

不同培养基及不同贮藏条件对金娃娃萱草花粉生命力的影响

王 玲, 祝朋芳*, 毛洪玉

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以金娃娃萱草(*Heemerocallis hybridus*)的花粉为材料,研究了不同培养基及不同贮藏条件对金娃娃萱草花粉生命力的影响。结果表明:金娃娃萱草花粉萌发的适宜液体培养基为蔗糖 $150\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 硼酸 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 氯化钙 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;适宜的染色剂为 TTC,染色时间为 30~35 min。不同贮藏条件下,金娃娃萱草花粉生命力有很大差异,常温贮藏时,花粉生命力下降很快,生命力仅能维持 15 d; -60°C 干燥超低温冷冻贮藏效果最好,花粉生命力可维持 30 d 以上。

关键词:花粉生命力;培养基;贮藏条件

中图分类号:S718.3

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2009)03-0095-03

Viability of the Pollen of *Heemerocallis hybridus* under Different Media and Store Conditions

WANG Ling, ZHU Peng-fang, MAO Hong-yu

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: Viability of the pollen of *Stella Doro* under the different media and the store conditions was investigated. The results showed that the liquid medium supplemented with sucrose $150\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ boracic acid + $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ chloridize calcic and TTC and the dyeing time of 30~35 min were suitable for the pollen germination. The viability varied significantly under different storage conditions; the viability of the pollen decreased evidently under storage temperature of 26°C , only lasted 15 days, -60°C refrigeration was the best, the viability can last more than 30 days.

Key words: viability of pollen; medium; store condition

萱草属植物分布广泛,且花期不一致,如果杂交的两亲本之间花期不遇,或者涉及到异地杂交问题,需要对采集的花粉进行贮藏或运输。在这些过程中,花粉的生命力受到一定程度的影响,进一步影响到杂交的成功率。因此,运输贮藏前后、杂交之前都要对花粉生命力进行测定,并且要充分掌握花粉生命力和贮藏特性,从而可以正确地选择父母本,配置合理的杂交组合,确保杂交的成功。国内外尚未见萱草属花粉生命力相关研究报道。以我国近年来引种栽培的大花萱草品种^[1]——金娃娃萱草(*Heemerocallis hybridus*)为试材,筛选出了最适宜其花粉萌发的培养基配方,以及最适宜的染色剂和染色时间,并测定了不同条件下花粉的贮藏力,以期扩大萱草属植物资源提供基础依据^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大花萱草品种金娃娃开放当天的花粉。

1.2 方法

1.2.1 液体培养基的筛选 (1)新鲜花粉单因子试验设计。将金娃娃萱草的新鲜花粉置于不同浓度的蔗糖、硼酸、氯化钙单因子培养液(即对应浓度的水溶液)中,在 20°C 条件下光照培养 3~4 h。每处理 3 次重复,每重复观察 3 个视野,然后计算平均值。以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准。萌发率 = 已萌发的花粉粒数/花粉粒总数 $\times 100\%$ ^[3]。

(2)正交试验设计。将金娃娃萱草的新鲜花粉

收稿日期:2008-10-08 修回日期:2008-11-24

基金项目:沈阳农业大学中青年硕士导师基金

作者简介:王玲,女,硕士研究生,从事园林植物遗传育种研究。

*通讯作者:祝朋芳,女,博士,副教授,从事园林植物遗传育种研究。E-mail: pengfangzhu@yahoo.com.cn.

