

木瓜花粉生活力测定及储藏特性

管雨¹, 贾文庆², 刘会超², 张智俊¹

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 以木瓜 *Chaenomeles sinensis* 新鲜花粉为试材, 通过培养基萌发试验法、氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法、碘-碘化钾(I-KI)染色法对花粉生活力进行测定, 并研究了不同储藏条件及时间对木瓜花粉萌发的影响。结果表明: 木瓜花粉萌发的最佳培养基为 100 mg·L⁻¹蔗糖+30 mg·L⁻¹硼酸+8 g·L⁻¹琼脂, 萌发率达 75.09%; TTC 染色法的染色率为 60.64%, 适宜作为木瓜花粉生活力的测定; I-KI 染色法的染色率仅为 17.94%, 不宜于其生活力的测定; 适宜木瓜花粉储藏的条件依次为-80 ℃, 4 ℃, -23 ℃和常温; 花粉在-80 ℃储藏 16 d 后, 花粉萌发率仍达到 22.9%。图 2 表 2 参 10

关键词: 植物学; 木瓜; 花粉; 生活力; 储藏条件

中图分类号: S718.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2012)05-0790-05

Pollen viability and storage of *Chaenomeles sinensis*

GUAN Yu¹, JIA Wen-qing², LIU Hui-chao², ZHANG Zhi-jun¹

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China)

Abstract: To determine the pollen viability of *Chaenomeles sinensis*, methods of culture medium, iodine/potassium iodide solution (I-KI) staining and 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining were used to determine the pollen germination. Effects on pollen germination for different storage types and time were also studied. Results showed that the best culture medium was 100 mg·L⁻¹ sucrose + 30 mg·L⁻¹ boric acid + 8 g·L⁻¹ agar, with the germination rate reaching 75.1%. For pollen viability, TTC staining with a germination rate of 60.6% was suitable; however, I-KI staining with germination rate of only 17.9% was not suitable. The best storage temperatures, in turn, were -80 ℃, 4 ℃, -23 ℃ and room temperature. At -80 ℃, the germination rate of pollen was 22.9% when it was preserved for 16 days. [Ch, 2 fig. 2 tab. 10 ref.]

Key words: botany; *Chaenomeles sinensis*; pollen; viability; storage conditions

木瓜 *Chaenomeles sinensis* 为蔷薇科 Rosaceae 木瓜属 *Chaenomeles* 落叶小乔木, 是优良的观花、观果、观树皮树种, 其果实可供食用、药用, 素有“百益之果”“万寿瓜”之雅称。近年来, 木瓜的美容护肤作用逐渐受到化妆品行业的重视, 利用木瓜果实加工罐头、果脯、果汁等保健食品更是方兴未艾。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着细胞学试验和杂交育种的成败^[1]。花粉生活力的强弱受遗传因素和环境因素的影响, 也是人工辅助授粉成败的关键。花粉萌发率虽不能完全等同于其生活力, 但在杂交育种实践中多以花粉萌发率来表示其生活力^[2-3]。花粉生活力的

收稿日期: 2011-09-15; 修回日期: 2011-11-26

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y307469); 浙江省现代森林培育技术重点实验室开放基金资助项目(200605)

作者简介: 管雨, 硕士, 从事植物生理、分子生物学研究。E-mail: guanyu3650@yahoo.cn。通信作者: 张智俊, 副教授, 博士, 从事植物分子生物学、生物信息学研究。E-mail: csfuzj@yahoo.com.cn

测定是保证花粉质量的重要途径，对花粉的储藏有着十分重要的意义。国内外对木瓜的研究主要集中在药用、栽培和加工技术。关于木瓜花粉生活力的研究尚未见报道。本研究通过培养基萌发法、染色法，对不同储藏条件下木瓜花粉生活力进行了研究，以期为木瓜的生产、遗传育种、基因库的保存提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料的采集与处理

试验材料取自河南科技学院绿化区 15 年生木瓜。于 2011 年 4 月 12 日木瓜盛花期采集树冠外围健壮枝条上含苞待放的花蕾，带回实验室后用镊子剥取花药，剔除破裂或带花丝的花药，放在培养皿中，置于 (25 ± 1) °C 的培养箱内培养 2 h 后，收集花粉备用。

