

陆地棉脱外壁花粉粒的制备和花粉粒核 DNA 检测

岳洁瑜¹, 吴李君², 吴跃进², 张宝龙³, 唐灿明^{1*}

(1. 南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国科学院等离子体物理研究所, 安徽 合肥 230031;
3. 江苏省农业科学院遗传生理研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:以陆地棉品种苏棉 22 号的花粉为材料, 研究棉花花粉粒脱外壁和检测花粉粒内部核 DNA 状态的方法。花粉粒经 4% 多聚甲醛固定后, 通过 10% 次氯酸钠水溶液氧化、55℃ 热激 30 min、压片等系列程序可将花粉粒的外壁完全脱去, 分离出完整的脱外壁花粉粒。用 DNA 荧光染料 DAPI 分别对陆地棉花粉粒和脱外壁花粉粒进行染色, 在荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下观察花粉粒的内部核结构。没有脱外壁的花粉粒的内部核结构难以被观察到, 而脱外壁花粉粒的核 DNA 结构清晰可见, 内壁几乎无荧光。首次发现陆地棉的成熟花粉粒为三核花粉粒。

关键词:陆地棉; 花粉粒; 脱外壁花粉粒; DAPI

中图分类号: S562.01 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)02-0094-05

Preparation of De-exined Pollen Grains and Observation of Pollen Grains Nuclear DNA in *Gossypium hirsutum* L.

YUE Jie-yu¹, WU Li-jun², WU Yue-jin², ZHANG Bao-long³, TANG Can-ming^{1**}

(1. Agronomy College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Science, Hefei 230031, China; 3. Genetics and Physiology Institute, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: The objective of this study was demonstrating nuclei DNA in the pollen grains of upland cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Sumian 22). The procedures of detaching the exine and observing nuclei DNA of pollen grains were established. The pollen grains were fixed with 4% paraformaldehyde solution, oxidated with 10% sodium hypochlorite solution, heat shocked at 55℃ for 30 minutes, then the slide with pollens solution was pressed by hand. Finally, the exine of pollen grains could be detached. The pollen grains and de-exined pollen grains were stained with DAPI and observed with fluorescence microscope and laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2), respectively. The nucleus of cotton pollen grain could not be observed, but the nuclear DNA of de-exined pollen grain could be observed clearly. The inner wall fluorescence of pollen grain was not found. The three nuclei of the pollen grain of upland cotton cultivar Sumian 22 were observed in the experiment.

Key words: upland cotton; *Gossypium hirsutum* L.; pollen grain; de-exined pollen grain; DAPI

植物的花粉粒和花粉管中各成员细胞的结构、空间关系, 特别是细胞核的状态变化一直是花粉生物学研究的重要内容之一^[1]。花粉粒的壁可分为外壁和内壁, 外壁主要由孢粉素和纤维素等

物质组成。其中孢粉素是一种难以分解、抗逆性强、耐高温的物质, 稳定性强, 具有抗强酸、强碱的特性, 它使花粉粒的外壁非常牢固^[2]。内壁主要由纤维素和果胶质组成, 易被酶类物质分解。脱

外壁花粉粒是指花粉粒被脱去外壁后,留下的内壁与原生质体,是介于完整花粉粒与花粉粒原生质体之间的一种结构单位^[3],是一种可用于研究花粉形态与生理特性的独特材料。脱外壁花粉粒可用来研究内壁的表面结构、剥离的外壁结构与成分、内壁的沉积、新壁的合成等多方面的内容^[4];脱外壁花粉粒由于排除了外壁对生物大分子的屏障作用,有利于染料分子的进入。用荧光染料对核 DNA 进行染色后,再用荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察,可研究花粉粒内部的核结构及其变化规律。棉属植物的花粉粒成熟时体积较大,直径大约为 85~105 μm 左右,从四分体释放出来以后,形成一层不透明的结构非常致密的外壁,外壁的自发荧光非常强。如果采用染色薄壁花粉粒(如水稻、小麦花粉粒)的方法来对棉花成熟花粉粒进行染色,则完全观察不到它的内部结构。需要采用新的方法脱去棉花花粉粒的外壁。本研究以陆地棉的成熟花粉粒为材料,通过热激-氧化法制备脱外壁花粉粒,再用 DNA 荧光染料 DAPI(4, 6-diamidino-2-phenylindole, 4,6-联脒-2-苯基吲哚)进行染色,建立了一种简便的制片程序,分别用荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜研究了棉花花粉粒的结构特点及其细胞核的状态。研究的方法和结果为开展与棉花花粉粒有关的生殖生物学研究提供了新的途径和依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种苏棉 22 号,种植于合肥中国科学院等离子体物理研究所实验地,常规栽培管理。待植株上的花朵开放后,收集花朵中的新鲜花粉粒备用。

