

姚 恒,郑昀晔,马文广. 烟草花粉密度及其与柱头的黏附力测定[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):85-88.

烟草花粉密度及其与柱头的黏附力测定

姚 恒,郑昀晔,马文广

(云南省烟草农业科学研究院,云南玉溪 653100)

摘要:将蔗糖密度梯度离心法与分光光度法相结合,测定了 K326、*N. repanda* 花粉的物理密度及其与柱头之间的结合力。结果表明,K326 花粉的密度为 $1.277\ 26\ \text{g}/\text{cm}^3$,其与柱头的黏附力为 $2.98 \times 10^{-7}\ \text{N}$; *N. repanda* 花粉密度为 $1.251\ 21\ \text{g}/\text{cm}^3$,其与柱头的黏附力为 $2.83 \times 10^{-7}\ \text{N}$ 。K326 花粉密度及其与柱头的黏附力均大于 *N. repanda* 花粉。

关键词:烟草;密度;黏附力;花粉

中图分类号: S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0085-04

植物不能运动,植物雌雄配子需要借助生物^[1-6](动物、昆虫)或者自然因素^[7-11](风、水)进行传粉。传粉后,柱头通过与花粉之间的黏附力“捕捉”花粉。黏附力强弱决定了柱头“捕捉”花粉能力大小。不同物种柱头对花粉的接受能力差异显著。干、湿柱头物种在柱头表面形态、有无柱头分泌物上的区别是导致花粉黏附过程不同的主要原因^[12]。拟南芥柱头对于其自身花粉的黏附力远远强于其他双子叶植物的花粉^[13-14]。对甘蓝的研究也得到了类似的结果。花粉外壁在黏附过程中发挥了非常重要的作用^[14-15]。除此之外,花粉外被中的蛋白、脂类在黏附过程中也起到重要作用^[16]。湿性柱头植物的授粉也受天气影响,例如下雨会减少或抑制黏液的分泌,从而降低花粉、柱头的附着效率^[17]。授粉 0~30 min 内下雨会显著降低枇杷的坐果率。目前,关于烟草花粉与柱头黏附力的研究尚未见报道。本研究建立了测定烟草花粉与柱头之间表面黏附力的方法,旨在为研究花粉与柱头结合力强弱提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草 K326、*N. repanda* 花粉。

收稿日期:2013-05-14

基金项目:中国烟草总公司云南省公司科技计划项目(编号:2011YN09)。

作者简介:姚 恒,博士,助理研究员,主要从事烟草品种选育研究。

E-mail: yaohn@126.com。

通信作者:马文广,研究员,主要从事烟草品种选育研究。E-mail:

mwg@tobacco-seed.com。

参考文献:

- [1] 张 力. SPSS 在生物统计中的应用[M]. 2 版. 厦门:厦门大学出版社,2008.
- [2] 蒋守华,刘葛山,徐美琴. 杂交油菜新品种淮杂油 5 号高产栽培技术研究[J]. 安徽农学通报,2008(16):43-44.
- [3] 赵继献,任廷波. 4 个油研品种的株型结构比较[J]. 贵州大学学报:农业与生物科学版,2002,21(6):391-396,403.

1.2 方法

1.2.1 花粉密度测定方法

1.2.1.1 密度梯度离心液配制 离心管底部加入 70% 蔗糖溶液,依次小心加入 60%、55%、50%、45%、30%、20% 蔗糖溶液,每种浓度溶液取 200 μL ,置于离心管中备用。

1.2.1.2 花粉样品处理 将蔗糖溶于水中,配置成质量浓度为 100 g/L 的溶液,称取 0.01 g 花粉置于 100 μL 上述溶液。取 10 μL 配制好的悬浮液缓慢注入“1.2.1.1”节中不同密度梯度离心液中。

1.2.1.3 离心沉降 离心管中的花粉在 Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机中,20 $^{\circ}\text{C}$ 下 6 000 r/min 离心 10 min,待花粉达到沉降平衡后静置。

1.2.1.4 绘制标准曲线 称取 0.01 g 花粉,投入到各浓度蔗糖溶液中,用 UV-1800 紫外分光光度计,以选取该浓度的标准蔗糖溶液为对照,绘制该浓度蔗糖溶液中花粉浓度标准曲线。抽取沉降平衡后不同浓度梯度的蔗糖溶液,采用分光光度计在 290 nm 波长下测定吸光度,利用标准曲线换算成该层浓度蔗糖溶液中花粉的浓度。

