

文章编号: 1674-7054(2017)01-0052-06

# 木薯花粉原位萌发及柱头可授性观察

周亚秋<sup>1</sup> 孙琪<sup>1</sup> 陈霞<sup>1</sup> 赖杭桂<sup>1</sup> 陈松笔<sup>2</sup> 叶剑秋<sup>2</sup>

(1. 海南大学 农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

**摘 要:** 以木薯华南5号(SC5)和华南7号(SC7)品种为实验材料,应用花粉活体原位萌发技术及联苯胺-过氧化氢法雌蕊柱头可授性检测技术,对木薯花粉萌发及花粉管发育特征进行观察,并分析木薯品种内自交及品种间异交花粉管萌发过程的差异,以确定木薯雌蕊柱头的最佳授粉时期。结果表明,木薯在同品种自交和异品种杂交上均存在授粉亲和性上的差异,异交授粉无论在花粉萌发速度及萌发率上均具有明显的优势。雌蕊柱头的最佳授粉时间为雌花开放后2~5 h,5~24 h内柱头具较强可授性,时间越长可授性越差,72 h后柱头不再具有可授性。

**关键词:** 木薯; 花粉; 原位萌发; 柱头; 可授性

中图分类号: Q 944.42 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.01.009

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是全球三大块根作物之一,其适应性很广,是热带及亚热带地区重要的经济及能源作物<sup>[1-2]</sup>。木薯花序为雌雄同序异花,同序雌花先于雄花成熟,为典型的异花授粉植物。由于木薯种茎极易无性繁殖,生产上的木薯种植材料均采用优良无性系,因此,木薯的品种都是高度杂合的无性系。通过有性杂交选择单株繁殖无性系是木薯优良品种选育的主要途径<sup>[3]</sup>,但因木薯人工授粉座果率低从而影响了杂交育种的效率,加强木薯有性生殖基本规律的研究,掌握木薯花粉的萌发特性及柱头可授性时期,对提高木薯杂交育种效率具有重要的实际意义。近年来,有关植物花粉原位萌发技术及柱头可授性检测方法已普遍应用于农作物、蔬菜、花卉、林木等有性生殖与杂交育种研究<sup>[4-8]</sup>。笔者曾经采用醋酸洋红、碘-碘化钾、TTC等染色法及花粉离体培养法均无法对木薯花粉活力进行有效测定,而应用活体柱头花粉原位萌发的苯胺蓝花粉管染色法,可有效观察到木薯花粉萌发及花粉管生长特性。在本研究中笔者以木薯华南5号(SC5)和华南7号(SC7)品种为实验材料,对木薯品种内自交及品种间异交花粉管萌发过程进行观察,并利用联苯胺-过氧化氢溶液检测柱头的过氧化物酶活性,通过过氧化物酶活性高低所产生气泡量的变化,判断木薯雌蕊柱头在开花后不同时期可授性的强弱,旨在为木薯有性杂交育种、种质资源保存及生殖生物学等生产研究方法提供指导依据。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 供试材料为华南5号(SC5)、华南7号(SC7)2个木薯品种,由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供,种植于海南大学农学院儋州校区教学科研基地。

1.2 花粉原位萌发方法 以SC5为母本,SC5及SC7为父本,于上午9:00~10:00时选取当天即将开放的父母本花序套袋隔离,于13:30~14:30时雌雄蕊开放后,采集2种父本花粉分别授于SC5母本柱头进行品种内自交和品种间异交授粉,套袋隔离。授粉后1 h内每隔10 min及授粉后2 h采样用于观察柱头

收稿日期: 2016-11-07

修回日期: 2016-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360354); 海南大学中西部计划学科重点领域建设项目(ZXBJH-XK001); 海南大学科研启动基金项目(kyqd1644)

