

贮藏温度及时间对核桃品种花粉生活力的影响

刘杜玲, 张博勇, 彭少兵, 吕平会

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以“香玲”、“西林3号”、“西洛2号”、“强特勒”和“哈特勒”5个核桃品种的花粉为试材,用TTC染色法和离体培养法测定了不同贮藏温度及时间下花粉的生活力。结果表明:5个核桃品种花粉在室温(20℃)下贮藏生活力最低,在3℃和-20℃下贮藏生活力较高;随贮藏时间延长花粉生活力显著下降。用TTC染色法测得的花粉生活力显著高于离体培养法,2种测定方法之间具有极显著的相关性。“香玲”、“西林3号”、“西洛2号”和“强特勒”花粉适于在3℃下贮藏,“哈特勒”花粉适于在-20℃下贮藏,贮藏时间为6~9 d。

关键词:核桃;花粉生活力;贮藏条件;贮藏方法

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0007-04

核桃(*Juglans regia* L.)属于异花授粉树种,大多数品种存在雌雄异熟现象,自花不结实或结实率很低,生产上为获得高产优质坚果,需配置授粉树或进行人工辅助授粉。另外,在林业常规杂交育种中,需要早期采集和贮藏花粉。因此研究合适的核桃花粉贮藏条件及花粉生活力是核桃高产栽培和杂交育种的基础。但有关花粉贮藏方面的研究多集中在枣^[1]、梨^[2]、枇杷^[3]、板栗^[4]等经济林树种上,而有关核桃花粉生活力和贮藏条件的研究鲜见报道。该研究以“香玲”、“西林3号”、“西洛2号”、“强特勒”和“哈特勒”5个核桃品种为试材,采用TTC染色法和离体培养法研究了不同贮藏温度及时间对核桃品种花粉生活力和萌发率的影响,确定花粉贮藏的最适条件,旨在为核桃人工授粉和杂交育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为“香玲”、“西林3号”、“西洛2号”、“强特勒”和“哈特勒”5个品种,树龄7~8年。

1.2 试验方法

试验在杨凌西北农林科技大学林学院苗圃进行,管

理水平一般。采集由绿变黄、小花分离、花药变黄但还没散粉的各供试品种的雄花序带回实验室,放在干燥的报纸上在室温下晾干,待花药开裂、花粉全部散出后,将花粉装在青霉素小瓶中^[5],在室温(20℃)、3℃及-20℃条件下分别贮藏3、6、9、12 d^[6],测定花粉生活力和萌发率。

1.3 项目测定

TTC染色法:将0.1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)滴于粘有花粉粒的载物片上,盖上盖玻片,于培养箱中30℃下避光放置0.5 h。显微镜(10×10)下观察花粉着色情况,红色的为有生活力的花粉。每品种重复3次,每个载物片观察6个视野^[7]。花粉生活力(%)=(着色花粉数/观察花粉数量)×100。

离体培养法:在凹玻片上滴上已配置好的培养基(5%蔗糖+0.5%硼酸)^[7],用头发丝将花粉条播后放入铺有加湿滤纸的培养皿中,在26℃恒温培养箱中培养9 h后取出,在光学显微镜下观察萌发情况,以萌发的花粉管长度超过花粉粒直径的萌发粉粒为标准^[8-9]。每处理重复3次,每重复镜检3个视野,花粉萌发率(%)=(已萌发的花粉粒数/总花粉粒数)×100。

1.4 数据分析

采用Excel和SPSS 19.0进行数据处理、方差分析和相关分析。

2 结果与分析

2.1 不同贮藏温度及时间对核桃品种花粉生活力的影响

在不同温度及贮藏时间下,用TTC染色法测定核桃品种花粉生活力的结果见表1。5个核桃品种花粉在不同温度条件下贮藏,花粉生活力各异,且随贮藏时间

第一作者简介:刘杜玲(1964-),女,陕西富平人,硕士,副教授,现主要从事经济林栽培的理论与技术等研究工作。E-mail:liudl606@126.com.

责任作者:吕平会(1959-),男,陕西周至人,本科,副研究员,现主要从事经济林栽培及育种等研究工作。E-mail:lvpinghui@126.com.

