

文章编号:1001-7380(2018)01-0005-05

3种槭属植物花粉离体萌发 适宜条件及活力检测方法

康德星, 王晓禹, 梅 梅, 张晓林, 陆秀君*

(沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:该文以红花槭、元宝枫、糖槭为试验材料, 蕾期采集花粉, 通过不同培养温度、不同蔗糖和硼酸质量浓度处理后进行花粉离体萌发, 筛选其最佳萌发条件。采用 TTC 法、 I_2 -IK 法、过氧化物酶法、亚甲基蓝法以及离体萌发法对 3 种槭属植物进行活力测定, 探讨其有效的活力测定方法。结果表明: 红花槭花粉在培养温度 28 ℃, 蔗糖 75 g/L+硼酸 150 mg/L 的培养基中萌发率最高为 81.95%; 元宝枫花粉在培养温度 25 ℃, 蔗糖 100 g/L+硼酸 250 mg/L 的培养基中萌发率最高为 66.7%; 糖槭花粉在培养温度 28 ℃, 蔗糖 25 g/L+硼酸 350 mg/L 的培养基中萌发率最高为 88.37%。过氧化物酶法与亚甲基蓝法活力测定效果较好, 与离体萌发相比差异显著, 其余 2 种染色剂不适合 3 种槭属植物花粉染色。

关键词:槭属植物; 花粉离体萌发; 过氧化物酶法; 亚甲基蓝法; 花粉活力测定

中图分类号: Q944.42; S792.35

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.1001-7380.2018.01.002

Conditions for in vitro germination and testing method for pollen viability of 3 species maple

KANG De-xing, WANG Xiao-yu, MEI Mei, ZHANG Xiao-lin, LU Xiu-jun*

(Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China)

Abstract: With *Acer rubrum* L., *A. truncatum* Bunge and *A. saccharum* Marsh. taken as test materials, their pollen was germinated in vitro under the conditions with different temperatures, different concentrations of sucrose and boric acid, and finally, the suitable pollen germination condition for each maple species was conformed. TTC method, I_2 -IK method, peroxidase solution, methylene blue staining and in vitro pollen germination method were used to detect the pollen viability of these maple species, and the effectiveness of these methods was assessed. The result showed that *A. rubrum* pollen at 28 ℃ in the culture medium containing 75 g/L sucrose and 150 mg/L boric acid had a germination rate of 81.95%; *A. truncatum* Bunge pollen at 25 ℃ in the culture medium supplemented with 100 g/L sucrose and 250 mg/L boric acid had a germination rate of 66.7%; *A. saccharum* Marsh. pollen at 28 ℃ in the culture medium with 25 g/L sucrose and 350 mg/L boric acid had a germination rate of 88.37%. There were significant differences among the pollen viabilities detected by peroxidase solution, methylene blue staining and in vitro pollen germination, but neither TTC method nor I_2 -IK staining method was suitable for pollen viability test of these maple species.

Key words: *Acer* sp.; In vitro pollen germination; Peroxidase solution; Methylene blue staining; Pollen viability test

我国拥有槭树种类约 151 种, 因其树冠较大, 叶 形态独特, 叶色多而密, 近几年来作为彩叶景观树

收稿日期: 2017-10-29; 修回日期: 2017-11-17

基金项目: 辽宁省农业科技攻关项目“经济林、景观林种质创新及新品种引进筛选”(No.2015207005)

作者简介: 康德星(1992-), 男, 山西朔州人, 硕士研究生。从事森林培育研究。E-mail: 1160433940@qq.com。

* 通信作者: 陆秀君(1966-), 女, 辽宁铁岭人, 教授, 博士。从事森林培育研究。E-mail: Lxjsyau@126.com。

种在园林绿化中被广泛应用。槭属目前主要分布于北温带,我国作为槭树植物的主要产地,拥有的槭属植物资源十分丰富,这为槭属植物作为园林绿化树种在我国广泛应用提供了基础^[1]。