作者简介: 周亚秋(1991-),女,海南大学农学院2014级硕士研究生, E-mail: 369736603@qq.com

通信作者: 赖杭桂(1964-),男,教授,研究方向: 植物遗传育种学, E-mail: laihanggui8938@163.com

上花粉粒萌发及花粉管生长。参照 Burke<sup>[9]</sup> 和 Hiratsuka 等<sup>[10]</sup> 花粉原位萌发方法,并作部分修改,具体流程如下:取新鲜雌花,去除萼片后取柱头连同子房在卡诺氏固定液( $V_{95\% \text{乙醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$ )中固定 24 h,取出柱头用 95% 乙醇洗涤 3~4 次,置于 70% 乙醇容器中 4℃ 冰箱中保存备用。观察时,把柱头用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 软化 1 h,蒸馏水冲洗 3 次以上,再用 1% 水溶性苯胺蓝染色 8~12 h,然后把柱头用木制牙签轻轻剖开,分成小块,置载玻片上,滴适量蒸馏水,加盖玻片轻轻压平,用 Olympus BX51 型显微镜在 WU(宽带紫外光激发)下观察。每张制片取 3~5 个视野,每样本计 100~300 个花粉粒,观察统计花粉萌发率及花粉管的生长特性。

1.3 雌蕊柱头可授性检测 用联苯胺-过氧化氢法测定柱头的可授性<sup>[11]</sup>。采集 SC5 品种不同开花时期的雌花,剪取柱头,置于凹面载玻片上,滴加联苯胺-过氧化氢反应液( $V_{1\% \text{联苯胺}}:V_{3\% \text{过氧化氢}}:V_{\text{水}}=4:11:22$ )至浸满柱头,观察柱头产生气泡状况。若柱头具可授性,则柱头周围的反应液呈现蓝色并有气泡出现。根据气泡产生的快慢和多少判断柱头可授性的相对强弱。

## 2 结果与分析

2.1 木薯花粉萌发及花粉管发育特征观察 荧光原位萌发的观察显示,大多数正常饱满的花粉粒萌发及花粉管生长较好(图 1A),小花粉粒及败育花粉粒不萌发或花粉管发育缓慢(图 1B)。木薯花粉萌动首先通过花粉孔露出芽点,有时可见 2 个萌发孔同时萌发,但其中只有 1 个花粉管能正常生长(图 1C);花粉管直径约 15~20  $\mu\text{m}$ ,基部管节有时可见明显膨大(图 1D)。柱头上观察的花粉粒萌发时间及花粉管生长速度有所差异,正常花粉管一旦萌发,其生长速度极快,花粉管进入花柱引导组织后向下呈直线生长(图 1E),显微镜下可见大量花粉管成束状于花柱中(图 1F)。

