

氮离子注入处理后的棉花花粉活力测定方法研究

于艳杰¹, 吴李君², 吴跃进², 唐灿明^{1*}

(1. 南京农业大学, 南京 210095; 2. 中国科学院等离子体物理研究所, 合肥 230031)

摘要:以陆地棉(*G. hirsutum* L.)品种苏棉 12 号的花粉为材料,用能量为 20keV 的 N⁺ 注入花粉,分别用花粉原位萌发法、联苯胺-甲萘酚染色法、花粉管快速萌发法、FDA(荧光素二醋酸酯)染色法、TTC(2,3,5-氯代三苯基四氮唑)染色法和离体萌发法 6 种方法测定 N⁺ 注入后的棉花花粉活力。TTC 染色法不能有效检测花粉的活力,测定结果均为 0%。除了 TTC 染色法外,其它 5 种方法均能测定自然花粉的活力,测定结果均为 98% 左右。花粉原位萌发法、联苯胺-甲萘酚染色法、FDA 荧光染色法和离体萌发法 4 种方法可测定抽真空处理过的花粉的活力。只有原位萌发法和 FDA 荧光染色法可测定 N⁺ 注入处理后的棉花花粉活力。随着离子注入剂量的增加,N⁺ 注入处理后的花粉活力呈下降趋势。抽真空处理对花粉的活力无明显影响。

关键词:陆地棉;花粉;离子注入;活力

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2007)02-0102-04

The Methods for Examining the Vitality of Cotton Pollen Implanted by Nitrogen Ion

YU Yan-jie¹, WU Li-jun², WU Yue-jin², TANG Can-ming¹

(1. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing Jiangsu 210095, China; 2. Institute of Plasma Physics, Academic Sinica, Hefei Anhui 230031, China)

Abstract: The vitality of cotton pollen of Sumian 12 cultivar(*G. hirsutum* L.) implanted by N⁺ with an energy of 20keV was measured by six methods including *in situ* pollen germination, Benzidine- α -Naphthol coloring, pollen tube quick germination, FDA fluorescence coloring, TTC coloring and pollen *in vitro* germination. TTC coloring was not suitable for measuring the vitality of cotton pollen. The other five methods were suitable for measuring natural pollen(CK) vitality with the same result of 98% or so. Pollen tube quick germination couldn't measure accurately the vitality of pollen being treated in vacuum. Benzidine- α -Naphthol coloring, pollen tube quick germination and pollen *in vitro* germination were incompetent for measuring the vitality of pollen implanted by nitrogen ion. Only the results of FDA fluorescence coloring and *in situ* pollen germination were repeatable and suitable for measuring the vitality of pollen implanted by N⁺. The vacuum treatment had no effect on pollen vitality. It was found that significant negative correlation between ion implantation dosage and pollen vitality exists.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; pollen; nitrogen ion implantation; vitality

诱变育种是棉花育种领域的一项重要研究内容,通过诱变可提高基因突变频率,为育种提供

更多的变异类型^[1-2]。离子注入是一种新的生物诱变技术,在棉花花粉的诱变方面已有少量研究,

收稿日期:2006-04-05 作者简介:于艳杰(1982-),女,硕士;*,通讯作者,tang20@jlonline.com

基金项目:国家自然科学基金(10475041)

初步说明将离子注入棉花花粉进行诱变是可行的^[3]。离子注入花粉后的活力检测对于选择合适的注入剂量及研究诱变机理具有一定意义。已见报道的棉花花粉活力测定方法主要有水合法(浸水法)、联苯胺-甲萘酚染色法、TTC 染色法、FDA 荧光染色法 4 种,较常用的是联苯胺-甲萘酚染色法。由于每种方法的测定原理不同,用来测定离子注入处理后的棉花花粉活力时,每种方法的测定效果可能有差异。本文采用了植物花粉活力测定中常用的 6 种方法,对 N⁺ 注入后的棉花花粉活力进行检测,比较各种方法的测定效果。

