

翠竹花粉的活力及储藏效果研究

范婷婷^{1,2}, 郭臻昊^{1,2}, 傅华君^{1,2}, 张莉^{1,2}, 林树燕^{1,2*}, 丁雨龙^{1,2*}

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学竹类研究所, 江苏 南京 210037)

摘要: [目的]以南京林业大学竹种园内开花的翠竹花粉为试验材料,研究在不同条件下花粉的活力和储藏效果,为翠竹杂交育种的生产实践提供基础理论数据。[方法]利用花粉离体培养法研究花粉在不同培养基组分、不同采样时间、不同温度及储藏条件下的萌发特性。[结果]翠竹花粉在不同浓度配比的培养基中萌发率差异显著,以10%蔗糖+0.01% H₃BO₃+0.06% CaCl₂·2H₂O培养基上培养2.5 h花粉萌发率最高;一天之中以上午9:00的花粉萌发率最高;翠竹花粉离体萌发适合的温度范围较宽,在26~30℃内花粉都有较高的萌发率。随着储藏时间的延长,翠竹花粉萌发率逐渐下降;不同储藏方式对花粉的萌发率有较大的影响,在储藏过程中未经干燥处理的花药的花粉萌发效果好于干燥后的,4℃低温保存下花粉萌发率相对较好,可延长花粉的储藏寿命,96.0 h后仍保有活力。[结论]翠竹花粉在10%蔗糖、0.01% H₃BO₃、0.06% CaCl₂·2H₂O的培养基中萌发效果最好,萌发适宜的温度范围是26~30℃,在储藏过程中低温不干燥的环境有利于延长花粉寿命。

关键词: 翠竹;花粉萌发;温度;储藏方式

中图分类号:S722

文献标识码:A

文章编号:1001-1498(2018)03-0180-06

Germination and Storage Characteristics of *Pleioblastus pygmaeus* Pollen

FAN Ting-ting^{1,2}, GUO Zhen-hao^{1,2}, FU Hua-jun^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, LIN Shu-yan^{1,2}, DING Yu-long^{1,2}

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Research Institute of Bamboo, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] The flowering *Pleioblastus pygmaeus* in the bamboo garden of Nanjing Forestry University was used as study object to study the viability and storage of the bamboo pollen under different conditions, and provide data for the production practice of hybrid breeding. [Method] The effects of culture medium composition, sampling time, culture time and preservation conditions on pollen germination of *P. pygmaeus* were investigated with liquid culture. [Result] The pollen germinating percentage varied with different culture media and reached the highest at the medium with 10% source + 0.01% H₃BO₃ + 0.06% CaCl₂·2H₂O for 2.5 h; the suitable temperature range for pollen germination was at 26~30℃. The pollen germinated at a decreasing rate as their storage prolonged. While preserving the pollen, the pollen germination of the fresh anthers was better than that after drying, and that the longevity of pollen could be extended appropriately at 4℃, in which the vitality of pollen maintained for 96.0 h. [Conclusion] The pollen of *P. pygmaeus* is suitable to cultivate in the culture medium with 10% source + 0.01% H₃BO₃ + 0.06% CaCl₂·2H₂O. The suitable cultivation temperature is 26~30℃, and the suitable conservation condition is low temperature and non-drying environments which help prolong the life of pollen.

Keywords: *Pleioblastus pygmaeus*; pollen germination; temperature; storage method

收稿日期: 2017-06-02

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD04B0305); “十三五”国家重点研发计划课题(2016YFD0600901); 江苏省三新工程项目(LYSX[2016]04); 江苏省科技支撑计划(农业)重点项目(BE2016304)

作者简介: 范婷婷(1993—),女,江苏扬州人,硕士研究生。主要研究方向:竹类植物发育解剖学。

* 通讯作者: 林树燕(1976—),女,山东潍坊人,副教授,博士。主要研究方向:竹子生殖生物学。E-mail: lrx@njfu.com.cn
丁雨龙(1958—),男,江苏常州人,教授,博士生导师。主要研究方向:发育生物学和竹林培育。E-mail: ylding@njfu.edu.cn

