

## 核桃优良品种雌雄花授粉活力的研究

刘昊<sup>1</sup> 高英<sup>1</sup> 董宁光<sup>2</sup> 徐虎智<sup>3</sup> 裴东<sup>1</sup>

(1 中国林业科学研究院林业研究所林木遗传育种国家重点实验室 2 北京林业大学林学院 3 河南省洛宁县林业局)

**摘要:**在核桃花期,柱头的可授性和花粉活力直接决定着座果率和当年产量。本文采用具有代表性的核桃优良品种‘温185’、‘强特勒’和‘清香’在记录柱头授粉受精形态变化的同时,用联苯胺-过氧化氢法确定了柱头的可授时期;用MTT染色法确定了花粉活力期限和花粉活力最高的条件和时期。结果表明:柱头可授时期在柱头微张至出现棕色条纹之间,最佳时期在柱头开张后3~5 d;自然状态下花粉可保存96 h,但4 h后生活力即降至33%,雄花刚开放时花粉生活力最高,达95%。花粉在4℃条件下可延长生活力,120 h平均生活力为63.3%。

**关键词:**核桃;雌花;雄花;花粉活力;柱头可授性

中图分类号: S718.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2011)06-0119-05

LIU Hao<sup>1</sup>; GAO Ying<sup>1</sup>; DONG Ning-guang<sup>2</sup>; XU Hu-zhi<sup>3</sup>; PEI dong<sup>1</sup>. Study on pollination activity of pistillate and staminate flowers in walnut excellent varieties. *Journal of Beijing Forestry University* (2011) 33(6) 119-123 [Ch, 20 ref.]

1 State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, P. R. China;

2 College of Forestry, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

3 Luoning County Forestry Bureau, Henan, 471700, P. R. China.

Stigma receptivity and pollen viability during walnut flowering can determine the fruit set percentage and the yield of current year directly. In this study, representative walnut cultivars—‘Wen185’, ‘Chandler’ and ‘QingXiang’ were observed. The morphological changes of stigma were recorded during pollination and fertilization, the stigma receptivity and optimal pollination period were studied by benzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method, and the period and conditions for keeping highest pollen viability were detected by MTT staining method. The results showed that the stigma receptivity period was ranging from the stigma slightly open to it with brown stripes. The best period for pollination was 3—5 days after the split stigma opened. The pollen can be stored for 96 hours under natural conditions and the viability decreased quickly to 33% after 4 hours. The pollen viability was the highest when the walnut anthers shedding, reaching 95%. Pollen viability could be reinforced at 4℃ and the average viability was 63.3% after 120 hours.

**Key words** walnut; pistillate flower; staminate flower; pollen viability; stigma receptivity

传粉过程始于花药开裂和成熟花粉的散出,携带着雄配子或其前体的花粉粒被暴露在不利的环境条件下(如干燥条件),并且必须在具有活力时到达具有可授性的柱头才能完成传粉过程。传粉的成功率受花粉活力、散布方式、柱头可授性和遗传因子的影响<sup>[1-2]</sup>。植物通过风力、动物、重力、分泌物等条件将花粉传播到雌蕊柱头上<sup>[3]</sup>,柱头发育到一定阶

段,能够接受花粉,并促进花粉萌发的一个时间过程为可授期。有关花朵功能形态方面的知识,是进一步研究花粉散出与柱头可授期之间相互关系的基础。因此,单花的开花动态、花粉的活力与寿命以及柱头的可授性,已成为传粉生态学必须研究的内容。

核桃(*Juglans regia* L.)作为我国主要的经济树种之一,通过对后代进行选优仍是获得核桃优良品

收稿日期: 2011-06-02

基金项目:国家林业重点科学技术研究计划林业新技术开发与储备专项(2008-04)、林业公益性行业科研专项(201004048)。

第一作者:刘昊。主要研究方向:经济林生物技术及林木遗传育种。电话:010-62888459 Email:glkl@163.com 地址:100091北京颐和园后中国林业科学研究院林业研究所经济林室。

责任作者:裴东,博士,研究员。主要研究方向:经济林栽培育种和植物生物技术。电话:010-62889624 Email:peidonggu@163.com 地址:同上。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

