

不同贮藏温度下大别山五针松花粉活力的变化

项小燕, 吴甘霖^①, 段仁燕, 王志高, 张中信, 王广艳

(安庆师范大学生命科学学院, 安徽 安庆 246133)

Change in pollen viability of *Pinus dabeshanensis* at different storage temperatures XIANG Xiaoyan, WU Ganlin^①, DUAN Renyan, WANG Zhigao, ZHANG Zhongxin, WANG Guangyan (School of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(2): 114-116

Abstract: By means of MTT staining method, pollen viability of *Pinus dabeshanensis* C. Y. Cheng et Y. W. Law stored for 1-170 d under conditions of room temperature (20 °C-28 °C), 4 °C and -20 °C was measured. The result shows that pollen viability of *P. dabeshanensis* is 95.97% during pollen flourishing period. When storage for 7 d at different temperatures, pollen viability is still over 90%. Pollen viability decreases to 40.33% when storage for 75 d at room temperature, while that decreases to 81.67% and 73.33% when storage for 75 d at 4 °C and -20 °C, respectively. But when storage for 115 d at different temperatures, pollen viability is lower than 20%. It is indicated that short-term (one month) storage at room temperature is suitable to keep pollen viability of *P. dabeshanensis*, but 4 °C is more suitable for keeping pollen viability for longer time.

关键词: 大别山五针松; 贮藏温度; 贮藏时间; 花粉活力; MTT 染色法

Key words: *Pinus dabeshanensis* C. Y. Cheng et Y. W. Law; storage temperature; storage time; pollen viability; MTT staining method

中图分类号: Q945.78; S791.24 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)02-0114-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.02.15

大别山五针松(*Pinus dabeshanensis* C. Y. Cheng et Y. W. Law)为松科(Pinaceae)松属(*Pinus* Linn.)植物,自然种群数量极少,目前仅发现在安徽省岳西县大王沟海拔900~1300 m阴坡和半阴坡有相对集中的分布,种群规模计200余株,且多为成年个体,林下幼苗极少,自然更新困难,为中国特有珍稀树种之一^[1]。大别山五针松常在每年3月份至4月份形成花芽,5月中下旬花粉成熟并散发,花粉具气囊,此时雌球花张开接受传粉,球果翌年9月成熟^[2]。据作者近年的调查,大别山五针松种子败育率较高,且种子质量较低,这也是该种类濒危的重要原因之一。

花粉为雄配子体,其活力和寿命对授粉、受精、种子产量和质量具有直接影响^[3];花粉活力主要受植物自身遗传特性和外界因素的影响,尤其受温度的影响^[4];而花粉的贮藏、活力以及受精能力等是人工授粉的关键。作者近年的野外观察结果表明,大别山五针松的传粉过程易受雨季影响,导致雌球花不易受粉,从而影响结实。

韩建伟等^[5]对大别山五针松花粉的离体萌发能力进行了研究,但目前对如何有效贮藏其花粉以及贮藏温度对大别山五针松花粉活力的影响尚不清楚。为此,作者对不同温度条件下贮藏不同时间的大别山五针松的花粉活力进行了测定,

以期筛选出适宜于较长时间保存大别山五针松花粉的温度条件,为解决大别山五针松传粉期花粉不足问题及其人工授粉和种质资源保存技术的研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试大别山五针松花粉于2013年5月13日(盛粉期)采自安徽省岳西县大王沟的栽培植株,取新鲜不黏手的花粉进行实验。

1.2 方法

1.2.1 花粉贮藏条件设置 轻取雄球花并放入纸袋内,自然干燥后去除杂质,分装至具塞小瓶中并放入适量的硅胶,分别置于室温(2013年5月份、9月份和10月份的平均气温为20 °C;6月份的平均气温为25 °C;7月份和8月份的平均气温为28 °C)、4 °C和-20 °C条件下贮藏,分别于贮藏1、3、5、7、9、11、15、20、30、60、75、115和170 d时取样观察花粉活力。

1.2.2 花粉活力测定 采用MTT染色法^[6]测定花粉活力。在载玻片上滴1滴质量体积分数0.5% MTT溶液,取适量花粉与其混合,加盖玻片后室温放置15 min;用BM2000显微镜(江

收稿日期: 2015-08-25

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201304314); 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2016A437)

