

紫荆花粉生活力测定及贮藏方法研究

李 荣

(河南新基园林绿化有限公司,河南 新乡 453003)

摘 要:以紫荆花粉为试材,利用离体培养法、碘-碘化钾染色法(I_2 -KI)、醋酸洋红染色法和氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法对花粉生活力进行测定,并研究了不同贮藏条件对花粉萌发的影响,以期了解紫荆花粉的萌发特性及适宜的贮藏方法。结果表明:培养基中添加不同浓度的蔗糖和硼酸对花粉的萌发有促进作用,紫荆花粉萌发的最适培养基为 15%蔗糖+0.004%硼酸+0.08%的琼脂,萌发率达 88.46%; I_2 -KI 染色法和 TTC 染色法不适用于测定紫荆花粉生活力;而醋酸洋红染色法可以作为测定紫荆花粉生活力的方法;花粉生活力随贮藏时间的延长而下降,最佳贮藏方法为 4℃干燥,耐贮藏力超过 26 d。

关键词:紫荆;花粉萌发;生活力;花粉贮藏

中图分类号:Q 946.83 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0116-04

紫荆(*Cercis chinensis* Bunge)属豆科紫荆属落叶灌木或小乔木,又名满条红,在栽培条件下多呈灌木状。紫荆先花后叶,紫红色,花冠假蝶形,花色艳丽可爱,宜丛植于庭院、建筑物前及草坪边缘,为著名庭院观赏树种^[1]。紫荆树皮花梗可入药,有解毒消肿之功效;种子可制农药,有驱杀害虫之功效,具有较高的药用价值^[2]。花粉生活力是评估花粉细胞活性的依据之一,其生活力测定结果的准确性决定细胞学试验和杂交育种的成败^[3]。不同类群植物花粉在自然条件下的寿命、花粉的适宜贮存、营养条件以及花粉生活力的适宜测定方法不同^[4]。掌握花粉适宜的培养、贮藏方法及生活力检测的方法对于提高植物育种效率具有较高的实际应用价值。目前,国内学者主要对紫荆的繁殖^[5]、栽培管理技术^[6]进行了较为深入的研究,但有关紫荆花粉生活力及其贮藏特性尚鲜见报道。现对紫荆花粉的萌发及贮藏特性进行研究,以期对紫荆育种及品种改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2010年4月,于晴天上午的9:00~10:00,在河南科技学院东区采取盛花期紫荆含苞欲放的花朵,带回实验室后去除花瓣取花药于培养皿内,置于(25±1)℃的培养箱散粉12 h后,收集花粉备用。

作者简介:李荣(1984-),女,本科,助理工程师,现主要从事园林工程等方面的研究工作。E-mail:ulegai@126.com。

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD01B07);国家国际科技合作资助项目(2011DFA30490)。

收稿日期:2013-12-12

1.2 试验方法

1.2.1 花粉的形态观察与花粉萌发率分析 将干燥花粉和新鲜花粉涂于黑色导电胶上,放在扫描电镜下观察测定。观察花粉的极轴(P)和赤道(E)长度,并计算 P/E 值;通过扫描电子显微镜照片观察远极面、近极面和局部的内壁纹饰、网眼大小和网脊宽度,测量、记录数据。

1.2.2 最佳培养基筛选 采用两因素(蔗糖、硼酸)完全随机试验,分别设蔗糖和硼酸浓度:0%、5%、10%、15%、20%、25%;0%、0.002%、0.004%、0.006%、0.008%。培养基均添加琼脂 8 g/L,pH 调至 6.0。取 2 滴培养基于凹玻片的凹处,用头发丝蘸取少许花粉均匀散于培养基上,将凹玻片置于铺有 2 层湿滤纸的培养皿中,在(25±1)℃的培养箱中培养 16 h 后,观察统计萌发的花粉数和未萌发的花粉数,计算萌发率,每处理 3 次重复,每重复统计花粉数不少于 50 粒,以花粉管长度大于花粉粒直径 1/2 为萌发标准^[7]。萌发率=(视野中萌发花粉粒数/视野中总花粉粒数)×100%。