1.2 培养基萌发试验法

1.2.1 花粉萌发最适培养基的确定 采用二因子完全随机试验，蔗糖质量浓度为 0, 50, 100, 150, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，硼酸质量浓度为 0, 10, 20, 30, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，琼脂 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别取 2 滴已配置好的培养基于凹玻片凹槽内，待冷却后将木瓜花粉均匀撒播在固体培养基上，然后将玻片放在有湿滤纸的培养皿中，盖上皿盖，放入 (25 ± 1) °C 培养箱内培养。在同一时间内，观察统计木瓜花粉的萌发率。处理重复 5 次，各重复镜检 3 个视野(花粉数 ≥ 50 粒 \cdot 视野 $^{-1}$)，花粉萌发以其花粉管长度超过花粉直径为标准。花粉萌发率(%)=(萌发花粉数/总花粉数) $\times 100\%$ 。

1.2.2 花粉萌发最佳观察时间的确定 配制由 2.1.1 筛选出的花粉萌发最佳培养基，酸碱度调至 pH 5.6~5.8。采用 1.2.1 所述方法进行播种，培养，观察统计花粉萌发率。培养时间分别设为 2, 4, 6, 8, 10 h。

1.3 碘-碘化钾(I-KI)染色法

称取碘化钾 2 g，溶解于 7 mL 的蒸馏水中，再加入 1 g 碘，待全部溶解后，用蒸馏水定溶至 100 mL，配置成 I-KI 溶液，置于 4 °C 冰箱内以备待用。然后用经过乙醇棉球消毒的发丝蘸取少量花粉放于载玻片的凹槽内，加水 1 滴，使花粉散开，再加 1 滴 I-KI 溶液，静置 3~4 min 后，在显微镜下观察。根据淀粉遇碘变蓝的特性，从蓝色的深浅程度来判断花粉中淀粉含量的多少。观察时，每个凹槽取 3 个视野，计算有生活力花粉所占的百分率。凡被染红色花粉活力强，淡红次之，无色者为没有活力或不育花粉，统计花粉的染色率，以染色率表示花粉活力。

1.4 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法

称取 0.25 g TTC 放入烧杯中，加入少许体积分数为 95%乙醇使其溶解，用蒸馏水稀释至 50 mL，制成体积分数为 0.5% TTC 溶液，置于 4 °C 冰箱中以备待用，方法同 I-KI 染色法。花粉粒凡被染成红色的为有生活力，否则为无生活力或是花粉败育。

1.5 不同储藏条件对木瓜花粉萌发的影响试验

花粉储藏条件试验：花粉采集阴干后，装入 35 支 2 mL 离心管分别储藏于以下环境：A 为常温，B 为常温+干燥剂，C 为 4 °C 储藏，D 为 -23 °C 储藏，E 为 -80 °C 储藏。8 支处理，各次测定分别取出 2 支。储藏 8, 16, 24, 32 d 后，按照在 1.2.2 确定的最佳培养基培养时间观察统计花粉萌发率，直到视野中很难找到萌发的花粉时停止观察。花粉耐储藏力是以待测花粉活力保持时间即待测样自收集到花粉活力降为 0 的时间长度来表示。

2 结果与分析

2.1 培养基萌发试验法

2.1.1 花粉萌发最适培养基(含蔗糖和硼酸)的确定 表 1 表明：蔗糖质量浓度 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 差异达到了显著水平，其他质量浓度差异不显著，100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最好；硼酸质量浓度 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 差异达到了显著水平，其他浓度差异不显著，30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最好。对照处理 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸萌发率最低。蔗糖质量浓度相等的条件下，木瓜花粉在 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸培养基的萌发率约是 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸培养基的 2.5 倍。同理，硼酸质量浓度相等的条件下，木瓜花粉在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖上的萌发率约是在含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖培养基上的 3.6 倍。用 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖分别与 20, 30, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼酸测

定的花粉萌发率分别是 26.54%，75.09%和 35.65%，木瓜花粉在 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸的培养基上萌发率最高，因此， $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸是最佳组合的培养基。

