

红花酢浆草花粉萌发及贮藏特性的研究

刘会超, 贾文庆, 尤扬, 赵晓美

(河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003)

摘要:以红花酢浆草花粉为试材,利用离体培养法、碘-碘化钾染色法、醋酸洋红染色法和 TTC(氯化三苯基四氮唑)染色法对花粉生活力进行测定,探讨扫描电镜下花粉形态结构与花粉萌发之间的关系,并研究不同贮藏条件对花粉萌发的影响。结果表明:花粉培养基中添加不同质量浓度的蔗糖和硼酸对花粉的萌发有促进作用,红花酢浆草花粉萌发的最适培养基为:150 g/L 蔗糖 + 0.04 g/L 硼酸,萌发率达 31.45%。花粉萌发率与饱满花粉占花粉总数的百分率一致。花粉生活力随贮藏时间的延长而下降,不同的贮藏条件对其有显著的影响,最佳贮藏温度为 -80℃。花粉在 -80℃ 耐贮藏力长达 30 d,贮藏 28 d 后花粉萌发率仍达到 1.30%。

关键词:红花酢浆草;花粉;萌发;生活力;贮藏

中图分类号:Q949.752.1;Q945.34 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0185-05

A Study on the Characteristics of Pollen Germination of *Oxalis corymbosa*

LIU Hui-chao, JIA Wen-qing, YOU Yang, ZHAO Xiao-mei

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

Abstract: Taking the fresh pollen of *Oxalis corymbosa* as the experiment material, using methods of culture in vitro, I₂-KI staining, carmine acetate dyeing and TTC staining its fresh pollen ability was determined. The effects of different storage conditions on the pollen germination were studied, too. The results showed that culture media with different mass concentrations of sucrose and boric had good effects on the pollen germination. The pollen germinating percentage reached the highest after incubated on the media supplemented with 15% sucrose and 0.004% boric acid. The pollen germinating percentage was consistent with the percentage of plump pollens. The vitality of pollen gradually descended prolongation of storage time. -80℃ was the best storage temperature to keep the vitality of pollen. When preserved at -80℃, the pollen had the storage ability of 30 d. After 28 d storage, the germination rate of the pollen was 1.30%.

Key words: *Oxalis corymbosa*; pollen; germination; viability; storage

红花酢浆草(*Oxalis corymbosa*)为酢浆草科酢浆草属多年生草本,别名三叶草、夜合梅等。具有植株低矮、整齐,花多叶繁,花期长,花色艳,覆盖地面迅速,又能抑制杂草生长等诸多优点,是园林中广泛种植的地被植物之一^[1,2]。

花粉在有性繁殖中传递着雄性亲本的遗传信息,早期采集、贮存花粉、花粉生活力测定是进行人工辅助授粉或杂交授粉的基础^[3]。不同类群植物花粉在自然条件下的寿命、花粉的适宜贮存、营养条件

收稿日期:2009-10-13 修回日期:2009-11-12

基金项目:河南省创新人才工程(2005-126-49)、河南科技学院博士基金(050106)和河南科技学院重点项目基金(050121)资助项目

作者简介:刘会超(1964-),博士,教授,主要从事观赏植物生物技术研究。

以及花粉生活力的适宜测定方法均有所差异^[3]。

国内学者主要对红花酢浆草的生物学特性^[2]、繁殖栽培^[2]、病虫害防治^[4]及在园林绿化中的应用^[2,5]进行了较为深入的研究。但有关红花酢浆草花粉生活力测定及贮藏特性研究尚未见报道,为此笔者对红花酢浆草花粉的萌发及贮藏特性进行了研究,以期对红花酢浆草育种及品种改良提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料的采集与处理

于河南科技学院校园采集盛花期红花酢浆草含苞欲放的花朵,带回实验室后去除花瓣取花药于培养皿内,置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱散粉 12 h 后,收集花粉备用。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉的形态观察 将干燥花粉(真空干燥 3 h)和新鲜花粉涂于黑色导电胶上,放在扫描电镜下观察测定。①用扫描电镜测定花粉的极轴和赤道长度,并计算 P/E 值。②通过扫描电镜照片观察远极面、近极面和局部的外壁纹饰、网眼大小和网脊宽度,测量、记录数据。