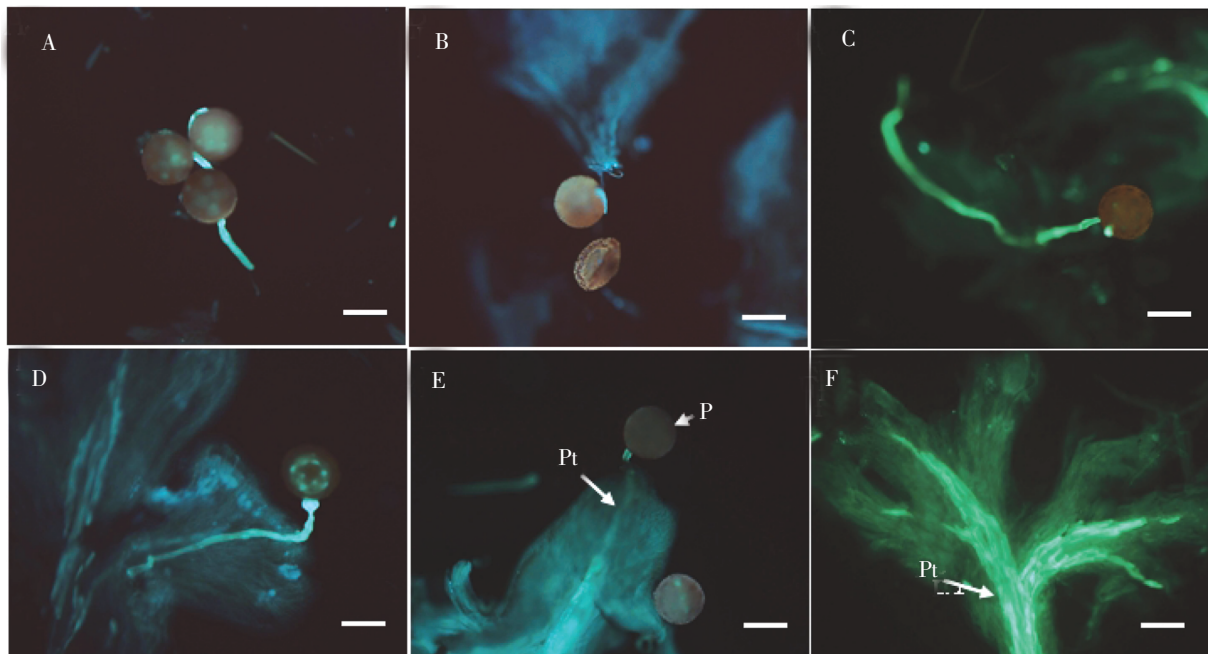


图1 木薯花粉管萌发及发育特征

A. 正常花粉萌发; B. 败育及小花粉粒; C. 两个萌发孔; D. 基部管节膨大; E. 花粉管进入花柱引导组织; F. 花柱中束状花粉管. 标尺 = 100  $\mu\text{m}$

Fig. 1 The growth and germination of cassava pollen tube

A. Normal pollen germination; B. Abortion and small pollen; C. Two apertures; D. Basal tube dilated; E. The pollen tube entering into the transmitting tissue of the style; F. The fasciculate pollen tubes within the style. bar = 100  $\mu\text{m}$

2.2 木薯自交及异交花粉管萌发过程的差异 观察比较 SC5 品种内自交及品种间异交授粉后花粉管萌发快慢及花粉萌发率可看出(表 1,图 2),异交授粉无论从花粉萌发率及花粉管萌发速度上均具有明显的优势。同品种自交后花粉 40 min 开始萌发,1 h 萌发率最高可达 39.2%;而异品种授粉后 20 min 花粉在柱头上已开始萌发,30 min 可达最高 66.8% 的萌发率,并可见异交 1~2 h 花柱中束状花粉管数量明显要多于自交 1~2 h 花柱中的花粉管数量(图 1F)。

表 1 SC5 自交及异交花粉管萌发过程的差异

Tab. 1 The differences of self-and cross-pollination of SC5 in pollen tube germination

授粉后时间 Time after pol- lination /min	观察数 Grains observed/粒		萌发数 Grains germinated/粒		萌发率 Germination rate/%	
	SC5 ♀ × SC5 ♂	SC5 ♀ × SC7 ♂	SC5 ♀ × SC5 ♂	SC5 ♀ × SC7 ♂	SC5 ♀ × SC5 ♂	SC5 ♀ × SC7 ♂
10	100	100	0	4	0.00 aA	4.0 bB
20	100	144	2	54	2.00 aA	31.0 bB
30	125	323	5	155	4.00 aA	66.8 bB
40	150	136	42	89	28.0 aA	65.4 bB
50	150	152	48	92	32.0 aA	60.5 bB
60	204	247	80	142	39.2 aA	57.5 bB
120	146	154	50	83	34.2 aA	53.9 bB

注: 不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著, 不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

Note: Different uppercase letters are significantly different at the 0.01 level; different lowercase letters are significantly different at the 0.05 level

### 2.3 雌蕊柱头最佳授粉状态的确定

木薯柱头膨大成球状,具乳头状突起,柱头 3 裂,肉质、乳白色,表面具黏性适于花粉固着和萌发(图 3A)。SC5 雌花开放时间一般为晴天中午约 12:00 时,花萼展开速度极快,到下午 17:00~18:00 时闭合。通过联苯胺-过氧化氢法测定柱头的可授性可看出(图 3,表 2),随着雌花开放时间的长短,雌花花萼形态及柱头形态会发生不同程度变化,氧化物酶活性高低所产生气泡量的变化明显(表