1.2 方法

1.2.1 脱外壁花粉粒的制备。将花粉粒置于 1 mL Eppendorf 管中,用 4% 多聚甲醛溶液在室温下固定 1 h 后,用 PBS 缓冲液洗涤数次,再加入 10% 次氯酸钠水溶液于 55℃ 水浴中处理 30 min,用 PBS 缓冲液置换次氯酸钠,并将花粉粒悬浮,4℃ 冰箱中保存备用。

将制备好的花粉粒悬浮液在离心机上以 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min,再将花粉粒细胞移至载玻片,加入 200 μL 浓度为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 溶液,迅速盖片,适度用力斜压至外壁脱

掉而花粉粒细胞不破裂为度,放在暗盒中静置 10 min 后镜检。

1.2.2 荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察。将制备好的载玻片放在荧光显微镜下观察,用 Olympus BH-2RFL 型反射荧光装置拍照。用 Leica TCS-SP2 型激光扫描共聚焦显微镜观察时,先将制备好的载玻片倒放在显微镜上,再用 UV 激光器的激光作光源进行扫描,通过单次扫描和连续扫描方式进行图像采集。

2 结果与分析

2.1 脱外壁花粉粒的制备方法

2.1.1 热激对棉花花粉粒脱外壁效果的影响。短时间的热激处理对棉花花粉粒脱外壁效果有着重要的影响。浸泡在浓度为 10% 的次氯酸钠水溶液中的花粉粒,在 35℃、45℃、55℃、65℃ 等 4 种温度下分别处理 30 min。结果 65℃ 处理的花粉粒内壁被严重破坏,压片时,材料很容易被压碎。35℃ 与 45℃ 处理的花粉粒脱外壁效果均不明显,且外壁难以通过压片法除去。55℃ 处理的花粉粒较容易压片,能得到完整的脱外壁花粉粒。说明热激温度 55℃ 是花粉粒脱外壁的适宜温度。

2.1.2 次氯酸钠水溶液处理对棉花花粉粒脱外壁效果的影响。次氯酸钠水溶液处理对棉花花粉粒脱外壁效果有着重要作用。经过 10% 的次氯酸钠水溶液处理的花粉粒,放入 55℃ 水浴锅中热激 30 min 后,花粉粒外壁很快变得疏松,易于压片。如果花粉粒不经过次氯酸钠处理,就直接进行水浴处理,水浴分别处理 30、45、60 和 90 min 后,获得的结果是:前三种处理脱外壁效果均较差,都难以压片,90 min 处理使花粉粒基本失去原有的结构。说明次氯酸钠处理对棉花花粉粒脱外壁效果有重要影响。浓度为 10% 的次氯酸钠水溶液可使花粉壁中的蛋白变性,结构变得疏松。浓度小于 10% 时,次氯酸钠本身的性质不够稳定,处理效果差;当浓度大于 10% 时,pH 值过高,腐蚀性很强,对花粉粒结构的破坏作用明显,对花粉粒的脱外壁效果也没有改善。

从本研究的结果来看,经过 4% 多聚甲醛溶液固定过的棉花成熟花粉粒,在 10% 次氯酸钠水溶液中,于 55℃ 水浴条件下处理 30 min,可较容易地被脱去花粉粒外壁(图 5)。