1.2.2 最佳培养基配方的筛选 试验采用两因素(蔗糖、硼酸)随机区组设计,蔗糖质量浓度选取 0, 100, 150, 200, 250 g/L;硼酸质量浓度选取 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 g/L。

取 2 滴培养基于凹玻片的凹处,待冷却后用头发丝蘸取些花粉均匀散于培养基上,将凹玻片置于铺有 2 层湿滤纸的培养皿中,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养 2, 4, 8, 16 h 后,观察统计出萌发的花粉数和未萌发的花粉粒数。计算萌发率,每处理重复 3 次,每重复统计花粉数不少于 100 粒。

1.2.3 $\text{I}_2 - \text{KI}$ 染色法 称取碘化钾 2 g,溶解于 7 mL 的蒸馏水中,然后加入 1 g 碘,待全部溶解后,再用蒸馏水定溶至 100 mL,配置成 $\text{I}_2 - \text{KI}$ 溶液,置于 4°C 冰箱中备用。然后用经过乙醇消毒的发丝蘸取少量花粉放于干净的普通载玻片凹槽内,加水 1 滴,使花粉散开,再加 1 滴 $\text{I}_2 - \text{KI}$ 溶液,静置 3 ~ 4 min 后置于显微镜下观察。染色后具较强活力花粉呈蓝黑色,较弱的为淡蓝色,无活力的无色。观察时,同样每个凹槽取 3 个视野,计算有生活力花粉百分率的平均值。

1.2.4 TTC(氯化三苯基四氮唑)染色法 配制 5 g/L TTC 溶液:称取 0.5 g TTC 放入烧杯中,加少许体积分数 $\varphi(\text{乙醇}) = 95\%$ 使其溶解,然后用蒸馏水稀释至 100 mL。取少许花粉放在载玻片上,加 1 ~ 2 滴 5 g/L TTC 溶液,盖上盖玻片,置 30°C 恒温箱中,10 ~ 15 min 后镜检。观察 2 ~ 3 张片子,每片取 5 个视野镜检,凡被染红色的花粉活力强,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,以此表示花粉活力的百分率。

1.2.5 醋酸洋红染色法 取少许花粉于载玻片上,加水 1 滴,再滴 1 滴醋酸洋红溶液(将 0.5 g 洋红于 50 mL 的冰醋酸混合煮沸,煮时加铁钉 1 枚,以增强染色效果),立刻置于显微镜下观察。凡被染成红色的均为有生活力的花粉。

1.2.6 不同贮藏条件对花粉生活力的影响 花粉采集阴干后,装入离心管放在以下 6 种环境条件下贮存:A. 室温;B. 室温(真空干燥);C. 4°C ;D. 4°C (真空干燥);E. -80°C ;F. -80°C (真空干燥)。贮藏 1、3、6、10、15、21、28 d 后,取出花粉置于 1.2.2 所得最佳培养基培养,16 h 后观察统计花粉萌发率。

2 结果与分析

2.1 红花酢浆草花粉的形态观察

经扫描电镜(3 000 倍)观察,花粉粒有卵形,平均极轴长 $34.48 \mu\text{m}$,平均赤道轴长 $21.70 \mu\text{m}$,极面轮廓三裂圆形 $P/E \approx 1.6$ (图 I :2、5);球形 $P/E < 1.6$ (图 I :1);长方形 $29.54 \mu\text{m} \times 17.43 \mu\text{m}$, $P/E > 1.6$ (图 I :4);瘿形平均极轴长 $15.92 \mu\text{m}$,平均赤道轴长 $10.60 \mu\text{m}$ (图 I :3、6)。具 3 孔沟,沟长达两极,沟中部较宽,两端尖(图 I :5)。外壁具规则网状雕纹。网眼大小不一,形状较不规则,网脊边缘光滑。新鲜花粉在扫描电镜下没有干燥花粉清晰,而且瘿的比较多(占 32.50%)(图 I)。

