

金银忍冬花粉生活力测定方法的研究

王 仲,邵 红,孙 睿,张卫东,张丽敏

(佳木斯大学 生命科学学院,黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为了探索金银忍冬花粉萌发活力的快速检测方法,以金银忍冬花粉为试材,采用醋酸洋红染色法、TTC染色法和过氧化物酶染色法3种不同染色方法及离体萌发培养法对金银忍冬花粉生活力进行测定。结果表明:最适宜的离体萌发培养基为15%蔗糖+160 mg·L⁻¹硼酸;过氧化物酶染色法的测定值与离体萌发培养法的测定结果最相近,是测定金银忍冬花粉生活力的最适染色法。

关键词:金银忍冬;花粉;生活力;测定方法

中图分类号:Q945 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)12-0022-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.12.0022

金银忍冬(*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.)是忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera* L.)植物,又叫金银木,为落叶灌木,金银忍冬花果并美,具有较高的观赏价值,是东北地区园林绿化的重要树种之一。本研究采用液体离体萌发培养法,对金银忍冬花粉萌发情况进行探讨,旨在找出最适宜的培养基;同时综合运用醋酸洋红染色法、TTC染色法及过氧化物酶染色法对金银忍冬花粉生活力进行测定,以期筛选出快速准确的花粉生活力测定方法,为金银忍冬的育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试金银忍冬花粉采自佳木斯市华泰新城小区。

1.2 方法

1.2.1 花粉的采集 2015年5月下旬采集即将开放的花朵,室内阴干后收集花粉,用于金银忍冬花粉生活力测定研究。

1.2.2 花粉培养及花粉生活力测定 ①离体萌发测定法。参照张颖^[1]测定矮牵牛花粉生活力的方法,采用液体培养基发芽法:选择有凹槽的载玻片,把配制好的培养基(蔗糖浓度:5%、10%、15%、20%;硼酸浓度:20、40、80、160 mg·L⁻¹)滴在载玻片的凹槽内,用毛笔均匀撒播适量的花粉于液体培养基中,用细玻璃棒搅拌均匀,然后将载

玻片放在铺有湿脱脂棉的培养皿中,加盖,放入25℃的培养箱内,4 h后取出,在光学显微镜下观察花粉萌发情况并照相。每处理重复3次,每重复镜检5个视野(每个视野花粉数≥50),观察统计发芽率(花粉管长度超过1/2花粉直径者视为萌发)。

花粉萌发率/(%)=某视野萌发花粉数/该视野统计花粉总数×100。

②醋酸洋红染色法。毛笔蘸取少量金银忍冬的花粉,置于凹面载玻片上,滴适量1%醋酸洋红溶液,细玻璃棒搅拌均匀,盖上盖玻片,光学显微镜下观察花粉染色情况,统计被染色花粉百分率,3次重复,每重复5个视野,有活力的花粉被染成红色^[2]。

③TTC染色法。毛笔蘸取少量金银忍冬的花粉,置于凹面载玻片上,加入适量0.5% TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)溶液,细玻璃棒搅拌均匀,盖上盖玻片,放入铺有湿脱脂棉的培养皿中,加盖,置于35℃恒温箱中15 min,然后在光学显微镜下观察,统计方法同醋酸洋红染色法,有活力的花粉被染成红色^[2]。

④过氧化物酶染色法。在干洁凹面载玻片上放少量金银忍冬的花粉,然后加0.5%联苯胺+0.5%α-萘酚+0.25%碳酸钠配制成的试剂1小滴后,再加入1小滴0.3%过氧化氢,细玻璃棒搅拌均匀,盖上盖玻片,光学显微镜下观察,统计方法同醋酸洋红染色法,凡有生活力的花粉为红色或玫瑰红色^[3]。

2 结果与分析

2.1 金银忍冬花粉萌发最适培养基的筛选

2.1.1 蔗糖浓度对花粉萌发的影响 不同植物花粉在不同浓度蔗糖培养基上萌发程度不同,本

收稿日期:2015-09-21

基金项目:佳木斯大学科研资助项目(S2013-055)

第一作者简介:王仲(1979-),女,辽宁省大石桥市人,硕士,讲师,从事园林植物遗传育种教学及研究。E-mail: wangzhong_2004@163.com。

通讯作者:张丽敏(1971-),女,黑龙江省佳木斯市人,硕士,副教授,从事遗传学教学及研究。E-mail:564734839@qq.com。

研究中蔗糖对金银忍冬花粉萌发率的影响表现为随着处理浓度的增加,花粉萌发率出现先升后降的情况。由图 1 可以看出,蔗糖浓度为 5%~15%,随着蔗糖浓度的增加,花粉萌发率呈递增趋势。当蔗糖浓度为 15%时,花粉的萌发率最高,为 10.22%,与其它浓度相比差异显著;但当蔗糖浓度达 20%时,花粉萌发率迅速下降,花粉几乎不再萌发,同时出现花粉内含物外泄(见图 2)。

