

文章编号: 1000-5692(2006)04-0406-04

# 菊属植物花粉生活力检测方法的比较

赵宏波, 陈发棣, 房伟民

(南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用碘-碘化钾法、氯化三苯基四氮唑(TTC)法及改进TTC法、无机酸法、荧光染色法、离体萌发法、活体萌发法测定了菊属 *Dendranthema* 植物菊花脑 *Dendranthema nankingense*, 南京野菊 *Dendranthema indicum*, 毛华菊 *Dendranthema vestitum* 和栽培小菊品种 m43-2, m46-1, m48-2 的花粉生活力。结果表明: 碘-碘化钾法、TTC法及改进TTC法、无机酸法和荧光染色法都不适合菊属植物花粉生活力的检测; 活体萌发法检测菊属植物花粉生活力不准确, 但能有效表述花粉萌发力; 离体萌发法能有效快速地测定花粉生活力, 适合菊属植物花粉生活力的检测。图1参11

**关键词:** 植物学; 栽培小菊; 菊属植物; 花粉活力; 检测方法

中图分类号: Q944.42; S682.1<sup>+</sup>1 文献标识码: A

花粉是种子植物的雄配子体, 在有性繁殖中扮演着重要角色。杂交育种在菊花 *Dendranthema × grandiflora* 育种中仍是最有效的手段<sup>[1]</sup>。进行菊属 *Dendranthema* 野生种和栽培小菊的花粉生活力测定对指导菊花育种具有重要的理论和现实意义。测定花粉生活力有很多方法, 主要包括染色法、离体萌发法和活体萌发法等3类, 其中根据原理不同染色法又包括氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)法、碘-碘化钾法、联苯胺法、荧光染色法等。每种方法都有不同的使用范围, 不同特性的花粉应选择不同的方法。该研究用碘-碘化钾法、TTC法及改进TTC法、无机酸法、荧光染色法、离体萌发法和活性萌发法对几种不同倍性菊属植物(二倍体, 四倍体和六倍体)和栽培小菊品种花粉生活力进行测定, 以期筛选出一种或几种快速准确地测定各种菊属植物和菊花材料花粉生活力的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验材料为不同倍数性的菊属植物菊花脑 *Dendranthema nankingense* (二倍体), 南京野菊 *Dendranthema indicum* (四倍体), 毛华菊 *Dendranthema vestitum* (六倍体)和3个栽培小菊品种(m43-2, m46-1, m48-2)的花粉。所有材料均取自南京农业大学菊花种质资源保存中心。

### 1.2 方法

1.2.1 碘-碘化钾法<sup>[2]</sup> 配制碘-碘化钾溶液: 将1.3g碘化钾溶解在水中, 再加入0.3g碘结晶, 然

收稿日期: 2005-11-23; 修回日期: 2006-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400308); 江苏省教育厅高技术产业化研究项目(JH02-086); 江苏省科学技术厅高技术研究项目(BG2003305); 上海市农业委员会重点攻关项目[(2004)D3-1]

作者简介: 赵宏波, 博士研究生, 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: zhaohbzhou@yahoo.com. 通讯作者: 陈发棣, 教授, 博士生导师, 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: cherfd@mail.njau.edu.cn

后定容到 100 mL。取少量花粉置于凹载玻片上, 滴上 2 滴碘-碘化钾溶液, 置于 30 °C 恒温箱中 20 ~ 30 min 后, 有 Olympus 相差显微镜下观察。有生活力的花粉染成蓝色, 生活力衰弱或内含物少的花粉成黄褐色。

1.2.2 TTC 法<sup>[3]</sup>及改进 TTC 法 用 0.15 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH6.5) 缓冲液配制 10 g·L<sup>-1</sup> 的 TTC 溶液; 改良 TTC 溶液为在 TTC 溶液中加入 200 g·L<sup>-1</sup> PEG 4 000。取少量花粉置于凹载玻片上, 加入 2 滴 TTC 溶液或改良 TTC 溶液, 放在 35 °C 恒温箱中, 染色 15 ~ 20 min 后, 在显微镜下观察, 有生活力的花粉呈红色。

1.2.3 无机酸法<sup>[4]</sup> 取少量花粉置于凹载玻片上, 滴上 1 滴 0.8 mol·L<sup>-1</sup> 的硝酸, 在 5 ~ 10 min 内在显微镜下观察。有生活力花粉的胞质内含物喷射而出形成瞬时花粉管。

