

紫花含笑(♀)、灰岩含笑(♂)及其杂种 F_1 代花粉萌发试验研究

吉利^{1,2}, 孙卫邦^{1*}

(1. 中科院昆明植物研究所昆明植物园, 昆明 650204; 2. 郑州市二七区城市管理执法局, 郑州 450000)

摘要: 对紫花含笑(*Michelia crassipes*)、灰岩含笑(*M. calcicola*)及其杂种 F_1 代花粉生活力进行了研究,为基于紫花含笑和灰岩含笑杂种 F_1 代的含笑属观赏植物新品种培育与种质创新提供科学数据及研究资料。研究发现,亲本(紫花含笑和灰岩含笑)新鲜花粉萌发率均可达90%以上,杂种 F_1 代花粉萌发率从38%到79%不等,平均为57.7%,低于双亲。亲本及其杂种 F_1 代花粉萌发的最适温度为25℃,温度过高花粉管的伸长受到抑制,并导致花粉管顶端破裂。亲本及多数杂种 F_1 代的新鲜花粉在100 g/L和150 g/L的蔗糖浓度下萌发率都较高;经-20℃贮藏后的花粉对蔗糖浓度的敏感性要高于新鲜花粉。杂种 F_1 代及其亲本的花粉在离体培养中均会出现双萌发管现象。番红染料对液体培养基中的花粉有致死和染色作用,有利于统计杂种 F_1 代及其亲本的花粉萌发率。

关键词: 紫花含笑; 灰岩含笑; 杂种 F_1 代; 花粉萌发; 番红

中图分类号: Q944.42; Q949.747.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)06-0691-05

Study on Pollen Germination of *Michelia crassipes*, *M. calcicola* and Their F_1 Hybrids

Ji Li^{1,2}, SUN Wei-Bang^{1*}

(1. Kunming Botanical Garden, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2. City Management & Administration Execution Bureau of Erqi District, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Pollen germination of *Michelia crassipes*, *M. calcicola* and their F_1 hybrids were observed for providing the data for new cultivars selecting from the F_1 hybrids. The results revealed that fresh pollen of both *M. crassipes* and *M. calcicola* had high germination percentage of more than 90%. Fresh pollen of the F_1 hybrids was less vigorous than their parents, and the germination percentage varied from 38% to 79%, with an average of 57.7%. Temperature of 25℃ was optimum for pollen germination of the parents and their F_1 hybrids. The higher temperature could prevent pollen tube elongation and induce the top burst of the pollen tube. The fresh pollen of the parents and most of the F_1 hybrids germinated well and had higher germination percentage in sucrose concentrations of 100 g/L and 150 g/L. Pollen stored under -20℃ for one year were more sensitive to the sucrose concentration than fresh pollen. Two-tube pollen was examined in *in-vitro* cultured pollen of parents and the F_1 hybrids. Safranin could effectively dye and cause a death of the pollen cultured in the liquid medium, which is helpful with statistics of pollen germination.

Key words: *Michelia crassipes*; *M. calcicola*; F_1 hybrids; Pollen germination; Safranin

木兰科含笑属(*Michelia*)中的紫花含笑(*M. crassipes*)和灰岩含笑(*M. calcicola*)是观赏价值较高的园林植物。为了深入利用木兰科植物资源,定向培育含笑属观赏植物新品种,本研究组于

2001年开展了紫花含笑(♀)与灰岩含笑(♂)的杂交育种研究,杂种 F_1 代植株于2005年开始陆续开花,其株型和花朵特征表型极为丰富。关于这些杂种 F_1 代及其亲本的形态特征(叶表皮微形态及叶结

收稿日期: 2010-12-06, 修回日期: 2011-06-20。

基金项目: 云南省中青年学术与技术带头人培养项目(2006PY01-48); 国家林业局新品种测试与保护项目(2007003)。

作者简介: 吉利(1983-), 女, 河南济源人, 硕士, 现主要从事城市园林绿化建设管理工作(E-mail: jili-729@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wbsun@mail.kib.ac.cn)。

