

文章编号: 1000-5692(2006)03-0270-05

# 蜡梅花粉活力检测方法筛选及保存时间观察

周莉花<sup>1</sup>, 郝日明<sup>1</sup>, 赵宏波<sup>2</sup>

(1. 浙江林学院 学报编辑部, 浙江 临安 311300; 2. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 用氯化三苯基四氮唑(TTC)法、无机酸法和离体萌发法等3种测试方法检测不同蜡梅 *Chimonanthus praecox* 品种的花粉活力。结果表明: TTC法和无机酸法检测效果较差, 而经过改良的培养基离体萌发法能有效地检测蜡梅花粉活力。该实验条件下, 蜡梅花粉离体萌发最佳培养基为聚乙二醇(分子量6 000)300 g·kg<sup>-1</sup>+硼酸 100 mg·L<sup>-1</sup>。在20℃暗培养条件下, 品种大金星‘Dajinxing’、圆被素心‘Rotunbaticoncolor’和金龙紫穴‘Jinlong Zixue’的萌发率分别为64.4%, 35.8%和35.5%, 不同蜡梅品种花粉活力差异较大。室温露置条件下, 蜡梅花粉活力能保持18~19 d, 而经干燥后, 在密封冷藏条件(4±2℃)下能保持2个月左右。图3表2参11

**关键词:** 植物学; 蜡梅; 花粉活力; 萌发率; 聚乙二醇; 保存时间

**中图分类号:** S685.99      **文献标识码:** A

蜡梅 *Chimonanthus praecox* 作为我国特有的传统名花, 一直受观赏园艺研究者关注。以往研究多集中在分类和观赏评价等方面<sup>[1-3]</sup>, 但有关蜡梅花粉活力及保存时间的研究还未见报道。花粉在有性繁殖中发挥着重要作用, 从研究花粉与柱头相互作用、生理调节对花粉萌发影响等方面着手研究花粉活力及保存时间对基因库保存和杂交育种方面等都具有理论意义和实践指导价值。有关花粉活力检测的方法很多, 主要有不萌发法和萌发法两大类, 其中不萌发法又有氯化三苯基四氮唑(TTC)法、无机酸测定法等<sup>[4,5]</sup>, 主要优点是快速方便, 不足之处是结果不直接; 而萌发法却较为直接和有效, 但费时耗力。目前运用较为普遍的是离体萌发法。花粉离体萌发培养基的主要成分为碳源、硼酸(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)、Ca<sup>2+</sup>等, 有的植物还需要其他物质如植物生长调节物质(6-BA等)、聚乙二醇(PEG)等。赵宏波等<sup>[6]</sup>、王四清等<sup>[7]</sup>报道PEG能显著促进菊花 *Dendranthema × grandiflora* 花粉萌发, Brewbaker等<sup>[8]</sup>报道, 在普通培养基(简称BK)上分属39科79属的86种植物花粉均能萌发良好; Leduce等<sup>[9]</sup>用改良的Monnier培养基ME<sub>3</sub>为萌发培养基, 使芥菜 *Capsella bursa-pastoris* 花粉的萌发率显著提高。该文旨在找寻一种能快速、有效、准确地检测出蜡梅花粉活力的方法, 同时也对室温露置和低温干燥密封条件下蜡梅花粉的保存时间进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取蜡梅3个品种圆被素心‘Rotunbaticoncolor’, 大金星‘Dajinxing’和金龙紫穴‘Jinlong Zixue’为实验材料, 品种的鉴定和命名参考赵天榜等编著的《中国蜡梅》<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2005-11-04; 修回日期: 2006-01-12

作者简介: 周莉花, 硕士, 从事科技期刊、观赏植物评价与分析研究。E-mail: zhouliahua@zjfc.edu.cn

## 1.2 方法

1.2.1 花粉采集 收取即将开裂的花药, 置于 40 W 白炽灯下烘 2~3 h, 花药离灯泡约 15 cm (15~20 °C), 花药烘烤开裂后, 花粉散出, 收集待检测。