基金项目:陕西省农业攻关资助项目(2014K01-10-01);西北农林科技大学基本科研业务费专项资助项目(QN2013080)。

收稿日期:2015-05-18

延长各品种花粉生活力均下降。“哈特勒”花粉在-20℃条件下贮藏3 d生活力最高(86.43%),贮藏至6 d,花粉生活力下降至60.81%,贮藏至9 d时花粉生活力下降至32.45%。其余4个品种均以3℃条件下贮藏3 d花粉生活力最高,在66.26%~80.29%,花粉生活力最高的品种是“西林3号”(80.29%),最低品种是“香玲”

表1 不同贮藏温度及时间对
核桃品种花粉生活力的影响

Table 1 Effect of different storage temperatures and time on pollen viability of walnut cultivars %

品种 Cultivar	贮藏温度 Storage temperature/℃	3 d	6 d	9 d	12 d
“香玲” ‘Xiangling’	20	42.56b	0.00b	0.00b	0
	3	66.26a	40.06a	19.75a	0
	-20	65.53a	39.80a	0.00b	0
“西林3号” ‘Xilin 3’	20	50.14b	23.80b	0.00b	0
	3	80.29a	53.95a	21.04a	0
	-20	65.20a	37.28a	0.00b	0
“西洛2号” ‘Xiluo 2’	20	71.97a	44.44a	0.00b	0
	3	73.43a	58.23b	29.85a	0
	-20	71.79a	44.45a	0.00b	0
“强特勒” ‘Chandler’	20	0.00b	0.00b	0.00b	0
	3	71.85a	45.46a	20.88a	0
	-20	64.57a	40.53a	18.96a	0
“哈特勒” ‘Hartley’	20	0.00b	0.00c	0.00b	0
	3	70.02a	16.51b	0.00b	0
	-20	86.43a	60.81a	32.45a	0

注:同列不同小写字母表示同一品种在不同温度下差异显著($P<0.05$)。表3同。

Note: Different lowercase letters in the same column represent significant differences at 0.05 level of each species under different temperature. The same as table 3.

表2 各品种在同一温度下
花粉生活力方差分析结果

Table 2 The variance analysis of each species' pollen viability at same temperature %

品种 Cultivar	贮藏温度 Storage temperature/℃	3 d	6 d	9 d	12 d
“香玲” ‘Xiangling’	20	42.56a	0.00b	0.00b	0
	3	66.26a	40.06b	19.75c	0
	-20	65.53a	39.80b	0.00c	0
“西林3号” ‘Xilin 3’	20	50.14a	23.80b	0.00c	0
	3	80.29a	53.95b	21.04c	0
	-20	65.20a	37.28b	0.00c	0
“西洛2号” ‘Xiluo 2’	20	71.97a	44.44b	0.00c	0
	3	73.43a	58.23b	29.85c	0
	-20	71.79a	44.45b	0.00c	0
“强特勒” ‘Chandler’	20	0.00a	0.00a	0.00a	0
	3	71.85a	45.46b	20.88c	0
	-20	64.57a	40.53b	18.96c	0
“哈特勒” ‘Hartley’	20	0.00a	0.00a	0.00a	0
	3	70.02a	16.51b	0.00c	0
	-20	86.43a	60.81b	32.45c	0

注:同一行不同小写字母表示同一温度下贮藏不同时间差异显著($P<0.05$)。表4同。

Note: Different lowercase letters in the same line represent significant differences at 0.05 level of each species under same temperature. The same as table 4.

(66.26%);贮藏至6 d时花粉生活力降为16.51%~58.23%;贮藏至9 d时花粉生活力降为19.75%~20.88%;贮藏至12 d时5个品种花粉生活力均为0。各品种花粉在室温下贮藏生活力均最低。方差分析表明,在室温(20℃)条件下贮藏的花粉生活力较3℃和-20℃差异显著,但3℃和-20℃之间差异不显著(除“西洛2号”);在同一贮藏温度下,随贮藏时间的延长花粉生活力显著下降(表2)。

2.2 不同贮藏温度及时间对核桃品种花粉萌发率的影响

表3为用离体培养法测定的花粉生活力。表明在不同贮藏温度条件下,核桃花粉生活力各异,同一温度下随贮藏时间的延长,核桃花粉生活力均呈下降趋势。“哈特勒”核桃花粉在-20℃条件下贮藏3 d萌发率最高(38.09%),贮藏6 d时花粉萌发率为10.46%,贮藏至9 d花粉萌发率下降为4.58%,12 d时花粉萌发率为0。其余4个品种均是在3℃下贮藏3 d花粉萌发率最高,在23.50%~45.64%,花粉萌发率最高的是“西林3号”,最低的是“强特勒”;贮藏6 d时花粉萌发率在7.91%~18.29%,贮藏至9 d时花粉萌发率在2.54%~5.21%,贮藏至12 d时,各品种花粉萌发率均为0;各品种花粉均是在室温条件下贮藏萌发率最低。方差分析结果表明,5个核桃品种花粉分别在3℃、-20℃条件下,“香玲”、“哈特勒”核桃花粉贮藏3 d,萌发率差异不显著,贮藏6、9 d萌发率差异显著;“西林3号”花粉分别贮藏3、6、9 d,萌发率均差异显著,“西洛2号”和“强特勒”花粉贮藏3、6 d萌发率差异不显著,贮藏9 d萌发率差异显著。同一温度条件下随贮藏时间延长,各品种花粉萌发率下降差异显著(表4)。