2)。开花 2 h 后过氧化物酶活性可达到最高,其后随着时间的延长,过氧化物酶活性减弱至无。雌花一旦开放柱头即具有较强可授性,0~2 h 内的联苯胺-过氧化氢溶液检测显示柱头可产生出较多的气泡,因此雌花花萼张开则柱头已具备了较强可授能力(图 3B);开放后 2~5 h 期间,检测显示柱头产生大量气泡,即过氧化物酶活性达最高时期,该时期柱头具最强可授性,是木薯杂交授粉的最佳时期(图 3C);雌花开放 24 h,联苯胺-过氧化氢溶液检测显示柱头仍有较多气泡产生,柱头仍具较强可授性(图 3D);48 h 进行联苯胺-过氧化氢溶液检测,发现柱头还可产生少量气泡,说明部分柱头仍具有一定的可授性,但此时大部分柱头已开始收缩变硬,变褐较明显(图 3E),时间越长则可授性越差。72 h 后花萼及柱头脱落,柱头褐化,已不具有可授性(图 3F)。

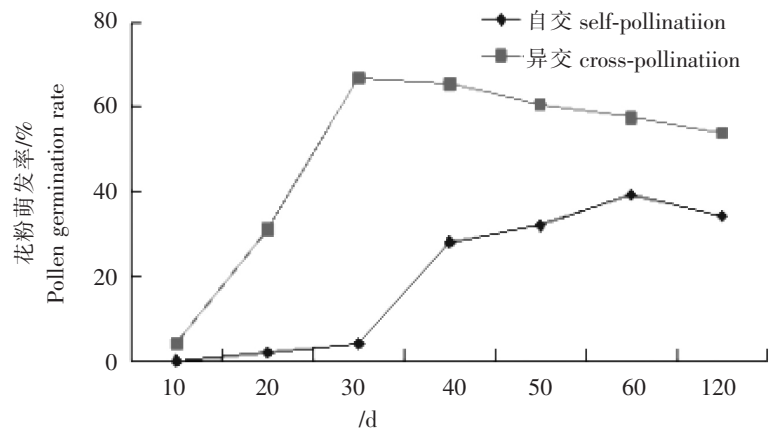


图 2 SC5 ♀ × SC5 ♂ 自交与 SC5 ♀ × SC7 ♂ 异交授粉后木薯花粉萌发率的动态变化

Fig. 2 The dynamic change of pollen germination rate of cassava after self-and cross-pollination

