

红花矮牡丹花粉贮藏及生活力研究

贾文庆, 刘会超*, 刘露颖

(河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

摘要:以红花矮牡丹花粉为材料, 采用离体培养法研究不同温度、培养基组分、贮藏温度及时间对花粉萌发的影响, 并探讨花粉形态与萌发之间的关系。结果表明: 培养基中添加蔗糖和硼酸对花粉的萌发有促进作用, 红花矮牡丹花粉萌发培养基中最适宜的蔗糖和硼酸质量分数分别为: 9%、0.004 5%, 红花矮牡丹花粉萌发率达 62.37%, 花粉萌发的最佳温度为 22 ℃。花粉生活力随贮藏时间的延长而下降, 不同的贮藏条件对牡丹花粉生活力有显著的影响, 红花矮牡丹花粉最佳贮藏方法为-196 ℃超低温保存, 耐贮藏力超过 365 d。花粉形态与其萌发之间有相关性。

关键词:矮牡丹; 花粉形态; 萌发; 生活力; 贮藏

中图分类号: S685.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286 (2012) 03-0460-04

Studies on the Pollen Germination and Storage Characteristics of *Paeonia Suffruticosa* var. *spontanea*

JIA Wen-qing, LIU Hui-chao, LIU Lu-ying

(Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract:The experiment was conducted with the fresh pollens of dwarf peony by in vitro culture to study the effects of culture medium composition, temperature and different storage methods on pollen germination; and the relationship between pollen morphology and germination was studied, too. The results showed that culture media with different concentrations of sucrose and boric acid had good effects on pollen germination. The germinating percentage of dwarf peony pollen reached the highest after incubated on the media supplemented with 9% sucrose and 0.004 5% boric acid, the germination percentage of dwarf peony pollen reached 62.37%. The optimal temperature was 22 ℃. Pollen vitality gradually descended with the prolongation of storage time. The best environment to keep dwarf pollen vitality was at -196 ℃. There is a correlation between pollen morphology and pollen germination.

Key words:*Paeonia suffruticosa* var. *spontanea*; pollen morphology; germination; viability; storage

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)分为两个亚种: 花王牡丹(subsp. *suffruticosa*)和矮牡丹(subsp. *spontanea*)^[1-2]。花王牡丹包括所有园林栽培品种, 花色鲜艳、雍容华贵, 在我国被誉为“花中之王”, 有 1 000 多个品种, 具有极高的观赏价值。后者为花王牡丹的近缘亲戚, 为我国特有种, 据认为花王牡丹可能就是由产自延安一带矮牡丹引种驯化而来^[1-2], 矮牡丹是极为珍贵的种质资源, 花色有黄、白、红、紫等色, 仅在山西稷山、陕西延安、河南辉县关山等地零星分布, 资源匮乏, 被列入国家濒危的三级保护植物, 是重要的牡丹育种原始材料之一^[2-3]。

植物花粉生命力及其贮藏特性是开花生物学特性研究中的一项重要内容, 是进行人工辅助授粉或杂交授粉的基础^[4], 掌握花粉花粉生命力、贮藏力特性以及生活力检测的方法对于提高植物育种效率、保存种质资源有较高实际应用价值。杂交育种中对于不同形态的花粉, 要求采取不同的授粉技术, 正

收稿日期: 2011-11-30 修回日期: 2012-02-27

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(112102110021)

作者简介: 贾文庆(1979—), 男, 讲师, 硕士, 主要观赏植物生物技术研究, E-mail: jiaqw99@126.com; *通讯作者: 刘会超, 教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: liuhc918@yahoo.com。

常花粉的形态指标也是多倍体育种中筛选 $2n$ 花粉的依据^[4]。迄今为止, 矮牡丹花粉种质资源保存体系尚未建立, 为此笔者选用河南关山野生的红花矮牡丹花粉为材料, 观察其形态特征, 采用离体萌发法来筛选适合红花矮牡丹花粉萌发的培养基、培养温度, 并探讨不同贮藏方法对红花矮牡丹花粉生命力的影响, 以为矮牡丹的资源保存、杂交育种提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料的采集与处理