表3 不同贮藏温度及时间对
核桃品种花粉萌发率的影响

Table 3 Effect of various preservation temperature and time on pollen germination %

品种 Cultivar	贮藏温度 Storage temperature/℃	3 d	6 d	9 d	12 d
“香玲” ‘Xiangling’	20	18.30b	0.00c	0.00b	0
	3	35.42a	18.29a	5.06a	0
	-20	34.57a	12.80b	0.00b	0
“西林3号” ‘Xilin 3’	20	16.45 b	4.87b	0.00b	0
	3	45.64 a	17.00a	3.23a	0
	-20	20.39 b	8.64b	0.00b	0
“西洛2号” ‘Xiluo 2’	20	28.50a	8.31a	0.00b	0
	3	32.04a	12.90a	2.54a	0
	-20	30.41a	10.06a	0.00b	0
“强特勒” ‘Chandler’	20	0.00b	0.00b	0.00c	0
	3	23.50a	7.91a	5.21a	0
	-20	22.87a	10.59a	2.84b	0
“哈特勒” ‘Hartley’	20	0.00b	0.00c	0.00b	0
	3	34.68a	5.75b	0.00b	0
	-20	38.09a	10.46a	4.58a	0

表 4 同一温度下不同贮藏时间
各品种花粉萌发率方差分析结果

Table 4 The variance analysis results on pollen germination of each species at the same temperature %

品种	贮藏温度	3 d	6 d	9 d	12 d
Cultivar	Storage temperature/℃				
“香玲”	20	18.30a	0.00b	0.00b	0.00
“Xiangling”	3	35.42a	18.29b	5.06c	0.00
“Xiangling”	-20	34.57a	12.8b	0.00c	0.00
“西林 3 号”	20	16.45a	4.87b	0.00c	0.00
“Xilin 3”	3	45.64a	17.00b	3.23c	0.00
“Xilin 3”	-20	20.39 a	8.64b	0.00c	0.00
“西洛 2 号”	20	28.50a	8.31b	0.00c	0.00
“Xiluo 2”	3	32.04a	12.90b	2.54c	0.00
“Xiluo 2”	-20	30.41a	10.06b	0.00c	0.00
“强特勒”	20	0.00a	0.00a	0.00a	0.00
“Chandler”	3	23.50a	7.91b	5.21c	0.00
“Chandler”	-20	22.87a	10.59b	2.84c	0.00
“哈特勒”	20	0.00a	0.00a	0.00a	0.00
“Hartley”	3	34.68a	5.75b	0.00c	0.00
“Hartley”	-20	38.09a	10.46b	4.58c	0.00

表 5 TTC 染色法与离体培养法测定的花粉生活力比较

Table 5 Comparison of pollen viability using TTC staining and *in vitro* culture method %

品种	贮藏温度	3 d	6 d	9 d	12 d
Cultivar	Storage temperature/℃	TTC	离体培养	TTC	离体培养
“香玲”	20	42.56a	18.30b	0.00a	0.00a
“Xiangling”	3	66.26a	35.42b	40.06a	18.29b
“Xiangling”	-20	65.53a	34.57b	39.80a	12.8b
“西林 3 号”	20	50.14a	16.45b	23.80a	4.87b
“Xilin 3”	3	80.29a	45.64b	53.95a	17.00b
“Xilin 3”	-20	65.20a	20.39b	37.28a	8.64b
“西洛 2 号”	20	71.97a	28.5b	44.44a	8.31b
“Xiluo 2”	3℃	73.43a	32.04b	58.23a	12.9b
“Xiluo 2”	-20	71.79a	30.41b	44.45a	10.06b
“强特勒”	20	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
“Chandler”	3	71.85a	23.5b	45.46a	7.91b
“Chandler”	-20	64.57a	22.87b	40.53a	10.59b
“哈特勒”	20	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
“Hartley”	3	70.02a	34.68b	16.51a	5.75b
“Hartley”	-20	86.43a	38.09b	60.81a	10.46b

