

# 曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力检测条件优化和适宜储藏温度分析

王呈伟<sup>1</sup>, 郑玉红<sup>1</sup>, 李莹<sup>1</sup>, 陆波<sup>1</sup>, 彭峰<sup>1,①</sup>, 陈晓萱<sup>2</sup>

[1. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 江苏大千生态景观股份有限公司, 江苏 南京 210024]

**摘要:** 采用单因素实验设计对适宜于曼地亚红豆杉‘Hicksii’(*Taxus media* ‘Hicksii’)花粉活力检测的 TTC 染色法和离体培养法的实验条件进行了选择,并采用优化条件研究了在 25 ℃ ~ -196 ℃ 条件下储藏 13 周花粉活力的变化。结果表明:采用 TTC 染色法测定的花粉活力均高于离体培养法。在 TTC 染色法的 3 个影响因素(染液 pH、TTC 浓度和染色温度)中,染液 pH 对检测结果有极显著影响,而染色温度和 TTC 浓度则无显著影响,但温度对染色速率有影响。在离体培养法的 3 个影响因素(培养基中蔗糖添加量、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 浓度及培养温度)中,蔗糖添加量对检测结果有极显著影响,在含质量体积分数 15% 蔗糖的培养基上花粉活力最高,而在含质量体积分数 20% 和 25% 蔗糖的培养基上花粉均不能萌发;在含 100 和 200 mg · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的培养基中添加 200 mg · L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 均能显著提高花粉活力;培养温度对花粉萌发速率有影响但对花粉活力没有明显影响。TTC 染色法的最优检测条件为:用 5.0 g · L<sup>-1</sup> TTC 染液(pH 7.0)在 35 ℃ 下染色 2.0 h;离体培养法的最优检测条件为:用含质量体积分数 15% 蔗糖、100 mg · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 200 mg · L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的培养基暗培养 4 d。在 25 ℃、4 ℃、0 ℃、-20 ℃、-80 ℃ 和 -196 ℃ 条件下储藏 13 周,‘Hicksii’花粉活力和保持时间有明显差异,其中,于 -80 ℃ 和 -196 ℃ 储藏 3 d 花粉就丧失活力;于 25 ℃ 和 -20 ℃ 储藏 7 周、4 ℃ 储藏 10 周,花粉仍有一定的活力;而在 0 ℃ 条件下花粉活力最高,且储藏 11 周花粉仍有活力。推测曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉对低温的抗性较差,0 ℃ 为其适宜的储藏温度。

**关键词:** 曼地亚红豆杉‘Hicksii’; 花粉活力; TTC 染色法; 离体萌发法; 储藏温度

中图分类号: Q944.42; S791.49.04 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)02-0013-06

**Detection condition optimization of pollen viability of *Taxus media* ‘Hicksii’ and analysis on its suitable storage temperature** WANG Cheng-wei<sup>1</sup>, ZHENG Yu-hong<sup>1</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, LU Bo<sup>1</sup>, PENG Feng<sup>1,①</sup>, CHEN Xiao-xuan<sup>2</sup> (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Daqian Ecology and Landscape Co., Ltd., Nanjing 210024, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, **21**(2): 13-18

**Abstract:** By single-factor experiment design, experimental conditions of TTC staining and *in vitro* culture methods suitable for pollen viability detection of *Taxus media* ‘Hicksii’ were selected, and changes of ‘Hicksii’ pollen viability stored at conditions from 25 ℃ to -196 ℃ for thirteen weeks were detected by optimal conditions. The results show that the detection result of pollen viability by TTC staining method is higher than that by *in vitro* culture method. Among three influence factors (staining solution pH, TTC concentration and staining temperature) of TTC staining method, staining solution pH has an extremely significant influence on detection result, while staining temperature and TTC concentration have no significant influence but the former has an effect on staining speed. Among three influence factors (sucrose addition, concentrations of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in medium and culture temperature) of *in vitro* culture method, sucrose addition has an extremely significant influence on detection result. The pollen viability is the highest in medium containing 15% (mass-volume ratio) sucrose, while all of pollens can not germinate in media containing 20% or 25% (mass-volume ratio)

收稿日期: 2011-11-19

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2010417); 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-YW-Z-0921)