试验用含苞欲放花蕾于 2011 年 4 月中旬采自河南关山景区, 采集后装入冰盒迅速带回实验室, 取出花药, 放入用硫酸纸折叠而成的小纸盒内, 置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱散粉 12 h 后, 收集花粉备用^[5]。

1.2 花粉的形态观察

将成熟干燥花粉(含水率为 25%)用毛笔涂于双面胶纸上, 镀金后放在扫描电子显微镜(Quanta 200)下观察测定。记录花粉的极轴和赤道长度并计算 P/E 值; 观察花粉远极面、近极面和局部的外壁纹饰、网眼大小、网脊宽度、饱满率, 测量、记录数据。

1.3 温度及最佳培养基筛选

将矮牡丹花粉接种于仅有琼脂(10 g/L)的空白培养基上, 分别在 18, 20, 22, 25 $^\circ\text{C}$ 下培养 10 h 后统计萌发率, 确定最佳培养温度。

在预备试验的基础上, 采用 2 因素(蔗糖、硼酸)完全随机试验, 蔗糖和硼酸质量分数分别为 0、8%、9%、10%、11%和 12%; 0、0.004%、0.0045%、0.005%、0.005 5%和 0.006%, 共 36 个处理。上述培养基均添加琼脂 10 g/L, 溶解后 pH 调至 5.8^[4-5]。

用玻璃棒滴培养基于凹玻片的凹处, 装满为止, 稍冷却后用干净的毛笔沾取少许红花矮牡丹花粉均匀撒播于培养基表面。将凹玻片置于铺有两层湿滤纸的培养皿中, 在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养 10 h (预备试验得出)后, 观察统计萌发率, 每处理重复 3 次, 每重复统计花粉数不少于 50 粒。以花粉管长度大于花粉粒直径为萌发标准。

$$\text{萌发率} = \frac{\text{观察视野中萌发花粉粒数}}{\text{观察视野中总花粉粒数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 不同贮藏条件对红花矮牡丹花粉生活力的影响

红花矮牡丹花粉收集后, 置于硅胶干燥器中干燥 10 h, 用 50 目标准检验筛过筛, 并分装于 5 mL 指形小管, 加入 2 粒硅胶粒干燥剂。采用常温干燥贮藏、4 $^\circ\text{C}$ 干燥贮藏、-20 $^\circ\text{C}$ 干燥贮藏、-80 $^\circ\text{C}$ 干燥贮藏、-196 $^\circ\text{C}$ 干燥贮藏 5 种方法贮藏。并分别在 4, 10, 22, 46, 94, 190 d 采用 1.2 所得最佳培养基测定花粉生活力。花粉耐贮藏力是以待测花粉活力保持时间即待测花粉样品活力降为接近零时间长度来表示。

2 结果与分析

2.1 红花矮牡丹花粉的形态结构观察及比较

红花矮牡丹花粉粒形态呈两侧对称, 极面观为长椭圆形到椭圆形。均为 3 孔沟, 延伸至两极, 萌发沟两极窄中间宽, 边缘明显增厚, 两极有近圆形的平面, 中部粗糙, 外壁光滑。花粉外壁纹饰基本类型为网状, 网眼多为圆孔或不规则多边形, 大网眼平均直径为 1.32 μm , 小网眼直径平均为 0.81 μm , 大小网眼分布密度较为均一, 网眼深度较浅。红花矮牡丹花粉粒平均极轴长 47.38 μm , 平均赤道轴长 23.85 μm , P/E ≈ 1.99 (图 2, a-c)。畸形花粉有勺形、三角形等, 约占观察花粉总数的 36.40% (图 2, d-e)。

2.2 温度及离体培养法对红花矮牡丹花粉萌发的影响

本试验结果表明, 18 $^\circ\text{C}$ 时花粉的萌发率为 15.2%, 20, 22 $^\circ\text{C}$ 时分别升高至 17.3%、19.25%, 25 $^\circ\text{C}$ 时又下降至 18.05%。可知在 18~25 $^\circ\text{C}$ 培养条件下, 随着温度的升高, 红花矮牡丹花粉萌发率呈现先升高后下降的趋势, 花粉萌发的最佳培养温度为 22 $^\circ\text{C}$ 。