构)的比较观察和观赏性突出的单株离体快繁技术研究已先后进行了报道^[1-3]。花粉是遗传信息的载体,其生活力对授粉受精有重要影响。花粉生活力的高低直接影响到果树^[4,5]、观赏植物^[6,7]、水稻^[8]等的育种效率。我们对紫花含笑、灰岩含笑及其杂种 F₁ 代花粉生活力进行了研究,以期为基于紫花含笑和灰岩含笑杂种 F₁ 代的含笑属观赏植物新品种培育与种质创新提供科学数据及研究资料。

1 材料与方法

1.1 花粉采集与处理

于上午 9 时至 10 时将已有少部分花粉散出的花带回实验室,取下花药置于硫酸纸上室温自然散粉,硅胶干燥。

1.2 培养时间对花粉萌发的影响试验

花粉来自亲本(杂交试验时标记的紫花含笑 *Michelia crassipes* 和灰岩含笑 *M. calcicola* 单株)及编号为 hy01-6 和 hy01-11 的杂种 F₁ 代。花粉萌发率测定采用液体培养法。培养基组分为 100 g/L 蔗糖 + 300 mg/L HBO₃ + 300 mg/L Ca(NO₃)₂。共做 3 个重复。25℃培养,并分别于 2、4、6、8、10 h 后,统计萌发率。

1.3 培养温度对花粉萌发的影响试验

花粉来自亲本及大量开花的编号为 hy01-11 的杂种 F₁ 代单株。培养基组分为 100 g/L 蔗糖 + 300 mg/L HBO₃ + 300 mg/L Ca(NO₃)₂;萌发温度梯度为 25℃、30℃、35℃,每个温度处理 3 个重复。花粉培养 4 h 后,观察其花粉管生长情况,计算萌发率。

1.4 培养基中蔗糖浓度对花粉萌发的影响试验

试验材料为采自亲本及 14 株杂种 F₁ 代的新鲜花粉,以及在 -20℃保存了一年的亲本和单株编号为 hy01-6 与 hy01-11 杂种 F₁ 代的花粉。设置蔗糖浓度为 50、100、150、200 g/L 的 4 个梯度,所有蔗糖浓度培养液中的 Ca(NO₃)₂ 和 HBO₃ 浓度均为 300 mg/L,并设蒸馏水和 300 mg/L HBO₃ + 300 mg/L Ca(NO₃)₂ 为对照。每个处理 3 个重复,在 25℃条件下培养 8 h 后,统计花粉萌发率。

1.5 花粉生活力测定及萌发率计算方法

以在适宜蔗糖浓度、萌发温度和萌发时间下获得的花粉萌发率,作为花粉生活力的测定依据。通

过 1% 番红染料,处理并染色已萌发完毕的花粉,以花粉管长度大于或等于花粉直径为萌发标准,每个重复在显微镜下选取 4 个视野进行镜检,采集和统计相关数据。花粉萌发率的计算方法为:萌发率 = 视野中花粉萌发数目/视野中总花粉数 × 100%。

2 结果

2.1 培养温度对花粉萌发的影响

试验结果表明,25℃时花粉萌发率较高,亲本萌发率均可达到 90%;随着温度升高,花粉萌发率明显降低(表 1)。杂种 F₁ 代 hy01-11 花粉在 35℃时的萌发率与 30℃时的萌发率均为 48% 左右,但 35℃条件下,部分花粉管出现短缩和破裂现象。在 30℃时花粉管仍能正常伸长,但长度较 25℃要短,且少数花粉管在伸长后出现弯曲皱褶现象;在 35℃时,花粉管伸长缓慢,且多数花粉出现顶端破裂现象。

表 1 培养温度对花粉萌发率的影响(平均值 ± 标准差)
Table 1 Pollen germination percentage of *M. crassipes*, *M. calcicola* and their F₁ hybrid (hy01-11) under different temperatures (Means ± SD)

温度(℃) Temperature	花粉萌发率(%) Pollen germination percentage		
	紫花含笑 <i>M. crassipes</i>	灰岩含笑 <i>M. calcicola</i>	hy01-11
25	92 ± 0	94 ± 1	57 ± 6
30	80 ± 8	71 ± 8	48 ± 7
35	40 ± 15	56 ± 6	48 ± 9