作者简介: 王呈伟(1986—),男,山东德州人,硕士研究生,主要研究方向为观赏植物生物技术及观赏植物遗传育种等。

①通信作者 E-mail: pfeng@vip.sina.com

sucrose. Addition of  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  in media containing  $100$  or  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$  can obviously improve pollen viability, and culture temperature has an effect on pollen germination speed but no obvious effect on pollen viability. The optimal detection condition of TTC staining method is taking  $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TTC solution (pH 7.0), dyeing at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2.0 h. The optimal detection condition of *in vitro* culture method is using culture medium containing 15% (mass-volume ratio) sucrose,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$  and  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , taking dark culture for 4 d. Stored at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  for thirteen weeks, pollen viability of 'Hicksii' and its retain time have significant differences. In which, pollens lost viability stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  or  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  for 3 d, pollens still have a certain viability stored at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  or  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for seven weeks and at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for ten weeks, while pollen viability is the highest stored at  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  and pollen still has a certain viability after stored at  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  for eleven weeks. It is conjectured that the resistance of pollen of *T. media* 'Hicksii' to low temperature is weak, and its suitable storage temperature is  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Key words:** *Taxus media* 'Hicksii'; pollen viability; TTC staining method; *in vitro* culture method; storage temperature

红豆杉是红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus* L.)植物的统称,具有四季常绿、假种皮颜色鲜艳、枝型优雅、适应性强等特点,在多种气候和土壤条件下生长良好,是理想的观赏植物。1971年,Wani等从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.)中分离得到抗癌活性成分紫杉醇(taxol)<sup>[1]</sup>,该成分是继阿霉素、顺铂之后对癌症治疗疗效最好、副作用最小的药物,因此,红豆杉还具有很高的药用价值。曼地亚红豆杉(*T. media* Rehd.)原产美国和加拿大,具有生物量大、生长迅速及耐低温等特点,在中国大部分地区均可栽种。'Hicksii'是曼地亚红豆杉的1个栽培品种,目前,本项目组已针对不同栽培条件对其枝叶中紫杉醇含量的影响进行了相关研究<sup>[2-3]</sup>。

花粉生活力主要受植物自身遗传特性和外界因素的影响,其中温度的影响尤为重要<sup>[4]</sup>。花粉储藏不但可用于保存种质,同时还可以解决杂交过程中父本与母本花期不遇或者异地杂交的问题。程广有等<sup>[5]</sup>采用TTC染色法研究了 $35 \text{ }^\circ\text{C} \sim -10 \text{ }^\circ\text{C}$ 储藏条件下东北红豆杉(*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.)的花粉寿命,结果显示低温可以延长东北红豆杉的花粉寿命,但对 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 甚至超低温条件对花粉寿命的影响未加以研究。

作者首先对适宜于曼地亚红豆杉'Hicksii'花粉活力检测的TTC染色法和离体培养法的实验条件进行了优化,并采用优化条件对在室温( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ )、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下储藏13周的曼地亚红豆杉'Hicksii'的花粉活力进行比较,以期筛选出适宜于曼地亚红豆杉'Hicksii'花粉的储藏温度,为其育种和繁殖提供基础实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

曼地亚红豆杉'Hicksii'于2002年由美国俄勒冈州引种至南京并栽植于江苏省·中国科学院植物研究所实验苗圃,于2010年3月7日采集花粉。选择花药开裂且新鲜呈白色的雄花,将花粉抖落并收集到EP管中,室温下自然干燥24h;采用烘干法检测花粉含水量,含水量达到约35%时储藏备用。

### 1.2 方法

1.2.1 花粉活力检测条件的优化 参照文献[6-7]设置TTC染色的方法和基本条件( $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TTC, pH 7.0;染色温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ),并对染液pH、TTC浓度和染色温度进行单因素实验筛选。其中,染液pH设3个水平:pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0;TTC浓度设3个水平:2.5、5.0和 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;染色温度设3个水平: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。将适量TTC溶液滴于载玻片上,用棉棒蘸取花粉并抖落于液滴中,于不同温度下进行暗培养。用Nikon ECLIPSE 80I显微镜观察并拍照,每隔0.5h观察1次;每处理3个玻片,每个玻片随机观察5~10个视野。对有活力和无活力的花粉数进行统计,以花粉总数超过200为宜,结果取平均值。

参照文献[8-9]设置花粉离体培养的方法和基本条件(培养基含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和质量体积分数15%蔗糖,培养温度 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ),并对培养基中蔗糖的质量体积分数、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 质量浓度以及培养温度进行单因素实

