

猕猴桃花粉生活力测定方法及花药处理方法研究

杨 红¹, 余和明², 李小艳¹, 冯莹莹¹

(1. 西昌学院 动物科学学院, 四川 西昌 615013; 2. 凉山州烟草公司 烟科所, 四川 西昌 615013)

摘 要:花粉生活力测定与花药前期处理对人工授粉有着至关重要的意义。现以中华猕猴桃为试材, 研究猕猴桃花粉生活力最佳的测定方法以及不同处理对花粉活力的影响。结果表明: TTC 染色法测定猕猴桃幼蕾期花粉生活力低, 而离体萌发法测定的花粉萌发率高, 建议在生产中最好采用染色法与离体萌发法综合测定花粉生活力; 花粉萌发率与花药脱离花瓣时间有关, 花蕾期花朵采摘后应立即分离雄蕊与花瓣, 以提高花粉萌发率; 花粉干燥与环境条件有关, 如环境已适宜干燥花粉, 建议不要采用其它辅助干燥花粉的方法。

关键词:猕猴桃; 花粉活力; 花粉萌发率; 染色法; 离体萌发法

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)08-0036-04

猕猴桃属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)植物, 为多年生大型木质藤本果树, 其具有特殊的外观, 独有的风味, 营养价值高, 素有“水果之王”之称。其鲜果维生素 C 含量是普通水果的几倍甚至几十倍, 并含有大量的维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 E 及多种矿物质、氨基酸, 是一种营养丰富、经济价值极高的水果, 目前正在被不断推广栽培^[1-2]。猕猴桃绝大多数为雌雄异株植物, 生产中需要严格配置授粉树, 雄株的配置以及雄株对后代性状的影响在生产及育种上至关重要。在实践中常因花期不遇、恶劣天气等原因致使仅依靠天然授粉很难获得优质高产的猕猴桃, 因此, 常辅助人工授粉^[3]。花粉活力对传粉受精起着关键作用。在实践中发现, 授精成功率除与花粉本身质量有关外, 还与花采集时间、雄蕊脱离花瓣时间、花粉贮藏条件等密切相关。有关对猕猴桃采粉期、花粉贮藏及离体萌发条件的研究较多^[4-9], 但并没有猕猴桃花粉活力测定方法比较及雄蕊脱离时间对花粉活力的影响等相关研究。因此, 该试验以中华猕猴桃雄株为试材, 探讨猕猴桃花粉生活力最佳的测定方法, 以及不同处理对花粉活力的影响, 以期对猕猴桃生产中花粉活力的检测以及花粉前期处理提供参考依据。

第一作者简介:杨红(1967-), 女, 硕士, 教授, 现主要从事生物学等研究工作。E-mail:657073699@qq.com.

基金项目:凉山州农业科技创新资助项目(5804); 四川省教育厅基金资助项目(10ZC038)。

收稿日期:2014-11-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试猕猴桃花朵采自课题组猕猴桃资源圃, 其建立在四川省西昌市普格县安哈镇。于开花盛期采集选择 3 株中华猕猴桃雄株样品, 用白色广口瓶(250 mL)盛装猕猴桃花朵, 再将样品瓶放进采样箱迅速带回实验室(约 2 h)。2014 年 3 月 20 日采集中华猕猴桃幼蕾期雄花 15 朵用于花粉生活力测定方法的试材, 3 月 25 日采集中华猕猴桃雄花幼蕾期 100 朵, 用于花药处理方法的试材。其中雄花不同发育期判断标准为幼蕾期(花直径 5~7 mm, 花瓣紧包)、大蕾期(花直径 6~8 mm, 有 1~3 片花瓣见展开迹象)、开花期(花开放, 露出雄蕊雌蕊, 花瓣完全展开)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 用于猕猴桃划分生活力的供试样品于 3 月 20 日采集, 室内用小镊子摘掉花瓣, 将雄蕊取下放置在垫有称量纸的培养皿中自然阴干(室内放置 1 d), 花粉干燥后将雄蕊分装在 3 个青霉素瓶, 再将青霉素瓶装在盛有一团湿润棉花的宽口广口瓶内, 放在 4℃冰箱中保存备用, 花粉生活力测定每次所取材料均为同一青霉素瓶。不同处理方法对花粉活力影响试验材料均为 3 月 25 日采集的中华猕猴桃雄花, 室内将采集样品按实验设计分组, 每处理 3 次重复, 花粉分离干燥保存方法如无特殊设计均同 3 月 20 日花粉采集处理方法, 花粉活力测定均采用已优化的花粉离体萌发法。