1.2.1.5 花粉密度计算方法 花粉密度计算方法见公式(1):

$$\rho = \sum (OD_n / OD) \times \rho_n \quad (1)$$

式中: ρ 代表花粉密度; OD_n 代表第 n 层蔗糖梯度溶液中花粉浓度; OD 代表所有含花粉的各浓度梯度蔗糖溶液层中花粉浓度总和; ρ_n 代表第 n 浓度梯度蔗糖溶液密度。

1.2.2 花粉与柱头黏附力测定方法

1.2.2.1 授粉柱头固定 将待测柱头切下长 10~15 mm 的小段,授粉后,立即将授粉柱头直立固定在盛有 2 mL 离心液的离心管底部,用铜丝缠绕在远离柱头的花柱上,使整个花柱

[4] 曹国军,包宗伟,傅小平,等. 油菜高产栽培配套技术研究[J]. 江西农业学报,2011,23(1):83-85.

[5] 任廷波,赵继献,陈长艳. 不同施氮量、密度对油研九号产量的影响[J]. 贵州农业科学,2004,32(1):16-19.

[6] 赵继献. 杂交油菜高产栽培性状的主要因子及其相关分析[J]. 山地农业生物学报,2001,20(2):86-91.

[7] 蒋守华,刘葛山. 密度、施氮量对油菜新品种淮杂油 7 号产量及经济性状的影响[J]. 浙江农业科学,2011(3):584-586.

能够沉入并完全浸没于盛有高密度蔗糖溶液离心管的底部。

1.2.2.2 差速离心洗脱 20 ℃ 5 000 ~ 14 000 *g* 下,将授粉柱头在 Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机中差速离心 10 min。

1.2.2.3 显微荧光观察 0.01% 水溶性苯丙胺蓝染色授粉柱头后,立刻在 Carl Zeiss Axiomager A1 紫外荧光显微镜下观察柱头表面花粉附着情况,记录柱头表面基本不存在花粉附着状态下的离心力 *g*_{离心力},以这时的 *g* 值作为洗脱花粉所需的加速度。

1.2.2.4 黏附力计算方法

$$V_{\text{花粉}} = \frac{4\pi r^3}{3} \tag{2}$$

$$F_{\text{黏附力}} = (V_{\text{花粉}} \times d_{\text{蔗糖}} \times g_{\text{离心力}}) - (V_{\text{花粉}} \times d_{\text{花粉}} \times g_{\text{离心力}}) = V_{\text{花粉}} \times (d_{\text{蔗糖}} - d_{\text{花粉}}) \times g_{\text{离心力}} \tag{3}$$

式中:*d*_{蔗糖} 代表蔗糖溶液密度, *g*/cm³; *d*_{花粉} 代表花粉密度, *g*/cm³; *g*_{离心力} 代表花粉被离心洗脱时的离心力, m/s²; *r* 代表花粉粒球的半径, μm; *V*_{花粉} 代表将花粉粒视为球形时的体积, cm³。

2 结果与分析

2.1 花粉密度

称取 0.01 g 花粉,投入到 2 mL 蔗糖溶液中,等比例稀释后,测定蔗糖溶液吸光度(表 1), K326 和 *N. repanda* 花粉在 50%、55%、60% 蔗糖溶液中的标准曲线见图 1 至图 5。离心后,当花粉达到沉降平衡后,观察到 K326 花粉悬浮在 55%、60% 这 2 层蔗糖浓度梯度层中; *N. repanda* 花粉悬浮在 50%、55%、60% 这 3 层蔗糖浓度梯度层中。各自抽取相应浓度梯度蔗糖溶液的梯度层,制作 K326、*N. repanda* 花粉在相应浓度蔗糖溶液中的标准曲线。UV-1800 紫外分光光度计测定表明, K326 花粉在 55%、60% 2 层蔗糖浓度梯度层中的吸光度分别为 0.579、0.532(测量杯 5 mL), *N. repanda* 在 50%、55%、60% 3 层蔗糖浓度梯度层中的吸光度分别为 0.604、0.555、0.543。根据相应的标准曲线,换算出 K326 花粉在 55%、60% 蔗糖溶液中的浓度分别为 0.07、0.15 mg/cm³, *N. repanda* 花粉在 50%、55%、60% 蔗糖溶液中的浓度分别为 0.64、0.35、0.33 mg/cm³(测量杯 1 mL)。查阅有关文献可知, 20 ℃ 下 50%、55%、60% 蔗糖溶液密度分别为 1.229 57、1.257 53、1.286 46 g/cm³。由公式算出 K326 花粉密度为 1.277 26 g/cm³, *N. repanda* 花粉密度为 1.251 21 g/cm³。由此可知, K326 花粉密度比 *N. repanda* 花粉高 0.026 05 g/cm³,考虑到测量误差,表明 K326、*N. repanda* 花粉密度相差极小。