花粉是植物进行育种繁殖所必需的材料,也是一个重要的种质保存类型。花粉的离体萌发对于雄配子体的生物学研究,以及植物杂交育种都具有重要意义,因此,需要探究其活力变化规律及适合长期保存的条件,方便应用和保存。竹类植物由于开花周期长,常常是几十年或是百年以上,因此,其开花十分罕见^[1],并且竹株开花时间不固定、花后即死亡等特点,使得人们对于竹子开花结实、花粉萌发及储藏等方面的认识十分有限。目前,已对毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.)^[2]、月月竹(*Chimonobambusa sichuanensis* T. P. Yi)^[3]、麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro)^[4]、孝顺竹(*Bambusa multiplex* (Lour.) Raeusch. ex Schult.)、异叶苦竹(*Pleioblastus simonii* f. *albostrigatus*)、鹅毛竹(*Shibataea chinensis* Nakai)^[5]等竹种的花粉萌发进行了报道,而未见有关翠竹(*Pleioblastus pygmaeus* (Miq.) E. -G. Camus)花粉萌发特性的研究。

翠竹属于竹亚科(Bambusoideae)、苦竹属(*Pleioblastus* Nakai)植物^[6]。近年来,关于翠竹研究的报道主要集中于快繁技术^[7]、幼苗的诱变育种以及园林应用^[8-9]等方面。最近两年南京林业大学竹种园中的翠竹连续开花,为丰富竹类植物花粉的生物学特性研究提供了珍贵的试验材料。本研究通过离体培养法,在不同培养条件以及不同储藏条件下进行了翠竹花粉萌发试验,旨在探索竹类植物花粉寿命、花粉萌发及储藏的适宜条件,为翠竹杂交育种等研究提供基础数据,对竹类植物种质资源创新生产实践具有重要的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

开花翠竹栽植于南京林业大学竹种园,属于成片开花类型。当翠竹处于盛花期时,采集开花竹株上成熟且未散粉的花药进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉萌发观测方法 花粉萌发采用液体培养法。采集的花药用湿报纸包裹带回实验室,随采随用。在小离心管中加入适量的液体培养基,用镊子夹破花药,将花粉混匀后,用毛笔蘸取少量花粉轻轻洒于离心管中,每处理设置3个重复,26℃培养箱中黑暗培养。定时取2~3滴培养液滴于载玻片,加盖上盖玻片后显微镜下观察花粉萌发情况,以花

粉管生长长度超过花粉粒直径作为已萌发的标准,每处理统计3个视野,每个视野花粉不少于50粒,重复3次。

萌发率 = 萌发的花粉 / 总的花粉数 × 100%。

1.2.2 花粉萌发最适观测时间的确定 2017年3月28日(6~22℃)采集翠竹花粉在简单培养基上培养,隔0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h分别观察统计其萌发率,以确定翠竹花粉萌发的最适观测时间。

1.2.3 不同培养基组合中花粉萌发率的观测 2017年3月29日(9~17℃)通过正交试验法将不同浓度的蔗糖、硼酸和CaCl₂·2H₂O设置成16种培养基(表1),pH值5.8,以明确适宜翠竹花粉萌发的不同浓度培养基组分的最佳组合。

表1 翠竹花粉离体萌发的液体培养基组分

Table 1 Components of liquid culture medium for

pollen germination

%

培养基编号 Medium code	培养基组分 Components of the culture medium		
	蔗糖	H ₃ BO ₃	CaCl ₂ ·2H ₂ O
1	5	0.01	0.01
2	5	0.05	0.03
3	5	0.10	0.06
4	5	0.20	0.09
5	10	0.20	0.03
6	10	0.10	0.01
7	10	0.05	0.09
8	10	0.01	0.06
9	15	0.05	0.06
10	15	0.01	0.09
11	15	0.20	0.03
12	15	0.10	0.01
13	20	0.10	0.09
14	20	0.20	0.06
15	20	0.05	0.03
16	20	0.01	0.01

1.2.4 不同温度处理下花粉萌发率的观测 考虑到翠竹花期外界环境的温度,于2017年3月30日(8~13℃)分别设计18、20、22、24、26、28、30℃7个培养温度,将翠竹花粉置于最佳培养基组合上进行培养,筛选花粉萌发适宜的温度范围。

1.2.5 花粉萌发率日变化的观测 2017年3月31日(5~15℃)测定一天之内不同时间翠竹花粉的萌发率。从6:00至18:00每隔1.0 h采一次花药,于最佳培养基组合中培养,统计花粉萌发率,明确翠竹花粉萌发的日变化。