2.2 离体培养法对红花酢浆草花粉萌发的影响

表 1 表明,在不含蔗糖的培养基中,花粉萌发受到抑制,16 h 时花粉萌发率仅为 1.89%。培养基中加入蔗糖可有效提高花粉的萌发率,如蔗糖质量浓度为 200 g/L 时,花粉培养 16 h 萌发率达到 13.73% 显

著高于其他处理。但是随着蔗糖质量浓度的提高,花粉萌发又受到抑制,当蔗糖质量浓度为 250 g/L 时,花粉培养 16 h 其萌发率只有 12.70%。所以,适宜红花酢浆草花粉萌发的蔗糖质量浓度为 200 g/L。

表 1 花粉在完全随机试验中 16 h 的萌发状况

Tab. 1 The condition of pollen germination in the completely random after 16 h

萌发率/% Germination percentage		蔗糖质量浓度/(g·L ⁻¹) Mass concentration of sucrose				
		0	100	150	200	250
硼酸质量浓度 /(g·L ⁻¹)	0.00	1.89 ± 0.02Yy	8.24 ± 0.02TUt	9.36 ± 0.19Ss	13.73 ± 0.20Mm	12.70 ± 0.07Nn
	0.01	2.20 ± 0.04Xx	9.69 ± 0.02Rr	23.70 ± 0.03Ee	16.95 ± 0.00Kk	10.00 ± 0.07Qq
Mass concentration of boric acid	0.02	3.00 ± 0.02Ww	16.20 ± 0.06Ll	26.36 ± 0.01Dd	19.21 ± 0.05Jj	8.03 ± 0.04Uu
	0.03	7.78 ± 0.07Vv	19.10 ± 0.07Jj	29.52 ± 0.04Bb	20.10 ± 0.07Ii	11.70 ± 0.07Pp
	0.04	9.43 ± 0.00Ss	22.17 ± 0.06Ff	31.45 ± 0.00Aa	21.17 ± 0.04Hh	12.35 ± 0.00Oo
	0.05	8.37 ± 0.05Tt	21.87 ± 0.00Gg	27.73 ± 0.05Cc	17.03 ± 0.04Kk	9.30 ± 0.07Ss

随着硼酸质量浓度的增加,花粉的萌发率呈先升后降的趋势。当培养基中硼酸质量浓度为 0.04 g/L 时,花粉的萌发率最高,达到 9.43%。硼酸质量浓度超过 0.04 g/L 时,花粉的萌发率随之下降。当培养基中的硼酸质量浓度增加到 0.05 g/L 时,花粉的萌发率下降为 8.37%,表明高质量浓度硼酸使花粉萌发受到严重抑制,因此最适合红花酢浆草花粉萌发的硼酸质量浓度为 0.04 g/L。

试验统计发现 200 g/L 蔗糖 + 0.04 g/L 硼酸培养基并不是花粉萌发的最佳方法。表 1 表明,蔗糖和硼酸最佳的培养基为:150 g/L 蔗糖 + 0.04 g/L 硼酸,花粉萌发率最高,萌发率达 31.45%。

2.3 碘-碘化钾染色结果

观察发现,用碘-碘化钾染色后,染成深蓝色(即有生活力)的花粉有 85.30%,黄褐色(即缺失生活力)的花粉为 14.70%;与离体萌发法最高仅为 31.45% 相比,差距很大,说明碘-碘化钾法不能准确地测定红花酢浆草花粉生活力。

2.4 TTC 法染色结果

观察统计结果表明,用 TTC 染色后,所观察的视野中红花酢浆草的花粉粒均未染色,这说明 TTC 法对花粉染色困难,不能作为测定红花酢浆草花粉生活力的染色剂。

2.5 醋酸洋红染色结果

醋酸洋红染色后,呈深红色(即有生活力)的花粉粒达 71.41%,浅红(无生活力)的花粉粒为 28.59% (图 II:8)。结果表明,醋酸洋红染色法测定的花粉生活力明显高于离体萌发法的测定结果,也不能准确地测定红花酢浆草花粉生活力。

