

青钱柳花粉生活力及耐贮性的研究

冯 岚 泐香香 方升佐

(南京林业大学森林资源与环境学院)

摘要:青钱柳具有明显的花期不育性,对其自花授粉和结实产生很大的影响。本文系统研究了青钱柳花粉生活力的测定方法、不同散粉期花粉生活力的动态变化,及不同贮藏条件下花粉的耐贮性,为开展人工授粉以解决青钱柳花期不遇和远缘杂交等提供科学依据。结果表明:琼脂培养法较适于青钱柳花粉的贮藏,且在硼酸 10 mg/L + 蔗糖 10% 培养基上花粉萌发率最高;在整个散粉期间,花粉生活力的变化值呈正态分布,散粉盛期的花粉生活力最高,可达 93.7%;不同含水量、不同贮藏温度对贮藏花粉生活力的影响呈极显著差异;随着贮藏时间的增加,花粉生活力下降;含水量为 7.3%、花粉贮藏于 -80℃ 条件下生活力最高,贮藏 4 个月花粉生活力还维持在 50% 左右。

关键词:青钱柳;花粉生活力;耐贮性

中图分类号: S722 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)04-0121-05

FENG Lan; FU Xiang-xiang; FANG Sheng-zuo. **Pollen viability and storability of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32 (4) 121-125 [Ch, 22 ref.] College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, 210037, P. R. China.

Dichogamy is an important factor preventing the self-fertilization and fruit production of *Cyclocarya paliurus*. We evaluated the methods of testing pollen viability, the dynamics of the pollen viability during the dispersal period and the storability of pollen under different conditions, in order to provide scientific references for artificial pollination and distant hybridization. The results showed that the agar culture was a suitable method for testing pollen viability. The optimum culture medium was 10 mg/L boric acid with 10% sucrose. The pollen viability showed a normal distribution during the dispersal period, with the highest germination rate of up to 93.7% during the metaphase of the dispersal. The pollen viability decreased with the extension of the storage period. The storage temperature and moisture content of pollen had significant effects on its storability. The combination of a moisture content of 7.3% and storage temperature of -80℃ was the best storage condition, which could retain pollen viability to about 50% after a 4-month storage.

Key words *Cyclocarya paliurus*; pollen viability; storability

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja) 系胡桃科 (Juglandaceae) 青钱柳属植物,为我国特有的珍稀树种,是国家重点保护的濒危植物之一。青钱柳是一种高大速生阔叶乔木,因其树形似柳,果实圆形似铜钱,色青而下垂,故名“青钱柳”。其根、枝、叶均可入药,具有明显的降血糖和血压、减肥、抗肿瘤、抗衰老、抗过敏、清热解暑、提高人体免疫力、

促进新陈代谢等多种功效,是一个很有发展前途的珍贵树种。

青钱柳的系统研究起步较晚(20世纪70年代),主要集中在理化成分、药用价值及饮茶保健功效方面^[1],而在人工培育技术方面研究较少,关于花粉及生殖发育的研究几乎是空白。青钱柳在自然状态下种子空粒率高,种壳骨质坚硬,且具有深休眠

收稿日期:2009-07-16

基金项目:江苏省高新技术研究计划项目(BG2006314)、江苏省“六大人才高峰”资助项目“珍贵青钱柳种质资源保存及其开发利用技术研究”。

第一作者:冯岚。主要研究方向:人工林定向培育。电话:13914703910 Email:haibaobei.8@163.com 地址:210037 江苏省南京市龙蟠路南京林业大学研究生 07(20) 信箱。

责任作者:泐香香,副教授。主要研究方向:森林培育学和分子遗传学。电话:025-85427403 Email:xxfu@njfu.com.cn 地址:210037 江苏省南京市龙蟠路南京林业大学森林资源与环境学院。

本刊网址: <http://www.bjfjournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

特性^[1],严重影响了该树种的人工资源培育和开发利用。经作者2年的跟踪观察发现,青钱柳花期不遇现象很严重,有些植株雌花进入了可授期,但是雄花还处于造孢时期;有些植株雄花进入了散粉期,但是雌花还处在大孢子时期。这种现象在同科的美国山核桃(*Carya illinoensis*)、核桃楸(*Juglans mandshurica*)中普遍存在^[2-3]。为此,本文开展了青钱柳花粉生活力和耐贮性的研究,为开展青钱柳的人工授粉提供科学依据,以期解决其花期不遇和结实率低等实际问题。

