

4 种冬青属植物花粉离体培养基筛选和贮藏条件的研究

郭娟<sup>1</sup>,邱帅<sup>1</sup>,刘华红<sup>1</sup>,魏建芬<sup>1</sup>,陈徐平<sup>1</sup>,陈林敬<sup>1</sup>,卢山<sup>2\*</sup>

(1. 杭州市园林绿化股份有限公司,浙江 杭州 310020;2. 浙江理工大学 建筑工程学院,浙江 杭州 310018)

**摘 要:**以 4 种冬青属植物花粉为试验材料,采用正交试验设计,分析了蔗糖、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 组成的液体培养基对冬青花粉萌发率和花粉管生长的影响,筛选出适合 4 种冬青花粉离体培养的培养基,同时探讨了 4℃ 和 -20℃ 贮藏条件对冬青花粉生活力的影响。结果表明:1)短梗冬青、全缘冬青和大叶冬青适宜的蔗糖浓度为 10%,大别山冬青为 5%,短梗冬青、全缘冬青适宜的 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度为 0.002%,大别山冬青和大叶冬青为 0.006%,CaCl<sub>2</sub> 促进大叶冬青的花粉萌发和花粉管的生长,但抑制其他 3 种冬青。2)在 4℃ 和 -20℃ 贮藏条件下,4 种冬青花粉随时间的增加萌发率均表现为先升后降,其中短梗冬青和大别山冬青在 -20℃ 贮藏条件下花粉萌发率高于 4℃;全缘冬青和大叶冬青花粉贮藏前期萌发率在 4℃ 条件下高于 -20℃,贮藏后期在 -20℃ 条件下随着时间增加花粉萌发率下降趋势较 4℃ 缓慢。3)花粉管长度在 2 种贮藏条件下随时间增加均表现为先增后减,短梗冬青花粉在 4℃ 条件下花粉管长度增减幅度明显,但在 -20℃ 条件下花粉管长度在贮藏 56 d 无差异变化;全缘冬青、大叶冬青和大别山冬青花粉管在 2 种贮藏条件下先增后减趋势一致,但 -20℃ 条件下随着时间增加花粉管长度减短趋势较 4℃ 缓慢。4)4 种冬青花粉萌发率与花粉管长度均存在一定的正相关性。综合得出,冬青花粉活力个体差异显著;4℃ 适合冬青花粉短时间贮藏,-20℃ 更适于冬青花粉的长时间贮藏;根据花期和花粉生活力丧失速度的差异,短梗冬青和全缘冬青适合作为冬青属种间杂交的父本,大叶冬青和大别山冬青适合做母本。

**关键词:**冬青花粉;贮藏条件;花粉生活力;萌发率;花粉管长度

**中图分类号:**S792.99      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2018)06-0118-09

Research on Medium Screening for *in Vitro* Germination and Storage Conditions  
of 4 *Ilex* Species

GUO Juan<sup>1</sup>, QIU Shuai<sup>1</sup>, LIU Hua-hong<sup>1</sup>, WEI Jian-fen<sup>1</sup>, CHEN Xu-ping<sup>1</sup>, CHEN Lin-jing<sup>1</sup>, LU Shan<sup>2\*</sup>

(1. Hangzhou Landscaping Incorporated, Hangzhou, Zhejiang 310020, China;

2. Building Engineering College, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

**Abstract:** Pollens of 4 *Ilex* species were used as materials to screen out suitable media for *in vitro* culture. An orthogonal design was adopted to optimize the culture media and to examine the influences of the components (such as sucrose, boric acid, and CaCl<sub>2</sub>) on the germination and the growth of pollen tubes. Impacts of two storage temperatures, i. e., 4℃ and -20℃ on the growth vigor of the pollens were investigated. The results showed that 1) the optimum sucrose concentration for culturing *I. buergeri*, *I. integra*, and *I. latifolia* was 10%, and 5% for *I. dabieshanensis*. The optimum boric acid concentration for *I. buergeri* and *I. integra* was 0.002%, and 0.006% for *I. dabieshanensis* and *I. latifolia*. CaCl<sub>2</sub> may promote pollen germination rate and tube growth of *I. latifolia*, while inhibit the other 3 species. 2) Under the temperatures of 4℃ and -20℃, pollen germination rates of all 4 species increased in the early days then decreased. Pollen

收稿日期:2018-01-04    修回日期:2018-05-31

基金项目:浙江省花卉新品种选育重大科技专项重点项目(2012C12909-3);国家自然科学基金项目(31170656)。

作者简介:郭娟,女,硕士,研究方向:园林植物育种。E-mail:guojuan1323344@163.com

\* 通信作者:卢山,男,硕士生导师,研究方向:园林植物研究与开发应用。E-mail:244517264@qq.com

germination rates of *I. buergeri* and *I. dabieshanensis* were higher under  $-20^{\circ}\text{C}$  than  $4^{\circ}\text{C}$ . Pollen germination rates of *I. integra* and *I. latifolia* were higher under  $4^{\circ}\text{C}$  than  $-20^{\circ}\text{C}$  in the early days, but in the later days, reduced more slowly than that under  $4^{\circ}\text{C}$ . 3) The growth of pollen tube length of 4 *Ilex* species all increased and then decreased with time, in which the increase and decrease for *I. buergeri* were significant under  $4^{\circ}\text{C}$ . Under  $-20^{\circ}\text{C}$ , the pollen tube length almost kept consistent during 56-day storage, and the length had no significant difference. For the other three species, they all showed the same trends under two temperatures; the tube growth increased in the early days then decreased, while the rate of decrease under  $-20^{\circ}\text{C}$  was slower than under  $4^{\circ}\text{C}$ . 4) There was a positive correlation between the germination rate and pollen tube length among 4 *Ilex* species. In conclusion, there were significant difference among the pollen viabilities of different species of *Ilex*;  $4^{\circ}\text{C}$  was suitable for short storage of *Ilex* pollen, while  $-20^{\circ}\text{C}$  was better for long storage; according to florescence and viabilities of different *Ilex* species, *I. buergeri* and *I. integra* were suitable for male parent in cross breeding, *I. latifolia* and *I. dabieshanensis* were suitable for female parents in cross breeding.