1.2.6 室温下花粉寿命的观测 2017年4月1日(8~18℃)采集新鲜花药带回实验室后,用镊子夹破花药使花粉散出,自然状态下室温放置,每隔一段时间(5、10、15、20、25、30、45、60 min)取部分花粉置于最佳萌发培养基上于26℃培养箱中培养,测定其花粉萌发率。

1.2.7 不同储藏条件下花粉萌发率的观测 2017年4月2日(9~22℃)采集新鲜花药带回实验室后,设置4种处理方法:(1)4℃低温不干燥;(2)4℃低温+干燥;(3)室温不干燥;(4)室温+干燥。室温处理即将采集回来的花药直接放置于室内,低温处理即将花药放置在4℃恒温冰箱中保存。干燥处理即将花药储藏于盛有硅胶的干燥皿中,不干燥处理即将采集的新鲜花药直接保存。每隔一段时间取出待测花药用镊子夹破,对散出的花粉进行萌发率测定,直至视野中难找到萌发的花粉时停止观察。

1.3 数据处理

采用 Origin 85 作图软件和 SPSS 17.0 统计软件进行试验数据分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间对花粉萌发率的影响

翠竹花粉在简单培养基(10%蔗糖+0.03%CaCl₂·2H₂O)上培养的时间不同,花粉的萌发率也不相同。图1表明:随着培养时间的延长,翠竹花粉的萌发率逐渐升高,到达2.5 h后花粉萌发率达到最高,而后花粉萌发率趋于平稳,说明2.5 h是观察统计翠竹花粉萌发率的最佳时间。本试验结果为翠竹花粉萌发的观测时间提供了参考依据。

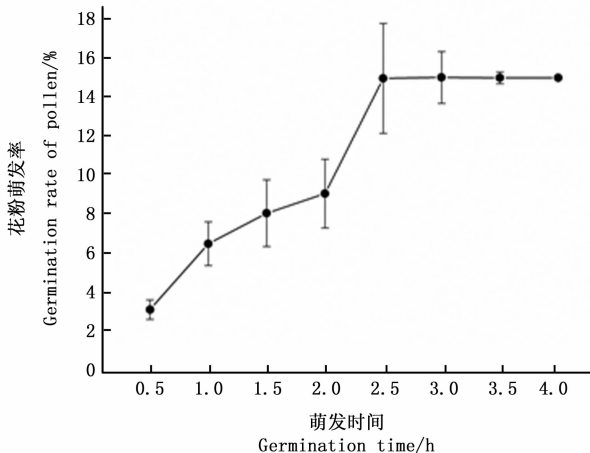
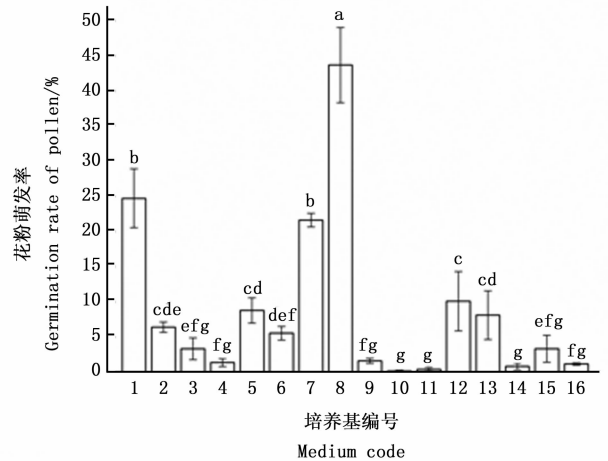