2.6 不同贮藏环境条件对花粉生活力的影响结果

由表 2 可看出,室温与室温真空干燥两种贮藏环境条件下,干燥的花粉萌发率要高,在同一贮藏环

表 2 不同贮藏环境条件下花粉萌发率

Tab. 2 Pollen sprout rate under the dissimilarities store condition

%

时间/d Time	处理 Treatment					
	常温 Room temperature	常温 + 干燥 Room temperature + drying	4 °C	4 °C + 干燥 4 °C + Drying	-80 °C	-80 °C + 干燥 -80 °C + Drying
1	12.47 ± 0.04E	13.45 ± 0.03D	17.96 ± 0.00C	20.26 ± 0.01A	20.08 ± 0.08B	3.20 ± 0.06F
3	2.40 ± 0.05F	6.08 ± 0.03 E	24.46 ± 0.03 A	22.67 ± 0.10 B	10.34 ± 0.03D	13.52 ± 0.55C
6	0.00 ± 0.00E	0.00 ± 0.00 E	16.08 ± 0.03D	21.20 ± 0.06 A	20.08 ± 0.03B	18.63 ± 0.04C
10	0.00 ± 0.00D	0.00 ± 0.00 D	3.35 ± 0.05C	16.33 ± 0.04 B	22.60 ± 0.06A	22.66 ± 0.01A
15	0.00 ± 0.00 E	0.00 ± 0.00 E	1.00 ± 0.07 D	10.13 ± 0.04 C	15.20 ± 0.07B	16.0 ± 0.07A
21	0.00 ± 0.00 D	0.00 ± 0.00 D	0.00 ± 0.00 D	3.15 ± 0.07 C	6.24 ± 0.18B	8.70 ± 0.07 A
28	0	0	0	0	0	1.30 ± 0.07 A

境条件下,随着贮藏天数的增加花粉萌发率有明显下降的趋势,常温贮藏 6 d 后花粉就不再萌发。4 ℃ 贮藏的花粉萌发趋势是先增后减,但短期内(1~21 d) 4 ℃ 低温贮藏要比室温下贮藏生活力要高,干燥以后其效果更明显。而 -80 ℃ 超低温贮藏未干燥的花粉萌发趋势是先减后增再减,贮藏 21 d 的花粉萌发率仅为 3.15%。而 -80 ℃ 超低温干燥贮藏的花粉萌发率是呈先递增后下降的趋势,28 d 后 -80 ℃ 干燥贮藏的花粉萌发率仍有 1.30%。综合比较,红花酢浆草花粉贮藏的最佳方式为 -80 ℃ 干燥贮藏,可较长时间保持花粉生活力,贮藏 28 d 花粉仍有萌发。室温环境不利于花粉的长期贮藏。

3 结论与讨论

3.1 红花酢浆草花粉的形态

花粉形态特征是探讨植物起源、演化及亲缘关系的重要特征之一,其不仅可用于种的鉴定,还可用于品种群的划分和品种鉴定^[6]。本研究对红花酢浆草花粉大小及形态作了较为宏观的描述,表明红花酢浆草花粉属于小型花粉,花粉球型的比例较低,而卵型、长方形和瘪的较多。大多数研究花粉形态主要是与分类有关^[7],而研究花粉形态与萌发状况的却很少。本研究表明花粉萌发的绝大多数是球形,球形花粉在全部花粉所占的比率和花粉的萌发率基本一致,说明花粉的萌发和花粉的形态具有相关性(图 II:1~7)。

3.2 离体萌发法对红花酢浆草花粉萌发的影响

在离体培养花粉萌发实验中,测定植物花粉萌发率的培养基一般都由蔗糖、琼脂和硼酸组成。硼酸可以促进糖的吸收和代谢,与糖结合能极大地提高花粉的萌发率,增加氧气的含量和吸收,参与果胶物质的合成^[8],利于花粉管的形成。

研究表明,蔗糖对红花酢浆草花粉的萌发有着重要的作用,在培养基中可以维持花粉与培养液之间的渗透平衡^[9]。本试验结果表明,蔗糖质量浓度在 0~150 g/L 时,红花酢浆草花粉的萌发率随蔗糖质量浓度的增加而增加,超过 150 g/L 时,花粉萌发率呈下降趋势。蔗糖也为花粉的萌发和花粉管的生长提供营养物质,在不含蔗糖的情况下,花粉的萌发率最高仅为 9.43%;但蔗糖质量浓度过高或过低对红花酢浆草花粉的萌发都会产生不良的影响,质量浓度过低时,花粉壁就会破裂,内容物散出;浓度过高,会造成花粉的质壁分离,抑制花粉萌发生长^[10]。