**Key words:** *Ilex* pollen; storage condition; pollen viability; germination rate; pollen tube length

冬青属(*Ilex*)为冬青科(Aquifoliaceae)一大属, 树形整齐, 树冠优美, 果实通常红色光亮, 经冬不落, 分外艳丽, 极具观赏价值, 全世界 400 多种, 我国 200 多种<sup>[1]</sup>。目前, 对冬青属植物的报道主要集中在冬青的分类<sup>[2-3]</sup>、繁育<sup>[4-5]</sup>、园艺应用<sup>[3-4, 6]</sup>及遗传多样性<sup>[7]</sup>等方面的研究。在欧美国家, 杂交冬青已成为园林绿化中十分重要的观赏树种, 而我国对冬青属植物杂交育种尚未有报道。因此, 通过杂交育种的方法培育冬青新品种意义重大。冬青属不同植物花期相差较远, 最多可达数月, 经过长期贮藏后, 花粉能否保持较高生活力是冬青杂交成败的关键。除了不同种之间的遗传差异外, 贮藏条件是影响花粉生活力的重要因素, 其中温度和湿度尤为重要<sup>[8]</sup>。研究表明<sup>[8-10]</sup>, 低温低湿条件下, 多数植物的花粉都能贮藏较长时间并保持生活力, 但少见冬青属植物相关研究。花粉生活力主要体现在花粉萌发率和花粉管长度两个方面<sup>[11]</sup>。离体培养提供的花粉萌发条件与花粉在柱头上的萌发条件较为接近, 且数据可靠亦可定量是目前花粉生活力测定的首选方法<sup>[12-13]</sup>。离体培养在杏<sup>[14]</sup>、山玉兰<sup>[12]</sup>、红山茶<sup>[15]</sup>、石榴<sup>[16]</sup>等植物研究中都有应用, 但不同植物的花粉萌发培养基组分存在较大差异。

本研究通过对 4 种冬青属植物进行以蔗糖、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  为变量设计的正交试验  $\text{L}_{25}(5^3)$  研究, 探讨 4 种冬青属植物花粉体外萌发的最适液体培养基, 并对花粉体外萌发动态进行细胞学观测; 研究不同贮藏条件对花粉萌发率及花粉管生长的影响, 为冬青杂交育种提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料于 2017 年 3—4 月采自杭州植物园、

杭州市园林绿化股份有限公司青山基地和径山基地, 采集生长健壮的冬青属 4 个种的成年植株(表 1)。采集大蕾期的花枝, 带回实验室水培, 选择含苞待放的花蕾, 剪去花被片, 将花药散落在硫酸纸上, 放入硅胶干燥器中充分干燥, 待花粉完全散出后及时收集到 2 mL 离心管中用于花粉培养基选择及花粉贮藏试验。冬青属各品种开花期不一致, 试验依据开花时间依次进行, 处理方法一致。

表 1 4 种冬青属植物花粉的采集  
Table 1 Collection pollen from 4 *Ilex* species

种类	采集地点	采集时间 (月-日)
短梗冬青( <i>Ilex buergeri</i> )	杭州植物园	3-13
全缘冬青( <i>Ilex integra</i> )	杭州青山	3-22
大别山冬青( <i>Ilex dabieshanensis</i> )	杭州径山	4-4
大叶冬青( <i>Ilex latifolia</i> )	杭州青山	4-17

### 1.2 试验方法

1.2.1 花粉离体萌发法 采用液体培养法, 以蔗糖(0%、5%、10%、15%、20%)、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ (0.000%、0.002%、0.004%、0.006%、0.008%)、 $\text{CaCl}_2$ (0.000%、0.005%、0.010%、0.015%、0.020%)进行 3 因素 5 水平共 25 个组合  $\text{L}_{25}(5^3)$  的正交试验, 以萌发率和花粉管长度为指标, 以短梗冬青为材料进行初步筛选, 其余 3 个品种从较优组合中再筛选出各自的最佳培养基组合。参考张超仪<sup>[17]</sup>的方法, 在双孔凹型载玻片孔内各滴入 1 滴培养液, 用毛笔将花粉均匀点入培养液中, 将载玻片放入保湿的培养皿内, 置于  $25^{\circ}\text{C}$  人工气候箱中暗培养 4 h。在  $40\times$  显微镜下观察统计, 花粉管长度超过花粉粒直径即视为已萌发, 每处理统计至少 10 个视野, 每个视野花粉不少于 50 粒。计算公式: 萌发率 = 萌发花粉数/花粉总数  $\times 100\%$ 。使用 Motic BA 400 生物显

微镜数码显微图像系统随机对花粉管进行长度测量,每处理随机选择 10 根花粉管测量。花粉管长度计数单位为 1 D=1 倍的花粉粒直径。

1.2.2 花粉的贮藏 以上述干燥的花粉作为试验材料,每 2 g 分装于 2 mL 离心管内密封保存,并置于 4℃、-20℃ 2 种不同条件下贮藏。每隔 0、2、7、14、21、28、35、42、49、56 d 和 180 d 取出一部分花粉,使用筛选的最优培养基进行培养,观测是否有萌发率。试验操作步骤、培养条件及统计方法同上述离体培养法。

### 1.3 数据统计与分析

统计每个视野冬青花粉萌发率、花粉管长度,用 Excel 2007 软件进行数据处理和图表制作,用 SPSS 19.0 软件进行方差分析,使用 R 语言 corrplot 包进行相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蔗糖、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 对冬青花粉萌发的影响

短梗冬青花粉萌发正交试验均值(表 2)表明,不同浓度的蔗糖、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 对花粉萌发率的影响存在差异( $P<0.05$ )。随着蔗糖浓度的增加,花粉萌发率呈现先升后降的趋势。蔗糖浓度为 0% 时,花粉萌发率最低,蔗糖浓度处于 5%~10% 时,萌发率逐渐升高,当蔗糖浓度为 10% 时,花粉萌发率达到最大值,均值 7.88%,蔗糖浓度在 10%~20% 时,花粉萌发率随蔗糖浓度升高而迅速降低,其中蔗糖浓度 20% 时,部分花粉发生质壁分离,萌发率均值为 2.55%,表明高浓度蔗糖对花粉萌发有一定的抑制作用,有效促进花粉萌发的蔗糖浓度为 5%~10%。随着 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度的增加,花粉萌发率呈现先升后降的趋势。H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度在 0.000%~0.002% 时,短梗冬青花粉萌发率随着浓度升高而迅速上升,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度为 0.002% 时萌发率达到最大值,萌发率平均 8.77%,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度>0.002% 时,花粉萌发率下降,在 0.004%~0.008% 时,萌发率无显著差异,表明低浓度的 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 对花粉萌发率的促进作用显著高于高浓度,适宜的 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度为 0.002%。随着 CaCl<sub>2</sub> 浓度的增加,花粉萌发率呈现下降趋势。CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0% 时,花粉萌发率最高,平均值为 9.08%,当 CaCl<sub>2</sub> 浓度>0% 时,花粉萌发率迅速下降,CaCl<sub>2</sub> 浓度在 0.005%~0.020% 时,花粉萌发率无显著差异,表明 CaCl<sub>2</sub> 的加入会抑制短梗冬青花粉的萌发率。

