4种槐树花粉生活力测定方法的比较

杨鑫, 张秀省, 穆红梅, 苗中芹, 陈敏, 张涛
(聊城大学农学院, 山东聊城 252059)

摘要:以国槐、聊红槐、五叶槐和龙爪槐的花粉为试验材料,测定4种槐树花药内花粉数量,并用I₂-KI染色法、TTC染色法以及培养基萌发法对其花粉生活力进行测定。结果表明,国槐的单个花药花粉数量最多,为41 750粒;培养基萌发法更适合测定4种槐树花粉生活力,I₂-KI染色法、TTC染色法均不适于测定其花粉生活力;蔗糖和硼酸影响4种槐树花粉的萌发,最优培养基为蔗糖浓度0.2%、硼酸浓度0.02%,花粉平均萌发率以国槐最高,达43.3%。

关键词:花粉;槐树脂;生活力;萌发率

中图分类号:S792.26

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2011)12-0053-02

Comparative studies on pollen viability determination method of four kinds of sophora trees

YANG Xin, ZHANG Xiu-sheng, MU Hong-mei, MIAO Zhong-qin, CHEN Min, ZHANG Tao
(College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: The pollen number of *Sophora japonica* L., *Sophora japonica* 'Liaohong', *Sophora japonica* var. *oligophylla* Franch and *Sophora japonica* var. *pendula* Loud was studied in this paper. And the pollen viability was determined by I₂-KI staining, TTC staining and culture medium germination methods. The results showed that the average pollen number of one single anther of *Sophora japonica* L. was the most, which was 41 750. Culture medium germination method was suitable method for the determination of pollen viability, while I₂-KI staining and TTC staining were not suitable for the determination of pollen viability. Sucrose and boric acid were the important factors for the germination of pollen. When sucrose was 0.2% and boric acid was 0.02%, the germination rate reached the maximum, the germination rate of *Sophora japonica* L. was the highest, which was 43.3%

Key words: Sophora Trees; pollen; viability; germination rate

国槐 (*Sophora japonica* L.) 为豆科蝶形花亚科槐属 (*Sophora* L.) 落叶乔木, 原产我国北方, 枝叶茂密, 树姿雄伟, 适应性、抗性强, 是园林中广泛种植的行道树和庭荫树, 花和荚果不仅可入药而且可作为黄色染料。国槐有许多变种和品种, 变种主要有枝条蟠曲如龙的龙爪槐 (*S. japonica* var. *pendula* Loud)、叶形似蝶的五叶槐 (*S. japonica* var. *oligophylla* Franch) 等; 聊红槐 (*S. japonica* 'Liaohong') 是国槐的栽培品种, 是从国槐栽培苗中发现的花色变异品种, 花期比国槐长 14 d 左右, 是当前乔木树种中极少的夏季红花系品种之一^[1], 均具有独特的园林应用价值。

花粉活力是花粉质量的重要生理指标, 花粉在柱头上的萌发率对植物受精具有十分重要的作用; 花粉活力还是评估花粉细胞活性的依据之一, 其活力测定结果的准确性对细胞学试验和杂交育种的成败有一定的影响。花粉贮藏是杂交育种的基础工作, 花粉生活力对花粉贮藏也有十分重要的作用^[2]。但目前对槐树花粉的研究仅局限于花粉形态学方面, 如杨德奎等^[3]对山东槐属植物的花粉亚显微形态进行研究, 赵燕等^[4]对其花粉的形态进行了比较。本试验以国槐及其变种和品种为材料, 研究其花粉数量, 并通

过染色法、培养基萌发法对花粉生活力进行测定, 探讨不同蔗糖和硼酸浓度对花粉萌发的影响, 旨在为研究槐属植物的结实率、杂交育种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为国槐、聊红槐、五叶槐和龙爪槐等 4 种槐树的花粉, 均在 2010 年 7 月采集于聊城大学东校区槐属资源圃。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉采集 每种树种取样 15 棵, 同一花序中部含苞待放的花蕾和当日盛开的花。花蕾置室温下 12 h, 待花粉充分开裂散粉后, 收集花粉在干燥器中干燥 1 h 后, 置于室温(干燥器中)贮存备用。

1.2.2 花粉数量的测定 采用纤维素酶法对花粉数量进行测定。取完整花药 20 枚放入 1.5 mL 离心管中, 在 25℃ 下烘干, 使花粉完全散出, 加入纤维素酶溶液 1 mL 处理 24 h, 使花粉从花药中完全解离, 并充分振荡, 使花粉粒均匀分布于溶液中。取 5 μL 溶液滴于凹面载玻片上, 在显微镜下观察统计花粉粒数, 3 次重复^[5]。每枚花药花粉数量=载玻片上总花粉粒数×200/20。