种的主要途径。核桃一般为雌雄同株异花,系风媒花,多数具有“雌雄异熟”性,花期不一致和雌花受精高峰期较短不利于其授粉受精,虽然核桃存在孤雌生殖现象,但在生产中仍需配制授粉品种,当缺乏授粉树或进行杂交育种时需人工授粉。关于核桃人工授粉前人已有一定研究,认为过量授粉会引起柱头失水脱落,授粉时期以柱头展开呈倒“八”字形为宜<sup>[4-8]</sup>。认为选择适宜的品种搭配以获得较好的授粉效果有其必要性<sup>[9]</sup>。笔者观察发现核桃雌花柱头的形状会因开放时期、环境温湿度和受粉情况等因素的变化而有所响应,此前笼统的认为倒“八”字形为授粉适宜时期的说法不完全准确。通过外部形态变化评估内部结构是快捷有效的判断方法,此前已研究了核桃雌花芽分化过程的内部结构与外部形态的关系<sup>[10]</sup>,而柱头可授性与花发育及其形态变化也具有密切联系<sup>[11-12]</sup>,因此,研究核桃的开花动态并掌握其授粉受精特性在其遗传育种和实际生产中具有重要意义。

本研究以核桃优良品种为试材,对核桃雌花的开花动态及外部形态特征进行了观察,检测了雌花柱头的可授性,以期确立雌花柱头形态与可授性的关系;并检测了不同保存条件下雄花花粉的生活力及寿命。为进行花期调控、人工授粉和品种搭配等提供科学的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

‘温185’为我国早实品种,雌先型‘强特勒’为美国早实品种,雄先型,1984年由奚声珂等引入中国;‘清香’为晚实品种,雄先型,20世纪80年代初由郗荣庭等引自日本。3个品种均栽植于河南省洛宁县,园内管理水平良好,树势中庸,气候和立地条件一致。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 核桃雌花开花外部形态观察

各个品种均随机选取园中不同方位的成龄树,在雌花开放时期,观察记录树冠上不同部位的雌花开放形态及其变化情况。

#### 1.2.2 雌花柱头可授性检测

采用联苯胺-过氧化氢法(质量分数为1%的联苯胺:质量分数为3%的过氧化氢:水=4:11:22,体积比)<sup>[13-15]</sup>测定核桃雌花从开花到谢花这段时间柱头可授性的变化,确定雌花开花后柱头具备可授性的时期。根据核桃雌花开放时期的长短,选取不同柱头型态的雌花,将其柱头切下,迅速投入添加了新制联苯胺-过氧化氢反应液的96孔培养板,计录柱

头开始发生颜色变化和产生气泡的时间,观察5 min内柱头颜色变化和柱头表面产生气泡的数量,每组50朵花,重复3次。

#### 1.2.3 花粉活力的检测

选取盛花期花序变黄松散但花药尚未开裂的雄花序,任其花药自然开裂散粉。待花药开裂散粉时,收集花粉于青霉素小瓶中密封,分别放置于4℃冷藏和室温保存,冷藏湿度保持在70%±5%,室内湿度为45%±5%。用MTT法测定花粉的活力和寿命<sup>[16-18]</sup>。具体方法是将散粉后不同时间的花粉置于载玻片上,将1~2滴MTT蔗糖溶液(100 mg MTT溶解在10 mL 5%的蔗糖溶液中)置于载玻片上与花粉样品充分混匀,盖上盖玻片,室温下放置15~20 min,在显微镜下观察并统计着色花粉粒和未着色花粉粒的数目(每组两个重复,每个重复5个视野)。若花粉变为紫红色则表明有活力,若为浅红色或未着色则表明无活力。对照为100℃干热杀死的相同花粉。