短梗冬青花粉萌发正交试验均值(表 2)表明,不同浓度的蔗糖、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 对花粉管长度生长的影响存在差异( $P<0.05$ )。随着蔗糖浓度的增

加,花粉管长度整体表现为增加趋势,但差异不显著,其中蔗糖浓度 20% 时,花粉管长度达到最大值,均值 5.27 D。随着 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度增加,花粉管长度呈现先增后减的趋势,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度在 0.000%~0.004% 时,花粉管长度迅速增加,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度为 0.004% 时,花粉管长度达到最大值,均值为 5.89 D,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度在 0.004%~0.008% 时,花粉管长度逐渐减短,但仍然高于对照值(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 浓度为 0.000%),表明 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 促进花粉管生长,低浓度的促进作用高于高浓度。随着 CaCl<sub>2</sub> 浓度的增加,短梗冬青花粉管表现为先减后增,CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.00% 时,花粉管长度达到最大值,均值为 5.17 D,CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.000%~0.010% 时,花粉管长度逐渐减短,0.010% 时花粉管长度最短,均值为 3.55 D,当 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.010%~0.020% 时花粉管长度逐渐增加,0.020% 时花粉管长度为 4.23D,CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.005%~0.020% 时花粉管长度无显著差异,表明 CaCl<sub>2</sub> 的加入对短梗冬青花粉管生长有一定的抑制作用。

表 2 不同因素水平对短梗冬青花粉萌发率和花粉管长度的影响

Table 2 Effects of different factor levels on pollen germination rate and pollen tube length of <i>I. buergeri</i>			
因素	浓度/%	花粉萌发率/%	花粉管长度/D
蔗糖	0	2.42±0.47a	2.12±0.23a
	5	6.54±0.99bc	4.49±0.41bc
	10	7.88±2.44c	5.13±0.57cd
	15	4.24±0.65ab	4.24±0.41b
	20	2.55±0.32a	5.43±0.46d
硼酸	0.000	1.3±0.24a	1.57±0.2a
	0.002	8.77±2.3c	5.12±0.55c
	0.004	4.77±1.01b	5.89±0.49c
	0.006	4.61±0.83b	4.86±0.31c
	0.008	4.18±0.52b	3.58±0.21b
CaCl <sub>2</sub>	0.000	9.08±2.36b	5.17±0.75c
	0.005	3.27±0.48a	3.9±0.39ab
	0.010	4.17±0.67a	3.55±0.35a
	0.015	2.57±0.31a	4.16±0.36ab
	0.020	4.54±1.05a	4.23±0.41ab

注:表中数据为平均值±标准误,同列相同小写字母表示 0.05 水平差异不显著。下同。

### 2.2 花粉最适培养基筛选

短梗冬青花粉正交试验均值(表 2)表明,蔗糖浓度处于 5%~10%,硼酸浓度处于 0.002%~0.006%,CaCl<sub>2</sub> 为 0.000% 时,花粉萌发率与花粉管长度生长均处于较高水平。正交试验方差分析表明(表 3),蔗糖浓度处于 5%~15%,均有花粉萌发率与花粉管长度值显著高于同浓度的其他处理,花粉管长度在蔗糖浓度 20% 时取的最大值,但由于蔗糖

浓度较高,导致部分花粉质壁分离,所以该浓度并不是花粉萌发的适宜浓度。因此,结合花粉萌发率和花粉管长度值,选出萌发率值较高,花粉管长度较长,表现出较高活力的 6 个处理,分别为处理 8、处理 9、处理 12、处理 14、处理 17 和处理 20 作为其余 3 种冬青属植物花粉萌发的液体培养基进行筛选。以上试验结果表明:由正交试验均值选出的蔗糖、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  和  $\text{CaCl}_2$  各自的较优水平组合的培养基,与正交设计方差分析结果选出的较优处理并不完全一致,这可能与正交试验中不同因素组合对花粉萌发率与花粉管长度生长的影响有别于单因素影响有关。正交试验均值的影响表现为,在正交表中蔗糖、

$\text{H}_3\text{BO}_3$  和  $\text{CaCl}_2$  的任一水平下都均衡地包含着另外 2 个因素的 5 个水平,当比较某因素不同水平时,其它因素的效应均可彼此抵消,因此,不同因素的各水平差异均由该因素引起。

3 种冬青方差分析结果(表 4)表明:全缘冬青花粉在处理 12 中萌发率最高,且花粉管长度生长良好,显著高于其余的 4 个组合;大叶冬青花粉在处理 14 中萌发率及花粉管长度都显著高于其他组合;大别山冬青花粉在处理 9 中萌发率及花粉管长度都显著高于其他组合。综合得出:短梗冬青、全缘冬青花粉最适培养基为处理 12、大叶冬青为处理 14、大别山冬青为处理 9。

表 3 短梗冬青花粉在正交试验中的萌发率和花粉管长度

Table 3 Germination rate and pollen tube length of <i>Ilex buergeri</i> in orthogonal design experiment					
处理编号	蔗糖/%	$\text{H}_3\text{BO}_3$ /%	$\text{CaCl}_2$ /%	萌发率/%	花粉管长度/D
1	0(1)	0.000(1)	0.000(1)	0.0±0.0a	0.0±0.0a
2	0(1)	0.002(2)	0.005(2)	5.0±0.7fghi	2.47±0.43cd
3	0(1)	0.004(3)	0.010(3)	3.03±0.21cdef	2.59±0.21cd
4	0(1)	0.006(4)	0.015(4)	1.07±0.15abc	3.03±0.06de
5	0(1)	0.008(5)	0.020(5)	3.0±0.46cdef	2.49±0.39cd
6	5(2)	0.000(1)	0.010(3)	2.4±0.26bcde	1.44±0.22b
7	5(2)	0.002(2)	0.015(4)	3.2±0.53cdef	3.1±0.51de
8	5(2)	0.004(3)	0.020(5)	12.03±1.15l	7.37±0.44j
9	5(2)	0.006(4)	0.000(1)	9.32±0.96k	4.25±0.62fg
10	5(2)	0.008(5)	0.005(2)	5.77±0.73ghij	5.06±0.33h
11	10(3)	0.000(1)	0.020(5)	0.6±0.1ab	1.94±0.08bc
12	10(3)	0.002(2)	0.000(1)	25.32±4.44m	9.98±0.52l
13	10(3)	0.004(3)	0.005(2)	2.23±0.21bcd	3.69±0.42ef
14	10(3)	0.006(4)	0.010(3)	6.83±0.45ij	6.18±0.76i
15	10(3)	0.008(5)	0.015(4)	4.41±0.36efgh	4.37±0.31fg
16	15(4)	0.000(1)	0.005(2)	1.47±0.15abc	1.49±0.18b
17	15(4)	0.002(2)	0.010(3)	7.25±1.76j	4.74±0.5gh
18	15(4)	0.004(3)	0.015(4)	2.13±0.31bcd	7.33±1.28j
19	15(4)	0.006(4)	0.020(5)	3.98±0.34defg	3.17±0.4de
20	15(4)	0.008(5)	0.000(1)	6.37±1.37hij	4.04±0.53fg
21	20(5)	0.000(1)	0.015(4)	2.03±0.21abcd	2.97±0.38d
22	20(5)	0.002(2)	0.020(5)	3.08±0.64cdef	5.32±0.31h
23	20(5)	0.004(3)	0.000(1)	4.41±1.14defgh	8.46±1.03k
24	20(5)	0.006(4)	0.005(2)	1.87±0.35abcd	6.81±0.62ig
25	20(5)	0.008(5)	0.010(3)	1.35±0.06abc	2.79±0.27d

