

3 个竹种的花粉特性观察及花粉培养和贮藏条件筛选

林树燕^{a,b}, 赵荣^b, 李洁^b, 郑笑^b, 丁雨龙^{a,b,①}

(南京林业大学: a. 竹类研究所, b. 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037)

Observation on pollen character and selection of pollen culture and storage conditions of three bamboo species

LIN Shuyan^{a,b}, ZHAO Rong^b, LI Jie^b, ZHENG Xiao^b, DING Yulong^{a,b,①} (Nanjing Forestry University: a. Bamboo Research Institute, b. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(4): 111-113

Abstract: Pollen character and viability of *Shibataea chinensis* Nakai, *Bambusa multiplex* (Lour.) Raeusch. ex Schult. et J. H. Schult. and *Arundinaria simonii* f. *heterophyllus* (Makino et Shirasawa) Muro were observed, and suitable culture and storage conditions of pollen were selected by taking pollen germination rate as the index. Results show that pollen of three bamboo species is nearly spherical with a single aperture, obvious pore ring and cover, aperture is concave. The highest germination rate of *S. chinensis*, *B. multiplex* and *A. simonii* f. *heterophyllus* is 9.1%, 15.8% and 76.5%, respectively. Suitable culture medium for pollens of *S. chinensis* and *B. multiplex* contains boric acid and sucrose with mass ratios of 0.001% and 15%, respectively, while that for pollen of *A. simonii* f. *heterophyllus* contains boric acid and sucrose with mass ratios of 0.001% and 20%, respectively, and the appropriate culture time is less than 3 h. The suitable storage conditions for pollen of *A. simonii* f. *heterophyllus* are storing fresh pollen under 4 °C or -5 °C for less than 10 h.

关键词: 竹类; 花粉形态; 花粉活力; 花粉萌发率; 培养和贮藏条件

Key words: bamboo; pollen morphology; pollen viability; pollen germination rate; culture and storage conditions

中图分类号: Q944.59; Q945.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)04-0111-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.04.16

竹类植物的营养生长期很长,大多数竹种开花后即死亡,因而对竹类开花生物学及生殖生物学的研究相对较少^[1-2]。花粉萌发和贮藏特性是竹类开花生物学特性研究的重要内容之一,目前主要集中于花粉粒的形态和活力等方面^[3-8],关于竹类花粉萌发和贮藏条件的相关研究尚不多见。为此,作者对鹅毛竹(*Shibataea chinensis* Nakai)、孝顺竹[*Bambusa multiplex* (Lour.) Raeusch. ex Schult. et J. H. Schult.]和异叶苦竹[*Arundinaria simonii* f. *heterophyllus* (Makino et Shirasawa) Muro]的花粉形态和活力、萌发和贮藏条件进行了研究,以期作为竹类生殖生物学研究及3个竹种的遗传育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试3个竹种的花粉于2009年至2012年的3月份至5月份(盛花期)采自南京林业大学竹种园。选取4个不同单株上的小花,采集成熟且未散粉的花药,各竹种重复采样3次;迅速用FAA固定液固定,于4 °C保存,用于花粉形态观察。用

于花粉活力测定和培养的花药则随采用。

1.2 方法

1.2.1 花粉形态观察 取已固定花粉,洗净并依次用体积分数70%乙醇和无水乙醇脱水,分别用K850型临界点干燥仪和E-1010型离子溅射仪进行干燥和喷金,用FEI QUANTA-200型扫描电子显微镜观察并拍照。各竹种选10个视野,各视野选10粒以上花粉粒测量直径,各重复3次,结果取平均值。

1.2.2 花粉活力测定 用I₂-KI染色法^[9]检测花粉活力,并用Leica DM2500型生物显微镜观察,统计各视野中花粉粒总数和染色花粉粒数并计算花粉活力,结果取平均值。各竹种镜检5个视野(每个视野花粉粒数大于25),各重复3次。

1.2.3 花粉培养条件筛选 采用培养基发芽法^[10]用含质量分数15%蔗糖和质量分数0.001%硼酸的简单培养基培养花粉,分别在培养1、2、3、4、5和6 h后取花粉,用Leica DM2500型生物显微镜观察花粉萌发状况,以花粉管长度超过花粉粒直径为萌发标准,每次取样均镜检3个视野(各视野花粉数大于50),各重复5次,计算花粉萌发率平均值,并据此确定各竹种花粉的最适培养时间。分别用质量分数0.001%、0.005%