2.2 培养时间对花粉萌发率的影响

新鲜花粉离体培养 1 h 后,个别花粉管开始凸出,2 h 后大部分花粉的花粉管长度超过花粉直径,6~8 h 后花粉萌发率趋于稳定,培养时间超过 8 h,花粉管过长,不利于花粉萌发率的统计。故以培养 8 h 作为亲本及其杂种 F₁ 代花粉萌发观察的时间。

2.3 蔗糖浓度对花粉萌发率的影响

亲本及其杂种 F₁ 代新鲜花粉萌发最适宜的蔗糖浓度存在一定差异。紫花含笑和灰岩含笑花粉萌发的最佳蔗糖浓度为 100 g/L,在此蔗糖浓度下萌发率均可达 90% 以上;大多数杂种 F₁ 代单株的花粉在蔗糖浓度为 100 g/L 和 150 g/L 的条件下萌发率较高,部分单株的花粉在 50 g/L 和 200 g/L 的蔗糖浓度下萌发较好。

以蒸馏水为对照的培养基中培养的花粉,仅见个

别花粉萌发,且花粉管很短。在 300 mg/L HBO₃ + 300 mg/L Ca(NO₃)₂ 无蔗糖的对照培养基中,花粉萌发数量明显增多,且花粉管较长。可见,HBO₃ 和 Ca(NO₃)₂ 能促进亲本及其杂种 F₁ 代花粉的花粉萌发和花粉管的伸长。

在 -20℃条件下贮藏一年的亲本紫花含笑和灰岩含笑花粉仍有较高的活力,花粉萌发率分别可达 37.34% 和 43.82%;编号为 hy01-6 和 hy01-11 的 2 个杂种 F₁ 代单株的新鲜花粉萌发率有差异(分别为 46% 和 69%),其花粉在 -20℃条件下贮藏一年后的萌发率明显下降,分别为 9.02% 和 37.11%。可见,亲本及部分杂种 F₁ 代植株的花粉可在 -20℃进行保存。

经 -20℃条件下贮藏一年的花粉与新鲜花粉适宜萌发的蔗糖浓度存在差异。紫花含笑、灰岩含笑的花粉 -20℃贮藏一年后,萌发的最佳蔗糖浓度均为 150 g/L,且在 100 g/L 蔗糖浓度下的萌发率(18.09% 和 28.98%)明显低于蔗糖浓度为 150 g/L 的萌发率(37.34% 和 43.82%),但二者的新鲜花粉在蔗糖浓度为 150 g/L 和 100 g/L 时萌发率差异不大。编号为 hy01-11 的杂种 F₁ 代单株的花粉在 -20℃贮藏一年后,在 150 g/L 与 100 g/L 蔗糖浓度下的萌发率没有差异;而编号为 hy01-6 的杂种 F₁ 代单株的花粉在 -20℃贮藏一年后,在 150 g/L 与 100 g/L 蔗糖浓度下的萌发率差异明显(表 2)。

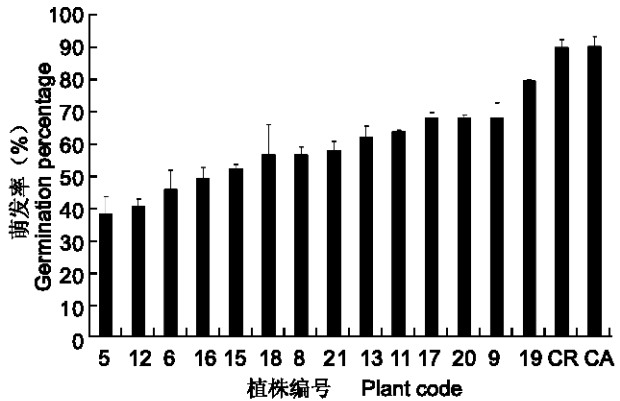
表 2 新鲜花粉与在 -20℃条件下贮藏一年的花粉萌发率比较
Table 2 Germination comparison of fresh pollen and the pollen stored under -20℃ for one year

植株编号 Plant code	花粉萌发率		Pollen germination (%)	
	新鲜花粉		-20℃贮藏花粉(1年)	
	100 g/L	150 g/L	100 g/L	150 g/L
紫花含笑 <i>M. crassipes</i> (CR)	89.82	92.55	18.09	37.34
灰岩含笑 <i>M. calcicola</i> (CA)	92.86	91.03	28.98	43.82
杂种 F ₁ 代(hy01-11)	71.55	69.59	37.11	36.45
杂种 F ₁ 代(hy01-6)	45.97	46.05	3.74	9.02

注: 100 g/L、150 g/L 为培养基中的蔗糖浓度。
Note: 100 g/L and 150 g/L mean sucrose concentration of the liquid media.