1 材料和方法

1.1 材料

所用材料为陆地棉品种苏棉 12 号,种植在中国科学院合肥等离子体物理研究所试验田,常规栽培管理。

1.2 方法

将雄蕊上的花粉弹在直径为 9 cm 的玻璃培养皿中,确保花粉粒不重叠。注入能量为 20keV 的 N⁺,注入剂量分别设 100 单位、150 单位、200 单位、250 单位和 300 单位(1 单位是指每平方米注入 2.6×10^{13} 个离子),每个处理重复 3 次。用自然花粉和抽真空处理花粉作对照。N⁺ 注入后,将每个处理的花粉分成 12 份,5 份立刻分别用联苯胺-甲萘酚染色法、花粉管快速萌发法、FDA 荧光染色法、TTC 染色法和花粉离体萌发法 5 种方法进行活力测定。另外,5 份分别用以上方法在 30 min 后进行第二次活力测定。其余两份做原位萌发试验,授粉后 4 h 和 8 h 各取一次样,每次每个能量处理取 5 个花柱,用 FAA 固定液固定,1 d 后转入 4℃ 冰箱内保存备用。

花粉原位萌发法^[4]、花粉管快速萌发法^[5]、

FDA 荧光染色法^[6]、TTC 染色法^[7]、离体萌发法^[8]、联苯胺-甲萘酚染色法^[9] 6 种方法的操作程序分别按文献中介绍的方法进行。每个处理设 3 次重复,每个重复取 10 个视野,观察 200 粒左右的花粉。用自然花粉和抽真空处理的花粉作为对照。以原位萌发法为参照标准,比较各种方法的检测结果。

2 结果与分析

2.1 各种方法测定的自然花粉和抽真空处理的花粉活力

2.1.1 自然花粉的活力。原位萌发法、联苯胺-甲萘酚染色法、花粉管快速萌发法、FDA 荧光染色法、离体萌发法 5 种方法均能测定自然花粉的活力,花粉活力分别为 100%,97.51%,96.48%,93.99% 和 98%,测定结果基本一致。TTC 染色法测定的自然花粉活力为 0%(表 1)。

2.1.2 抽真空处理过的花粉的活力。原位萌发法、联苯胺-甲萘酚染色法、FDA 荧光染色法、离体萌发法 4 种方法均能测定抽真空处理过的花粉的活力,花粉活力分别为 100%,98.99%,95.01% 和 98.10%,测定结果基本一致。TTC 染色法测定的抽真空处理花粉活力为 0%。花粉管快速萌发法测定的活力仅为 66.13%,明显低于原位萌发法的测定结果。说明 TTC 染色法和花粉管快速萌发法不适合测定抽真空处理过的花粉的活力。

对棉花花粉进行 N⁺ 注入需要在真空条件下进行,花粉经抽真空处理以后会发生脱水现象。用原位萌发法测定出的自然花粉和抽真空花粉的活力相同,均为 100%,表明抽真空处理不会影响棉花花粉在柱头上的萌发和在花柱中的生长。

表 1 新鲜自然花粉与抽真空处理的花粉的活力

Table 1 Vitality of pollen in nature or being treated in vacuum

	原位萌发法	联苯胺-甲萘酚染色法	TTC 染色法	花粉管快速萌发法	FDA 荧光染色法	离体萌发法	%
CK0	100	97.51±1.46	0	96.48±0.4	93.99±1.20	98.00±0.00	
CK1	100	98.99±0.01	0	66.13±39.8	95.01±19.61	98.10±0.98	

注:CK0 是新鲜的自然花粉、CK1 是抽真空的花粉。

2.2 各种方法测定的 N⁺ 注入处理的花粉活力

2.2.1 原位萌发法的测定。随着 N⁺ 注入剂量的增加,原位萌发法测定的花粉活力呈下降趋势,5 个剂量所对应的花粉活力分别为 90%,75%,50%,40% 和 40%,离子注入后立即测定与 30

min 后测定的花粉活力结果是一致的。这表明离子注入对花粉活力、花柱中花粉管的生长有非常明显的抑制作用,离子注入剂量愈高,花粉活力愈低(表 2,3)。

2.2.2 联苯胺-甲萘酚染色法的测定。在 N⁺ 离

子注入花粉后,立即用联苯胺-甲萘酚染色法测定花粉的活力,100,150,200,250,300单位5个剂量处理的花粉活力分别为95.25%,87.71%,87.75%,88.45%和87.79%(表2)。注入30 min后的测定结果分别为95.31%,88.35%,89.27%,87.9%和86.11%,两次测定结果一致。100单位注入处理与对照花粉活力97.51%相同,150~300单位共4个注入处理的花粉活力基本一致,与100单位注入处理的活力相比有一定程度下降。该结果表明联苯胺-甲萘酚染色法与原位萌发法测定的结果有明显差异,活力数值明显偏高,不能反映花粉在不同能量的 N^+ 注入后的活力变化。