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD23B05); 中国博士后科学基金资助项目(2014M560427); 国家自然科学基金资助项目(31000294); 江苏高校优势学科建设项目(PAPD)

作者简介: 林树燕(1976—),女,山东潍坊人,博士,副教授,主要从事竹类植物发育学的研究。

①通信作者 E-mail: ylding@vip.126.com

和0.010%硼酸与质量分数5%、10%、15%和20%蔗糖交叉配制制成12种简单培养基,用上述最适培养时间培养花粉,计算花粉萌发率,据此确定各竹种花粉萌发的最适培养基。

1.2.4 花粉萌发率日变化观察 在盛花期晴天的7:00至16:00每隔1h采集1次尚未散粉的花药,用上述最适培养基培养2h,并按上述方法计算花粉萌发率,分析其日变化规律。

1.2.5 花粉贮藏条件和贮藏时间筛选 在盛花期的10:00采集异叶苦竹花粉,分别置于室温(25℃)和低温(4℃、-5℃、-10℃)下保存;一部分花粉中加入硅珠,视为干燥保存;另一部分花粉不经干燥直接保存。分别在贮藏1、3、6、10、24、32、48、72、96和120h后取样观察并计算花粉萌发率,至视野中无花粉萌发时停止观察。

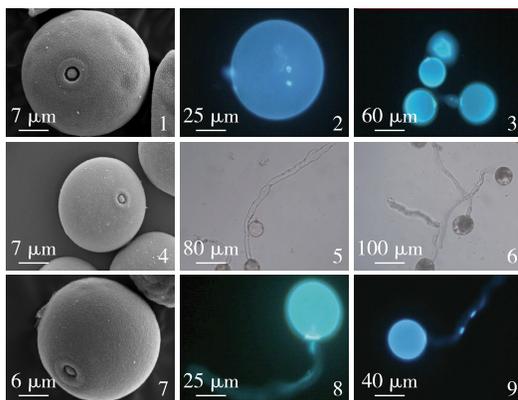
1.3 数据计算及处理

按照公式“花粉活力=(染色花粉粒数/花粉粒总数)×100%”和“花粉萌发率=(萌发花粉粒数/花粉粒总数)×100%”计算花粉活力和花粉萌发率。用EXCEL 2013软件对数据进行处理,并用SPSS 13.0软件进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 花粉形态及萌发特征

3个竹种的花粉均呈近球形(图1),具单个圆形或椭圆形萌发孔,明显且内凹,具孔环和盖;外壁纹饰为细颗粒状(图1-1,4,7);花粉外壁极薄,易皱瘪破裂。鹅毛竹、孝顺竹和异叶苦竹的花粉直径分别为23.5~51.7、32.70~41.57和18.8~28.2 μm,平均直径分别为40.22、36.77和27.86 μm。在鹅毛竹花粉和花粉管中可见2个精核和1个生殖核(图1-2,3)。



1-3. 鹅毛竹 *Shibataea chinensis*: 1. 花粉形态 Pollen morphology; 2. 2个精细胞和1个营养细胞 Two sperms and one vegetative cell; 3. 萌发的花粉 Germinated pollen. 4-5. 孝顺竹 *Bambusa multiplex*: 4. 花粉形态 Pollen morphology; 5. 萌发的花粉 Germinated pollen. 6-9. 异叶苦竹 *Arundinaria simonii* f. *heterophyllus*: 6. 萌发的花粉 Germinated pollen; 7. 花粉形态 Pollen morphology; 8. 精细胞到达萌发孔 Sperm reaches to aperture; 9. 花粉管中的精细胞 Sperms in pollen tube.

图1 供试3个竹种的花粉形态

Fig. 1 Pollen morphology of three bamboo species tested

2.2 花粉活力的比较

在镜检的440粒鹅毛竹花粉中,发育良好、不良和无活力的花粉分别占38.6%、55.5%和5.9%,花粉败育率61.4%;在镜检的510粒孝顺竹花粉中,发育良好、不良和无活力的花粉分别占75.1%、18.0%和6.9%,花粉败育率24.9%;在镜检的554粒异叶苦竹花粉中,发育良好、不良和无活力的花粉分别占88.4%、6.9%和4.7%,花粉败育率11.6%。

2.3 花粉的最适培养条件

2.3.1 最适培养时间 由表1可见:鹅毛竹、孝顺竹和异叶苦竹的花粉萌发率分别在培养4、2和3h时达到最高,分别为9.4%、15.7%和46.2%;但它们的花粉萌发率分别在培养3、2和2h后无显著差异,表明最佳培养时间以3h内为宜。

