

贴梗海棠花粉生活力与贮藏性研究

马诗钰¹, 周兰英¹, 蒲光兰¹, 赖腾跃¹, 蔡利娟¹, 王波^{1,2}

(1. 四川农业大学 林学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川工程职业技术学院 建筑工程系, 四川 德阳 618000)

摘要:以贴梗海棠初开花朵为试材,研究了次甲基蓝、TTC、I₂-KI、a-萘酚-联苯胺 4 种染色剂测定花粉生活力的效果,3 种贮藏条件下(-20、4、25℃)花粉生活力的变化规律及离体培养时蔗糖、硼酸、温度对花粉萌发的影响和最佳培养基组合。结果表明:不同染色剂测定的花粉生活力差异显著,次甲基蓝(84.94%)最适合贴梗海棠花粉染色,I₂-KI(44.62%)不适合该种花粉染色。贮藏温度对花粉生活力影响显著,温度越低,贮藏时间越长,各贮藏条件下,花粉活力降到 50% 以下的时间分别为 3 d(25℃)、10 d(4℃)、7 d(-20℃),4℃贮藏条件最佳。在一定范围内,蔗糖、硼酸和温度能促进花粉萌发,超过范围后抑制萌发,且高浓度硼酸对萌发的抑制作用比低浓度硼酸强,单因素试验下最佳蔗糖、硼酸浓度和温度分别为 10%、0.03%、20℃,正交实验花粉萌发的最佳组合为 8%(蔗糖)+0.03%(硼酸)+20℃(温度)。

关键词:贴梗海棠;花粉;生活力;贮藏;萌发

中图分类号:S 661.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0081-05

贴梗海棠(*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai)属蔷薇科(Rosaceae)木瓜属(*Chaenomeles*)落叶灌木,果实也称作皱皮木瓜,具有极高的药用价值^[1],同时也是优良的观花观果树种。以往对其研究多集中在组织培养、植株繁殖栽培、中药化学成分、品种分类等方面^[1-4],花粉相关研究有郑林等^[5]对花粉形态的描述,董美芳等^[6]对花粉超低温保存 1 周后不同的解冻方式与萌发率的关系研究,但其试验中应用的是水培条件,且花粉来自盛开 2 d 的花朵,而花粉活力受开花程度影响显著^[7]。

第一作者简介:马诗钰(1989-),女,硕士研究生,研究方向为林木遗传育种。E-mail:melishery1989@163.com.

责任作者:周兰英(1960-),女,教授,博士生导师,现主要从事林木遗传育种及园林植物与观赏园艺教学与科研工作。E-mail:949460359@qq.com.

收稿日期:2014-03-13

目前尚鲜见初开花朵贮藏和染色法及固体培养基法测定生活力的报道。

花粉是植物的生殖单位,对其贮藏有利于解决授粉时空和地域障碍问题^[8],为基础领域研究,如低温休眠、萌发、种质资源保存等提供试材^[9]。花粉生活力测定可以了解花粉的可育性,提高杂交、人工授粉效率,目前关于各种植物花粉贮藏条件和萌发基质有大量报道^[10-13]。现以贴梗海棠初开花朵的花粉为试材,采用次甲基蓝、a-萘酚-联苯胺、TTC、I₂-KI 4 种染色剂测定花粉活力,以期找出适合贴梗海棠花粉生活力测定的有效试剂;在-20℃(冷冻)、4℃(冷藏)、25℃(常温)条件下贮藏,定期用选出的最优染色法测定花粉活力以期得出花粉有效贮藏时间,为解决不同种亲本间杂交花期不遇的问题提供数据支撑;固体培养基法测定花粉萌发率,以获得花粉萌发的最适培养基浓度组合,为贴梗海棠杂交育种

