

希茉莉 (*Hamelia patens* Jacq.) 花粉发育时期快速检测

岳琳^{1,2}, 匡延凤^{1*}, 廖景平¹

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:茜草科希茉莉 (*Hamelia patens* Jacq.) 的花粉用 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 直接染色不能观察到花粉核, 本研究探索出适宜在 DAPI 染色前处理希茉莉花粉壁的水浴加热-氧化方法, 使得希茉莉花粉核能在荧光显微镜下清晰地显示出来, 从而快速检测花粉所处的发育阶段。结果表明: (1) 单核花粉和二核花粉最适宜的水浴加热温度和时间分别为 65℃、20 ~ 50 min 和 55℃、20 ~ 40 min; (2) 花粉发育阶段与花朵、花药长度的对应关系为: 花朵 0.90 ~ 1.00 cm、花药 0.50 ~ 0.60 cm 时对应花粉的四分体时期, 花朵 1.10 ~ 1.60 cm、花药 0.60 ~ 0.85 cm 时对应单核花粉时期, 花朵 1.80 ~ 2.70 cm (花冠裂片张开前)、花药 0.91 ~ 1.01 cm 时对应二核花粉时期。

关键词: 希茉莉; 花粉发育; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

中图分类号: Q944.42

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2014)04-0421-06

Quick Detection of Pollen Developmental Stages of *Hamelia patens* Jacq.

YUE Lin^{1,2}, KUANG Yan-Feng^{1*}, LIAO Jing-Ping¹

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: DAPI is a DNA-specific fluorochrome that facilitates observation of nuclei during pollen development and can confirm the developmental stages of pollen grains. However, the nuclei in *Hamelia patens* Jacq. pollen grains are little stained by DAPI due to the resistance of the pollen wall. An effective “water-bath heating and oxidation” method was used to treat the pollen wall of *H. patens*. The results showed that the: (1) best incubating conditions for uninucleate microspores and bicellular pollen grains were 20 ~ 50 min at 65°C and 20 ~ 40 min at 55°C, respectively; and, (2) lengths of flowers and anthers were 0.90 ~ 1.00 cm and 0.50 ~ 0.60 cm at the tetrad stage, 1.10 ~ 1.60 cm and 0.60 ~ 0.85 cm at the uninucleate microspore stage, and 1.80 ~ 2.70 cm and 0.91 ~ 1.01 cm at the bicellular pollen stage, respectively.

Key words: *Hamelia patens* Jacq.; Pollen development; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

花粉在花药中产生, 它的形态结构尤其是其表面的纹饰特征常常作为植物分类和系统演化研究中的重要依据^[1]。花粉壁是包裹着花粉粒的一层特

殊细胞壁, 在保护花粉免受环境破坏、促进花粉与昆虫以及花粉与柱头之间的附着与识别等方面具有重要作用^[2]。虽然花粉壁的形态特征及其发育过

收稿日期: 2014-01-23, 退修日期: 2014-02-14。

基金项目: 国家自然科学基金(31200176); 中国科学院资源保护与可持续利用重点实验室青年基金; 中国科学院华南植物园博士启动项目。

作者简介: 岳琳(1990-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物结构与发育生物学(E-mail: yuelin90@scbg.ac.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: kuangyf05@scbg.ac.cn)。

程已有大量研究,但对于花粉壁形成过程的分子调控机制还知之甚少,需要进行深入的解析。茜草科(Rubiaceae)植物花粉类型丰富多样,其花粉大小、花粉表面纹饰、萌发孔沟数目及类型、花粉壁层次结构等特征的变异均较为显著。其中,有些特征是茜草科部分族、属或种的分类依据,有些是茜草科植物区别于被子植物其它类群的独有特征^[3],因此茜草科植物的花粉具有较高的研究价值。

