-3]。这些研究中多是以被子植物花粉管为研究对象。迄今为止,被子植物花粉管的生长被认为主要是由于高尔基体来源的果胶质,经囊泡运输到顶端生长点后,通过胞吐作用沉积在原有的细胞壁上而实现^[4-5]。此过程中通过胞吐作用而融合到顶端细胞膜上过剩的质膜通过胞吞作用回到细胞质中,并入内膜循环^[6]。

裸子植物花粉管虽然在形态上与被子植物花粉管相像。但从现有的研究结果看,裸子植物花粉管与被子植物花粉管存在较大差异。例如:裸子植物的花粉管具有在进化上较原始的特性,生长缓慢^[7],具有分叉的现象等^[8]。裸子植物花粉管细胞壁的结构也与被子植物花粉管具有 2 层细胞壁的结构不同^[9-11],它们都没有明显的分层结构^[12-13]。裸子植物花粉管壁的组成成分与被子植物花粉管壁

的存在差异^[7],且不同属的裸子植物花粉管壁的组成也存在差异^[14]。裸子植物花粉管内部的结构组分也与被子植物花粉管存在差异,包括细胞器的分布^[15-16],微丝骨架的分布^[17-18],细胞质中钙离子的浓度梯度^[19-20]等。结构上的差异暗示着裸子植物的生长可能与被子植物花粉管的生长机制存在差异。然而迄今为止,专门比较裸子植物花粉管与被子植物花粉管的研究还未有报道。

为了比较裸子植物和被子植物花粉管生长差异背后的机制,本研究运用透射电子显微镜、激光共聚焦显微镜和全内反射荧光显微镜,观测比较了裸子植物青杆、雪松花粉管和被子植物烟草、百合花粉管生长过程中单位时间内细胞壁体积的变化、FM4-64 染色的时间变化特性和波动特性及囊泡移动速度。

1 材料与方法

1.1 材料

实验选用的材料裸子植物的代表树种青杆 (*Picea wilsonii* Mast.) 花粉、雪松 (*Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don) 花粉,采自北京中国科学院植物研究所园内。烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 花粉

收稿日期: 2021-04-20; 修订日期: 2021-06-21

基金项目: 中央引导地方科技发展专项 (No. 2020L3025); 武夷学院引进人才资助项目 (No. YJ202119)。

作者简介: 郑茂钟 (1976-), 男 (汉族), 福建古田人, 副教授, 博士。E-mail: 2469637166qq.com

采自北京中国科学院植物研究所的温室内。百合 (*Lilium longiflorum* Thunb.) 花粉来自于花店新鲜百合上的花药。花粉以 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度接种于液体培养基中。青杆、雪松花粉培养基含有 12% 蔗糖, 0.01% H_3BO_3 , 0.01% KH_2PO_4 , 0.03% CaCl_2 ; 百合、烟草花粉培养基含有 15% 蔗糖, 0.01% H_3BO_3 , 0.01% KH_2PO_4 , 0.01% CaCl_2 。所有样品置摇床 (125 r/min) 中, 24 °C 恒温培养。

1.2 实验方法

1.2.1 通过透射电镜图像分析花粉管胞吞胞吐速率

花粉管生长速度、单位时间细胞壁体积的变化、胞吐速率、胞吞速率参数的测定方法详见于郑茂钟等 (2014) [21]。简略而言, 花粉管生长速度是通过测量已知培养时长的花粉管长度变化而估算; 花粉管内径、壁厚、胞吐囊泡直径、胞吞囊泡直径是通过透射电子显微镜拍摄的花粉管超薄切片图片而获得。单位时间细胞壁体积的变化则是将花粉管看成是圆柱形 (顶端是半球体), 并假定花粉管的生长是一种匀速的生长, 从而根据圆柱体体积计算方法利用花粉管生长速度、花粉管内径和壁厚进行估算。胞吐速率和胞吞速率估算则是假定花粉管顶端生长过程中细胞壁体积的增加都完全来自于胞吐囊泡所携带的物质, 且这些物质在壁上沉积并不改变其体积, 只是改变了形状, 从而根据单位时间细胞壁体积的变化、胞吐囊泡直径和胞吞囊泡直径计算。

1.2.2 FM4-64 的装载

方法参照 Parton 等 (2001) [22], 但略有改动。FM4-64 储存液用正常培养基稀释 10 倍。然后把培养的花粉管取 100 μL 至 eppendorf 管内, 取 1 μL 稀释后的 FM4-64 加入 100 μL 的花粉管悬浮液内, 使 FM4-64 的最终浓度为 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 FM4-64 染色的激光共聚焦显微镜的观察

激光共聚焦显微镜的观察采用 ZEISS LSM 510 META (Germany) 系统, 63 \times 水镜, 激发波长为 514 nm, 采集滤光片为 530~600 nm。时间序列采集速率百合为 5.3 s/帧, 烟草、青杆、雪松为 12 s/帧。

1.2.4 全内反射荧光显微镜观测花粉管中囊泡移动速度

FM4-64 染色 30 min 后, 利用入射光角度可变的全内反射荧光显微镜拍摄花粉管内囊泡运动。入射光角度可变的全内反射荧光显微镜是在倒置显微镜 (IX81; Olympus) 的基础上构建的。多通道