Abstract: An investigation was conducted on species composition and distribution of epiphytic bryophytes on trucks, dead woods and litters in Yushe National Forest Park of Guizhou province. Meanwhile, the species distribution and association among trees and their debris were studied by using species diversity index and similarity index. The results showed that 56 species of epiphytic bryophytes belonging to 26 families and 35 genera were recorded, with Hypnaceae, Lepidoziaceae, Metzgeriaceae and Brachytheciaceae predominating. Host trunks had the largest number of species (40 species) among three substrate types. Shannon-Wiener species diversity index of epiphytic bryophytes order was trucks>dead woods>litters, and species distribution of epiphytic bryophytes was the most widely including *Brotherella henonii*, *Taxiphyllum subarcuratum* and *Ditrichum pallidum*. The most species of life-form was wefts taking up 44.64% of all epiphytic bryophytes. The results had significant implications for clarifying distribution patterns of species diversity of epiphytic bryophytes and indicative function of healthy vegetation in subtropical montane forest ecosystems.

Key words: epiphytic bryophytes; species diversity; trunk; dead wood; Yushe National Forest Park

的顺利开展提供条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试贴梗海棠花粉采自四川农业大学植物园,为保证花朵为初开,于采集前 1 d 先标记好即将开放花朵的位置,采集当天时间为上午 10:00,将花朵迅速带回实验室,取下花药,混匀后装在 4 个干燥的花粉瓶中,用棉花塞住瓶口分别放在 25、4、-20℃ 中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 快速测定染色剂的筛选 用镊子和解剖针将花药划开,花粉均匀洒在洁净的载玻片上,分别滴 0.5% TTC、0.025% 次甲基蓝、 α -萘酚-联苯胺、 I_2 -KI 4 种染色剂,待充分反应后,盖上盖玻片,每种染色法重复 3 张片,每张片选取 3 个分散均匀的视野,每个视野花粉数不少于 100 粒,记录并统计结果。

1.2.2 不同贮藏条件对花粉生活力的影响 取分别放在 25、4、-20℃ 下的花粉,选用 α -萘酚-联苯胺染色,最初每 24 h 测定 1 次,1 周后每 3~5 d 测 1 次,直到花粉完全失去生活力,方法和操作如 1.2.1。

1.2.3 花粉萌发单因素试验筛选 蔗糖对萌发率的影响:1 g 琼脂+100 mL 蒸馏水,pH 5.8,20℃,蔗糖浓度分别为 0、5%、10%、15%、20%;硼酸对萌发率的影响:1 g 琼脂+100 mL 蒸馏水+蔗糖 10 g,pH 5.8,20℃, H_3BO_3 浓度分别为 0、0.01%、0.03%、0.05%、0.07%;温度对萌发率的影响:1 g 琼脂+100 mL 蒸馏水+蔗糖 10 g,pH

5.8,温度分别为 5、15、20、25、30℃。

1.2.4 花粉萌发正交实验 单因素试验选出各组分浓度后,采用 $L_9(3^3)$ 正交实验设计选出三者最佳组合浓度。

1.2.5 花粉萌发试验操作方法 将配置好的培养基趁热用玻璃棒薄薄的涂一层在盖玻片上,凝固后将花粉轻轻粘在培养基上,盖玻片盖在双凹孔上(孔中滴 2 滴蒸馏水保湿),有培养基的一面朝向凹孔,每处理 3 次重复。观察时选取同 1 张盖玻片上均匀分散的 3 个不同视野,每视野花粉数不少于 100 粒,以花粉管长度超过花粉粒直径的 1/2 作为萌发标准,用 Nikon55i 显微镜每 24 h 镜检,用 AI Cytovision 软件对花粉萌发情况照相并保存。萌发率=(萌发花粉粒数/花粉粒总数) \times 100%。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 和 SPSS 17.0 进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同试剂测定生活力的比较