2.2.3 花粉管快速萌发法的测定。用花粉管快速萌发法在离子注入后立即测定花粉的活力,5个剂量所对应的活力分别为50.00%,35.00%,26.67%,26.76%和20.00%(表2)。30 min后测定,对应的活力分别为11.37%,3.38%,4.28%,4.84%和1.57%(表3)。两次测定结果差异非常明显,重复之间差异很大,与原位萌发法测定的花粉活力差异非常明显。表明该方法不能用来对 N^+ 注入处理后的花粉进行活力检测,只能对自然花粉进行活力测定。

2.2.4 FDA 荧光染色法的测定。用FDA荧光染色法在离子注入后立即测定花粉的活力,5个剂量所对应的活力分别为83.76%,79.50%,62.31%,57.07%和48.38%。30 min后测定,对应的活力分别为85.69%,77.79%,63.12%,59.77%和48.41%。两次测定的结果基本一致,重复间差异小,与原位萌发法测定的结果也基本一致。由于FDA荧光染色法操作简便,因此,它是快速测定 N^+ 处理后的棉花花粉活力的较好方法。

2.2.5 离体萌发法的测定。用离体萌发的方法在离子注入后立即测定花粉的活力,5个剂量所对应的活力分别为1%,2%,2%,1%和1%,30 min以后测定,对应的活力分别为1%,1%,0%,2%和1%,活力都很低,而对自然花粉及抽真空花粉测得的活力高达98%,差异非常明显。与原位萌发法测定的结果也有很大的差异。该结果表明,离体萌发法只能对自然花粉及抽真空花粉进行活力测定,不能用来对离子注入后的花粉进行活力测定。

2.2.6 TTC 染色法的测定。TTC染色法测定的各个处理的花粉活力均为0%,花粉均无颜色变化,表明该方法不能用来检测棉花花粉的活力。

表2 N^+ 注入花粉后立即测定的花粉活力

注入剂量/单位	100	150	200	250	300
原位萌发法	90±5	75±5	50±10	40±10	40±10
联苯胺-甲萘酚染色法	95.25±0.6	87.71±1.5**	87.75±1.4**	88.45±1.4**	87.79±2.5**
TTC染色法	0**	0**	0**	0**	0**
花粉管快速萌发法	50.00±38.7	35.00±24.8*	26.67±17.0	26.67±20.5**	20.00±14.2**
FDA 荧光染色法	83.76±5.0	79.50±3.6	62.31±2.8	57.07±4.1*	48.38±3.9
离体萌发法	1**	2**	2**	1**	1**

注:*,** 分别表示差异达5%和1%的显著水平,后同。

表3 N^+ 注入花粉30 min后测定的花粉活力

注入剂量/单位	100	150	200	250	300
原位萌发法	90±5	75±5	50±10	40±10	40±10
联苯胺-甲萘酚染色	95.31±0.8	88.35±0.8**	89.27±0.7**	87.9±2.1**	86.11±3.7**
TTC染色法	0**	0**	0**	0**	0**
花粉管快速萌发法	11.37±7.1**	3.38±2.9**	4.28±3.3**	4.84±3.5**	1.57±1.4**
FDA 荧光染色法	85.69±5.0	77.79±1.6	63.12±6.3	59.77±2.3*	48.41±5.5
离体萌发法	1**	1**	0**	2**	1**

3 结论与讨论

3.1 结论

6种花粉活力检测方法的测定效果有明显差

异。只有FDA荧光染色法和原位萌发法可测定 N^+ 注入处理后的棉花花粉活力。FDA荧光染色法操作简便,是较好的活力测定方法。TTC法不能检测棉花花粉的活力。花粉管快速萌发法不能