验筛选。其中,蔗糖质量体积分数设4个水平:10%、15%、20%和25%; $H_3BO_3$ 和 $Ca(NO_3)_2$ 质量浓度设4个组合: $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} H_3BO_3-0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} Ca(NO_3)_2$ 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} H_3BO_3-0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} Ca(NO_3)_2$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} H_3BO_3-200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} Ca(NO_3)_2$ 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} H_3BO_3-200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} Ca(NO_3)_2$ ;培养温度设3个水平:25℃、30℃和35℃。用棉棒蘸取花粉并抖落于不同的培养基上,于不同温度下进行暗培养。用Nikon ECLIPSE 80I显微镜观察花粉管的生长情况并拍照,每隔12 h观察1次;每处理3个玻片,每个玻片随机观察5~10个视野。以花粉管萌发作为判别花粉有活力的标准,对有活力和无活力的花粉数进行统计,以花粉总数超过200为宜,结果取平均值。

1.2.2 储藏温度对花粉活力的影响 将花粉分别于室温(25℃)、4℃、0℃、-20℃、-80℃和-196℃条件下储藏13周,每周测定1次花粉活力。其中,花粉在-80℃储藏和取出时要经过-20℃和0℃各6 h的缓冲处理<sup>[10]</sup>,花粉在-196℃储藏和取出时则要经过-80℃、-20℃和0℃各6 h的缓冲处理。采用优化的TTC染色法和离体培养法同步测定花粉活力。

### 1.3 数据分析

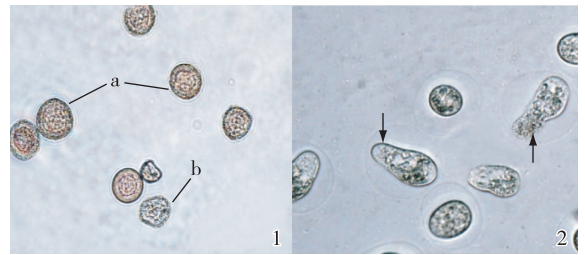
花粉活力的计算公式为:花粉活力=[有活力的花粉数/(有活力的花粉数+无活力的花粉数)]×100%。使用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计和差异显著性分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 花粉活力检测方法的优化

实验结果表明:采用TTC染色法和离体培养法检测曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力均有良好效果(图1)。TTC染色后,有活力花粉被染成红色,无活力花粉不变色(图1-1);此外,有一些花粉因为活力

不足而产生轻微的变色。通过离体培养,有活力的花粉均可观察到花粉管的萌发(图1-2)。



1. TTC 染色的花粉形态 Pollen morphology by TTC staining; a. 有活力花粉 Viable pollen; b. 无活力花粉 Unviable pollen. 2. 离体培养的花粉形态,箭头示花粉管 Pollen morphology by *in vitro* culture, arrows showing pollen tubes.

图1 TTC染色和离体培养后曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉的形态  
Fig. 1 Pollen morphology of *Taxus media* ‘Hicksii’ by TTC staining and *in vitro* culture

#### 2.1.1 TTC染色法实验条件的优化

2.1.1.1 pH的选择 采用不同pH的 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  TTC在35℃条件下测定曼地亚红豆杉‘Hicksii’的花粉活力,结果见表1。由表1可见:采用pH 7.0的TTC染液进行染色,测得的花粉活力高于pH 6.0和pH 6.5的TTC染液,差异极显著( $P=0.01$ )。用pH 7.0的TTC染液染色0.5 h花粉活力为73.37%,染色2.0 h的花粉活力达到稳定状态(92.30%),可以进行计数。而用pH 6.0和pH 6.5的TTC染液分别染色3.5 h,测得的花粉活力分别为45.78%和74.99%。总体上看,采用pH 7.0的TTC染液染色速度最快,测得的花粉活力也明显高于pH 6.0和pH 6.5的TTC染液。

2.1.1.2 染色温度的选择 分别在25℃、30℃和35℃条件下采用pH 7.0的 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  TTC染液进行染色,曼地亚红豆杉‘Hicksii’的花粉活力没有明显差别,均达到90%以上,但是染色所需时间却差别很大。25℃、30℃和35℃条件下花粉活力达到45%

