

水稻花粉萌发及花粉管生长动态

陈士强 王 忠* 刘满希 谢兆伟

(扬州大学 作物遗传栽培生理实验室,江苏 扬州 225009 ; * 通讯联系人, E mail wangzhong@yzu .edu .cn)

Germination of Pollen and Growth Dynamic of Pollen Tube in Rice

CHEN Shi qiang , WANG Zhong* , LIU Man xi , XIE Zhao wei

(Laboratory of Crop Inheritance & Cultivation & Physiology , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China ; * Corresponding author , E mail : wangzhong@yzu .edu .cn)

Abstract : The germination of rice pollen grain *in vitro* and the growth of pollen tube in pistil were observed with a microscope . The stigma was removed at different time after pollination to investigate seed setting rate of floret . Results showed that rice pollen grain germinated 2 min after pollination and pollen tube would penetrate stigma into style in 5 - 10 min , 30 min later the end of pollen tube reached the bottom of ovary , then some pollen tubes arrived at the embryo sac 40 min after pollination and meanwhile a small amount of callose formed in the pollen tubes , 50 min later a great deal of callose was found , and the pollen grain began to shrink . The growing speed of pollen tube in rice stigma , style and ovary was 1500 , 5000 , 5400 $\mu\text{m}/\text{h}$, respectively . The seed setting rate was quite low when the stigma was removed at 10 - 15 min after pollination , and then it increased gradually from 20 min to 50 min , finally it was over 60% at 50 min after pollination and tended to be stable .

Key words : rice ; pollen germination ; growth of pollen tube ; seed setting rate ; microscopic observation

摘 要 :用显微镜观察水稻花粉粒的萌发、花粉管在雌蕊中的生长以及授粉后不同时间剪除柱头处理对颖花结实率的影响。水稻花粉粒在授粉 2 min 后开始萌发 ,5 ~ 10 min 后花粉管穿过柱头进入花柱生长 ,约经 30 min 花粉管顶端到达子房基部 ,40 min 时有些花粉管顶端可接近胚囊 ,此时花粉管内胼胝质形成 ,但数量较少 ,50 min 后花粉管内胼胝质塞大量形成 ,花粉粒萎缩干瘪。水稻花粉管在柱头、花柱和子房中的生长速率分别为 1500、5000、5400 $\mu\text{m}/\text{h}$ 。水稻授粉后 10 ~ 15 min 剪除柱头的处理只有极少量颖花结实 ,授粉后 20 ~ 50 min 剪除柱头处理的颖花结实率随处理时间推迟而升高 ,授粉后 50 min 剪除柱头处理的结实率达 60% 以上 ,接近正常。

关键词 :水稻 ;花粉萌发 ;花粉管生长 ;结实率 ;显微观察

中图分类号 :Q944 .44 ;S511 .01 文献标识码 :A 文章编号 :1001-7216(2007)05-0513-05

水稻花粉粒落到亲和柱头上能萌发长出花粉管 ,花粉管通过柱头、花柱、胎座、珠孔等雌蕊组织到达胚囊。此过程中花粉管是如何生长的、受到何种物质控制以及花粉管是如何准确地到达胚囊 ,这些问题一直受到人们的关注。杨弘远等^[1]早在 20 世纪 80 年代对水稻花粉的发育途径进行了研究 ,指出水稻花粉有两种发育途径 ,即孢子体发育和配子体发育 ;20 世纪 90 年代中期 ,徐是雄等^[2]比较详细地描述了水稻有性生殖过程中雄性组织的发育过程 ;田惠桥等^[3-4]在对烟草花粉及花药发育研究中指出烟草花粉萌发和花粉管生长期间柱头和花柱中存在明显的钙分布梯度 ;郑茂钟等^[5]认为烟草花药发育需要钙离子的参与 ,这可能与将来花粉管的定向生长有密切关系 ;赵彩平等^[6]发现 G 蛋白对花粉管生长有调控作用 ;黄景华等^[7]通过对小麦花粉管通道形成的研究 ,将小麦花粉管的发育进程分为 3 个时期 ,即花粉管萌发期、花粉管通道形成期、胼胝质形成期 ;Wedzony 等^[8]对 2,4-D 影响下玉米花粉

