

芒(*Miscanthus sinensis* Anderss)花粉 生活力测定方法比较

赵元杰, 蒋建雄, 刘明稀, 艾 辛, 易自力
(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要:采用离体萌发法、FDA染色法和I₂-KI染色法测定芒离体花粉的生活力,并对测定效果进行比较。结果表明,利用离体萌发法测得芒离体花粉的平均初始萌发率为82.6%,并且花粉萌发和生长很快,5 min即开始萌发,培养30 min后花粉管平均长度达到了145.77 μm,但花粉的平均萌发率下降很快,室温保存90 min的花粉其萌发率已下降至3.0%。利用FDA染色法和I₂-KI染色法测定的芒花粉初始生活力与离体萌发法的结果基本一致,分别为84.6%和86.6%,但这两种染色法在跟踪测定芒离体花粉的生活力时易误判,不适合用于跟踪测定花粉生活力的变化。利用离体萌发法能够准确有效地测定芒花粉生活力的变化规律,而FDA染色法和I₂-KI染色法适合用于测定芒花粉的初始生活力。

关键词:芒;花粉生活力;离体萌发法;FDA染色法;I₂-KI染色法

中图分类号:S543⁺.9;Q944.42;Q94-33

文献标识码:A

论文编号:2009-1470

Comparison of Pollen Viability Determining Methods for *Miscanthus sinensis* Anderss

Zhao Yuanjie, Jiang Jianxiong, Liu Mingxi, Ai Xin, Yi Zili

(College of Bioscience & Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: The pollen viability of *Miscanthus sinensis* was determined by in vitro pollen germination method, I₂-KI staining method and FDA staining method, respectively. These three methods were analyzed to find their advantages, disadvantages and effectiveness. The results showed that with the *in vitro* pollen germination method, the pollens germinated in 5 minutes and the pollen tubes reached an average length of 145.77 μm in 30 minutes. The average initial pollen germinating rate was 82.6%, but it was decreased sharply to 3.0% when the pollens were stored for 90 minutes at room temperature. The initial staining rate by FDA method and I₂-KI method was 84.6% and 86.6% respectively, close to that of in vitro pollen germination method. However, the last two methods could not accurately distinguish the inactive pollens from the pollens having been stored for a longer time. *In vitro* pollen germination method could be an accurate and effective method to test the change of the pollen viability. I₂-KI staining method and FDA staining method could be used to test the initial pollen viability effectively.

Key words: *Miscanthus sinensis* Anderss, pollen viability, *in vitro* pollen germination method, FDA staining method, I₂-KI staining method

0 引言

芒属植物(*Miscanthus Anderss*)原产于东亚,为禾本科的多年生C₄高大草本纤维植物。近年来,芒属植

物受到各国政府和能源领域科学家们的高度关注,认为芒属植物作为生物质能源开发利用优于其他粮食作物或木本植物,将成为石油和煤炭等化石燃料的理

基金项目:美国 Mendel Biotechnology, Inc. 合作项目。

第一作者简介:赵元杰,女,1985年出生,湖南娄底人,硕士研究生,研究方向:芒属植物生殖遗传学。通信地址:410128 湖南长沙湖南农业大学生物科学技术学院遗传学硕士学位点, E-mail: 624127157@qq.com。

通讯作者:易自力,男,1959年出生,湖南浏阳人,博士,教授,研究方向:草本能源植物开发与利用。通信地址:410128 湖南长沙湖南农业大学生物科学技术学院, E-mail: yizili889@163.com。

收稿日期:2009-07-17,修回日期:2009-08-07。

想替代品之一。芒属植物具有生长迅速、生物产量大、热值高、适应性广、种植成本低等特点。其生物质不仅可以通过直接燃烧来生产热能或电能,也可以通过生物酶发酵或汽化等途径转化成乙醇等生物燃料^[1-2]。同时芒的茎秆纤维含量较高,是一种优良的造纸原料。此外,它还兼具保持水土等生态功能^[3]。

