

3 种柳树花粉最适贮藏温度及离体培养基研究

郭娇娇¹, 王春荣^{1*}, 王志彬² (1. 河北省林业和草原科学研究院, 河北石家庄 050061; 2. 张家口市金沙滩林场, 河北怀安 076150)

摘要 为了解不同柳树品种花粉贮藏的适宜条件及最适离体培养基, 以粉枝柳、黄花柳、早柳 3 种柳树花粉为试验材料, 采集新鲜花粉进行离体培养, 以筛选适宜培养基, 并将花粉分别置于室温 20~25、4、-5、-20 °C 条件下干燥贮藏后, 通过测定花粉萌发率, 筛选适宜的贮藏条件。结果显示: 粉枝柳和早柳花粉在 100 g/L 蔗糖+100 mg/L 硼酸的培养基中萌发情况较好, 黄花柳则在 50 g/L 蔗糖+100 mg/L 硼酸中萌发率较高。随着贮藏时间的延长, 贮藏温度越低, 3 种柳树花粉贮藏效果越好。在 -20 °C 干燥情况下, 3 种柳树花粉贮藏 60 d 后仍可保持较高的萌发率, 萌发率分别为粉枝柳 42.6%, 早柳 39.5%, 黄花柳 29.5%; 而室温条件下贮藏 12~15 d 基本丧失活力。

关键词 柳树; 花粉; 萌发率; 离体培养

中图分类号 S722.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)05-0123-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.05.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Suitable Storage Temperature and Culture Medium of Three Species of Willow Pollen

GUO Jiao-jiao¹, WANG Chun-rong¹, WANG Zhi-bin² (1. Hebei Academy of Forestry and Grasslands Science, Shijiazhuang, Hebei 050061; 2. Zhangjiakou Jinshatan Forest Farm, Huai'an, Hebei 076150)

Abstract The fresh pollens were collected to filter the suitable *in vitro* culture condition from three kinds of willows which were used as the experiment material. Fresh pollens were collected for *in vitro* culture to screen the appropriate medium, and the pollens were dried at room temperature 20~25, 4, -5, -20 °C respectively, and then the appropriate storage conditions were selected by measuring the pollen germination rate. The results showed that pollen of *Salix rorida* and *Salix matsudana* germinated better in the medium of 100 g/L sucrose+100 mg/L boric acid, while that of *Salix citrosa* germinated higher in the medium of 50 g/L sucrose+100 mg/L boric acid. With the prolongation of storage time, the lower the storage temperature of the three willow species, the better the pollen storage effect. Under the dry condition of -20 °C, the pollen of the three willow species could still maintain a high germination rate after 60 days of storage. The germination rates were 42.6% for *Salix rorida*, 39.5% for *Salix matsudana*, and 29.5% for *Salix caprea*; However, after 12~15 days storage at room temperature, the vitality of the cells almost completely lost.

Key words Willow; Pollen; Germination rate; *In vitro* culture

柳树是杨柳科柳属(*Salix*)植物,是水土保持、防风固沙、四旁绿化的优良树种,同时也是进行木本植物遗传学与基因组学研究的模式树种^[1-2]。柳树为雌雄异株植物,不同品种柳树的花期不同,且有些花期相对较短,因此花期不遇成为柳树优良品种杂交选育工作中面临的难题之一。花粉收集贮藏是解决这一难题的有效手段,它可以有效破除杂交亲本所受的花期与地域限制,扩大杂交亲本的选择范围,从而大大提高获得优良新品种的机会^[3-7]。因此,如何使长期贮藏后的花粉仍然保持较高活力成为研究的关键。目前关于柳树花粉贮藏的研究报道相对较少,且多集中于不同花粉活力测定方法的比较研究。王伟伟等^[1,8-11]对蓝墨水、TTC、I₂-KI、醋酸洋红等染色法及离体培养法等几种常见花粉活力检测方法进行了对比研究,发现染色法更适用于花粉活力的快速测定,但是由于染色法均是依靠花粉中的淀粉、脱氢辅酶等不同物质染色,花粉失活后这些物质或酶的活性仍然存在,而且很多染色法的染色界限并不明显,这将导致染色法的测定结果会出现一定程度的偏差,而离体培养法测定的数据更为准确。笔者选取 3 个柳树品种进行花粉离体培养,研究 3 种柳树花粉在不同贮藏温度下花粉萌发率随贮藏时间的变化规律,研究 3 种柳树花粉的适宜贮藏温度,以期为解