1.2.4 荧光染色法<sup>[5]</sup> 用 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的蔗糖溶液配制 0.1 g·L<sup>-1</sup> 的 FDA 溶液。取少量花粉置于凹载玻片上, 滴上 2 滴 FDA 蔗糖溶液, 置于恒温箱中 25 °C 染色 15 ~ 20 min 后在荧光显微镜下观察。有生活力的花粉将发射出荧光。

1.2.5 离体萌发法<sup>[6]</sup> 采用赵宏波等筛选得到的菊属植物花粉离体萌发培养基 ME<sub>3</sub> + 200 g·L<sup>-1</sup> PEG 4 000 为花粉萌发培养基, 在 20 °C 黑暗条件下培养 2 h 以上, 在显微镜下检测花粉萌发。花粉管长度大于花粉直径视为花粉萌发, 萌发率等于萌发的花粉数除以检测的花粉总数。

1.2.6 活体萌发法 取当天采集的新鲜花粉, 在柱头最佳授粉时间授于 3 个小菊品种 m1-1, m12-1, m12-2 和同一品种 (提前去雄) 的柱头, 6 h 后取下柱头, 固定, 用 8 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠软化脱色 8 h, 然后用 0.1 g·L<sup>-1</sup> 苯胺蓝溶液浸泡 8 h, 用甘油压片, 在荧光显微镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 碘-碘化钾法

菊花脑、南京野菊、毛华菊和栽培小菊 m43-2, m46-1, m48-2 等 6 种花粉经碘-碘化钾溶液染色之后, 有少数花粉颜色略有变化, 但由于菊花花粉颜色较深, 故不易分辨。因此, 碘-碘化钾法不适用于菊属植物花粉生活力检测。

### 2.2 TTC 法及改进 TTC 法

经 10 g·L<sup>-1</sup> 的 TTC 溶液和改良 TTC 溶液染色之后, 所有材料花粉颜色均未有明显变化。因此, TTC 法也不适于菊属植物花粉生活力检测。

### 2.3 无机酸法

6 种材料的花粉滴上硝酸几分钟后, 可见花粉萌发孔有膨胀向外突出的现象 (小于 1 倍花粉直径), 但花粉吸水后也能观察到萌发孔膨胀, 故不易判断是否具生活力。因此无机酸法也不适用于菊属植物花粉生活力检测。

### 2.4 荧光染色法

6 种材料花粉经荧光染料 FDA 溶液染色之后, 在显微镜下未观察到有荧光发出。这可能是由于菊花花粉壁较厚或含有特殊的蜡层, 因而 FDA 溶液未能透过质膜, 而被酯酶分解形成能产生荧光的荧光素。

### 2.5 离体萌发法

以花粉在离体萌发培养基上的萌发率来表示花粉生活力结果准确可靠。菊花脑、南京野菊、毛华菊和栽培小菊 m43-2, m46-1, m48-2 花粉在离体萌发最适的培养基 ME<sub>3</sub> + 200 g·L<sup>-1</sup> PEG 4 000 上, 花粉萌发率分别为 57.7%, 52.5%, 44.8% 和 30.9%, 22.3%, 20.9%, 且花粉管生长良好, 便于观察统计 (图 1-a)。菊属植物花粉在离体萌发培养基上, 培养约 15 min 后开始萌发, 从开始萌发到培养 2 h 的时间内, 萌发率呈直线上升趋势, 之后基本就恒定不变。离体萌发法操作简便、快速且结果直观, 只需要一般的显微镜即可进行花粉萌发观察。因此, 离体萌发法可以有效测定菊属植物花粉生活力。

### 2.6 活体萌发法

活体萌发实验表明, 同一品种花粉在不同品种的柱头上黏附量差异较大。菊花脑、南京野菊、毛

华菊和栽培小菊 m43-2, m46-1, m48-2 花粉在小菊 m1-1 的柱头上黏附量均较高, 平均每柱头约 60 个花粉(图 1-b); 而在 m12-1 和 m12-2 上黏附量均较低, 平均每柱头只有 20 个花粉左右(图 1-c)。而在自身品种或种的柱头, 小菊 m46-1, m48-2 和毛华菊几乎观察不到花粉在柱头上黏附, 43-2、菊花脑和南京野菊能观察到少数花粉在柱头上黏附, 这说明花粉在自身品种柱头上黏附与品种或种的遗传特性有关。由此可见, 活体萌发由于所用柱头材料的不同而得到的花粉生活力就相差较大, 因此活体萌发法不能准确地测定菊花花粉生活力。