2.3.2 最适培养基 由表2可见:在含质量分数0.001%硼酸和质量分数15%蔗糖的培养基中鹅毛竹和孝顺竹的花粉萌

表1 不同培养时间3个竹种花粉萌发率的比较($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 1 Comparison on pollen germination rate of three bamboo species at different culture times ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

培养时间/h Culture time	花粉萌发率/% Pollen germination rate		
	SC	BM	ASH
1	5.1±0.8b	7.8±0.4b	19.5±1.2b
2	8.1±0.7b	15.7±0.7a	45.7±1.5a
3	9.1±0.8a	14.8±0.5a	46.2±1.4a
4	9.4±0.5a	14.5±0.6a	45.0±1.2a
5	8.9±0.8a	14.7±0.3a	45.4±1.6a
6	9.2±0.5a	15.3±0.7a	45.7±1.5a

¹⁾ SC: 鹅毛竹 *Shibataea chinensis*; BM: 孝顺竹 *Bambusa multiplex*; ASH: 异叶苦竹 *Arundinaria simonii* f. *heterophyllus*. 同列中不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

表2 在不同培养基上3个竹种花粉萌发率的比较($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 2 Comparison on pollen germination rate of three bamboo species on different culture media ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

质量分数/% Mass ratio		花粉萌发率/% Pollen germination rate		
硼酸 Boric acid	蔗糖 Sucrose	SC	BM	ASH
0.001	5	3.4±0.2c	8.9±0.6c	23.1±1.3c
0.001	10	6.7±0.4b	12.1±0.7b	41.6±1.6c
0.001	15	9.1±0.8a	15.8±1.4a	45.2±0.5c
0.001	20	2.3±0.5c	7.8±0.5c	76.5±1.7a
0.005	5	2.1±0.8c	7.6±0.8c	19.6±0.4c
0.005	10	5.2±0.3b	8.2±0.5c	32.8±1.2c
0.005	15	7.9±0.4ab	10.2±1.2b	35.4±1.4c
0.005	20	3.9±0.7c	8.0±0.5c	64.2±1.6b
0.010	5	1.7±0.9c	7.1±0.8c	16.4±0.4c
0.010	10	6.0±0.5b	8.2±0.3c	35.1±0.6c
0.010	15	7.8±0.6ab	10.8±0.8b	38.6±0.3c
0.010	20	3.8±0.3c	7.7±0.9c	69.8±0.8ab

¹⁾ SC: 鹅毛竹 *Shibataea chinensis*; BM: 孝顺竹 *Bambusa multiplex*; ASH: 异叶苦竹 *Arundinaria simonii* f. *heterophyllus*. 同列中不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

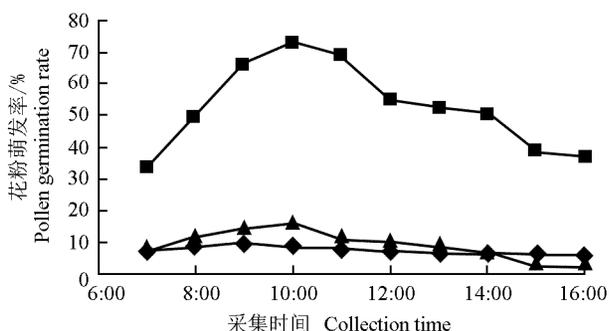
发芽率最高,分别为9.1%和15.8%;在含质量分数0.001%硼酸和质量分数20%蔗糖的培养基中异叶苦竹的花粉发芽率最高,为76.5%。当硼酸含量相同时异叶苦竹的花粉发芽率随蔗糖含量的提高而增大;鹅毛竹和孝顺竹的花粉发芽率则在含质量分数15%蔗糖的培养基中最高。

2.4 花粉萌发率的日变化规律

由3个竹种花粉萌发率的日变化曲线(图2)可见:9:00至11:00采集的花粉萌发率较高。其中,9:00采集的鹅毛竹花粉萌发率最高,为9.2%;10:00采集的孝顺竹和异叶苦竹的花粉萌发率最高,分别为15.7%和72.9%。3个竹种中异叶苦竹花粉萌发率的日变幅最大。