湖南农业大学自20世纪80年代即开展了芒属植物的遗传改良研究,先后成功培育出南荻(*M. lutarioriparia*)的同源四倍体品种^[4]以及转外源Bt基因抗虫新种质^[5],并收集保存了1000多份野生芒属种质资源,目前正在开展种质资源评价和杂交育种等研究工作。花粉的生活力对于开展人工授粉杂交极其重要,但不同植物花粉的生活力及其适宜测定方法均有差异。实践中发现不同种类以及同一种类不同生态型芒属植物的开花期差别比较大,同时还发现芒属植物花药散粉的日高峰时段受当天温度和湿度的影响较大,且花粉生活力丧失速度很快,难以准确预测,给人工授粉杂交带来一定困难。为了解决亲本开花期以及花药散粉时间不一致的问题,收集和储存花粉是一种较好的途径。因此,十分必要找出一种能够快速、准确地检查所收集和贮存芒属植物花粉生活力的测定方法。笔者首次比较分析了花粉离体萌发法、FDA染色法和I₂-KI染色法等不同方法在芒离体花粉生活力测定中的适用性,为进一步开展人工杂交选育、花粉贮存、雄性不育材料发掘等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2008年11月上旬在湖南农业大学生命科学楼遗传学实验室内进行。

1.2 材料

供试材料为种植于湖南农业大学芒属种质资源圃内的芒,于晴天清晨选择生长良好的开花植株,将其花序的始花部位(即花序中上部)剪下,此时颖花上的花药显露但尚未开始散粉,迅速带回实验室内,室温静置(通风干燥)数分钟后,轻拍花序使花粉散落在洁净干燥的玻璃片上。

1.3 方法

1.3.1 离体萌发法 液体培养基的配制参考Brewbaker & Kwack培养基配方^[6],并略有改动:

(1)无机盐贮备液:HBO₃ 0.1 g; Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.3 g; MgSO₄·7H₂O 0.2 g; KNO₃ 0.1 g; 蒸馏水 100 ml。

(2)花粉萌发培养基:无机盐贮备液 1 ml,蔗糖 2 g,蒸馏水 9 ml。

室温(约25℃)下,每隔15 min于玻璃板上取样一

次,将花粉置于盛有花粉萌发培养基的凹面载玻片中,培养30 min后,在Olympus普通光学显微镜(100×)下观察,以花粉管伸长的长度超过花粉粒直径2倍视为萌发,跟踪测定花粉活力的变化。

1.3.2 FDA染色法 参考周坚的方法^[7]配制FDA测定液并略有改动:按1 ml丙酮溶解5 mg FDA(荧光素双醋酸酯)的比例置备贮备液,贮藏于4℃冰箱中。每次观察前用20%的蔗糖溶液将贮备液稀释50倍,混匀至轻乳状,即得终浓度为100 μg/ml的FDA测定液,即用即配。检测时,在盛有花粉的凹面载玻片上,加一滴FDA测定液,静置5 min后,在Olympus荧光显微镜(100×)下以短蓝光观测,发出黄绿色荧光的花粉为有生活力,无荧光者为缺失生活力的花粉。

1.3.3 I₂-KI染色法 按照于晓英的方法^[8]配制I₂-KI溶液。在涂有花粉的载玻片上,加2滴I₂-KI溶液,在Olympus普通光学显微镜(100×)下观察,被染成蓝黑色的花粉为有生活力,黄褐色者为缺失生活力。

1.4 数据统计方法

每次随机累计观测100个花粉粒,计算花粉萌发百分率或染色百分率,5次重复,取平均值。

2 结果与分析

2.1 花粉离体萌发法

在液体培养基中培养约5 min后芒的花粉即开始萌发,并且花粉管伸长速度很快,30 min后花粉管平均长度可达到145.77 μm(图1)。在室温下,芒花粉的初始平均萌发率达到了82.6%,但花粉萌发率下降很快,放置30 min后花粉的平均萌发率下降至50.6%;放置时间为60 min的花粉,其平均萌发率下降至18.8%;放置时间为90 min的花粉,其平均萌发率则仅有3.0%(图2)。Kumar等^[9]曾用“花粉存活时间”描述花粉生活力大于50%的时间段,但是通常将在花粉生活力下降到低于5%时作为花粉寿命的终结。因此可以认为,在室温环境中芒花粉生活力的持续时间即花粉寿命仅为90 min。