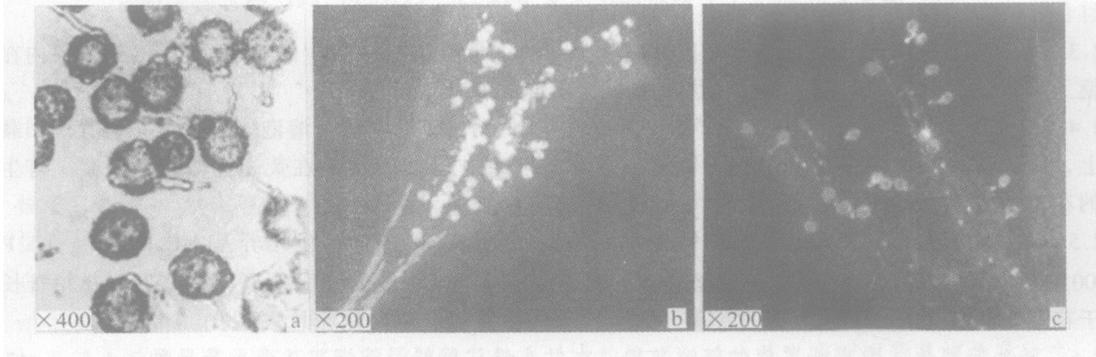


图 1 南京野菊花花粉萌发情况

a. 在离体萌发培养基上( $\times 400$ ); b. 在小菊品种 m1-1 的柱头上( $\times 200$ ); c. 在小菊品种 m12-1 的柱头上( $\times 200$ )

Figure 1 Pollen germination of *Dendranthema indicum*

a. in the culture medium of germination in vitro; b. on the stigma of the cultivar m1-1; c. on the stigma of the cultivar m12-1

### 3 讨论

利用染色法进行花粉生活力测定具有快速简便的优点, 但受花粉自身特性(如花粉壁的厚薄, 花粉外壁的组成物质, 花粉内各种酶活性的强弱等)的影响较大, 因此不同的染色法只适合某些植物花粉生活力的测定。TTC 法检测花粉生活力是应用较多的, 很多植物材料例如锦带花 *Weigela florida*<sup>[7]</sup>, 芍药 *Paeonia lactiflora*<sup>[8]</sup>, 刺五加 *Eleutherococcus senticosus*<sup>[9]</sup> 等的花粉生活力测定都适用。碘-碘化钾法测定花粉生活力时, 其着色程度受花粉壁的厚薄和花粉内支链淀粉和直链淀粉比例高低决定, 棉花 *Gossypium* sp. 花粉用碘-碘化钾染色就不着色<sup>[10]</sup>。荧光染色法被广泛应用于花粉、悬浮细胞和原生质体等的活力测定<sup>[3,5]</sup>。TTC 溶液、碘-碘化钾溶液和荧光染料 FDA 溶液都未能将 6 种菊花材料的花粉染上颜色, 这可能是由于花粉外壁太厚或花粉内含物中支链淀粉含量较少等。PEG 能使花粉内膜结构发生变化, 改变膜表面电荷, 使膜的柔软程度和通透性提高, 因此作者在 TTC 溶液中添加  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PEG 4 000 (在花粉离体萌发培养基中的最适质量浓度), 试图借助 PEG 的软化通透作用使 TTC 进入花粉内与呼吸酶结合, 但也没有作用, 这说明 TTC 溶液不能进入花粉内主要是由于花粉壁对它的限制。利用无机酸法测定花粉生活力是根据无机酸刺激花粉质膜, 使质膜通透性提高, 以致大量吸收  $\text{H}^+$  离子, 使内压迅速升高, 导致质膜膨胀, 最后活性花粉的胞质内含物喷射而出形成瞬时花粉管的原理<sup>[4]</sup>。在  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸处理 6 种菊花的花粉后, 花粉萌发孔有向外突出的趋势。由于花粉萌发孔向外突出的现象, 不仅是无机酸刺激花粉质膜的原因, 也可能是由于花粉内的渗透势高于溶液的渗透势, 大量吸水也可能造成萌发孔向外突出, 两者不易区分。