2.5 花粉的最适贮藏条件和贮藏时间

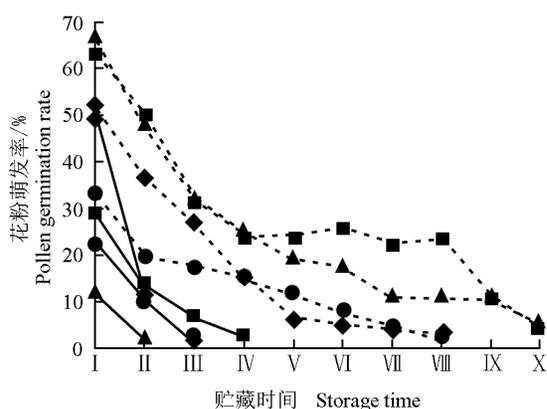
由图3可见:在不同贮藏温度下异叶苦竹新鲜花粉(采后未干燥)的萌发率总体上高于干燥花粉。在不同贮藏条件下



—◆—: 鹅毛竹 *Shibataea chinensis*; —▲—: 孝顺竹 *Bambusa multiplex*; —■—: 异叶苦竹 *Arundinaria simonii f. heterophyllus*.

图2 3个竹种花粉萌发率的日变化曲线

Fig. 2 Daily change curve of pollen germination rate of three bamboo species



—: 干燥花粉 Dry pollen; ---: 新鲜花粉 Fresh pollen; ◆: 室温 Room temperature; ▲: 4 °C; ■: -5 °C; ●: -10 °C. I - X: 贮藏时间分别为1, 3, 6, 10, 24, 32, 48, 72, 96和120 h Storage time is 1, 3, 6, 10, 24, 32, 48, 72, 96 and 120 h, respectively.

图3 不同贮藏条件下异叶苦竹花粉萌发率的变化

Fig. 3 Change of pollen germination rate of *Arundinaria simonii f. heterophyllus* (Makino et Shirasawa) Muro under different storage conditions

贮藏1 h后花粉萌发率均急速下降,并随贮藏时间的延长而逐渐减小;其中,在不同温度下干燥花粉均在贮藏3~10 h后失去活力,而新鲜花粉在贮藏10 h后萌发率降幅趋缓。总体上看,异叶苦竹花粉不耐贮藏,其新鲜花粉较为适宜的贮藏温度为-5 °C和4 °C,贮藏时间以10 h内为宜。

3 讨论

鹅毛竹、孝顺竹和异叶苦竹的花粉均为近球形,具单个萌发孔,有明显的孔环和盖,萌发孔内凹,这些特征与禾本科(Gramineae)植物的花粉形态^[3]特征基本一致。因此,虽然不同竹种的花粉大小有差异,但花粉形态相似。

供试3个竹种花粉萌发率差别较大,且花粉败育率也较高;雄性败育可导致野外条件下鹅毛竹不结实,孝顺竹和异叶苦竹仅能收获少量种子。三细胞型(1个营养细胞和2个精细胞)花粉寿命比二细胞型(1个营养细胞和1个精细胞)花粉短,而禾本科植物的三细胞型花粉的寿命相对更短^[11]。异叶苦竹的花粉在贮藏1 h后活力迅速下降,也表明其花粉不耐贮藏、寿命较短。在供试的3个竹种中,异叶苦竹的花粉萌发率相对较高,但在干燥条件下其花粉萌发率明显降低。因此,适当的湿度与低温条件是异叶苦竹花粉贮藏的必要条件。

参考文献:

- [1] JANZEN D H. Why bamboos wait so long to flower [J]. Annual Reviews of Ecology and Systematics, 1976, 7: 347-391.
- [2] JEEVA S, KIRUBA S, LALHRUAITLUANGA H, et al. Flowering of *Melocanna baccifera* (Bambusaceae) in northeastern India [J]. Current Science, 2009, 96: 1165-1166.
- [3] 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.
- [4] 张文燕, 马乃训, 吴玲玲, 等. 五月季竹开花结实的研究[J]. 竹子研究汇刊, 1992, 11(2): 15-25.
- [5] 汪奎宏, 何奇江, 吴蓉. 早竹花粉形态与生物学特性[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(2): 137-141.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 袁金玲, 顾小平, 岳晋军, 等. 孝顺竹开花生物学特性及杂交试验[J]. 林业科学, 2011, 47(8): 61-66.
- [9] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 84.
- [10] 何凤仙. 植物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 71-77.
- [11] KARTHA K K. Cryopreservation of Plant Cells and Organs[M]. Florida: CRC Press, 1985: 172-198.

(责任编辑: 郭严冬)