染色法是快速测定花粉生活力且比较有效的方法,不同的染色试剂对花粉的染色效果不同。从表 1 可以看出,次甲基蓝和 α -萘酚-联苯胺染色效果较好,二者差异不显著,但均与 TTC 和 I_2 -KI 染色法差异极显著,测出的生活力均高于 80%,与新采集花粉的生活力接近(89.02%)。TTC 染色法显著优于 I_2 -KI 染色法,生活力达 77.00%, I_2 -KI 染色法测定结果最低,生活力低于 50%,由此可见, I_2 -KI 染色法不适合用于贴梗海棠花粉快速测定,最佳选用试剂为次甲基蓝和 α -萘酚-联苯胺。

表 1

不同染色剂测定花粉生活力结果

Table 1

The result of pollen viability which measured by different coloring agents

试剂 Reagent	生活力 Viability/%	5%显著水平 5% Significant level	1%显著水平 1% Significant level
次甲基蓝 Methylene blue	84.94	a	A
α -萘酚-联苯胺 α -naphthol-benzidine	83.81	a	A
TTC	77.00	b	B
I_2 -KI	44.62	c	C

注:表中大小写字母分别表示 $P=0.01$ 和 $P=0.05$ 显著差异水平。下同。

Note: Capital and lowercase letters in the table represent $P=0.01$ and $P=0.05$ significant level respectively. The same below.

2.2 贮藏温度对花粉生活力的影响

从图 1 不同贮藏条件下花粉生活力的变化趋势可以看出,贴梗海棠新鲜花粉生活力达 89.02%,在 3 种不同温度下的保存时间差异显著。25℃ 条件下保存时间最短,生活力下降速度最快,3 d 后花粉活力降到 50% 以下,7 d 后降为 0%。在贮藏初期,即 1~10 d 之间,4℃ 贮藏下的花粉生活力下降速度比 -20℃ 的缓慢,分别降到 56.07%、49.79%。之后 -20℃ 下花粉生活力降速减缓,而 4℃ 下的花粉生活力迅速降低,15 d 时间内由 46.38% 降为 0%。因此,远程杂交的花粉保存无需在冷冻条件进行,可采用冷藏温度保存,降低设备需求,并尽可能在采粉后 1 周完成。

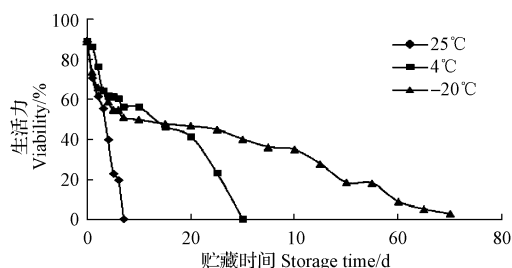


图 1 不同贮藏条件下贴梗海棠花粉生活力随时间的变化趋势

Fig. 1 Variation tendency of pollen viability under different storage temperatures

2.3 单因素试验结果

2.3.1 蔗糖对萌发率的影响 蔗糖在花粉萌发过程中除了为花粉提供碳源外,还能起到调节渗透压的作用。由表 2 可知,当蔗糖浓度为 0%时,花粉也能萌发,只是萌发率偏低,仅为 6.46%。蔗糖浓度为 10%时的萌发率最高,达到 14.93%,与其余 4 个浓度下的萌发率差异显著。当浓度为 5%、15%、20%时,萌发率均低于 10%,三者差异不显著,但均高于对照(6.46%),分别为 8.31%、9.73%、7.42%,说明贴梗海棠花粉对蔗糖浓度敏感,仅适宜浓度蔗糖才能促进萌发率显著增加。花粉萌发过程见图 2。

2.3.2 硼酸对萌发率的影响 硼参与花粉管膜果胶物质的合成,一般情况下,花粉中硼酸含量较低,需要由柱头和花柱内的硼酸进行补偿,其次糖与硼酸形成糖-硼复合体,促进植物对糖的吸收和代谢^[14]。贴梗海棠花粉萌发对硼酸浓度较为敏感,从表 2 可以看出,当硼酸浓度为 0.03%时,花粉萌发率最高,达到 17.89%,极显著高于其余 4 个浓度。0%和 0.01% 2 个低浓度条件下的萌发率虽然较低,分别为 13.40%、13.67%,但均极显著高于 0.05%(10.25%)和 0.07%(8.39%)条件下的萌发率,表明高浓度硼酸对花粉萌发的抑制程度较低浓度下大,因此适宜的硼酸浓度对贴梗海棠花粉萌发尤为重要。