通过对Brewbaker和Kwack培养基中的蔗糖浓度进行调整,发现蔗糖浓度调整为20%时,芒花粉萌发和花粉管生长效果较好。蔗糖浓度过低或过高均不利于花粉萌发和花粉管生长,一是蔗糖为花粉的萌发及花粉管的生长提供营养,浓度过低,提供给花粉萌发的能量就较低,也不利于萌发,二是蔗糖可以维持外界环境一定的渗透压,但是高浓度的蔗糖会改变花粉管的透性,导致代谢物和离子泄露,反而对萌发不利^[10]。

2.2 FDA染色法

用FDA染色法测定芒花粉的初始活力时,染色后

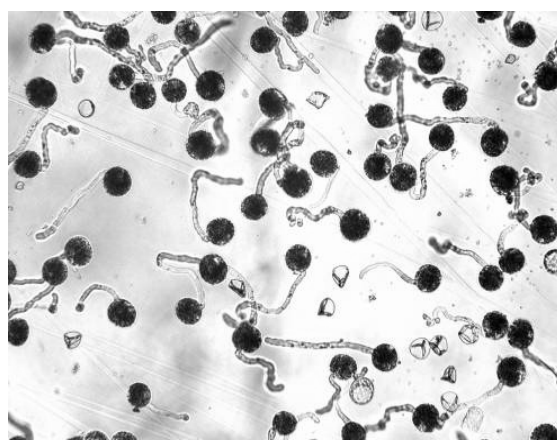


图1 芒花粉生活力的离体萌发检测

的花粉在荧光显微镜的短蓝光照射下持续发出黄绿色荧光,背景为黑色,效果明显(图3A),持续观测时间可以达到15 min。芒花粉的初始平均FDA染色率达到了84.6%。FDA本身无荧光,无极性,能自由地穿越完整的细胞质膜。FDA一旦进入原生质体后,受到原生质

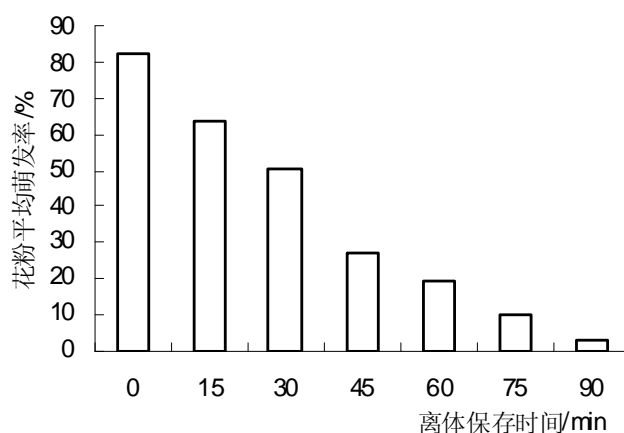


图2 花粉离体萌发法测定的芒花粉生活力的变化规律

体内酯酶的作用,分解形成有荧光的极性物质—荧光素。荧光素不能自由地穿越细胞质膜,因而积累在有活力的细胞中,当用紫外线照射时,产生黄绿色荧光。而无活力的细胞不能分解FDA,因此检测不到荧光信号^[1]。FDA染色的实质是测定酶活性与质膜两个指标。