表 6 TTC 染色法与离体培养法测定的花粉生活力相关分析

Table 6 Correlation analysis of pollen viability using TTC staining and *in vitro* culture method

相关系数	TTC 染色	离体培养	TTC 染色	离体培养	TTC 染色	离体培养
Correlation coefficient	TTC staining(3 d)	<i>In vitro</i> culture(3 d)	TTC staining(6 d)	<i>In vitro</i> culture(6 d)	TTC staining(6 d)	<i>In vitro</i> culture(9 d)
TTC 染色 TTC staining(3 d)	1	0.920 **	0.856 **	0.758 **	0.494	0.448
离体培养 <i>In vitro</i> culture(3 d)	0.920 **	1	0.778 **	0.833 **	0.499	0.454
TTC 染色 TTC staining(6 d)	0.856 **	0.778 **	1	0.840 **	0.705 **	0.605 *
离体培养 <i>In vitro</i> culture(6 d)	0.758 **	0.833 **	0.840 **	1	0.591 *	0.595 *
TTC 染色 TTC staining(9 d)	0.494	0.499	0.705 **	0.591 *	1	0.896 **
离体培养 <i>In vitro</i> culture(9 d)	0.448	0.454	0.605 *	0.595 *	0.896 **	1

注: * 表示 $P<0.05$ 显著水平; ** 表示 $P<0.01$ 显著水平。
Note: * means significant difference at $P<0.05$; ** means significant difference at $P<0.01$.

3 讨论与结论

离体花粉的寿命和不同贮藏条件下花粉的寿命长短对核桃人工授粉和杂交育种有重要的指导作用。花粉生活力的高低主要受品种遗传因子影响,同时还受温度、湿度、光照、空气等环境因子的影响,而温度是影响

2.3 2 种花粉生活力测定方法比较

表 5 表明,同一品种在同一贮藏温度及贮藏时间下,用 TTC 染色法测得的花粉生活力明显高于离体培养法,且 2 种方法测得的花粉生活力差异显著。如 5 个品种花粉在 3℃ 下贮藏 3 d 时,用 TTC 染色法测得的花粉生活力在 66.26%~80.29%,而用离体培养法测得的花粉生活力 23.5%~45.64%,用 TTC 染色法测得的花粉生活力比离体培养法高出 30.84%~48.35%。且在同一温度下随贮藏时间延长,用 TTC 染色法测定的花粉生活力下降幅度明显大于离体培养法。对 2 种方法测定的花粉生活力进行相关分析结果见表 6,在相同贮藏条件下,离体培养法与 TTC 染色法测定的花粉生活力具有极显著的相关性,相关系数为 0.840~0.920。

花粉生活力最主要的环境因子之一。对于大多数植物而言,温度越低花粉的保存时间越长,同一贮藏温度下,随贮藏时间延长,花粉生活力和萌发率显著下降^[10]。该研究用 TTC 染色和离体培养法研究了在不同贮藏温度及贮藏时间下 5 个核桃品种花粉的生活力及萌发率。

结果发现,核桃花粉在 3℃ 和 -20℃ 条件下贮藏,花粉生活力较高,贮藏时间为 6~9 d。其中,“香玲”、“西林 3 号”、“西洛 2 号”、“强特勒”花粉贮藏的最适温度为 3℃,在此温度下贮藏 6 d,花粉生活力为 16.51%~58.23%,萌发率为 7.91%~18.29%;贮藏 9 d 花粉生活力为 19.75%~20.88%,萌发率为 2.54%~5.21%,这与缙锋利^[6]、杜晋城等^[10]在核桃上的研究结果一致。说明这 4 个核桃品种的花粉在冷藏条件下贮藏 6~9 d 即能满足授粉要求。“哈特勒”花粉贮藏的最适温度为 -20℃,在该温度下贮藏 6 d,花粉生活力为 60.81%,萌发率为 10.46%;贮藏 9 d 花粉生活力为 32.45%,萌发率为 4.58%,这与王锦锋^[5]在核桃、周楠楠等^[9]在红桤木、孙爱芹等^[1]在枣上的研究结果一致。说明核桃花粉适宜在低温或超低温条件下贮藏,这可能与该温度条件下核桃花粉中的 POD、SOD、CAT 酶活性有关,其原因有待于进一步探讨。