图1 萌发时间对花粉生活力的影响

Fig. 1 The germination rate of pollen under different germination time

2.2 不同培养基成分、浓度对花粉萌发率的影响

不同培养基培养条件下翠竹花粉萌发率不同(图2),其中,翠竹花粉在8号(10%蔗糖+0.01% H₃BO₃+0.06% CaCl₂·2H₂O)培养基上萌发率最高,达到43.69%±5.36%,极显著高于其它种类培养基;在1号和7号培养基上萌发相对较好,萌发率在20%~25%之间;在2、5、6、12、13号培养基上萌发相对较差,萌发率在5%~10%;在3、4、9、10、11、14、15、16号培养基上花粉萌发很差,萌发率小于5%,其中,10、11、14号培养基上花粉萌发率不足1%。上述结果表明,蔗糖对翠竹花粉萌发的影响较显著,浓度过高或过低都不利于花粉萌发。当蔗糖浓度为10%时,花粉内外渗透压保持平衡,萌发率达最高;当蔗糖浓度超过10%时,花粉萌发率快速下降,在15%浓度下,萌发率最高仅为10.09%±4.22%,主要原因可能是随着蔗糖浓度升高,使得培养基水势降低,导致细胞脱水死亡。低浓度的硼酸可小幅度提高翠竹花粉的萌发率,但随着硼酸浓度升高,花粉的萌发率反而呈下降趋势;钙离子最适宜萌发的浓度为0.06%,浓度太低和过高都不利于花粉的萌发。



注: Duncan 多重比较,不同的小写字母表示在0.05水平下差异显著
Notes: Different letters indicate statistically significant different means at 0.05 level according to Duncan analysis.

图2 不同培养基上的花粉萌发率

Fig. 2 Pollen germination rates on different culture media

2.3 不同温度对翠竹花粉萌发的影响

温度对翠竹花粉的萌发率影响显著(图3)。随着培养温度的升高,翠竹花粉萌发率总体呈上升趋势。在18~24℃温度范围内,翠竹花粉萌发率上升较慢,花粉萌发率在25%左右;在24~26℃培养条件下,花粉萌发率上升较快,26℃时萌发率达

45.48% ± 2.79%; 30℃ 培养条件下花粉萌发率达到最高 50.42% ± 1.48%。通过显著性分析,在 26 ~ 30℃ 温度范围内翠竹花粉萌发率差异性不显著,都有较高的萌发率,说明翠竹花粉萌发较适合的温度范围较宽。

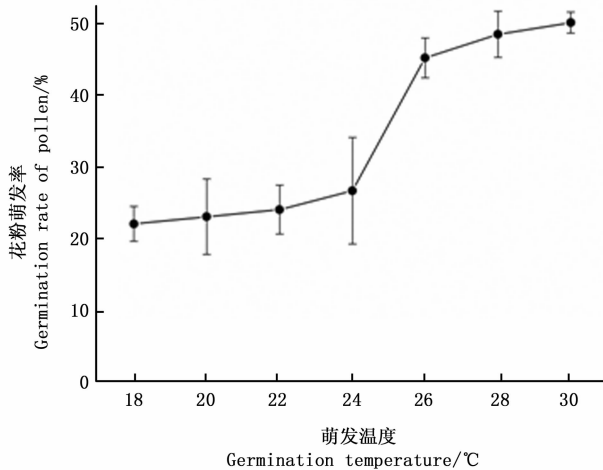


图3 温度对翠竹花粉萌发的影响

Fig. 3 Effect of temperature on pollen germination of *P. pygmaeus*

2.4 花粉萌发率的日变化规律

在不同的时间点采集新鲜的翠竹花粉于 26℃ 培养箱中培养,结果显示(图4):一天之中不同时间点花粉萌发率差异较大。上午 7:00—9:00 时花粉萌发率较高,其中 9:00 时萌发率达最高,为 44.60% ± 6.69%; 下午 13:00 时花粉萌发率次高,为 37.70% ± 11.03%; 随着时间的推移,花粉萌发率逐渐下降,到下午 18:00 时花粉萌发率最低,仅为 7.87% ± 2.09%。对于大多数植物而言,它们的最

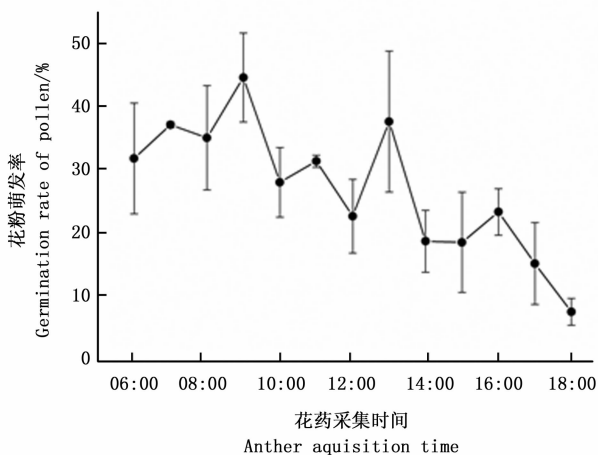


图4 翠竹花粉萌发的日变化

Fig. 4 The diurnal variation of pollen germination of *P. pygmaeus*

大散粉量通常发生在中午,采粉时间最好集中在上午^[10]。翠竹最大的开花量发生在上午,因此,在野外授粉活动时采集花粉最好选择在 9:00 时左右,以确保授粉效果。