用来测定经抽真空处理过的花粉的活力。原位萌发法、联苯胺-甲萘酚染色法、花粉管快速萌发法、FDA 荧光染色法和离体萌发法 5 种方法均可用于自然花粉的活力检测,测定的结果基本一致。原位萌发法、联苯胺-甲萘酚染色法、FDA 荧光染色法和离体萌发法 4 种方法均可用于抽真空处理过的花粉的活力检测,测定的结果基本一致。

3.2 讨论

不同测定方法对自然花粉、抽真空花粉和 N^+ 注入花粉的活力测定结果有明显差异,这可能与不同方法的测定机理有关。联苯胺-甲萘酚染色法是棉花花粉活力测定最常用的方法,但该方法不能准确测定经 N^+ 注入处理后的棉花花粉活力。可能是花粉经 N^+ 注入处理后,虽然部分花粉已不能在柱头上萌发,但并不影响花粉中已经存在的过氧化物酶的活性,没有萌发能力的花粉仍被染成红色,导致测定出的花粉活力数值偏高。TTC 染色法是植物花粉活力测定中推荐使用的一种方法^[7,10]。原理是 TTC 染色液与花粉呼吸代谢中的氧化还原酶进行还原作用,由无色的氧化型变成红色的还原型。本研究中该方法不能测定棉花花粉活力,提高 TTC 染色液的浓度至 1% 或延长反应的时间至 1 h 都不能使花粉着色。这和华中农学院的研究结果相同^[9]。可能是棉花花粉的呼吸作用较弱,产生的氧化还原酶不足以使 TTC 发生颜色反应。类似研究也表明 TTC 染色法不能测定无芒稗花粉的活力^[11]。因此,TTC 染色法测定棉花花粉活力的方法和效果需要进一步验证。花粉管快速萌发法能测定自然花粉的活力,不能测定抽真空花粉的活力;离体萌发法能测定自然花粉和抽真空花粉的活力,不能测定 N^+ 注入花粉的活力。产生这些现象的原因有待研究。

不同方法对抽真空花粉和 N^+ 注入花粉的活力测定效果不同,也说明棉花花粉经过抽真空和 N^+ 注入处理后,生理状态可能发生了明显变化,

这方面的机理以及这些变化与后代遗传变异间的关系尚待研究。

致谢:

江苏省农科院遗传所倪万潮研究员和南京农业大学生命科学学院王庆亚教授对本实验提供大力帮助。中国科学院等离子体物理研究所研究生任杰和王志明、陈远东、王洋三位实习同学参加本项目的部分研究工作。

参考文献:

- [1] 孙君丽,杜雄明,孙其信,等. 棉花 γ 辐射诱变后代 M5 农艺经济性状的遗传变异[J]. 棉花学报, 2006, 18(2):83-88.
- [2] 朱乾浩,季道藩. 棉花辐射诱变育种研究进展[J]. 棉花学报, 1997, 9(3):113-119.
- [3] 李立祥,李爱青. 氮离子注入棉花花粉诱发农艺形状变异的研究[J]. 激光生物学报, 1997, 6(3):1160-1164.
- [4] JOHN J. Burke. Moisture Sensitivity of Cotton Pollen [J]. Agronomy Journal, 2002, 94:883-388.
- [5] 张绍铃,陈迪新,康 琅,等. 培养基组分及 pH 值对梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2):225-230.
- [6] 邓德旺. 棉花花粉介导的基因转化方法研究[D]. 南京农业大学, 1997, 20-21.
- [7] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(一)花粉活力的测定 [J]. 植物学通报, 1993, 44(1):60-62.
- [8] JOHN J B, Jeff V, Melvin J O. *In Vitro* Analysis of Pollen Germination[J]. Agronomy Journal, 2004, 96:359-368.
- [9] 华中农学院黄冈分院棉麦组. 不同染色法测定棉花花粉生活力[J]. 遗传与育种, 1977, (5):35-36.
- [10] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 1990.
- [11] 宋小玲. 通过植物的亲和性评价抗除草剂转基因作物基因漂移的安全性研究[D]. 南京农业大学, 2003, 50-51. ●