## 2 结果与分析

### 2.1 开花进程的外部形态变化

通过对3个品种的开花进程观察发现,3个品种的雌花期外部形态变化一致。根据外部形态变化,将其分成6个阶段(如图1),即显花期、初开期、V字期、小八字期、大八字期和翻卷期。显花期花被闭合,将柱头包裹其中,持续3~5 d;初开期,花被开裂,柱头伸出,略开张,两裂柱头夹角5°~15°,有些品种柱头顶部外侧呈粉红色,持续1~2 d;V字期,柱头伸长并张开呈V字型,柱头夹角15°~45°,可见柱头表面具突触状的腺质细胞,持续1~2 d;小八字期,柱头夹角45°~90°之间,表面湿性分泌物可见,突触状腺质细胞向外伸展,此时期持续时间因是否授粉而有所不同,经过授粉比未授粉的柱头较快变干并翻卷,干热或大风气候也会使柱头较快枯萎,持续1~3 d;大八字期,柱头夹角90°~120°,柱头生长并开始向外卷曲,羽状柱头完全展开,整个柱头呈羽毛状,柱头上分泌物逐渐减少,顶部外侧的粉红色逐渐消褪,持续2~5 d;翻卷期,柱头张开同时朝下翻卷,夹角基本不再变化,柱头萎蔫逐渐干枯。雌花的子房从显花期到V字期生长膨大,最粗直径从2~3 mm增至5 mm左右,子房未膨大的雌花在花期结束前萎蔫枯黄自花柄端脱落;大部分雌花自大八字期开始有一个明显的膨大变化,子房未变化的雌花在翻卷期后逐渐干枯,连同花柄一起脱落。

### 2.2 柱头可授性的检测

若雌花柱头具有可授性,经联苯胺-过氧化氢

染色的柱头组织会呈现蓝色并伴有大量气泡产生,根据柱头染色的面积、深浅和气泡数的多少确定其柱头可授性的强弱。由表1可以看出雌花初开期,经检测在柱头边缘的触突状腺质细胞具有减弱的可授性;随着柱头生长和张开角度逐渐增大,其表面的触突状腺质细胞伸展、光亮,有黏液产生,经检测小八字期和大八字期具有较强的可授性,表现为柱头变色快、着色深,并且柱头周围气泡多,产生迅速,着

色部位主要集中在柱头表面。在翻卷期经常可见柱头表面呈褐色条纹样,此时的触突状腺质细胞已干枯,染色不明显。在3个核桃品种‘清香’、‘温185’和‘强特勒’的试验中发现雌花柱头的可授性趋势基本一致(如图2),均在V字期开始具有一定的可授性,小八字期和大八字期具有较强的可授性,翻卷期柱头开始萎蔫,不具有可授性。

表1 核桃雌花柱头可授性检测

Tab. 1 Determination of stigma receptivity in walnut

开花时期	‘清香’		‘温185’		‘强特勒’	
	可授性	可授性测定结果	可授性	可授性测定结果	可授性	可授性测定结果
初开期	-	气泡少产生慢 颜色无变化	-	气泡少产生慢 颜色无变化	-	气泡少产生慢 颜色无变化
V字期	+/-	气泡少产生快 着色快颜色浅	+/-	气泡少产生快 着色快颜色浅	+/-	气泡少产生快 着色快颜色浅
小八字	++	气泡多产生快 着色快颜色深	+++	气泡多产生快 着色快颜色极深	+++	气泡多产生快 着色快颜色极深
大八字	+++	气泡多产生快 着色快颜色极深	++	气泡多产生快 着色快颜色深	+++	气泡多产生快 着色快颜色极深
翻卷期	+	气泡少产生慢 着色慢颜色浅	+	气泡少产生慢 着色慢颜色浅	+	气泡少产生慢 着色慢颜色浅