花粉是植物有性途径进行遗传物质传递的载体,也是开展人工授粉及新品种培育最基本的材料。花粉活力对杂交育种是否成功影响重大,花粉生活力的测定是保证花粉质量的重要途径,对花粉贮藏有着十分重要的意义^[2]。

本研究采用离体萌发法、TTC 染色法、I₂-IK 染色法、亚甲基蓝染色法以及过氧化酶染色法^[3],对 3 种槭属植物的新鲜花粉进行了较为系统的研究,找出了最佳培养条件、贮藏条件以及最佳染色方法,为日后不同槭树品种之间进行授粉,克服花期不遇等提供一定的理论依据,并为今后开展槭属植物杂交育种研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验材料于 2016 年 4—6 月取自沈阳农业大学校园内和苗木基地槭树科 3 个种的花枝,分别是红花槭 (*Acer rubrum* L.)、元宝枫 (*A. truncatum* Bunge)、糖槭(*A. saccharum* Marsh.)。

1.2 花粉收集方法

于槭属植物形成花蕾时开始观察,选取正常生长的植物进行观测,待花朵大多呈含苞待放状时,分别随机选 3 株树,选取树冠中上部阳面的健康枝条,剪下带回实验室。将花枝下端剪成斜面,置于盛水的烧杯中水培,等待花朵自然开放,在烧杯下部铺好硫酸纸。待花朵开放时,用毛笔刷收集刚开裂花药里的成熟花粉,用离心管装好备用^[4]。

1.3 花粉生活力测定方法

1.3.1 离体培养法 本试验中采用液体培养基法,蔗糖质量浓度设 4 个水平,为 25,50 ,75 ,100 g/L;硼酸质量浓度设 3 个水平,为 150 ,250 ,350 mg/L。共 12 种组合(见表 1)。培养温度设 3 个水平,为 25,28,31 ℃。用胶头滴管分别取 12 种培养液滴在凹面载玻片上,编好序号,撒适量新鲜花粉于培养液上混匀,放入恒温培养箱中培养,每个处理进行 3 次重复,用光学显微镜分别观察花粉 6,12,18,24 h 的萌发率(试验发现,培养超过 24 h 的花粉受真菌感染严重,故最终培养时间为 24 h)。并分析花粉培养 24 h 后的萌发率,得出最佳培养基。花粉管的

长度超过花粉粒直径作为花粉萌发的标准。花粉萌发率(%)=(视野中花粉萌发数/视野中花粉总数)×100%。

1.3.2 染色法 试验中采取 4 种染色方法分别对 3 种槭属植物新鲜花粉进行活力检测,分别是 TTC 染色法^[5]、I₂-KI 染色法^[6]、过氧化酶染色法^[7]、亚甲基蓝染色法^[8]。

表 1 培养基组合的不同处理

培养基序号	蔗糖/(g/L)	硼酸/(mg/L)
1	25	150
2	25	250
3	25	350
4	50	150
5	50	250
6	50	350
7	75	150
8	75	250
9	75	350
10	100	150
11	100	250
12	100	350

1.4 数据分析

试验数据用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,采用邓肯氏新复极差法进行多重比较。

2 结果和分析

2.1 培养基及培养温度对红花槭花粉离体萌发的影响

红花槭花粉经过不同培养基与培养温度培养 24 h 后,花粉萌发情况的多重比较结果如表 2 所示,红花槭花粉在培养温度 28 ℃,75 g/L 蔗糖+150 mg/L 硼酸的培养基中萌发率最高,为 81.95%,显著高于其他处理。当蔗糖质量浓度为 25 g/L 和 50 g/L 时,花粉的萌发率随着硼酸质量浓度的增加而增加。当蔗糖质量浓度为 75,100 g/L 时,花粉的萌发率随着硼酸质量浓度的增加而减少。

2.2 培养基及培养温度对元宝枫花粉离体萌发的影响

元宝枫花粉经过不同培养基与培养温度培养 24 h 后,花粉萌发情况的多重比较结果如表 3 所示,元宝枫花粉在培养温度 25 ℃,100 g/L 蔗糖+250

mg/L 硼酸的培养基中萌发率最高,为 66.7%,显著高于其他处理。在不同温度条件下,随着蔗糖质量浓度的增加,花粉萌发率的大体趋势为先增加后减小。在同一温度,同一蔗糖质量浓度条件下,花粉萌发率基本随硼酸的质量浓度增加而增加。