1.2.3 I₂-KI 染色法 称取碘化钾 2 g, 溶解于 7 mL 蒸馏水中, 加入 1 g 碘, 全部溶解后再用蒸馏水定容至 300 mL, 配制成碘-碘化钾溶液, 贮于棕色瓶中, 4℃ 冰箱中备用^[6]。用经酒精棉球消毒过的发丝蘸取少量花粉放于载玻片凹槽

收稿日期: 2011-03-25

基金项目: 山东省聊城市农业产业化发展资金(201064)

作者简介: 杨鑫(1985-), 男, 在读硕士生, E-mail: ywym131920@163.com

通讯作者: 张秀省(1960-), 男, 博士, 教授, E-mail: zhangxiusheng@lccu.edu.cn

内,加1滴水,使花粉散开,再加1~2滴碘-碘化钾溶液,盖上盖玻片静置3~4 min后置于显微镜下观察。从蓝色的深浅程度判断花粉中淀粉含量。染色后活力较强的花粉呈蓝黑色,较弱的为淡蓝色,无活力的几乎无色。

1.2.4 TTC (氯化三苯基四氮唑) 染色法 称取0.5 g TTC放入烧杯中,加入少许95%酒精溶解,用蒸馏水定容至100 mL,制成0.5%TTC溶液,放于4℃冰箱中待用^[6],溶液发红时不能使用。然后用经酒精棉球消毒过的发丝蘸取少许花粉于载玻片上,加水1滴,使花粉散开,再加1~2滴0.5%TTC溶液,盖上盖玻片,置于35℃的恒温培养箱中静置15~20 min后,置于显微镜下观察。被染成红色的为活力强的花粉粒,淡红色或无色的为没有活力的花粉粒或不育花粉。

1.2.5 培养基萌发试验法 采用琼脂培养基萌发法^[7],配置浓度为0.1%、0.2%、0.3%的蔗糖溶液,硼酸溶液浓度分别为0.01%、0.02%、0.03%,加入1%琼脂配制成不同的培养基。

用玻璃棒滴1滴培养液于盖玻片上,沾取少许花粉均匀撒播于培养基表面,让其自然散开,置于25℃恒温箱中培养,Olympus显微镜下观察花粉的萌发状况。以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准,统计花粉萌发率。

2 结果与分析

2.1 4种槐树花粉数量

研究表明,国槐、聊红槐、五叶槐、龙爪槐的每个花药中花粉数量分别为41 750、29 840、37 343、40 661粒。4种槐树每个花药中花粉数量存在差异,国槐与龙爪槐差异不显著,与五叶槐和聊红槐差异达极显著;聊红槐中的花粉数量与龙爪槐

和五叶槐差异达极显著;龙爪槐与五叶槐差异不显著。

2.2 不同染色法测定花粉活力

由表1可知,4种槐树花粉经碘-碘化钾溶液染色后,花粉粒呈红褐色和黄褐色,这与有生活力的花粉粒染色为蓝色不符;并且所有花粉均染色,只是颜色不相同,不可能所有花粉都具有生活力。此法不适合4种槐树花粉生活力的测定。

表1 I₂-KI 染色法测定花粉染色率

品种	观察总数(粒)	红褐色(粒)	黄褐色(粒)	红褐色染色率(%)	黄褐色染色率(%)
国槐	2135	1742	393	81.59	18.41
聊红槐	2447	1865	582	76.22	23.78
五叶槐	1984	1551	433	78.18	21.82
龙爪槐	2076	1462	614	70.42	29.58

经0.5%TTC溶液染色后,花粉呈深红色居多,且4种槐树花粉染色率差别不大、平均达85%,但其颜色稳定性较差,染色效果不理想。花粉呈浅红色的平均达10%,无色的平均5%,且有生活力和无生活力的染色界限不分明,表明TTC染色法不适合用来测定4种槐树花粉的生活力。

2.3 培养基萌发法测定花粉生活力

硼酸和蔗糖是影响花粉萌发的重要因素,表2为4种槐树在不同浓度硼酸和蔗糖培养基上的花粉萌发情况。由表2可知,4种槐树在不同培养基上花粉萌发率有差异,但是均在添加有0.02%硼酸+0.2%蔗糖培养基中花粉萌发率最高,其中国槐43.3%、聊红槐39.5%、五叶槐30.8%、龙爪槐22.1%,与其他组合相比差异显著。因此,1%琼脂+0.02%硼酸+0.2%蔗糖为最优培养基。