1.2.2 花药分离时间对花粉活力影响 试验材料为幼蕾期 50 朵, 设 3 个处理。A1: 采回后立即分离雄蕊与花

瓣;A2:采回后将花朵放在培养皿中待花朵自然开放后分离雄蕊与花瓣,约1~2 d;A3:花蕾采集后扦插在MS培养基中,在光照培养箱中使其开放后分离雄蕊与花瓣,约1 d。

1.2.3 干燥方法对花粉活力影响 试验材料为幼蕾期50朵,按1.2.2中A1处理方法,即采回后立即分离雄蕊与花瓣,然后放在垫有称量纸的培养皿中。设3个处理。B1:室内自然阴干(1 d);B2:白炽灯干燥(100 W、离样品1 m、1 d);B3:干燥器干燥(盛装CaCl₂、1 d)。

1.3 项目测定

1.3.1 染色法 采用氯化三苯四氮唑(TTC)染色法、碘-碘化钾(I₂-KI)、亚甲基蓝染色法3种染色法测定猕猴桃花粉活力。用小镊子取1个已干燥的花药,顺花药瓣裂方向将花粉点播在干洁的载玻片上,每张载玻片制2个样(2种染色法),然后加1滴染色剂,用牙签搅匀后盖上盖玻片。制片完成后镜检,其中I₂-KI染色法与亚甲基蓝染色法立即镜检,TTC染色法培养后再镜检,即将制好的片放在37℃光照培养,0.5 h后镜检。每种染色法制作8张片,每个样观察5个视野,统计花粉染色率。TTC染色法:TTC(2,3,5-三苯基氯化四氮唑)为Biosharp TTC(规格1 g),浓度0.5%,判断标准为凡被染成红色其生活力强,淡红生活力次之,无色的为没有生活力或不育花粉。I₂-KI染色法:KI 2 g,I₂ 1 g溶解于300 mL蒸馏水。配制时先用少量蒸馏水将KI完全溶解,然后加I₂搅拌,待其完全溶解后定溶至300 mL,放入棕色瓶备用。用原液染色,判断标准为花粉被染为蓝色为有活力,黄褐色或无色为没有生活力或不育花粉。亚甲基蓝染色法:0.1%亚甲基蓝。判断标准为花粉被染为蓝色为有活力,无色为没有生活力或不育花粉。

1.3.2 离体萌发法 将花粉播种在涂有培养基的载玻片上,然后将载玻片置于垫有双层湿润滤纸的培养皿中,放入光照培养箱培养,培养一定时间后镜检,统计萌发率,花粉管长度超过花粉粒直径1倍视为花粉萌发。萌发率为视眼中已萌发的花粉数/总花粉数×100%。经过培养基成分、涂抹方法、培养条件、花粉播种方法、镜检方法的优化,采用以下方法进行花粉离体萌发测定。离体萌发固体培养基配方:100 g/L蔗糖+100 mg/L硼酸+4.0 g/L琼脂,pH 6.5;涂抹方法:使用“L”型玻棒在载玻片上轻轻涂抹一层培养基,涂抹长度约2 cm,宽度为载玻片宽;培养条件:温度29℃,湿度80%~90%,光照培养箱中暗培养6 h;花粉播种方法:使用小镊子夹住花药,轻轻延载玻片长边顺次在培养基上点播花药;花粉镜检方法:选择第3、4、5次点样作为镜检样,每个样观察上下2个视眼,在10×4倍光学显微镜下观察。每