置于不同浓度蔗糖、硼酸、氯化钙多因子培养液中培养,进行与水平因子正交试验设计。处理、观察及计算方法同上。

1.2.2 化学药剂的筛选 (1)花粉染色剂的筛选。用次甲基兰、醋酸洋红、联苯胺、 α -萘酚、甲乙液、TTC(2,3,5-氯代三苯基四氮唑)对金娃娃萱草花粉进行染色^[4],并计算染色率。每种染色剂3个重复,每重复观察3个视野,然后计算平均值。以最适培养液法测得的花粉生命力为对照。染色率=着色的花粉粒数目/花粉粒总数 $\times 100\%$ 。

(2)TTC染色时间的筛选。将待测花粉置于载玻片上,加1~2滴0.5% TTC 盖上盖玻片,然后置于35℃恒温箱内染色不同时间后^[5],观察花粉的染色情况,每处理3个重复,每重复观察3个视野,然后计算平均值。

1.2.3 贮藏新鲜花粉 将金娃娃萱草的新鲜花粉经室内阴干(以不粘手为度),去除杂质后装入指形管中,采用石灰不作为干燥剂^[6],分别进行常温、常温干燥、0~4℃冷藏、0~4℃干燥冷藏、-20℃冷冻、-20℃干燥冷冻、-60℃超低温、-60℃干燥超低温冷冻贮藏,并每隔一段时间,采用最适宜液体培养基对贮藏花粉进行生命力测定。处理、观察及计算方法同上。

2 结果与分析

2.1 新鲜花粉萌发液体培养基筛选

2.1.1 适宜单因子蔗糖、硼酸、氯化钙浓度的筛选 由表1知,采用不同浓度的蔗糖培养基,花粉萌发率均呈差异极显著。在一定范围内,花粉萌发率随蔗糖浓度的增加而升高,在浓度为150 g·L⁻¹时,萌发率最高,为10.02%;大于150 g·L⁻¹时,萌发率随浓度增大而降低,浓度过高会使花粉粒脱水过快,引起质壁分离。

表1 不同处理条件下金娃娃萱草花粉的萌发率^①

Table 1 Germination rate of *H. hybridus* in different treatments

蔗糖/ (g·L ⁻¹) 萌发率/%		硼酸/ (mg·L ⁻¹) 萌发率/%		氯化钙/ (mg·L ⁻¹) 萌发率/%	
0	1.05 Ff	0	1.05 Ff	0	1.05 Ff
50	4.45 Cc	10	9.02 Dd	10	4.81 Cc
100	7.27 Bb	20	13.21 Aa	20	8.64 Aa
150	10.02 Aa	30	11.53 Bb	30	5.17 Bb
200	3.89 Dd	40	10.87 Cc	40	3.03 Dd
250	3.54 Ee	50	6.43 Ee	50	1.59 Ee

①不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

不同浓度硼酸培养时,各处理间花粉萌发率均呈差异极显著,萌发率随硼浓度的不同而不同。在

无蔗糖的条件下,20 mg·L⁻¹ 硼酸使花粉萌发率最高,为13.21%。

不同浓度氯化钙培养下的花粉萌发率间也均呈极显著差异,但萌发率较硼酸低。在无蔗糖条件下,20 mg·L⁻¹ 氯化钙溶液处理的萌发率最高,达到8.64%。

2.1.2 多因子组合培养液的筛选 对表2中数据进行分析,影响因子从高到低依次为:硼酸、蔗糖、氯化钙。

表2 金娃娃萱草花粉萌发正交试验

Table 2 Orthogonal experiment on germination rate of *H. hybridus*

处理号	蔗糖/ (g·L ⁻¹)	硼酸/ (mg·L ⁻¹)	氯化钙/ (mg·L ⁻¹)	萌发率/%
1	0	0	0	1.05
2	0	10	10	9.02
3	0	20	20	23.21
4	0	30	30	21.53
5	0	40	40	10.87
6	50	0	20	4.45
7	50	10	30	20.02
8	50	20	40	25.03
9	50	30	0	23.24
10	50	40	10	10.63
11	100	0	40	7.27
12	100	10	0	24.68
13	100	20	10	28.54
14	100	30	20	25.03
15	100	40	30	11.84
16	150	0	10	26.03
17	150	10	20	30.54
18	150	20	30	52.69
19	150	30	40	25.36
20	150	40	0	13.35
21	200	0	30	3.89
22	200	10	40	9.32
23	200	20	0	15.26
24	200	30	10	9.46
25	200	40	20	8.03
R	20.402 0	20.408 0	6.478 0	
F	8.721 0	9.765 6	0.419 2	