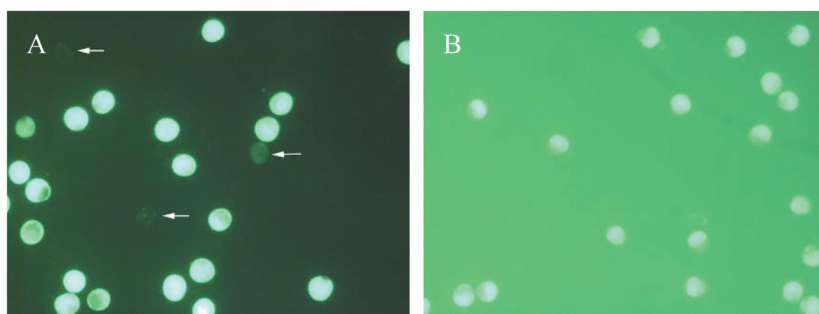


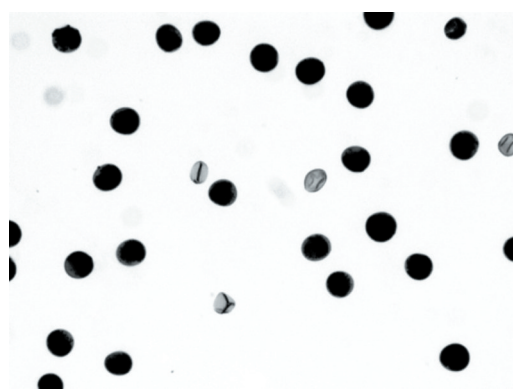
图3 芒花粉生活力的FDA染色检测

A: 室温下保存0 h花粉的FDA染色; B: 室温下保存90 min后花粉的FDA染色

但在跟踪测定中发现,对室温保存较长时间的芒离体花粉进行FDA染色时,大多数花粉仍能产生绿色荧光,说明酯酶的活性并未完全丧失。同时背景中也很快出现黄绿色荧光,表明荧光物质已从花粉细胞渗出到染色液中(图3B)。由于无法判断是从哪些花粉细胞中渗出及其渗出量的多少,不便于观察统计失活花粉。因此FDA染色法不宜作为跟踪测定芒花粉生活力变化的方法,但可用于花粉初始活力的检测。

2.3 I₂-KI 染色法

I₂-KI 染色法实质是利用花粉内的淀粉遇碘变色去判断花粉有无生活力。利用I₂-KI染色法测定芒的花粉活性时,I₂-KI将有活力的花粉染成蓝黑色,说明芒花粉细胞中的淀粉含量较高(图4)。芒花粉的平均初始I₂-KI染色率为86.6%。而在室温下保存数小时后的芒花粉尽管已经失去了生活力,但由于细胞内的淀粉仍然存在,大部分花粉仍能被I₂-KI染色。若用该方法做芒花粉生活力的跟踪测定,会误判花粉生活力保

图4 芒花粉生活力的I₂-KI染色检测

持不变,也只能用于检测花粉的初始活力。

3 讨论

3.1 芒花粉生活力测定方法的比较

花粉生活力的测定方法,通常可分为萌发测定和不萌发测定两类^[1]。笔者比较了离体萌发法以及两种染色法用于测定芒花粉生活力的效果。离体萌发法是

根据花粉离体培养时的萌发率判定其生活力,这种方法简单、结果直观,该方法几乎适合所有植物花粉生活力的测定,但当培养条件有差异时,测定结果相差悬殊^[11]。通过对 Brewbaker 和 Kwack 培养基中的蔗糖浓度进行调整,获得了较好的萌发效果,芒的花粉在液体培养基中培养 5 min 即可开始萌发,大大缩短了分析检测的周期,并且离体萌发法可以跟踪测定芒花粉在离体保存过程中其生活力的变化规律。但应该注意的是,花粉萌发率并不完全等同于花粉生活力,因为具有萌发能力的花粉在其传粉后不一定能正常结实^[12]。研究表明,FDA 染色法和 I₂-KI 染色法用于芒花粉初始生活力测定的结果与花粉离体萌发法的测定结果是基本一致的,由于两种方法的分析步骤简单,效率高,适合用于花粉初始生活力的大规模普查分析,但均不宜作为跟踪测定芒花粉生活力变化的方法。