1.2.2 花粉活力检测 花粉检测采用 TTC 法<sup>[4,5]</sup>、无机酸法<sup>[5]</sup>和离体萌发法。其中离体萌发法采用 5 种培养基诱导萌发, 每种诱导方法又作 3 种或 3 种以上质量分数配比, 及 1 个对照。具体方法如下。

单因素处理: ①PEG 处理: 去离子水(ck), 200, 300, 400 g·kg<sup>-1</sup>的 PEG 400 (分别简称为 P1, P2, P3), 150, 200, 250, 300 g·kg<sup>-1</sup>的 PEG 1 500 (分别简称为 P4, P5, P6, P7), 150, 200, 250, 300 g·kg<sup>-1</sup>的 PEG 4 000 (分别简称为 P8, P9, P10, P11), 150, 200, 250, 300, 350, 400 g·kg<sup>-1</sup>的 PEG 6 000(简称为 P12, P13, P14, P15, P16, P17); ②蔗糖处理: 去离子水(ck), 150, 200, 300 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖(分别简称为 S1, S2, S4); 双因素处理: ③蔗糖与基本培养基或硼酸处理: 150 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖(S1), 150 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖+100 mg·L<sup>-1</sup>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (简称为 S1/B), 150 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖+BK (简称为 S1/BK), 150 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖+ME<sub>3</sub> (简称为 S1/ME<sub>3</sub>); ④PEG 与蔗糖处理: 最适分子量和质量分数的 PEG, 分别添加 150, 200, 250 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖(简称为 P15/S1, P15/S2, P15/S3); ⑤PEG 与基本培养基或硼酸处理: 最适分子量和质量分数的 PEG, 分别添加 100 mg·L<sup>-1</sup>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, BK, ME<sub>3</sub> (简称为 P15/B, P15/BK, P15/ME<sub>3</sub>)。均采用液体培养, pH 5.8。BK 培养基: 100 mg·L<sup>-1</sup>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300 mg·L<sup>-1</sup>CaNO<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O, 200 mg·L<sup>-1</sup>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100 mg·L<sup>-1</sup>KNO<sub>3</sub>; ME<sub>3</sub>: 改良 Monnier 培养基。

操作步骤如下: 均在花粉采集的当天进行。将花粉混匀, 把培养液均匀倒于载玻片上, 在表面形成 2~4 mm 的薄层, 用毛笔蘸取少量花粉, 轻轻撒在表面, 每处理做 3 个重复。20 °C 暗培养 12 h。萌发率的计算: 在 Olympus 相差显微镜下观察, 花粉管的长度大于花粉的直径计为萌发, 每次每处理计数 3~5 个视野中的花粉总数和萌发花粉数, 按公式萌发率=(已萌发的花粉粒数÷花粉总数)×100%计算萌发率。同一品种分 3 个不同时间采集花粉进行重复。

1.2.3 花粉保存时间检测 收集花粉, 分 2 份, 一份室温条件下(5±5) °C 露置, 每天用离体萌发法检测花粉活力; 另一份先经变色硅胶干燥 1 h, 随后装入 0.5 mL 离心管, 密封, 放入冰箱冷藏室(4±2) °C 密封保存, 每周检测花粉活力 1 次。

1.2.4 统计方法 采用 Excel 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 TTC 法检测结果

显微镜下, 1 个视野内偶尔有花粉粒着色, 且着色淡, 不易分辨, 观察 3 个品种结果一致。因此 TTC 法不适合蜡梅花粉活力检测。

### 2.2 无机酸法结果

滴上硝酸几分钟后可见花粉粒 2 个萌发孔有膨胀向外突出的现象, 小于 1 倍直径, 因花粉吸水后, 萌发孔也会膨胀, 故不易判断是否为具活力, 观察 3 个品种结果一致。因此无机酸法也不适用于蜡梅花粉活力检测。