1 材料与方法

1.1 材料

南京中山植物园药用园15~20年生的青钱柳雄花。

1.2 方法

1.2.1 花粉采集

在散粉期(5月14—18日),每天上午采集同一植株中部向阳侧成熟的雄花序。采回后在水培条件下收集花粉。

1.2.2 花粉生活力测定

1) 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法^[4-5]。在载有花粉的载玻片上滴入浓度为0.5%的TTC溶液2滴,用镊子搅拌均匀,放于装有湿滤纸的培养皿内,置于37℃的恒温箱2h后取出盖上盖玻片,在显微镜下观察。此处理重复3次,每重复随机选取5个视野观察并拍照,每个视野的花粉总数要大于50粒。处理中有生活力的花粉被染成红色。花粉生活力=着色花粉数量/观察花粉数量×100%。

2) 醋酸洋红染色法。在载有花粉的载玻片上滴入1~2滴1%醋酸洋红溶液,用镊子搅拌均匀,盖上盖玻片,15min后在显微镜下观察。有活力的花粉被染成红色,无活力的花粉不着色(重复处理数与花粉生活力统计同上)。

3) 琼脂培养基法^[6-7]。在琼脂浓度为0.6%、pH 5.8~6.0的溶液中,分别加入不同质量浓度的蔗糖和硼酸。蔗糖浓度设5个处理:5%、10%、

15%、20%、30%;硼酸浓度设3个处理:10、100、1000 mg/L。将蔗糖浓度和硼酸浓度进行正交设计,共15个处理。将一滴培养液滴于凹形载玻片,用毛笔蘸少许花粉播于培养基上,置于25℃的恒温箱中培养24h,每小时观察一次。萌发的花粉管长度超过花粉直径则定为萌发。每个处理重复3次,每重复随机选取3个视野观察并拍照,每个视野的花粉总数要大于50粒,统计花粉粒总数和已萌发的花粉粒总数。花粉生活力=已萌发的花粉粒数量/花粉粒总数×100%。

1.2.3 花粉贮藏

将花粉收集于离心管中,于4℃条件下用硅胶干燥4、13h,用烘干法^[8]测得花粉的含水量分别为7.3%和4.0%;未经干燥的新鲜花粉含水量为12.1%(对照)。将不同含水量的花粉置于密封条件下分别贮藏在室温、4、-20、-40、-80℃条件下,用琼脂培养基法于0、3、7、30、60、120d时测定花粉的生活力。

以上试验的花粉均采用散粉盛期的新鲜花粉。

1.2.4 数据分析

结果数据用SAS软件进行方差分析及多重对比分析。

2 结果与分析

2.1 花粉生活力测定方法的比较

用TTC染色法测定新鲜花粉的生活力很低,只有19.36%(图1B、表1),不能正确反应花粉的生活力;用醋酸洋红染色法和琼脂培养基法测定花粉生活力较高,分别为93.66%和93.88%(表1),且两者测定的花粉生活力趋于一致。但由于青钱柳的花粉本身颜色很浅,用醋酸洋红染色后,整体颜色稍稍变深,具有生活力的花粉与无生活力的花粉颜色区别不大,不易区分(图1A),因此,醋酸洋红染色法不适于测定青钱柳花粉生活力。根据观察,琼脂培养基法操作简单并且检测结果直观(图1C),便于统计萌发率,是比较方便简捷的花粉生活力检测方法。