个处理制作5张。

1.3.3 不同花粉生活力测定方法比较 采用染色法与离体萌发法测定花粉活力,筛选出较适宜的方法。

1.4 数据分析

数据采用Excel与SPSS进行统计与分析,采用单因素ANOVA方差分析LSD检验。

2 结果与分析

2.1 不同花粉活力测定方法的比较

通过镜检发现,染色法测定猕猴桃花粉生活力效果并不理想,3种染色法测定的生活力差异较大。从图1可知,TTC染色法生活力为3.2%,I-KI染色法生活力为1.9%,亚甲基蓝染色法生活力为97.7%。TTC染色法与I-KI染色法染色时大多数花粉未被染色,多数染成略带黄色,不易辨别。且将染色液浓度升高(TTC)、染色液浓度降低(I-KI)、染色时间延长,染色效果均无明显变化。亚甲基蓝染色法测定的生活力很高,绝大多数花粉均染成蓝色。离体萌发法测定的花粉活力为80.0%,有花粉管生长且花粉管长度超过花粉粒直径1倍视为花粉萌发,其是否有生活力判断标准比染色法更直观。当培养条件、播种方法一致时,其重复率较高。因此,该试验不同处理对花粉活力的影响采用离体萌发法。

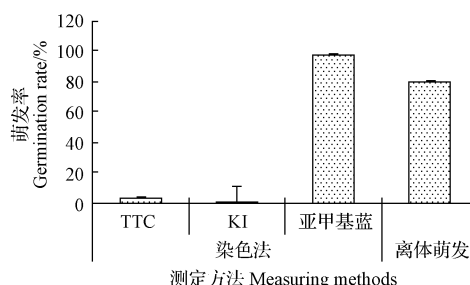


图1 不同花粉活力测定方法的比较

Fig.1 Comparison of different methods of pollen viability

2.2 花药分离时间对花粉活力的影响

从图2可以看出,花药从花瓣上分离时间不同,花粉活力差异较大。雄花采回后立即分离雄蕊与花瓣,花

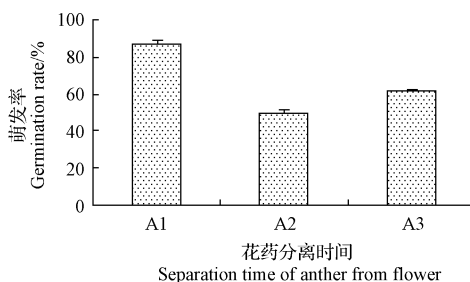


图2 花药分离时间对花粉活力的影响

Fig.2 Effect of separation time on pollen viability

粉活力最高,为 86.4%,而雄花采回后放在培养皿中待花朵自然开放后分离雄蕊与花瓣,花粉活力最低,为 49.5%。雄花离母株后在 MS 培养基中离体培养自然开放后分离雄蕊与花瓣,花粉活力为 61.6%。

2.3 不同干燥方法对花粉活力的影响

从图 3 可以看出,采用不同干燥方法干燥猕猴桃花粉,其花粉生活力有一定的差异。自然阴干花粉活力最高,为 80.8%,氯化钙干燥剂辅助干燥,其花粉活力最低,为 58.6%,白炽灯干燥的花粉生活力为 74.5%。