注: - . 不具可授性; + / - . 部分具有可授性; + . 较弱可授性; ++ . 具有可授性; +++ . 强可授性。



a. 显花期; b. 初开期; c. V字期; d. 小八字期; e. 大八字期; f. 翻卷期

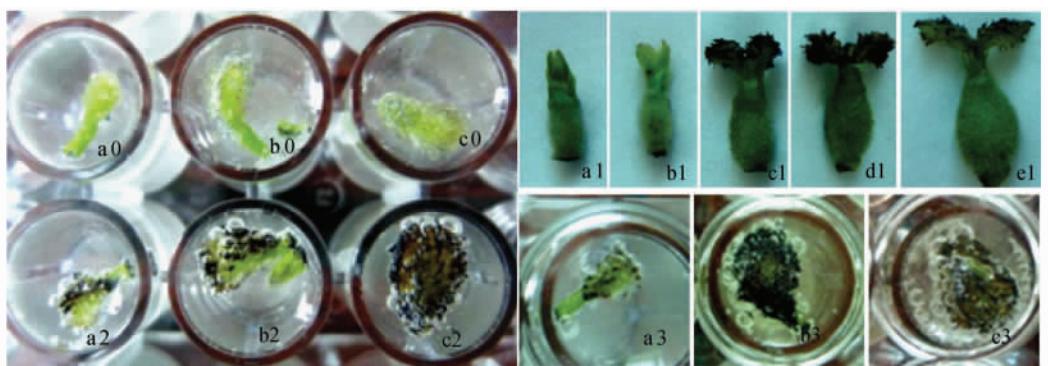
图1 核桃雌花开花动态

Fig. 1 Flowering dynamics of walnut pistil flower

### 2.3 花粉活力的检测

图3为冷藏(温度 $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、湿度 $70\% \pm 5\%$ )保存条件下核桃花粉活力的变化情况。从图中可以看出核桃花药刚散粉时,花粉活力最高,达96%,并

且在前5 d都保持较高的生活力,达63.3%以上。5~10 d时花粉活力下降迅速,到20 d的时候仍有3.7%花粉具有活力。图4为冷藏与自然状态(室温 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、湿度 $45\% \pm 5\%$ )下保存的核桃花粉



a0、a2. ‘清香’V字期; b0、b2. ‘清香’小八字期; c0、c2. ‘清香’大八字期; a1. ‘强特勒’初开期; b1. ‘强特勒’V字期; c1. ‘强特勒’小八字期; d1. ‘强特勒’大八字期; e1. ‘强特勒’翻卷期; a3. ‘温185’V字期; b3. ‘温185’小八字期; c3. ‘温185’大八字期。a0~c0为纯水对照; a1~e1、a2~c2、a3~c3为联苯胺-过氧化氢溶液测试

图2 ‘清香’、‘强特勒’和‘温185’雌花柱头可授性及联苯胺-过氧化氢法检测

Fig. 2 Stigma receptivity and benzidine- $H_2O_2$  method determination of ‘qingxiang’, ‘chandler’ and ‘wen185’

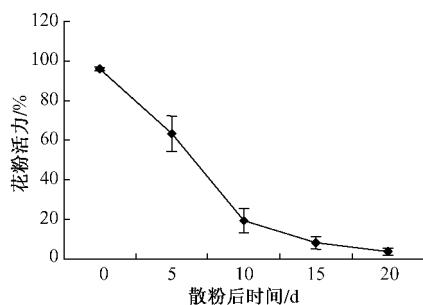


图3 核桃花粉活力的变化

Fig. 3 Pollen viability of walnut

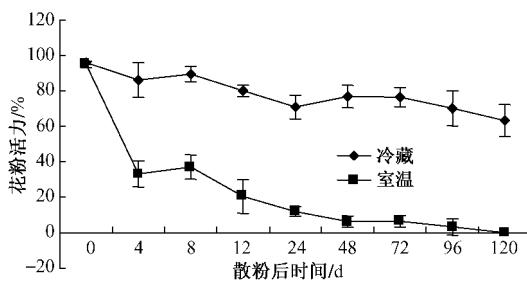


图4 不同保存条件下核桃花粉活力

Fig. 4 Pollen viability of walnut in different conditions

活力变化情况。从图4可以看出自然状态下刚散粉时核桃花粉活力较高,达95%,4 h后迅速降至33.2%。5 d后丧失活力。表明不同的保存条件对花粉的活力有较大的影响,低温和较高的湿度是核桃花粉长时间离体保存的重要条件。

### 3 结论与讨论

在适当的时机授粉是植物杂交育种成功的基础。柱头可授性是花朵成熟过程中的一个重要时期,其在很大程度上对开花后不同阶段的传粉率、雄性和雌性功能之间的相互干扰,不同基因型花粉之间的竞争以及配子体选择的机会等有一定影响<sup>[1]</sup>。

