

虎舌红种内花粉形态与活力的比较研究

杜娟¹, 邵慧敏², 叶萌³

(1. 四川农业大学 城乡建设学院, 四川 都江堰 611830; 2. 中科院华西植物园 四川 都江堰 611830

3. 四川农业大学 林学院, 四川 雅安 625000)

摘要: 通过扫描电镜观察了虎舌红及其2个新品种红虎舌和绿虎舌的花粉形态特征, 并用TTC染色法和离体培养法测定其花粉的活力, 比较了虎舌红种内花粉形态及活力的差异, 为虎舌红的杂交育种等进一步的开发利用提供依据。结果表明: 3种花粉均为 $N_3P_4C_5$ 型, 单粒, 等极, 辐射对称, 椭球形, 极面观三裂圆形或三角形, 赤道面观椭圆形, 萌发孔为3孔沟, 沟纵长, 直达两极, 大部分形成合沟; 外壁纹饰为虎舌红呈穴网状, 红虎舌呈颗粒状, 绿虎舌呈网纹状, 依据3种花粉的大小和外壁纹饰的差异, 推断出红虎舌的性状较为原始, 而绿虎舌的性状较为进化; 用TTC染色法和离体培养法对3种花粉的活力大小进行了比较, 其结果一致, 均为红虎舌>绿虎舌>虎舌红, 3种花粉最佳的贮藏方式均为在4℃条件下贮藏。

关键词: 虎舌红; 花粉形态; 花粉活力; 扫描电镜; TTC染色法

中图分类号: Q 949.773.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0080-04

虎舌红(*Ardisia mamillata*)属紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia* Swartz.)圆齿组(*Ardisia* sect. *Crisp-ardisia*)的植物, 俗称红毛毡、乳毛紫金牛、红毛走马胎。近几年随虎舌红的商业开发, 其商品名有“佛光红”、“满堂红”和“宝鼎红”^[1]; 它主要分布于我国南部及西南部, 生于山地、山谷林阴下及阴湿的地方, 由于叶面有紫红色茸毛, 整叶极似虎舌, 故名虎舌红, 极具观赏价值, 并荣获1999年昆明世界园艺博览会“室内观叶植物金奖”称号^[2]。目前, 国内外对虎舌红的研究主要集中在其繁殖栽培上^[3-4], 而对花粉形态和活力的研究较少, 张巧玲^[5]在观察紫金牛属圆齿组的花粉形态的时候曾观察过虎舌红的花粉形态, 但对其种内花粉形态和活力研究尚未见相关报道。该研究通过比较虎舌红种内花粉形态和活力的差异, 来确定其贮藏方法, 为杂交育种提供依据, 也为进一步开发利用虎舌红奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料虎舌红(*Ardisia mamillata*) (以下简称M), 其2个品种红虎舌(*Ardisia mamillata* ‘hong hushe’, 以下简称M1)和绿虎舌(*Ardisia mamillata* ‘lv hushe’, 以下简称M2)均来自中科院华西亚高山植物园, 其中M是华西亚高山植物园的栽培种, M1和M2是M经过自然演化的新品种, 并已于2005年获得国家林业局

植物新品种保护。

1.2 花粉形态的观测

花药样品经自然干燥后已开裂, 花粉散落。在解剖镜下, 直接取花粉撒落在样品台双面胶纸上, IB-5离子喷涂仪喷金后, 送到扫描电镜(SEM)下扫描, 观察、测量、拍照。所使用扫描电镜型号为: JEOL JSM-5900 LV电镜。依据图片比例标尺, 测量、计算花粉粒全长与体长, 进行数据统计分析。

1.3 花粉活力的测定

1.3.1 TTC染色法^[6]测花粉活力 分别取新鲜花粉, 常温25℃下、4℃和-20℃条件下保存的不同天数的3种花粉来进行测定。将少量花粉置于载玻片上, 加1~2滴0.5%的TTC(2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑)溶液, 盖上盖玻片。将制片放在35℃恒温箱中3~4 h, 然后在低倍镜下观察, 凡是染成红色的花粉其活力为强, 淡色次之, 原色为不具有活力的花粉。观察3个制片, 每片取3个视野, 统计100粒左右花粉, 然后计算花粉活力百分率。