2.2 棉花花粉粒的核 DNA 观察

荧光染料 DAPI 可以对细胞核中的 DNA 进

行染色,染色后的 DNA 可以通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜进行观察。经 DAPI 染色后的花粉粒,如果不进行脱外壁处理,在荧光显微镜下观察,看不到花粉粒的内部核结构(图 4),仅能看到表面的结构。应用激光扫描共聚焦显微镜观察,在波长为 488 nm 的激光激发下,可以清晰地显示出花粉粒的外壁(图 6、7),但激光扫描不能透过,同样看不到花粉粒的内部结构(图 11)。花粉粒内壁也无荧光信号。该结果说明,如果不进行脱外壁处理,荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下均不可能观察到棉花成熟花粉粒的内部核结构。

在荧光显微镜下观察,可清晰地看到经过 DAPI 染色后的脱外壁花粉粒的内部核结构,清楚地分辨出单核花粉粒(图 1)、双核花粉粒(图 2)和三核花粉粒(图 3)等三种不同类型的花粉粒(图中箭头所指皆表示核)。单核花粉粒中的细胞核还没有进行有丝分裂,或者已进行过一次有丝分裂,但是,营养核与生殖核仍然聚集在一起。双核花粉粒已进行了一次有丝分裂,形成一个营养核与一个生殖核,且两者已经明显分开。三核花粉粒已进行过两次连续的有丝分裂,包含一个营养核和两个精细胞核,且三者已经明显分开。因此,从本研究的结果来看,只有在脱去成熟花粉粒的外壁后,DAPI 染料才能对花粉粒内部的核 DNA 进行染色,核结构才能在荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下被观察到。在棉花花粉粒萌发以前,其内部生殖核的分裂并不完全同步,而是同时存在单核花粉粒、双核花粉粒和三核花粉粒等三种不同类型的成熟花粉粒,部分花粉粒内的生殖核已经分裂为两个精细胞。所以,陆地棉品种苏棉 22 号的成熟花粉粒应该属于三核花粉粒。

在激光扫描共聚焦显微镜下观察,花粉粒外壁被脱去后,内壁几乎无荧光,可清楚地观察到花粉粒的内部核结构(图 8—图 10)。也可在粗调焦距时看到单核、双核和三核等三种不同类型的花粉粒,结果与荧光显微镜下观察到的现象是完全一致的。

3 讨论

脱外壁花粉是近年来建立的介于花粉与原生质体间的独特体系^[5],植物脱外壁花粉粒的制备方法主要有低温水合、水合一酶解和多步冲击等

3 种^[3,6-9]。本研究表明,这 3 种方法均不能脱去棉花成熟花粉粒的外壁。Bernardo(1965)用三酸混合液脱壁法观察到棉属小孢子染色体第一次分裂过程,但双核期以后的棉花花粉粒的外壁很难被三酸溶解,细胞内含物也受到遮蔽。即使能溶解其外壁,所需时间也相当长(5~8 h,室温)。如果用挤压法,又破坏了细胞内含物在细胞内的相对状态和位置^[10,11]。

本研究先将花粉粒在固定液中固定,再经长时间高温热激和 10% 次氯酸钠水溶液氧化,改变了内壁、外壁和原生质体三者之间的结合状态,使花粉粒外壁变得松散,用大拇指轻压,外壁即可开裂,最后脱去外壁,得到完整的脱外壁花粉粒。

研究得到的是没有生活力的脱外壁花粉粒。应尝试其它方法,有效地分离出有活力的脱外壁花粉粒,作为研究花粉粒萌发、离体授粉、离体培养和遗传转化的材料^[12]。通过完整花粉粒、脱外壁花粉粒及花粉粒原生质体的比较,可以更深入地认识外壁及内壁的生物学功能,从而对其在传粉、受精过程中各自的作用及其相互关系有更深入的了解。