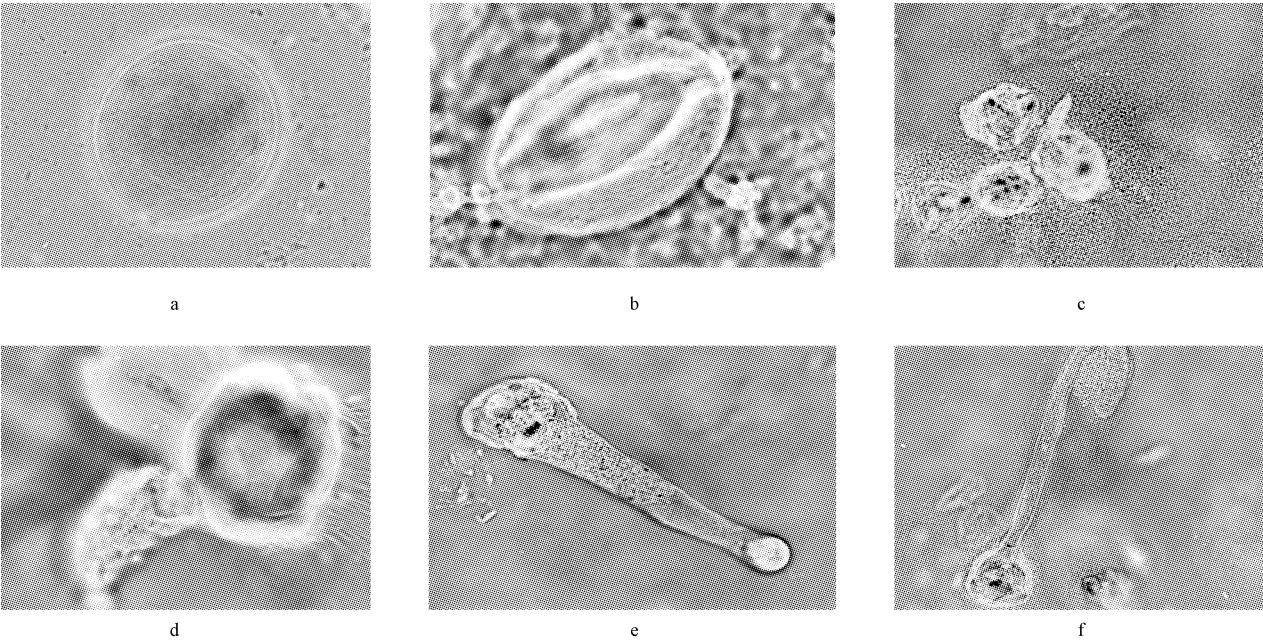


图 2 花粉管萌发过程

注:a. 刚接种到培养基上的花粉;b. 萌发孔张开;c,d. 花粉管开始长出;e. 花粉管完全伸长;f. 花粉管顶端破裂。

Fig. 2 Germination process pictures of pollen tube

Note:a. The pollen that just has been inoculated on nutrient medium;b. Germinal aperture open;c,d. Pollen tube start to be grown;e. Pollen tube extened totally;f. The top of pollen tube break up.

