

“素心”蜡梅花粉生活力及贮藏力的研究*

杨 姗¹, 张家瑞¹, 秦 垚², 马 婧¹, 李名扬¹, 李志能¹

(1. 西南大学 园艺园林学院 重庆市花卉工程技术研究中心 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 澳门科技大学 商学院, 澳门 519020)

摘要:采用离体萌发法,研究不同的培养基对成年株“素心”蜡梅(*Chimonanthus praecox*)花粉萌发的作用,并探讨不同干燥时间及贮藏条件对花粉生活力的影响。结果表明,干燥4 h的花粉在10%蔗糖+75 mg·L⁻¹ H₃BO₃+0.1% CaCl₂+50 mg·L⁻¹ GA₃的培养基上培养4 h后萌发率最高,并且干燥4 h后的花粉贮藏2 d后生活力下降明显,在-20℃条件下贮藏6 d后花粉萌发率明显高于4℃和20℃贮藏的花粉,第8 d后3种贮藏条件下的花粉萌发率均不到1%。研究结果可为测定和分析蜡梅花粉生活力提供一定的参考,也为蜡梅储存指出了方向。

关键词:蜡梅;花粉;生活力;贮藏力

中图分类号:S685.99

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2016)02-0134-04

蜡梅(*Chimonanthus praecox*)为蜡梅科(Calycanthaceae)蜡梅属(*Chimonanthus*)落叶灌木,别名腊梅、黄梅、黄梅花;又因蜡梅花入冬初放,冬尽而结实,伴着冬天,故又名冬梅。蜡梅是中国特产的传统名贵观赏花木,有着悠久的种植历史,是国家二级濒危植物之一^[1]。近些年来,对蜡梅的研究主要集中在蜡梅遗传多样性、抗逆分子生物学、种质资源、分类及分布等方面^[2-4]。有关蜡梅花粉生活力的研究已有初步报道^[1],但是有关添加了赤霉素(GA)等激素的培养基对蜡梅花粉生活力的影响还未见报道。花粉生活力测定的方法主要有染色法、显微镜形态观测法、离体萌发法^[7]。目前,测定蜡梅花粉生活力的方法有:联苯胺染色法^[1]、离体萌发法^[1,9-10]、氯化三苯基四氮唑(TTC)法和无机酸法^[10]等,其中离体萌发法耗时较长,但能有效地检测蜡梅花粉的生活力,测定结果也比较精确可靠^[8]。

鉴于上述背景,本研究采用离体萌发法来测定蜡梅花粉的生活力,研究适合蜡梅花粉萌发的培养基类型及不同贮藏条件、贮藏时间对蜡梅花粉生活力的影响,探讨蜡梅花粉适宜的贮藏条件,这对蜡梅基因库的保持、育种操作及遗传改良等具有重要意义。

1 材料与方法

供试材料为重庆西南大学南区校园内的自然越冬的“素心”蜡梅,选择其中生长健壮的枝条带回室内,收集花粉等待检测。

1.1 离体萌发最佳培养基筛选

采用单因素控制法筛选最佳培养基。首先确定其中蔗糖和 H₃BO₃ 含量,配制以下培养基:1) 5%蔗糖+10 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 2) 5%蔗糖+50 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 3) 5%蔗糖+75 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 4) 10%蔗糖+10 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 5) 10%蔗糖+50 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 6) 10%蔗糖+75 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 7) 15%蔗糖+10 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 8) 15%蔗糖+50 mg·L⁻¹ H₃BO₃; 9) 15%蔗糖+75 mg·L⁻¹ H₃BO₃。然后,选择蜡梅花朵,用镊子取下正在散粉的花粉,将取下的花粉混合均匀后散布到上述不同的培养基上,置于22℃环境下培养2~4 h,取出镜检。镜检时每个培养基取5个视野,平均每个视野不低于200粒花粉,把花粉管的长度大于或等于花粉的直径作为花粉萌发的标准^[11-12],统计数据并计算出萌发率,重复7次后计算平均值。最后,根据9组培养基的萌发率确定蔗糖和 H₃BO₃ 的最佳配比,并在此基础上分别加入不同含量的 CaCl₂ (0.1%, 0.5%, 1.5%),