决柳树杂交育种工作中花期不遇问题提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料为 2021 年 4 月初采集的粉枝柳、黄花柳和早柳的未开放花枝,其中粉枝柳和黄花柳花枝采集于张家口赤城黑龙山,早柳花枝采集于河北农业大学校园内。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉采集与贮藏。挑选生长健壮的柳树植株,采集花芽饱满的未开放花枝带回,装于玻璃瓶中进行水培。为避免花序盛开后花粉混合,对 3 个品种枝条分别进行隔离。待雄花盛开后,用镊子取下花序并在硫酸纸上轻轻磕碰、晃动使花粉坠落,并用花粉筛筛取花粉、去除杂质。将收集的花粉分装在盛有变色硅胶的离心管中密封,标记好品种名称及采集时间。将密封的离心管分别置于室温 20~25、4、-5、-20 °C 的贮藏条件下干燥封存,待后期试验使用。

1.2.2 花粉萌发适宜培养基的筛选。选取蔗糖和硼酸作为影响因子,分别设定 4 个浓度水平,进行 2 因素 4 水平完全试验(表 1)。在不同配比的培养基上分别进行花粉离体培养试验,根据各培养基中花粉萌发结果确定 3 种柳树较为适宜的培养基配比。通过前期预试验已确定当培养基中琼脂的质量浓度为 8 g/L 时,培养基不会出现低温凝固现象,便于在培养基上铺洒花粉及培养观察。

1.2.3 花粉萌发率的测定。采用离体培养法进行花粉萌发率的测定。用一次性塑料滴管吸取培养基溶液,立即滴 1 滴于双凹载玻片的 2 个凹槽中央,使其完全铺满凹槽,凹槽弧

基金项目 河北省科技厅资助项目“河北省野生柳树资源评价、筛选及抗寒品种选育”(17226320D-4)。

作者简介 郭娇娇(1988—),女,河北宁晋人,工程师,硕士,从事森林培育及林木育种研究。*通信作者,正高级工程师,硕士,从事林木育种研究。

收稿日期 2022-04-20;修回日期 2022-06-01

面需尽量薄,否则会降低透光性,影响观察。取少量花粉在硫酸纸上,用笔头松软的小毛笔垂直轻蘸花粉,在距离载玻片一定高度的位置轻弹毛笔,使花粉均匀分布到培养基上。在载玻片上用记号笔标记好花粉种类及贮藏温度。每个花粉处理设置3个重复。将载玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿中,置于25℃光照培养箱中培养24h,取出载玻片用显微镜观察并统计花粉萌发状况,每个凹槽选取8~10个视野。花粉管的长度等于或大于花粉粒直径即视为萌发^[12-14]。

表1 花粉萌发适宜培养基筛选设计方案

Table 1 Design of suitable medium for pollen germination

水平 Level	因素 Factor	
	蔗糖浓度 Sucrose concentration (A)//g/L	硼酸浓度 Boric acid concentration (B)//mg/L
1	50	100
2	100	200
3	150	300
4	200	400

2 结果与分析

2.1 不同培养基对3种柳树花粉萌发率的影响 将3种柳树的新鲜花粉分别在不同配比的培养基上进行离体培养,培养24h后各培养基的花粉萌发情况见图1。从图1可见,粉枝柳、早柳和黄花柳3种柳树花粉在A₄B₃和A₄B₄2种配比中均未萌发,在其余培养基中的萌发率波动较大,但规律不同。粉枝柳和早柳在A₂B₁中花粉萌发率相对更高,黄花柳则在A₁B₁中萌发率较高。