表 2 单因素试验各组分浓度下花粉离体萌发率

Table 2 The rate of pollen germination <i>in vitro</i> under different single factors					
蔗糖浓度 Sucrose concentration/%	萌发率 Germination rate/%	硼酸浓度 Boric acid concentration/%	萌发率 Germination rate/%	温度 Temperature/℃	萌发率 Germination rate/%
10	14.93aA	0.03	17.89aA	20	12.47aA
15	9.73bB	0.01	13.67bB	15	11.32abAB
5	8.31bcBC	0	13.4bB	25	10.76bAB
20	7.42cdBC	0.05	10.25cC	30	10.44bB
0	6.46dC	0.07	8.39dD	5	4.94cC

2.3.3 温度对萌发率的影响 温度影响体内酶活性,一定范围内,随着温度升高花粉萌发数可能减少,但可促进花粉管的生长速度。由表 2 可知,当温度在 15~30℃之间时,萌发率均在 10%以上,20℃时,萌发率最大,为

12.47%,与 15℃(11.32%)差异不显著,与 25℃(10.76%)在 0.05 水平上差异显著,与 30℃(10.44%)差异极显著。15、25、30℃之间差异均不显著。当温度为 5℃时,萌发率极显著低于其它 4 个温度,仅为 4.94%,

说明低温花粉活力受影响较大,不利于其生长繁殖。

2.4 蔗糖、硼酸、温度三因素正交实验结果

从表3可以看出,9个组合平均萌发率为11.11%,其中高于平均值的组合有2、4、5,萌发率最高的为组合2(8%蔗糖+0.03%硼酸+20℃),萌发率为均值的2倍,达到22.23%,极显著高于其它组合,组合4、5萌发率分别为13.00%、13.82%,极显著高于其它6个组合。萌发率最低是组合9(12%蔗糖+0.05%硼酸+20℃),萌发率仅为5.52%。蔗糖浓度为8%、10%、12%时,平均萌

发率分别为14.05%、11.19%、8.09%,其中8%、10%条件下的萌发率较总体均值高,浓度为12%的平均萌发率低于总体平均值。当硼酸浓度分别为0.01%、0.03%、0.05%时,平均萌发率分别为10.64%、14.96%、7.72%,仅在硼酸浓度为0.03%时的平均萌发率高于总体平均值(11.11%),说明硼酸浓度过高与过低对萌发的影响较大,与单因素情况一致。当温度分别为15、20、25℃时,平均萌发率分别为8.19%、13.58%、11.55%,20℃仍然是萌发率最高的温度。

表3

花粉萌发 $L_9(3^3)$ 正交实验结果

Table 3

Results of orthogonal experiment about pollen germination

序号 Number	蔗糖浓度 Sucrose concentration/ %	硼酸浓度 Boric acid concentration/ %	温度 Temperature/ °C	花粉萌发率 Germination rate/ %
1	8	0.01	15	9.00CDd
2	8	0.03	20	22.23Aa
3	8	0.05	25	10.91Cc
4	10	0.01	20	13.00Bb
5	10	0.03	25	13.82Bb
6	10	0.05	15	6.74Ee
7	12	0.01	25	9.93CDed
8	12	0.03	15	8.82Dd
9	12	0.05	20	5.52Ff
均值 AVG				11.11

3 讨论

花粉生活力的测定方法较多,其中染色法是一种相对简单快捷的方法。不同植物花粉内含物不同,适用的染色剂也不同,如该试验中 I_2 -KI 测定效果最差,不适用于贴梗海棠花粉生活力的快速测定,这与管雨等^[15]对木瓜(*Chaenomeles sinensis*)研究结果相似,可能是因为花粉中淀粉含量较低所致,而李刚等^[16]认为 I_2 -KI 能准确测定芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)花粉的生活力。甲基蓝和 α -萘酚-联苯胺染色效果均较好,二者无显著差异,均可用于贴梗海棠花粉生活力的快速测定。染色法虽使用方便,受花粉自身条件(花粉壁厚度、组成物特性、花粉内酶活性等)影响较大^[15],在一定程度上与主观判断染色程度相关,可结合离体萌发以达到更准确的判断。