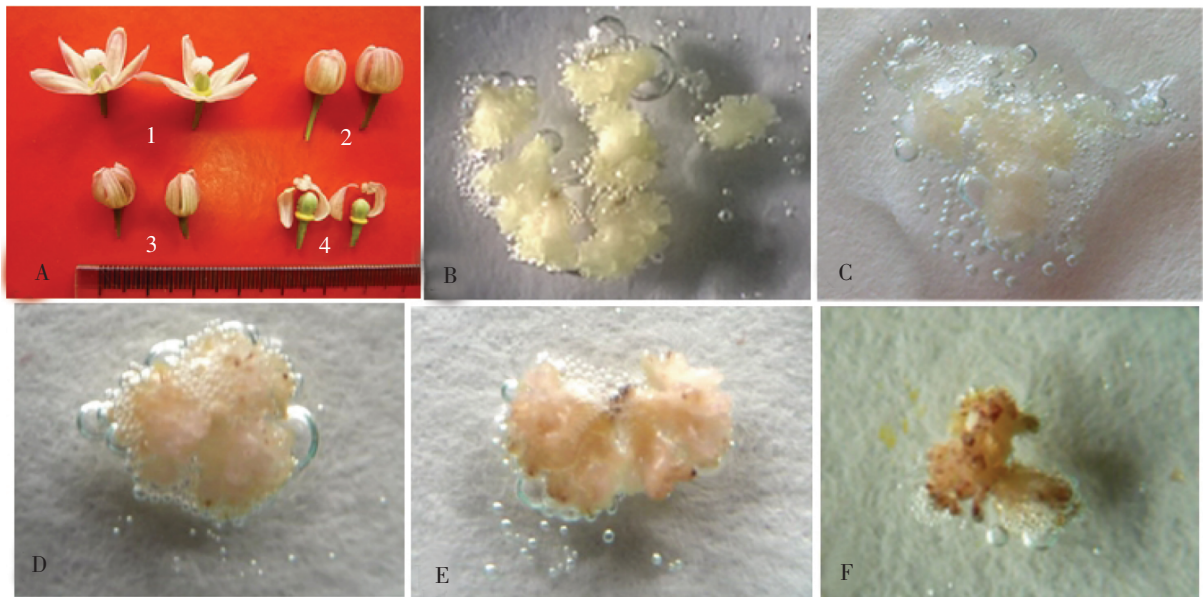


图 3 木薯雌蕊柱头可授性检测

A. 1 ~ 4 d 开放后的雌花; B. 雌花开放 2 h 内的柱头检测; C. 雌花开放 2 ~ 5 h 的柱头检测; D. 24 h 后的柱头检测; E. 48 h 后的柱头检测; F. 72 h 后的柱头检测

Fig. 3 The determination of stigma receptivity of cassava

A. The female flowers that opened 1 – 4 days; B. Stigma detection within 2h after female flowers opened; C. Stigma detection 2 – 5 h after female flowers opened; D. Stigma detection after the flowers opened 24h ; E. Stigma detection after 48h; F. Stigma detection after 72 h

表 2 木薯 SC5 柱头可授性检测

Tab. 2 The determination of stigma receptivity of SC5

开花后时间 / h Time after flowering	雌花花萼形态 The calyx form of female flowers	柱头形态 Stigma form	检测结果 Test results
0 ≤ T < 2	花萼开放, 颜色鲜艳 Sepals opened , bright	柱头大 乳白色 Stigm big , creamy	++
2 ≤ T < 5	花萼张开, 后期闭合 Sepals opened and then closed	乳白色, 表面黏性 Stigma creamy , sticky on surface	+++
24	花萼闭合, 颜色暗淡 Sepals closed dim	柱头乳白带浅红 Stigma creamy with	++
48	花萼闭合, 开始萎蔫 Sepals closed , started to wither	柱头收缩, 呈红褐色 Stigma shrunk , reddish brown	+
72	花萼脱落 Sepals dropped	呈褐色, 易脱落 Stigma brown , easy to shed	-

注: -. 柱头不具有可授性; +. 柱头具有可授性; ++. 柱头具有较强可授性; +++. 柱头具最强可授性

Note: -. Stigma without receptivity; +. Stigma with receptivity; ++. Stigma with a strong receptivity; +++. Stigma with the strongest receptivity

3 讨 论

花粉萌发和花粉管生长是实现受精作用的首要步骤,在高等植物有性生殖过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。通常植物花粉活力可采用人工离体培养萌发或花粉染色法进行测定<sup>[12-13]</sup>,俞奔驰等<sup>[14]</sup>和石兰蓉等<sup>[15]</sup>曾报道相关木薯花粉活力测定方法,但可能由于木薯花粉粒外壁组分复杂及结构特殊<sup>[16]</sup>,花粉染色法和离体

培养法测定结果并不理想,而活体原位萌发可真实反映其柱头上花粉萌发及花粉管生长状况。本研究应用花粉原位萌发技术,人工授粉后采集柱头,通过苯胺蓝染色法对花粉管进行染色,可有效在荧光显微镜下动态观察木薯花粉粒在柱头上萌发及花粉管生长过程。