2.5 在室温条件下离体花粉的寿命

由图5可以看出:翠竹花药刚采集时起始花粉萌发率为 43.69% ± 5.36%,而散出的花粉(无花粉囊)在室温条件下放置一段时间后花粉萌发率下降迅速,5 min 后花粉萌发率仅为 11.47% ± 3.88%,30 min 后萌发率只有 1.01% ± 0.77%,放置 1.0 h 后花粉已经接近完全失活,萌发率接近于零。禾本科(Poaceae)植物花粉为三核型结构,代谢偏于活泼,竹类花粉壁薄,易失水,更易于丧失生活力^[11],野外自然散粉后正常受精的机会大大减少。因此,在野外进行授粉工作时花粉最好随采随用,避免时间过长导致花粉失活。

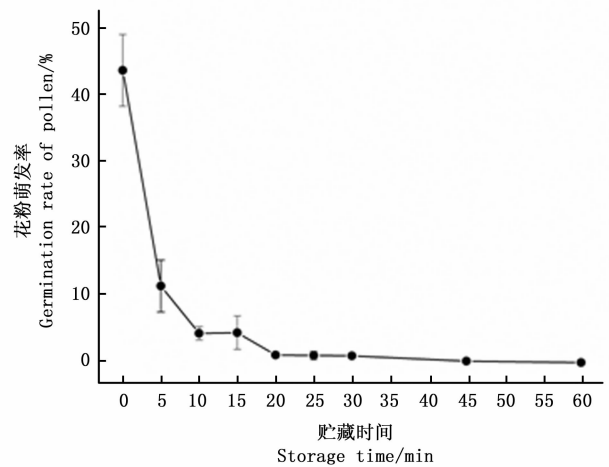


图5 室温条件对花粉萌发率的影响

Fig. 5 Effect of storage time at room temperature on pollen germination

2.6 不同储藏条件对翠竹花粉萌发的影响

随着储藏时间的延长,翠竹花粉萌发率呈下降趋势,不同的储藏方式对花粉萌发率也有显著的影响(图6)。翠竹新鲜花药贮藏过程中,未经干燥和经干燥处理后的花药在 4℃ 低温环境中,储藏 20.0 h 花粉活力分别为 28.52% ± 5.03%、14.63% ± 5.35%,储藏 4 d 后花粉活力还未完全丧失,花粉活力在 20.0 h 内迅速下降,萌发率降至 0.8%,储藏 30.0 h 后很难在视野中找到萌发的翠竹花粉。

干燥处理对花粉活力的影响显著,不利于翠竹花粉萌发,无论是 4℃ 低温处理还是室温条件下储藏,干燥处理后的花药比未经干燥处理花药的花粉

萌发率要低。在4℃低温的储藏条件下,前6.0 h,经干燥处理的花粉活力与未经干燥处理的相比,花粉活力下降幅度差异不明显,随着储藏时间的延长,经干燥处理后的花药其花粉萌发率迅速下降,30.0 h后,萌发率趋于零;室温条件下,花粉活力在短时间内即出现大幅度下降,其寿命仅有20.0 h左右。低温处理在一定程度上延长了翠竹花粉的储藏时间,但随着储藏时间的延长,花粉萌发率呈下降趋势,难以满足远距离携带,因此,尽量在花药散粉当天完成授粉为宜。