作者简介: 项小燕(1981—),女,安徽桐城人,博士,副教授,主要从事植物系统进化及植物资源保护等方面的研究。

^①通信作者 E-mail: wugl@sina.cn

南永新光学有限公司)观察花粉的染色情况,有活力花粉呈蓝色,无活力花粉未染色。每个处理选择染色均匀的区域镜检6个视野,各重复3次。

1.3 数据处理与分析

按照公式“花粉活力=(染色花粉粒数/花粉粒总数)×100%”计算花粉活力。采用 EXCEL 2003 软件对实验数据进行处理。

2 结果和分析

在室温、4℃和-20℃条件下分别贮藏1、3、5、7、9、11、15、20、30、60、75、115和170d的大别山五针松花粉活力变化见表1。结果显示:在不同温度条件下,大别山五针松的花粉活力均随贮藏时间的延长而逐渐降低。贮藏1d时,贮藏于不同温

度下的花粉活力均较高,平均花粉活力为95.97%;贮藏3和5d时,贮藏于室温下的花粉活力基本不变,但贮藏于4℃和-20℃条件下的花粉活力略降低;贮藏7d后,贮藏于不同温度下的花粉仍保持较高活力,在室温、4℃和-20℃条件下平均花粉活力分别为95.62%、93.69%和92.35%;贮藏60d时,室温贮藏的花粉活力降幅最大,平均花粉活力降至72.93%,而4℃和-20℃条件下平均花粉活力分别降至83.75%和83.90%;贮藏60d后,在室温条件下的花粉活力急剧下降,在-20℃条件下的花粉活力也明显下降,贮藏75d时平均花粉活力分别降至40.33%和73.33%,而4℃条件下平均花粉活力仍保持81.67%;贮藏115d时,不同贮藏温度下平均花粉活力均急剧下降,其中4℃条件下平均花粉活力降至18.11%,而室温下平均花粉活力仅为5.68%;贮藏170d时,各贮藏条件下花粉均无活力。

表1 在不同贮藏温度下大别山五针松花粉活力的变化($\bar{X}\pm SE$)

Table 1 Change in pollen viability of *Pinus dabeshanensis* C. Y. Cheng et Y. W. Law at different storage temperatures ($\bar{X}\pm SE$)

贮藏温度 Storage temperature	不同贮藏时间的花粉活力/% Pollen viability at different storage times						
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	15 d
室温 Room temperature	95.97±0.53	95.96±0.64	95.95±0.65	95.62±0.20	95.34±0.24	94.24±1.07	94.22±0.34
4℃	95.97±0.53	94.85±0.15	93.95±0.27	93.69±0.23	92.99±0.10	92.98±0.21	90.10±0.17
-20℃	95.97±0.53	94.51±0.24	93.48±0.48	92.35±0.43	91.60±0.44	89.07±1.75	87.05±1.07

贮藏温度 Storage temperature	不同贮藏时间的花粉活力/% Pollen viability at different storage times					
	20 d	30 d	60 d	75 d	115 d	170 d
室温 Room temperature	93.80±0.49	92.91±0.57	72.93±1.71	40.33±1.29	5.68±1.74	0.00±0.00
4℃	85.78±1.05	85.11±0.98	83.75±0.99	81.67±0.87	18.11±1.02	0.00±0.00
-20℃	85.54±0.92	85.42±0.87	83.90±1.73	73.33±2.38	12.07±1.55	0.00±0.00

3 讨论和结论

花粉活力常用的检测方法为 TTC 染色法^[7-8]。但该方法需要将花粉和染色液在恒温条件下混合并保温一段时间,因而操作要求较高。而本研究选用的 MTT 染色法只需将花粉和染色液混合后置于室温条件下放置 15 min 即可检测出花粉活力,是一种灵敏度高、经济、快速的花粉活力检测方法,尤其适合野外条件下花粉活力的检测,该方法已在其他植物花粉活力研究中得到验证^[6],并被认为是与花粉实际萌发率最为接近的一种花粉活力测定方法^[9]。

韩建伟等^[5]的研究结果表明:在最适条件下大别山五针松离体花粉的萌发率仅为 33.15%,远低于采用 MTT 染色法获得的花粉活力检测结果,其原因是离体萌发研究所用的花粉在采集后需经过较长时间的运输,花粉活力整体降低并可能影响离体萌发结果(未发表数据),但是否还有其他因素影响花粉萌发率,则有待进一步研究。

花粉活力通常随贮藏时间的延长而降低,并因贮藏方法

不同而异^[10]。大别山五针松花粉活力也具有同样的变化趋势。采集当天大别山五针松花粉活力最高(为 95.97%),室温条件下其花粉活力在贮藏 60 d 时仍达到 72.93%,但室温条件下贮藏 60 d 后其花粉活力急剧下降,此时正值 7 月中旬,较高的室温可能加速了花粉的呼吸作用,从而使花粉活力快速下降;而在 4℃条件下贮藏 75 d 时大别山五针松的花粉活力仍较高,为 81.67%,贮藏 115 d 时其花粉活力才明显下降,说明大别山五针松的花粉活力也因贮藏条件不同而异。