表 1 烟草花粉在蔗糖溶液中的吸光度

花粉密度 (g/cm ³)	K326 吸光度		<i>N. repanda</i> 吸光度		
	55% 蔗糖	60% 蔗糖	50% 蔗糖	55% 蔗糖	60% 蔗糖
0.156	0.504	0.383	0.324	0.390	0.400
0.313	0.724	0.512	0.419	0.494	0.470
0.625	1.000	0.884	0.557	0.730	0.763
1.250	1.480	1.385	0.874	1.282	1.325
2.500	2.505	2.932	2.007	2.035	1.956
5.000	4.000	4.000	3.503	3.748	3.781

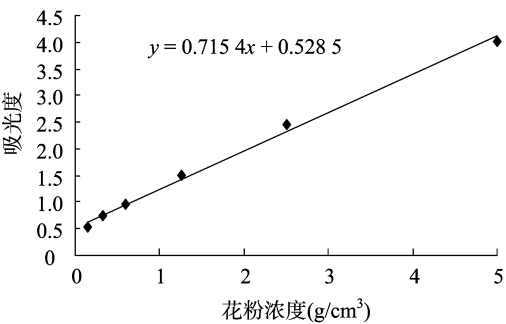


图1 55%蔗糖溶液中K326花粉的标准曲线

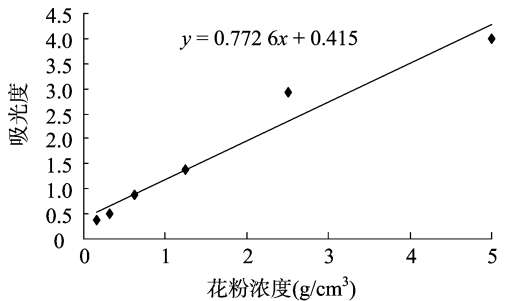


图2 60%蔗糖溶液中K326花粉的标准曲线

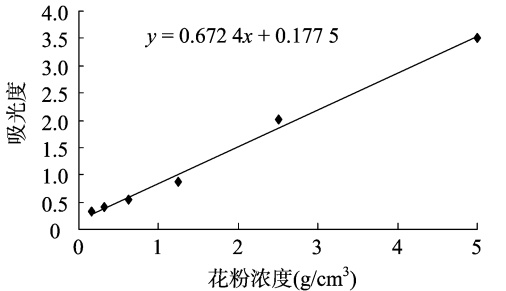


图3 50%蔗糖溶液中*N. repanda*花粉的标准曲线

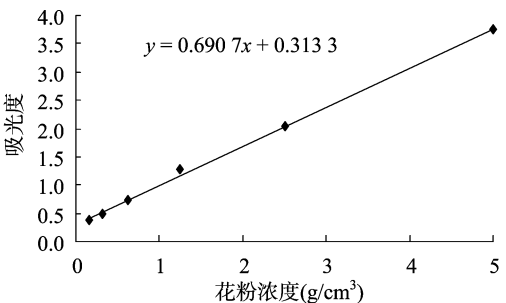


图4 55%蔗糖溶液中*N. repanda*花粉的标准曲线

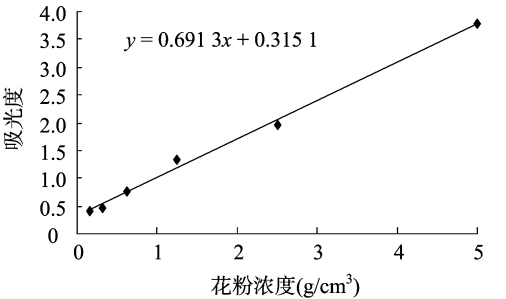
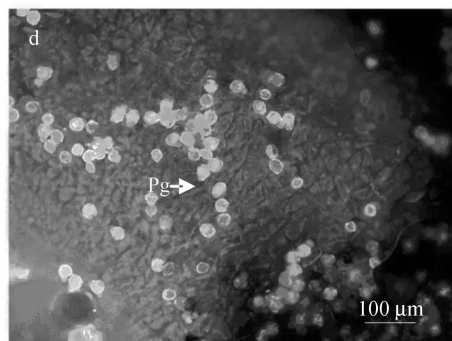
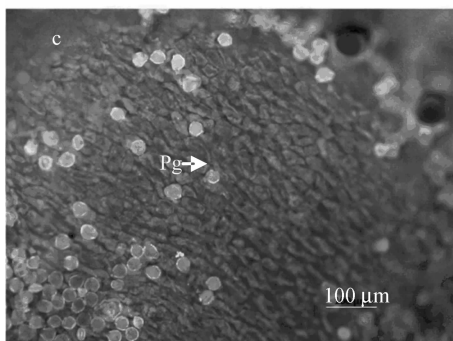
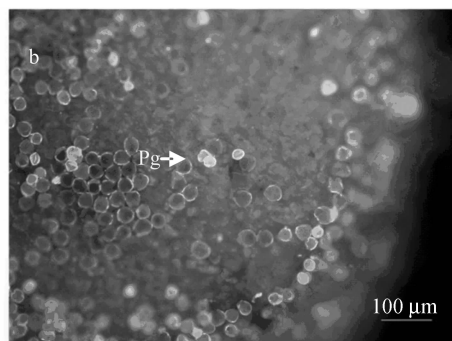
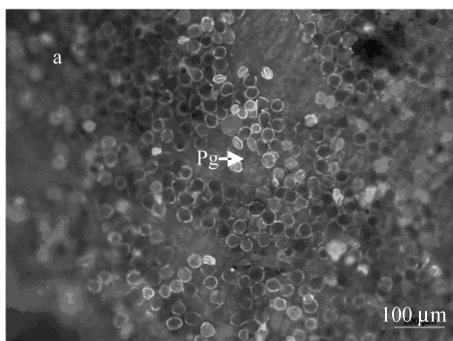


图5 60%蔗糖溶液中*N. repanda*花粉的标准曲线

2.2 花粉与柱头黏附力

20 ℃下,授粉 K326 柱头差速离心处理 20 min,用 0.01% 苯胺蓝水溶液染色后,立即在 Carl Zeiss Axioimager A1 紫外荧光显微镜下观察柱头表面花粉粒的附着情况。图 6-a 至图 6-c 显示,花粉粒呈现依次减少情况,图 6-c 与图 6-d 相比,花粉粒数相差不大。以图 6-c 状态下的离心力作为洗