希茉莉(*Hamelia patens* Jacq.)为茜草科长隔木属多年生常绿灌木,原产于热带美洲,我国南部和西南部有栽培,花期常为 5 – 10 月,但在热带地区温度适宜时,可全年开花。希茉莉花期长,是研究茜草科植物花药及花粉发育较为理想的材料。目前,国内还未见希茉莉花粉研究的相关报道,为了对希茉莉花粉发育过程进行深入的细胞学及分子生物学分析,取材并准确判断花粉的发育时期是首要解决的问题。

花粉发育一般分为花粉母细胞时期、四分体时期、单核花粉时期、二核花粉时期及成熟花粉时期,花粉内细胞核数目是区分发育时期的重要标准。在检测 DNA 的各种染料中,DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)特异性强、灵敏度高,可以穿透细胞膜与细胞核中的双链 DNA 结合,产生比 DAPI 本身更为强烈的荧光信号(是 DAPI 的 20 多倍),从而发挥标记的作用^[4],因此 DAPI 是检测花粉发育时期的理想标记染料。Erickson 和 Gould 等研究发现,花器官的表型特征与该器官内各组织细胞发育时期有着密切的联系^[5,6],故本实验拟找出希茉莉花朵总长度、花药长度与花粉发育阶段的对应关系,为后续研究的取材提供便利。

Honys 等和 Deveshwar 等研究表明,拟南芥、水稻花粉未经预处理,即可被 DAPI 成功染色,显示出细胞核^[7,8]。而本研究预实验结果显示,希茉莉花粉不经预处理,则细胞核不能被 DAPI 成功染色;不经预处理的花粉即使用加有 Triton X-100 表面活性剂的 DAPI 溶液染色,在荧光显微镜下细胞核仍然不可见。关于花粉壁的处理方法有化学法^[9]、酶解法^[10,11]、物理法^[12]等,这些方法都在不同程度上去除了花粉壁,得到了花粉原生质体,但同时也具有实验条件要求高、易使花粉原生质体

失活、操作繁琐、耗时长等缺点。在总结前人经验的基础上,本研究采用水浴加热-氧化方法处理希茉莉花粉,使 DAPI 成功与细胞核结合,观察到花粉中细胞核的数目,探索出了快速检测希茉莉花粉发育时期的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为茜草科希茉莉(*Hamelia patens* Jacq.),种植于中国科学院华南植物园内,常规栽培管理。采摘希茉莉新鲜花朵,测量花朵的总长度(从子房底部至花冠顶部),并按长度将其进行分组。

1.2 实验方法

1.2.1 处理方法 I

解剖分组后的新鲜花朵,将各组的完整花药分别置于不同的 1.5 mL 离心管中,用卡诺固定液固定,4℃ 冰箱中过夜;挑出适量已固定好的花药放入新的 1.5 mL 离心管中,用 PBS(phosphate buffer saline)缓冲液洗涤 3 次(每次 10 min);将花药放在载玻片上捣碎,滴加 0.4 μg/mL DAPI 溶液 100 μL 染色,然后置于 ZEISS AXIOPLAN 2 iminage 荧光显微镜下观察、随机拍照。统计至少 30 粒花粉中的单核花粉数、二核花粉数、未见核花粉数,计算花粉见核率。

1.2.2 处理方法 II

解剖分组后的新鲜花朵,将各组的完整花药分别置于不同的 1.5 mL 离心管中,用 4%多聚甲醛溶液在室温下固定 1 h;挑出适量已固定好的花药放入新的 1.5 mL 离心管中,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次(每次 10 min)后,加入 500 μL 10%次氯酸钠溶液,放入 45℃、55℃、65℃水浴锅中分别处理 20、30、40、50 min;然后用 PBS 缓冲液洗涤花药 3 次(每次 10 min),最后保存于 PBS 溶液中;将花药取出置于载玻片上,在解剖镜下解剖并使花粉释放出来,待花粉液滴略干后滴加 2 μg/mL DAPI 溶液 100 μL,迅速盖片且适度轻压。将制备好的花粉玻片放在 ZEISS AXIOPLAN 2 iminage 荧光显微镜下观察、随机拍照。统计各处理条件下至少 30 粒花粉中的单核花粉数、二核花粉数、未见