1.2.3 花粉染色法 I_2 -KI 染色法、醋酸洋红染色法、TTC(氯化三苯基四氮唑)染色法参照贾文庆等^[5]的方法。

1.2.4 不同贮藏条件对花粉生活力的影响 花粉采集阴干后,装入离心管,在真空干燥箱中抽真空 2 h,干燥花粉抽真空后,放入干燥剂。分别贮藏在室温(A)、室温+干燥(B)、4℃(C)、4℃+干燥(D)、-80℃(E)、-80℃+干燥(F)。贮藏 1、4、8、13、19、26 d 后,取出花粉置于以 1.2.2 试验所得最佳培养基培养中,16 h 后观察统计花粉萌发率。花粉耐贮藏力是以待测花粉活力保持时间,即待测样品活力降为零的时间长度来表示^[8]。

2 结果与分析

2.1 紫荆花粉的形态观察

经扫描电镜观察,花粉粒为长球形,多饱满,极面观为圆形,具3孔沟,外壁纹饰为桔皮状,表面光滑,萌发沟

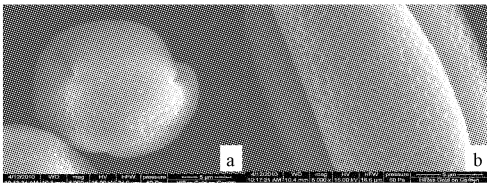


图1 干燥花粉

注:a.极面;b.纹饰

Fig.1 Dry pollen

Note:a. Polar;b. Ornamentation.

边缘凹陷且较光滑。干燥花粉的平均极轴长 32.98 μm , 平均赤道轴长 16.05 μm , $P/E \approx 2.055$ (图 1a、b);新鲜花粉的平均极轴长 33.38 μm , 平均赤道轴长 16.31 μm , $P/E \approx 2.047$ (图 2a、b)。

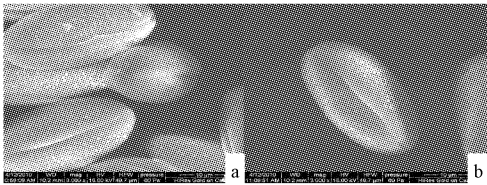


图2 新鲜花粉

注:a.极面;b.侧面

Fig.2 Fresh pollen

Note:a. Polar;b. Side.

2.2 离体培养法对紫荆花粉萌发的影响

从表 1、2 可以看出,在不含有蔗糖和硼酸的培养基中,花粉萌发率较低,仅为 6.72%。培养基中加入蔗糖可有效提高花粉的萌发率,当蔗糖浓度为 15%时,萌发率达到 43.87%,显著高于其它处理。蔗糖浓度继续升高,花粉萌发受到抑制,当蔗糖浓度上升至 25%时,花粉萌发率只有 7.42%。所以,适宜紫荆花粉萌发的蔗糖浓

度为 15%。

在仅含硼酸的情况下,随着硼酸浓度的增加,花粉萌发率呈先上升后下降的趋势,当硼酸浓度为 0.004%时花粉萌发率最高,达 27.45%,硼酸浓度继续升高,花粉的萌发率反而下降,当硼酸浓度增加到 0.008%时,只有 11.80%。因此最适合紫荆花粉萌发的硼酸浓度为 0.004%。

表 1 不同浓度蔗糖、硼酸处理对花粉萌发率的影响

Table 1 Effect of different concentration sucrose and boric acid on the pollen germination %						
硼酸浓度 Concentration of boric acid	0	5	10	15	20	25
0	6.72 \pm 0.69Xz	9.43 \pm 0.21Ux	24.86 \pm 0.18Op	43.87 \pm 0.59Gg	32.26 \pm 0.28Jk	7.42 \pm 0.26Wy
0.002	24.63 \pm 0.69Op	18.52 \pm 0.54Rs	35.68 \pm 0.82Ij	53.72 \pm 0.52Ee	57.70 \pm 0.76Dd	13.80 \pm 0.18Tu
0.004	27.45 \pm 0.55Mn	30.46 \pm 0.18Kl	39.95 \pm 0.27Hi	88.46 \pm 0.73Aa	64.87 \pm 0.85Cc	22.51 \pm 0.25Pq
0.006	20.23 \pm 0.03Qr	26.01 \pm 0.29No	42.97 \pm 0.34Gg	67.53 \pm 0.55Bb	41.09 \pm 0.39Hh	13.07 \pm 0.26Tv
0.008	11.80 \pm 0.12Uw	16.40 \pm 0.28St	28.52 \pm 0.45Lm	46.80 \pm 0.43Ff	15.75 \pm 0.14St	5.18 \pm 0.08Yz ₁

注:不同大小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上存在差异。

Note:Different lowercase and capital letters denote significantly different at 0.05 and 0.01 level respectively.