表 4 3 种冬青花粉最适培养基的筛选

Table 4 Selection of the optimal medium of 3 <i>Ilex</i> species						
处理编号	萌发率/%			花粉管长度/D		
	全缘冬青	大叶冬青	大别山冬青	全缘冬青	大叶冬青	大别山冬青
8	3.96±0.53a	2.48±0.65b	7.82±0.67bc	3.86±1.54a	12.43±2.67c	9.02±1.84b
9	3.09±0.65a	5.39±0.04c	10.8±1.47d	3.18±0.88a	2.03±0.14a	13.94±1.31c
12	14.57±0.61d	1.35±0.26a	3.96±0.69a	9.61±1.88c	1.82±0.28a	9.73±2.31b
14	7.97±0.57c	5.47±1.01c	6.9±0.74b	5.77±2.19b	14.39±2.55c	9.62±2.07b
17	3.44±0.88a	1.27±0.06a	3.79±0.3a	16.96±2.19d	5.75±3.58b	9.59±2.09b
20	5.2±0.18b	2.47±0.57b	9.18±1.54cd	3.21±0.79a	5.88±6.18b	6.35±1.02a

### 2.3 不同贮藏条件对冬青花粉生活力影响

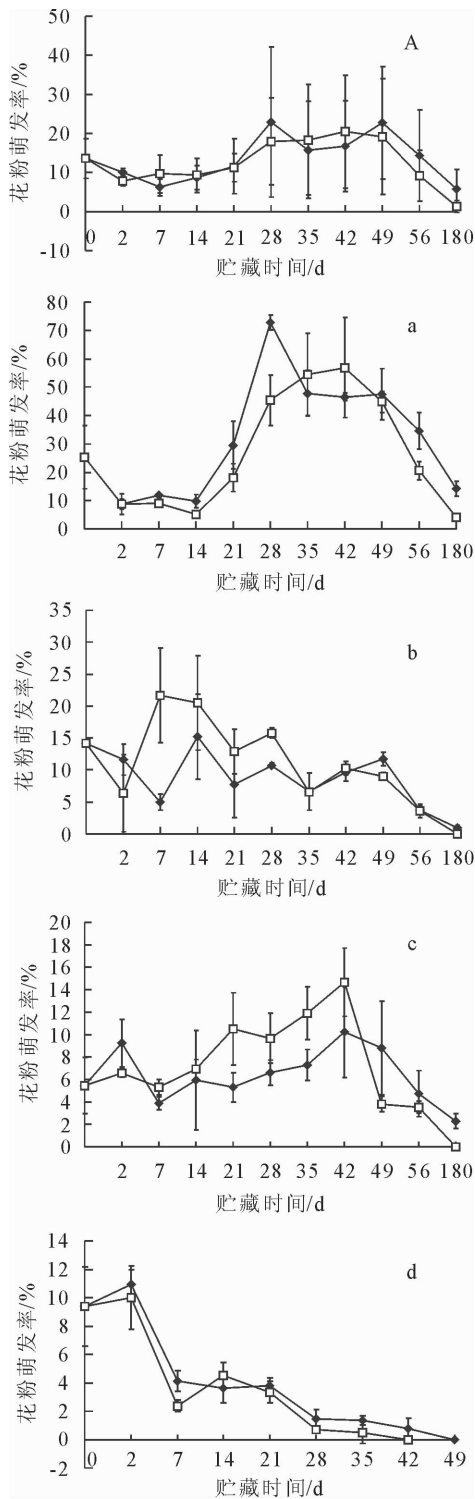
#### 2.3.1 不同贮藏条件对冬青花粉萌发率的影响

由图 1A 可知,总体上,在 4℃ 和 -20℃ 贮藏条件下,冬青花粉萌发率随时间的增加表现为先降后升再降的趋势,相同培养时间,在 2 种贮藏条件下的花粉萌发率无显著差异,但 -20℃ 最大值较 4℃ 高,随着时间增加花粉萌发率下降趋势较 4℃ 缓慢。由图 1a 可知,在 2 种条件下,短梗冬青花粉贮藏 2 d,花粉萌发率显著降低,贮藏 2~14 d 期间萌发率也有小幅度下降,贮藏 14~28 d 花粉萌发率显著升高,其中在 -20℃ 条件下,贮藏 28 d 时萌发率达到最大值 72.74%,显著高于 4℃ 条件,随后下降,180 d 花粉萌发率降至 14.23%,在 4℃ 条件下,花粉萌发率持续上升,贮藏 42 d 时花粉萌发率达到最高 56.88%,随后下降,180 d 萌发率降至 4.07%,表明短梗冬青更适合在 -20℃ 条件下贮藏。由图 1b 可知,全缘冬青花粉在 2 种贮藏条件下先增后减的趋势是一致的,但萌发率最大值 4℃ 条件下显著高于 -20℃,在花粉贮藏 7~28 d 期间萌发率均表现为 4℃ 条件下显著高于 -20℃ 条件,在贮藏 35~180 d 期间 2 种条件下萌发率无显著差异,49 d 除外,4℃ 条件下花粉贮藏 7 d 萌发率达到最大值 21.66%,在 -20℃ 条件下,贮藏 14 d 时达到最大值 15.24%,随后呈现下降趋势,56 d 花粉萌发率都降至 4% 以下,结果表明 4℃ 更适合全缘冬青花粉的短期贮藏。由图 1c 可知,大叶冬青花粉萌发率在 2 种贮藏条件下贮藏 7~42 d 期间均表现为缓慢上升,4℃ 条件下贮藏 7~42 d 期间的花粉萌发率均显著高于 -20℃ 条件下的花粉萌发率,贮藏 42 d 时萌发率均达到最高,4℃ 条件下贮藏的花粉萌发率为 14.66%, -20℃ 条件下为 10.23%,随后 4℃ 条件下贮藏的花粉萌发率迅速下降,56 d 降至 3.53%,180 d 活力为 0, -20℃ 条件贮藏的花粉活力下降较缓慢,180 d 花粉仍有一定活力,萌发率为 2.30%,结果表明,4℃ 适合大叶冬青花粉短期内保存, -20℃ 则适合较长时间的花粉活力保存。由图 1d 可知,大别山冬青花粉在 2 种贮藏条件下,贮藏 2 d 时萌发率均达到最高,4℃ 条件下贮藏的花粉萌发率为 10.01%, -20℃ 条件下贮藏的花粉萌发率为 10.95%,随后花粉活力迅速下降,贮藏 7 d 时均已降至 5% 以下,表明大别山冬青花粉活力下降速度较快,2 种贮藏条件下花粉萌发率无显著差异。