将蔗糖、硼酸、氯化钙3因子进行多重比较,结果表明,蔗糖含量150 g·L⁻¹与200 g·L⁻¹差异达到了极显著水平($P<0.01$),其他浓度差异不显著,150 g·L⁻¹效果最好。硼酸含量20 mg·L⁻¹与0 mg·L⁻¹差异达到极显著水平,20 mg·L⁻¹效果最好。氯化钙5个浓度的差异均未达到极显著水平,30 mg·L⁻¹效果最好。

2.2 新鲜花粉萌发化学染色剂的筛选

2.2.1 花粉染色剂的筛选 研究表明,由于金娃娃萱草花粉自身的特性,采用次甲基兰、联苯胺、 α -萘酚均无法使花粉粒着色;采用醋酸洋红染色,花粉粒均被染成红色,因此,它们不能作为测定金娃娃萱草花粉生命力的染色剂;用0.5% TTC 对花粉染色,

可以看到一部分花粒被染上红色,一部分花粉粒不着色,两者差别明显,因此,TTC 可以作为测定金娃娃萱草花粉生命力的染色剂。

2.2.2 TTC 染色时间的筛选 由表 3 可以看出,花粉染色率随染色时间的延长而升高,不同染色时间之间均呈现极显著差异。在染色时间为 30~35 min 时,染色率最高,为 49.75%。因此,可以把 30~35 min 作为 TTC 法测定金娃娃萱草花粉生活力的染色时间。

表 3 染色时间对金娃娃萱草花粉染色率的影响^①

Tabel 3 Dyeing rate of *H. hybridus* dyed by TTC for different dyeing times

染色时间/min	15	20	25	30	35
染色率/%	19.25 Ee	25.47 Dd	38.33 Cc	44.58 Bb	49.75 Aa

①不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

表 4 不同贮藏条件下金娃娃萱草花粉的生命力及贮藏力

Tabel 4 The viability and storability of *H. hybridus* under different conditions

贮藏时间/d	贮藏条件							
	常温	常温干燥	0~4℃	0~4℃干燥	-20℃	-20℃干燥	-60℃	-60℃干燥
0	52.69 Aa	52.69 Aa	52.69 Aa	52.69 Aa	52.69 Aa	52.69 Aa	52.69 Aa	52.69 Aa
5	19.43 Bb	24.23 Bb	42.07 Bb	46.12 Bb	43.25 Bb	39.13 Bb	51.08 Bb	52.04 Bb
10	12.49 Cc	15.26 Cc	35.94 Cc	38.24 Cc	39.33 Cc	25.25 Cc	39.04 Cc	45.25 Cc
15	5.98 Dd	8.26 Dd	24.62 Dd	28.93 Dd	21.79 Dd	17.48 Dd	36.57 Dd	40.23 Dd
20	0	5.04 Ee	18.18 Ee	20.23 Ee	8.77 Ee	3.32 Ee	25.75 Ee	38.12 Ee
25		0	12.50 Ff	16.43 Ff	1.26 Ff	0	20.05 Ff	29.12 Ff
30			4.27 Gg	8.25 Gg	0		15.87 Gg	25.25 Gg

3 结论与讨论

适宜金娃娃萱草花粉萌发的培养液为蔗糖 150 g·L⁻¹+硼酸 20 mg·L⁻¹+氯化钙 30 mg·L⁻¹。研究表明,金娃娃萱草花粉萌发率随蔗糖浓度的增加而升高,在浓度为 150 g·L⁻¹时,萌发率最高,为 10.02%,大于 150 g·L⁻¹时,萌发率随蔗糖浓度的增大而降低。在植物花粉萌发的液体培养基试验中,蔗糖除了能够为花粉提供能源和碳源外,还能够起到调节渗透压的作用^[7],但浓度过高会使花粉粒脱水过速,引起质壁分离,从而抑制了花粉的萌发。蔗糖作为一种能量的来源,可以被葡萄糖、砂糖和绵白糖等代替,调节糖的浓度同样可以达到较高的萌发率^[8]。