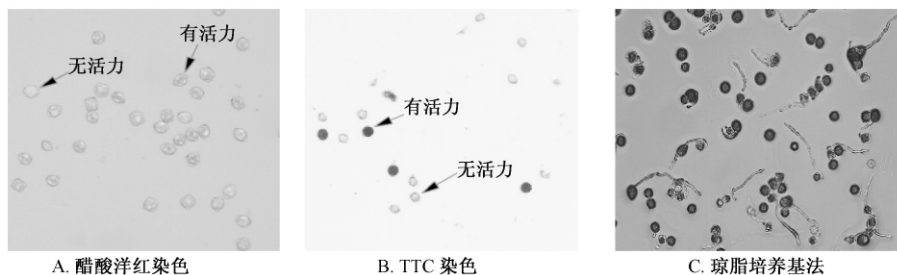


图1 花粉生活力测定方法的比较

Fig. 1 Comparison of testing methods on pollen viability

表1 不同测定方法的花粉生活力

Tab. 1 Pollen viability with different testing methods %

测定方法	花粉生活力
醋酸洋红染色法	93.66 a
TTC 染色法	19.36 b
琼脂培养基法	93.88 a

注:同列中不同字母表示在0.05水平上差异显著。

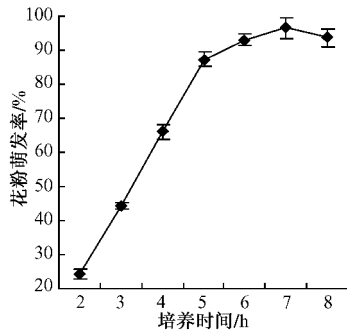


图2 琼脂培养时间对花粉萌发的影响

Fig. 2 Effects of culture time on pollen germination

2.2 不同培养基对花粉萌发的影响

由图3可以看出:硼酸 10 mg/L + 蔗糖 10% 花粉萌发率最高,为 93.7%。当硼酸浓度不变,蔗糖浓度达到 15% 时,花粉萌发率为 43%,下降了一半;随着蔗糖浓度的上升,花粉的萌发率逐渐下降,说明当蔗糖浓度超过 15% 会抑制花粉的萌发。当蔗糖浓度为 10%,硼酸浓度为 100、1 000 mg/L 时,花粉的萌发率明显下降,说明硼酸浓度超过 100 mg/L 抑制了花粉的萌发。

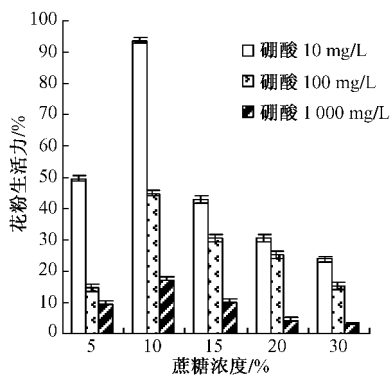


图3 不同培养基对花粉萌发的影响

Fig. 3 Effects of different culture media on pollen germination

经方差分析可知:培养基中的硼酸浓度、蔗糖浓度对青钱柳花粉萌发率的影响呈极显著差异 ($F = 751.28$, $F = 252.42$, $P < 0.05$);同时蔗糖浓度与硼酸浓度之间的交互作用也具有极显著差异 ($F = 88.98$)。研究表明,蔗糖 10% + 硼酸 10 mg/L 组成的培养基花粉萌发率最高。

2.3 不同散粉期花粉生活力的差异

青钱柳花粉于 5 月 13 日进入散粉期,历经 6 d。

根据花药的开裂程度,可分为散粉初期(5 月 14 日)、散粉盛期(5 月 15—16 日)、散粉末期(5 月 17—18 日)。散粉初期与末期,花药仅有 20% 开裂,散粉盛期花药开裂程度达到 90% 以上。不同散粉期的花粉生活力存在显著差异 ($F = 3.07$, $P < 0.05$),其中散粉盛期的花粉生活力高于散粉初期和散粉末期。在散粉初期的花粉生活力较低,只有 83.8%;随着散粉的持续进行,花粉进入散粉盛期,而此时花粉生活力升高并达到最大值 93.7%;随后,花粉的生活力开始下降,直至散粉末期,花粉生活力为 82.7%。在整个散粉过程中,花粉生活力的平均值呈正态分布(图 4)。