### 2.3 离体萌发法检测结果与分析

2.3.1 PEG 对花粉离体萌发的影响 用圆被素心和大金星为材料。由图 1 可以看出, 不同分子量 PEG 均能明显促进蜡梅花粉萌发, 但各自的最适质量分数存在差异, PEG 400 以质量分数为 300 g·kg<sup>-1</sup>最为适宜, 品种圆被素心和大金星的花粉萌发率分别达到 31.9%和 31.4%; PEG 1 500, 品种圆被素心以质量分数为 200 g·kg<sup>-1</sup>最适宜, 萌发率为 19.1%, 品种大金星以 250 g·kg<sup>-1</sup>最适宜, 萌发率为 53.1%; PEG 4 000 以 250 g·kg<sup>-1</sup>最适宜, 品种圆被素心和大金星的萌发率分别达到 18.5%和 44.5%; PEG 6 000 以 300 g·kg<sup>-1</sup>最适宜, 品种圆被素心和大金星的花粉萌发率分别达到 35.8%和 64.4%。以质量分数为 300 g·kg<sup>-1</sup>PEG 6 000 对蜡梅花粉离体萌发的作用最强, 与 300 g·kg<sup>-1</sup>PEG 400, 200 和 250 g·kg<sup>-1</sup>PEG 1 500, 250 g·kg<sup>-1</sup>PEG 4 000 差异显著。另外, 品种圆被素心花粉活力明显低于大金星。

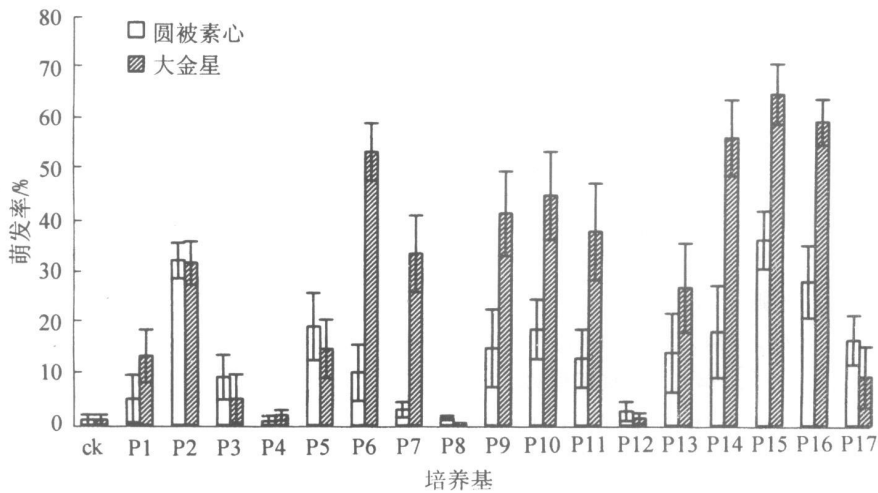


图1 PEG对蜡梅花粉离体萌发的作用

Figure 1 Effects of different PEG molecular weights and concentrations on pollen germination of *Chimonanthus praecox*

2.3.2 不同质量分数蔗糖对花粉离体萌发的作用 以大金星为实验材料, 观察花粉在不同质量分数蔗糖培养条件下的萌发, 可知, 单独添加蔗糖未能明显促进花粉萌发, 萌发率均低于5%。

2.3.3 蔗糖和基本培养基互作对花粉萌发的影响 以大金星为实验材料, 选用3种不同基本培养基, 分别添加B, BK和ME<sub>3</sub>, 并以150 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖为对照。结果显示, 150 g·kg<sup>-1</sup>蔗糖和3个基本培养基互作均未能明显促进大金星花粉的萌发, 花粉萌发率都小于5%。