表1 用不同pH的TTC染液染色后曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力的比较( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison of pollen viability of *Taxus media* ‘Hicksii’ by TTC staining solution with different pH ( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

pH	不同染色时间的花粉活力/% Pollen viability at different staining times						
	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h	3.5 h
6.0	13.75±3.36cC	16.11±1.46cC	24.04±1.75cC	27.71±2.41cC	37.48±0.67cC	40.86±5.60cC	45.78±1.56cC
6.5	27.19±2.56bB	45.71±4.80bB	55.44±5.56bB	60.68±2.25bB	69.09±3.13bB	73.60±3.71bB	74.99±3.22bB
7.0	73.37±3.06aA	79.90±2.95aA	85.14±1.90aA	92.30±2.42aA	92.51±1.41aA	91.09±1.61aA	90.70±0.61aA

<sup>1)</sup> 同列中不同的大写和小写字母分别表示差异极显著( $P=0.01$ )或显著( $P=0.05$ ) Different capitals and small letters in the same column indicate the extremely significant ( $P=0.01$ ) or significant ( $P=0.05$ ) differences, respectively.

所需的染色时间分别为 2.0、1.0 和 0.5 h；而花粉活力达到 90% 所需的时间分别为 6.0、3.5 和 2.0 h。比较而言,在 35 °C 条件下染色速度最快。

2.1.1.3 TTC 浓度的选择 在 pH 7.0、35 °C 的条件下采用不同浓度 TTC 染液染色,曼地亚红豆杉 ‘Hicksii’ 的花粉活力检测结果差异较小,仅染色效果略有不同。主要表现为:用 2.5 g · L<sup>-1</sup> TTC 染液染色偏浅;而用 10.0 g · L<sup>-1</sup> TTC 染色后载玻片上有少数红色斑点,即有多余染料沉积;用 5.0 g · L<sup>-1</sup> TTC 染色效果最好,颜色适中,且无红色斑点。

综合上述实验结果,适用于曼地亚红豆杉 ‘Hicksii’ 花粉活力 TTC 染色检测的最佳条件为:用 pH 7.0 的 5.0 g · L<sup>-1</sup> TTC 于 35 °C 下染色 2.0 h。

### 2.1.2 离体培养法实验条件的优化

2.1.2.1 培养基中蔗糖添加量的选择 在蔗糖添加量不同的培养基中曼地亚红豆杉 ‘Hicksii’ 的花粉萌发效果见表 2。‘Hicksii’ 花粉萌发对蔗糖浓度有严格要求。在含质量体积分数 10% 蔗糖的培养基上培养 4 d,花粉活力达到 65.34%。在含质量体积分数 15% 蔗糖的培养基上培养 3 d,花粉活力可达到 78.56%；培养 2~5 d,花粉活力均极显著高于其他培养基,说明含质量体积分数 15% 蔗糖的培养基更有利于曼地

亚红豆杉 ‘Hicksii’ 花粉管的萌发。然而,在含质量体积分数 20% 和 25% 蔗糖的培养基上培养 1~5 d, ‘Hicksii’ 的花粉均没有萌发,并出现不同程度的质壁分离现象,尤其是在含质量体积分数 25% 蔗糖的培养基上几乎所有具水合层的花粉都出现质壁分离现象,表明培养基中蔗糖添加量较高对 ‘Hicksii’ 花粉萌发有明显的抑制作用。

2.1.2.2 培养基中 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 质量浓度的选择 在 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 质量浓度不同的培养基中曼地亚红豆杉 ‘Hicksii’ 的花粉萌发效果见表 3。仅含 200 mg · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的培养基对 ‘Hicksii’ 花粉萌发的促进效果略优于仅含 100 mg · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的培养基,但添加 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 后,在含 200 mg · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 200 mg · L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 或 100 mg · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 200 mg · L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的培养基上花粉活力显著提高,表明同时含有 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的培养基对 ‘Hicksii’ 花粉管萌发的促进作用均优于仅含有 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的培养基,说明 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 存在相互作用。在含有 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 组合的培养基上花粉活力均极显著高于仅含有 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 的培养基,而且花粉管的萌发速率也明显加快;但同时含有 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的 2 组培养基间花粉活力无显著差异。实验结果说明:在含

表 2 在蔗糖添加量不同的培养基上离体培养 1~5 d 曼地亚红豆杉 ‘Hicksii’ 花粉活力的比较 ( $\bar{X} \pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 2 Comparison of pollen viability of *Taxus media* ‘Hicksii’ in vitro cultured for 1-5 d in culture media with different additions of sucrose ( $\bar{X} \pm SD$ )<sup>1)</sup>