* 收稿日期:2015-09-09 修回日期:2015-10-17 网络出版时间:2016-1-20 21:26

资助项目:国家级大学生创新创业训练计划(No. 201410635065);重庆市教委中小学创新人才培养工程(No. CY150210);西南大学第七届本科
生科技创新基金(No. 1319002);西南大学人才引进项目(No. SWU113030);中央高校基本业务费(No. XDJK2014B025;
No. 2362014xk10)

作者简介:杨姗,女,研究方向为蜡梅花粉生活力,E-mail:850762681@qq.com;通信作者:李志能,副教授,E-mail:550208720@qq.com

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20160120.2126.022.html

采用上述方法测定蜡梅花粉的生活力,得出 CaCl_2 的最佳添加量。在最佳的蔗糖、 H_3BO_3 和 CaCl_2 含量配比培养基中,再分别加入不同含量的 GA_3 ($25, 50, 75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),也采用同样的方法测定蜡梅花粉的生活力,得出 GA_3 的最佳添加量。

1.2 花粉保存的最佳干燥时间的确立

采用相同的蜡梅花粉源,选择盛花期即将散粉的蜡梅拿到室内培养,将花药用镊子摘下,收集于硫酸纸上,于 22°C 温室下培养 3 h,等待花药散粉后混合均匀。用硅胶干燥剂在 4°C 低温环境下干燥,于干燥后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 h 使用本研究确立的最佳培养基测定花粉生活力,得出最佳干燥时间。

1.3 花粉储藏的最佳温度和时间的确立

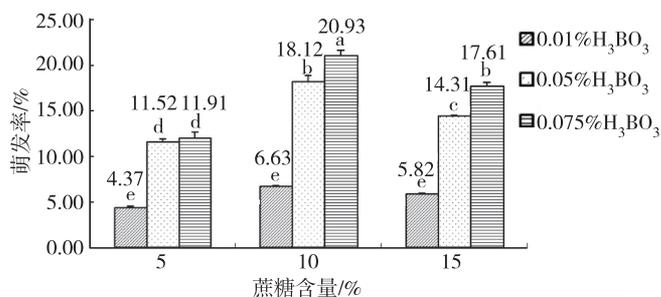
采用同一地区生长情况相近的蜡梅花作为花粉源,用同样的方法干燥(干燥时间为得出的最佳干燥时间),再平均分成 3 份,分别储存在 $22, 4, -20^\circ\text{C}$ 的条件下,每 2 d 取出一定量花粉,测定花粉生活力。

2 结果与分析

2.1 花粉离体萌发最佳培养基

2.1.1 蔗糖和 H_3BO_3 的含量对蜡梅花粉萌发率的影响 实验结果表明,相同蔗糖含量条件下,蜡梅花粉萌发率随着 H_3BO_3 含量的增加而增加。相同 H_3BO_3 含量条件下,分别添加了 5%、10% 和 15% 蔗糖的培养基,花粉萌发率先升高后降低。 H_3BO_3 含量为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,添加了 15% 蔗糖的花粉萌发率高于添加 5% 蔗糖的花粉萌发率,蔗糖含量为 10% 时,萌发率最高,达到 20.93% (图 1)。而在左丹丹等人的研究中,蔗糖含量为 10% 时花粉萌发率低于蔗糖含量为 15% 时的花粉萌发率^[1],这种差异可能来源于环境的影响。蔗糖为植物的各项生理活动提供能量,不同植物对蔗糖等的需求量不一样,山楂、葡萄、石榴、樱桃、李在含有 10% 蔗糖的培养基中花粉萌发率最高,而 15% 的蔗糖将会抑制樱桃、李的花粉萌发^[13]。

2.1.2 不同 CaCl_2 含量对蜡梅花粉萌发率的影响 从图 2 中可以看出,在 10% 蔗糖 + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ 培养基的基础上,少量的 CaCl_2 会提高蜡梅花粉的萌发率。0.01% CaCl_2 能够促进蜡梅花粉的萌发,萌发率最高达 19.96%; 0.05% CaCl_2 促进蜡梅花粉的萌发的效果开始减弱; 0.15% CaCl_2 则抑制花粉萌发。总的看来 CaCl_2 含量越高,它对花粉萌发的抑制就越显著 ($p < 0.05$)。在左丹丹等人的研究中,少量的 CaCl_2 对蜡梅花粉的萌发有促进作用,在 0.05% 时达到最高的萌发率,为 20.538%^[1]。本研究得出的结果与上述结果不尽一致——由于左丹丹等人所采用的蜡梅花粉取自中国农业科学院,这与本文材料来源在地理环境、温度、光照等方面有所差异,由此可能导致最终结果的不一致。