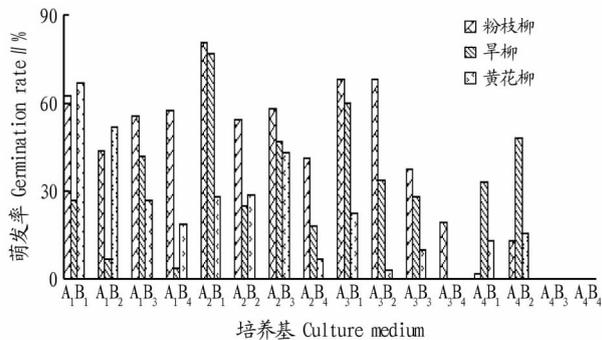


图1 不同培养基下3种柳树花粉萌发情况

Fig. 1 Pollen germination in different proportion of medium

根据极差分析(表2)可知,粉枝柳和黄花柳 $R_A > R_B$,早柳 $R_A < R_B$,说明粉枝柳和黄花柳花粉萌发受蔗糖浓度的影响大于受硼酸浓度影响,而早柳则受硼酸浓度影响较大。比较蔗糖不同水平的效果,黄花柳表现为水平1>水平2>水平3>水平4,说明蔗糖浓度越高,黄花柳的花粉萌发率越低;粉枝柳和早柳的花粉萌发率变化趋势不一致,但均以水平2最高。比较硼酸不同浓度水平下柳树花粉萌发效果,发现3个柳树花粉萌发率总体随硼酸浓度的增高而降低。综合分析可知,粉枝柳和早柳的最适宜培养基为A₂B₁,而黄花柳则在A₁B₁培养基中花粉萌发率最高。

表2 不同培养基花粉萌发率极差分析

Table 2 Range analysis of pollen germination rate in different media

水平 Level	粉枝柳 <i>Salix rorida</i>		早柳 <i>Salix matsudana</i>		黄花柳 <i>Salix caprea</i>	
	A	B	A	B	A	B
1	54.64	53.04	19.56	48.87	40.66	32.31
2	58.29	44.50	41.43	28.15	26.38	24.61
3	47.89	41.22	30.09	30.43	8.71	21.84
4	3.57	29.27	20.20	5.25	7.08	6.27
R	54.72	23.77	21.87	43.62	33.58	26.04

2.2 贮藏温度对3种柳树花粉萌发率的影响

2.2.1 贮藏温度对粉枝柳花粉萌发率的影响。由图2可知,粉枝柳在各温度条件下,贮藏3d内花粉萌发率下降程度相近;室温条件下3d后萌发率降低速度开始加剧,贮藏7d,花粉萌发率降低至52.1%,15d萌发率降至10%以下。4℃条件下,贮藏3d后萌发率开始快速下降,贮藏10d萌发率显著下降为65.5%。-5和-20℃条件下,花粉萌发率在前15d相近,之后差异逐步增大;-5℃条件下,贮藏15d后萌发率与初始萌发率出现差异,贮藏60d萌发率仍可达27.3%。-20℃条件下,粉枝柳花粉萌发率下降最为缓慢,贮藏28d后萌发率与-5℃条件下差异增大,贮藏60d萌发率仍有42.6%。

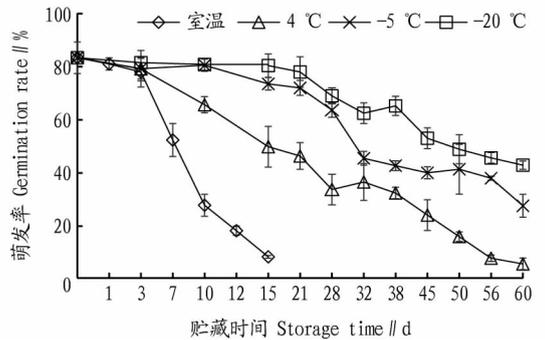


图2 不同贮藏温度下粉枝柳花粉萌发率的变化

Fig. 2 Changes of pollen germination rate of *Salix rorida* in different storage temperatures

2.2.2 贮藏温度对早柳花粉萌发率的影响。由图3可知,早柳花粉在室温条件下贮藏3d萌发率出现差异,贮藏7d萌发率降为51.0%。4℃条件下,早柳花粉萌发率随时间的延长缓慢下降,贮藏28d后萌发率下降至48.3%。-5和-20℃条件下贮藏21d时早柳花粉萌发率与初始仍较为接近。-5℃条件下贮藏38d花粉萌发率降至54.3%,而-20℃条件下贮藏50d花粉萌发率降至51.7%。