蔗糖质量体积分数/% Mass-volume ratio of sucrose	不同培养时间的花粉活力/% Pollen viability at different culture times				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
10	10.44±2.67aA	43.33±3.00bB	57.45±3.61bB	65.34±2.43bB	67.45±1.91bB
15	12.98±1.02aA	53.44±3.98aA	78.56±2.23aA	80.34±0.23aA	76.97±3.28aA
20	0.00±0.00bB	0.00±0.00cC	0.00±0.00cC	0.00±0.00cC	0.00±0.00cC
25	0.00±0.00bB	0.00±0.00cC	0.00±0.00cC	0.00±0.00cC	0.00±0.00cC

<sup>1)</sup> 同列中不同的大写和小写字母分别表示差异极显著 ( $P=0.01$ ) 或显著 ( $P=0.05$ ) Different capitals and small letters in the same column indicate the extremely significant ( $P=0.01$ ) or significant ( $P=0.05$ ) differences, respectively.

表 3 在 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 质量浓度不同的培养基上离体培养 1~5 d 曼地亚红豆杉 ‘Hicksii’ 花粉活力的比较 ( $\bar{X} \pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 3 Comparison of pollen viability of *Taxus media* ‘Hicksii’ in vitro cultured for 1-5 d in culture media with different concentrations of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ( $\bar{X} \pm SD$ )<sup>1)</sup>

质量浓度/mg · L <sup>-1</sup> Concentration		不同培养时间的花粉活力/% Pollen viability at different culture times				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
100	0	5.56±1.32cB	14.85±3.75cC	34.45±3.58cB	37.40±4.35dD	45.40±3.55dC
200	0	4.56±1.35cB	12.00±1.11cC	36.87±3.37cB	46.56±2.09cC	54.45±4.77cB
100	200	12.98±1.02bA	53.44±3.98aA	78.56±2.23aA	80.34±0.23aA	76.97±3.28aA
200	200	16.56±2.78aA	44.91±3.32bB	70.22±3.00bA	71.04±1.94bB	70.98±3.76bA

<sup>1)</sup> 同列中不同的大写和小写字母分别表示差异极显著 ( $P=0.01$ ) 或显著 ( $P=0.05$ ) Different capitals and small letters in the same column indicate the extremely significant ( $P=0.01$ ) or significant ( $P=0.05$ ) differences, respectively.

有  $H_3BO_3$  的培养基中同时添加适量的  $Ca(NO_3)_2$  对曼地亚红豆杉‘Hicksii’的花粉萌发有十分明显的促进作用。

2.1.2.3 培养温度的选择 在培养温度不同的条件下,曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力没有明显的差别,均可达到80%左右,但是所需的培养时间却有很大差别。在25℃、30℃和35℃温度条件下花粉活力达到40%所需的培养时间分别为3.5、2.0和1.5 d;而花粉活力达到80%所需的培养时间分别为6.0、4.0和3.0 d。比较而言,在35℃条件下曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉的萌发效果最好。

综合上述实验结果,适宜于曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力离体培养检测的最佳条件为:用含质量体积分数15%蔗糖、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} H_3BO_3$ 和 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} Ca(NO_3)_2$ 的培养基,于35℃下培养4 d。

## 2.2 花粉适宜储藏温度分析

在25℃、4℃、0℃和-20℃条件下储藏1~13周曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力的变化见表4。在室温(25℃)和-20℃条件下,储藏7周的‘Hicksii’

花粉仍有一定的活力,但在室温(25℃)和-20℃条件下分别储藏9周和10周后花粉均无活力;在4℃条件下储藏10周的花粉仍具有一定的活力,但储藏11周后花粉均无活力;在0℃条件下储藏效果最好,储藏11周的花粉仍具有一定的活力,且储藏13周的花粉仍可以检测到花粉活力。在-20℃条件下储藏2周花粉活力迅速下降,说明‘Hicksii’的花粉不抗低温。另外,本研究还对-80℃和-196℃条件下‘Hicksii’花粉活力进行了检测,结果显示:在-80℃和-196℃条件下保存3 d曼地亚红豆杉‘Hicksii’的花粉就失去了全部活力,说明超低温储藏方法并不适用于‘Hicksii’花粉的储藏。综合以上实验结果可见:适宜于曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉储藏的最适温度为0℃。