核花粉数，计算花粉见核率。

1.2.3 花粉壁超微结构观察

采集不同发育阶段的花序并剥离出花药，迅速用 2.5%戊二醛 (pH 7.2, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制)固定 24 h 以上；用磷酸缓冲液充分洗涤后转入 1%锇酸中固定 (≥2 h)；用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸泡 2 h，并在浸泡过程中冲洗 4 次 (30 min / 次)；再经不同浓度梯度酒精 (15%，30%，50%，75%，90%，100%) 逐级脱水、环氧丙烷过渡、Spurr 树脂包埋和 70℃烘箱热聚合；最后在半薄切片机上用玻璃刀切成厚度为 1 ~ 2 μm 的半薄切片，0.1%甲苯胺蓝染色后在光学显微镜下初步观察，确定花药发育的大致时期；定位标记后用超薄切片机切片，厚度为 80 ~ 90 nm，2% (W/V) 醋酸双氧铀染色 60 ~ 90 min 后，再用 6% (W/V) 柠檬酸铅染色 15 min，最后在 JEM-1010 型透射电子显微镜下 100 KV 观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 四分体时期的观察

希茉莉花朵长度为 0.90 ~ 1.00 cm、花药长度为 0.50 ~ 0.60 cm 时，花粉正处于四分体时期 (表 1)，其 4 个小孢子被包藏在共同的胼胝质壁中。此时，DAPI 易与小孢子的核结合，采用方法 I 对希茉莉花粉进行预处理后，可在荧光显微镜下清楚地观察到四分体状态 (图版 I：A, B)。

表 1 希茉莉花粉发育时期与花朵、花药长度的对应关系
Table 1 Classification of lengths of *Hamelia patens* flowers and anthers for categorization of its pollen developmental stages

花朵长度 Flower length (cm)	花药长度 Anther length (cm)	花粉发育时期 Pollen developmental stage
0.90 ~ 1.00	0.50 ~ 0.60	四分体时期 Tetrad stage
1.10 ~ 1.60	0.60 ~ 0.85	单核花粉时期 Uninucleate microspore stage
1.80 ~ 2.70	0.91 ~ 1.01	二核花粉时期 Bicellular pollen stage

2.2 单核花粉时期的观察

希茉莉花朵长度为 1.10 ~ 1.60 cm、花药长度为 0.60 ~ 0.85 cm 时，花粉正处于单核时期

(表 1)，细胞核尚未进行有丝分裂，花粉外壁已经形成。在希茉莉花朵的这一长度范围内 (1.10 ~ 1.60 cm)，花粉均显示为单核 (图版 I：C, D)，未见二核花粉和四分体。经本实验的方法 I 对花药进行预处理，DAPI 无法进入花粉内，观察不到花粉核 (图版 I：E)。而采用本实验的方法 II 处理后发现 (表 2)，水浴温度对花粉见核率具有显著影响 ($P < 0.05$)；65℃水浴加热 20 ~ 50 min 时，花粉核易被 DAPI 染色，花粉见核率可达 68.37% ~ 85.87%，且表现稳定。

表 2 水浴温度和时间对希茉莉花粉见核率的影响
Table 2 Effect of temperature and time of water-bath heating on the proportion of pollen grains with visible nuclei

水浴 Water-bath heating		花粉见核率 (%) Proportion of pollen grains with visible nuclei	
温度 Temperature (℃)	时间 Time (min)	单核花粉 Uninucleate microspore	二核花粉 Bicellular pollen
45	20	57.00 a	41.24 ac
	30	57.18 a	42.85 acd
	40	47.06 a	37.90 acd
	50	30.77 a	7.69 ad
55	20	44.44 a	79.49 be
	30	64.58 a	46.67 bef
	40	53.33 a	57.45 bef
	50	29.17 a	41.96 bf
65	20	68.37 b	52.53 abg
	30	72.56 b	51.78 abgh
	40	85.87 b	25.81 abgh
	50	75.81 b	28.79 abh

注：同一列中不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Note: Different letters in the same column refer to significant differences at the 0.05 level under the same developmental stage of pollen grains.