注:不同小写和大写字母分别表示经 Duncan 法多重比较后差异显著 ($p < 0.05$) 和极显著 ($p < 0.01$), 下同。

图 1 蔗糖和 H_3BO_3 的含量对花粉萌发率的影响

Fig. 1 The effect of the content of sucrose and H_3BO_3 on germination of pollens

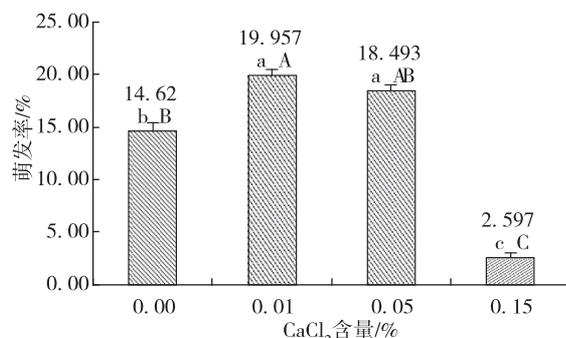


图 2 不同 CaCl_2 含量对花粉萌发率的影响

Fig. 2 The effect of different CaCl_2 content on pollens germination rates

2.1.3 不同 GA_3 含量对蜡梅花粉萌发率的影响 实验结果表明, GA_3 在有 CaCl_2 的条件下对蜡梅花粉的萌发能够起明显的促进作用。在 10% 蔗糖 + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + 0.01% CaCl_2 的培养基中加入不同含量的 GA_3 可以明显提高蜡梅花粉的萌发率,与不加 GA_3 的培养基相比,添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的培养基上蜡梅花粉萌发率高达 26.70%,而 GA_3 的含量超过 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,这一促进作用逐渐减弱(图 3)。但是,在本研究范围内没有出现 GA_3 抑制花粉萌发的情况。

2.2 最佳干燥时间对蜡梅花粉保存的影响

从图 4 可见,蜡梅花粉的萌发率随着干燥时间的延长呈现先升后降趋势,干燥 4 h 的花粉萌发率达到最高,

萌发率为 18.25%；然后呈下降趋势。因此 4 h 为本研究得出的最佳干燥时间。然而左丹丹等人^[1]得出的结论为 12 h，而本实验中干燥 12 h 后花粉萌发率明显降低，这可能与上述研究中干燥方法、气候环境和取样时间的差异有关。理论上说，花粉内含水量越少，各项生理活动都会降低，但是含水量过低则会影响其他生理因素，从而影响花粉的萌发率。