1.3.2 离体培养法测花粉活力 培养基成分为0.2% CaCl₂+0.05% H₃BO₄+10%蔗糖+10% PEG 4000, 分别取新鲜花粉, 常温下、4℃和-20℃条件下保存的不同天数的3种花粉, 将培养基均匀倒于载玻片上, 在表面形成2~4 mm的一层培养基, 用毛笔蘸取少量花粉, 轻轻撒在表面, 每个处理3次重复, 把载玻片置于培养皿中保湿, 再置入25℃恒温箱中黑暗培养12 h以上, 然后在显微镜下观察花粉萌发的情况, 每个重复取3~5个视野, 以花粉管的长度大于花粉粒的直径为萌发标准, 计数一个视野中花粉的总数和萌发花粉数, 以几个视野

第一作者简介: 杜娟(1977-), 女, 四川南部人, 硕士, 讲师, 现主要从事园林植物应用研究工作。E-mail: 16271720@qq.com。

收稿日期: 2010-10-27

所得到的平均数确定。按下式计算萌发率, 萌发率=已萌发的花粉粒数目/花粉总数 $\times 100\%$ 。

2 结果分析

2.1 花粉形态的观测

2.1.1 花粉的表面形态特征 3种植物的花粉形态变异不大, 花粉均为单粒, 等极, 辐射对称, 椭球形, 极面观三裂圆形或三角形(图 7-2、6、10), 赤道面观椭圆形(图 7-1、5、9), 萌发孔为 3 孔沟, 沟纵长, 直达两极, 大部分形成合沟(图 7-3、7、11); 按照 Erdtman^[7] 的 NPC 分类系统进行对照, 虎舌红植物花粉应为 N₃P₄C₅ 型, 即赤道三孔沟类型。外壁纹饰和大小三者略有不同, M 外壁纹饰呈穴网状, 网眼略深, 并伴有次级雕纹, 在网眼里有颗粒状突起, 少数网眼具穿孔并多分布于中部 穿孔密度为 2~3 个/ μm^2 , 两极少见穿孔, 网脊宽 0.17~0.21 μm , 网脊距 0.48~0.61 μm (图 7-4); M1 外壁纹饰呈致密的颗粒状, 颗粒大小不等, 粒径 0.2~1 μm , 几乎未见穿孔(图 7-8); M2 外壁纹饰呈网纹状, 网眼较 M 浅平, 网脊

宽 0.43~0.56 μm , 网脊距 0.21~0.33 μm , 并伴有颗粒突起, 几乎未见穿孔(图 7-12), 具体形态性状描述见表 1。

2.1.2 花粉的大小比较 为了比较虎舌红及其 2 个品种的花粉粒大小, 以花粉的极轴长和赤道轴长为测试的指标, 在扫描电镜下分别选取形态较为标准的花粉各 40 粒进行测量和统计分析, 结果见表 2。根据埃尔塔曼(1978)^[8] 的划分标准把花粉的大小分为 6 个等级(以花粉最长轴的长度来表示): 小于 10 μm 为非常小孢粉, 10~25 μm 为小孢粉, 25~50 μm 为中等孢粉, 50~100 μm 为大孢粉, 100~200 μm 为非常大孢粉, 大于 200 μm 为巨孢粉。由表 2 可知, 虎舌红及其 2 个变种的花粉均为小孢粉类型。由表 3 可知 虎舌红及其 2 个品种花粉极轴的最大值和最小值之间有明显差异, 赤道轴的最大值与最小值之间也有明显差异, 而 3 种花粉的极轴长和赤道轴长的方差分析显示, F 分布的显著性概率 $\text{Sig.} < 0.01$, 说明 3 种花粉大小具有极显著差异。