2.3.4 PEG与蔗糖互作对花粉萌发的影响 在300 g·kg<sup>-1</sup>PEG 6 000培养基上, 添加不同质量分数蔗糖, 观察大金星和圆被素心的花粉萌发, 结果表明(表1), 添加蔗糖后不但未能提高花粉萌发率, 反而对萌发有明显的抑制作用, 且蔗糖质量分数越高, 抑制作用越强。

2.3.5 PEG和基本培养基互作对花粉萌发的影响 在300 g·kg<sup>-1</sup>PEG 6 000的培养基中分别添加V, ME<sub>3</sub>和BK, 结果(表2)均对蜡梅花粉萌发起显著促进作用, 比仅添加300 g·kg<sup>-1</sup>PEG 6 000效果好, 但三者之间差异不显著。另外可以看出蜡梅花粉在不同天气条件下采集的花粉活力差异较大。

表1 PEG与蔗糖互作对蜡梅花粉离体萌发的作用

Table 1 Effects of PEG with sucrose on pollen germination of *C. praecox*

培养基	萌发率/%	
	大金星	圆被素心
P15	40.6 a	16.4 a
P15/S1	14.1 b	11.6 b
P15/S2	14.8 b	5.0 c
P15/S3	4.2 c	6.0 c

表2 PEG与基本培养基互作对蜡梅花粉萌发的作用

Table 2 Effects of PEG with basic culture media on pollen germination of *C. praecox*

培养基	萌发率/%	
	大金星	圆被素心
P15	40.6 a	16.4 a
P15/B	45.9 b	23.2 b
P15/ME <sub>3</sub>	48.4 b	19.5 b
P15/BK	48.4 b	23.2 b

说明: 小写字母表示在0.05水平上进行差异比较, 表2同。

## 2.4 花粉离体萌发时间及萌发情况

在最适培养基上, 20 °C培养温度下, 蜡梅花粉10 min左右即开始萌发, 约45 min花粉管伸长至花粉直径的1~2倍, 2 h左右花粉管为花粉直径的3倍, 3 h左右有的花粉管已长到花粉直径的10倍长。蜡梅花粉具2个萌发孔, 多数情况下只有1个萌发孔萌发, 即使2个萌发孔同时萌发(图2-a), 常只有1根花粉管能继续生长, 另外1根停在萌发阶段。在没有PEG的培养基上花粉管基部易发生分

叉, 分支细软, 甚至呈絮状, 花粉和花粉管之间易断开, 有的在生长一段时间后花粉管前端突然释放溶物, 停止生长(图 2-b)。在添加了 PEG 的培养基上, 一些短的花粉管容易发生分叉, 但多数花粉管生长迅速(图 2-c)。

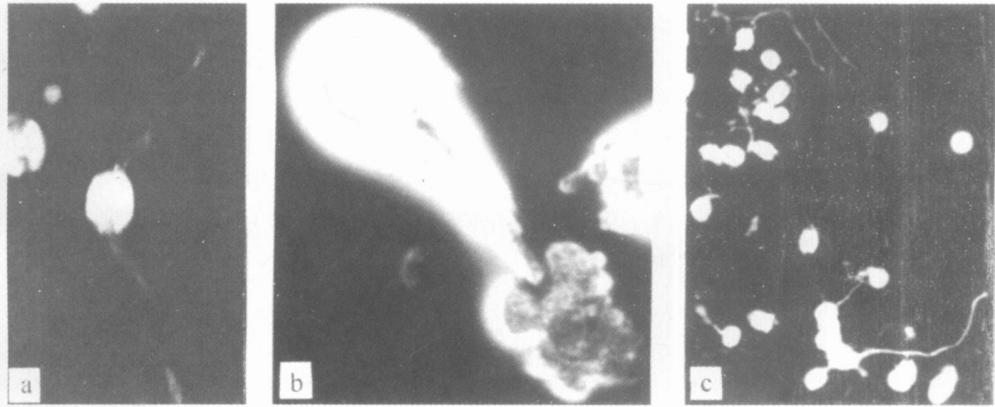


图 2 蜡梅花粉萌发状态(a. 2 个萌发孔同时萌发; b. 释放内容物; c. 添加 PEG 后的萌发状态)