表 2 不同培养条件下红花槭离体花粉萌发率 %			
培养基 序号	培养温度/℃		
	25	28	31
1	21.38±2.84 f	33.09±3.11 f	29.25±3.35 e
2	37.80±1.74 de	45.77±1.72 d	43.44±3.53 bed
3	48.43±1.83 b	60.04±1.99 c	44.76±1.95 bc
4	29.92±4.78 f	32.91±4.21 f	31.97±5.01 e
5	33.34±2.20 de	46.18±5.51 d	45.62±6.36 b
6	43.19±2.05 bed	72.30±2.92 b	53.64±2.57 a
7	60.92±1.12 a	81.95±2.25 a	58.12±5.70 a
8	49.21±4.98 b	45.84±4.71 d	45.37±3.51 b
9	44.82±6.15 bc	39.84±1.33 e	37.62±0.80 bede
10	45.85±2.55 bc	39.70±1.55 e	37.10±5.13 cde
11	41.62±3.03 cd	38.38±0.75 e	36.01±1.55 de
12	39.77±2.75 cd	40.27±1.81 e	38.43±5.50 bede
表中数据为平均值±标准误;同列数字后不同小写字母表示 $P<0.05$ 时存在显著性差异			

表 3 不同培养条件下元宝枫离体花粉萌发率 %			
培养基 序号	培养温度/℃		
	25	28	31
1	34.04±2.43 f	40.31±1.29 de	41.81±0.88 c
2	38.68±2.23 ef	39.44±2.84 e	42.19±2.12 bc
3	44.64±2.06 cde	39.48±6.22 cde	43.54±2.26 bc
4	39.62±1.01 ef	38.45±3.51 e	44.22±2.22 bc
5	43.82±2.28 de	44.06±3.04 cde	48.70±3.22 bc
6	53.82±1.43 bc	52.52±2.86 bc	50.78±1.65 b
7	51.54±2.18 bed	49.57±0.94 bed	41.93±1.78 c
8	52.06±1.93 bed	47.78±3.92 bede	45.52±1.58 bc
9	58.83±2.29 ab	54.44±2.49 ab	47.67±1.86 b
10	55.59±3.14 bc	47.84±2.34 bede	47.62±3.83 b
11	66.70±3.04 a	61.03±4.45 a	60.69±1.46 a
12	42.42±3.46 bed	38.68±1.33 bede	38.60±1.46 bc
表中数据为平均值±标准误;同列数字后不同小写字母表示 $P<0.05$ 时存在显著性差异			

2.3 培养基及培养温度对糖槭花粉离体萌发的影响

糖槭花粉经过不同培养基与培养温度培养 24 h

后,花粉萌发情况的多重比较结果如表 4 所示,糖槭花粉在培养温度 28 ℃,25 g/L 蔗糖+350 mg/L 硼酸的培养基中萌发率最高,为 88.37%,显著高于其他处理。不同处理在培养温度 28 ℃时,萌发率普遍达到最大值。在同一温度,同一蔗糖质量浓度条件下,花粉萌发率基本随硼酸的质量浓度增加而增加。

表 4 不同培养条件下糖槭离体花粉萌发率 %			
培养基 序号	培养温度/℃		
	25	28	31
1	25.69±2.46 d	41.46±1.66 e	32.69±1.97 e
2	37.64±4.19 bc	53.75±3.64 c	40.57±2.75 bede
3	44.44±7.66 ab	88.37±2.74 a	53.17±3.98 a
4	38.40±4.85 bc	32.45±3.66 f	35.91±1.78 de
5	45.24±4.86 ab	48.63±2.96 cd	44.41±2.63 abcd
6	51.69±3.19 a	45.58±1.99 de	46.40±1.99 abc
7	25.72±3.90 d	30.54±3.61 f	19.72±8.54 f
8	39.31±3.78 bc	49.43±3.06 cd	43.62±8.17 bed
9	42.58±5.12 b	42.64±2.94 e	37.51±3.65 cde
10	40.54±2.39 b	48.66±2.46 cd	35.50±4.69 de
11	31.66±2.81 cd	50.54±3.81 cd	38.42±4.05 cde
12	41.30±1.44 b	63.36±4.43 b	49.41±8.26 ab
表中数据为平均值±标准误;同列数字后不同小写字母表示 $P<0.05$ 时存在显著性差异			