a、b、c、d 表示 K326 花粉经过 10 000、12 000、13 000、14 000 g 离心后柱头表面附着情况

图6 差速离心后K326花粉在柱头表面的附着情况

根据公式(4)、(5)计算花粉与柱头之间的黏附力:

$$V_{\text{花粉}} = \frac{4\pi r^3}{3} \quad (4)$$

$$F_{\text{黏附力}} = (V_{\text{花粉}} \times d_{\text{蔗糖}} \times g_{\text{离心力}}) - (V_{\text{花粉}} \times d_{\text{花粉}} \times g_{\text{离心力}}) = V_{\text{花粉}} \times (d_{\text{蔗糖}} - d_{\text{花粉}}) \times g_{\text{离心力}} \quad (5)$$

$$g = 9.80 \text{ m/s}^2$$

70% 蔗糖密度为 1.34717 g/cm^3 , K326 花粉密度为 1.27726 g/cm^3 , 其中: $r = 20 \text{ μm}$, $g_{\text{加速度}} = 13000 \text{ g}$, K326 花粉与柱头间的黏附力: $F_{\text{黏附力}} = 4/3 \times \pi \times (20 \times 10^{-4} \text{ cm})^3 \times (1.34 - 1.28) \text{ g/cm}^3 \times 10^{-3} \times 13000 \text{ g} \approx 2.98 \times 10^{-7} \text{ N}$ 。

70% 蔗糖密度为 1.34717 g/cm^3 , *N. repanda* 花粉密度为 1.25121 g/cm^3 , 其中: $r = 20 \text{ μm}$, $g_{\text{加速度}} = 9000 \text{ g}$, *N. repanda* 花粉与柱头间的黏附力: $F_{\text{黏附力}} = 4/3 \times \pi \times (20 \times 10^{-4} \text{ cm})^3 \times (1.34 - 1.25) \text{ g/cm}^3 \times 10^{-3} \times 9000 \text{ g} \approx 2.83 \times 10^{-7} \text{ N}$ 。