#### 2.3.2 不同贮藏条件对冬青花粉管生长的影响

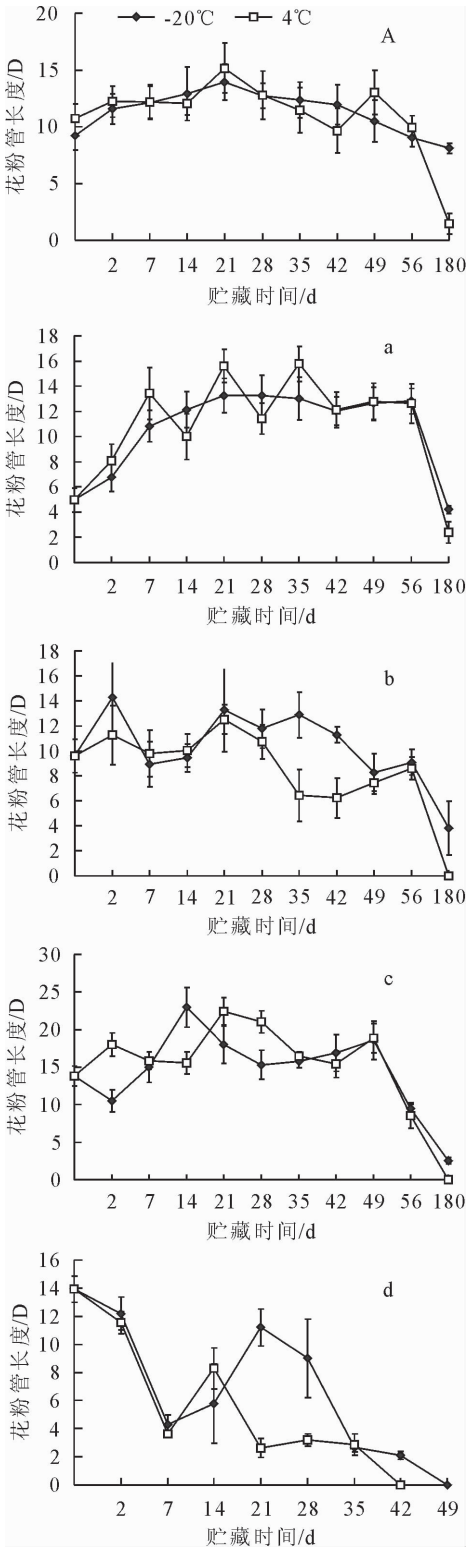
由图 2A 可知,总体上,在 4℃ 和 -20℃ 贮藏条件下,4 种冬青花粉管长度随着贮藏时间增加都表现为先增后减,4℃ 条件下花粉管长度最大值显著高于

-20℃,但 -20℃ 条件下随着时间增加花粉管长度减短趋势较 4℃ 缓慢。由图 2a 可知,短梗冬青花粉在 4℃ 条件下贮藏 0~42 d 期间花粉管长度先增后



注:图 A 表示 4 种冬青花粉萌发率在 4℃ 和 -20℃ 2 种贮藏条件下总体表现;图 a~图 d 分别表示短梗冬青、全缘冬青、大叶冬青和大别山冬青花粉萌发率在 4℃ 和 -20℃ 贮藏条件下的变化。误差线为 95% 置信区间,相互重叠表示无显著差异,反之则差异显著。

图 1 2 种贮藏条件对 4 种冬青花粉萌发率的影响  
Fig. 1 Effect of 2 storage temperatures on pollen germination rate of 4 *Ilex* species



注:图 A 表示 4 种冬青花粉管长度在 4℃ 和 -20℃ 2 种贮藏条件下总体表现;图 a~图 d 分别表示短梗冬青、全缘冬青、大叶冬青和大别山冬青花粉管长度在 4℃ 和 -20℃ 贮藏条件下的变化。误差线为 95% 置信区间,相互重叠表示无显著差异,反之则差异显著。

图 2 2 种贮藏条件对 4 种冬青花粉管生长的影响

Fig. 2 Effect of 2 storage temperatures on pollen tube growth of 4 *Ilex* species

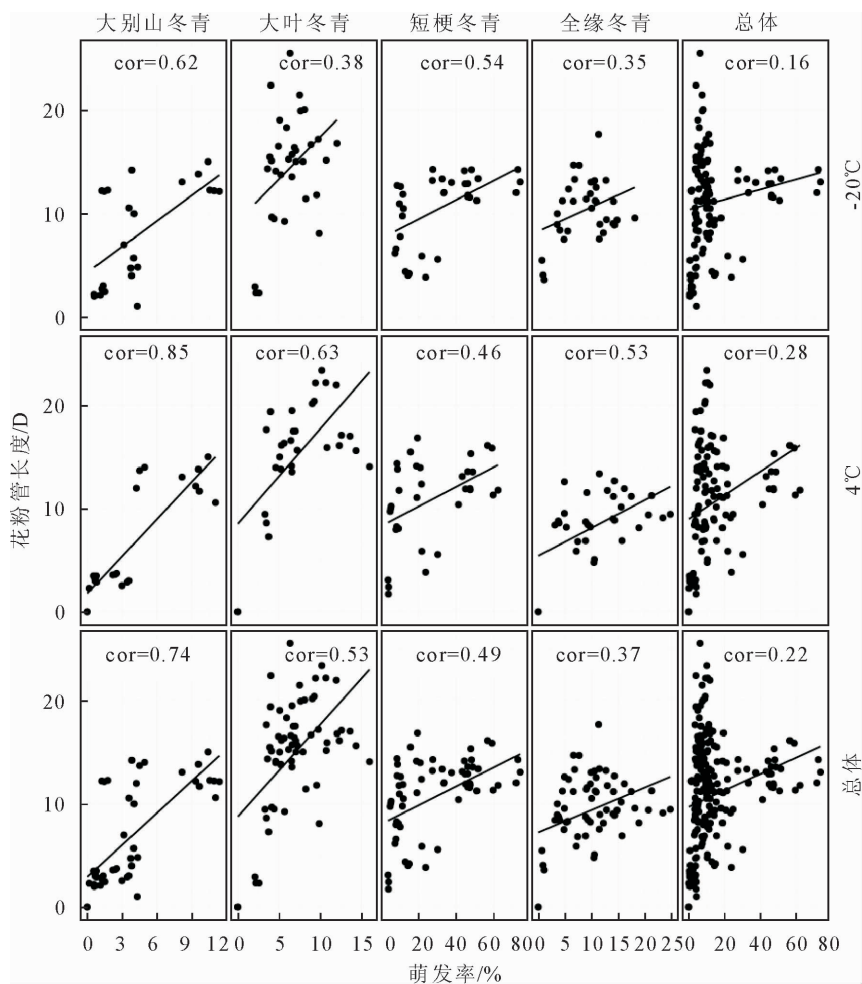
降,35 d 达到最大值 15.77 D,42~56 d 期间长度维持在 12~13 D,差异不显著,180 d 花粉管长度仅有 2.41 D;在 -20℃ 条件下,贮藏 7~56 d 期间花粉管