由表4还可见:采用TTC染色法和离体培养法测得的花粉活力的变化趋势基本相似,二者可以相互印证;但采用TTC染色法获得的检测结果均高于离体培养法。

表4 在不同温度条件下储藏13周的曼地亚红豆杉‘Hicksii’花粉活力的变化( $\bar{X}\pm SD$ )

Table 4 Change of pollen viability of *Taxus media* ‘Hicksii’ stored at different storage temperatures for 13 weeks ( $\bar{X}\pm SD$ )

时间/week Time	在不同储藏温度下的花粉活力/% <sup>1)</sup>				在不同储藏温度下的花粉活力/% <sup>2)</sup>			
	Pollen viability at different storage temperatures <sup>1)</sup>				Pollen viability at different storage temperatures <sup>2)</sup>			
	25℃	4℃	0℃	-20℃	25℃	4℃	0℃	-20℃
1	92.30±2.42	92.30±2.42	92.30±2.42	92.30±2.42	78.56±2.23	78.56±2.23	78.56±2.23	78.56±2.23
2	64.31±4.34	76.25±2.09	82.75±2.81	19.17±2.11	55.97±3.24	60.00±3.23	72.19±2.44	15.96±0.71
3	45.49±3.10	59.66±5.87	69.44±0.98	14.29±2.18	38.07±1.11	53.95±2.23	63.87±2.89	10.17±2.57
4	29.96±0.98	41.05±2.22	69.85±1.09	13.73±1.98	23.07±2.56	32.33±3.34	56.94±3.46	9.01±1.87
5	15.04±2.11	36.66±1.28	65.42±3.00	12.41±0.89	12.61±3.21	24.03±2.19	50.96±4.01	8.63±0.45
6	7.15±1.45	29.01±3.17	60.65±3.78	9.79±2.85	4.52±0.12	17.05±1.09	50.09±3.00	6.36±2.12
7	4.87±1.23	16.03±2.99	50.28±2.54	7.01±1.04	2.42±0.45	9.87±0.87	43.01±2.59	5.36±0.09
8	2.01±0.99	6.44±0.47	35.94±3.26	3.94±0.78	0.00±0.00	3.34±0.78	25.03±0.99	0.00±0.00
9	0.00±0.00	4.28±0.93	25.94±2.20	2.79±0.41	0.00±0.00	1.55±0.45	20.79±3.46	0.00±0.00
10	0.00±0.00	3.45±1.34	11.94±1.09	0.00±0.00	0.00±0.00	1.71±0.34	11.94±2.43	0.00±0.00
11	0.00±0.00	1.51±0.23	8.89±3.11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	3.40±1.46	0.00±0.00
12	0.00±0.00	0.00±0.00	5.00±0.79	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
13	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

<sup>1)</sup>采用TTC染色法的检测结果 Determination result by TTC staining method.

<sup>2)</sup>采用离体培养法的检测结果 Determination result by *in vitro* culture method.

## 3 讨论和结论

采用TTC法测得的花粉活力高于离体培养法,但二者检测结果的变化趋势相同,可以相互印证。相比

较而言,TTC染色法更方便快捷。由于部分能显色的花粉并不一定能萌发,因而,采用TTC染色法获得的检测结果高于离体培养法。离体培养法以花粉管萌发作为判别花粉活力的指标,因而其结果更准确。

研究结果表明:染液pH对TTC染色法的检测结

果有极显著影响, pH 7.0 的 TTC 染液的染色效果极显著优于 pH 6.0 和 pH 6.5 的 TTC 染液。TTC 染色法主要原理是花粉萌发过程中由脱氢酶引起的氧化还原反应使生物染料产生颜色反应, 有活力花粉被染成红色、无活力花粉不显色。在 TTC 染液染色过程中, 最适反应条件可提高脱氢酶的活性、促进氧化还原反应的进行。由于酶促反应对 pH 有严格要求, 所以 TTC 染色法对染液 pH 的要求也比较高。