的萌发和花粉管生长状况进行了研究 ,指出在授粉后 30 min 内花粉萌发并缓慢生长 ,在 5 ~ 24 h 内花粉管顶端到达珠孔 ;范丙友等^[9]于 2004 年利用花粉管通道法对牡丹花粉管通道形成时间进行了研究 ,指出牡丹授粉后 1 h 花粉管通道即可形成 ;胡颖等^[10]通过透明和脱色苯胺蓝染色 ,曾较清楚地观察到拟南芥花粉管在花柱内的生长 ,并对其生长速率进行了计算。然而 ,水稻花粉管在雌蕊中的生长动态、生长速率尚未有过深入的报道。

本研究在前人的基础上 ,应用显微荧光观察等技术对水稻花粉管生长动态作了研究 ,旨在探明水稻花粉管在柱头和子房中生长的路径与速度 ,为进一步开展水稻花粉分子生物学的研究提供理论和方法。

收稿日期 :2006-12-01 ;修改稿收到日期 :2007-04-29。
基金 项 目 : 国 家 自 然 科 学 基 金 资 助 项 目 (30070454 , 30471045)。
第一作者简介 :陈士强(1981-) ,男 ,硕士研究生。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种有扬稻 6 号 和不育系 YW 2S。大田栽培和盆栽 ,常规管理 ,在 开花期进行实验。其中以扬稻 6 号提供花粉 ,YW 2S 颖花作为花粉粒萌发和花粉伸长的载体。

1.2 方法

1.2.1 水稻花粉萌发的离体观察

将加热融化的培养基均匀地涂于载玻片上 ,待 培养基冷却后将刚开花裂药的水稻花粉抖落其上 , 接着将载玻片置载有数码摄影的显微镜下观察 ,并 每隔 1 min 拍摄 1 次花粉粒萌发情况。

培养基配方为 :蔗糖 15% ,马铃薯淀粉 5% ,硼 酸 0.0005% ,蒸馏水 80%。

1.2.2 花粉管在雌蕊中生长的荧光显微观察

用 CO₂ 催花^[11] ,待不育系 YW 2S 开花时迅速 用扬稻 6 号花粉对它进行人工授粉 ,将授粉后 1、2、 3、5、10、20、30、40、60、120 min 的水稻子房分别放 入 FAA 固定液中固定 24 h 后取出移入 70% 的酒精溶液中保存待用。观察前取出固定的子房 ,用 50%、30%和 10% 系列酒精溶液复水 ,然后放入 2 mol/L NaOH 中软化 12 h ,蒸馏水清洗 2 次 ,再用

0.05% 苯胺蓝溶液染色 12 h 。最后将软化的子房 放在干洁的载玻片上 ,滴 1 滴甘油 ,加盖玻片 ,轻轻 挤压 ,置荧光显微镜下观察拍片^[12]。

通过测量授粉后不同时间的花粉管的长度来计 算花粉管的生长速率^[10]。

1.2.3 剪除柱头观察结实率

参照黄景华等^[7] 研究小麦的方法 ,在水稻开花 时对盆栽水稻进行人工授粉 ,分别在授粉后 5、10、 15、20、30、40、50、60 和 120 min 对水稻的颖花进行 剪除柱头处理 ,待籽粒成熟时调查颖花的结实率。

2 结果与分析

2.1 水稻花粉粒的萌发和花粉管的生长

水稻花粉粒落在马铃薯淀粉培养基上(图 1- A) 后 2 min 便开始萌发(图 1- B) ,4 min 后花粉管已伸 长到花粉粒直径的 1 倍(图 1- C) ,6 min 时花粉管已 达花粉粒直径的 2 倍多(图 1- D) ,8 min 时花粉管达 花粉粒直径的 3 倍以上(图 1- E) ,花粉管头部开始 膨大 ,10 min 时可见到花粉管头部破裂 ,内含物释 放(图 1- F)。此后花粉管停止生长 ,这可能是因为 培养基无法真正替代水稻的雌蕊结构 ,导致花粉管 不能正常伸长。实验测得花粉管在培养基上的生长 速率为 1400 ~ 1600 μm/h ,并发现其生长速率受温