2.1.2 硼酸浓度对花粉萌发的影响 硼离子对花粉萌发及花粉管生长具有重要的作用。本研究以 15%蔗糖为基本培养基,加入 4 种不同浓度硼酸进行花粉萌发试验,结果见图 3,从中可以看出,当有硼酸加入后,无论哪种培养基条件金银忍冬花粉萌发率都较对照组有增加,且当硼酸浓度

为 160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,花粉萌发率最高,达到 50.62%。

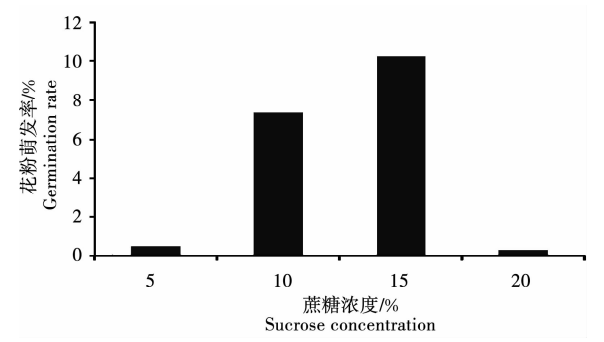


图 1 蔗糖对金银忍冬花粉萌发率的影响
Fig. 1 The effect of sucrose concentration on the pollen germination rate of *L. maackii*

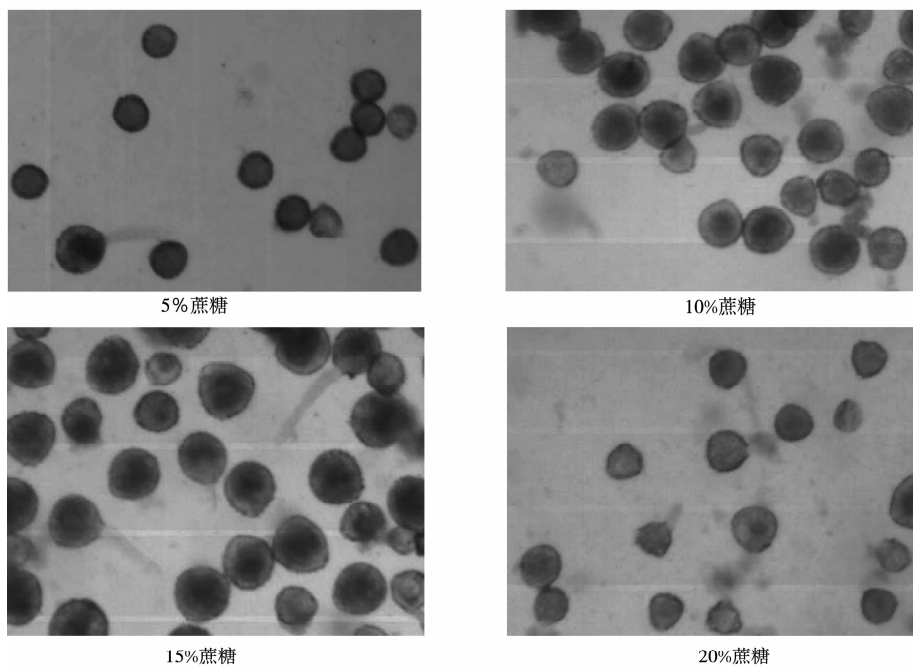


图 2 不同蔗糖浓度下金银忍冬花粉萌发情况

Fig. 2 Pollen germination of *L. maackii* under different sucrose concentration

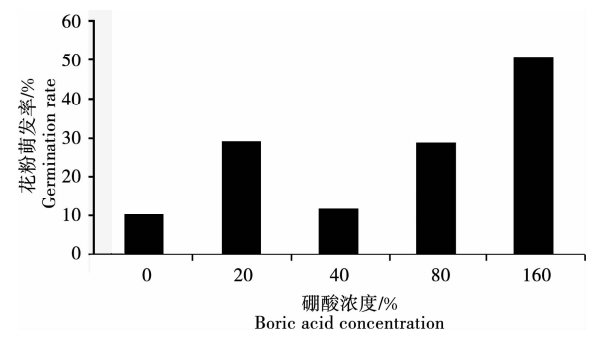


图 3 硼酸对金银忍冬花粉萌发率的影响

Fig. 3 The effect of boric on the pollen germination rate of *L. maackii*

综上所述,金银忍冬花粉萌发率最高的组合为 15%蔗糖+160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸培养基,此时花粉萌发率为 50.62%,花粉管生长良好,为供试试验设计中金银忍冬花粉萌发的最佳培养基。

2.2 不同染色方法对花粉生活力的影响

本试验采用 3 种不同染色方法对金银忍冬花粉生活力进行测定,由表 1 可以看出:采用 TTC 染色法无法使花粉着色,而醋酸洋红染色后花粉粒均被染成红色,因此这两种方法不能作为测定金银忍冬花粉生活力的染色方法。