Figure 2 Pollen germination and pollen tube growth of *Chimonanthus praecox* (a. short length pollen tube released inclusion in vitro; b. two pollen tubes of none pollen germinated in vitro; c. pollen germination on the culture medium)

## 2.5 花粉保存时间

2.5.1 室温露置条件下的花粉保存时间 以花粉萌发率低于 5% 为失活标准, 蜡梅花粉在室温露置条件下( $5 \pm 5$ ) $^{\circ}\text{C}$  保存时间为 18~19 d (图 3)。花粉活力的丧失是一个连续的过程, 没有明显的界限标志。花粉活力在初始 3 d 内下降较迅速, 随后下降缓慢。大金星新鲜花粉萌发率为 64.4%, 第 2 天花粉萌发率 45.9%, 第 3 天花粉萌发率为 36.2%。圆被素心新鲜花粉萌发率为 35.8%, 第 2 天花粉萌发率为 33.7%, 第 3 天花粉萌发率下降至 17.2%。金龙紫穴新鲜花粉萌发率为 35.5%, 第 2 天花粉萌发率为 29.8%, 第 9 天降至 19.3%。3 个品种间花粉寿命无明显区别。另外, 保存一定时间后, 花粉管质量下降, 细软, 且花粉管萌发一段时间后, 多发生花粉管前端突然释放内容物现象。

2.5.2 干燥冷藏条件下的花粉寿命 干燥后在冰箱冷藏室( $4 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$  密封保存蜡梅(大金星、圆被素心和金龙紫穴)花粉, 花粉活力可保持 2 个月左右, 但是干燥低温贮存后萌发的花粉管细软, 多分枝。

## 3 结论

花粉是种子的雄配子体, 在有性繁殖中发挥着重要作用, 花粉具有活力是完成受精的必要条件, 因此, 准确测定花粉活力十分重要。试验结果表明 TTC 法及无机酸不宜用来检测蜡梅花粉活力, 一般的离体萌发培养基上花粉萌发率很低, 只有离体萌发培养基中添加 PEG, 花粉萌发率和花粉管质量才有显著提高。PEG 常用于原生质体融合, 在花粉萌发中, PEG

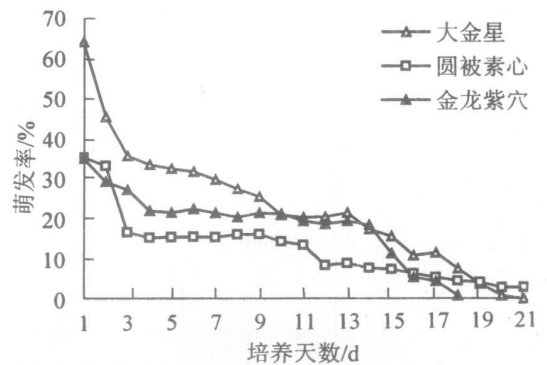


图 3 室温露置条件下花粉保存时间

Figure 3 Life-span of *C. praecox*'s pollen under room temperature

似乎有类似的作用, 使花粉粒体内膜结构发生变化, 提高其柔软及通透性, 改变膜表面电荷作用, 并在 PEG 产生的高渗透压下水花粉管变得更易萌发和生长, 且花粉管长而直。从不同分子量的 PEG 对蜡梅花粉萌发效果来看, 大分子量的 PEG 能更好促进蜡梅花粉萌发。培养基中添加蔗糖的作用, 一方面是维持一定渗透压, 另一方面是作为代谢的产物, 但蔗糖对蜡梅花粉萌发基本没有作用, 甚至会抑制 PEG 对蜡梅花粉萌发的作用, 其原因不明, 有待进一步研究。离体萌发培养基中添加  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , BK,  $\text{ME}_3$ , 能进一步促进花粉萌发, 硼对 3-细胞花粉如菊花花粉<sup>[6,10]</sup> 就有显著促进花粉管生