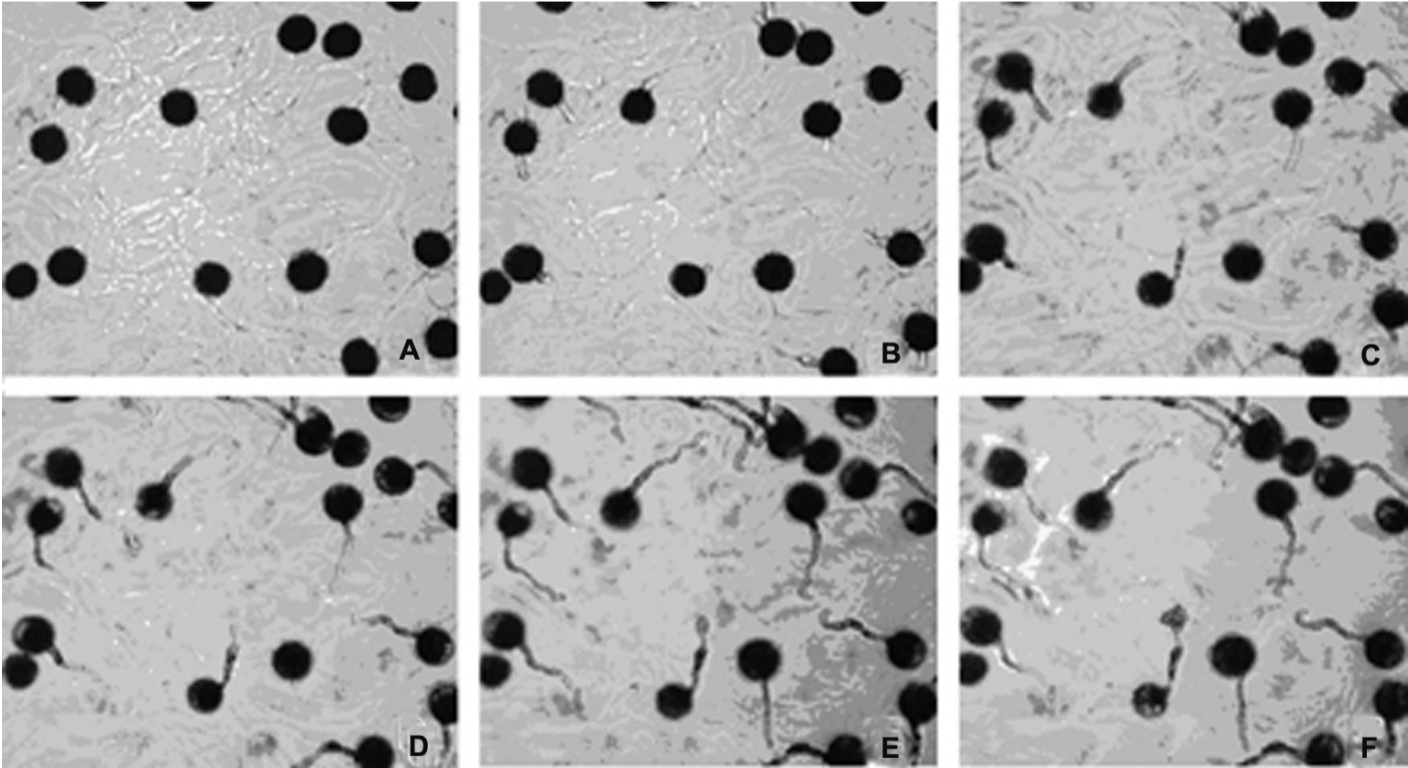


图 1 水稻花粉粒在培养基上的萌发情况(温度为 30)

Fig.1 . Germination of pollen in culture medium at 30 .

A - 0 min 时的花粉粒 ;B - 2 min 时花粉已大量萌发 ;C - 4 min 时花粉管长至花粉粒直径大小 ;D - 6 min 时花粉管长至花粉粒直径的 2 倍以上 ;E - 8 min 时的花粉管顶端已膨大 ;F - 10 min 时的花粉管顶端破裂。

A , Pollen at 0 min after placed on the culture medium ;B , Pollen germinated 2 min later ;C , The length of pollen tube up to the diameter of pollen 4 min later ;D , The length of pollen tube exceeded twice of the diameter of pollen 6 min later ;E , The apex of the pollen tube expand ed 8 min later ;F , The apex of the pollen tube broke 10 min later .