本试验表明,最适合红花酢浆草花粉萌发和花粉管生长的培养基为 0.8 g/L 琼脂 + 150 g/L 蔗糖 + 0.04 g/L 硼酸,萌发率最高为 31.45%。

3.3 染色法对红花酢浆草花粉萌发的影响

碘-碘化钾染色法是检测花粉生活力常用的方法,其原理是新鲜的花粉有淀粉积累,遇碘呈蓝色反应。本试验发现,碘-碘化钾染色法测定红花酢浆草花粉生活力结果较离体萌发法明显偏高,说明碘化钾溶液染色法不适用于对其花粉活力的测定。一般来说,TTC 染色法对大多数植物都是适合的,有关研究表明:TTC 染色法适用于锦带花^[11]、芍药^[12]等花粉生活力的测定。但本试验的结果却表明,TTC 无法使红花酢浆草花粉着色,可能是其花粉自身特性的影响所致。醋酸洋红染色后的红花酢浆草花粉生活力比离体萌发法测定的结果也高。醋酸洋红法的染色主要靠花粉中的脱氢辅酶而染色,当花粉失去活力时,该酶的活性仍然存在,所以该方法的测定结果偏高^[13]。所以 3 种染色法都不适合测定红花酢浆草花粉生活力。

3.4 不同贮藏环境条件对花粉生活力的影响

花粉生活力的强弱受遗传因素和环境因素的影响。低温可降低花粉呼吸作用及其他生理功能,有利于花粉较长时间保存活力^[14]。但随着贮藏时间的增加,花粉内贮藏物质的消耗增多,酶活性下降,水分逐步流失,花粉的生活力会逐渐下降。-80 ℃ 冷冻干燥贮藏的花粉萌发率从低到高的增长,可能是因为低温干燥导致花粉中的酶或其他化学物质发生生理生化变化,致使花粉萌发率降低,随着贮藏时间延长,酶活性逐渐恢复,萌发率逐渐提高,至于具体原因还有待进一步的验证和探讨。

低温保存是目前植物种质资源保存中较理想的途径。低温贮藏的红花酢浆草花粉可直接用于杂交育种中的授粉,为进一步培育新品种奠定基础,也对其长期保存提供了基础性的技术保障。本研究表明,红花酢浆草花粉在 -80 ℃ 低温保存可长时间保存生活力。

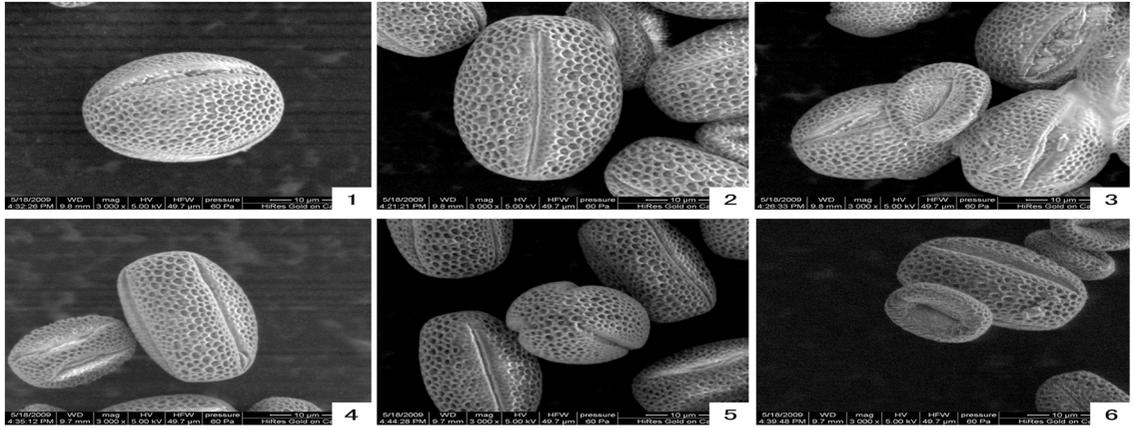


图 I (放大 3 000 倍) 1. 球形花粉; 2. 卵形花粉; 3. 瘪形花粉; 4. 长方形花粉; 5 花粉极面; 6. 瘪形花粉; 1~3 干燥花粉; 4~6 新鲜花粉