表 1 木瓜花粉在完全随机试验中的萌发率

Table 1 Germination rate of pollen of *Chaenomeles sinensis* in completely randomized trials

| 硼酸/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 不同蔗糖质量浓度的萌发率/% | | | | |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 0 | 1.88 ± 0.57 Ml | 4.85 ± 1.08 LMI | 5.95 ± 0.75 Kl | 7.12 ± 0.66 Kk | 7.69 ± 0.88 Kj |
| 10 | 5.59 ± 0.59 Kl | 16.67 ± 0.70 Hh | 20.62 ± 0.53 Gg | 19.16 ± 0.94 Gh | 21.68 ± 0.74 Gg |
| 20 | 7.78 ± 1.03 Kj | 19.56 ± 0.99 Gh | 26.54 ± 0.55 Ff | 31.75 ± 0.54 Ee | 32.56 ± 0.63 Dd |
| 30 | 13.35 ± 1.04 li | 20.56 ± 1.01 Gh | 75.09 ± 0.65 Aa | 44.36 ± 0.04 Bb | 40.35 ± 1.04 Bb |
| 40 | 12.38 ± 1.58 li | 15.68 ± 1.03 Cc | 35.65 ± 0.33 Cc | 38.23 ± 0.67 Bc | 41.56 ± 0.32 Bb |

说明：小写英文字母表示在 $F_{0.05}$ 水平上的差异显著性，大写英文字母表示在 $F_{0.01}$ 水平上的差异显著性。

2.1.2 花粉萌发最佳观察时间的确定 木瓜花粉在不同时间的萌发率是有差异的。图 1 表明：在培养箱中放置 2~6 h，随着时间的延长花粉萌发率逐步提高，6 h 的木瓜花粉萌发率达到最高，为 72.27%，8 h 后观察结果与 10 h 相近，花粉的萌发率趋于平稳，说明 6 h 时有生活力的花粉已萌发完毕，不再随着时间的延长而萌发，故随后的试验均在培养 6 h 后统计花粉生活力。

2.2 碘-碘化钾(I-KI)染色法

多数植物正常的成熟花粉粒积累有较多的淀粉，I-KI 溶液可将其染成蓝色。观察发现：利用 I-KI 染色法测定木瓜花粉的生活力，花粉细胞出现了蓝色 (17.94%) 和黄褐色 (82.06%) 2 种颜色反应，而且随时间的变化波动不大，与培养基萌发最高萌发率达 75.09% 相比，差距较大。I-KI 染色法不能真实体现木瓜花粉的生活力可能是由于木瓜花粉细胞淀粉含量低造成的，所以不适合木瓜花粉生活力的测定。

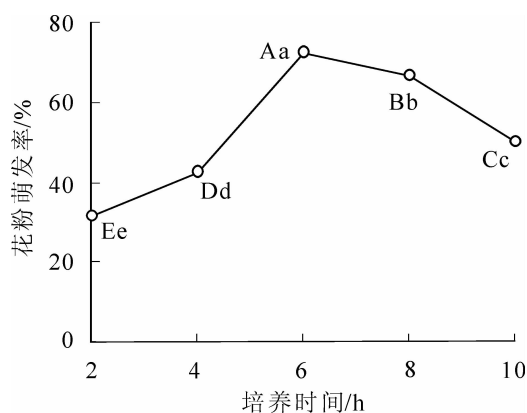
2.3 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法

具有活性的细胞产生的 NADH_2 (黄素腺嘌呤二核苷酸) 或 NADPH (三磷酸吡啶核苷酸) 可将无色的 TTC (氯化三苯基四氮唑) 还原成红色的 TTF (三苯基甲腈) 而使本身染成红色，次活力的被染成淡红色，而无活力的花粉因呼吸作用较弱，颜色变化不明显。

观察发现：利用 TTC 染色法测定木瓜花粉的生活力，花粉细胞出现了红色 (60.46%)，淡红色 (25.54%) 和无色 (14.00%) 3 种颜色反应，且随着时间的延长，细胞的染色率变化不大。利用 TTC 法测定的木瓜花粉的活力 (活性细胞和次活性细胞的总和) 与利用培养基培养法最高萌发率达 75.09% 相接近。用该方法可以快速进行花粉的活力测定，具有时间短、操作简便的优点。