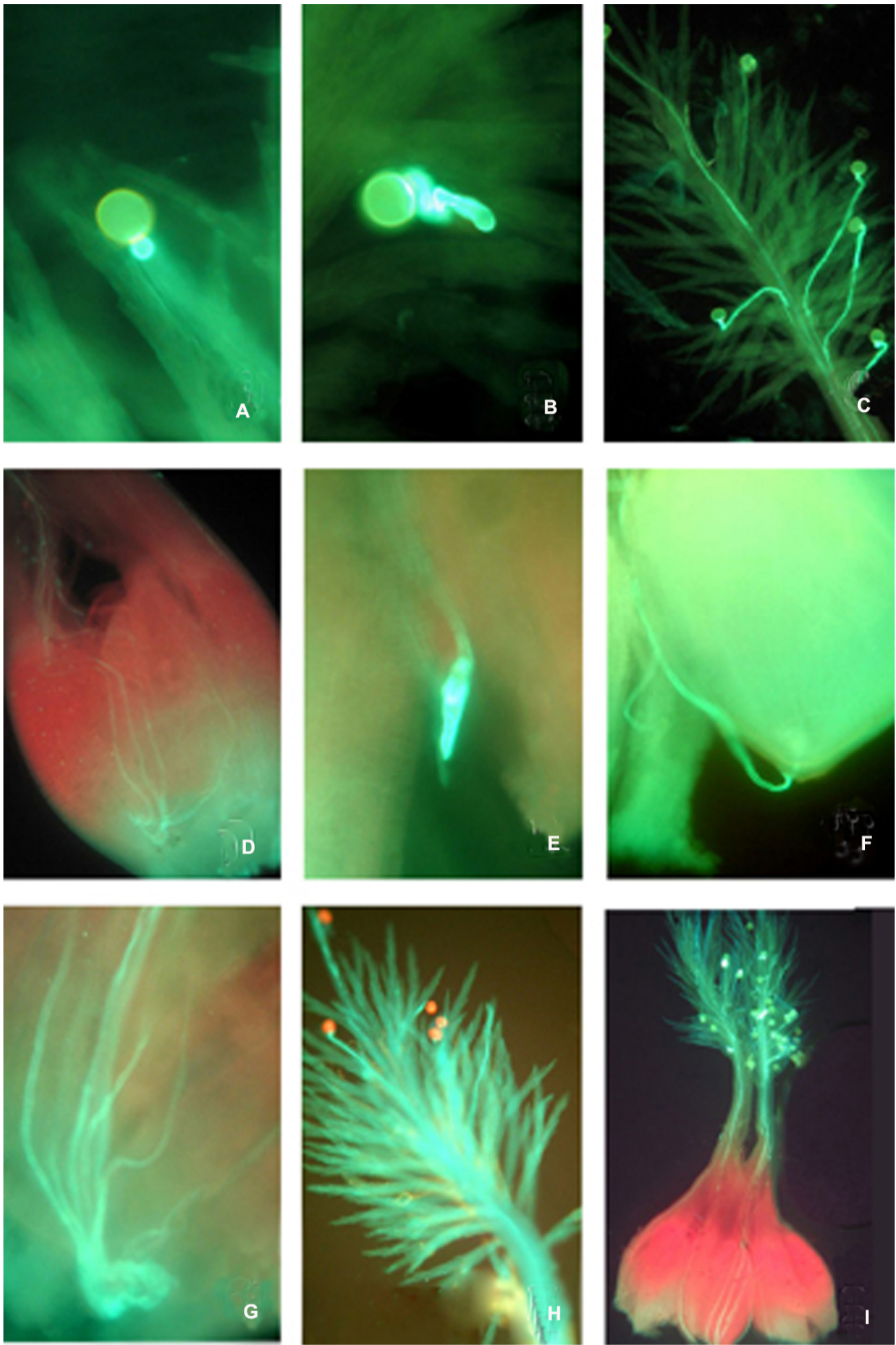


图 2 荧光显微观察水稻花粉粒的生长
Fig . 2 . Growth of the rice pollen tube observed by fluorescence microscope .