硼酸对促进金娃娃萱草花粉萌发的作用最大,适宜的浓度为 20 mg·L⁻¹,氯化钙的作用次之,适宜的浓度为 30 mg·L⁻¹。用纯水培养花粉会导致花粉粒外壳破裂,原生质外渗;高浓度的硼酸、氯化钙会导致原生质体失水,花粉粒外壳与原生质体分离^[9],只有条件适宜的培养液才能使花粉正常萌发。硼在植物体内含量很低,并且分布不均匀,但以花中

2.3 不同贮藏条件对金娃娃花粉生命力的影响

由表 4 可知,不同贮藏条件对花粉生命力及贮藏力有很大影响,均呈现极显著差异。常温贮藏,金娃娃花粉生命力下降很快,生命力仅能维持 15 d;常温干燥贮藏,贮藏前期花粉生命力下降较快,而后期下降缓慢;0~4℃冷藏贮藏,花粉生命力维持时间相对较长,25 d 后生命力能维持 10%以上,这样的花粉可以进行杂交授粉;0~4℃干燥冷藏贮藏效果好于非干燥条件;-20℃冷冻贮藏,花粉生命力能维持 20 d,冷冻贮藏效果略好于干燥冷冻贮藏,可能是由于冷冻条件会使细胞脱水,在干燥剂存在的条件下,会加剧脱水过程,使细胞过度脱水,不利于花粉生命力的维持;-60℃超低温冷冻贮藏条件下,花粉生命力下降缓慢,且生命力维持时间最长,这样的花粉适合杂交授粉,且干燥超低温贮藏优于非干燥贮藏。

含量最高,花中又以柱头和子房为最高^[7]。硼能参与果胶物质的合成,有利于花粉管壁的建造,从而促进了花粉萌发与花粉管的伸长^[10]。据前人的研究,可能因为硼离子与蔗糖分子形成络合物加速了蔗糖的运输速度,从而促进了糖的吸收与代谢^[7];在花柱组织中存在 Ca²⁺ 浓度梯度^[11],它是指引花粉管生长的一个基本因素,因此,含 Ca²⁺ 的培养液也可能在一定程度上对花粉萌发起到了类似的促进作用^[12]。根据本研究结果,当蔗糖、硼酸、氯化钙共同作用时,钙离子的作用不显著。关于离子间如何相互作用而导致了在促进花粉萌发时钙离子的附属作用,还有待进一步研究。

适宜金娃娃萱草花粉的染色剂为 TTC,适宜染色时间为 25~30 min。

不同贮藏条件对金娃娃萱草新鲜花粉生命力以及贮藏力影响差异很大。常温贮藏条件下,花粉生命力下降很快,仅能维持 15 d;-60℃干燥超低温冷冻贮藏条件时,花粉生命力下降缓慢,且生命力维持 30 d 以上。新鲜的金娃娃萱草花粉在不同贮藏条件下,生命力以及贮藏力有很大差异,贮藏效果为:

(下转第 108 页)

该区群众一直注重增加氮、磷肥的施用量,土壤养分比例失调,钾素相对缺乏。因此该区花椒生产中需要重视钾肥的施用。

通过对肥料及产量间的关系分析得出,最高产量施肥量为氮(N)254 kg·株⁻¹、磷(P₂O₅)176 kg·株⁻¹、钾(K₂O)116 kg·株⁻¹;最佳经济产量施肥量为氮(N)254 kg·株⁻¹、磷(P₂O₅)176 kg·株⁻¹、钾(K₂O)为116 kg·株⁻¹。

参考文献:

- [1] 王政,高瑞凤,李文香,等. 氮磷钾肥配施对大豆干物质积累及产量的影响[J]. 大豆科学,2008(8): 587-598.
- [2] 汪君利,邢东光,姚彩杰,等. 施肥对土壤理化性状及玉米产量的影响[J]. 磷肥与复肥,2008(7): 70-71.
- [3] 李月娥,刘福喜,谢天水,等. 施肥量对杭晚蜜柚初结果树产量与果实品质的影响[J]. 福建果树,2008(12): 24-25.
- [4] 刘兆丽,王建林. 施肥对小麦产量结构的影响[J]. 青岛农业大学学报,2008(3): 189-192.
- [5] 云岚,付强,云锦凤. 施肥对新麦草饲草产量和再生性的影响[J]. 内蒙古草业,2008(9): 1-3.