研究表明: 培养基中的蔗糖浓度是离体培养法的重要影响因子。蔗糖作为渗透调节剂可为花粉细胞提供适当的渗透压, 渗透压过低会导致花粉粒非正常吸水, 过高则导致细胞失水, 推测本实验中出现的质壁分离现象与此有关。添加剂对曼地亚红豆杉 'Hicksii' 花粉的萌发率也有明显影响, 在含  $H_3BO_3$  的培养基中添加适量的  $Ca(NO_3)_2$  可以大幅度提高 'Hicksii' 花粉的萌发率; 表明  $H_3BO_3$  和  $Ca(NO_3)_2$  对 'Hicksii' 花粉的萌发具有协同促进作用。Cheng 等<sup>[11]</sup>认为: 在花粉培养过程中硼有促进花粉萌发和花粉管伸长的作用; 而赵彩平等<sup>[12]</sup>和贾文庆等<sup>[13]</sup>认为: 钙对花粉萌发也有促进作用, 能引导花粉管生长方向、促进胞吐作用, 从而促进花粉管伸长。本研究结果也验证了钙和硼的这一促进作用。

近年来, 超低温储藏技术的应用越来越广泛, 主要是采用  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  和  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  对花粉进行储藏, 具有保存效果好、保存时间长的特点<sup>[10, 14]</sup>。然而, 本实验中  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  和  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  储藏 3 d 的花粉全部失去活力, 推测可能原因有 2 个: 一是在进行超低温储藏前没有对 'Hicksii' 花粉进行适当的预处理; 二是 'Hicksii' 花粉对低温的抗性较差, 不适合超低温储藏。大多数适合超低温储藏的花粉在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  下花粉活力下降比较缓慢<sup>[15-16]</sup>, 而 'Hicksii' 花粉活力在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  下急速下降, 因此, 'Hicksii' 花粉耐低温能力较差可能是主要因素, 这一判断还需要进一步实验验证。

结合时间和成本等因素综合考虑后认为: 采用 TTC 染色法检测曼地亚红豆杉 'Hicksii' 花粉活力的最适条件为: 用 pH 7.0 的  $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  TTC 染液在  $35\text{ }^\circ\text{C}$  条件下染色 2.0 h。采用离体培养法观察花粉活力的最适条件为: 花粉在含质量体积分数 15% 蔗糖、

$100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_3\text{BO}_3$  和  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Ca}(\text{NO}_3)_2$  的培养基上于  $35\text{ }^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d。而曼地亚红豆杉 'Hicksii' 花粉的最适储藏温度为  $0\text{ }^\circ\text{C}$ 。

#### 参考文献:

- [1] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] 李乃伟, 束晓春, 张明霞, 等. 土壤含水量对红豆杉紫杉醇含量及相关生理指标的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, 35(3): 75-78.
- [3] 李乃伟, 彭峰, 冯煦, 等. 不同施肥处理对曼地亚红豆杉 'Hicksii' 生长和紫杉醇含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(2): 28-33.
- [4] 王钦雨, 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.
- [5] 程广有, 唐晓杰, 杨振国, 等. 不同贮藏温度对东北红豆杉花粉寿命的影响[J]. 吉林林学院学报, 1998, 14(4): 196-198.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] RODRIGUEZ-RIANO T, DAFNI A. A new procedure to assess pollen viability[J]. Sexual Plant Reproduction, 2000, 12(4): 241-244.
- [9] WEAVER M L, TIMM H. *In vitro* and in-flower studies of pollen viability in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Naturwissenschaften, 1987, 74(2): 89-91.
- [10] 张亚利, 尚晓倩, 刘燕. 花粉超低温保存研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(4): 139-147.
- [11] CHENG C, RERKASEM B. Effects of boron on pollen viability in wheat[J]. Plant and Soil, 1993, 155/156(1): 313-315.
- [12] 赵彩平, 徐国华, 张绍铃, 等. G 蛋白调节剂对梨花粉萌发及花粉胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 160-166.
- [13] 贾文庆, 刘宇, 陈韵, 等.  $Ca^{2+}$  与葱兰花粉萌发和花粉管生长的关系[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(4): 98-99.
- [14] 刘婷婷, 代其林, 奉斌, 等. 甘蓝型油菜花粉超低温保存及其花粉活力的研究[J]. 生物技术通报, 2010(3): 114-118.
- [15] 赵彩平, 刘娜, 韩明玉, 等. 不同贮藏温度对桃花粉生活力的影响[J]. 北方园艺, 2010(12): 50-52.
- [16] 安勇, 张彦妮, 钱灿. 贮藏温度及时间对百合花粉萌发率的影响[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(1): 44-45.

(责任编辑: 佟金凤)