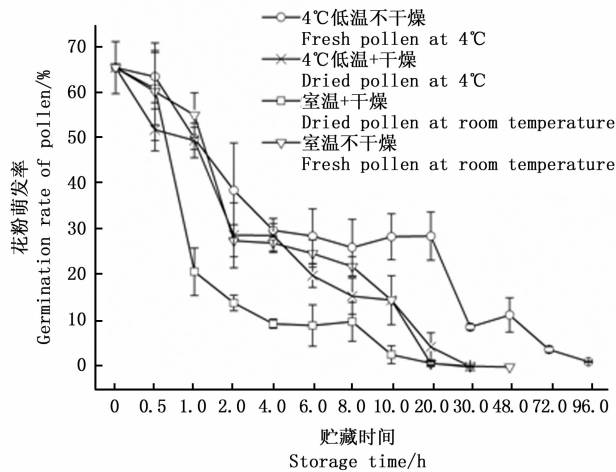


图6 不同储藏条件下花粉萌发率随时间的变化

Fig. 6 The germination rate of pollen under different treatments changing with time

3 讨论

花粉离体萌发一般是在培养基上进行的,而蔗糖作为培养基中的重要能源物质和渗透调节物质在花粉萌发和生长中具有重要作用^[12]。大多数研究^[13-14]表明,蔗糖是竹类植物花粉离体培养所必需的重要营养成分,硼酸和钙在蔗糖的主导作用下起辅助作用。本试验中,翠竹在10%浓度的蔗糖培养基中萌发效果最好,加入微量的硼和钙明显提高了花粉的萌发效果,与张文燕等^[15]研究结果一致,但随着钙离子和硼浓度不断升高,花粉萌发率反而呈下降趋势,林树燕等^[3]、刘倩倩等^[16]都发现硼酸过高会抑制竹类植物花粉的萌发率。因此在竹类植物开花期间,可以喷施添加了调节物质的悬浮液促进花粉萌发以提高授粉效果。不同竹种花粉萌发需要的时间不一致,毛竹花粉培养1.0 h后萌发率即达到最高值^[10],月月竹则需要3.0 h花粉萌发率最高^[3],翠竹花粉萌发率则在培养2.5 h后达到最

高值。

本试验中,翠竹离体花粉在室温下活力迅速下降,散粉5 min后花粉萌发率仅有10%左右,1.0 h后花粉已失活,可见竹类植物散粉后花粉活力维持时间较短。在野外自然条件下,由于阳光、水分等因素的影响,萌发率将更低。外界环境(不同采样时间以及外界温度等)对翠竹花粉活力的影响显著,翠竹花粉属于典型的风媒花,体积小、质量轻且数量多,因此,建议在野外授粉工作时最好选取在开花量大、花粉萌发率较高的上午进行,通过增加花粉点授粉量来提交杂交结实率。王胜华等^[17]认为,水稻(*Oryza sativa* L.)花粉离体萌发在27~33℃都有较高的萌发频率,朱展望等^[18]研究小麦(*Triticum aestivum* L.)花粉发现,离体条件下小麦花粉萌发的最适温度为28℃左右。本试验中,翠竹花粉离体萌发的适宜温度范围是26~30℃,而翠竹的花期在3月下旬至4月初,外界温度达不到适宜的萌发温度,特别是低温可能抑制花粉萌发,从而影响花粉的授粉受精。竹子花粉的这些特征必然产生花而不实或花而少实的结果。

在花粉储藏过程中,低温降低了花粉呼吸作用、水分代谢等,延长了花粉活力^[19]。通过制造适宜的条件(4℃低温保存),已经把翠竹花粉最长的保存时间延长到96.0 h;张光楚曾报道毛竹的花粉在4℃冰箱中保存,5 d后尚可授粉利用^[20]。异叶苦竹花粉在-5℃条件下可贮藏120.0 h,在-10℃温度下也可贮藏76.0 h^[21];水稻花粉也曾成功用超低温保存,其结实率与对照新鲜花粉无明显差异^[22]。所以,对于翠竹的花粉是否适于超低温保存需要进一步的试验研究。经过干燥处理的花粉无论是在室温条件还是4℃低温环境中,萌发率下降迅速,与月月竹^[3]、麻竹^[4]花粉储藏试验中的结论一致,可见竹子花粉储藏中不耐干燥。

4 结论

翠竹花粉萌发率同其它竹类植物类似,具有萌发率较低且不耐贮藏的特点。本文对翠竹盛花期花粉的萌发特性及贮藏期进行了详细观测,得到以下结论:离体翠竹花粉培养过程中,蔗糖浓度对其萌发影响较为显著。当蔗糖浓度为10%时,花粉内外渗透压保持平衡,萌发率达最高;低浓度的硼酸可小幅度提高翠竹花粉的萌发率;钙离子最适宜萌发的浓度为0.06%。10%蔗糖+0.01% H₃BO₃+0.06%

