

烟草花粉活力鉴定方法筛选

李宗平, 张俊杰*, 彭 灏, 王文明, 郭宇龙, 徐世平, 陈茂胜, 李进平

(湖北省烟草研究所, 中国烟草白肋烟试验站, 武汉 430030)

摘要: 以白肋烟 B37 花粉为试验材料, 对花粉活力鉴定方法进行了分析比较, 并设计了培养配方、培养温度、培养时间等 15 种花粉活力鉴定方法。结果表明, 花粉离体培养萌发测定花粉活力是较为理想的烟草花粉活力鉴定方法, 其中葡萄糖 (3%) + 硼酸 (50 mg/L) + CaCl₂ (20 mg/L)、蔗糖 (10%) + 硼酸 (50 mg/L) + CaCl₂ (20 mg/L) 25 °C 恒温暗箱保湿培养 3 h, 花粉萌发率最高, 新鲜花粉活力分别为 86.8% 和 91.3%。

关键词: 花粉; 萌发; 花粉管

中图分类号: S572.032

文章编号: 1007-5119(2013)04-0080-03

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.04.017

Screening for Optimum Method of Tobacco Pollen Vigor Evaluation

LI Zongping, ZHANG Junjie*, PENG Hao, WANG Menming,

GUO Yulong, XU Shiping, CHEN Maosheng, LI Jinping

(Burley Tobacco Experimental Station of CNTC, Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030, China)

Abstract: With the experimental material of Burley B37 pollen, various tobacco pollen vigor evaluation methods were compared. The results indicated that pollen germination was the best method for identifying pollen vigor. With the formula of 3% glucose, 50 mg/L boric acid, 20 mg/L CaCl₂ and 10% sucrose, 50 mg/L boric acid, 20 mg/L CaCl₂, cultivating 3 h under 25 °C constant temperature, the percentage of pollen germination was the highest. The pollen vigor was 86.8% and 91.3% respectively.

Keywords: pollen; germination; pollen tube

植物花粉活力即花粉萌发力 (germinability) 是指花粉在适宜条件下萌发的能力^[1]。据刘芳等^[2]报道, 植物花粉活力不同物种因自身遗传特性而存在差异, 此外, 温度、相对湿度、储藏介质、辐射、光照是影响花粉活力的主要环境因素, 一般来说, 低温、干燥、黑暗条件下有利于花粉活力保持。王四清等^[3]通过几种菊花花粉的试管萌发实验, 发现蔗糖对菊花花粉萌发有促进作用。杜玉虎等^[4]、沈捷等^[5]分别对榆叶梅和杉木花粉进行离体萌发培养, 发现适宜的硼酸及钙离子浓度能促进花粉管的形成, 浓度过高则起抑制作用。花粉活力鉴定方法主要分 3 类: 一类是染色法, 如氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法、碘钾 (I-KI) 染色法、荧光染色法、甲基兰染色法等; 二类是花粉离体萌发测定法,

如葡萄糖花粉萌发培养法、蔗糖花粉萌发培养法等; 三类是花粉授粉结实检测法。据孙光玲等^[6]报道, 烟草花粉活力测定以葡萄糖及蔗糖发芽法较为可靠。目前使用较多的鉴定方法有 TTC 染色法和花粉离体萌发测定法。碘钾 (I-KI) 染色法、荧光染色法由于能使未成熟和衰老的花粉着色, 而这些花粉不一定具有受精能力, 致使花粉活性测定值偏高, 花粉授粉结实检测法是根据结实情况判断花粉活性, 结果比较准确, 但由于授粉到每个柱头的花粉量较多, 无法定量判断花粉的活力。

在烟草杂交制种中, 通常需要早期采集父本花粉, 经过一段时间储藏, 当花粉需求量较大时, 可保障花粉的充足供应; 或为了减少父本种植量, 当年采集的花粉经冷冻干燥低温储藏多年使用, 经过

基金项目: 湖北省烟草专卖局项目“经济高效烟草种子生产技术研究”(027Y2011-051)

作者简介: 李宗平, 男, 高级农艺师, 从事烟草育种及良繁包衣加工工作。E-mail: li63@163.com。*通信作者: E-mail: zjj1966y@163.com

收稿日期: 2011-12-12

修回日期: 2012-11-19

长期储藏的花粉在使用之前，都必须做花粉活力检测，以检验花粉的萌发受精能力。本研究通过不同烟草花粉活力鉴定方法的筛选，以期找到一种准确、可靠、有效的烟草花粉活力鉴定方法，为烟草杂交制种中花粉采集、储藏、检测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