氩离子激光发射器发出的光 (458, 488, 515 nm; 30 mW) 通过单模块光纤和三组照明镜头聚焦在高孔径物镜 (Apo 1003 OHR; NA 1.65; Olympus) 的背面, 从而允许样品的荧光被激发。FM4-64 的激发波长为 514 nm。荧光通过 100 倍油镜, 530~600 nm 滤光片, 由电耦合 CCD (Micromax, MMX-512-BFT; Princeton Instruments) 以 200 ms/帧的速度收集 time-lapse 图像序列。

囊泡移动速度的测量方法参照 Zheng 等 [23] 测定线粒体移动速度的方法。具体为用 Image J 软件跟踪单个囊泡的确切位置 $[(x_1, y_1), (x_2, y_2), (x_3, y_3) \dots (x_n, y_n)]$ 。被跟踪囊泡在间隔时间 (T_n) 内的瞬时移动位移 (D_n) 用以下公式计算:

$$D_n = \sqrt{(x_n - x_{n-1})^2 + (y_n - y_{n-1})^2}。$$

从而囊泡的瞬时移动速度 (V_n) 用公式: $V_n = D_n/T_n$ 计算。

囊泡的移动速度以平均移动速度 (\bar{V}) 表示为: $\bar{V} = \sum V_n/n$ 。

本实验分析了每种植物最少 7 根花粉管, 统计了每种花粉管至少 650 个囊泡的移动速度。

2 实验结果

2.1 四种植物花粉管的物理参数

表 1 显示了通过电镜图片测量统计得到的四种植物花粉管的物理参数。这些参数中花粉管生长速度、花粉管内径、花粉管壁厚、胞吐囊泡直径、胞吞囊泡直径是直接测定值。由表 1 可知, 裸子植物青杆、雪松花粉管与被子植物百合、烟草花粉管存在着最明显的不同是前者的生长速度远小于后者。青杆和雪松花粉管生长速度分别 7.2 $\mu\text{m}/\text{h}$ 和 5.13 $\mu\text{m}/\text{h}$, 是被子植物百合花粉管生长速度的 0.9% ~ 1.2%, 是烟草花粉管生长速度的 15.9% ~ 22.3%。其次青杆和雪松花粉管内径和壁厚明显大于百合和烟草花粉管。根据花粉管的生长速度、花粉管内径和花粉管壁厚可以估算出青杆、雪松、百合、烟草花粉管单位时间内细胞壁体积的变化分别是 842.4 $\mu\text{m}^3/\text{h}$ 、1 001.6 $\mu\text{m}^3/\text{h}$ 、4 616.6 $\mu\text{m}^3/\text{h}$ 、222.3 $\mu\text{m}^3/\text{h}$ 。显然裸子植物青杆和雪松花粉管单位时间内需要增加的细胞壁体积大于被子植物烟草花粉管。若这四种植物花粉管细胞壁物质主要来自于囊泡的运输, 那么裸子植物青杆和雪松花粉管生长所需要的胞吐速率和胞吞速率大于烟草花粉管 (表 1)。

表 1 电镜图像测量统计的四种植物花粉管的物理参数

Table 1 The physical parameters of four species pollen tubes obtained from the ultrastructural imagings

物种	花粉管生长速度/($\mu\text{m}/\text{h}$)	花粉管内径/ μm	花粉管壁厚/ μm	单位时间内细胞壁体积的变化/($\mu\text{m}^3/\text{h}$)	胞吐囊泡直径/ μm	胞吞囊泡直径/ μm	胞吐速率/(个/min)	胞吞速率/(个/min)
青杆	7.2	29.373	1.218	842.4	0.237	0.0475	2015	49778
雪松	5.13	21.113	2.620	1001.6	0.21	0.046	3444	71572
百合	587	13.28	0.186	4616.6	0.244	0.035	10121	465370
烟草	32.3	6.98	0.301	222.3	0.142	0.0467	2472	22427

2.2 四种植物花粉管 FM4-64 的时间标记模式

图 1 显示了四种植物花粉管中 FM4-64 的时间标记模式。结果表明在青杆和雪松花粉管中,染色 2 min 时,FM4-64 集中在质膜上,此时细胞质中未见有染色;随后在 5 min 时,顶端细胞质中出现有极少的染色;到 10~15 min 时,花粉管顶端细胞质中才有明显的染色;而到了 45 min,花粉管中的染色都不断增强(图 1A 和 1B)。在百合和烟草花粉管中,染色 2 min 时,花粉管质膜上染色明显,同时已经见到

有染料进入细胞质中;10 min 时,花粉管顶端细胞质中有了明亮的染料聚集;15 min 时细胞质膜上的染色明显的减少;25 min 左右,花粉管顶端染色达到最大亮度;其后荧光染色又逐渐降低,但 V 形染色形状依然还保持(图 1C 和 1D)。通过荧光强度的时间变化也验证裸子植物青杆和雪松花粉管中 FM4-64 逐渐的增强;而在 25 min 之前,被子植物百合和烟草花粉管中 FM4-64 荧光强度逐渐升高,而且荧光强度高于裸子植物的,随后逐渐降低(图 2)。