从表 1 可以看出, 蔗糖、硼酸、蔗糖 \times 硼酸的互作效应对红花矮牡丹花粉萌发率影响均存在显著差异(图 2, f-j)。在不含有蔗糖和硼酸的培养基(CK)中, 花粉萌发较少, 10 h 时花粉萌发率仅为 18.85%, 花粉管长度短而且细(图 2, h)。当培养基中仅加入蔗糖时, 红花矮牡丹花粉萌发率显著提高, 在蔗糖质量分数为 9% 时达到最大值(41.60%); 但当蔗糖为 12% 时, 花粉萌发率反而下降, 只有 26.40%。在

仅含硼酸条件下,花粉萌发率随硼酸质量分数的升高呈现先升后降的趋势,当硼酸质量分数为 0.004 5% 时,花粉的萌发率最高,达到 29.58%。硼酸超过 0.004 5% 时,花粉的萌发率随之下降,当培养基中的硼酸质量分数增加到 0.006% 时,花粉的萌发率下降为 25.40%。从表 1 可以看出,培养基中同时添加不同的蔗糖和硼酸可以显著提高红花矮牡丹花粉萌发率,红花矮牡丹花粉萌发适宜的蔗糖和硼酸为 9% 蔗糖+0.004 5% 硼酸,花粉萌发率最高,达 62.37% (图 2, f-g)。试验发现,与 CK 相比,在适宜质量分数的蔗糖和硼酸的培养基上,花粉管长度更长,粗度更粗。

表 1 不同浓度的蔗糖、硼酸对红花矮牡丹花粉萌发的影响

Tab.1 The effects different concentration of sucrose and boric on the dwarf peony pollen germination

萌发率/% Germination percentage	蔗糖/% Sucrose						
	0	8	9	10	11	12	
0	18.85±0.20yV	37.61±0.11rO	41.60±0.34noKL	41.35±0.23oKLM	35.30±0.38sP	26.40±0.24vS	
0.004 0	21.23±0.15xU	42.39±0.33mnJK	51.29±0.21fD	53.20±0.42cdC	51.60±0.24efD	47.00±0.07hEF	
硼酸 /% Boric acid	0.004 5	29.58±0.29uR	52.43±0.28deCD	62.37±0.54aA	58.38±0.27bB	53.47±0.56cC	51.15±0.21fD
	0.005 0	26.62±0.19vS	48.26±0.20gE	53.42±0.25cC	46.15±0.16iFG	44.20±0.22kHI	45.24±0.03jGH
	0.005 5	26.48±0.35vST	46.60±0.23hiF	46.15±0.18iFG	43.30±0.06kIJ	41.25±0.10oLM	44.15±0.16kHI
	0.006 0	25.40±0.21wT	42.47±0.19imJK	41.50±0.28oKLM	39.90±0.30pMN	39.34±0.31qN	31.50±0.24tQ

不同大小写字母表示在 0.01、0.05 水平上的差异。

Different lower case latin and capital letters denote significantly different at 0.05 and 0.01 level respectively.

2.3 不同贮藏环境条件对红花矮牡丹花粉生活力的影响结果

图 1 研究表明,在 5 种贮藏温度条件下,随着贮藏时间延长,红花矮牡丹花粉萌发率均呈下降趋势。贮藏温度影响花粉萌发率下降速度。室温下萌发率下降最快,贮藏的第 22 天,花粉萌发率降为 1%,贮藏时间最短; 4 °C 适用于矮牡丹花粉的短期贮藏,贮藏 176 d 左右后花粉丧失生活力; 与常温和 4 °C 处理相比, -20 °C、-80 °C 与 -196 °C 低温处理,花粉的萌发率下降幅度较小,呈缓慢下降趋势,能够明显延长贮藏时间,但以 -80 °C 与 -196 °C 低温处理较好,在贮藏的第 366 天,花粉萌发率仍分别达到 34.65% 和 38.24%,花粉管形态正常 (图 2, i-j), 这可能是由于急速的降温使花粉细胞内的水急速冷却,迅速达到玻璃化状态,减少了对花粉的损伤,从而提高了花粉的成活率。由此可知,红花矮牡丹花粉适宜的长期贮藏温度为 -196 °C。