花粉生活力的强弱受遗传因素和环境因素影响。贮藏过程中温度越低,花粉保存时间越长,但在贮藏初期(10 d),-20℃花粉活力比4℃下降低速度更快,这可能是在贮藏初期冷冻温度对花粉细胞伤害较大,短时间内出现-20℃的花粉生活力比4℃降低较快的现象,一段时间后,短期休眠现象逐渐解除^[17],温度越低,呼吸作用越弱,可溶性糖类、有机酸的消耗减少^[18],使得-20℃花粉生活力逐渐高于4℃。花粉在25℃保存条件下仅3 d生活力就降到50%以下,4℃及-20℃也仅能保存10、7 d,表明贴梗海棠花粉具有不耐贮藏性,这与杜仲

(*Eucommia ulmoides* Oliv)花粉贮藏6个月生活力仍可达52.4%不同^[19]。因此,贴梗海棠的授粉及杂交等工作应尽可能在采粉后冷藏条件下1周内完成。

不同植物及同一植物不同品种花粉离体培养时所需培养基组分、浓度差异及萌发率均差异较大,如程伟等^[20]研究表明,西南桦(*Betula alnoides* Buch. - Ham. ex D. Don)花粉离体培养最佳培养基为15%蔗糖+200 mg/kg 硼酸+30℃,此时萌发率为30.3%,该试验中萌发率最高的浓度组合为蔗糖8%+硼酸0.03%+温度20℃,萌发率为22.23%,高于任一单因素结果,但远远低于染色法测定的花粉活力,与此相反,贾文庆等^[21]研究发现,离体萌发表现良好的紫薇(*Lagerstroemia indica*)花粉在染色反应里表现并不好,这可能是因为离体条件虽然能提供模拟环境,但无法提供花粉在自然生长情况下植株体内提供的所有营养物质,因此不能完全符合贴梗海棠自然生长发育条件。董美芳等^[6]对皱皮木瓜花粉采用水培法,并在培养基中增加 $CaCl_2$ 一项,获得最适浓度为温度20℃+蔗糖150 g/L+硼酸20 mg/L+ $CaCl_2$ 50 mg/L,萌发率为35.4%,造成此差异的原因也可能是试验材料品种不同,其取材为皱皮木瓜,该试验中为贴梗海棠。据张茜等^[3]对木瓜分类表明,目前木瓜属分类较混乱,皱皮木瓜与贴梗海棠均属于皱皮木瓜种下的不同品种,如李玉萍等^[22]对20个风信子(*Hya-cinthus orientalis*)品种萌发特性研究表萌发率高的品种