2.4 3 种槭属植物花粉萌发过程

分别用筛选出的最佳培养温度与培养基,对 3 种槭属植物花粉进行培养观察,萌发率如图 1 所示。研究发现培养 6 h,3 种花粉的萌发率为 21.96%—29.85%,其中红花槭的萌发率最小,元宝枫的萌发率最大。在 12 h 时 3 种花粉均大量萌发,之后花粉萌发速率逐渐降低,并最终保持稳定,直到 24 h 时达到最大值。最终萌发率大小关系为糖槭(88.37%)>红花槭(81.95%)>元宝枫(66.70%)。

2.5 不同花粉活力测定方法的比较

本试验采用了 4 种染色法测定花粉萌发率,其中 TTC 和 I₂-IK 染色法无法使花粉染色,故不能作为测定 3 种槭树植物花粉活力的有效染色剂。而亚甲基蓝染色法和过氧化物酶染色法能在短期内使花粉染色,且效果明显。由染色结果(见表 7)可知,过氧化物酶染色法对红花槭、元宝枫、糖槭花粉的检测结果显示高于离体萌发的花粉萌发率($P<0.05$);亚甲基蓝染色法对元宝枫花粉的检测结果显示高于离体萌发的花粉萌发率($P<0.05$),而对其

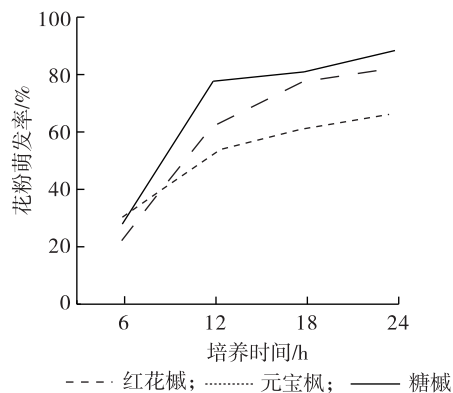


图 1 3 种槭属植物花粉萌发率随培养时间的变化

余 2 种槭属植物花粉的检测方法与离体萌发法相比无显著差异 ($P>0.05$)。

表 7 3 种方法检测的花粉生活力

测定方法	红花槭 $F=45.716$	元宝枫 $F=47.493$	糖槭 $F=16.234$
过氧化物酶	95.49±1.01 a	81.85±1.46 a	93.66±1.93 a
亚甲基蓝	87.03±1.77 b	79.39±1.08 a	84.35±0.92 b
离体萌发	81.95±2.25 b	66.7±3.04 b	88.37±2.74 b

表中数据为平均值±标准误;同列数字后不同小写字母表示 $P<0.05$ 时存在显著性差异

3 结论与讨论

花粉萌发常用的培养基有固体和液体 2 种,液体培养基操作相对简便。其中蔗糖和硼酸是培养基的主要成分,大量的研究表明,不同植物的花粉萌发所需要的培养基种类和质量浓度有所不同,一些较难萌发的花粉,还需添加其他成分,如 Ca^{2+} , K^+ , PEG 等^[9]。刺槐花粉的适宜萌发条件为 150 g/L 蔗糖+20 mg/L 硼酸+0.5 mg/L 硝酸钙^[10]。芒果花粉在液体培养基中,萌发率最高,可达 50.14%^[11]。绝大多数的桃品种的最佳培养基为 10%蔗糖+0.1%硼酸+1%琼脂^[12]。因此很有必要对不同种类的花粉确立相对应的适宜萌发条件。本研究发现,红花槭花粉在培养温度 28℃,75 g/L 蔗糖+150 mg/L 硼酸的培养基中萌发率最高为 81.95%;元宝枫花粉在培养温度 25℃,100 g/L 蔗糖+250 mg/L 硼酸的培养基中萌发率最高为 66.7%;糖槭花粉在培养温度 28℃,25 g/L 蔗糖+350 mg/L 硼酸的培养基中萌发率最高为 88.37%。在最佳培养基处理下,培养 12 h 后大部分花粉均萌