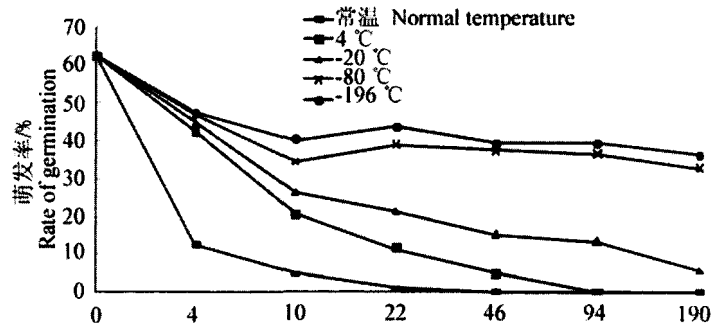


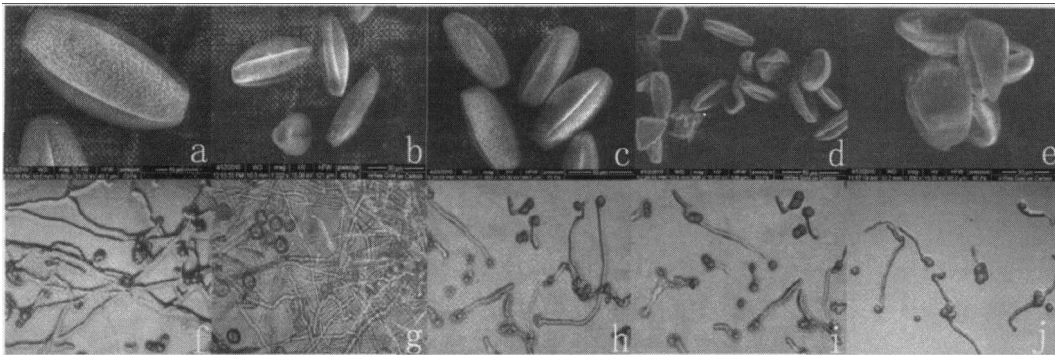
图 1 不同贮藏环境对红花矮牡丹花粉萌发的影响

Fig.1 The effects of different store environment and time on the pollen germination rate

3 结论与讨论

花粉形态的研究可为分类鉴定,探讨植物起源、演化及亲缘关系提供依据^[6-8]。物种不同,花粉的形态、结构及大小也有差异。本研究结果表明:红花矮牡丹属于中型花粉,表面光滑,没有黏液分泌,说明红花矮牡丹属于典型的风媒花,杂交时隔离袋必须使用防风、防水、透气的材料,不能使用尼龙袋、纱布袋或育种笼。红花矮牡丹花粉勺形、三角形等畸形花粉所占比较高 (36.40%),与离体萌发法最高 62.37% 结合来看,萌发率和花粉的饱满率有一定关系,说明花粉萌发与花粉形态有相关性。畸形花粉所占比较高可能是红花矮牡丹繁殖力差,资源匮乏的原因之一。

硼在植物体内含量很低,且分布不均匀,以花中含量最高,花中又以柱头和子房最多,硼离子与游离态的糖结合,增加氧气的含量,使糖易于通过质膜,促进运输,从而促进糖的吸收与代谢,加之硼能参与果胶物质的合成,利于花粉管壁的建立^[9-10]。供试红花矮牡丹花粉萌发率随硼酸质量分数的增



a-c: 正常花粉; d,e: 瘪形花粉; f,g: 在 9%蔗糖+0.0045%硼酸培养基上红花矮牡丹花粉萌发; h: CK 培养基上花粉萌发; i,j: 超低温保存后的花粉萌发。

a-c.Normal pollen; d,e. Shrivelled shape pollen; f,g.photos of pollen germination on the media supplemented with 9% sucrose and 0.0045% Boric acid; h. the photo of pollen germination on the CK media; i,j. pollen germination after cryopreservation.