雌蕊柱头可授性的检测方法很多,其中联苯胺-过

氧化氢染色检测柱头可授期较为可靠和简单,在多数植物中得到应用<sup>[13-15]</sup>。本研究对核桃雌花的开花动态进行了观察,根据柱头的不同形态将其划分为6个时期,结论与张琴<sup>[19]</sup>的研究基本一致。观察中还发现:授粉成功后的雌花柱头会较快进入翻卷期;干热或大风气候会使可授期缩短;子房膨大不能作为判断雌花是否受精的依据。利用联苯胺-过氧化氢染色法进行了不同开花状态下雌花柱头可授性的检测,结果表明核桃柱头可授性与外部形态有一定的关系。核桃柱头伸出略张开时已具有可授性,小八字期与大八字期可授性较强,随着柱头的萎蔫、干枯丧失可授性。试验中还发现柱头的着色部位主要在触突状细胞上,因此认为授粉的有效部位为触突状腺质细胞,而花粉在柱头上萌发与生长的具体部位还需作进一步观察。核桃雌花外部形态与可授性相关性的建立对准确、快捷地把握适宜授粉时期及实施花期人工调控提供科学依据。花粉具有活力是完成受精的必要条件,花粉保持生活力时间的长短,一方面由遗传基因所决定,另一方面也受环境因素的影响<sup>[20]</sup>。本研究中,核桃花粉活力检测结果表明刚散粉时花粉活力最高,随保存时间的延长而下降;另外,不同保存条件对核桃花粉活力影响较大。4℃冰箱的温湿度对于保持花粉活力比较适宜,前5 d的生活力均较高,在63%以上;而自然状态下的花粉活力丧失较快,4 h后只有33.2%;因此,进行人工授粉时要注意花粉活力的保持。装有冻存冰袋的冰盒内温湿度与4℃冰箱的基本一致,在室外可用于保持花粉活力,这为生产上花粉活力的短期保持提供了方便。

### 参 考 文 献

- [1] DAFNI A. *Pollination ecology: A practical approach* [M]. New York: Oxford University Press, 1992: 1-59.

- [2] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 134-150.
- [3] LIU K W, LIU Z J, HUANG L Q, et al. Self-fertilization strategy in an orchid[J]. *Nature*, 2006, 441: 945-946.
- [4] 郁荣庭, 张毅萍. 中国核桃[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 192-195.
- [5] DAVID E. *Walnut orchard management* [M]. California: Cooperative Extension, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1985: 81-87.
- [6] 张毅萍, 朱丽华. 核桃高产栽培[M]. 北京: 金盾出版社, 2001: 102-103.
- [7] LEMUS G, GONZÁLEZ C, ETAMALES J. Control of pistillate flower abortion in 'Serr' walnuts in Chile by inhibiting ethylene biosynthesis with AVG [C]//RAMINA A, CHANG G, GIOYANNON I, et al. *Advances in plant ethylene research: proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene*. New York: Springer, 2007: 305-307.
- [8] JAIN S M, PRIYADARSHAN P M. *Breeding plantation tree crops: Temperate species* [M]. New York: Springer, 2009: 249-273.
- [9] KRUEGER W H. Pollination of English walnuts: practices and problems[J]. *HortTechnology*, 2000, 10(1): 127-130.
- [10] 高英, 董宁光, 张志宏, 等. 早实核桃雌花芽分化外部形态与内部结构关系的研究[J]. 林业科学, 2010, 23(2): 241-245.
- [11] YI W, LAW E, MCCOY D, et al. Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*) [J]. *Annals of Botany*, 2006, 97: 57-63.
- [12] 刘林德, 张萍, 张丽, 等. 锦带花的花粉活力、柱头可授性及传粉者的观察[J]. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1431-1434.
- [13] 李艳华, 康向阳. 白杨派树种雌蕊柱头可授性及其检测方法的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(5): 859-863.
- [14] 黄修梅, 郝丽珍, 胡宁宝, 等. 沙芥花粉萌发特性和柱头可授性的研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(10): 1473-1478.
- [15] 王其刚, 张颤, 魏洪英, 等. 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.
- [16] RODRIGUEZ-RIANO T, DAFNI A. A new procedure to assess pollen viability[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2000, 12(4): 241-244.
- [17] 陆婷, 罗淑萍, 蒙敏, 等. 灰枣开花生物学特性研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1589-1594.
- [18] 刘黎明, 刘萍, 梁凤丽, 等. 新疆野杏花粉活力和柱头可授性研究[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(4): 86-89.
- [19] 张琴, 刘德良. 三台核桃的开花习性观察[J]. 经济林研究, 2001, 19(2): 7-11.
- [20] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982: 20-60.

(责任编辑 赵 勃)