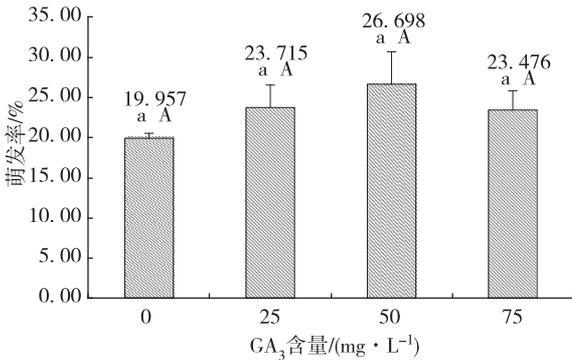


图 3 不同 GA₃ 含量对花粉萌发率的影响

Fig. 3 The effect of different GA₃ content on pollens germination rates

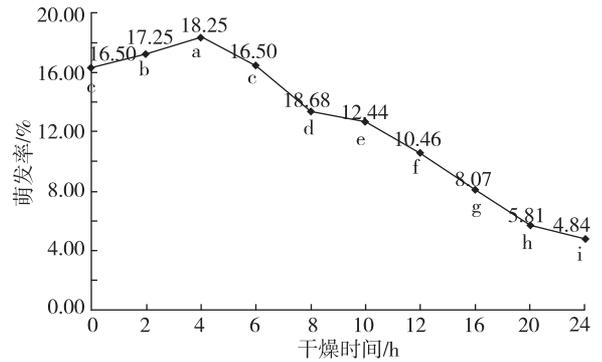


图 4 花粉保存的最佳干燥时间

Fig. 4 The best drying time of pollen

2.3 花粉最佳储藏温度和时间

从图 5 可知。在 -20 °C 下储存的花粉萌发率最高，20 °C 下储存的花粉萌发率最低。3 种储藏温度下花粉萌发率都呈现逐渐下降的趋势，在前 2 d 内该趋势尤为明显，从第 2 d 开始，该趋势放缓，并逐渐维持在较低的水平。到第 8 d 时，3 种储藏温度下花粉萌发率极低，均在 1% 以下。理论上保存温度越高，花粉内部的生理活动越旺盛，消耗的能量就越多，从而使得萌发率降低，本研究结果基本与之相符。但是在左丹丹等人的研究中，蜡梅花粉在 20 °C 环境下保存 30 d 仍然有 6% 的萌发率^[1]，这可能与取材时间、干燥方法、花粉的生理状态、南北方的湿润度差异等因素有关。

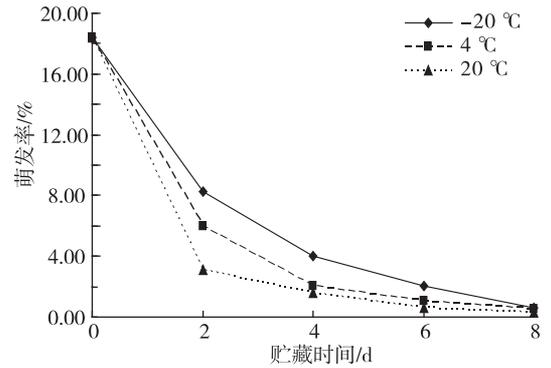


图 5 不同储藏温度对花粉生活力的影响

Fig. 5 The effect of different storage temperatures on pollen germination rates

3 讨论与结论

3.1 培养基成分对花粉生活力的影响

通过离体萌发的方法测定不同含量的蔗糖、H₃BO₃、CaCl₂、GA₃对“素心”蜡梅花粉生活力的影响，得出蜡梅花粉萌发的最适培养基组成是为 10% 蔗糖 + 75 mg·L⁻¹ H₃BO₃ + 0.1% CaCl₂ + 50 mg·L⁻¹ GA₃。离体培养中 H₃BO₃ 和蔗糖是培养基中重要的成分，其中蔗糖可以维持花粉和培养液的渗透平衡，也是花粉萌发的营养来源。不同植物花粉萌发最适宜的蔗糖含量并不相同，本研究中 10% 的蔗糖含量可以较好的促进蜡梅花粉的萌发。不同植物花粉萌发适宜的 H₃BO₃ 含量也不同，本研究中 75 mg·L⁻¹ 的 H₃BO₃ 能更好的促进蜡梅花粉萌发。本研究也发现，CaCl₂ 与 GA₃ 在蜡梅花粉的萌发中也具有一定的促进作用，但过量 CaCl₂ 会抑制蜡梅花粉的萌发；在研究范围内，未见 GA₃ 抑制花粉萌发的情况出现。

3.2 储藏条件对花粉生活力的影响

通过对不同干燥时间、储藏时间以及储藏温度对蜡梅花粉生活力影响的研究后，结果表明，用硅胶干燥剂干燥 4 h 的蜡梅花粉生活力最好，萌发率可达 18.25%；蜡梅花粉的生活力随着储藏时间的增加而下降，在 -20 °C 环境下保存的蜡梅花粉的生活力最高。在条件允许的情况下，一般而言，温度越低越适宜于花粉的储存，可能是由于低温减弱了花粉的呼吸作用，减少了营养物质的消耗。

参考文献:

[1] 左丹丹, 明军, 刘春, 等. 蜡梅储藏花粉的生活力测定[C]// 2007 年中国园艺学会观赏园艺专业委员会年会论文集. 南

京: 出版者不详, 2007: 151-155.