2.4 亲本及其杂种 F₁ 代的新鲜花粉活力比较
通过对亲本紫花含笑和灰岩含笑及其杂种 F₁

代的新鲜花粉活力进行测定,发现亲本花粉萌发率均在 90% 以上,表现出较高的花粉活力;杂种 F₁ 代花粉的萌发率从 38% 到 79% 不等,平均为 57.7%,其花粉活力均低于亲本(图 1)。杂种 F₁ 代花粉活力虽然低于亲本,但仍具有较高的可育性,可以采用杂种 F₁ 代开展含笑新品种定向培育的人工杂交育种研究。



CA: 灰岩含笑; CR: 紫花含笑; 数字代表杂种 F₁ 代编号。
CA: *M. calcicola*; CR: *M. crassipes*; The numbers mean serial number of the F₁ hybrids.

图 1 紫花含笑、灰岩含笑及其杂种 F₁ 代的花粉萌发率比较
Fig. 1 Comparison of pollen germination of *M. crassipes*, *M. calcicola* and their F₁ hybrids

在 25℃和适宜的蔗糖浓度条件下,花粉萌发 1~2 h 时,紫花含笑、灰岩含笑及其杂种 F₁ 代均有部分花粉出现两条花粉管的现象(图 2)。花粉管出现的方式多样,有的在花粉同一部位伸出两条花粉管(图 2: 2),有的则在临近部位或者相对的两极伸出两条花粉管(图 2: 1, 4),有的花粉管一条伸出后,另一条才伸出(图 2: 5),有的则两条花粉管同时伸出(图 2: 2, 3, 4, 6)。

3 讨论与结论

本实验结果表明,紫花含笑、灰岩含笑及杂种 F₁ 代新鲜花粉均具有较高的活力,这为改良其杂种 F₁ 代的观赏性状及含笑属观赏品种杂交育种提供了依据。观察表明,在栽培条件下紫花含笑、灰岩含笑及杂种 F₁ 代结实率很低,这可能与传粉昆虫缺失有关^[9-12],真实原因有待深入研究。

紫花含笑、灰岩含笑及其杂种 F₁ 代新鲜花粉萌发适宜的蔗糖浓度有一定差异,但亲本和多数杂种 F₁ 代单株的新鲜花粉在 100 g/L 和 150 g/L 蔗糖浓度下的萌发较好,这与杨琴军等^[13]对阔瓣含笑