A - 授粉后 2 min 花粉粒即开始萌发 ; B - 授粉后 5 min 花粉管长度已超过花粉粒直径 ; C - 授粉后 10 ~ 15 min 花粉管已大量伸入花柱 ; D - 授粉后 25 min 子房中已有多条花粉管 ; E - 伸入子房的花粉管顶端膨大且开始弯曲 ; F - 授粉后 30 min , 其中 1 条花粉管伸入珠孔 ; G - 授粉后 30 min 花粉管畸形膨大 , 生长停止 ; H - 授粉后 50 min 花粉粒颜色变深并干瘪 ; I - 授粉后 40 min 花粉管在整个雌蕊中的生长。

A , Pollen germinated 2 min after pollination ; B , The length of pollen tube exceeded the diameter of pollen 5 min after pollination ; C , Pollen tubes entered into style 10 - 15 min after pollination ; D , Pollen tubes entered into ovary 25 min after pollination ; E , The apex of one pollen tube expanded and wound ; F , One pollen tube entered into micropyle 30 min after pollination ; G , Pollen tubes abnormally expanded and its growth stopped 30 min after pollination ; H , Pollen grain shrivelled 50 min after pollination ; I , Pollen tubes in the whole pistil 40 min after pollination .

度影响 , 适宜水稻花粉萌发的温度在 30 ℃ 左右。

2.2 水稻花粉粒萌发及花粉管生长动态的荧光显微观察

水稻授粉后 2 min 花粉粒即开始萌发 (图 2

A) 授粉后 5 min 其长度已超过花粉粒直径 (图 2 B)。花粉管在柱头中的生长速率约为 1500 μm/h ; 授粉后 10 ~ 15 min 花粉管伸入花柱中生长 (图 2 C) , 授粉后 20 min 开始进入子房 , 花粉管在花柱中

的生长速率约为 5000 μm/h ;授粉后 25 min ,花粉管伸入子房中(图 2 D)。授粉后 30 min ,部分花粉管顶端膨大(图 2 E) ,这可能与花粉管快速生长有关。此时在子房基部可以观察到多条花粉管 ,说明在水稻授粉后 30 min 左右 ,柱头至子房段的花粉管通道形成 ,花粉管在子房中的生长速率约为 5400 μm/h。授粉后 40 min ,其中一条花粉管的前端已绕到胚珠的珠孔处 ,进入胚珠(图 2 F) ,同时在花粉管的内部观察到少量胼胝质 ,其作用是阻止花粉管内部物质的倒流 ,也会出现几条花粉管一起伸进胚珠的现象 ,但更多的是花粉管顶端弯曲、畸形膨大(图 2 G、I) ,并于子房深处停止生长。该花粉管尖端的畸形膨大 ,可能也是阻止花粉管继续伸长生长的一种机制。授粉后 50 min ,花粉粒开始大量萎缩(图 2 H) ,其内含物已基本耗尽 ,至此可以认定柱头至珠孔的花粉管通道已经完全形成。授粉后 60 min ,花粉管内部形成胼胝质塞 ,花粉管内部物质停止向胚珠内流动。

2.3 剪除柱头对颖花结实率的影响

通过实验调查了水稻不育系 YW 2S 授粉后不同时间进行剪除柱头处理的结实数和结实率情况(表 1)。结果表明 ,水稻结实率随授粉后剪除柱头时间呈现规律性变化 ,在授粉后 5 min 剪除柱头处理的没有结实 ,这说明 5 min 时间内花粉管伸长达不到子房 ;授粉后 10 min 处理的出现结实 ,但结实

率很低 ,授粉后 15 ~ 50 min 处理的结实率随着剪除柱头时间的推迟而增加 ,且幅度较大 ,由 8 .7% 增加到 61 .1% ;授粉后 50 ~ 120 min 内剪除柱头处理的结实率虽有所增加 ,但增加幅度不大。这一结果与荧光观察花粉管伸长的情况相符。水稻花粉管约在授粉后约 30 min 伸入子房 ,此时也是柱头至子房段花粉管通道形成、花粉管伸长使其内生殖细胞进入配囊的时间 ,此时即使剪除柱头 ,由于花粉管已到达子房 ,故不会影响子房的受精结实。

3 讨论

3.1 花粉粒萌发及花粉管在雌蕊中的生长动态

黄景华等[7] 曾以小麦为材料观察花粉管的生长进程。本研究结果与他们的结果比较 ,汇总成表 2。从表 2 中可以看出稻麦等作物花粉粒萌发及花粉管生长有如下特点 :

- 1)授粉后 2 ~ 3 min ,水稻、小麦花粉粒即可萌发 ,但前 5 ~ 10 min 内稻麦花粉管均未到达子房 ,此阶段剪除柱头处理的稻麦颖花不能结实也证明了这一点。
- 2)授粉后 20 min 内 ,剪除柱头处理的稻麦开始结实 ,但结实率很低 ,这说明在此阶段已有部分花粉管到达子房 ,由于花粉管生长到一定的长度后 ,原来花粉粒中的内含物全部集中到花粉管前端^[15 16] ,为花粉管继续伸长提供营养 ,因而剪除柱头并不影响

表 1 水稻 YW 2S 不同时间段剪除柱头的结实数和结实率

Table 1 . Numbers of fertile florets and seed setting rates of YW 2S after removing stigma at different time .