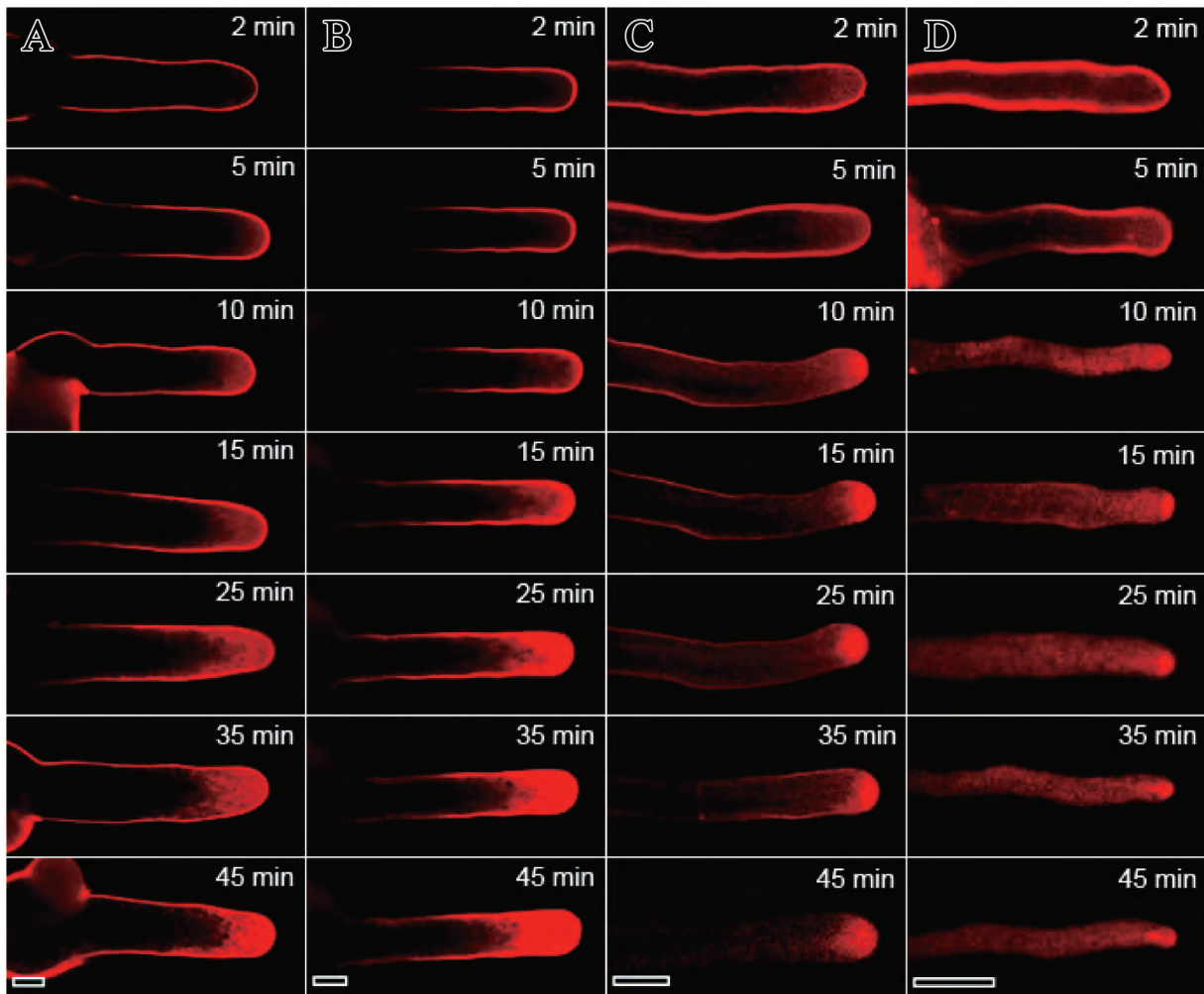


图 1 四种植物花粉管中 FM4-64 染色的时间变化。A. 青杆; B. 雪松; C. 百合; D. 烟草。Bar=20 μm

Fig.1 FM4-64-uptake time courses in four species pollen tubes. A. *Picea wisonii* Mast. pollen tube; B. *Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don pollen tube; C. *Lilium longiflorum* Thunb. pollen tube; D. *Nicotiana tabacum* L. pollen tube.

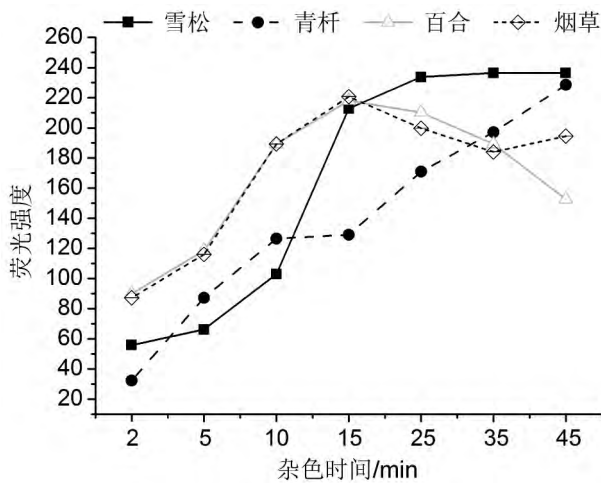


图 2 四种花粉管中 FM4-64 荧光强度的时间变化。

Fig.2 Variation of fluorescence intensity of FM4-64 in four species pollen tubes.