表 1 虎舌红及其 2 个品种花粉性状的扫描电镜观察比较

种类	花粉形状	极轴 \times 赤道轴/ μm	极轴 赤道轴	萌发孔类型	萌发沟长/ μm	萌发沟宽/ μm	外壁纹饰
M <i>Ardisia mamillata</i>	近球形	(15.40~18.90) \times (10.10~13.10)	1.54	三孔沟	16.10~18.90	0.27~0.36	穴网状
M1 <i>Ardisia mamillata</i> 'hong hushe'	近球形	(14.80~16.80) \times (10.20~12.80)	1.35	三孔沟	15.40~18.80	0.23~0.36	颗粒状
M2 <i>Ardisia mamillata</i> 'lv hushe'	近球形	(16.40~20.3) \times (10.63~14.10)	1.69	三孔沟	17.00~22.00	0.31~0.61	网纹状

表 2 虎舌红及其 2 个品种花粉的极轴长和赤道轴长的比较

种类	极轴最长/ μm	极轴最短/ μm	平均值/ μm	赤道轴最长/ μm	赤道轴最短/ μm	平均值/ μm
M <i>Ardisia mamillata</i>	18.90	15.40	17.02	13.10	10.10	11.09
M1 <i>Ardisia mamillata</i> 'hong hushe'	16.80	14.80	15.69	12.80	10.20	11.71
M2 <i>Ardisia mamillata</i> 'lv hushe'	20.30	16.40	18.24	14.10	10.63	12.51

表 3 虎舌红及其 2 个品种花粉的大小方差分析

代码	方差来源	平方和	df	均方	F	Sig.
P	组间	129.636	2	64.818	88.186	0
	组内	85.997	117	0.735		
	总计	215.633	119			
E	组间	40.717	2	20.359	11.923	0
	组内	199.779	117	1.708		
	总计	240.496	119			

2.2 花粉活力的测定

2.2.1 花粉活力 TTC 染色结果 由图 1 可知, 3 种新鲜(储藏 0 d)花粉的 TTC 活力测定在 90%以上, 但是在

常温下, M1 和 M2 的花粉保存 3 d 后活力为 70%, 而 M 的活力则为 0, 在常温下 M 花粉的活力下降速度最快, 而 M1 活力保存得最持久, 保存到 4 d 后活力下降为 40%, 到 5 d 后为 0。在 4℃条件下(图 2), 储藏 1 d 后三者 95%以上具有活力, 但其中 M 和 M2 到 5 d 后活力均丧失, M1 的活力也是保持最久的, 到 7 d 后 60%的具有活力, 9 d 后才丧失活力; 在 -20℃条件下(图 3), M 和 M2 均没有活力, 不能忍受低温而全部丧失了生活力, 只有 M1 具有活力, 且在 3 d 后测定时仍然有 30%的花粉能染色。4 d 后全部丧失活力; 在 3 种不同的储藏条件,

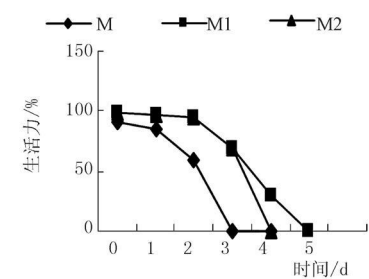


图 1 常温 25℃ TTC 活力测定

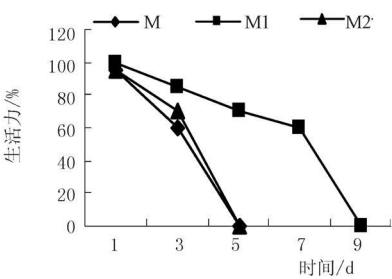


图 2 4℃TTC 活力测定

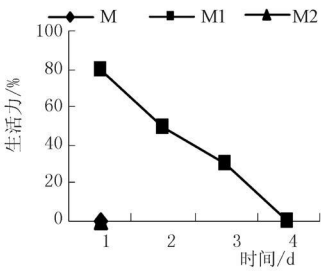


图 3 -20℃TTC 活力测定

TTC 法测定 3 种花粉的活力结果可以初步认为是 M1>M2>M。

2.2.2 花粉离体培养结果 将筛选出来的最适培养基来进行 3 种花粉的离体培养, 结果见图 4~6。由图 4 可知, 在常温 25℃储藏条件下, 三者的新鲜(储藏 0 d)花粉的萌发率都在 80%以上, 其中红虎舌的最高为 90%, 而栽培种和绿虎舌放置 3 d 后花粉完全丧失萌发力, 红虎舌却还有 50%的萌发率; 在 4℃储藏条件下(图 5), 放置