项目 Item	授粉后处理时间 Treated time after pollination								
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	120 min
处理颖花数 No . of treated florets	61	54	46	57	56	65	72	66	80
结实数 No . of fertile florets	0	3	4	8	16	23	44	44	54
结实率 Seed setting rate/%	0	5 .6	8 .7	14 .0	28 .6	35 .4	61 .1	66 .7	67 .5

表 2 小麦和水稻花粉管生长进程的比较

Table 2 . Comparison of the pollen tube growth process between wheat and rice .

项目 Item	授粉后处理时间 Treated time after pollination								
	2 min	3 min	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
小麦 Wheat									
荧光观察 Fluorescence observation	花粉粒未萌发	花粉粒萌发	花柱中生长	尚未趋向子房生长	趋向子房生长	子房中生长	花粉管通道基本形成	花粉管通道完全形成	胼胝质堵塞花粉管
结实率 Seed setting rate/%	0 .0	0 .0	0 .0	0 .0	10 .5	31 .4	35 .1	55 .0	67 .4
水稻 Rice									
荧光观察 Fluorescence observation	花粉粒萌发	进入花柱	花柱中生长	趋向子房生长	部分进入子房	大量进入子房	进入胚珠	花粉管通道完全形成	胼胝质堵塞花粉管
结实率 Seed setting rate/%	0 .0	0 .0	0 .0	0 .0	14 .0	28 .6	35 .4	65 .1	66 .7

其生长结实率低,说明没有形成足以使子房受精的花粉管束。

3)授粉后 30 ~ 40 min ,在显微镜下可以清楚地看到稻麦子房中已形成大量的花粉管束 ,同时发现部分花粉管前端已绕到胚珠的珠孔处 ,进入胚珠 ,有的会出现几条花粉管一起伸进胚珠的现象。至 40 min 时剪除柱头处理的稻麦结实率已超过 33% ,这说明在稻麦授粉后 40 min 左右 柱头至子房段的花粉管通道已基本形成^[7]。

4)授粉后 40 ~ 50 min ,荧光镜下发现稻麦部分花粉管顶端畸形膨大 ,内部形成胼胝质 ,至此可以认定花粉管通道已完全形成。剪除柱头处理的稻麦结实率大大提高 ,超过 55%。同时发现 20 ~ 50 min 内同期剪除柱头处理的小麦结实率通常低于水稻 ,这可能与稻麦开花期气温有关 ,在一年中小麦开花早 ,气温低 ,而水稻开花在夏天 ,气温较高 ,因而水稻花粉管生长速率大 ,结实率高。

5)授粉后 50 ~ 60 min ,花粉粒开始大量萎蔫 ,其内含物已基本耗尽 ,花粉管顶端形成大量胼胝质堵塞了花粉管。此阶段剪除柱头处理的稻麦结实率很高 ,授粉 50 min 后麦类结实率已大于 48% ,水稻达到 65 .1% ;授粉 60 min 后稻麦结实率均达到 63. 0% 以上 ,基本接近正常自然结实水平。

3 2 花粉管定向生长的可能机制

田惠桥等^[4]通过对烟草花粉管生长研究后认为花粉管的生长是一种极性生长 ,其延伸是通过高尔基体产生的分泌小泡不断融合到花粉管顶端上完成的 ,这可能也与花粉管可以定向生长以至最终进入胚囊有关。现在普遍认为花粉粒萌发以及花粉管的定向生长与钙有相当大的关系。郑茂钟等^[5]在对烟草的研究中发现花柱中存在钙离子 ,储立民等^[17]对丝瓜研究还表明低浓度的钙离子(0 .01 ~ 1 mmol/L) ,能促进花粉粒的萌发及花粉管的伸长 ,而高浓度(10 mmol/L)时反而起抑制作用。此外 ,杨弘远等^[18]认为植物花粉管生长与植物激素密切相关。