2.4 不同储藏条件下花粉的萌发

由表 2 可知：不同的储藏条件对木瓜花粉生活力的影响有显著差异。在常温储藏、常温干燥储藏、 $-23 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻储藏时，储藏前期花粉生活力下降缓慢，而后期下降较快，至 24 d 后花粉基本失去生活力； $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏，花粉生活力维持时间相对较长，比 $-23 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻储藏效果略好，可能由于冷冻条件会使细胞过度脱水，不利于花粉生活力的维持； $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冷冻储藏条件下，8~32 d 时间内，花粉生活力保持相对平稳，至 32 d 时萌发率仍有 15.3%，并且记录了在此期间花粉的萌发状态 (图 2)。这说明木瓜花粉在超低温冷冻储藏条件下能维持的相对时间最长。



小写和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

图 1 培养时间对花粉生活力的影响

Figure 1 Effect of culture time on pollen viability

表 2 不同储藏条件下花粉萌发率

Table 2 Germination rate of the pollen under different storage conditions

| 储藏时间/d | 不同储藏条件下萌发率/% | | | | |
|--------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | 常温 | 常温+干燥剂 | 4 °C | -23 °C | -80 °C |
| 8 | 13.90 ± 0.60 Bb | 13.8 ± 0.90 Bb | 12.4 ± 0.60 Cc | 12.3 ± 0.60 Cc | 39.80 ± 0.90 Aa |
| 16 | 6.80 ± 0.30 Dd | 6.70 ± 0.20 Dd | 9.00 ± 0.10 Dd | 6.20 ± 0.50 De | 22.90 ± 0.30 Dd |
| 24 | 5.70 ± 0.60 Eg | 5.70 ± 0.60 Fg | 5.20 ± 0.60 Gh | 5.10 ± 0.20 Hh | 18.50 ± 0.50 Ef |
| 32 | 0.00 | 0.00 | 1.40 ± 0.30 Ii | 0.40 ± 0.10 Ij | 15.30 ± 0.10 Ij |

说明：大写英文字母表示在 $F_{0.01}$ 水平上的差异显著性,小写英文字母表示在 $F_{0.05}$ 水平上的差异显著性。

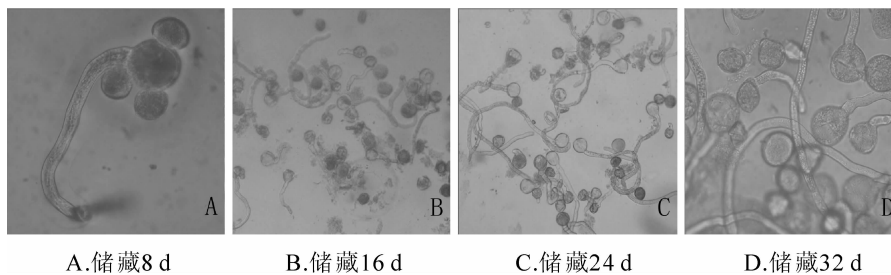


图 2 -80 °C 储藏条件下花粉萌发状态

Figure 2 Germination of pollen at -80 °C

3 小结与讨论

3.1 培养基萌发试验法

在培养基萌发试验中,蔗糖为植物花粉萌发和花粉管的生长提供了营养及维持着培养液之间的渗透平衡。高质量浓度的蔗糖能改变花粉管的透性,导致代谢物质和离子泄露在培养基里,从而使花粉及花粉管的破裂,对萌发不利^[4]。本试验表明,蔗糖质量浓度低于或大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,均不利于木瓜花粉的萌发,因此,蔗糖不仅在花粉萌发中提供所需营养,还参与其他的代谢功能。笔者认为:作为一种能量来源,如葡萄糖、砂糖(主要成分是蔗糖)等可以调节其质量浓度,同样可以保持较高的花粉萌发率。

大多数植物在含有硼和渗透压调节剂的培养液中会促使花粉及花粉管的萌发。但在自然条件下花粉的硼元素是缺乏的,而由比较高浓度的柱头、花柱内的硼所补偿^[5-6]。硼在花粉萌发中参与了诸多的生理活动,如糖的吸收、运转、代谢和氧的吸收,参与果胶的合成等过程^[7]。本试验表明:在离体条件下,适宜质量浓度的硼处理能有效提高花粉的萌发率,在硼酸质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,有利于木瓜花粉的萌发,但在未添加硼酸的培养基内木瓜花粉萌发速度较慢,且高质量浓度起抑制作用,硼酸质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,培养 2 h 后萌发率仅为 9.33%。因此,适宜的硼酸质量浓度有利于木瓜花粉的萌发,过高或过低都不利于其萌发;花粉萌发率的高低除了和花粉发育时期、花粉本身的质量有关外,还与萌发时的温度、营养物质、矿质元素等环境条件密切相关。