这些结果说明了裸子植物花粉管胞吞速度小于被子植物,而胞吐速度大于被子植物。

2.3 四种植物花粉管 FM4-64 波动特性

FM4-64 波动特性是花粉管胞吞、胞吐、囊泡运输、顶端生长引起的体积变化等多种因素造成的。图 3 显示了花粉管顶端的染色形状形成后,在一段扫描时间内亚顶端部位(图 3A, 3C, 3E 和 3G 矩形框显示)的 FM4-64 呈现的规律性波动。表 2 统计了四种植物花粉管 FM4-64 波动的周期和振幅。结果显示青杆、雪松、百合、烟草的波动周期分别为 $(46.56 \pm 11.18) s$ 、 $(41.00 \pm 13.08) s$ 、 $(22.69 \pm 7.24) s$ 、 $(35.30 \pm 9.41) s$; 其波动的振幅分别为 3.89 ± 1.47 、 5.24 ± 3.14 、 11.58 ± 6.42 、 20.89 ± 11.53 。显然裸子植物花粉管的 FM4-64 波动周期大于被子植物花粉管,前者的振幅小于后者。

表 2 四种花粉管中 FM4-64 波动周期和振幅
Table 2 The period and amplitude of FM4-64 fluctuation in four species pollen tubes

花粉管类型	周期/s	振幅
百合	22.69 ± 7.24	11.58 ± 6.42
烟草	35.30 ± 9.41	20.89 ± 11.53
青杆	46.56 ± 11.18	3.89 ± 1.47
雪松	41.00 ± 13.08	5.24 ± 3.14

2.4 四种植物花粉管囊泡移动速度的比较

在被子植物花粉管中,细胞壁前体物质被认为是通过高尔基体产生的囊泡运输的。经过统计发现,4 种植物花粉管中囊泡的移动情况差异显著。在间隔 1 min 内,青杆花粉管中只有 28% 的囊泡在移动,雪松花粉管中有 34% 的囊泡在移动,百合和

烟草花粉管中的囊泡都在移动中。对于被跟踪到的囊泡的瞬时移动速度进行归类统计,显示青杆花粉管中囊泡的瞬时移动速度为 $0.5 \sim 0.99 \mu m/s$ 的囊泡占 33.3%,为 $1.0 \sim 1.99 \mu m/s$ 的囊泡占 38.1%;雪松花粉管中囊泡的瞬时移动速度为 $0.5 \sim 0.99 \mu m/s$ 的囊泡占 31.7%,为 $1.0 \sim 1.99 \mu m/s$ 的囊泡占 37.8%;而百合和烟草花粉管中囊泡的瞬时移动速度都大于 $1.0 \mu m/s$,瞬时移动速度 $1.0 \sim 1.99 \mu m/s$ 的囊泡分别占 11.4% 和 19.2% (图 4)。连续跟踪一个囊泡的移动显示青杆和雪松花粉管中囊泡的移动常常停顿(图 5A 和 5B);而百合和烟草花粉管中囊泡移动速度较稳定(图 5C 和 5D)。然而有趣的是,对于单个囊泡的瞬时最大速度的比较发现,这四种花粉管中囊泡的最大瞬时移动速度的差别并不像平均速度那样大:在青杆、雪松、百合、烟草中分别为 $10.68 \mu m/s$ 、 $11.38 \mu m/s$ 、 $17.45 \mu m/s$ 、 $12.5 \mu m/s$ 。

3 讨论

FM4-64 被用于活体观测真核细胞的内吞和囊泡运输过程。它只能锚定在脂膜双分子层的外页才能激发强烈的荧光^[24]。进行植物细胞 FM4-64 染色后,细胞膜立即染色,随后几分钟内通过胞吞囊泡进入细胞,随着细胞内膜循环的过程使得高尔基体和胞吐囊泡等内膜系统都被染色^[25]。本研究通过荧光强度的时间变化显示,与裸子植物青杆和雪松花粉管比较,被子植物烟草和百合花粉管中 FM4-64 在染色初期出现的更早,在 25 min 之后其荧光强度更快地降低,揭示了被子植物花粉管的胞吞和胞吐速率明显高于裸子植物。此外本研究中观测到裸子植物青杆和雪松花粉管中分别只有 28% 和 34% 的囊泡在移动,且多数囊泡移动速度小于被子植物烟草和百合花粉管,说明裸子植物花粉管中单位时间内能移动到顶端进行胞吐作用的囊泡数量要少于被子植物的。甚者裸子植物花粉管中 FM4-64 波动的振幅明显小于被子植物花粉管的观测结果也进一步支持了被子植物花粉管的胞吞和胞吐速率明显高于裸子植物的结论。