长度维持在 10.82~12.81 D,差异不显著,由此看出,-20℃ 贮藏条件下的短梗冬青花粉管在较长一段时间内生长保持一致。由图 2b 可知,全缘冬青花粉在 2 种贮藏条件下,花粉管长度变化趋势较为一致,在 4℃ 条件下,贮藏 21 d 时花粉管长度达到最大值 12.51 D,在 -20℃ 条件下,贮藏 2 d 时花粉管长度达到最大值 14.27 D,随后均呈现下降趋势,-20℃ 条件下随着贮藏时间的延长花粉管长度减短趋势较 4℃ 条件下缓慢,21~56 d 花粉管长度显著高于 4℃ 条件。由图 2c 可知,大叶冬青花粉在 2 种贮藏条件下,花粉管长度变化趋势较一致,均表现为先增后减,在贮藏 0~49 d 期间花粉管长度均高于 10 D,4℃ 条件下,贮藏 21 d 时花粉管长度达到最大值 22.44 D,-20℃ 条件下,贮藏 14 d 时花粉管长度达到最大值 22.96 D,随后下降,贮藏 56 d 时,花粉管长度均降至 10 D 以下,表明在 2 种贮藏条件下,大叶冬青花粉均可保持较高的活力。由图 2d 可知,大别山冬青新鲜花粉的花粉管长度达到最大值,13.94 D,随后下降,贮藏 0~7 d 时花粉管长度在 2 种条件下表现一致,贮藏 14~49 d 期间,-20℃ 贮藏条件下花粉管长度减短趋势较 4℃ 条件缓慢,贮藏 21~28 d 期间花粉管长度显著高于 4℃ 条件,35 d 后花粉管长度都降至 3 D 以下,表明大别山冬青花粉活力下降较快。

2.4 花粉萌发率与花粉管生长动态相关性分析

对 4 种冬青花粉萌发率与花粉管长度进行相关性分析,由图 3 可以看出,总体上,4 种冬青花粉萌发率与花粉管长度为弱正相关性,但不同贮藏温度下,不同冬青的两者相关性有较大差异。其中,大别山冬青在 4℃ 和 -20℃ 条件下花粉萌发率与花粉管长度均为强正相关,表明花粉管长度的增减趋势与花粉萌发率变化一致;大叶冬青的花粉萌发率与花粉管长度总体为正相关,但在 4℃ 条件下相关性较强,-20℃ 为弱相关,4℃ 条件下萌发率高且花粉管长度长,-20℃ 条件下,花粉管最大值较萌发率最大值提前,表明大叶冬青在贮藏前期 4℃ 条件下的花粉生活力更高;短梗冬青花粉在 4℃ 和 -20℃ 2 种条件下萌发率与花粉管长度为正相关,相关性强弱差异不大,但在 4℃ 条件下,花粉管的长度增减幅度较 -20℃ 明显,-20℃ 萌发率高,且花粉管长度保持一致,表明在 4℃ 条件下对花粉活力影响明显,20℃ 条件下,花粉活力保持更好;全缘冬青花粉总体上表现为二者弱相关性,其中在 4℃ 条件相关性强于 -20℃,相同时期,-20℃ 条件下,花粉萌发率较 4℃ 低,但花粉管长度较 4℃ 长,表明 2 种条件对全缘冬青花粉活力的影响有差异。





注： $r$  介于  $-1$  和  $1$ ， $r=1$ ，表示 2 个变量完全正相关， $r=0$  时表示两变量非线性相关， $r=-1$  时表示 2 个变量完全负相关。

图 3 2 种贮藏条件下 4 种冬青花粉萌发率与花粉管长度的相关系数

Fig. 3 Correlation coefficient of pollen germination rate and tube length of 4 species of *Ilex* under 2 storage temperatures

3 结论与讨论

研究表明离体萌发法对所有花粉均适宜,大多数植物都采用离体萌发法来测定花粉活力与萌发特性<sup>[15]</sup>。花粉离体萌发受多种因素影响,其中蔗糖、硼酸和  $\text{Ca}^{2+}$  是影响花粉萌发的重要因素。蔗糖为花粉萌发和花粉管形成提供必需的碳源和能量,调节花粉粒内外渗透压平衡<sup>[18]</sup>,不同种类植物花粉萌发所需蔗糖浓度不同,同种植物不同品种间花粉适宜的蔗糖浓度亦存在差异<sup>[14]</sup>。本研究中,4 种冬青属植物花粉萌发适宜的蔗糖浓度为 5%~10%,其中短梗冬青、全缘冬青、大叶冬青适宜的蔗糖浓度为 10%,大别山冬青为 5%,浓度过低则萌发率较低,过高则抑制萌发甚至导致花粉细胞质壁分离,但蔗糖并非冬青花粉萌发的必要条件,在不添加蔗糖的溶液里仍有一定的萌发率,这与张超仪<sup>[17]</sup>对杜鹃花属植物的研究结果一致。硼酸影响花粉管的生长和形态,主要参与花粉管顶端细胞壁的构建<sup>[19]</sup>,影