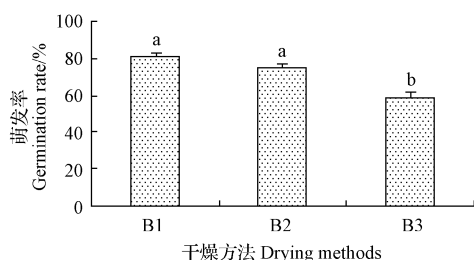


图 3 不同干燥方法对花粉活力的影响

Fig. 3 The effect of different treatments on pollen viability

3 讨论与结论

人工授粉前对花粉生活力进行准确快速鉴定对生产有着至关重要的意义。花粉生活力鉴定方法目前有 2 类,即染色法与离体萌发法。但染色法在实际应用中,常常会遇到一些问题,如染色时间不易掌握、染色结果不易判断等。离体萌发法判断花粉生活力的标准为观察是否有花粉管萌发,其更为直观,但需要摸索离体萌发的最佳培养条件。姚春潮等^[6]采用 TTC 染色法研究了不同干燥及贮藏方法对 6 个美味猕猴桃花粉活力的影响,表明猕猴桃大蕾期新鲜花粉活力在 70% 以上。陈永安等^[4]采用 TTC 染色法(4% 氯化三苯基四氯唑)研究了采粉期及贮藏条件对猕猴桃花粉生活力的影响,表明开花前 3 d,猕猴桃花粉生活力仅为 1.92%,开花前 1 d,花粉生活力达 69.11%,大蕾期花粉生活力达 82.31%。该试验采用了离体萌发法与 3 种染色法测定了猕猴桃幼蕾期花粉的生活力,结果发现,离体萌发法测定的生活力为 80.0%,而 TTC 染色法与 I₂-KI 染色法测定的生活力不到 5%,亚甲基蓝染色法测定的生活力为 97.7%。研究结果表明,亚甲基蓝染色法可能会造成假阳性,TTC 染色法与 I₂-KI 染色法可能不能真实测定花粉生活力。假如 TTC 染色法能真实反映猕猴桃花粉生活力,则 TTC 染色法测定的花粉生活力是否与花粉成熟度有关,离体萌发测定有生活力的幼蕾期花粉其授粉效率是否与所测的生活力相一致等还有待于进一步研究。

因此,在实际应用中,可以将 2 种方法有效结合,以减少花粉败育带来的不良后果。

另外,在离体萌发条件摸索中发现,培养基硬度、光照、培养时间、花粉密度等均会影响离体萌发测定结果。花粉离体萌发培养基硬度比植物组织培养基硬度要低;暗培养比光照培养更有利于猕猴桃花粉离体萌发;中华猕猴桃花粉离体萌发结果观察需 29℃ 暗培养 5~6 h,时间短花粉管未萌发,时间长,花粉管过长不易计数,另外,培养中不到规定时间不能将载玻片拿出培养环境,否则花粉不萌发;花粉密度会影响猕猴桃花粉萌发结果,因此建议在播种与观察花粉时方法要尽量保持一致。

研究结果还表明,花粉生活力还与雄蕊与花瓣脱离时间有关,花朵采摘后立即分离雄蕊与花瓣,花粉生活力最高,因此,在猕猴桃人工授粉时,建议分批授粉,即采摘一批雄花后,立即取下花粉,采用适合的工具尽快授粉,以提高花粉授粉率。

姚春潮等^[6]研究表明,采用灯照干燥法处理美味猕猴桃花粉,制取的花粉比自然阴干花粉生活力高,而该试验研究结果表明,自然阴干比灯光干燥、干燥剂辅助干燥效果好。原因之一可能为处理方法不同,姚春潮处理的灯光干燥距离较近,灯源仅在花药上方 10 cm,而该试验所采用的光源在花药上方约 1 m。原因之二可能由于自然阴干环境条件不同,该实验地在西昌,3、4 月气候温暖干燥,干燥过程中再辅助其它干燥因子,可能不能达到预想效果。因此,建议在不同的地区,因地制宜选取适合方法。

参考文献

- [1] 李文生,石磊,王宝刚,等. 不同颜色果肉猕猴桃营养品质的比较[J]. 食品科技,2012,37(7):47-52.
- [2] 艾应伟,范志金. 四川盆周山区发展特色优质猕猴桃的优势与对策[J]. 园艺园林科学,2005,21(11):259-261.
- [3] 陈学森,李杨,束怀瑞. 果树开花授粉生物学研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2000,31(3):345-348.
- [4] 陈永安,陈鑫,刘艳飞. 采粉期及贮藏条件对猕猴桃花粉生活力的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(8):157-160.
- [5] 陈延惠,李洪涛,朱道圩,等. 猕猴桃花粉生活力及其贮藏性的研究[J]. 河南农业大学学报,1996,30(2):175-177.
- [6] 姚春潮,龙周侠,刘旭峰,等. 不同干燥及贮藏方法对猕猴桃花粉活力的影响[J]. 北方园艺,2010(20):37-39.
- [7] 姚春潮,张朝红,刘旭峰,等. 猕猴桃花粉萌发动态及培养基成分对花粉萌发的影响[J]. 中国南方果树,2005,34(2):50-51.
- [8] 李平,张朝红,艾绍周,等. 猕猴桃花粉萌发的影响因子[J]. 北方果树,2007(1):5-7.
- [9] 齐秀娟,张绍铃,方金豹. 培养环境条件对猕猴桃花粉萌发的影响[J]. 浙江农业学报,2011,23(3):528-532.