近年来,花粉粒作为一种新的诱变材料,对其施加的各种条件会在不同水平上影响花粉的活力或生理代谢过程,其中最引人关注的是在遗传物质 DNA 水平上是否发生了变异。于艳杰^[13] 尽管比较了几种测定棉花花粉活力的方法,但鉴于棉花花粉外壁结构尤其致密的情况,并不能在 DNA 水平上检测其遗传物质是否发生了变化。DAPI 标记后的脱外壁花粉粒可清晰地看到花粉粒的内部核结构,且 DAPI 的结合是定量的,所以可通过检测 DAPI 的量说明核 DNA 在量上的变化。而且脱外壁花粉还可以作为研究棉花花粉粒外壁和内壁结构及花粉粒发育过程中的细胞周期、细胞凋亡等内容的实验材料^[14-15]。

根据以往报道,棉花的花粉粒是双核的,成熟时含营养核和生殖核,浸没在营养细胞细胞质中的生殖核常紧靠营养核,所以,有时候营养核和生殖核是重叠在一起的^[16]。通常认为,棉花花粉粒的生殖核在萌发后的花粉管中才分裂为两个精细胞。本试验中却首次通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察到三核的陆地棉花粉粒,大约有三分之一的花粉粒观察到了这种结构,所以,可认为陆地棉的成熟花粉粒是三核的。

由于激光共聚焦显微镜存在放大倍数和分辨率不能同时兼顾的弊端,所以,双核和三核花粉粒的核只能在共聚焦显微镜的粗调焦距时可在一个视野中看到,在高倍放大的情况下,不同的核同时出现在一个焦平面和一个视野的情况极少见,拍到清晰的图片非常困难,所以只列出了单核花粉粒(图8和图9)和三核花粉粒(图10)的图片,尚无双核花粉粒的照片。

致谢:

中国科学院等离子体物理研究所研究生赵焯对本实验提供大力帮助。

参考文献:

- [1] 李国平,黄群策,秦广雍.用激光扫描共聚焦显微镜观察雪松花粉和花粉管[J].激光生物学报,2006,15(1):1-8.
- [2] 王开发,杨振京,张盛隆.花粉中的孢粉素[J].养蜂科技,1999,5:11-13.
- [3] 杨弘远,周 嫦.植物有性生殖实验研究四十年[M].武汉:武汉大学出版社,2001.103-135.
- [4] XU B F, Liang S P, Zhou C, Yang H Y. Brassica de-exined pollen as a new experimental system studying pollen germination[J]. Acta Botanica Sinica, 1997, 39(6): 489-493.
- [5] 吴旺泽,王 蒂,王 清,等.马铃薯花粉的制备与人工萌发[J].园艺学报,2005,32(1):39-43.
- [6] 夏惠君,周 嫦,杨弘远.烟草脱外壁花粉的制备[J].武汉大学学报(自然科学版),1995,41(6):773-776.
- [7] DUHUX E. Protoplast isolation of gymnosperm pollen[J]. Z Pflanzenphysiol, 1980, 99:207-214.
- [8] 周 嫦.三种植物花粉原生质体的大量分离与初步培养[J].植物学报,1988,30(4):362-367.
- [9] 徐秉芳,梁世平,周 嫦,等.芸苔属脱外壁花粉的分离和人工萌发[J].植物学报,1996,38(12):963-968.
- [10] BHOOJWANI S S, Cocking E C. Isolation of pollen protoplasts from pollen tetrads[J]. Nature New Biology, 1972, 239: 29-30.
- [11] 吴敬音.棉花花粉粒三酸去壁法的改进[J].江苏农业科学,1982,9:46.
- [12] 梁世平,夏惠君,周 嫦,等.烟草花粉脱外壁过程中发现的一种特殊花粉壁结构[J].电子显微学报,1996,15(5):401.
- [13] 于艳杰,吴李君,吴跃进,等.氮离子注入处理后的棉花花粉活力测定方法研究[J].棉花学报,2007,19(2):102-105.
- [14] 王洪燕.利用DNA荧光探针DAPI检测番茄花粉粒的发育时期[J].枣庄学院学报,2006,23(2):93-94.
- [15] COLEMAN AW, Goff LJ. Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA[J]. Stain Technol, 1985, 60(3): 145-154.
- [16] 徐是雄,胡适宜.棉花形态和解剖结构图谱[M].北京:北京大学出版社,1985.11-12. ●