花粉在柱头上的萌发及生长状况是杂交亲和性的一项重要内容<sup>[17]</sup>,运用花粉管荧光标记能够直接判断高等植物在自交、异交过程中花粉萌发及花粉管的生长情况<sup>[6]</sup>。苯胺蓝能够有效地标记花粉管,花粉管在花柱区内穿行时产生大量的胼胝塞,产生强烈荧光,因此采用荧光显微镜法能快速测定植物授粉的亲和性<sup>[18]</sup>。研究发现,木薯在同品种内授粉和异品种间授粉亲和性上存在差异,异品种间授粉其花在柱头的起始萌发时间为 20 min,而同品种内授粉的起始萌发时间则需 40 min;此外,异品种间授粉 30 min 即可达 66.8% 的最高萌发率,而同品种内授粉需 1 h 才可达 39.2% 的最高萌发率。由此可见,无论在花粉萌发速度及萌发率上木薯异品种间的授粉均具有明显的优势。这表明木薯品种间异交授粉亲和性要强于品种内自交授粉亲和性,木薯的自然授粉以品种间异交为主,但同时也不排除品种内自交授粉的可能性<sup>[19]</sup>。这可能与木薯天然授粉下以异花为主的生殖进化有关。

人工授粉成功的关键在于成熟的并具有活力的花粉粒能否及时的传导到具有可授性的雌蕊柱头上,自然条件下采用刚成熟的新鲜花粉粒活性较强,木薯花粉的原位萌发结果也表明了采集当天开放的花粉无论自交或异交只需 20~40 min 即可萌发,且萌发速度极快,30 min~1 h 已达最高萌发率;而柱头可授性检测表明,木薯的柱头在雌花开放后 24 h 内都具较强的可授性,在开花后 2~5 h 具最强可授性,这与石兰蓉等<sup>[15]</sup>采用 MTT 法检测结果基本一致,但过氧化物酶活性检测更能直观地反映柱头可授性强弱,因此,选用当天开放的新鲜木薯雌雄花用于杂交授粉效果最好。

## 参考文献:

- [1] Cock J H. Cassava: a basic energy source in the tropics [J]. Science, 1982, 218(4574): 755–762.
- [2] Nassar N M A, Ortiz R. Cassava improvement: challenges and impacts [J]. Agric. Sci, 2007, 145: 163–171.
- [3] Li K, Zhu W, Zeng K, et al. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots [J]. Proteome Sci., 2010, 1477: 5956–5960.
- [4] 于艳杰, 吴李君, 吴跃进, 等. 陆地棉花花粉粒萌发和花粉管生长特性 [J]. 自然科学进展, 2007(9): 1299–1303.
- [5] 李春林, 姚小华, 杨水平, 等. 普通油茶花粉形态及花粉管活体萌发的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(3): 242–246.
- [6] 王春雷, 张绍铃. 荧光标记在植物花粉管构造及生长特性研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 407–413.
- [7] 胡杏, 鞠易倩, 叶远俊, 等. 紫薇×大花紫薇不同育性株系花粉生活力及柱头可授性对比分析 [J]. 河南农业大学学报, 2014(2): 145–149.
- [8] Chang Li, Jiale Su, Xiaoqing Liu, et al. Pistillate Flower Development and Stigma Receptivity of *Euphorbia pulcherrima* [J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 15(10): 1671–1675.
- [9] Burke J J. Moisture sensitivity of cotton pollen [J]. Agronomy Journal, 2002(94): 883–388.
- [10] Hirasuka S, Zhang S L, Nakagawa E, et al. Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S-protein in the Japanese pear [J]. Sexual Plant Reproduction, 2001, 13(4): 209–215.
- [11] 孙颖, 马翠青, 严俊鑫, 等. 大花百子莲的花粉活力与柱头可授性 [J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(7): 89–92.
- [12] Pline W A, Edmisten K L, Oliver T, et al. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability [J]. Crop Sci., 2002, 42: 2193–2200.
- [13] Maria Letícia G Melloni, Maximiliano S Scarpari, Jeremias R de Mendonca. Comparison of two staining methods for pollen viability studies in sugarcane [J]. Sugar Tech, 2013, 15(1): 103–107.
- [14] 俞奔驰, 李军, 盘欢, 等. 木薯花粉活力测定及验证试验 [J]. 广东农业科学, 2012, 13: 25–27.
- [15] 石兰蓉, 卢赛清, 黄秋伟, 等. 木薯花粉活力与柱头可授性研究 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 98–100.
- [16] Livia J V, Soares T L, Rossi M L, et al. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) [J]. Acta Botanica Brasilica, 2012, 26(2): 350–356.
- [17] 张天真. 作物育种学总论 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 117–118.
- [18] 魏建和, 马凤杰, 黄璐琦, 等. 桔梗花粉管萌发的荧光显微镜观察 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1625–1627.
- [19] Sutyemez M. Pollen quality, quantity and fruit set of some self-compatible and self-incompatible cherry cultivars with artificial pollination [J]. Afr J. Biotechnol, 2011, 10(17): 3380–3386.