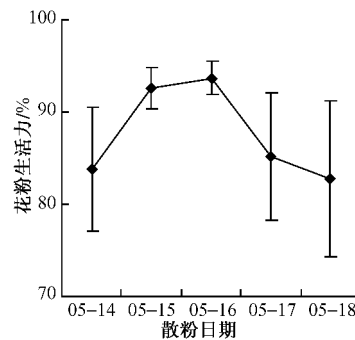


图4 散粉期青钱柳花粉的生活力

Fig. 4 Pollen viability during dispersal period

2.4 贮藏条件对花粉生活力的影响

2.4.1 花粉含水量对花粉耐贮性的影响

青钱柳花粉在不同含水量下,其生活力随着时间的变化差异显著。从表 2 可以看出,在室温条件下,花粉的生活力急剧下降:贮藏 3 d 时含水量为 7.3% 的花粉的生活力降至 30% 左右,含水量为 12.1% 和 4.0% 的花粉降至 20% 左右;贮藏 7 d 时,萌发率为 1.01% ~ 2.23%。在 4℃ 条件下贮藏的花粉,生活力下降趋势较缓:含水量为 12.1% 和 4.0% 的花粉变化趋势基本一致,贮藏 7 d 时,生活力都为 64% 左右;而含水量为 7.3% 的花粉生活力为 71.24%。4℃ 条件下贮藏 30 d,含水量为 12.1% 和 4.0% 的花粉生活力降至 30% 左右,含水量为 7.3% 的花粉还有 60% 左右的生活力。

-20、-40℃ 条件下贮藏的花粉,生活力下降较慢。贮藏 30 d,3 种含水量的花粉生活力下降趋势基本相同,都降至 60% 左右;贮藏 120 d 时,含水量为 7.3% 的花粉生活力为 39.74% ~ 48.24%,而含水量为 12.1% 和 4.0% 的花粉生活力还不到 16% (-40℃、含水量为 4.0% 的除外)。由此说明含水量为 7.3% 更有利于花粉的贮藏。

-80℃ 条件下贮藏的花粉,贮藏 7 d 生活力变化不大。贮藏 30 d 时,含水量为 12.1% 的花粉生活

力开始明显下降,降至73.68%,其他含水量的花粉仍保持85%以上的生活力。随后,含水量为12.1%和4.0%的花粉生活力下降趋势一致,120 d时花粉生活力为20%左右,而含水量为7.3%的花粉仍保

持50.14%的较高生活力。由此说明,花粉含水量过高或过低都不利于青钱柳花粉的贮藏。经多重比较分析可知,含水量7.3%的花粉生活力都维持一个较高水平。

表2 不同含水量、贮藏温度下青钱柳花粉生活力
Tab.2 Pollen viability of *C. paliurus* with different moisture contents and storage temperatures

含水量/%	温度/℃	花粉生活力/%					
		对照	3 d	7 d	30 d	60 d	120 d
4.0	室温	93.71	20.97 dB	1.01 cA	0	0	0
	4	93.71	77.32 cB	63.37 bB	29.89 cB	5.68 dB	0
	-20	93.71	84.97 bB	83.66 aA	59.68 bB	38.52 cB	13.56 cB
	-40	93.71	88.35 aB	84.23 aB	60.79 bB	51.78 bB	37.17 aB
	-80	93.71	91.38 aA	85.73 aB	85.73 aB	58.12 aB	24.35 bB
7.3	室温	93.71	30.21 dA	2.23 eA	0	0	0
	4	93.71	82.69 cA	71.24 dA	58.45 dA	37.22 dA	4.64 d
	-20	93.71	88.36 bA	82.14 cA	64.24 cA	51.46 cA	39.74 cA
	-40	93.71	91.53 aA	89.11 bA	72.27 bA	61.82 bA	48.24 bA
	-80	93.71	92.13 aA	91.45 aA	86.54 aA	74.32 aA	50.14 aA
12.1	室温	93.71	21.13 dB	1.12 dA	0	0	0
	4	93.71	78.35 cB	64.73 cB	31.26 cB	6.72 dB	0
	-20	93.71	86.55 bB	84.34 bA	60.78 bB	39.47 cB	11.23 cB
	-40	93.71	89.86 aB	85.54 bB	62.36 bB	52.68 bB	15.12 bC
	-80	93.71	90.22 aA	88.87 aB	73.68 aA	58.12 aB	19.41 aC

注:同列中小写字母表示同一含水量下不同温度对花粉生活力影响的多重比较结果,大写字母表示同一温度下不同含水量对花粉生活力影响的多重比较结果,不同字母表示在0.05水平上差异显著。