2.3 二核花粉时期的观察

希茉莉花朵长度为 1.80 ~ 2.70 cm (花冠裂片张开前)、花药长度为 0.91 ~ 1.01 cm 时，花粉正处于二核时期 (表 1)，细胞核已进行有丝分裂，形成了一个生殖核和一个营养核，生殖核较小且荧光亮度很强，营养核较大但荧光强度较弱。在希茉莉花朵的这一长度范围 (1.80 ~ 2.70 cm) 内，花粉均显示为二核 (图版 I：F, G)，未见单核花粉和三核花粉。经本实验的方法 I 对花药进行预处理，DAPI 无法进入花粉内，观察不到花粉核。而采用本实验的方法 II 对花药进行处理后发现 (表

2), 水浴温度对花粉见核率具有显著影响 ($P < 0.05$); 55℃水浴加热 20 ~ 40 min 时, 花粉核的染色效果较好, 比率为 46.67% ~ 79.49%。65℃水浴加热 30 ~ 50 min 时, 花粉出现了脱外壁现象(图版 I: H, I), 且 30 min 时外壁脱除的现象尤为明显; 40 min、50 min 时很多花粉破碎, 无法观察到花粉核的情况。

2.4 花粉的超微结构观察

希茉莉的花粉壁分为外壁(exine)和内壁(intine), 外壁又可分为覆盖层(tectum)、柱状层(columella)、基足层(foot layer)和外壁内层(endexine)(图版 I: J)。单核花粉时期的花粉壁厚度约 1.8 ~ 3 μm (图版 I: K), 二核花粉时期的花粉壁厚度约 2 ~ 4.5 μm (图版 I: L), 二核花粉时期花粉内壁在萌发孔区域出现加厚现象, 厚度达到 6 μm 左右(图版 I: M)。

花粉的超微结构观察结果与 DAPI 染色的结果一致, 均表明希茉莉花朵长度为 0.90 ~ 1.00 cm、花药长度为 0.50 ~ 0.60 cm 时对应花粉的四分体时期, 花朵长度为 1.10 ~ 1.60 cm、花药长度为 0.60 ~ 0.85 cm 时对应单核花粉时期, 花朵长度为 1.80 ~ 2.70 cm(花冠裂片张开前)、花药长度为 0.91 ~ 1.01 cm 时对应二核花粉时期。

3 讨论

3.1 花粉发育时期与花朵、花药长度对应关系

有研究表明, 花器官的形态与该器官的组织细胞发育有着密切的联系。Erickson^[5]综述了小孢子、大孢子发育时期与花芽长度之间的关系, 并提出可以基于它们的对应关系快速取材; Gould 和 Lord^[6]对麝香百合(*Lilium longiflorum*)的花药长度和花药内各层细胞的发育时期做了详细的统计和分析, 总结出它们之间的对应关系; 冯九焕等^[13]观察了水稻(*Oryza sativa* L.)小孢子不同发育时期的形态特征, 并探索出小孢子发育时期与小穗长度之间的对应关系; 本实验结果也表明花粉发育的时期与花朵、花药的长度有着明确的对应关系。希茉莉花粉发育的四分体时期、单核花粉时期及二核花粉时期与花朵长度、花药长度的对应关系为: 花朵 0.90 ~ 1.00 cm、花药 0.50 ~ 0.60 cm 时对应

花粉的四分体时期, 花朵 1.10 ~ 1.60 cm、花药 0.60 ~ 0.85 cm 时对应单核花粉时期, 花朵 1.80 ~ 2.70 cm(花冠裂片张开前)、花药 0.91 ~ 1.01 cm 时对应二核花粉时期, 这些对应关系将为希茉莉花粉发育研究的细胞学、分子生物学实验取材提供依据, 大大提高了取材的效率和准确性。