有趣的是,通过透射电子显微镜观测本研究发现裸子植物青杆和雪松花粉管单位时间内需要增加的细胞壁体积大于被子植物烟草花粉管;若这四种花粉管细胞壁物质主要来自于囊泡的运输,那么裸子植物青杆和雪松花粉管生长所需要的胞吐速度和胞吞速度大于烟草花粉管。这显然与 FM4-64

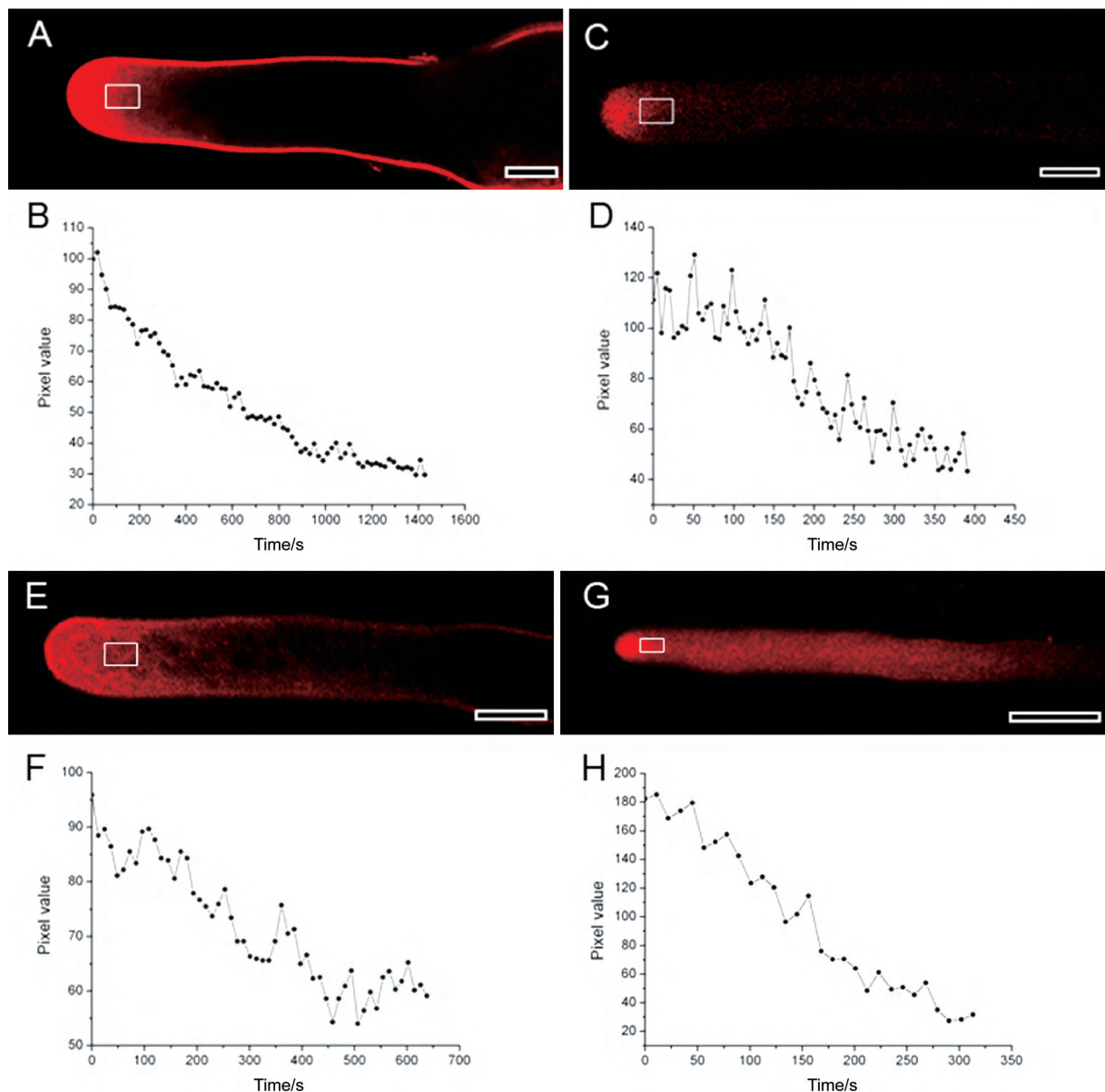


图3 花粉管顶端 FM4-64 的波动动态。A. 青杆; C. 百合; E. 雪松; G. 烟草。B, D, F, H. 分别是 A, C, E 和 G 图中方框处的时间荧光密度图。Bar=20 μm

Fig.3 Quantitative analysis of the fluctuation of FM4-64 staining in growing pollen tubes. A. *Picea wisonii* Mast. pollen tube; C. *Lilium longiflorum* Thunb. pollen tube; E. *Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don pollen tube; G. *Nicotiana tabacum* L. pollen tube. B, D, F and G stands for graphs of fluorescence intensity against time for the areas indicated by box in A, C, E and G.