1 d 的 3 种花粉萌发率均在 70%以上, 其中红虎舌的最高为 80%, 栽培种和绿虎舌保存 3 d 后其萌发力均丧失, 红虎舌还有 30%的萌发率; 在 -20℃储藏条件下(图 6), 栽培种和绿虎舌均丧失萌发力, 红虎舌有微弱的萌发力, 但 2 d 后丧失为 0; 综上所述, 从三者花粉的离体培养结果来看, 其萌发力大小可以认为是红虎舌>绿虎舌>虎舌红栽培种, 这与 TTC 染色法测定三者活力大小比较的结果是一致的。

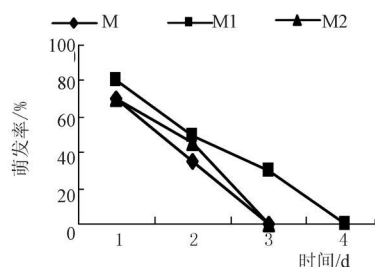


图 4 常温下离体培养结果

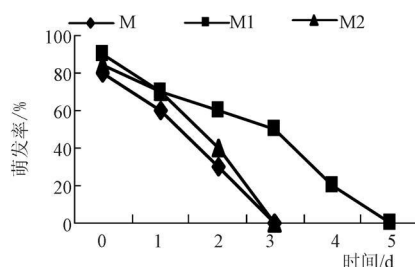


图 5 4℃下离体培养结果

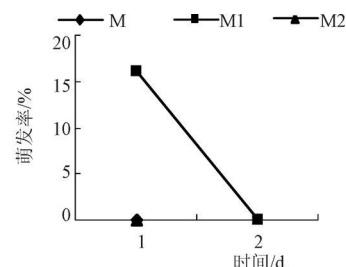


图 6 -20℃下离体培养结果

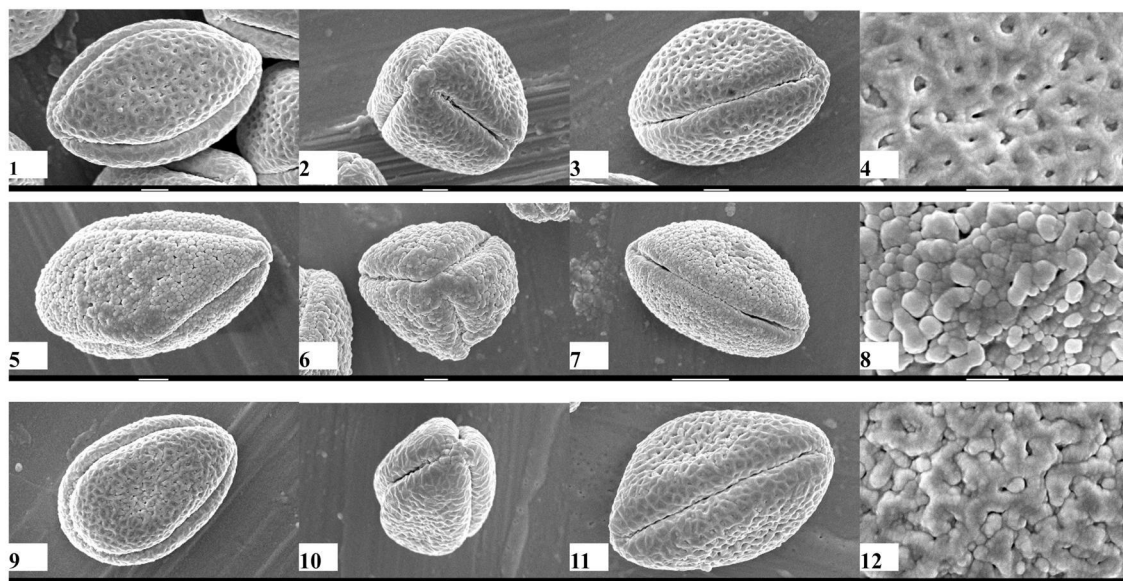


图 7 虎舌红花粉扫描电镜图版

注: 1: M 的赤道面观(×5 000); 2: M 的极面观(×5 000); 3: M 的萌发孔沟(×6 000); 4: M 的表面雕纹(×20 000); 5: M1 的赤道面观(×5 000); 6: M1 的极面观(×5 000); 7: M1 的萌发孔沟(×6 000); 8: M1 的表面雕纹(×20 000); 9: M2 的赤道面观(×5 000); 10: M2 的极面观(×5 000); 11: M2 的萌发孔沟(×6 000); 12: M2 的表面雕纹(×20 000)。

3 结论与讨论

虎舌红及其 2 个品种花粉形态基本一致, 单粒, 等极, 辐射对称, 极面观三裂圆形或三角形, 赤道面观近椭圆形, 具有 3 条萌发孔沟, 沟长直达两极, 成合沟, 表面纹饰网纹状或者细颗粒状, 这些特征与张巧玲^[9]观察了紫金牛属圆齿组 20 种 1 变种的花粉形态中所描述的花粉形态基本一致。虎舌红的花粉属于小孢子型花粉, 没有黏液分泌, 属于风媒花花粉, 因此杂交隔离套袋必须使

用防风、防水、透气的材料, 不能使用尼龙袋、纱布袋和育种笼^[9]。