发,随后的花粉萌发率增加缓慢;培养 24 h 时,3 种槭属植物花粉的萌发率趋于稳定,达到最大值。

张朋研究发现,红花槭的最佳萌发条件为 40 g/L 蔗糖+200 mg/L 硼酸+350 mg/L CaCl_2 ,萌发率为 55.67%^[13]。王永格等对“丽红”元宝枫的研究发现,其在培养温度 15℃,150 g/L 蔗糖的条件下培养 6 h,花粉萌发率最高,为 31.6%;并且指出 TTC 和 I_2 -IK 不适合检测“丽红”元宝枫的花粉生活力^[14]。王续蕾发现糖槭的最佳萌发条件是:培养温度 15℃,150 g/L 蔗糖+300 mg/L 硼酸,萌发率可达 43.22%^[15]。以上研究与本文结果有所差异,有可能是试验材料的差异性以及花粉培养温度不同导致,也可能是在不同的生长环境下,其适应性发生了不同的变化而造成的。

花粉活力检测的方法有很多,左丹丹等对其作了较为详细的介绍,并分析了各种方法的特点^[16]。詹妮等研究表明, I_2 -IK 对大叶相思花粉的染色结果略高于离体萌发法,但 2 者差异不显著^[7]。孙爱芹等研究发现, I_2 -IK 染色法对枣花粉的染色结果显著高于离体萌发法^[6]。本研究中,过氧化物酶法测得的结果普遍高于离体萌发法,差异显著,可能是由于染色法测得的结果是花粉潜在的活力,而离体萌发法测得的结果是花粉的实际活力^[17];而 TTC 与 I_2 -IK 染色法无法使 3 种槭属植物花粉染色,与王永格等、王续蕾的研究结果相同。原因可能是由于不同种类的花粉酶的活性与淀粉含量不同导致^[6]。在实际工作中,染色法方便快捷,可用来快速检测花粉的生活力,但有时活力较弱的花粉也会被染色,因此染色法测得的结果一般都比真实情况偏高^[18]。本试验的结果也证实了赵元杰等^[19]的试验结果。Smith-Huerta 等认为,测定花粉受精有效性和种子形成的比率是测定植物花粉活力较为精确的方法^[20]。因此,在测定花粉生活力时,应结合研究目的与实际情况选择合适的测定方法。

参考文献:

- [1] 徐延志.我国槭属植物资源评价[J].资源开发与保护,1988,4(4):52-55.
- [2] 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,2002,3:365-373.
- [3] 姜雪婷,杜玉虎,张绍铃,等.梨 43 个品种花粉生活力及 4 种测定方法的比较[J].果树学报,2006,23(2):178-181.
- [4] 杨琴军,黄英平,陈龙清.3 种含笑属植物花粉生活力的测定[J].安徽农业科学,2007,35(1):15-17.