Fig. I 1. Round pollen; 2. Oval pollen; 3. Shrivelled shape pollen; 4. Rectangular pollen; 5. Poleof pollen; 6. Shrivelled shape pollen; 1~3 Dry pollen; 4~6 Fresh pollen

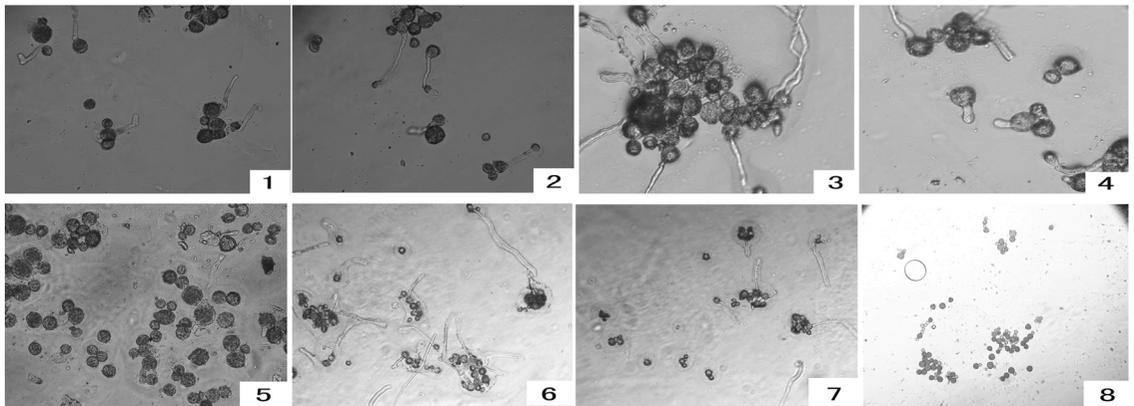


图 II 1~7. 萌发照片(放大 40 倍); 8. 醋酸洋红染色照片(放大 10 倍)

Fig. II 1~7. Photos of pollen germination; 8. Photos of carmine acetate dyeing

参考文献:

[1] 牛广瀑 朱春荣 孔祥芝 等. 红花酢浆草的繁殖栽培及园林应用[J]. 河北林业科技 2005(1):48.
 [2] 罗天琼 莫本田. 红花酢浆草生物学特性研究[J]. 贵州农业科学, 1997 25(4):49-53.
 [3] 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(6):18-20.
 [4] 庄少斌. 防治红花酢浆草岩螨[J]. 花木盆景:花卉园艺版 2003 8:28.
 [5] 张良 张彩莹 何民桢. 红花酢浆草在园林绿化中的应用[J]. 中国野生植物资源 2006 25(5):30.
 [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] 蔡秀珍 刘克明 朱晓文 等. 凤仙花属部分植物的花粉形态[J]. 园艺学报 2008 35(3):389-394.
 [8] 贾文庆 刘会超. 垂丝海棠花粉生活力测定的研究[J]. 广东农业科学 2007(1):32-34.
 [9] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社 2001:260.
 [10] Wang Q L, Lu L D, Wu X Q et al. Pollen storage and viability determination[J]. Chin Bull Bot 2002, 19(3):365-372.
 [11] 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, 19:4889-4891.
 [12] 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.
 [13] Abdullah M, Yousef A M, Mollaa H et al. Cross compatibility between *Abemoschus esculentus* and *A. moschatus* [J]. Euphytica 2000 32(114):175-180.
 [14] Sukhvilub N, Hetherington Vivithanage S E, Whiley W, et al. Effect of temperature on pollen tube growth, seed development in mango (*Mangifera indica* L.) [J]. Acta Hort 2000, 106(509):609-616.