2.2.3 贮藏温度对黄花柳花粉萌发率的影响。从图4可见,随着时间的推移,黄花柳在室温条件下花粉萌发率下降较快,贮藏12d即降至10%以下。-5和-20℃前15d的萌发率变化不明显,后期下降速率出现差异,-5℃条件下贮藏21d萌发率下降至52.0%,贮藏56d萌发率降至7.8%;-20℃条件下贮藏28d时萌发率为55%,贮藏60d萌发率仍可达29.5%。4℃条件下花粉萌发率较-5和-20℃条件

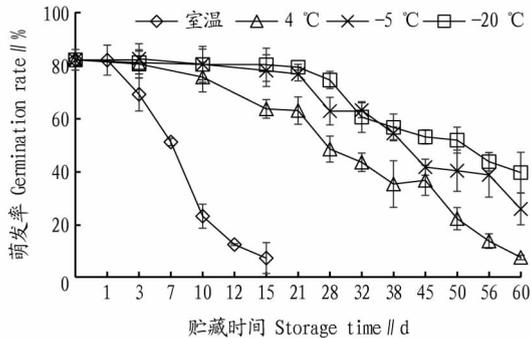


图 3 不同贮藏温度下旱柳花粉萌发率的变化

Fig. 3 Changes of pollen germination rate of *Salix matsudana* in different storage temperatures

下下降速度较快,贮藏 21 d 时萌发率显著下降至 47.4%,贮藏 50 d 萌发率降至 10% 以下。

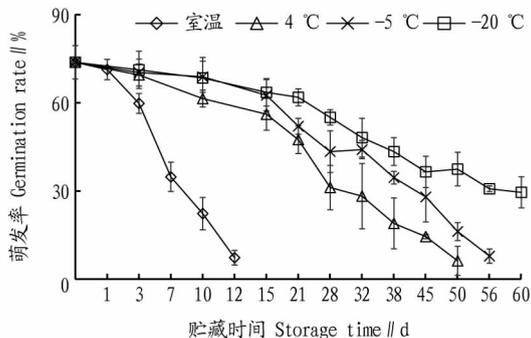


图 4 不同贮藏温度下黄花柳花粉萌发率的变化

Fig. 4 Changes of pollen germination rate of *Salix caprea* in different storage temperatures

3 结论与讨论

蔗糖是植物生长的重要能源物质和渗透调节物质^[1],蔗糖浓度过高会导致花粉失水、质壁分离,抑制花粉的萌发,适宜的蔗糖浓度可以在一定程度上缓解花粉破裂,维持渗透平衡。在培养基中添加一定浓度的硼酸有利于花粉萌发和花粉管的生长^[15-16]。该研究表明,粉枝柳、旱柳、黄花柳 3 种柳树花粉萌发的适宜硼酸浓度为 100 mg/L,而粉枝柳和旱柳花粉萌发适宜的蔗糖浓度为 100 g/L,黄花柳的适宜蔗糖浓度为 50 g/L。

不同植物花粉在不同贮藏条件下的萌发率均有所不同。杜克兵等^[3,6]研究表明,杨树花粉在 -20°C 条件贮藏效果最好,长期贮藏则应选择干燥密封超低温冷冻(-80°C);朴永浩等^[17]对 8 个梨品种的花粉贮藏研究发现,在冰箱冷藏室中干燥密封贮藏 1 年的花粉仍具有较高的发芽率;刘赢男等^[4]研究发现, 3°C 低温冷藏是山梅花植物的最佳贮藏条件。而该研究中 3 种柳树 -20°C 条件下干燥贮藏可保持最高萌发率,可见