3.2 芒花粉的生活力

植物花粉的生活力因植物种不同而有所差异,大多数植物的花粉只有几天或者几星期就失去生活力,尤其禾本科植物花粉的寿命更短^[11,13]。禾本科植物花粉的寿命短与其花粉为三核型是密切相关的。一方面,三核型花粉在散粉前,生殖核进行有丝分裂产生精子过程中消耗花粉内的贮藏物质。另一方面,三核型花粉代谢较活跃、外壁较薄,而且色素含量较低,抗逆性低,因此通常情况下三核型花粉的寿命短于二核型花粉。2008年课题组成员开展了大量的芒属植物人工授粉杂交试验,由于芒属植物花药的日散粉高峰期是在凌晨 3:00—6:00 时左右,因此采用父本套袋收集花粉,然后次日上午给母本进行人工授粉的办法,但杂交成功率极低。离体萌发试验的结果表明,在室温下保存的芒离体花粉生活力持续时间很短,这很好地解释了人工杂交失败的原因。

花粉生活力除受遗传因子影响外,环境因素如取材前后及保存过程的温度、湿度等因素也有很大的影响^[14]。通常情况下,花粉在低湿度(相对湿度 25%~50%)、低温(1~5℃)、空气中高 CO₂ 浓度、低 O₂ 分压或

无 O₂ 的环境条件中较易保存。但是禾本科植物花粉在贮藏时要求较高的湿度(相对湿度 70%~100%),例如水稻花粉在 12℃ 和相对湿度 85% 下可存活 24 h^[13]。芒花粉的生活力较短,这势必成为开展杂交育种工作的限制因素,因此进一步探索芒花粉离体保存的适宜温度和湿度条件十分必要。

参考文献

- [1] Heaton E A, Clifton-Brown J, Voigt T B, et al. *Miscanthus* for renewable energy generation: European Union experience and projections for Illinois[J]. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*,2004,9:433-451.
- [2] Collura S, Azanbre B, Finqueneisel G, et al. *Miscanthus* × *giganteus* straw and pellets as sustainable fuels: combination and emission tests[J]. *Environ Chem Lett*,2006,4:75-78.
- [3] 刘亮,朱明,朱太平. 芒荻类植物资源的开发和利用[J]. *自然资源学报*,2001,16(06):562-563.
- [4] 何立珍,周朴华,刘选明. 南荻同源四倍体的研究[J]. *遗传学报*,1997,24(6):544-549.
- [5] 易自力,周朴华,储成才,等. 南荻遗传转化系统的建立及转基因植株的获得[J]. *高技术通讯*,2001,11(4):20-24.
- [6] 胡适宜. 植物胚胎学试验方法(一):花粉生活力的测定[J]. *植物学通报*,1993,10(2):60-62.
- [7] 周坚,樊汝汉. 鹅掌楸属两种植物花粉品质和花粉管生长的研究[J]. *林业科学*,1994,30(5):405-411.
- [8] 于晓英,卢向阳,龚明福,等. 瓜叶菊花粉生活力测定[J]. *湖南农业大学学报*,2005,31(1):42-46.
- [9] Kumar A, Chowdhury C Y, Johnson B E, et al. Pollen viability and stigma receptivity in relation to meteorological parameters in pearl millet[J]. *Seed Sci Technol*,1995,23:147-156.
- [10] Loverine P T, Peter K. Relationship between pollen germination and sucrose[J]. *Ann Rev Plant Mol Biol*,1997,48:461-491.
- [11] 王钦丽,卢龙斗,吴小琴,等. 花粉的保存及生活力测定[J]. *植物学通报*,2002,19(3):365-373.
- [12] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京:高等教育出版社,1982.
- [13] 杜继煜,白岩,白宝璋. 植物的花粉[J]. *农业与技术*,2004,24(6):84-85.
- [14] 尹佳蕾,赵惠恩. 花粉生活力影响因素及花粉贮藏概述[J]. *中国农学通报*,2005,21(4):110-113.