长, 提高其质量的作用, 在 2-细胞蜡梅花粉<sup>[2,11]</sup>中也有类似的作用, 且作用显著。其中的硼酸、无机盐和一些微量元素对蜡梅花粉管萌发和质量有促进作用。

蜡梅不同品种间花粉活力存在差异, 花粉活力高低可以直接影响蜡梅受精成功, 这可能是不同品种结实率不一的原因之一。蜡梅花粉在室温露置条件下保存时间较长, 为 18~19 d。分析原因有二: 其一, 蜡梅花粉本身的寿命较长; 其二, 冬季温度低, 限制了花粉细胞内的酶活力, 从而花粉活力能保持较长时间。蜡梅花粉活力较长, 有利于传粉的成功。

蜡梅科 Calycanthaceae 不同种的开花期明显不同, 以南京气候条件下为例, 美国蜡梅 *Calycanthus floridus* 在 4 月中下旬开花, 夏蜡梅 *Sinocalycanthus chinensis* 在 5 月中下旬开花, 亮叶蜡梅 *Chimonanthus nitens* 在 11 月开花, 开展低温冷藏条件下保存蜡梅花粉研究, 有助于今后进一步开展不同花期种类之间的种间杂交研究, 培育新的观赏植物。

### 参考文献:

- [1] 张若蕙, 张金谈, 郝海平. 蜡梅科花粉形态及系统位置的探讨[J]. 浙江林学院学报, 1989, 6(1): 1-8.
- [2] 张若蕙, 刘洪涛, 沈湘林, 等. 世界蜡梅[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998.
- [3] 赵天榜, 陈志秀, 高炳振. 中国蜡梅[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1993.
- [4] 胡适宜. 植物胚胎学试验方法(一)花粉生活力的测定[J]. 植物学通报, 1993, 10(2): 60-62.
- [5] 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): 365-373.
- [6] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 栽培小菊和几种菊属植物花粉离体萌发研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 22-27.
- [7] 王四清, 陈俊愉. 菊花和几种其他菊科植物花粉的试管萌发[J]. 北京林业大学学报, 1993, 15(4): 56-60.
- [8] BREWBAKER J L, KWACK B H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth[J]. *Am J Bot*, 1963, 50: 859-865.
- [9] LEDUCE N, MONNIER M, DOUGLAS G C. Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Casella bursa-pastoris* [J]. *Sex Plant Rep*, 1990, 3: 228-235.
- [10] 唐岱, 李名扬, 徐淳. 菊花花粉萌发及花粉活力研究[J]. 西南农业大学学报, 1993, 15(4): 359-362.
- [11] 赵建伟, 黄燕文. 蜡梅小孢子发生和花粉形成的研究[J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(2): 100-104.

## Pollen viability test of *Chimonanthus praecox*

ZHOU Li-hua<sup>1</sup>, HAO Ri-ming<sup>1</sup>, ZHAO Hong-bo<sup>2</sup>

(1. Department of Journal of Zhejiang Forestry College, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang China; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** The pollen viability were tested by means of TTC, inorganic acid and germination in vitro. The results showed that only when in vitro medium was added PEG, the pollen germination rate could be improved and represent the pollen viability. The best molecular weight and concentration of PEG for germination were 6 000 and 300 g<sup>°</sup>kg<sup>-1</sup> respectively. The effect of the medium of 300 g<sup>°</sup>kg<sup>-1</sup> PEG 6 000 and 100 mg<sup>°</sup>L<sup>-1</sup>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> on pollen germination was the best in this test. The cultivars of *Chimonanthus praecox* were different in pollen viability. The life-span of pollen in room condition was 18 to 19 d, and was about 2 months in cold storage (4±2)°C. [Ch, 3 fig. 2 tab. 11 ref.]

**Key words:** botany; *Chimonanthus praecox*; pollen viability; germination rate; PEG; life-span