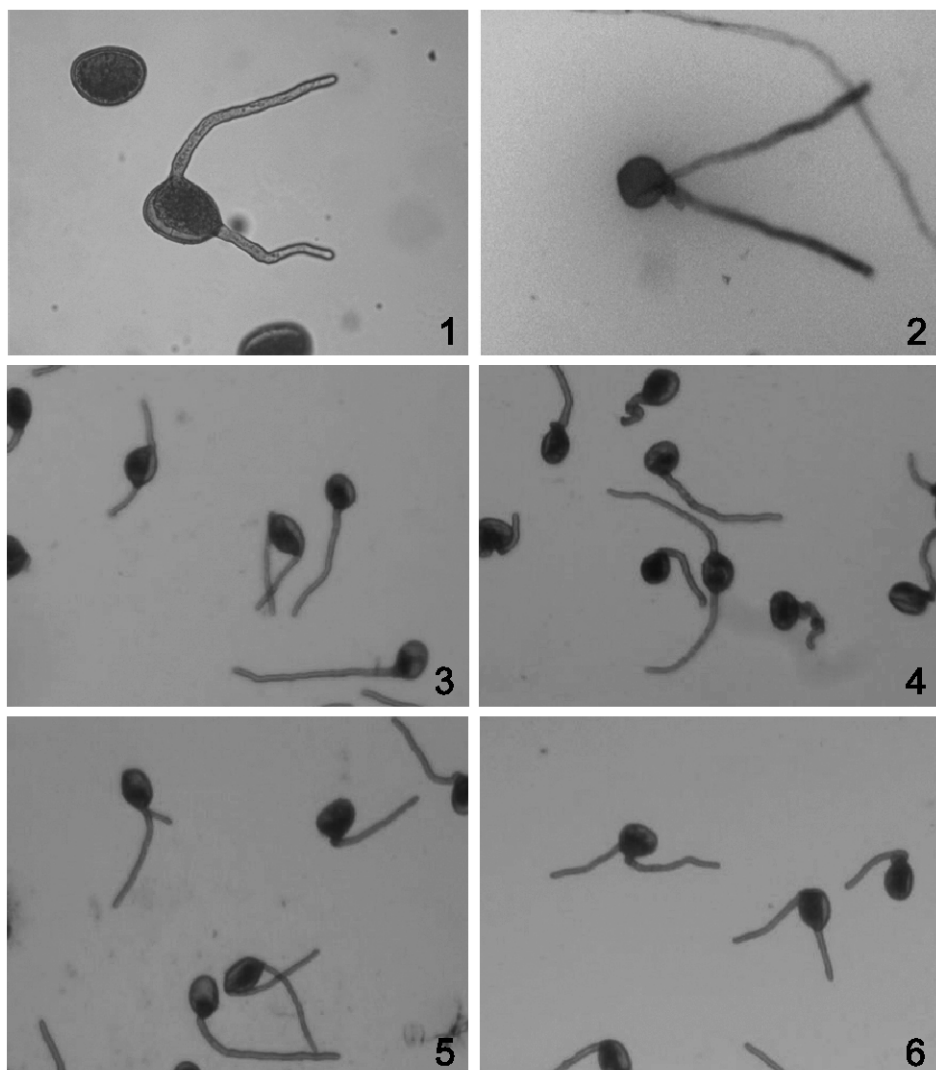


图2 紫花含笑、灰岩含笑及其杂种 F_1 代花粉离体萌发中的双萌发管现象
Fig. 2 Two-tube pollen found in *in-vitro* cultured pollen of *M. crassipes*,
M. calcicola and their F_1 hybrids

(*M. platypetala*)、平伐含笑(*M. cavaleriei*)和含笑(*M. figo*)以及胡冬南等^[14]对深山含笑(*M. maudiae*)和乐昌含笑(*M. chapensis*)的花粉萌发试验结果一致。因此,100 g/L 和 150 g/L 蔗糖浓度的培养基适宜多数含笑属植物花粉的萌发。经 -20°C 低温贮藏一年的花粉,其萌发的最佳蔗糖浓度与新鲜花粉有差别,且低温贮藏的花粉对蔗糖浓度的敏感性高于新鲜花粉。胡冬南等^[14]对深山含笑和乐昌含笑的研究也发现,新鲜花粉对萌发环境要求不高,而贮藏一段时间后的花粉其萌发率则因培养基中糖浓度的不同而有明显差异。由于木兰科植物的种间和属间杂交是亲和的^[15,16],在进行花期不遇的木兰科植物杂交试验时,可以采用低温贮藏的方法

保存可育花粉。

祁顺华、龚洵等在云南含笑(*M. yunnanensis*)、含笑、乐昌含笑、深山含笑、二乔木兰(*Magnolia × soulangeana*)的花粉离体培养中也曾发现有双花粉管现象^[17,18],因此,可以推测木兰科植物的花粉在离体培养条件出现双萌发管是较普遍的现象。紫花含笑、灰岩含笑及其杂种 F_1 代的花粉均具远极单萌发沟,花粉管可在萌发沟的任何位置萌发。但在研究云南含笑花粉在灰岩含笑柱头上萌发时,没有观察到一个花粉粒萌发出两条花粉管的现象^[18]。我们推测花粉离体萌发时,极性萌发环境的缺失可能是造成双萌发管出现的原因。关于木兰科植物花粉离体萌发中出现的双萌发管现象有待进一步深入