3.2 染色法测定木瓜花粉生活力

花粉活力是评估花粉细胞活性的依据之一,其活力测定结果的准确性决定细胞学实验和杂交育种的成败。利用染色法进行花粉生活力测定具有快速简便的优点,但受花粉自身特性(如花粉壁厚度,组成花粉外壁的物质特性及花粉内酶活性的强弱等)的影响较大,因此,不同的染色法只适合某些植物花粉生活力的测定。TTC 染色法适用于锦带花 *Weigela florida*^[8],芍药 *Paeonia lactiflora*^[9] 等的花粉生活力测定。本试验的结果表明:TTC 染色法的实验结果较接近培养基萌发试验法,能真实地反映木瓜花粉的生活力,说明 TTC 染色法适用于对木瓜花粉生活力的测定。一般来说,I-KI 染色法对大多数植物都是不适合的。

3.3 不同储藏环境条件下花粉萌发试验

花粉生活力的强弱受遗传因素和环境因素的影响。经过初步试验发现:木瓜花粉在储藏过程中温度

是影响其萌发率的主要因素,干燥和低温有助于维持花粉生活力。有报道^[10]指出,低温保存的花粉比新鲜花粉有更高的离体萌发率,但不同的种及品种所需低温不同。本试验表明:木瓜花粉在不同的储藏条件下,生活力有很大差异,只有在适宜的储藏条件下,才具有一定的萌发力,在-80℃条件下储藏32d,花粉萌发率仍达15.3%,因此,笔者建议在生产实践中于超低温条件下储藏木瓜花粉,以便木瓜花粉保持活力的时间更长,有利于种质资源的保存。

参考文献:

- [1] 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.
ZHAO Tongli, ZHOU Xiang, ZHU Pengbo, *et al.* Comparative study on testing methods for pollen viability in lily species [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2006 (5): 143.
- [2] 胡适宜.被子植物生殖生物学[M].北京:高等教育出版社,2005:135-176.
- [3] 王钦丽,卢龙斗,吴小琴,等.花粉的保存及其生活力测定[J].植物学通报,2002,19(3):365-372.
WANG Qinli, LU Longdou, WU Xiaoqin, *et al.* Pollen preservation and its viability test [J]. *Chin Bull Bot*, 2002, 19 (3): 365 - 372.
- [4] LOVERINE P T, PETER K. Relationship between pollen germination and sucrose [J]. *Ann Rev Plant Mol Biol*, 1997, 48: 461 - 491.
- [5] CLIVE A S. *Plant Taxonomy and Biosystematics* [M]. London: Edward Arnold, 1980: 135 - 156.
- [6] NIKLAS K J. The aerodynamics of wind pollination [J]. *Bot Rev*, 1985, 51: 328 - 336.
- [7] 赵长星,刘成连.培养基种类及蔗糖浓度对部分果树花粉萌发率的影响[J].河北林果研究,2001,16(9):240-243.
ZHAO Changxing, LIU Chenglian. Elementary studies on measurement of life-ability of fruit tree pollen [J]. *Hebei J For Orchard Res*, 2001, 16 (9): 240 - 243.
- [8] 许晓岗,童丽丽.垂丝海棠插穗扦插生根过程解剖学研究[J].安徽农业科学,2006,34(19):4889-4891.
XU Xiaogang, TONG Lili. Anatomical observation on the root system of the cutting of *Malus hallian* Roehne [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2006, 34 (19): 4889 - 4891.
- [9] 刘林德,张洪军,祝宁.刺五加花粉活力和柱头可授性的研究[J].植物研究,2001,21(3):375-376.
LIU Linde, ZHANG Hongjun, ZHU Ning. Pollen viability and stigma receptivity of *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Bull Bot Res*, 2001, 21 (3): 375 - 376.
- [10] 张玉进.魔芋花粉的低温和超低温保存[J].园艺学报,2000,27(2):139-140.
ZHANG Yujin. Conservation of *Amorphophallus* pollen at low temperature and in liquid nitrogen [J]. *Acta Horti Sin*, 2000, 27 (2): 139 - 140.