- [5] 胡适宜.植物学实验方法(一)花粉生活力的测定[J].植物学通报,1993,10(2):60-62.
- [6] 孙爱芹,常伟光,韩 斌.不同枣品种花粉生活力及贮藏方法研究[J].中国农学通报,2010,26(1):166-168.
- [7] 詹 妮,黄烈健.大叶相思花粉离体萌发适宜条件及活力检测方法[J].林业科学,2016,52(2):67-73.
- [8] KHATUN S, FLOWERS T J. The estimation of pollen viability in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46(282):151-154.
- [9] 尹佳蕾,赵惠恩.花粉生活力影响因素及花粉贮藏概述[J].中国农业科学,2005,31(4):110-113.
- [10] 戴 丽,孙 鹏,蒋晋豫,等.刺槐红花刺槐四倍体刺槐花粉体外萌发对比[J].东北林业大学学报,2012,40(1):1-5.
- [11] DUTTA S K, SRIVASTAV M, CHAUDHARY R, et al. Low temperature storage of mango (*Mangifera indica* L.) pollen [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 161(2):193-197.
- [12] 杜纪红,叶正文,苏明申,等.桃花粉离体萌发和花粉管生长特性研究[J].西北植物学报,2011, 31(1):64-71.
- [13] 张 朋.元宝枫花性变化规律及其与美国红枫远缘杂交初探[D].泰安:山东农业大学,2014.
- [14] 王永格,王茂良,舒健骅,等.“丽红”元宝枫花粉生活力研究[J].北京农学院学,2015,30(2):63-66.
- [15] 王续蕾. 沈阳地区几种槭属植物花粉特性初步研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016.
- [16] 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.
- [17] DURO A, PICCIONE V, ZAMPINO D. Air quality biomonitoring through pollen viability of Fabaceae[J]. Environmental Monitoring & Assessment, 2013, 185(5):3803-3817.
- [18] 赵鸿杰,乔龙巴图,殷爱华,等.3 种山茶属植物花粉活力测定方法的比较[J].中南林业科技大学学报,2012, 30(3):105-107.
- [19] 赵元杰,蒋建雄,刘明稀,等.花粉生活力测定方法比较[J].中国农学通报,2009, 25(24):147-150.
- [20] SMITH-HUERTA N L, VASEK F C. Pollen longevity and stigma-pre-emption in *Clarkia*[J]. American Journal of Botany, 1984, 71(9):1183-1191.

(上接第 4 页)

- [4] 李 欣,沈 向,张鲜鲜,等.观赏海棠叶、果、花色彩的数字化描述[J].园艺学报,2010, 37(11):1811-1817.
- [5] 吴晓星,刘凤桢,房义福,等.36 个欧美观赏海棠品种(种)应用价值的综合评价[J].南京林业大学学报(自然科学版),2015, 39(1):93-98.
- [6] 胡学俭,孙明高,夏 阳,等.NaCl 胁迫对无花果与海棠膜脂过氧化作用及保护酶活性的影响[J].西北植物学报, 2005, 25(5):937-943.
- [7] 许晓岗.垂丝海棠、楸子的扦插生根机理研究[D].南京:南京林业大学,2006.
- [8] 刘志强,汤庚国.海棠在园林中的应用研究[J].苏州科技学院学报(工程技术版),2004, 17(3):75-80.
- [9] 秦晓晓.苹果属观赏海棠类黄酮种类、代谢及生物活性分析[D].重庆:西南大学,2016.
- [10] 李晓磊,沈 向,王 磊,等.海棠不同品种果实香气物质分析[J].中国农业科学,2008, 41(6):1742-1748.
- [11] 贺 凯.年产 600 吨海棠果酒工程初步设计[D].济南:齐鲁工业大学,2016.
- [12] 汪国胜,章军鹏,林 然,等.海棠果果醋的制作方法:中国,CN 106148156 A[P]. 2016.
- [13] 打造西府海棠新版图—中国最具潜力果酒品牌追踪报道[DB/OL]. <http://news.sina.com.cn/o/2015-07-02/184932061953.shtml#>,2015-07-02/2017-10-17.
- [14] 刘 珩,卢明艳,王 涛,等.不同品种海棠果品质测定及聚类分析[J].中国农学通报,2014, 30(25):222-225.
- [15] 贾定贤,米文广,杨儒琳,等.苹果品种果实糖、酸含量的分级标准与风味的关系[J].园艺学报,1991,18(1):9-14.
- [16] 黄月琼,邓 文,李谈潇.不同品种哈密瓜果品质研究[J].东北农业大学学报,2015(1):41-46.
- [17] 牛锐敏,饶景萍,韩新花,等.不同采收期对红富士苹果贮藏品质的影响[J].西北农业学报,2006, 15(3):171-174.
- [18] 王向斌,周会玲,张晓晓,等.苹果果实品质形成及影响因素分析[J].北方园艺,2015(13):186-189.