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis						
变异来源 Sources of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著水平 Significant level	
硼酸 Boric acid	1 375.254	4	343.8135	1.470 **	0.2179	
蔗糖 Sucrose	3 706.017	5	741.2035	3.169 **	0.0111	
硼酸×蔗糖 Boric acid×Sucrose	440.3168	20	22.0158	0.094	1	
误差 Error	104.13	90	23.8662			
总变异 Total variation	5 625.718	119				

当培养基中同时添加不同浓度的蔗糖和硼酸时,花粉萌发率呈先上升后下降的趋势,硼酸浓度为 0.002%时,蔗糖浓度在 20%处萌发率最高,其它情况下,均是蔗糖为 15%时达到最大值,且各处理间呈极显著差异;而蔗糖浓度在 0%、5%、10%、15%、20%、25%时,各处理亦是在硼酸为 0.004%时数值最高,方差分析表明,蔗糖、硼酸两因素间无互作效应。而最适紫荆花粉萌发的培养基为 15%蔗糖+0.004%硼酸培养基,萌发率达 88.46%(图 3a、b)。

2.3 不同染色方法测定花粉生活力的结果

观察图 4 发现,用醋酸洋红染色后,所观察视野中紫荆的花粉粒 95%以上被染成深红色(图 4a);用碘-碘化钾和 TTC 染色后,所观察的视野中紫荆的花粉粒均未染色(图 4b)。醋酸洋红染色结果与离体培养法得出的萌发率(88.46%)基本一致。所以,醋酸洋红染色法可以做为测定紫荆花粉的生活力的方法;而碘-碘化钾染色法和 TTC 染色法不能作为测定紫荆花粉生活力的方法。

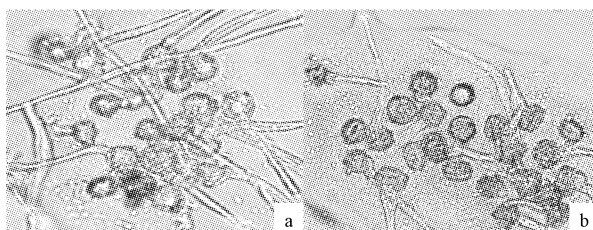


图3 花粉萌发照片

注:a.培养12 h;b.培养8 h。

Fig. 3 Photos of pollen germination

Note:a. Culture for 12 h;b. Culture for 8 h.

2.4 不同贮藏环境条件对紫荆花粉生活力的影响

由表3可知,干燥贮藏比不干燥贮藏花粉萌发率高,不同贮藏条件对花粉生活力有明显的影响,花粉萌发率随着贮藏时间的延长而下降。常温条件下,随着贮藏天数的增加花粉萌发率迅速降低,常温贮藏19 d后花

表3

不同贮藏环境和时间对花粉萌发的影响

Table 3

Effect of different store environment and time on the pollen germination

时间 Time/d	常温 Normal temperature/℃		4℃		-80℃	
	不干燥	干燥	不干燥	干燥	不干燥	干燥
1	62.13±0.68Ee	72.85±0.78BCb	74.27±0.97Bb	80.73±1.16Aa	65.61±0.38Dd	70.76±1.11Cc
4	46.89±0.80Ee	44.64±1.15Ff	54.58±0.65Cc	67.49±0.49Aa	52.04±1.04Dd	57.23±1.07Bb
8	12.18±0.32Ff	15.22±0.37Ee	42.50±0.50Bb	71.50±0.58Aa	39.85±1.20Cc	35.43±0.87Dd
13	1.87±0.27Ff	3.50±0.28Ee	35.53±0.58Cc	50.53±1.06Aa	28.39±0.85Dd	42.83±0.25Bb
19	0.00±0.00Dd	0.00±0.00Dd	14.40±0.56Bb	24.75±0.38Aa	12.31±0.96Cc	15.00±0.54Bb
26	0.00±0.00Cc	0.00±0.00Cc	0.00±0.00Cc	3.35±0.35Aa	0.00±0.00Cc	1.12±0.22Bb