白肋烟 B37 新鲜花粉，氯化三苯基四氮唑 (TTC)，葡萄糖，蔗糖，硼酸，SMART 生物显微镜。

1.2 试验设计和处理

试验于 2011 年在中国烟草恩施良繁基地分析检测中心进行。共设 15 种花粉鉴定方法，按培养配方、培养时间、培养温度进行处理设计 (表 1)。每处理设 3 次重复，每重复观察 4 个视野。在恒温培养箱中保湿培养。

表 1 花粉鉴定处理方法

Table1 The treatment methods for identifying pollen vigor			
处理代号	培养配方	培养时间/h	培养温度/℃
a	0.5%TTC 染色法	0.5	37
b	1%葡萄糖发芽法	1.5	35
c	2%葡萄糖发芽法	1.5	35
d	3%葡萄糖发芽法	1.5	35
e	4%葡萄糖发芽法	1.5	35
f	5%葡萄糖发芽法	1.5	35
g	5%蔗糖发芽法	1.0	35
h	10%蔗糖发芽法	1.0	35
i	15%蔗糖发芽法	1.0	35
j	3%葡萄糖+20 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl ₂	1.5	35
k	3%葡萄糖+30 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl ₂	1.5	35
l	3%葡萄糖+40 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl ₂	1.5	35
m	15%蔗糖+10 mg/L 硼酸	1.0	35
n	3%葡萄糖+50 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl ₂	3.0	25
o	10%蔗糖+50 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl ₂	3.0	25

1.3 花粉活力计数方法

TTC 染色法，在每个视野内染成红色或粉红色的花粉粒占调查花粉粒总数百分率；葡萄糖及蔗糖离体萌发培养法，在每个视野内萌发的花粉粒 (花粉管长度超出花粉粒直径一倍以上) 占调查花粉粒总数百分率；花粉活力均用百分数表示。

2 结果

2.1 不同处理方法对花粉活力的影响

方法 o 花粉活力检测结果最高，为 91.3% (图 1)，方法 n 其次，为 86.8%，方法 b 最低，为 6.6%，方法 a 居中；图 2 为 TTC 染色法，花粉粒染色情况，利用 TTC 染色法检测新鲜花粉的活力可达 74.8%，红色花粉粒表示是具有活力的花粉粒；图 3~4 是利