3.2 希茉莉花粉壁结构

茜草科植物的花粉壁包括覆盖层、柱状层、基足层、外壁内层和内壁, 不同结构层的厚度在不同的类群中存在较大差异, 即使在同一粒花粉的不同部位也有差异, 少数植物还具有特殊的花粉壁结构^[3]。希茉莉的花粉壁结构符合茜草科植物花粉壁的一般特征, 同样也包括上述 5 层。希茉莉单核花粉时期的花粉壁厚度约 1.8 ~ 3 μm , 二核花粉时期的花粉壁厚度约 2 ~ 4.5 μm , 二核花粉时期花粉内壁在萌发孔区域出现加厚现象, 厚度达到 6 μm 左右。有研究表明, 拟南芥的花粉壁厚度约 1.2 ~ 1.5 μm , 水稻花粉壁厚度约 1.5 ~ 1.8 μm ^[14], 且其花粉不经过预处理即可被 DAPI 染色显示出细胞核。拟南芥和水稻的花粉壁厚度比希茉莉小, 并且未见报道内壁在萌发孔区域有加厚现象, 据此我们推测希茉莉花粉壁的厚度是影响 DAPI 染色的重要限制因素, 具体原因仍需进一步研究证明。本实验采用加有 Triton X-100 的 DAPI 溶液处理花粉, 花粉核在荧光显微镜下也不可见, 此结果表明表面活性剂也不能促进 DAPI 染料渗入花粉内部从而使花粉核成功染色。

3.3 花粉预处理方法

为了去除花粉壁得到花粉原生质体, 前人探索出了多种处理方法, 如化学法、酶解法、物理法等。Tanaka 等^[10]用 4-甲基吗啉-N-氧化物(MMNO·H₂O, 4-methyl morpholine N-oxide monohydrate)并热激的方法处理麝香百合(*Lilium longiflorum*)花粉, 得到了花粉原生质体, 但是热激温度高达 125℃, 实验条件要求较严格, 普通实验室难以做到, 且实验试剂与高温易使原生质体失活。周嫦^[11]用酶解法分离出鸢尾(*Iris tectorum* Maxim)、风雨花(*Zephyranthes grandiflora* Lindl)和萱草(*Heemerocallis fulva* L.)3 种植物成熟花粉的原生质体, 分离率高达 90% 以上, 但其实验操

作步骤复杂且条件要求严格，适于花粉原生质体培养。吴旺泽等^[12]将 3 个马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 普通栽培种的花粉经低温饥饿、低温水合、高温热激和渗激处理后，分离出有活力的脱外壁花粉，花粉最高脱壁率为 34.5%，此方法操作步骤较多且耗时长。本研究中，对固定过的花粉粒进行 10%次氯酸钠溶液氧化和水浴加热处理后滴加 DAPI 溶液染色，即能在荧光显微镜下观察到花粉核，且在一定处理条件下花粉核染色率高达 84%，也无花粉破裂的现象。水浴加热的温度对 DAPI 染色的效果具有显著影响 ($P < 0.05$)，而时间长短的影响不显著。单核花粉时期，希茉莉花粉在 65℃、20 ~ 50 min 处理条件下染色的见核率较高，而低于 65℃时花粉核不易被 DAPI 结合；二核花粉时期，希茉莉花粉在 55℃、20 ~ 40 min 处理条件下见核率较高，低于 55℃时花粉核不易被 DAPI 结合，高于 55℃时花粉易破碎。本研究探索出的水浴加热-氧化方法可能改变了花粉外壁、内壁和原生质体三者之间的结合状态，使得花粉壁结构变得疏松或完全被去除，因而 DAPI 染液能成功渗入并与花粉核结合。但值得注意的是，经该方法处理得到的是没有生活力的花粉，不可作为花粉萌发、离体培养和遗传转化实验的花粉材料^[15]。

致谢：感谢华南植物园公共实验室邓汝芳工程师协助制作透射电镜样品和拍摄照片。感谢审稿人对本文提出的宝贵意见。

参考文献：

[1] 朱骏, 杨仲南. 花粉壁发育研究进展[J]. 自然杂志, 2013, 35(2): 112-117.