染色观测的结果相矛盾。考虑到通过透射电子显微镜观测估算花粉管细胞壁体积的变化和所需的胞吞和胞吐速率的模型分析是以花粉管细胞壁前体物质主要来自于囊泡的运输为前提条件的^[26], 这种观测结果的矛盾可能暗示着来自运输囊泡的细胞壁前体物质在裸子植物和被子植物花粉管的细胞壁中所占的比例不同。构成植物细胞壁的主要聚合物中, 半纤维素、果胶和富含羟脯氨酸的糖蛋白是在高尔基体中合成而后通过囊泡运输到细胞生长点参与细胞壁的合成^[7]; 而纤维素和胼胝质是

通过细胞膜上相应的酶合成^[27]。被子植物花粉管顶端是由果胶和半纤维素构成的单层细胞壁^[28-29]; 而管中的细胞壁为 2 层, 内层细胞壁主要由胼胝质和纤维素构成^[9-11]。考虑到花粉管的生长是在顶端, 显然果胶和半纤维素通过囊泡运输和胞吐作用而堆积成顶端单层细胞壁是被子植物花粉管生长的主要机制。与被子植物不同的是, 裸子植物整根花粉管只有一层细胞壁^[12-13]。荧光标记显示, 青杆和云杉花粉管顶端细胞壁分布着纤维素或胼胝质^[30-31]。这暗示着纤维素或胼胝质在花粉管顶端

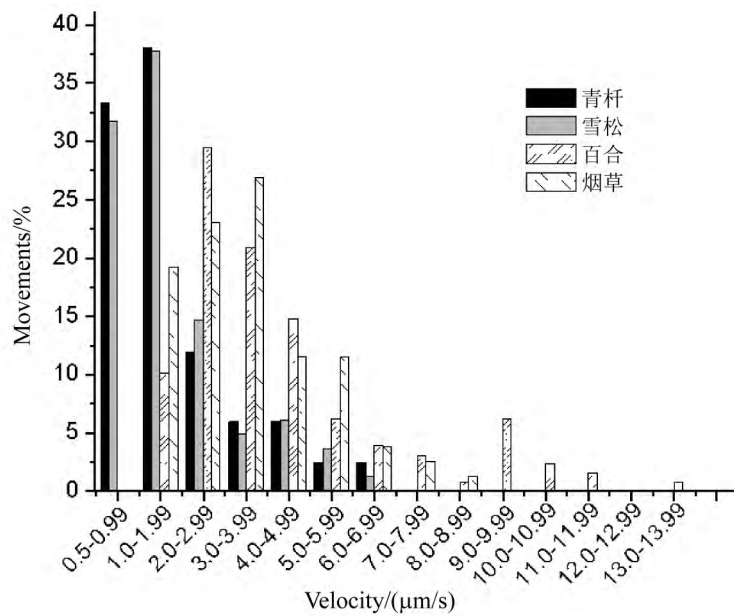


图 4 四种花粉管中囊泡移动的平均速度分布 ($n>650$)。

Fig.4 Frequency distribution of average velocities of vesicle movements in four species pollen tubes ($n>650$).