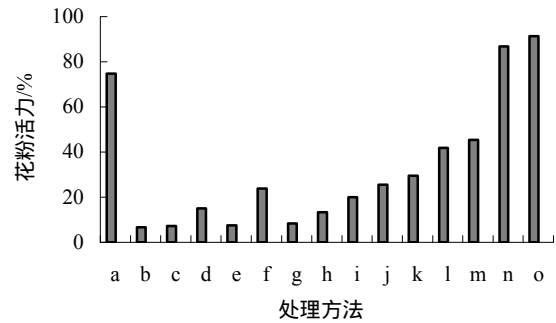


图 1 不同处理方法鉴定花粉活力

Fig. 1 The pollen vigor under different identifying methods

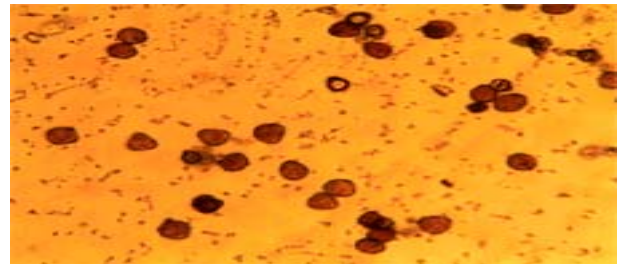


图 2 TTC 染色法花粉粒染色

Fig. 2 The pollen dyeing of TTC

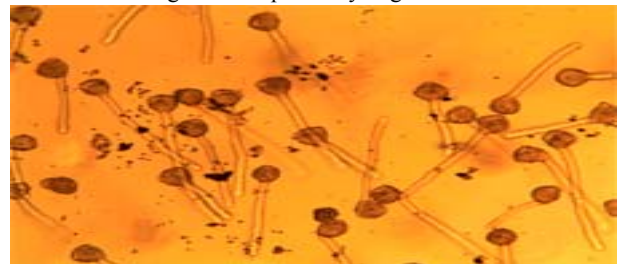


图 3 处理方法 n 培养花粉粒萌发

Fig. 3 The Germination of pollen under methods of n

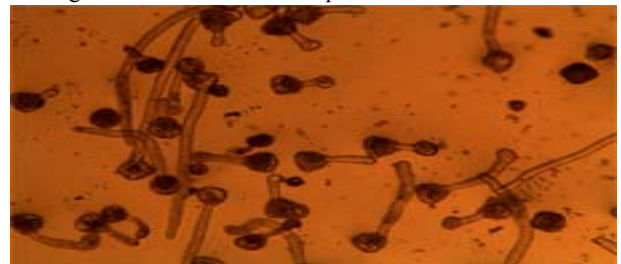


图 4 处理方法 o 培养花粉粒萌发

Fig. 4 The Germination of pollen under methods of o

用 3%葡萄糖和 10%蔗糖分别培养时,花粉粒萌发形成花粉管的情况,通过添加 50 mg/L 硼酸和 20 mg/L CaCl_2 可促进花粉管的生长,检测新鲜花粉的活力分别为 86.8%、91.3%。实验过程中发现,在一定的培养时间内,随着葡萄糖、蔗糖培养浓度的增加,花粉粒萌发的比例增加,花粉活力检测结果增加,但萌发形成花粉管的数量不多,使总的花粉活力检测结果偏低;在葡萄糖及蔗糖培养液中加入硼酸及氯化钙后,花粉粒萌发形成花粉管的数量明显增加,可见硼酸及氯化钙对花粉管的形成有明显的促进作用;花粉离体培养时间及培养温度对花粉活性检测结果影响明显,培养时间过短,有活力的花粉粒还未萌发形成花粉管,或形成的花粉管过短不能计数为有活力的花粉粒,使花粉活力检测结果偏低,影响花粉活力检测结果。花粉粒形成花粉管对培养温度要求比较高,温度过低花粉粒不能正常萌发形成花粉管,培养温度过高会使花粉粒死亡,失去活力,影响检测结果。

2.2 不同花粉活力鉴定方法分析

TTC 染色法是利用有活性花粉粒在呼吸作用过程中产生的 NADH_2 或 NADPH_2 将无色的 TTC 还原成红色的 TTF 而使花粉粒染成红色,无活力的花粉呼吸作用较弱,TTC 的颜色变化不明显,不能使花粉粒着色。TTC 染色法更适用于新鲜花粉的活力检测,对于过分干燥或经长期干燥低温保存的花粉其花粉呼吸作用较弱,染色效果不理想。其特点是简便快捷,但重复性差,色度的深浅不易分辨,影响对花粉活力的判断。

葡萄糖及蔗糖萌发发芽检测法是比较可靠和准确的烟草花粉活力鉴定方法,但需要加入适宜浓度的硼酸和钙离子,以促进花粉管的形成,判定花粉活力。在未加入硼酸和钙离子的葡萄糖及蔗糖溶液中培养花粉,只能使花粉粒的萌发孔形成小凸起,或花粉粒膨胀后破裂,内容物溢出,形成花粉管的数量较少,无法判定花粉真实活力。

3 讨论

有关植物花粉活力鉴定方法的报道在花卉及

蔬菜植物方面较多,在烟草方面报道比较少见。普遍认为花粉离体培养萌发是鉴定花粉活力比较准确和可靠的方法。鉴别花粉具有活力的特征是花粉能够萌发并形成花粉管。影响花粉管形成的因素较多,花粉培养基中适宜葡萄糖或蔗糖浓度对花粉的萌发有促进作用,适宜的硼酸、钙离子浓度能够促进花粉管的形成。本研究认为 3%葡萄糖或 10%蔗糖是烟草花粉离体发芽培养的适宜浓度,花粉萌发率较高,在此培养基的基础上添加 50 mg/L 硼酸和 20 mg/L 氯化钙,形成花粉管的数量明显增多,从而更能真实反映花粉活力的实际情况。此外,培养时间、培养温度也是影响烟草花粉萌发和花粉管形成的重要因素。

4 结论

本研究发现葡萄糖及蔗糖发芽法测定烟草花粉活力是较为可靠的方法,其中以 3%葡萄糖+50 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl_2 及 10%蔗糖+50 mg/L 硼酸+20 mg/L CaCl_2 为培养基,恒温 25 °C 暗箱保湿培养 3 h,检测新鲜花粉的活力可达 86.8%~91.3%,比较接近新鲜花粉活力的实际情况。而 TTC 染色法虽然简便快捷,但重复性差,花粉粒着色色度深浅不易分辨,检测结果往往与花粉活力的实际情况差别较大,不宜作为烟草花粉活力的鉴定方法。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 刘芳,周蕴薇. 花粉的保存及生活力测定方法的探讨[J]. 南方农业, 2007, 1 (3): 70-71.
- [3] 王四清,陈俊愉. 菊花和几种其它菊科植物花粉的试管萌发[J]. 北京林业大学学报, 1993, 15 (4): 78-93.
- [4] 杜玉虎,慕影,蒋锦标,等. 蔗糖、钙和硼对榆叶梅花粉离体萌发及花粉管生长的影响[J]. 北方园艺, 2008 (8): 106-109.
- [5] 沈捷,祝晨辰,徐进,等. 硼、钙离子对杉木花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 林业科技开发, 2010 (6): 57-60.
- [6] 孙光玲,王银生,胡乾政. 烟草花粉储藏与活力测定[J]. 中国烟草, 1994, 15 (1): 24-26.