- [6] 苏加楷,耿华珠. 野生牧草的引种驯化[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [7] 云锦凤,王勇,徐春波,等. 新麦草新品系生物学特性及生产性能研究[J]. 中国草地学报,2006(5): 1-71.
- [8] DWEY H. Registration of Bozoiisky-select Russian wildrye grass [J]. Crop-Science, 1985(25): 575-576.
- [9] 牛天印. 花椒丰产栽培技[J]. 林业科技通讯,1999(5): 30-32.
- [10] 狄彩霞,王正银. 影响花椒产量和品质的因素[J]. 中国农学通报,2004(3): 179-181.
- [11] 郝乾坤,张国桢,孙丙寅. 花椒水肥管理现状的调查研究[J]. 陕西林业科技,2003(2): 23-24.
- [12] 崔云玲,郭天文,李娟,等. 花椒平衡施肥技术研究[J]. 西部林业科学,2006,12(4): 113-114.
- [13] 谢宗谋,冯廷敏. 花椒施肥试验初报[J]. 甘肃林业科技,2005,3(1): 54-55.
- [14] 刘育昌. 落叶果树栽培学[M]. 北京:中国科学技术出版社,1995: 16-20,179-188.
- [15] 孙丙寅,邓振义,康克功,等. 不同配方施肥对花椒产量和质量的影响[J]. 陕西农业科学,2006(1): 7.
- [16] 张永成. 饱和 D-最优设计方法在农业试验中的应用[J]. 马铃薯杂志,1997,11(3): 171-176.

(上接第 97 页)

-60℃干燥超低温冷冻>-60℃超低温冷冻>0~4℃干燥冷藏>0~4℃冷藏>-20℃冷冻贮藏>-20℃干燥冷冻贮藏>常温干燥贮藏>常温贮藏。

参考文献:

- [1] 龙雅宜,龚维忠. 多倍体萱草新品种的选育[J]. 园艺学报,1981,8(1): 51-57.
- [2] 祝朋芳,张利欣,刘莉. 大花萱草与黄花菜杂交亲和性及其幼胚离体培养[J]. 北方园艺,2008(8): 190-191.
- [3] CARTER J, SEEMA D S. Effect of flower bud size on regeneration in daylily (*Heemerocallis fulva* L.) via somatic embryogenesis[J]. The Camellia Journal, 1999, 54(3): 24-25.
- [4] 张子学,孙峰. 辣椒花粉生命力最佳测定方法的筛选[J]. 种子,2002(1): 32-33.
- [5] 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): 88-89.

- [6] 孙晓梅,王大政,杨宏光,等. 不同处理和贮藏方法对百合花粉生活力的影响[J]. 辽宁农业科学,2000(6): 27-30.
- [7] 年玉欣,罗凤霞,张颖,等. 测定百合花粉生命力的液体培养基研究[J]. 园艺学报,2005,32(5): 922-925.
- [8] DAVID B D. Influence of borate and pentaerythritol concentration on germination and tube growth of *Lilium longiflorum* pollen[J]. Amer. Soc. Hort. Sci, 1978,103(3): 413-416.
- [9] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2001: 31, 260.
- [10] 加藤幸雄,志左诚. 植物生殖生理学[M]. 北京:科学出版社,1987: 176-180.
- [11] 马智,赵容莲. 钙、硼水平对苹果花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 河北农业科学,1999,3(2): 1-4.
- [12] 车代弟,樊金萍,王金刚. 东方百合萌发培养基组分的优化[J]. 植物研究,2003,23(2): 178-181.