离体萌发法操作简便, 快速, 结果直观可靠, 几乎适用于所有植物的花粉生活力测定, 但不同的材料需要不同的培养基。作者在以前的工作中已经筛选得到菊属植物花粉离体萌发适宜的培养基  $\text{ME}_3 + 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PEG 4 000, 在这个培养基上, 6 种菊花花粉均能较好萌发, 并且萌发率较高且稳定。因此离体萌发法是检测菊属植物花粉生活力的理想方法。活体萌发法测定花粉生活力与柱头可授性、授粉时期、花粉与柱头的亲和性(相同种或品种和不同种或品种)、柱头的发育状况、花粉在柱头上黏附和萌发所需的时间等很多因素有关。Mayer 等<sup>[11]</sup> 根据有活力的花粉萌发后能锚定在柱头上的原理, 利

用漂洗后柱头上的花粉数目除以漂洗前的花粉数目来表示花粉萌发率。但是, 由于人工授粉花粉都是过量的, 花粉在柱头上呈多层排列, 造成表层一些有活力的花粉未能与柱头接触, 而未感受到萌发信号, 在柱头软化染色过程中易被漂洗掉, 导致得到的萌发率不准确。总之, 活体萌发法测定花粉生活力的限制因子很多, 任何一个因素的变化都会较大程度影响花粉在柱头上的萌发, 从而影响结果。因此, 作者认为活体萌发法不适合花粉生活力的检测, 但可用来表述花粉的萌发力。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 蒋甲福, 陈发棣, 郭维明. 小菊杂种一代部分性状的遗传与变异研究[ J ]. 南京农业大学学报, 2003, 26 (2): 11—15.
- [ 2 ] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [ 3 ] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(一): 花粉生活力的测定[ J ]. 植物学通报, 1993, 10 (2): 60—62.
- [ 4 ] 王钦丽, 卢龙斗, 吴小琴, 等. 花粉的保存及其生活力测定[ J ]. 植物学通报, 2002, 19 (3): 365—373.
- [ 5 ] SATO S, KATHO N, IWAI S, HAGIMORI M. Establishment of reliable method of in vitro germination and pollen preservation of *Brassica rapa* [ J ]. *Euphytica*, 1998, 103: 29—33.
- [ 6 ] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 栽培小菊和几种菊属植物花粉离体萌发研究[ J ]. 南京农业大学学报, 2005, 28 (2): 22—27.
- [ 7 ] 刘林德, 张萍, 张丽, 等. 锦带花的花粉活力、柱头可授性及传粉者的观察[ J ]. 西北植物学报, 2004, 24 (8): 1 431—1 434.
- [ 8 ] 红雨, 刘强, 韩岚. 芍药花粉活力和柱头可授性的研究[ J ]. 广西植物, 2003, 23 (1): 90—92.
- [ 9 ] 刘林德, 张洪军, 祝宁, 等. 刺五加花粉活力和柱头可授性的研究[ J ]. 植物研究, 2001, 21 (3): 375—379.
- [ 10 ] 胡晋. 花粉的保存和生活力测定[ J ]. 种子, 1992 (6): 33—35.
- [ 11 ] MAYER E, GOTTSBERGER G. Pollen viability in the genus *Silene* (Caryophyllaceae) and its evaluation by means of different test procedures[ J ]. *Fbra*, 2000, 195: 349—353.

## Detection methods of pollen viability of *Dendranthema*

ZHAO Hong-bo, CHEN Fa-di, FANG Wei-min

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** The pollen viability of *Dendranthema indicum*, *D. vestitum*, *D. nankingense* and three cultivars of chrysanthemum with small inflorescences (m43-2, m46-1, m48-2) were detected by methods of iodine-iodide kalium, triphenyltetrazolium chloride (TTC) or modified TTC, FDA, mineral acid, germination in vitro and in vivo. The results showed that the methods of iodine-iodide kalium, TTC or modified TTC, FDA, mineral acid were not able to detect the pollen viability of chrysanthemum. The method of germination in vivo can not test the pollen viability but describe the pollen vigor. The method of germination in vitro was fit for detection of pollen viability of chrysanthemum. [Ch, 1 fig. 11 ref.]

**Key words:** botany; chrysanthemum cultivars with small inflorescences; *Dendranthema*; pollen viability; detection