虎舌红及其 2 个品种花粉的表面纹饰和大小有所不同, 其表面纹饰 M2 为网纹状, M1 为细颗粒状, M 为穴网状; Erdtman^[8]通过对被子植物花粉研究表明, 被子植物花粉外壁纹饰的演化是由全覆盖层无穿孔类型到全覆盖层穿孔类型再到半覆盖层网纹类型, 穿孔的直径不断变大, 直到相邻的孔靠近地挤在一起, 逐渐变成多角形, 形成一个蜂窝状的网。由此可推测出该属植物花

粉外壁纹饰的演化趋势可能为: 从颗粒状→皱波状→穴网状或细网状。据此, M1 花粉纹饰的性状是属于本种的退化性状, 而 M2 则刚好相反, 其表面纹饰是属于该种的进化性状, 由此得出 3 种植物的进化顺序为 M2、M、M1, M1 最原始; 结合花粉大小来看, 3 种类型的大小排序为: $M2 > M > M1$, 普遍规律认为, 同种植物里花粉越大的越进化, 可见 M2 也是 3 种植物里最进化的。

用 TTC 染色法和花粉离体萌发法比较 3 种花粉的活力大小, 结果是一致的, 即 $M1 > M2 > M$ 。3 种花粉中 M1 的活力最强, 在不同的储藏条件下保存的天数最久; M 是 3 种花粉里活力最弱最不耐储藏的, 在采样过程中发现, 3 种植物均在同等的管理水平下, 但长势却有所不同, M1 植株总体长势是最好的, 植株粗壮, 叶片繁茂, 花序多, 每个花序上小花数量也多。而 M 长势较弱, 与 M1 植株相比, 显得矮小细弱, 花枝少, 花序上小花也稀少, M2 植株整体看上去比 M 和 M1 均大, 叶片也较两者宽大, 但茎干略软, 枝叶较少, 花朵也少, 长势较 M1 弱。花粉的生活力大小一方面受遗传因素的决定, 另一方面也受环境因素的影响^[10], 而对于同一个种的不同品种的花粉生活力而言, 花粉的活力大小跟植株的长势有没有具体的相关关系, 还有待于进一步的研究。

用 TTC 染色法和花粉离体萌发法比较 3 种花粉的活力大小, 在 -20°C 条件下, 3 种花粉几乎没有生活力, 说明不能在此温度下贮藏; 但用 TTC 染色法测定结果显示, 3 种花粉在 4°C 条件下贮藏最佳, 而用离体培养法测定的结果发现 3 种花粉最适合的贮藏的温度是在常温 25°C 条件下, 二者结果不一致; 主要原因有可能是低温条件下贮藏的虎舌红花粉不容易在培养基里萌发, 而且测定结果因为培养基的组分和人为操作而存在一定