响花粉管的生长。通常花粉中的硼酸含量不足,需要柱头和花柱中的硼来补充,因此离体培养条件下均需添加一定量的硼酸来促进花粉萌发<sup>[11]</sup>。本研究中,低浓度的硼酸显著促进了短梗冬青(0.002%)、全缘冬青(0.002%)和大别山冬青(0.006%),大叶冬青(0.006%)花粉萌发,硼酸浓度为 0.000% 时,花粉没有萌发,硼酸浓度较高时(0.008%),促进作用减弱,这与山玉兰<sup>[12]</sup>、辽宁杨<sup>[13]</sup>花粉萌发所需低浓度的硼酸较为接近。另外,钙在花粉萌发和花粉管生长过程中也起一定作用,一定浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  是花粉萌发所必需的,外源  $\text{Ca}^{2+}$  的需求取决于花粉细胞内游离钙的含量,内源钙充足时, $\text{Ca}^{2+}$  的添加可能造成细胞  $\text{Ca}^{2+}$  中毒,产生过高的细胞膨压,从而抑制花粉的萌发及花粉管的生长<sup>[20-22]</sup>。外源钙可以替代花粉萌发时的群体效应<sup>[23]</sup>,促进花粉萌发。本研究结果显示, $\text{CaCl}_2$  的加入显著抑制了短梗、全缘、大别山冬青花粉的萌发和花粉管的生长,但对大叶冬青有促进作用,表明前者

细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含量可能相对较高,而后者细胞内源  $\text{Ca}^{2+}$  不足。这与张超仪<sup>[17]</sup>对杜鹃花属植物花粉萌发率的研究结果较为一致, $\text{CaCl}_2$  的加入抑制了部分杜鹃品种花粉的萌发。

由于遗传差异,不同植物新鲜花粉生活力不同,而合适的贮藏条件是花粉能否长期保持活力的关键因素。因此,明确贮藏条件对不同植物花粉生活力的影响对解决花期不遇的植物杂交有着重要的指导意义。一般花粉贮藏温度有常温、4、-20、-70、-80、-196℃<sup>[24-26]</sup>。由于无需特殊设备,易于实现,常温、4℃和-20℃是实际生产过程经常用到的。本试验结果表明:4种冬青花粉生活力在-20℃较4℃条件下保存时间长,其中短梗冬青花粉在2种条件下贮藏180d仍有一定的活力,-20℃条件下活力较高;全缘冬青、大叶冬青花粉在4℃可贮藏2个月左右,贮藏56d萌发率都降至4%以下,-20℃条件下贮藏180d时仍有一定的活力,分别为0.9%和2.3%;大别山冬青相比较其余3种冬青花粉保存时间较短,贮藏7d时,花粉萌发率都降至5%以下。一般来说,花粉生活力会随着贮藏时间的延长而下降,而本试验表明,4种冬青花粉的萌发率在短时间贮藏后显著增加,这可能与采收的新鲜花粉干燥时未充分散粉,在贮藏的过程中除了花粉的代谢活动,还有花粉的散出,到一定时间,花粉量达到最大值,从而出现萌发率最大值的现象有关。这一现象在油茶<sup>[10]</sup>、紫薇<sup>[27]</sup>和板栗<sup>[28]</sup>中都有报道,其他原因仍需进一步研究。花粉萌发率达到峰值后,之后随着时间的延长,活力逐渐下降,其中-20℃下降的趋势较4℃缓慢,这可能与花粉在低温贮藏条件下可溶性糖类和有机酸类消耗较少,从而花粉生活力下降得较慢有关<sup>[29]</sup>。

萌发率和花粉管长度常用来鉴定花粉的生活力。本研究表明,短梗冬青、大叶冬青和大别山冬青在2种贮藏条件下,花粉管长度总体变化趋势与花粉萌发率较为一致,而全缘冬青花粉在-20℃条件下储藏,前期花粉萌发率较4℃低,但相同时间的花粉管长度高于4℃条件,且贮藏期间花粉管长度增减幅度较小,张绍铃<sup>[30]</sup>认为,与萌发率相比,花粉管长度更能展现生活力,并与受精密切相关。从冬青杂交试验来看,即使萌发率低于5%,而花粉管较长,依然有一定的结实率,在一定程度上证明了张绍铃的结论,但依然需要进一步明确花粉管长度与结实率的关系。

综上可得,短梗冬青和全缘冬青花粉离体培养最适培养基为10%蔗糖+0.002%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,大叶冬青花粉适宜的培养基为10%蔗糖+0.006%  $\text{H}_3\text{BO}_3$

+0.010%  $\text{CaCl}_2$ ,大别山冬青为5%蔗糖+0.006%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;不同冬青的花粉生活力存在显著差异,短梗冬青>全缘冬青>大叶冬青>大别山冬青;短时间低温贮藏能够有效提高冬青花粉生活力;短时间贮藏,-20℃和4℃条件下,冬青花粉生活力变化差异不显著,而长时间贮藏,-20℃条件下生活力高于4℃;2种贮藏条件下,短梗冬青花粉贮藏时间最长,180d仍有较高生活力,全缘冬青和大叶冬青次之,大别山冬青花粉贮藏时间最短,7d之后活力均降到5%以下;短梗冬青和全缘冬青花期较早,花粉贮藏时间较长,适合作为冬青属种间杂交的父本,而大叶冬青和大别山冬青花期较晚,花粉生活力丧失较快,适合作为母本。

参考文献:

[1] 周晓峰. 几种冬青属树种种子休眠原因及萌发特性研究[D]. 南京:南京林业大学,2010.

[2] 王蕾,廖文波. 冬青科黑叶冬青的分类学修订[J]. 西北植物学报,2012,32(6):1261-1266.

WANG L, LIAO W B. A taxonomic rebision of *Ilex melanophylla* H. T. Chang of Aquifoliaceae[J]. Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin., 2012, 32(6):1261-1266. (in Chinese)

[3] 刘洋,张璐,姜燕娟. 冬青属植物分类学及园艺应用研究进展[J]. 北方园艺,2015(12):183-189.

LIU Y, ZHANG L, JIANG Y J. Research progress on the taxonomy and horticultural application of the Genus *Ilex* [J]. Northern Horticulture, 2015(12):183-189. (in Chinese)

[4] 王丽英. 北美冬青繁育及其园林应用研究[D]. 临安:浙江农林大学,2014.

[5] 徐志豪. ‘贝尔奇卡金’哈克勒雷冬青无性快繁技术研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.

[6] 惠梓航,姜卫兵,魏家星,等. “冬青”类树种的园林特性及其应用[J]. 江西农业学报,2011,23(2):46-49.

HUI Z H, JIANG W B, WEI J X, et al. Landscape characteristics of holly and its application[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(2):46-49. (in Chinese)

[7] 章建红,高云振,张斌,等. 26种冬青属植物遗传多样性分析[J]. 西北植物学报,2011,31(3):0504-0510.