植物存在多精入卵等现象 ,说明会有多条花粉管进入胚囊受精 ,但多数情况下即使有大量花粉管同步伸长 ,也只有少数几条能延伸至子房的基部 ,而最终往往只有一条花粉管能进入珠孔而最终完成双受精。在水稻中也发现类似情况。大部分花粉管延伸到花粉与子房相连接的部位便停止生长 ,同时花粉管尖端畸形膨大 ,可能是由于花粉管本身缺乏延伸或进入珠孔的能力而引起的畸形变化 ,或是当有

一条花粉管进入珠孔端后就产生一些“阻挡”作用 ,使其他的花粉管都发生畸形生长而失去生命力 ,最终不能进入珠孔^[2]。

实验中采用不育系 YW- 2S 柱头作为花粉萌发的载体 ,通过人工授粉可以较好地掌握柱头上的花粉粒数量 ,以便更好地观察花粉管的生长进程。而可育品种因不能排除自身花粉的干扰 ,难以确切观察到花粉粒萌发后伸入花柱进入子房内部的情况。花粉管伸入胚珠以后 ,由于珠被较厚 ,用荧光显微镜已经很难继续观察其生长情况 ,更无法观察到花粉管如何释放两个雄性细胞至胚囊中。但通过石蜡切片^[19]和树脂切片可以较好地继续追踪观察 ,我们也正在进行这方面的研究。

参考文献：

[1] 杨弘远,周 嫦. 水稻花粉两条发育途径的实验研究. 植物学报, 1979, 21(4): 345-351.

[2] 徐是雄,徐雪宾. 稻的形态与解剖. 北京: 农业出版社, 1984.

[3] 田惠桥,谢潮添,邱义兰,等. 烟草花粉萌发和花粉管生长期间柱头和花柱中的钙分布. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(1): 53-61.

[4] 田惠桥,远 彤. 钙在被子植物受精过程中的作用. 植物生理学报, 2000, 26(5): 369-380.

[5] 郑茂钟,杨延红,郭 娟,等. 烟草花药发育过程中钙动态分布的初步观察. 厦门大学学报, 2004, 43: 126-132.

[6] Zhao C P, Zhang S L. A review on regulatory effect of G protein on pollen tube growth. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2004, 24(11): 2177-2182.

[7] 黄景华,王广金,孙 岩,刁艳玲. 小麦花粉管通道形成时期的研究. 黑龙江农业科学, 2004(2): 20-22.

[8] Wedzony van Lammeren M A M. Pollen tube growth and early embryogenesis in wheat x maize crosses influenced by 2, 4 D. Ann Bot, 1996, 77: 639-647.

[9] Fan B Y, Gao S P. Preliminary study on the form time of pollen tube pathway of peony (Paeonig suffruticosa Andr). Henan Agric Sci, 2004(5): 51-52.

[10] Hu Y, Zhao J. Morphologic character of pollen tube growth and embryo development during sexual reproductive process of Arabidopsis thaliana. J Wuhan Univ, 2006, 52(2): 241-246.

[11] 王 忠,顾蕴洁,高煜珠. CO₂ 促进水稻开花的效应. 植物生理学通讯, 1987(3): 29-31.

[12] 王 兰,刘向东,卢永根,等. 同源四倍体水稻胚乳发育: 极核融合与胚乳细胞化. 中国水稻科学, 2004, 18(4): 281-289.

[13] 胡适宜,杨弘远. 植物受精生物学的研究的世纪回顾与前瞻. 世界科技研究与发展, 1998, 20(3): 9-13.

[14] 王文和,赵 洁,杨弘远. 水稻离体授粉的胚胎学研究. 植物学报, 2001, 43(9): 905-909.

[15] 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社, 1982.

[16] 胡适宜. 被子植物受精作用研究的历史及受精的起源. 北京: 科学出版社, 2002.

[17] 储立民,金爱红,徐冬青. 钙离子浓度对丝瓜花粉粒萌发和花粉管生长的影响. 河南农业科学, 2005(4): 56-58.

[18] 杨弘远,周 嫦. 植物有性生殖实验研究四十年. 武昌: 武汉大学出版社, 2001.

[19] 申家恒,申 业,王艳杰. 小麦花粉管生长途径及受精过程经历时间的研究. 作物学报, 2006, 32(4): 522-526.