[2] Heslop-Harrison J. Pollen walls as adaptive systems[J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1979, 66(4): 813-82.

[3] Dessein S, Ochoterena H, Block PD, Lens F, Robbrecht E, Schols P, Smets E, Vinckier S, Huysmans S. Palynological characters and their

phylogenetic signal in Rubiaceae [J]. *Bot Rev*, 2005, 71(3): 354-414.

[4] 朱澍, 林辰涛. 一种新型的 DNA 荧光染料 DAPI 的光学特性及其应用[J]. 武汉植物学研究, 1986, 4(1): 91-102.

[5] Erickson RO. Modeling of plant growth [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1976, 27: 407-34.

[6] Gould KS, Lord EM. Growth of anthers in *Lilium longiflorum* [J]. *Planta*, 1988, 173(2): 161-171.

[7] Honys D, Twell D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(11): R85.

[8] Deveshwar P, Bovill WD, Sharma R, Able JA, Kapoor S. Analysis of anther transcriptomes to identify genes contributing to meiosis and male gametophyte development in rice [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11(1): 78.

[9] Loewus FA, Baldi BG, Franceschi VR, Meinert LD, McCollum JJ. Pollen sporoplasts: dissolution of pollen walls [J]. *Plant Physiol*, 1985, 78(3): 652-654.

[10] Tanaka I, Kitazume C, Ito M. The isolation and culture of lily pollen protoplasts [J]. *Plant Sci*, 1987, 50(3): 205-211.

[11] 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.

[12] 吴旺泽, 王蒂, 王清, 彭晓莉. 马铃薯脱外壁花粉的制备与人工萌发[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 39-43.