过氧化物酶染色法中观察到有活力的花粉被

染成红色,而无生活力的花粉不能着色,得到有活力花粉的比率为 51.35%,这种染色法计算花粉生活力接近离体萌发法,因此可以作为快速测定金银忍冬花粉生活力的染色方法。

表 1 金银忍冬花粉生活力测定方法比较

Table 1 Comparison of determination methods of pollen viability of <i>L. maackii</i>				
测定方法 Determination methods	离体培养法 Isolated culture method	过氧化物酶染色法 Peroxidase staining	醋酸洋红法 Carmin acetate staining	TTC 法 TTC staining
具生活力花粉/% Pollen viability	50.62	51.35	100	0

3 结论与讨论

蔗糖是花粉萌发主要的碳素来源,能够为花粉提供必要的能源,此外,也是渗透压的调节剂,起着维持花粉与培养液之间渗透平衡的作用,蔗糖浓度适宜,可以避免花粉及花粉管的破裂,但若浓度过高,则会抑制花粉萌发。本试验研究结果也证实当蔗糖浓度在 5%~15%时,随着蔗糖浓度增加金银忍冬花粉的萌发率也随之增高,且利于花粉管的生长;但当蔗糖浓度为 20%时,花粉活力迅速下降,且出现内容物外泄情况。本试验结果与许珂等^[4]进行的金银忍冬花粉离体萌发的研究有所不同,其研究中蔗糖浓度达 30%时,花粉萌发率才下降,但本试验采用的是液体培养基萌发法,即只使用蔗糖和硼酸溶液,未加入琼脂作为支持物,本方法较加入琼脂的固体培养基萌发法简单、快捷,但是否是造成数据差异的主要原因,还有待进一步研究。

硼在植物体内含量低,且分布不均匀,但以花中含量最高,花中又以子房和柱头最多,有研究认为这可能由于硼可以与蔗糖结合形成络合物,易

于在组织中运输和参与果胶物质的合成,以利于花粉管的建造,促进花粉萌发^[5]。从本试验研究结果来看,在金银忍冬花粉离体培养法中,蔗糖浓度为 5%~20%的 4 个不同浓度梯度,均以硼酸为 0 为基础进行研究,花粉萌发率虽各有不同,但总体表现都较低,而加入硼酸后,花粉萌发率都有提高,尤其蔗糖浓度为 15%,硼酸浓度为 160 mg·L⁻¹时,萌发率最高,达 50.62%,说明硼酸对金银忍冬花粉萌发具有促进作用。

花粉离体萌发法是测定花粉生活力的较为普遍的一种测定方法,测定结果比较精确可靠^[6],但不同植物花粉萌发所需时间及适合的萌发条件也不相同,一般都需事先摸索,本试验采用的是 25℃培养 4 h,同时设置 4 个蔗糖浓度、4 个硼酸浓度筛选得出,因此,该方法操作起来有些繁琐,当需要在授粉前对田间花粉生活力进行快速测定时,该法的应用就会有很大的局限性。相对于离体萌发法,利用染色法来测定花粉生活力较为简单、快捷,一般几分钟内即可得到实验数据,但不同植物适宜的染色方法也不同,本试验中过氧化物酶染色法与离体培养基萌发法结果最接近,且操作程序简单,是测定金银忍冬花粉生活力最好的方法。

参考文献:

[1] 张颖,罗凤霞,年玉欣,等.矮牵牛花粉生命力测定方法的研究[J].种子,2005,24(8):26-28.
[2] 郭军洋,陈龙正,曹清河,等.黄瓜现采花粉生活力最佳染色方法的筛选[J].广东农业科学,2004(6):48-49.
[3] 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.
[4] 许珂,古松,江莎.金银忍冬花粉离体萌发初探[J].热带亚热带植物学报,2008,16(2):109-115.
[5] 崔晓龙,魏蓉城,黄瑞友.草果花粉生活力的研究[J].云南大学学报:自然科学版,1995,17(3):284-289.
[6] 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.

Study on Determination Method of Pollen Viability of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim

WANG Zhong, SHAO Hong, SUN Rui, ZHANG Wei-dong, ZHANG Li-min
(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: Pollen of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. was employed as the experimental material, determination method of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. 's pollen viability was studied. Comparisons were made for the effect of sucrose and boron in culture solution on the germination of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. 's pollen. And carmine acetate staining, TTC staining and peroxidase staining were compared in order to seek for a fast determination method of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. 's pollen viability. The results indicated that the optimum culture solution was 15% sucrose+160 mg·L⁻¹ H₃BO₃; and the result of peroxidase staining was similar to that of germination, it was the most optimal staining method for testing pollen viability of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.

Keywords: *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. ; pollen; viability; testing method