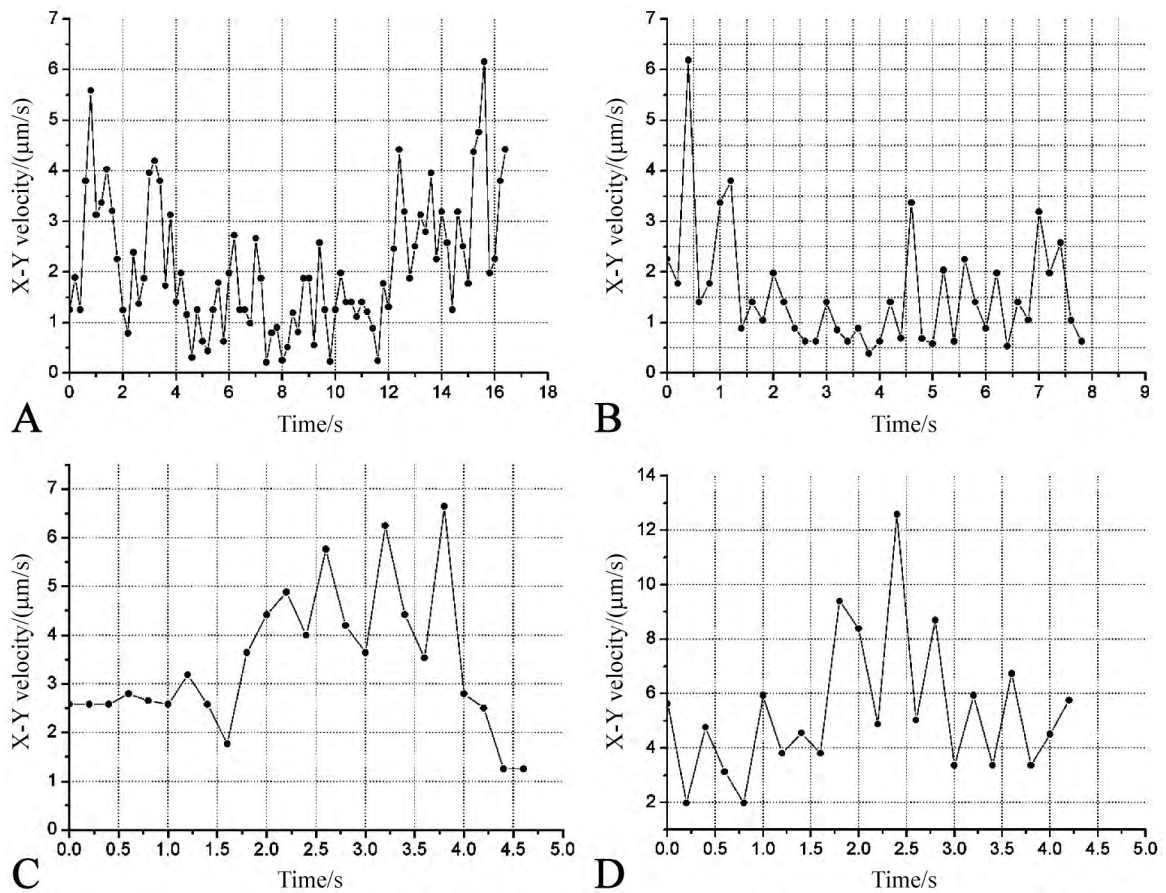


图 5 四种花粉管中典型的囊泡移动速度。A. 青杆; B. 雪松; C. 百合; D. 烟草。

Fig.5 Plots of the X-Y velocity of the typical vesicle movements in pollen tubes. A. *Picea wisonii* Mast. pollen tube; B. *Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don pollen tube; C. *Lilium longiflorum* Thunb. pollen tube; D. *Nicotiana tabacum* L. pollen tube.

的合成是裸子植物花粉管生长所需要的,来自囊泡的细胞壁前体物质的积累只是部分贡献了裸子植物花粉管顶端细胞壁的增加。因此裸子植物花粉管和被子植物花粉管生长速度的差异很可能涉及顶端细胞壁成分的不同及其造成的顶端生长点细胞壁的延展性等机械性的差异。

参考文献:

- [1] ALOISI I , CA G , FALERI C , et al. Spermine regulates pollen tube growth by modulating Ca^{2+} -dependent actin organization and cell wall structure [J]. *Frontiers in Plant Science* , 2017 , 8: 1701. doi: 10.3389/fpls.2017.01701.
- [2] FU Y. The cytoskeleton in the pollen tube [J]. *Curr Opin Plant Biol* , 2015 , 28: 111–119.
- [3] CAI G , PARROTTA L , CRESTI M. Organelle trafficking , the cytoskeleton , and pollen tube growth [J]. *J Integr Plant Biol* , 2015 , 57 (1) : 63–78.
- [4] COLE R A , FOWLER J E. Polarized growth: maintaining focus on the tip [J]. *Curr Opin Plant Biol* , 2007 , 9 (6) : 579–588.
- [5] MILLER D D , RUIJTER N C A , EMONS A M C. From signal to form: aspects of the cytoskeleton–plasma membrane–cell wall continuum in root hair tips [J]. *Journal of Experimental Botany* , 1997 , 48 (316) : 1881–1896.
- [6] PARTON R G , RICHARDS A A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms [J]. *Traffic* , 2003 , 4 (11) : 724–738.
- [7] DEHORS J , MARECK A , KIEFER-MEYER , M C , et al. Evolution of cell wall polymers in tip-growing land plant gametophytes: composition , distribution , functional aspects and their remodeling [J]. *Frontiers in Plant Science* , 2019 , 10: 441. doi: 10.3389/fpls.2019.00441.
- [8] BREYGINA M , MAKSIMOV N , POLEVOVA S , et al. Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*) [J]. *Protoplasma* , 2019 , 256 (4) : 941–949.
- [9] DARDELLE F , LEHNER A , RAMDANI Y , et al. Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall [J]. *Plant Physiology* , 2010 , 153 (4) : 1563–76.
- [10] CHEBLI Y , KANEDA M , ZERZOUR R , et al. The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube–spatial distribution , recycling , and network formation of polysaccharides [J]. *Plant Physiology* , 2012 , 60 (4) : 1940–1955.
- [11] LAMPUGNANI E R , MOLLER I E , CASSIN A , et al. In vitro grown pollen tubes of *Nicotiana glauca* actively synthesise a fucosylated xyloglucan [J]. *PLoS One* , 2013 , 8 (10) : e77140.
- [12] FERNANDO D D , QUINN C R , BRENNER E D , et al. Male gametophyte development and evolution in extant gymnosperms [J]. *International Journal of Developmental Plant Biology* , 2010 , 4: 47–63.
- [13] ABERCROMBIE J M , O'MEARA B C , MOFFATT A R , et al. Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls: callose synthase (CalS) gene expression patterns [J]. *Evodevo* , 2011 , 2 (1) : 14.
- [14] YATOMI R , NAKAMURA S , NAKAMURA N. Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of gymnosperms [J]. *Grana* , 2002 , 41 (1) : 21–28.
- [15] TERASAKA O , NIITSU T. Differential roles of microtubule and actin–myosin cytoskeleton in the growth of *Pinus* pollen tubes [J]. *Sex Plant Reproduction* , 1994 , 7 (5) : 264–272.
- [16] DE WIN A H N , KNUIMAN B , PIERSON E S , et al. Development and cellular organization of *Pinus sylvestris* pollen tubes [J]. *Sex Plant Reproduction* , 1996 , 9 (2) : 93–101.
- [17] WANG Y , CHEN T , ZHANG C , et al. Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca^{2+} and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes [J]. *New Phytologist* , 2009 , 182 (4) : 851–862.
- [18] SHENG X , ZHANG S , JIANG L , et al. Lead stress disrupts the cytoskeleton organization and cell wall construction during *Picea wilsonii* pollen germination and tube growth [J]. *Biol Trace Elem Res* , 2012 , 146 (1) : 86–93.
- [19] FERNANDO D D , LAZZARO M D , OWENS J N. Growth and development of conifer pollen tubes [J]. *Sexual Plant Reproduction* , 2005 , 18 (4) : 149–162.
- [20] HOLDAWAY-CLARKE T L , HEPLER P K , JORHI B M. Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes [J]. *New Phytologist* , 2003 , 159 (3) : 539–563.
- [21] 郑茂钟 , 李国平 , 张剑. 外源钙对花粉管胞吞/胞吐速率和细胞壁成分的影响 [J]. *电子显微学报* , 2014 , 33 (6) : 550–557.
- [22] PARTON R M , FISCHER-PARTON S , WATAHIKI M K , et al. Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes [J]. *Journal of Cell Science* , 2001 , 114 (Pt 14) : 2685–2695.
- [23] ZHENG M , BECK M , MÜLLER J , et al. Actin turnover