Zuo D D, Ming J, Liu C, et al. Pollen viability test of Chi-

- monanthus praecox* [C]//Proceedings of the 2007 annual conference of the Chinese horticultural society ornamental horticulture professional committee. Nanjing: [s. n.], 2007: 151-155.
- [2] 鲁涤非,陈龙清. 蜡梅科研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(2): 124-128.
- Lu D F, Chen L Q. Research in Calycanthaceae[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1999, 21(2): 124-128.
- [3] 赵冰,张启翔. 蜡梅种质资源表型多样性[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(5): 10-16.
- Zhao B, Zhang Q X. Phenotypic of *Chimonanthus praecox* germplasm[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2007, 35(5): 10-16.
- [4] 马婧,刘群,王晓斌,等. 2个蜡梅 *nsLTP* 基因启动子的克隆及其在烟草中的瞬时表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 601-608.
- Ma J, Liu Q, Wang X B, et al. Cloning and transient expression assay of two *nsLTP* gene promoters from *Chimonanthus praecox* in tobacco[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(4): 601-608.
- [5] 明军,廖卉荣. 蜡梅科植物种质资源研究文献分析[J]. 北京林业大学学报, 2004, 3(3): 60-66.
- Ming J, Liao H R. Literatures analysis and research advances on Calycanthaceae[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2004, 3(3): 60-66.
- [6] 张若蕙,沈湘林. 蜡梅科的分类及地理分布与演化[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(2): 7-11.
- Zhang R H, Shen X L. Taxonomy geographical distribution and evolution of Calycanthaceae[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1999, 21(2): 7-11.
- [7] 邢世岩,有祥亮,李可贵,等. 银杏雄株开花生物学特性的研究[J]. 林业科学, 1998, 34(3): 51-58.
- Xing S Y, You X L, Li K G, et al. Studies on the biological feature of flowering of in *Ginkgo biloba* male trees[J]. Forest Science, 1998, 34(3): 51-58.
- [8] 潘瑞焯. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 176-179.
- Pan R Z. Plant physiology[M]. Beijing Higher Education Press, 2008: 176-179.
- [9] 周莉花,郝日明,吴建忠. 蜡梅传粉生物学研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 323-327.
- Zhou L H, Hao R M, Wu J Z. The pollination biology of *Chimonanthus praecox* (L.) link (Calycanthaceae) [J]. Journal of Horticulture, 2006, 33(2): 323-327.
- [10] 周莉花,郝日明,赵宏波. 蜡梅花粉活力检测方法及保存时间观察[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(3): 270-274.
- Zhou L H, Hao R M, Zhao H B. Pollen viability test of *Chimonanthus praecox* [J]. Journal of Zhejiang Forestry University, 2006, 23(3): 270-274.
- [11] 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.
- Zuo D D, Ming J, Liu C, et al. Advance in technique of plant pollen viability [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(16): 4742-4745.
- [12] 周莉,代力民,徐杰. 丁香花粉生命力及贮藏力的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34(1): 16-19.
- Zhou L, Dai L M, Xu J. Vitality and storage capacity of *syringa* pollen[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2003, 34(1): 16-19.
- [13] 李桂云,顾景梅,王峰. 不同培养基对果树花粉发芽率影响的试验[J]. 山西果树, 2001, 83(1): 3-5.
- Li G Y, Gu J M, Wang F. Effects of different medium on germination rate of fruit trees[J]. Shanxi Fruits, 2001, 83(1): 3-5.

Studies on the Pollen Vitality and Storage Capacity in *Chimonanthus praecox*

YANG Shan¹, ZHANG Jiarui¹, Qin Yao², MA Jing¹, LI Mingyang¹, LI Zhineng¹

(1. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions (Ministry of Education),

Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, College of Horticulture and Landscape, Southwest University,

Chongqing 400715; 2. Colledge of Business, Macau University of Science and Technology, Macau 519020, China)

Abstract: By the means of germination *in vitro*, the effects of different culture media, preservation condition and drying time on the germination of pollens in *Chimonanthus praecox* 'Luteus' were studied. The results showed that the pollen dried for 4 hours and then incubated 4 hours on the medium, which is composed of 10% sucrose + 75 mg · L⁻¹ H₃BO₃ + 0.1% CaCl₂ + 50 mg · L⁻¹ GA₃, reached the highest germination rate. Storing for two days, the vitality of pollen dried for 4 hours shows extinct descent. The germination rate of pollen stored at -20 °C for 6 days was higher than that of at 4 °C and 20 °C, respectively. The vitality of the pollen stored for 8 days is less than 1%. The results can provide a reference for the measurement and analysis of pollen viability, the orientation of pollen preservation in future is also suggested.

Key words: *Chimonanthus praecox*; pollen; vitality; the storage capacity