2.4.2 温度对花粉耐贮性的影响

为了探讨青钱柳花粉采收后的贮藏条件,试验中研究了不同温度对花粉耐贮性的影响。从表2可以得出:含水量为12.1%的花粉,在室温条件下在第3天时生活力下降到21.13%,第7天不到2%;在4℃贮藏至30 d,生活力为31.26%,贮藏至60 d,生活力仅有6.72%;在冷冻条件下(-20、-40、-80℃)生活力下降的趋势基本一致,贮藏60 d时,生活力都由93.71%下降到39.47%~58.12%,到120 d时,花粉生活力仅为15%左右。

常温贮藏下,含水量为7.3%的花粉,第3天生生活力还有30%左右,到了第7天生生活力仅为2.23%;在4℃贮藏条件下,花粉贮藏30 d生活力还有58%左右,相比常温贮藏,生活力下降趋势较缓慢;在冷冻条件下,花粉都保持较高的生活力,这说明冷冻条件更有利于青钱柳花粉的保存。经多重比较分析,其中最好的贮藏条件是-80℃,含水量为7.3%、贮藏120 d花粉生活力仍保持在50%左右。

含水量为4.0%的花粉在常温下7 d左右生活力就只剩1.01%。由此可以得出:无论含水量多少,青钱柳花粉都不宜在常温下贮藏。在4℃下贮藏的花粉,贮藏30 d时,花粉生活力还有30%左右,60 d时生活力仅剩5.68%;在冷冻条件下,-20℃贮藏60 d时生活力为40%左右,而-40、-80℃贮藏60 d时生活力还有55%左右。

试验结果表明:青钱柳花粉的耐贮性不但与花粉含水量密切相关,同时受贮藏温度的影响也十分显著。无论是低温还是室温,贮藏的花粉生活力均随贮藏天数的增加而迅速降低。对于贮藏相同时间的花粉来说,低温下花粉的生活力高于室温;对于在低温下贮藏的花粉,含水量过高或者过低,花粉生活力均下降较快。方差分析可知,不同贮藏温度、不同含水量对花粉生活力变化的影响都达到极显著水平;通过多重对比可知,含水量为7.3%、温度为-80℃的贮藏条件较有利于青钱柳花粉的贮藏。

3 结论与讨论

在检测青钱柳花粉活力的3种方法中,琼脂培养基是最适合的方法。在硼酸10 mg/L+蔗糖10%条件下,青钱柳花粉萌发率最高。随着硼酸浓度和蔗糖浓度的增加,花粉的萌发受到抑制。在花粉离体培养中,不同植物种类所需的最适蔗糖、硼酸浓度是不同的。如悬铃木(*Platanus acerifolia*)花粉最适的培养基条件是15%蔗糖+0.01%硼酸^[9];在3%蔗糖+60 mg/L硼酸的培养基配方下,银杏(*Ginkgo biloba*)花粉的萌发率最高^[10];凤梨科(Bromeliaceae)植物的最适培养基浓度是20%蔗糖+0.001%硼酸^[11]。

在青钱柳花粉整个散粉期中,花粉的生活力都很高。尤其在散粉盛期,花粉的生活力达到最大值。

所以在对青钱柳进行人工授粉时,特别是在解决青钱柳雌雄花花期不遇的问题上,建议采集花粉生活力最高的散粉盛期的花粉进行授粉。

在林业的常规育种过程中,父本花粉的生活力及产量是应该考虑的重要因素之一。目前关于花粉生活力的研究已有大量报道。一般认为干燥花粉贮藏于低温、冷冻或真空下有利于花粉的保存^[12]。如飞燕草(*Delphinium*)花粉经3 h干燥后贮藏于-30℃下180 d还有很高的生活力^[13];甜杏(*Prunus dulcis*)花粉生活力在低温贮藏一年后还有50%左右^[14]。这与本文研究的结果基本一致:青钱柳在干燥4 h后贮藏于-80℃下,120 d生活力还保持在50%左右。在超低温(-196℃)下,保存花粉的研究也有很多相关报道^[15]。如山龙眼属(*Protea*)的花粉在超低温下贮藏450 d后生活力与新鲜花粉没有区别^[16];与青钱柳同科的美国山核桃的花粉在超低温下贮藏了10年仍具很高的生活力^[17]。对于青钱柳花粉是否适宜在超低温下贮藏的问题还有待继续研究。