ZHANG J H, GAO Y Z, ZHANG B, et al. Genetic diversity of *Ilex* L. tree species [J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin., 2011, 31(3):0504-0510. (in Chinese)

[8] 尹佳蕾,赵惠恩. 花粉生活力影响因素及花粉贮藏概述[J]. 中国农学通报,2005,21(4):110-113.

YIN J L, ZHAO H E. Summary of influencial factors on pollen viability and its preservation methods[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(4):110-113. (in Chinese)

[9] BOYLE T H. Environmental control of moisture content and viability in *Schlurabergera truncata* (Cactaceae) pollen[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, (5):625-630.

[10] 黄永芳,吴雪辉,何美儿,等. 3种油茶植物花粉贮藏及生活力的研究[J]. 福建林学院学报,2011,31(1):56-59.



HUANG Y F, WU X H, HE M E, *et al.* Studies on the pollen storage and viability of 3 oil-tea species[J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2011, 31(1): 56-59. (in Chinese)

[11] 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.

ZUO D D, MING J, LIU C, *et al.* Advance in technique of plant pollen viability[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(16): 4742-4745. (in Chinese)

[12] 李佛莲, 徐海燕, 龚洵, 等. 山玉兰花粉离体萌发和花粉管生长特性的研究[J]. 广西植物, 2017, 37(4): 478-484.

LI F L, XU H Y, GONG X, *et al.* Characteristics of pollen germination and pollen tube growth of *Magnolia delavayi* [J]. Guihaia, 2017, 37(4): 478-484. (in Chinese)

[13] 许东, 李际红, 谢兰禹, 等. 辽宁杨雄花序发育及花粉萌发特征[J]. 林业科学, 2016, 52(8): 38-45.

XU D, LI J H, XIE L Y, *et al.* Characteristics of staminate catkin development and pollen germination in *Populus × liaoningensis* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2016, 52(8): 38-45. (in Chinese)

[14] 安晓芹, 廖康, 殷惠娟, 等. 4 个杏品种花粉离体萌发及花粉管生长动态[J]. 新疆农业大学学报, 2013, 36(1): 33-37.

AN X Q, LIAO K, YIN H J, *et al.* Research on germination *in vitro* pollen and tube growth dynamics of 4 apricot cultivars [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2013, 36(1): 33-37. (in Chinese)

[15] 叶欣, 谢云, 茹华莎, 等. 浙江红山茶花粉萌发与贮藏特性研究[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(1): 103-106.

YE X, XIE Y, RU H S, *et al.* Pollen germination and storage of *Camellia chekiangoleosa* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(1): 103-106. (in Chinese)

[16] 杨尚尚, 苑兆和, 李云, 等. 石榴‘泰山红’的花粉萌发生物学特性[J]. 林业科学, 2013, 49(10): 48-53.

YANG S S, YUAN Z H, LI Y, *et al.* Biological characteristics of pollen germination of ‘Taishanhong’ pomegranate [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013, 49(10): 48-53. (in Chinese)

[17] 张超仪, 耿兴敏. 六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 92-99.

ZHANG C Y, GENG X M. Comparative study on methods for testing pollen viability of the six species from genus *Rhododendron* [J]. Plant Science Journal, 2012, 30(1): 92-99. (in Chinese)

[18] 胡珂雪, 张晓曼, 郑云凤. 四季报春花花粉萌发特性研究[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(2): 170-173.

HU K X, ZHAGN X M, ZHENG Y F. Characteristics of pollen germination of *Primula boconica* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(2): 170-173. (in Chinese)

[19] 胡适宜, 杨弘远. 被子植物受精生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 29-58.

[20] 刘雪莲, 陈莹. 培养基组分对花粉离体萌发的影响研究进展[J]. 通化师范学院学报, 2009, 30(12): 43-46.

[21] MIGNANI I, GREVE C G, BEN-ARIE R, *et al.* The effects of  $GA_3$  and divalent cations on aspects of pectin metabolism and tissue softening in ripening tomato pericarp [J]. Physiol Plant, 1995, 93: 108-115. (in Chinese)

[22] MALHO R, READ N D, TREWAVAS A J, *et al.* Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation [J]. Plant Cell, 1995(7): 1173-1184.

[23] 杨淑娟, 毛桂莲, 孙驰. 钙和硼对芦荟花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7238-7239.

YANG S J, MAO G L, SUN C. Effects of calcium and boron on pollen germination and pollen tube growth of *Aloe vera* L. var. *chinesis* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(14): 7238-7239. (in Chinese)

[24] FERNANDO D D, RICHARDS J L, KIKKERT J R. In vitro germination and transient GFP expression of American chestnut (*Castanea dentata*) pollen [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(5): 450-456.

[25] MACHADO C D, MOURA C R, LEMOS E E, *et al.* Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures [J]. Acta Sci. Agron, 2014, 36(2): 227-232.

[26] 张洪伟, 段一凡, 李稚, 等. 不同贮藏方法对桂花花粉活力影响的研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(S1): 7-12.

ZHANG H W, DUAN Y F, LI Z, *et al.* Study on effects of different storage methods on pollen vitality of *Osmanthus fragrans* [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2014, 38(S1): 7-12. (in Chinese)

[27] 贾文庆, 刘宇. 紫薇花粉生活力的测定[J]. 陕西农业科学, 2007(1): 46-47.

JIA W Q, LIU Y. Detection on the survival abilities of pollen of *Lagerstroemia* [J]. Shaanxi Journal of Agriculture Sciences, 2007(1): 46-47. (in Chinese)

[28] 谢治芳, 谢正生, 曾曙才. 6 个板栗品种的花粉形态及发芽特性[J]. 福建林学院学报, 2005, 25(4): 344-348.

XIE Z F, XIE Z S, CENG S G. The pollen morphology and sprouting characteristics of 6 Chinese chestnut varieties [J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2005, 25(4): 344-348. (in Chinese)

[29] 周楠楠, 方炎明, 马成涛. 红桧木花粉生活力及其贮藏方法的研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2010, 34(5): 34-38.

ZHOU N N, FANG Y M, MA C T. Red alder pollen viability and the effects of different storage methods [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2010, 34(5): 34-38. (in Chinese)

[30] 张绍铃, 梅正敏, 陈迪新. 果梅花粉离体萌发及花粉管生长影响因子的研究. 中国农学通报, 2003, 19(2): 21-25.

ZHANG S L, MEI Z M, CHEN D X. A study on factors affecting in vitro pollen germination and tube growth of *Prunus mume* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2003, 19(2): 21-25. (in Chinese)