的误差, 具体原因有待于进一步研究。花粉的生活力并不完全等于萌发率, 因为具有萌发能力的花粉, 在其传粉后不一定能正常结实, 只是在实践上用萌发率来表示而已^[10]; 且低温贮藏可使大多植物的可溶性糖、有机酸等消耗减少, 从而使其花粉保存较长的时间^[11], 一般而言, 适当的低温相对常温而言是比较适合花粉贮藏的; TTC 染色法较培养基法更简便易行也更准确, 因此该试验中, 参考 TTC 法测定的花粉活力结果, 认为 3 种花粉在 4°C 下贮藏最佳。在人工选育新品种时, 可以根据此特性来贮藏其花粉, 并选择合适的时间进行人工授粉。

参考文献

- [1] 卢其能. 虎舌红的生物学特性与组织培养研究[J]. 江西林业科技, 2002(1): 5-6.
- [2] 曾云英. 野生植物资源虎舌红的研究进展[J]. 北方园艺, 2008(1): 61-62.
- [3] 詹怀远, 桂忠明, 陈春泉, 等. 虎舌红迁地保护技术的研究[J]. 中国野生植物资源, 2005(1): 65-67.
- [4] 钟娟, 叶萌, 庄平, 等. 珍稀观赏植物虎舌红的研究现状[J]. 北方园艺, 2008(5): 65-69.
- [5] 张巧玲, 王少平, 胡启明, 等. 中国紫金牛属圆齿组花粉形态研究及其分类学意义[J]. 广西植物, 2007, 27(3): 385-392.
- [6] 胡适宜. 植物学实验方法(一)花粉生活力的测定[J]. 植物学通报, 1993, 10(2): 60-62.
- [7] Erdtman G. Handbook of palynology-an introduction to study of pollen grains and spores[M]. Copenhagen: Munksgaard, 1969.
- [8] 埃尔塔曼 G. 孢粉学手册[M]. 中国科学院植物研究室孢粉组, 译. 北京: 科学出版社, 1978.
- [9] 贾小明, 李俊红, 李周歧, 等. 杜仲花粉形态、储藏及萌发性研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(7): 149-154.
- [10] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982.
- [11] 李志能, 刘国锋, 罗春丽, 等. 悬铃木花粉生活力及贮藏的研究[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 54-57.

Analysis of Pollen Shape and Livingness in *Ardisia mamillata*

DU Juan¹, SHAO Hui-min², YE Meng³

(1. City Construction College of Sichuan Agriculture University, Dujiangyan, Sichuan 611830; 2. Western China Arboretum of the Chinese Academy of Sciences, Dujiangyan, Sichuan 611830; 3. Forestry College of Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625000)

Abstract: In order to compare the difference of pollen shape and livingness in *Ardisia mamillata*, the pollen of the plant were cultured *in vitro* and then its shape were observed through scanning electronic microscope (SEM), as well as the pollen livingness were measured by TTC. The results showed that the pollen type was N3P4C5, single, radiation symmetry, ellipse sphericity, ; the polar cover was triangle or three crack rotundity, the equator cover was ellipse, the bourgeon aperture was three. every aperture from one polar to another lengthwise and link each other in the polar; the surface of *Ardisia mamillata* was deep reticulate shape, the surface of *Ardisia mamillata* 'Hong Hushe' was granule shape, the surface of *Ardisia mamillata* 'Lv Hushe' was reticulate. From the aspect of the surface shape, the evolved order was: 'Hong Hushe' → *Ardisia mamillata* Hance → 'Lv Hushe'. The activities of the pollen were similar with 'Hong Hushe' > 'Lv Hushe' > *Ardisia mamillata* Hance and the optimal stored temperature was 4°C for all.

Key words: *Ardisia mamillata*; pollen shape; pollen livingness; scanning electronic microscope; TTC coloration