在一定含水量条件下,花粉可以得到较好的贮藏^[18]。不同植物花粉贮藏时的最适含水量差异很大^[19]。如沙田柚(*Citrus grandis*)花粉低温贮藏的最适含水量为13.5%^[20];蔗茅(*Erianthus rufipilus*)花粉含水量在10%以下才能较长时间保持花粉的生活力^[21]。本研究表明,青钱柳花粉的贮藏,最适贮藏的花粉含水量是7.3%,过高或过低都会使花粉的生活力下降。这与Luza等^[22]研究的核桃(*Juglans regia*)花粉低温贮藏的含水量不能高于7.5%一致。对比3种含水量,5种贮藏温度,青钱柳花粉贮藏的最适条件是含水量为7.3%、温度为-80℃。

参 考 文 献

- [1] 方升佐,杨万霞. 青钱柳的开发利用与资源培育[J]. 林业科技开发,2003,17(1):49-51.
- [2] 张志华,王文江,高仪,等. 核桃雌雄异熟性的花芽分化进程[J]. 园艺学报,1995,22(4):391-393.
- [3] 姚小华,王开良,任华东,等. 薄壳山核桃优新品种和无性系开花物候特性研究[J]. 江西农业大学学报,2004,26(5):676-680.
- [4] IANSAC A R, SULLIVAN C Y, JOHNSON B E. Viability and germination of the pollen of sorghum (*Sorghum bicolor*) [J]. *Annals of Botany*, 1994, 74(1): 27-33.

- [5] KELEN M, DEMIRTAS I. Pollen viability, germination capability and pollen production level of some grape varieties (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2003, 25(3): 229-233.
- [6] 申书兴. 园艺植物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [7] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992.
- [8] 孙蕾, 房用, 马玲, 等. 黑松和赤松花粉取粉处理和干燥贮藏技术研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 189-191.
- [9] 李志能, 刘国锋, 罗春丽, 等. 悬铃木花粉生活力及贮藏力的研究[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 54-57.
- [10] 胡君艳, 李云, 孙宇涵, 等. 银杏花粉生活力测定及贮藏方法的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 148-153.
- [11] PARTON E, VERVAEKE I, DELEN R, et al. Viability and storage of bromeliad pollen [J]. *Euphytica*, 2002, 125(2): 155-161.
- [12] 王钦丽, 卢龙斗, 吴小琴, 等. 花粉的保存及其生活力测定[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 365-373.
- [13] HONDA K, WATANABE H, TSUTSUI K. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30℃ [J]. *Euphytica*, 2002, 126(3): 315-320.
- [14] MARTINEEZ-GOMEZ P, GRADZIEL T M. Low temperature storage of almond pollen [J]. *HortScience*, 2002, 37(4): 691-692.
- [15] BARNABAS B, KOVACS G. Storage of pollen [J]. *Novenytermeles*, 1994, 43(5): 447-456.
- [16] VAN DER WALT T D, LITTLEJOHN G M, ORTEGA E, et al. Storage and viability testing of protea pollen [J]. *American Society for Horticultural Science*, 1996, 121(5): 804-809.
- [17] SPARKS D, YATES I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability [J]. *HortScience*, 2002, 37(1): 176-177.
- [18] BUITINK J, WALTERS C, HOEKSTRA F A, et al. Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents: Interpretation on the basis of water activity and glass concepts [J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 103(2): 145-153.
- [19] 胡晋, 郭长根. 超低温(-196℃)保存杂交水稻恢复系花粉的研究[J]. 作物学报, 1996, 22(1): 72-77.
- [20] 薛妙男, 刘华英, 饶桂荣, 等. 沙田柚花粉低温贮藏的研究[J]. 广西植物, 2000, 20(4): 367-370.
- [21] 李富生, 林位夫, 何顺长. 不同无性系蔗茅抽穗开花特性的观察和花粉贮藏条件的研究[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 171-174.
- [22] LUZA J G, POLITO V S. Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen [J]. *Euphytica*, 1988, 37(2): 141-148.

(责任编辑 董晓燕)