不同植物间花粉所适宜的最佳贮藏条件存在显著差异。

该研究结果表明,粉枝柳、旱柳和黄花柳花粉萌发率在不同贮藏温度条件下随贮藏时间的变化趋势基本一致。随着贮藏时间的延长,花粉的萌发率逐渐降低;在贮藏 3 d 后,温度越高花粉萌发率下降速度越快。室温条件下 3 种柳树花粉萌发率迅速降低,12~15 d 花粉萌发率降至 10% 以下;在低温贮藏条件下,3 种柳树花粉的贮藏期明显增长。 -20°C 条件下,贮藏初期花粉仍保持较高的萌发率,21 d 后萌发率下降较快,贮藏 60 d 3 种柳树花粉的萌发率在 29.5%~42.6%,而室温条件下贮藏 12~15 d 花粉基本丧失活力。这可能是由于低温可使花粉代谢受到抑制,酶的活性减弱^[18-20],呼吸作用降低,因此可以使花粉维持较长时间的活力。

参考文献

- [1] 王伟伟,姚玲,何开跃,等. 不同柳树花粉离体培养及活力测定方法比较研究[J]. 江苏林业科技,2018,45(4):1-7.
- [2] 王源秀,江聪,徐立安. 柳树花粉生活力分析[J]. 林业科技开发,2007,21(1):28-30.
- [3] 杜克兵,沈宝仙,许林,等. 不同贮藏条件下杨树花粉活力变化及隔年杂交授粉应用的可行性研究[J]. 华中农业大学学报,2007,26(3):385-389.
- [4] 刘赢男,周丹,刘玮,等. 不同培养基及贮藏条件对山梅花属植物花粉生活力的影响[J]. 东北林业大学学报,2011,39(12):47-48,79.
- [5] 彭向永,刘俊祥,李振坚,等. 高柳花粉离体萌发及花粉管生长特性[J]. 北京林业大学学报,2017,39(3):81-86.
- [6] 孙超,台秀国,杨振亚,等. 不同贮藏温度对 4 种杨树花粉生活力的影响[J]. 山东科学,2015,28(1):109-113.
- [7] 李亚军,黄河,牛雅静,等. 10 个菊花品种花粉生活力测定和贮藏方法研究[J]. 福建农业学报,2020,35(3):295-302.
- [8] 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.
- [9] 左丹丹,明军,刘春,等. 植物花粉生活力检测技术进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745.
- [10] 王玲,祝朋芳,毛洪玉. 不同培养基及不同贮藏条件对金娃娃萱草花粉生命力的影响[J]. 西北林学院学报,2009,24(3):95-97,108.
- [11] 刘洁云,吴艳艳,牟海飞,等. 黄白香蕉花粉离体培养基筛选及贮藏试验[J]. 西南农业学报,2021,34(8):1699-1704.
- [12] 姜雪婷,杜玉虎,张绍铃,等. 梨 43 个品种花粉生活力及 4 种测定方法的比较[J]. 果树学报,2006,23(2):178-181.
- [13] 程广有,唐晓杰,孟范例,等. 不同贮藏温度对银中杨花粉寿命的影响[J]. 北方园艺,2010(23):105-107.
- [14] 陈永安,陈鑫,刘艳飞. 采粉期及贮藏条件对猕猴桃花粉生活力的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(8):157-160.
- [15] 李桂荣,杨鹏鸣. 硼酸与蔗糖对百合花粉生活力的影响[J]. 安徽农业科学,2010,38(18):9494-9495.
- [16] 高倩,黄榜,张安平,等. 蜂糖李花粉离体萌发及活力保存研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2021,49(5):123-129,137.
- [17] 朴永浩,曲柏宏,代志国,等. 梨花粉贮藏特性与授粉能力的研究[J]. 北方园艺,2002(5):54-55.
- [18] 张保才,李晓丹,崔鸿文,等. 不同贮藏方式对辣椒花粉生活力及授粉效果的影响[J]. 西北农业学报,2013,22(7):132-137.
- [19] 苗卫东,王萌,井朋伟,等. 不同葡萄品种花粉生活力测定与贮藏条件[J]. 北方园艺,2021(24):23-31.
- [20] 肖玉菲,马锦林,蔡娅,等. 陆川油茶花粉贮藏和离体萌发条件研究[J]. 热带作物学报,2021,42(7):1971-1980.