## Pollen Germination in Situ and Stigma Receptivity of Cassava

ZHOU Yaqiu<sup>1</sup>, SUN Qi<sup>1</sup>, CHEN Xia<sup>1</sup>, LAI Hanggui<sup>1</sup>, CHEN Songbi<sup>2</sup>, YE Jianqiu<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

**Abstract:** The pollen germination and stigma receptivity is an important part of plant reproduction, and it is the basis for the artificial pollination in reproduction and crossbreeding. The pollen germination rate and pollen tube growth of cassava varieties SC5 and SC7 were observed by using the method for pollen germination in situ and in vivo, and the stigma receptivity was detected by using the benzidine-hydrogen peroxide test. The differences of the pollen tube germination process in selfing or crossing of these two cassava varieties were analyzed to determine the best pollination time for the stigmas of the pistil of cassava. The results show that there are differences in pollination affinity of the cassava varieties in the self- and cross-pollination, and that cross pollination had obvious advantages in pollen germination speed and rate. The best pollination time for the stigma was 2–5 h after the female flowers opened, and the stigma receptivity was the highest within 5–24 h. The stigma receptivity turned to be weaker with time and was no longer available after 72 h.

**Keywords:** Cassava; pollen; germination in situ; stigma; receptivity

(上接第 51 页)

## Effects of Preservatives Applied at Different Flowering Stages on Cut Flower Senescence of *Oncidium* Gower Ramsey

CHENG Yuxuan<sup>1</sup>, YANG Cuiping<sup>1</sup>, TIAN Xiaoyan<sup>1</sup>, SHI Lesong<sup>1</sup>, HU Jin<sup>1</sup>,  
YAN Bingyu<sup>1</sup>, GONG Xiaoxiao<sup>1</sup>, ZHUANG Yufen<sup>1</sup>, PAN Yingwen<sup>2</sup>, LIU Jinping<sup>1</sup>

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants, Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract:** *Oncidium* flowers (*Oncidium* Gower Ramsey) at different flowering stages were treated with ethylene agents such as silver thiosulfate (STS) and 1-methylcyclopropene (1-MCP), and ethylene releaser ethephon to observe the effects of the ethylene agents used as preservatives on cut flowers. The results show that the aging process of *Oncidium* flowers could be obviously shortened by ethephon application after the half-opened stage. The STS treatment could prolong the prior-to-full-opening stage and the full-opened stage of flowers. The 1-MCP treatment could delay the senescing progression of flowers at the initial stage of senescence and the senescence stage. The ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content of the flower parts at different flowering stages were determined. The results showed that ACC contents of the gynandria and sepals of the cut flowers were steady during the bud-burst stage and the half-opened stage, but rose after the half-opened stage, and that ethylene production increased after the prior-to-full-opening stage. ACC contents of petals increased slowly after the prior-to-full-opening stage and peaked at the initial stage of senescence. The effectiveness of the preservatives appeared to be strongly affected by the initiation of endogenous ethylene biosynthesis in *Oncidium* cut flowers.

**Keywords:** *Oncidium* Gower Ramsey; flower senescence; preservative; STS; 1-MCP; ethephon; ethylene production; ACC content