由此可知, K326 花粉与柱头之间的黏附力大于 *N. repanda* 花粉, 但是差异很小。从图 1、图 2 可以看出, 即使经上万转的离心, 柱头表面仍然有花粉粒。这是因为在自然情况下, 某些活力高的花粉一旦落到柱头上, 就立即开始进行水合萌发, 长出花粉管并深入柱头, 将花粉粒铆钉在柱头上, 即使加大离心力, 也不能将花粉粒从柱头上洗脱下来。

3 结论与讨论

植物杂交不亲和产生生殖障碍有 5 个阶段: 花粉的黏附

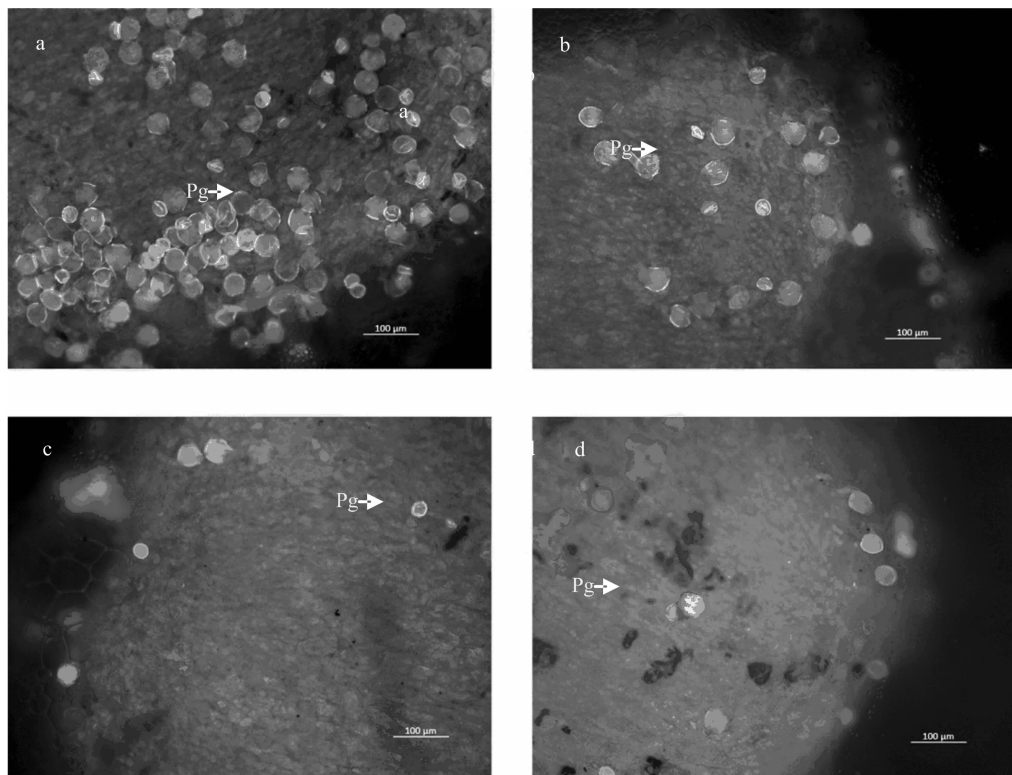
脱柱头上 K326 花粉所需离心力 g 的临界值 (13000 g)。由图 7-a 至图 7-c 可知, 经过差异梯度离心后, *N. repanda* 柱头上的花粉粒呈现依次减少状态。进一步加大离心力, 发现图片上的花粉粒数相差不大 (图 7-d、7-e)。以图 7-c 状态下的离心力作为洗脱柱头上 *N. repanda* 花粉所需离心力 g 的临界值 (9000 g)。

→花粉的水合→花粉在柱头表面萌发并进入引导组织→花粉管在引导组织进行极性生长并导向胚珠→花粉管经过珠孔进入珠心, 到达胚囊, 释放精子与卵细胞、核中央细胞融合完成双受精。花粉只有通过了这 5 个阶段的“考验”, 才能顺利完成受精。