研究。

紫花含笑、灰岩含笑及其杂种F₁代花粉萌发的温度不能超过30℃,因此在含笑属植物杂交育种中,应注意杂交实验时的温度条件。杂种F₁代花粉萌发率低于父母本,且单株间有显著差异。在采用杂种F₁代开展杂交育种时,应选择那些花粉萌发率较高的植株采集花粉,这将有助于提高杂交结实率。

番红溶液对紫花含笑、灰岩含笑及其杂种F₁代的花粉染色效果较好。我们对大叶醉鱼草(*Buddleja davidii*)和板凳果(*Pachysandra axillaris*)的花粉染色的实验也发现,番红溶液对他们花粉均有很好的染色效果(尚未发表)。番红溶液染色并杀死花粉未见报道,仅在花粉粒永久制片制作中有番红染色花粉的记录^[19]。本研究观察到,番红处理能有效杀死紫花含笑、灰岩含笑及其杂种F₁代的花粉,有利于其花粉萌发率的统计。因此,对一些花粉、尤其是颜色较淡的花粉进行活力测定时,可采用番红溶液染色,终止花粉管生长,提高花粉萌发率统计的准确性。

参考文献:

- [1] 傅旭阳. 紫花含笑与钙土含笑杂种F₁代及云南拟单性木兰组织培养技术的研究[D]. 昆明: 昆明植物研究所, 2006.
- [2] 傅旭阳, 孙卫邦. 紫花含笑(♀)×钙土含笑(♂)杂种F₁代的离体繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 461-464.
- [3] 吉利, 赵兴峰, 孙卫邦. 紫花含笑(♀)与灰岩含笑(♂)及其杂种F₁代叶表皮微形态和叶结构的比较观察[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(1): 12-18.
- [4] 龚榜初, 洪月明, 吴士元, 吴连梅. 柿花粉生活力及雌花可授期[J]. 经济林研究, 2000, 18(1): 26-28.
- [5] 钟晓红. 李树授粉试验及其花粉生活力测定[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(2): 138-142.
- [6] 王四清, 陈俊愉. 菊花和几种其他菊科植物花粉的试管萌发[J]. 北京林业大学学报, 1993, 15(4): 56-60.
- [7] 李红星, 王卿, 王飞, 罗梦. 几种园林植物花粉生活力的鉴定[J]. 陕西林业科技, 2004(6): 5-9.
- [8] 王胜华, 陈放, 周开达. 水稻花粉的离体萌发[J]. 作物学报, 2000, 26(5): 609-613.
- [9] 龚洵, 武全安, 鲁元学, 张彦萍. 栽培红花山玉兰的传粉生物学[J]. 云南植物研究, 1998, 20(1): 89-93.
- [10] 王立龙, 王广林, 刘登义, 王兴明, 沈章军. 珍稀濒危植物小花木兰传粉生物学研究[J]. 生态学杂志, 2005, 24(8): 853-857.
- [11] 李火根, 曹晓明, 杨建. 2种鹅掌楸的开花习性与传粉媒介[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(4): 401-405.
- [12] 赖家业, 潘春柳, 覃文更, 韦国富. 珍稀濒危植物单性木兰传粉生态学研究[J]. 广西植物, 2007, 27(5): 736-740.
- [13] 杨琴军, 黄英平, 陈龙清. 3种含笑属植物花粉生活力的测定[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 15-17.
- [14] 胡冬南, 刘细燕, 杨光耀, 蒋鸟琴, 杨文. 木兰科含笑属深山含笑、乐昌含笑花粉技术的研究[J]. 江西农业大学学报: 自然科学版, 2002, 24(2): 237-239.
- [15] 龚洵, 潘跃芝, 杨志云. 木兰科植物的杂交亲和性[J]. 云南植物研究, 2001, 23(3): 339-344.
- [16] 王亚玲, 李勇, 张寿洲, 崔铁成, 巫锡良. 木兰科植物的人工杂交[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(6): 508-514.
- [17] 祁顺华. 云南含笑传粉生物学研究[D]. 昆明: 云南大学, 2000.
- [18] 龚洵, 张国莉, 潘跃芝. 云南含笑花粉萌发研究[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(4): 346-350.
- [19] 房玉玲, 秦明珠. 花粉粒永久制片的简易制作[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(6): 4.

(责任编辑: 张平)