物种濒危是多因素共同作用的结果,其中雄配子发育异常是很多物种濒危的重要因素之一^[11]。新采集的大别山五针松花粉活力高达 95.97%,表明其雄配子发育正常。项小燕等^[2]的研究结果表明:大别山五针松散粉期常受到雨季的影响,易造成花粉活力下降及花粉密度降低,雌球花受粉不足,这也是大别山五针松种子产量和质量均较低的重要原因之一(未发表数据)。如果在盛粉期采集花粉并进行适度的人工补充授粉,可提高大别山五针松的受粉率,从而提高其种子的产量和质量(未发表数据)。

综上所述,室温最有利于短期(1个月)内大别山五针松花

粉的保存,而4℃贮藏则更有利于较长时间保持其花粉活力。此外,不同温度条件下贮藏7d内大别山五针松的花粉活力均无明显降低,为该种的人工授粉提供了可能性。

参考文献:

- [1] 彭镇华,江泽慧. 大别山五针松及起源[M]. 北京:中国林业出版社,1999.
- [2] 项小燕,张小平,段仁燕,等. 濒危植物大别山五针松母树林花粉传播规律[J]. 广西植物,2014,34(3):333-337.
- [3] 李胜,李唯,杨德龙,等. 扁桃花粉活力的测定及其提高坐果率研究[J]. 果树学报,2004,21(1):79-81.
- [4] 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.
- [5] 韩建伟,王恩茂,张智勇,等. 珍稀濒危物种大别山五针松花粉离体萌发的研究[J]. 中国农学通报,2014,30(13):15-19.
- [6] 张超仪,耿兴敏. 六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J]. 植物科学学报,2012,30(1):92-99.
- [7] 王红卫,邓辉胜,谭海明,等. 银杉花粉生命力及其变异[J]. 植物生态学报,2007,31(6):1199-1204.
- [8] 王呈伟,郑玉红,李莹,等. 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[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(2):13-18.
- [9] WIDRLECHNER M P, PELLETT H M, ASCHER P D, et al. *In vivo* pollen germination and vital staining in deciduous azaleas[J]. HortScience, 1983, 18(1): 86-88.
- [10] 赵文飞,邢世岩,姜永旭,等. 贮藏时间对银杏花粉保护酶活性和萌发率的影响[J]. 武汉植物学研究,2004,22(3):259-263.
- [11] 王亚玲,张寿洲. 香港木兰小孢子发生及雄配子体发育的研究[J]. 武汉植物学研究,2008,26(6):547-553.

(责任编辑:郭严冬)

(上接第32页 Continued from page 32)

- [25] SCERVINO J M, MESA M P, NÓMICA I D, et al. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46: 755-763.
- [26] 刘微,朱小平,高书国,等. 解磷微生物浸种对大豆生长发育及其根瘤形成的影响研究[J]. 中国生态农业学报,2004,12(3):153-155.
- [27] 崔邢,张亮,林勇明,等. 不同土壤条件下解磷菌处理对巨尾桉土壤有效磷含量的影响[J]. 应用与环境生物学报,2015,21(4):740-746.
- [28] 钟传青,黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报,2005,42(2):286-294.
- [29] ILLMER P, SCHINNER F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27: 257-263.
- [30] 盛荣,肖和艾,谭周进,等. 土壤解磷微生物及其磷素有效性转化机理研究进展[J]. 土壤通报,2010,41(6):1505-1510.
- [31] 徐建明,张甘霖,谢正苗,等. 土壤质量指标与评价[M]. 北京:科学出版社,2010:4-36.
- [32] 戴开结,何方,沈有信,等. 不同磷源对云南松幼苗生长和磷吸收量的影响[J]. 生态学报,2009,29(8):4078-4083.
- [33] 蔡秋燕,张锡洲,李廷轩,等. 不同磷源对磷高效利用野生大麦根际土壤磷组分的影响[J]. 应用生态学报,2014,25(11):3207-3214.
- [34] 朱培森,杨兴明,徐阳春,等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报,2007,18(1):107-112.
- [35] 赵其国,黄国勤,马艳芹. 中国南方红壤生态系统面临的问题及对策[J]. 生态学报,2013,33(24):7615-7622.
- [36] 戴沈艳,申卫收,贺云举,等. 一株高效解磷细菌的筛选及其在红壤性水稻中的施用效果[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(5):678-683.
- [37] 国家林业局森林资源管理司. 第七次全国森林资源清查及森林资源状况[J]. 林业资源管理,2010(1):1-8.
- [38] 杨尚东,吴俊,谭宏伟,等. 红壤区桉树人工林炼山后土壤肥力变化及其生态评价[J]. 生态学报,2013,33(24):7788-7797.

(责任编辑:张明霞)