烟草是自交亲和的, 柱头是湿性柱头。K326 花粉比 *N. repanda* 花粉的密度大, 花粉与柱头间的黏附力也大; 但是作为同烟草种, 这 2 个品种的花粉密度、柱头黏附力相差很小。烟草柱头通过分泌物的表面张力“捕捉”花粉, 这种通过物理作用介导花粉与柱头黏合的机制, 决定了烟草柱头对花粉黏附没有选择性, 柱头、花粉的黏附力只与花粉表面状态、密度相关。如果物种柱头是自交不亲和、干性柱头, 柱头、花粉间的黏附力强弱会因柱头对花粉亲和性的选择机制而呈现巨大差异。如在芸薹属植物的自交不亲和系统中, 花粉与柱头通过蛋白的相互作用, 识别亲和的花粉, 拒绝自身花粉。柱头通过这些机制选择性介导了花粉黏附, 对亲和性花粉的黏附力远远大于非亲和性花粉。干性柱头没有表面张力的作用, 柱头、花粉的黏附力强弱与花粉本身密度无关, 亲和性花粉与柱头的黏附力强于非亲和性花粉的黏附力。

参考文献:

- [1] 王淳秋, 罗毅波, 台永东, 等. 蚂蚁在高山鸟巢兰中的传粉作用[J]. 植物分类学报, 2008, 46(6): 836-846.



a、b、c、d 表示 *N. repanda* 花粉经过 6 000、8 000、9 000、10 000 g 离心后柱头表面附着情况

图7 差速离心后 *N. repanda* 花粉在柱头表面的附着情况

- [2] 邵剑文, 张小平, 张中信, 等. 安徽羽叶报春的有效传粉昆虫及花朵密度和种群大小对传粉效果的影响[J]. 植物分类学报, 2008, 46(4): 537–544.
- [3] 黄双全, 郭友好, 潘明清, 等. 鹅掌楸的花部综合特征与虫媒传粉[J]. 植物学报, 1999, 41(3): 15–22.
- [4] 段元文, 刘建全. 青藏高原特有植物祁连獐牙菜(龙胆科)的花综合征与虫媒传粉[J]. 植物分类学报, 2003, 41(5): 465–474.
- [5] 方海涛, 斯琴巴特. 蒙古扁桃的花部综合特征与虫媒传粉[J]. 生态学杂志, 2007, 26(2): 177–181.
- [6] 张玉娜, 孙 坤, 张 辉, 等. 肋果沙棘(*Hippophae neurocarpa* S. W. Liu et T. N. He) 自然种群的风媒传粉特征[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 508–514.
- [7] 鲁先文, 马瑞君, 孙 坤. 中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi) 的开花特性及风媒传粉距离的检测[J]. 生态学报, 2008, 28(6): 2518–2525.
- [8] 胡永宁, 张国盛, 包宝祥, 等. 毛乌素沙地天然臭柏种群风媒传粉的特征[J]. 干旱区资源与环境, 2006, 20(4): 186–192.
- [9] 魏 岩, 尹林克, 严 成. 白梭梭开花及风媒传粉特点[J]. 干旱区研究, 2005, 22(1): 85–89.
- [10] 祖元刚, 于景华, 王爱民. 红松天然种群风媒传粉特点的研究[J]. 生态学报, 2000, 20(3): 430–433.
- [11] 郭友好, 黄双全. 茨藻目植物柱头特征与传粉系统的演化[J]. 植物分类学报, 1999, 37(2): 131–136.
- [12] Heslop-Harrison Y, Shivanna K R. The pollen-stigma interaction: pollen tube penetration in *Crocus* [J]. Annals of Botany, 1977, 41(5): 913–922.
- [13] Zinkl G M, Zwiebel B I, Grier D G, et al. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine [J]. Development, 1999, 126(23): 5431–5440.
- [14] Gaude T, Dumas C. A membrane-like structure on the pollen wall surface in *Brassica* [J]. Annals of Botany, 1984, 54(6): 821–825.
- [15] Dickinson H G, Elleman C J, Doughty J. Pollen coatings – chimaeric genetics and new functions [J]. Sexual Plant Reproduction, 2000, 12(5): 302–309.
- [16] Ortega E, Dicenta F, Egea J. Rain effect on pollen-stigma adhesion and fertilization in almond [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(3): 345–348.
- [17] 梅百根, 张正福. 蔗糖密度梯度离心法测定蛋白质的沉降系数[J]. 植物生理学通讯, 1987, 23(4): 61–63.