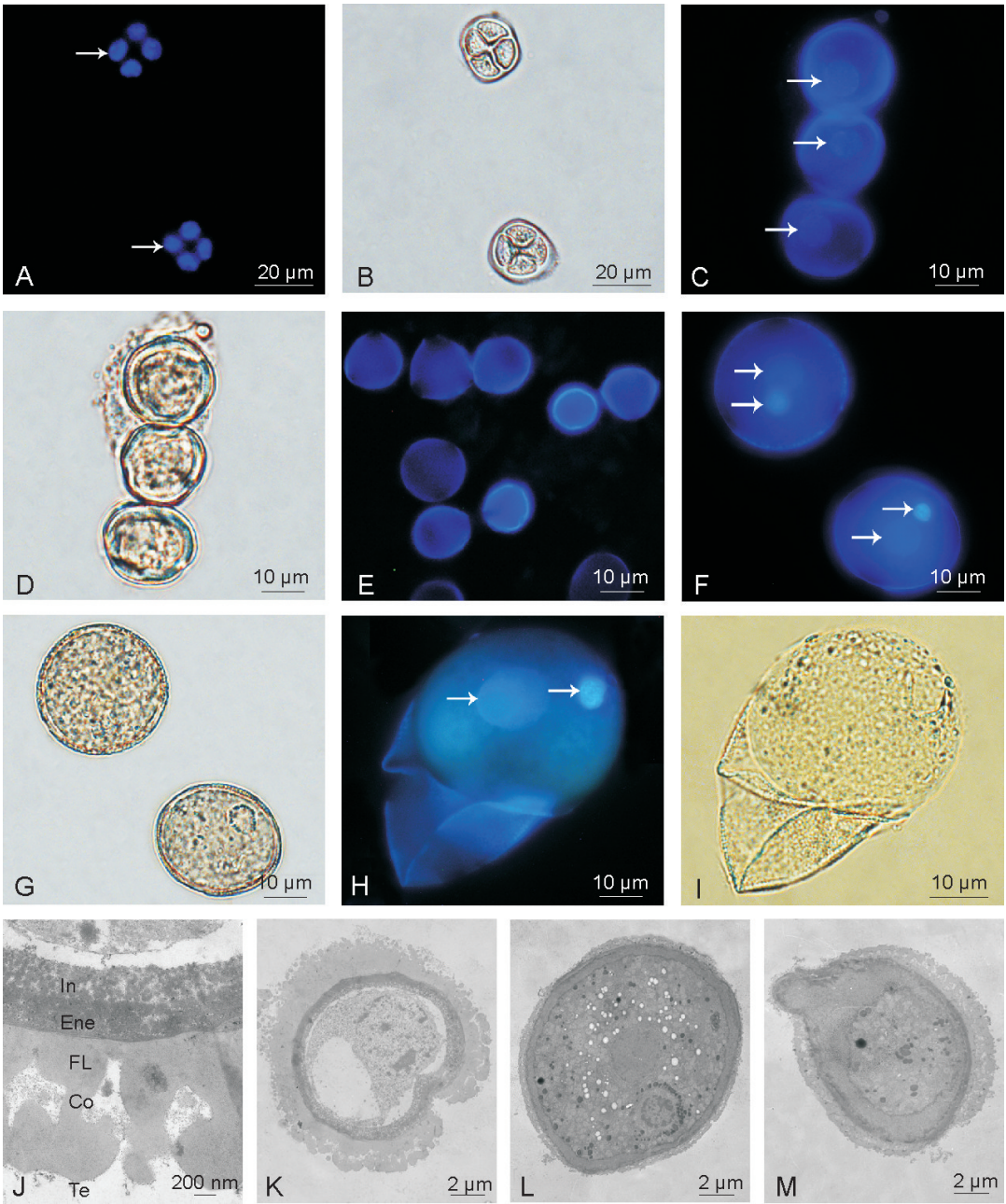
[13] 冯九焕, 卢永根, 刘向东, 徐雪宾. 水稻花粉发育过程及其分期[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(1): 21-28.

[14] Zhang DB, Luo X, Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development [J]. *J Genet Genomics*, 2011, 38(9): 379-390.

[15] 岳洁瑜, 吴李君, 吴跃进, 张宝龙, 唐灿明. 陆地棉脱外壁花粉粒的制备和花粉粒核 DNA 检测[J]. 棉花学报, 2008, 20(2): 94-98.

岳琳等：图版 I

YUE Lin *et al.*: Plate I



荧光显微镜和透射电子显微镜下希茉莉不同发育时期的花粉。A, C, E, F, H: 荧光显微镜下(荧光); B, D, G, I: 荧光显微镜下(普通光)。J, K, L, M: 透射电子显微镜下。A, B: 四分体时期花粉; C, D, K: 单核花粉; E: 未见核花粉; F, G, L: 二核花粉; H, I: 正在去外壁的二核花粉; J: 单核花粉的花粉壁; M: 花粉内壁在萌发孔区域加厚。In: 内壁; Ene: 外壁内层; FL: 基足层; Co: 柱状层; Te: 覆盖层。箭头指花粉核。

Pollen grains of *Hamelia patens* Jacq. under fluorescence microscope and TEM. A, C, E, F, H: Fluorescence microscope (Ultraviolet light); B, D, G, I: Fluorescence microscope (Visible light); J, K, L, M: TEM. A, B: Pollen grains at tetrad stage; C, D, K: Pollen grains at uninucleate microspore stage; E: Pollen grains with invisible nuclei; F, G, L: Pollen grains at bicellular pollen stage; H, I: Pollen grains removing exine; J: Stratification of pollen wall at uninucleate microspore stage; M: Thickened intine at aperture. In: Intine; Ene: Endexine; FL: Foot layer; Co: Columella; Te: Tectum. Arrows nucleus of pollen grains.