表2 不同培养基对4种槐树花粉萌发率的影响

硼酸浓度(%)	蔗糖浓度(%)	花粉萌发率(%)			
		国槐	聊红槐	五叶槐	龙爪槐
0.01	0.1	23.5±1.0gG	19.2±1.6gG	17.5±1.5fE	12.7±0.9hG
	0.2	30.8±1.0dD	28.9±1.8dD	23.2±1.4cC	15.9±1.2DdeE
	0.3	27.5±0.7fEF	26.5±2.1eE	18.6±1.0eE	14.3±1.1gF
0.02	0.1	38.4±0.5bB	35.7±0.9bB	22.3±1.2cD	19.8±1.5bB
	0.2	43.3±0.9aA	39.5±1.5aA	30.8±1.4aA	22.1±1.9aA
	0.3	35.6±1.2cC	31.4±1.4cC	25.4±1.0bB	17.3±1.1cC
0.03	0.1	26.7±0.8fF	23.4±0.9fF	21.2±1.6dD	14.7±1.4fGfEF
	0.2	31.9±1.0dD	28.1±1.5dD	24.8±2.2bB	16.8±1.1cdCD
	0.3	28.9±0.9eE	25.8±1.5eE	22.4±1.7cD	15.3±1.4efEF

注:表中同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著,大写英文字母不同者表示差异极显著。

3 结论与讨论

4种槐树的花粉数量有显著差异,最多的国槐单个花药花粉数量为41 750粒,其次龙爪槐为40 661粒,五叶槐为37 343粒,最少的聊红槐只有29 840粒。国槐和聊红槐之间的花粉数量存在极显著差异,这可能取决于它们自身的遗传特性。

I₂-KI溶液染色法是检测花粉生活力的常用方法,本试验染色颜色为红褐色和黄褐色,与实际情况不符,而且某些植物由于花粉失活也会产生淀粉积累,遇碘会变蓝色,

所以I₂-KI溶液染色法不适用于对其花粉活力的测定。TTC染色法对大多数植物是适用的,在锦带花、芍药等花粉生活力测定中效果明显^[8],但本试验结果表明,TTC染色法染色不稳定、褪色较快,这可能是花粉自身特性的影响,因此该法同样不适合对其花粉活力的测定。检测花粉活力染色方法还有萨而达柯克染色法^[9]、CAB法、Kew法^[10]等,哪种染色法最适合槐属植物花粉活力的测定有待进一步研究。

培养基萌发试验法测定4种槐树的花粉生活力,得出最佳培养基组合为1%琼脂+0.02%硼酸+0.2%蔗糖。蔗

(下转第77页)

酶的交互作用共同完成了土壤酶活性的变化。但这个交互作用的机制和三它们之间是如同进行协同的问题,还需要进行更深入的研究。另外,由于,威廉环毛蚓和赤子爱胜蚓分别属于上食下居型和表居型二种不同的生态类型,在表居型的赤子爱胜蚓生活和取食于地表的枯枝落叶层,主要以植物残落物为食,这有可能是导致土壤转化酶活性比接种威廉环毛蚓的土壤转化酶活性高的一个原因;威廉环毛蚓则是上食下居型蚯蚓,居住在土壤亚表层,取食富含有机质的土壤,过氧化氢酶活性与土壤有机质转化速度密切相关,这有可能是导致土壤过氧化氢酶活性比接种赤子爱胜蚓的土壤过氧化氢酶活性高的一个原因。

参考文献:

- [1] Brussaard L. On the mechanisms of interactions between earthworms and plants[J]. *Pedobiologia*, 1999, 43: 880-885.
- [2] Brown G C, Barios I, Lavelle P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2000, 36: 177-198.
- [3] 于建光, 胡锋, 李辉信, 等. 接种蚯蚓对土壤团聚体分布、稳定性及有机碳赋存的影响[J]. *水土保持学报*, 2010, 24(3): 175-179.
- [4] 贺淹才. 蚯蚓对改良土壤和改善农业生态环境的作用[J]. *黑龙江农业科学*, 2004(6): 2-44.
- [5] 张卫信, 陈迪马, 赵灿灿. 蚯蚓在生态系统中的作用[J]. *生物多样性*, 2007(2): 142-153.
- [6] 李辉信, 胡锋, 沈其荣, 等. 接种蚯蚓对秸秆还田土壤碳、氮动态和作物产量的影响[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(12): 1637-1641.
- [7] ZHANG B G, LI G T, SHEN T S, et al. Changes in microbial biomass C, N and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia fetida*[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 2055-2062.
- [8] 张立宏, 许光辉. 微生物与蚯蚓协同作用对土壤肥力影响的研究[J]. *生态学报*, 1990, 10(2): 116-120.
- [9] 戴伟, 白红英. 土壤过氧化氢酶活性及其动力学特征与土壤性质的关系[J]. *北京林业大学学报*, 1995, 17(1): 37-39.
- [10] Gianfreda L, Sannino F, Violante A. Pesticide effects on the activity of free, immobilized and soil invertase[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(9): 1201-1208.
- [11] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [12] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [13] 李西开, 蒋柏藩, 袁可能, 等. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [14] 戴伟, 白红英. 土壤过氧化氢酶活性及其动力学特征与土壤性质的关系[J]. *北京林业大学学报*, 1995, 17(1): 37-39.
- [15] Perucci P, Casucci C, Dumontet S. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(13): 1927-1933.
- [16] 黄福珍, 张与真, 杨夫瑞. 蚯蚓改土及综合利用[M]. 重庆: 重庆出版社, 1984: 28-36.
- [17] Brown G. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drill sphere and the role of interactions with other edaphic functional domains [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2000, 36: 177-198.