3 讨论

植物花粉形态特征具有遗传性,它既具有科、属的共同特征,也常常具有种的特异性^[6],同属的植物花粉,其形态特征在许多方面表现了同一属的共同点。因此,新种的建立有时可以通过花粉的形态特征进一步证实,并在现代植物分类及古植物研究中日益受到重视^[6],但目前研究花粉形态与萌发状况的却很少。该试验通过扫描电镜观察花粉,发现其呈长球形,表面光滑,干瘪率低,这可能是萌发率较高的主要内因之一。

硼和渗透压调节剂是大多数植物的花粉萌发和生长花粉管必须的物质^[6]。一般认为,花粉中硼的含量不足,自然条件下这种不足是由柱头分泌物来补偿^[4]。而离体培养可模拟自然界中花粉萌发的柱头环境,为花粉的萌发提供条件。蔗糖对花粉的萌发具有两方面作用,一是为花粉的萌发及花粉管的生长提供营养,二是维持外界环境一定的渗透压。但蔗糖浓度过低或过高对紫荆花粉的萌发都会产生不良影响,浓度过低时花粉壁破裂、内容物散出,浓度过高会造成花粉的质壁分离抑制花粉萌发生长^[6]。该试验结果表明,在离体条件下,适宜的蔗糖和硼酸浓度可显著提高花粉的萌发率。最适合紫荆花粉萌发的培养基为15%蔗糖+0.004%硼酸+0.08%琼脂,萌发率最高达88.46%。

不同的染色法只适合某些植物花粉生活力的测

粉不再萌发;4℃干燥条件下贮藏26 d时花粉萌发率为3.35%, -80℃干燥条件下贮藏26 d时花粉萌发率为1.12%;而4℃不干燥和-80℃不干燥条件下贮藏26 d时花粉不再萌发。所以4℃干燥是花粉贮藏的适宜条件。

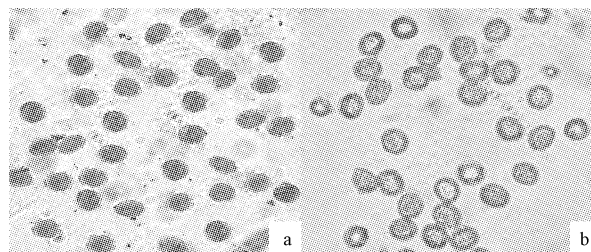


图4 花粉染色图片

注:a.醋酸洋红染色照片;b.碘-碘化钾染色照片。

Fig. 4 Dyeing pollen

Note:a. Photo of carmine acetate dyeing;b. Photo of I₂-KI dyeing.

定^[8]。该试验表明紫荆花粉有95%以上被醋酸洋红染成深红色,与离体培养花粉萌发率88.46%基本相同,故醋酸洋红染色法可以作为测定紫荆花粉生活力的简易手段。

花粉生活力的长短,一方面是由遗传因素所决定,另一方面也受环境因素的影响,影响花粉寿命的关键因子是花粉含水量和贮藏温度,低温、干燥处理是长期保存花粉的必要条件^[6]。采收的花粉贮藏前经过干燥处理后,花粉含水量降低,花粉细胞内部各种代谢活动减缓,从而在相同时间内花粉消耗的有机物质减少^[7],延长了花粉的贮藏寿命。花粉细胞在低温或超低温环境中,细胞内的自由水被固化,只剩下不能被利用的液态束缚水,酶促反应进行缓慢,新陈代谢不活跃,花粉细胞处于“休眠”状态^[8],花粉贮藏时间也随之延长。该试验表明,不同贮藏条件对花粉生活力有明显的影响,花粉萌发率随贮藏时间的延长而下降,温度过高或过低,对保持花粉的生活力都不利。紫荆花粉的最佳贮藏条件为4℃干燥。

参考文献

- [1] 庄雪影. 园林树木学[M]. 广州:华南理工大学出版社,2006.
- [2] 中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书[M]. 北京:中国农业出版社,1996.