根际低氧胁迫对水培番茄过氧化氢酶活性的影响

樊 严

(锦州农业科学院,辽宁 锦州 121017)

摘 要:为了促进水培番茄技术大面积推广,解决水培番茄栽培中根际低氧问题,试验以 10 个水培番茄品种为试材,研究了根际低氧处理对水培番茄过氧化氢酶(CAT)活性的影响。结果表明:在 30 d 的根际低氧处理过程中,根际低氧胁迫先激活了 CAT 活性,随着低氧时间的增加 CAT 活性逐渐降低;不同水培番茄品种 CAT 活性降低的程度不同;在根际低氧条件下 CAT 活性较强的番茄品种为“紫玫瑰”,酶活性较弱品种为“黄珍珠”。

关键词:根际低氧;番茄;过氧化氢酶

中图分类号:S 641.204⁺.7 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)08-0039-03

番茄是世界性的重要蔬菜,营养价值高,也是营养液栽培即水培中广泛应用的重要蔬菜之一。在营养液栽培过程中番茄经常面临根际低氧逆境。番茄如果营养液长期供氧不足会直接造成根系生长不良,从而影响产量。番茄根长期浸在缺氧营养液中非常容易腐烂^[1]。很多学者在不同的果蔬上进行了根系低氧逆境的研究,但关于水培番茄根际低氧逆境的研究很少。

研究表明植物在低氧胁迫条件下,体内会产生超氧自由基。植物体内在胁迫条件下的保护机制就是对活性氧的清除。植物在低氧胁迫逆境下会通过一系列的

生理生化代谢反应,来适应或缓解低氧胁迫所带来的伤害^[2]。在低氧胁迫下植物体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等酶活性增加^[3],致使活性氧数量增多,大量的积累^[4]。植物体的细胞内存在着多种抗氧化的分子和抗氧化酶,它们组成了植物体的抗氧化系统,这个系统可以使植物正常生理代谢产生的活性氧控制在一定水平从而使得植物不会受到活性氧的伤害。植物体内的抗氧化系统对植物维持正常生长发育起到了非常重要的作用^[5]。

抗氧化酶系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等。所有植物细胞中都存在过氧化氢酶(CAT),它可以将过氧化氢迅速分解为 H₂O 和 O₂。细胞中大部分的过氧化氢由 CAT 清除。该研究对 10 个番茄品种在根际低氧处理 30 d 内 CAT 活性进行分析,

作者简介:樊严(1975-),女,硕士,高级农艺师,现主要从事设施园艺栽培等研究工作。E-mail:fanyandd@126.com.

收稿日期:2014-11-10

Study on the Method of Measuring Pollen Viability and Pretreatment of Pollen

YANG Hong¹, YU He-ming², LI Xiao-yan¹, FENG Ying-ying¹

(1. College of Animal Science, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013; 2. Tobacco Scientific Research Institute, Tobacco Company of Liangshan, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: Method of measuring pollen viability and pretreatment of pollen have very important significance for artificial pollination. Taking *Actinidia chinensis* as materials, the best way of measuring pollen viability and the effect of different treatments were studied. The results showed that, for pollen of flower bud, the method of TTC, the pollen viability was low, and the method of germination *in vitro* and the pollen viability was high. So, the best way of measuring pollen viability was methods of staining and germination. The rate of pollen germination was associated with the time, and for flower bud, the best way was separation of stamens and petals immediately for improving the rate of pollen germination; Pollen drying was associated with environmental condition, if the environment was suitable for drying pollen, it didn't need to use other drying methods.

Keywords: *Actinidia chinensis*; pollen viability; pollen germination; staining; germination *in vitro*