张子学等^[11]认为 TTC 染色法和离体培养法适用于不同贮藏时间的花粉生活力测定。TTC 染色法是根据花粉粒的呼吸酶活性来判断花粉生活力,该方法对很多植物花粉生活力的检测都适用,如枇杷^[3]、黄牡丹^[12]、银杉^[13]、锦带花^[14]、紫花苜蓿^[15]等。与 TTC 染色法相比,离体培养法测定的花粉生活力数据科学可靠,测定结果与真实的花粉生活力更接近,这已在许多植物花粉生活力研究中得到验证,故仍为目前杂交育种中花粉生活力测定的首选方法^[16]。该研究表明,用 TTC 染色法测得的花粉生活力显著高于离体培养法,5 个品种花粉在 3℃ 下贮藏 3 d,用 TTC 染色法测得的花粉生活力比离体培养法高出 30.84%~48.35%。TTC 染色法测定的是花粉潜在的生活力,但生活力并不等于花粉萌发率,花粉萌发率不仅受遗传因素的影响,还受环境因素的制约,有生活力的花粉不一定都能萌发^[9]。该研究认为用

离体培养法测定的生活力能更确切地反映核桃花粉的实际生活力,适用于核桃花粉生活力的测定。

参考文献

- [1] 孙爱芹,常伟光,韩斌,等.不同枣品种花粉生活力及贮藏方法研究[J].中国农学通报,2010,26(1):166-168.
- [2] 姜雪婷,杜玉虎,张绍铃,等.梨 43 个品种花粉生活力及 4 种测定方法的比较[J].果树学报,2006,23(2):178-181.
- [3] 郭启高,李昆,吴琼,等.龙泉 1 号天然三倍体枇杷的花粉形态及生活力[J].果树学报,2010,27(3):391-396.
- [4] 陈在新,李金秋,潘娟,等.板栗新品系花粉生活力的研究[J].安徽农业科学,2008,36(8):3219-3220.
- [5] 王锦锋.核桃不同品种花粉生活力及其贮藏条件研究[J].安徽农业科学,2014,42(2):392-394.
- [6] 缙锋利.3 种核桃花粉生活力的比较研究[J].山西农业科学,2014,42(2):140-142.
- [7] 齐国辉,张景兰,郭军,等.不同核桃品种花粉生活力的比较研究[J].河北林果研究,2007,22(1):54-61.
- [8] 贾爱平,王飞,张潮红,等.中华猕猴桃品种间亲和性研究[J].园艺学报,2010,37(11):1829-1835.
- [9] 周楠楠,方炎明,马成涛.红桤木花粉生活力及其贮藏方法的研究[J].南京林业大学学报,2010,34(5):34-38.
- [10] 杜晋城,涂美艳,周正华,等.核桃离体花粉贮藏条件及活力研究[J].西南农业学报,2014,27(4):1682-1685.
- [11] 张子学,孙峰.辣椒花粉生活力最佳测定方法的筛选[J].种子,2002(1):32-33.
- [12] 律春燕,王雁,朱向涛,等.黄牡丹花粉生活力测定方法的比较研究[J].林业科学研究,2010,23(2):272-277.
- [13] 王红卫,邓辉胜,谭海明,等.银杉花粉生命力及其变异[J].植物生态学报,2007,31(6):1199-1204.
- [14] 刘林德,张萍,张丽,等.锦带花的花粉活力、柱头可授性及传粉者的观察[J].西北植物学报,2004,24(8):1431-1434.
- [15] 陈晶,张月学,唐凤兰,等.紫花苜蓿花粉生活力测定方法研究[J].草地学报,2010,18(2):297-301.
- [16] 孙坤,张玉娜,苏雪,等.中国沙棘花粉生活力检测方法比较研究[J].西北师范大学学报,2009,45(2):78-81.

Effect of Different Storage Temperature and Time on Pollen Viability of Walnut Cultivars

LIU Duling, ZHANG Boyong, PENG Shaobing, LYU Pinghui

(College of Forest, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Pollen vitality of 5 walnut cultivars ‘Xiangling’, ‘Xilin 3’, ‘Xiluo 2’, ‘Chandler’ and ‘Hartley’ were determined by TTC staining and *in vitro* culture method under different storage temperatures and time. The results showed that, the pollen viability of 5 walnut cultivars were the lowest at room temperature (20℃) while higher at 3℃ and -20℃; with the extension of storage time, the pollen viability decreased significantly and TTC staining was significantly higher than *in vitro* culture method. Two methods for determining had a significant correlation. The suitable condition was at 3℃ for ‘Xiangling’, ‘Xilin 3’, ‘Xiluo 2’, ‘Chandler’ pollen storage and at -20℃ for ‘Hartley’, the storage time was 6-9 days.

Keywords: walnut; pollen vitality; storage conditions; storage method