可达 84.67%,而低的仅为 10.71%。在后续研究中,可以扩大选材范围,比较不同种源地贴梗海棠花粉生活力和贮藏性差异。

参考文献

- [1] 宋亚玲. 中药木瓜化学成分及生物活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [2] 陈罡, 叶景丰, 马冬菁, 等. 贴梗海棠组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2008(8): 186-187.
- [3] 张茜, 王光, 何祯祥, 等. 木瓜种质资源的植物学归类及管理原则[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(3): 339-343.
- [4] 郑林, 陈红, 郭先峰, 等. 木瓜属(*Chaenomeles*)栽培品种与近缘种的数量分类[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2009, 33(2): 47-50.
- [5] 郑林, 陈红, 张雷, 等. 木瓜属植物的花粉形态及品种分类[J]. 林业科学, 2008, 44(5): 53-57.
- [6] 董美芳, 陈明海, 贾婉, 等. 不同培养条件和贮藏方法对皱皮木瓜花粉萌发率的影响[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2012, 42(3): 291-294.
- [7] 耿兴敏, 黄蓓丽, 罗凤霞, 等. 唐菖蒲花粉低温保存效果分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2011, 35(4): 7-12.
- [8] Perveen A, Ali S. Pollen germination capacity and maintenance of Pollen in *Praecitrullus fistulosus* (stocks) Pangola (Cucurbitaceae) [J]. Pakistan Journal of Botany, 2011, 43(1): 47-50.
- [9] Nanda K P B A, Chaudhury R, Shivanna K R. Effect of storage on pollen germination and pollen tube growth[J]. Current Science, 1988, 57(10): 557-559.
- [10] 刘赢男, 周丹, 刘玮, 等. 不同培养基及贮藏条件对山梅花属植物花粉生活力的影响[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(12): 47-48, 79.
- [11] Ali I, Kazem B, Saeed P, et al. Storage of apple pollen and *in vitro* germination[J]. African Journal of Agricultural Research, 2011, 6(2): 624-629.
- [12] 谢深喜, 罗先实, 吴月嫦, 等. GA₃、2,4-D、B 和蔗糖对梨花粉生活力及生长速度的影响[J]. 果树学报, 2004, 21(4): 289-294.
- [13] 张铭芳, 吴磊磊, 贾桂霞. 百合不同杂交品种花粉贮藏特性分析[J]. 西北植物学报, 2013, 3(7): 1465-1472.
- [14] 李俊英, 陶慧, 许林, 等. 大叶杨花粉离体萌发和贮藏条件的研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2011, 29(2): 83-87.
- [15] 管雨, 贾文庆, 刘会超, 等. 木瓜花粉生活力测定及储藏特性[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(5): 790-794.
- [16] 李刚, 高敏, 王子斌, 等. 长期储藏芍药花粉生活力测定方法研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 325-328.
- [17] 赵纪伟, 李莉, 彭建营, 等. 梨不同品种花粉生活力测定及授粉特性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(1): 152-156, 162.
- [18] 董易, 马晓红, 沈强, 等. 荷兰水仙花粉萌发和花粉贮藏性[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30(5): 24-29.
- [19] 贾小明, 李俊红, 李周岐. 杜仲花粉形态、贮藏及萌发性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(7): 149-154.
- [20] 程伟, 赵志刚, 曾杰, 等. 西南桦花粉离体萌发的适宜条件与萌发特征[J]. 林业科学研究, 2007, 20(2): 209-212.
- [21] 贾文庆, 刘会超, 姚连芳. 紫薇花粉萌发特性研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(6): 18-20.
- [22] 李玉萍, 罗凤霞, 王春彦, 等. 风信子花粉萌发及贮藏性研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(12): 2484-2489.

Study on Pollen Viability and Storage Characters of *Chaenomeles speciosa*

MA Shi-yu¹, ZHOU Lan-ying¹, PU Guang-lan¹, LAI Teng-yue¹, CAI Li-juan¹, WANG Bo^{1,2}

(1. College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014; 2. Department of Architectural Engineering, Sichuan Engineering Technical College, Deyang, Sichuan 618000)

Abstract: Taking young bloom *Chaenomeles speciosa* as experimental materials, four coloring agents (Methylene Blue, TTC, I₂-KI and alpha-naphthol benzidine) were used to measure pollen viability. Storage characters under three different temperature conditions (-20, 4 and 25°C) and germination percentage under different concentrations of sucrose, boric acid and temperature were studied respectively. The results showed that pollen viability measured by different coloring agents showed significantly differences. Methylene Blue(84.94%) was the best choices for rapid determination, while the worst was I₂-KI(44.62%). Storage temperatures had remarkable effects on pollen viability, that was the lower the temperature, the longer the storage time. The storage time of pollen viability percentage under 50% were 3 days(25°C), 10 days(4°C) and 7 days(-25°C), the optimum temperature for pollen storage was 4°C. Within certain limits, sucrose, boric acid and temperature could promote pollen to germinate easily. If the concentration exceeded optimum capacity, germination rate of pollen would be restrained. Moreover, high concentration of boric acid gave a severe inhibition on germination by contrast with low boric acid concentration. The optimal sucrose, boric acid concentration and temperature were 10%, 0.03%, 20°C respectively during single factor experiment. The optimal portfolio of solid medium verified by orthogonal test was 8%(sucrose)+0.03%(boric acid)+20°C(temperature).

Key words: *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai; pollen; viability; storage; germination