- is required for myosin-dependent mitochondrial movements in arabidopsis root hairs [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (6): e5961.
- [24] GRIFFING L R. FRET analysis of transmembrane flipping of FM4-64 in plant cells: is FM4-64 a robust marker for endocytosis [J]. *Journal of Microscopy*, 2008, 231 (2): 291-298.
- [25] RIGAL A, DOYLE S M, ROBERT S. Live cell imaging of FM4-64, a tool for tracing the endocytic pathways in *Arabidopsis* root cells [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1242: 93-103.
- [26] KETELAAR T, GALWAY M E, MULDER B M, et al. Rates of exocytosis and endocytosis in *Arabidopsis* root hairs and pollen tubes [J]. *J Microsc*, 2008, 231 (2): 265-273.
- [27] FARROKHI N, BURTON R A, BROWNFIELD L, et al. Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes [J]. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4 (2): 145-167.
- [28] FERGUSON C, TEERI T T, SHIKA-AHO M, et al. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum* [J]. *Planta*, 1998, 206 (3): 452-460.
- [29] ROY S, ECKARD K J, LANCELLE S, et al. High-pressure freezing improves the ultrastructural preservation of in vivo grown lily pollen tubes [J]. *Protoplasma*, 1997, 200 (1): 87-98.
- [30] LAZZARO M D, DONOHUE J M, SOODAVAR F M. Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes [J]. *Protoplasma*, 2003, 220 (3/4): 201-207.
- [31] SHENG X, HU Z, LU H, et al. Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141 (4): 1578-1590.

Cytological comparison of pollen tube growth between gymnosperms and angiosperms

ZHENG Mao-zhong^{1,2}, LIN Li^{1,2}, YE Hong-meng^{1,2}, HUA Wei-ping^{1,2}

(1. College of Ecology and Resource Engineering, Wuyi University, Wuyishan Fujian 354300; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Eco-industrial Green Technology, Wuyi University, Wuyishan Fujian 354300, China)

Abstract In order to compare the mechanism underlying pollen tube growth in gymnosperms and angiosperms, laser confocal microscopy, total internal reflection fluorescence microscopy and transmission electron microscopy were used to observe the time variation and fluctuation characteristics of FM4-64 staining, the velocities of vesicles, and the increase of cell wall volume per unit time in pollen tubes of *Picea wilsonii* Mast., *Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don, *Nicotiana tabacum* L., *Lilium longiflorum* Thunb.. Our findings show that, compared with those of pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. and *Lilium longiflorum* Thunb., the fluorescence intensity of FM4-64 in the pollen tubes of *Picea wilsonii* Mast. and *Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don increased more slowly in the early stage and decreased more slowly in the late stage, indicating that the endocytosis and exocytosis rates of gymnosperm pollen tubes were significantly lower than those of angiosperms. Secondly, only 28% and 34% of the vesicles in gymnosperms' pollen tubes were moving, and most of the vesicles moved slower than those in tobacco and lily pollen tubes, which revealed that the number of vesicles in gymnosperms' pollen tubes that could move to the top for exocytosis per unit time was less than that in angiosperms'. However, the increased cell wall volume of *Picea wilsonii* Mast. and *Cedrus deodara* (Roxburgh) G. Don pollen tubes per unit time was larger than that of *Nicotiana tabacum* L. pollen tubes. These results suggest that the accumulation of cell wall precursors from vesicles contributes differently to the increase of pollen tube apical cell wall in gymnosperms and angiosperms.

Keywords pollen tube; angiosperm; gymnosperm; exocytosis; endocytosis; growth mechanism