图2 花粉形态及萌发

Fig.2 Pollen morphology and germination

加而升高,在质量分数为 0.004 5%时,萌发率最高,但超过 0.004 5%时,花粉的萌发反而受到抑制。碳水化合物是一切生命所必需的,花粉的萌发也离不开糖的参与,它一方面可维持花粉管的渗透平衡,防止花粉过度吸水涨破,另一方面,还可作呼吸底物和合成淀粉的原料,作为花粉萌发的能量来源,同时也是花粉萌发和花粉管壁合成的主要营养物质^[11-14]。花粉萌发通常是多因子共同作用的结果,本试验表明,红花矮牡丹花粉萌发适宜的蔗糖和硼酸为 9%蔗糖+0.004 5%硼酸,萌发率达 62.37%。培养基中添加硼酸和蔗糖有利于花粉管生长。

低温、较低的湿度可降低花粉呼吸作用及其他生理功能,有利于花粉较长时期保存活力^[4,11]。但温度过高或过低,对保持花粉的生活力都不利^[9-14]。试验发现,红花矮牡丹经超低温保存后出现花粉萌发率明显升高的“冷刺激”现象。张玉进等^[15]对魔芋(*Amorphophallus konjac* ‘Wanyuan’)花粉以及 Van Der Walt 等^[12]在对山龙眼属(*Helicia*)花粉的超低温保存研究中都发现了这种“冷刺激”现象,但该现象出现的机理目前尚不清楚,有待于进一步研究。本研究表明不同贮藏条件下,红花矮牡丹花粉生活力有很大差异,常温贮藏时,红花矮牡丹生活力下降得很快,仅能维持 22 d; 4 °C 冷藏,花粉生活力可以维持 82 d; -20, -80, -196 °C 冷冻贮藏花粉生活力可以维持 300 d 以上。所以,在牡丹远缘杂交育种时常花期不遇,可以利用相应方法保存花粉,但从节省成本考虑, -20 °C 低温保存是红花矮牡丹较适宜的贮藏保存方法。

参考文献:

- [1] 裴颜龙.牡丹复合体的研究[D].中国科学院植物研究所博士论文,1993:10-22.
- [2] 关克俭.中国植物志[M].科学出版社,1979(27):41-45.
- [3] 傅立国,金鉴明.中国植物红皮书-稀有濒危植物第一册[M].北京:科学出版社,1992:530-564.
- [4] 潘瑞炽.植物生理学[M].高等教育出版社,2004(6):101-112.
- [5] 贾文庆,刘会超,姚连芳.紫薇花粉萌发特性研究[J].西北林学院学报,2007,22(06):18-20.
- [6] 姜正旺,王圣梅,张忠慧,等.猕猴桃属花粉形态及其系统学意义[J].植物分类学报,2004,42(3):245-260.
- [7] 袁涛,王莲英.几个牡丹野生种的花粉形态及其演化、分类的探讨[J].北京林业大学学报,1999,21(1):17-21.
- [8] 杨秋生,万卉敏,孙俊娅等.牡丹栽培品种群花粉形态的比较[J].林业科学,2010,46(6):133-135.
- [9] Bach A,Cecot A.Application of double-phase culture media in micropropagation of *Hyacinthus orientalis* cv.carnegie. II .Effect of auxins on growth and development[J].Acta Horticulturae,1989,251:215-221.
- [10] Sukhvilul N, Hetherington S E, Whiley,A.W., et al. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth and seed development in mango(*Mangifera indica* L.)[J].Acta Hort,2000,56(509):609-616.
- [11] 郑诚乐,俞晓曲,王晓飞,等.锥栗花粉生活力的研究[J].江西农业大学学报,2004,26(2):200-202.
- [12] Van Der Walt I David, Littlejohn G M.Storage and viability testing of protea pollen[J].J Amer Soc Hort Sci,1996,121(5):804-809.
- [13] 刘会超,贾文庆,尤扬.红花酢浆草花粉萌发及贮藏特性的研究[J].江西农业大学学报,2010,32(1):185-189.
- [14] 王其刚,张颢,蹇洪英.月季‘云粉’、‘云玫’的花粉活力和柱头可授性研究[J].江西农业大学学报,2010,32(3):458-461.
- [15] 张玉进,张兴国,刘佩瑛.魔芋花粉的低温和超低温保存[J].园艺学报,2000,27(2):139-140.