应用正交设计优化甘薯叶绿原酸提取工艺研究

李 光¹, 余 霜²

(1. 安顺学院 农学院, 贵州 安顺 561000; 2. 安顺学院 资源与环境工程学院, 贵州 安顺 561000)

摘 要:以甘薯叶为试材,通过 5 因素 4 水平正交实验设计的方法,考察了不同酒精浓度、料液比、pH 值、提取次数、提取时间对甘薯叶绿原酸提取的影响。结果表明:影响绿原酸提取的主要因素为酒精浓度>提取次数>料液比>pH 值>提取时间;最佳提取工艺为 30%乙醇、料液比 1:20 g/mL、pH 5.0,提取 4 次,每次提取时间 90 min。验证试验提取获得的绿原酸含量为 3.517%,优于正交实验最佳提取获得的含量,表明该实验获得的最佳方案提取量稳定,提取效率高。

关键词:甘薯叶;绿原酸;提取工艺;正交设计

中图分类号:S 531 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0119-03

红薯属旋花科一年生或多年生蔓生草本植物,又称番薯、山芋、甘薯、地瓜等。红薯起源于墨西哥以及哥伦

比亚、厄瓜多尔到秘鲁一带的热带美洲,16 世纪末从南洋引入我国^[1]。在我国,红薯是仅次于水稻、小麦和玉米的第四大粮食作物。甘薯全身都可以被利用,甘薯块根可以被人们食用,根茎叶还是优良的饲料,营养价值极高,据中国预防医学科学院检测,甘薯茎叶与菠菜、胡萝卜等 14 种蔬菜相比,在 14 种营养成分中,甘薯茎叶的蛋白质、微量元素、维生素等 13 项指标均居首位^[2],尤为重要是甘薯茎叶提取物富含活性多糖和绿原酸类化

第一作者简介:李光(1980-),男,博士,副教授,研究方向为植物学及作物遗传育种。E-mail:lg20029@126.com.

基金项目:贵州省农业攻关资助项目(黔科合 NY 字[2010]3014);贵州省教育厅科技创新人才支持计划资助项目(黔教合 KY 字[2013]148)。

收稿日期:2014-01-17

[3] 赵统利,周翔,朱朋波,等.百合花粉生活力测定方法的比较研究[J].江苏农业科学,2006(5):143.

[4] 左丹丹,明军,刘春,等.植物花粉生活力检测技术进展[J].安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745.

[5] 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.

[6] 马书燕,郑亚军,凌燕,等.紫荆栽培管理技术[J].现代农业科技,2007(2):33.

[7] Shivanna K R, Linskens H F. Pollen vitality and pollen vigor[J]. Theor Appl Genet Springer Verlag, 1991, 81(1): 38-42.

[8] 金爱红,储立民,徐东青,等.钙对葱兰花粉萌发和花粉管生长的影响[J].湖北农业科学,2005(3):91-93.

[9] Akhond M A Y, Molla M A H, Islam M O, et al. Cross compatibility between *Abelmoschus esculentus* and *A. moschatus*[J]. Euphytica, 2000, 114(3):175-180.

Study on the Determination of *Cercis chinensis* Pollen Viability and Its Storage Method

LI Rong

(Henan Xinji Landscape Company, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: Taking fresh pollen of *Cercis chinensis* as material, pollen viability was tested by some methods including culture *in vitro*, I₂-KI staining, carmine acetate dyeing and TTC, in order to study characteristics of pollen germination and the suitable method of pollen storage. The results showed that culture media with different concentration of sucrose and boric acid had good effect on the pollen germination. The pollen germination rate reached 88.64% after cultured on the media supplemented with 15% sucrose, 0.004% boric acid and 0.08% agar. I₂-KI staining and TTC staining were not suitable for testing pollen viability of *Cercis chinensis*, carmine acetate dyeing could be used to test pollen viability of *Cercis chinensis*. Pollen vitality decreased as time gone on, 4°C dry storage was the best storage condition to keep the vitality of pollen. Pollen could be stored over 26 d with significant viability.

Key words: *Cercis chinensis* Bunge; pollen; germination; viability; pollen storage