(上接第 55 页)

糖和硼酸是影响花粉萌发的重要因素, 蔗糖为花粉萌发和花粉管的生长提供营养和所需碳源, 又能维持外界环境一定的渗透压; 硼酸能增加花粉对糖的吸收、运转和代谢, 增加氧的吸收, 与糖结合可以提高花粉管的萌发率, 并促进果胶的合成^[11-12]。硼酸对于花粉的萌发也有一定的影响^[13], 在花粉管生长过程中, 培养基中的硼酸, 有利于更多的蛋白质转化为膜和壁的主要成分, 而膜和壁是花粉管生长的必需成分, 因而有利于花粉管的生长^[14]。

本试验结果表明, 在最优培养基中中国槐花粉萌发率为 43.3%, 当硼酸和蔗糖的浓度提高时萌发率下降明显, 较低浓度也不利于花粉管的萌发。国槐和聊红槐的花粉平均萌发率均高于五叶槐与龙爪槐; 国槐单个花药花粉含量显著高于聊红槐, 但是花粉平均萌发率仅略高于聊红槐, 龙爪槐和五叶槐的花粉数量高于聊红槐, 但是花粉平均萌发率显著低于聊红槐。可见, 花粉数量高花粉萌发率未必高, 花粉萌发受多种因素的影响, 种间甚至同一品种不同授粉时间, 其花粉萌发率也有所不同, 这还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 邱延昌, 张秀省, 黄勇, 等. 国槐新品种聊红槐[J]. *林业科学*, 2008, 44(5): 10.
- [2] 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.
- [3] 杨德奎, 郭燕, 王善娥, 等. 山东槐属植物的花粉亚显微形态研究[J]. *广西科学*, 2005, 12(2): 158-160.
- [4] 赵燕, 侯桂玲, 张秀省, 等. 国槐及其变种、变型花粉形态的比较研究[J]. *聊城大学学报*, 2007, 20(1): 53-54.
- [5] 袁德义, 谭晓风, 胡青素, 等. 油茶花粉特性及其不同贮藏条件下生活力的研究[J]. *浙江林业科技*, 2009, 28(5): 66-69.
- [6] 邹琦. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 148-150.
- [7] 王友保, 张莉. 花粉萌发与花粉管生长试验的改进[J]. *生物学通报*, 2006, 41(12): 57.
- [8] 红雨, 刘强, 韩岚. 芍药花粉活力和柱头可授性的研究[J]. *广西植物*, 2003, 23(1): 90-92.
- [9] Cook F S, Walden D B. The male gametophyte of *Zeamays* L. II invitro germination[J]. *Can J Bot*, 1965(43): 779-786.
- [10] Ervandyan S G. Proline as an indicator of pollen fertility in maize[J]. *Biologicheskii Zhurnal Armenii*, 1990, 43(2): 123-127.
- [11] Lazzaro M D. Microtubule organization in germinated pollen of the conifer *Picea abies* (Norway spruce, Pinaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 1999, 86(5): 759-766.
- [12] 余义和, 李桂荣, 王新娟, 等. 蔗糖和硼酸浓度对金光杏梅花粉离体萌发的影响[J]. *山西果树*, 2006, 112(4): 7-8.
- [13] Wang Q, I Lu, X Wu, et al. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri* [J]. *Tree Physiol*, 2003, 23(5): 345-351.
- [14] Rihova L, Hrabetova E, Tupy J. Optimization of conditions for invitro pollen germination and tube growth in potatoes [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 1996, 157(5): 561-566.