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的培养基适宜翠竹花粉萌发。翠竹花粉萌发所需的温度范围较宽,在 $26 \sim 30^\circ\text{C}$ 温度范围内都有较高的萌发率。翠竹离体花粉在室温下活力迅速下降,散粉 5 min 后花粉萌发率仅有 10% 左右,1.0 h 后花粉已失活。因此,竹类植物杂交育种过程中务必选择新鲜花粉。翠竹花粉贮藏期短, 4°C 低温保存效果相对较好。本研究对于探讨竹子开花结实率低的原因以及进行杂交育种等研究提供了理论基础支撑。

参考文献:

[1] 周芳纯. 竹林培育学[M]. 北京:中国林业出版社,1998:118-130.

[2] 王青,彭祚登,郭起荣,等. 毛竹花粉活力测定及其适宜保存条件研究[J]. 竹子研究汇刊,2012,31(1):23-26.

[3] 林树燕,骆仁祥,丁雨龙,等. 月月竹的花粉萌发力及贮藏力研究[J]. 林业科技开发,2008,22(5):22-25.

[4] 钟远标,岳晋军,楼崇,等. 麻竹的花器官与繁育系统[J]. 林业科学,2017,53(1):1-10.

[5] 林树燕,赵荣,李洁,等. 3个竹种的花粉特性观察及花粉培养和贮藏条件筛选[J]. 植物资源与环境学报,2015,24(4):111-113.

[6] 林树燕,范婷婷,姜明云,等. 3种地被竹花器官形态特征及学名订正[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2017,41(1):189-193.

[7] 张春霞,骆仁祥,丁兴萃,等. 翠竹的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2010,46(5):477-478.

[8] 翟敬宇. 电子束辐照翠竹幼苗的诱变效应及 RAPD 分析[J]. 竹子研究汇刊,2013,32(3):22-27.

[9] 赵婧好,贺诗雨,戴刘凤,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照翠竹的生物学效

应及 RAPD 分析[J]. 世界科技研究与发展,2016,38(6):1280-1286.

[10] 刘宝,曾杰,程伟,等. 木本植物花粉采集、贮藏与活力检测的研究进展[J]. 广西林业科学,2008,37(2):76-79.

[11] Kartha K K. Cryopreservation of plant cells and organs [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985: 159-170.

[12] Che D, Fan J, Wang J. Study on optimization of the culture medium for oriental hybrids pollen germination[J]. Bulletin of Botanical Research. 2003, 23(2): 178-181.

[13] 张文燕,马乃训,陈红星. 竹类花粉形态及萌发试验[J]. 林业科学研究,1989,2(1):67-70.

[14] 林树燕,丁雨龙,张昊. 5种竹子花粉萌发率及开花特性[J]. 林业科学,2008,44(10):159-163.

[15] 张文燕,马乃训. 竹类植物花粉的生活力和自然授粉[J]. 林业科学研究,1990,3(3):250-255.

[16] 刘倩倩,徐一帆,林新春,等. 雷竹花粉萌发率及贮藏方法研究[J]. 福建林学院学报,2012,32(2):146-150.

[17] 王胜华,陈放,周开达. 水稻花粉的离体萌发[J]. 作物学报,2000,26(5):609-612.

[18] 朱展望,张改生,牛娜. 小麦花粉的离体萌发研究[J]. 麦类作物学报,2007,27(1):12-15.

[19] 陈和明,尹光天,胡哲森,等. 黄藤花粉萌发与低温贮藏研究[J]. 西北植物学报,2006,26(7):1395-1400.

[20] 张光楚,陈富枢. 竹类杂交育种的研究[J]. 广东林业科技,1986,(3):1-5.

[21] 林树燕. 鹅毛竹和异叶苦竹的生殖生物学研究[D]. 南京:南京林业大学,2009.

[22] 胡晋,郭长根. 超低温(-196°C)保存杂交水稻恢复系花粉的研究[J]. 作物学报,1996,22(1):72-77.

(责任编辑:金立新)