

常春义, 郑奕雄, 吴华玲, 等. 细萼连蕊茶花粉生活力和贮藏力研究 [J]. 广东农业科学, 2018, 45(9): 28-32.

细萼连蕊茶花粉生活力和贮藏力研究

常春义^{1,2}, 郑奕雄², 吴华玲³, 崔永春^{1,2}, 伍嘉倩^{1,2},

曾森林^{1,2}, 李嘉美^{1,2}, 孙映波¹, 于波¹

(1. 广东省农业科学院环境园艺研究所 / 农业农村部华南都市农业重点实验室 /

广东省园林花卉种质创新综合利用重点实验室, 广东 广州 510640;

2. 仲恺农业工程学院农业与生物学院, 广东 广州 510225;

3. 广东省农业科学院茶叶研究所 / 广东省茶树资源创新利用重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 研究探索了碳源与温度对细萼连蕊茶 (*Camellia tsofui* Chien) 花粉萌发的影响, 以期利用该物种进行山茶杂交育种提供技术支持。采用培养基法, 研究了碳源种类 (蔗糖、乳糖、葡萄糖、麦芽糖和山梨醇)、浓度 (0.146~0.876 mol/L)、低温 (5~25℃) 或高温 (30~40℃) 处理以及低温 (-80℃) 贮藏对长柄山茶花粉萌发的影响。结果表明: 花粉在含有 0.292 mol/L 蔗糖的培养基中萌发率较高, 可达 20.07%。低温处理 (5~25℃) 对花粉萌发无不良影响, 但高温 ($\geq 30^\circ\text{C}$) 处理造成花粉萌发率显著降低。而经 35℃ 处理 6 h 后, 花粉萌发率显著下降至 3.17%。室温下自然干燥 24 h 后于 -80℃ 条件贮藏 12 个月, 花粉萌发率仍可达 11.54%。研究表明, 蔗糖是细萼连蕊茶花粉培养的适宜碳源; 高温 ($\geq 30^\circ\text{C}$) 不利于花粉萌发; 低温 (-80℃) 贮藏可在 1 年内维持花粉较高活力。

关键词: 细萼连蕊茶; 花粉; 萌发; 蔗糖; 低温

中图分类号: S685.14

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X (2018) 09-0028-05

Pollen vitality and storage capacity of *Camellia tsofui* Chien

CHANG Chun-yi^{1,2}, ZHENG Yi-xiong², WU Hua-ling³, CUI Yong-chun^{1,2}, WU Jia-qian^{1,2},

ZENG Miao-lin^{1,2}, LI Jia-mei^{1,2}, SUN Ying-bo¹, YU Bo¹,

(1. Environmental Horticulture Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Urban Agriculture in

South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangdong Key Laboratory of Ornamental Plant

Germplasm Innovation and Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510640, China;

2. College of Agriculture and Biology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

3. Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Key Laboratory of Tea Plant

Resources Innovation & Utilization Resources Innovation and Utilization, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This study explored the effects of carbon source and temperature on the pollen germination of *Camellia tsofui* Chien, in order to provide technical support for the cross breeding of this species. In this work, the effects of the types of carbon sources (sucrose, lactose, glucose, maltose and sorbitol), concentration (0.146~0.876 mol/L), low temperature (5~25℃) or high temperature (30~40℃) and low temperature (-80℃) storage on pollen germination of *C. longipetiolata* were studied by culture medium method. Pollen germination rate was higher in

收稿日期: 2018-06-04

基金项目: 广州市科技计划项目 (201604020031, 201506010018); 广东省科技计划项目 (2017A070702008); 农业农村部华南都市农业重点实验室开放课题 (2014hhlm006); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-19)

作者简介: 常春义 (1994-), 男, 在读本科生, E-mail: 1813160128@qq.com

通讯作者: 于波 (1977-), 男, 博士, 副研究员, E-mail: yubo423@163.com

medium containing 0.292 mol/L sucrose or lactose, up to 20.07% respectively. Low temperature (5~25℃) had no bad effect on pollen germination, but the germination rate of pollen decreased significantly at high temperature ($\geq 30^{\circ}\text{C}$). After 6 h treatment at 35℃, the pollen germination rate dropped to 3.17%. Up to 11.54% germination rate was still observed in pollen after 12 months storage under -80℃. The results show that the suitable carbon source of sucrose or lactose long stalk *Camellia* pollen culture; high temperature ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) can seriously inhibit the germination of pollen; low temperature (-80℃) storage can maintain the high vitality of pollen within 1 years.

Key words: *Camellia tsofui*; pollen; germination; sucrose; low temperature

细萼连蕊茶 (*Camellia tsofui* Chien) 为山茶科山茶属连蕊茶组灌木, 产于我国湖南、江西和四川^[1], 树形紧凑, 嫩叶红色, 花小而密集, 花瓣背面略带粉红色, 芳香, 可观形观花观叶, 可作花境、花坛、丛林及芳香类应用, 具有很高的观赏和园林应用价值^[2]。目前, 国际登录的茶花 (*C. japonica*) 通常花型较大, 重瓣较多、色泽浓艳, 树形壮硕挺拔, 叶片硬实浓绿, 但极少品种具有浓郁香气。而连蕊茶组植物 (Sect. *Theopsis* Coh. St.) 虽然花朵单瓣、花径较小、色泽多为白色, 叶片较小较薄, 树枝较细偏软, 但花量大, 花朵密集, 多数种类具芳香气味, 且大多数物种分布于我国境内。因此, 利用这些芳香型连蕊茶物种资源与茶花品种进行种间杂交, 充分利用杂种优势改良传统茶花, 实现优势性状互补, 培育具有芳香气味的优良茶花新品种是今后茶花育种的重要发展方向。目前, 只有少数连蕊茶物种被引种驯化并用于茶花人工杂交育种, 包括细萼连蕊茶在内的大多数连蕊茶还未见系统应用于茶花育种研究。

了解连蕊茶花粉生活力和贮藏力的状况, 能够更好地指导杂交育种工作, 解决因花期不育、异地授粉而带来的授粉困难。目前, 已有川鄂连蕊茶和毛柄连蕊茶的花粉低温贮藏的研究报道^[3-4], 但迄今为止未见细萼连蕊茶等其他连蕊茶组植物花粉生活力和低温贮藏的研究报道。本研究以采自浙江金华的细萼连蕊茶花粉为试材, 对其进行了花粉低温贮藏力和生活力研究, 旨在为今后开展细萼连蕊茶与山茶物种间杂交育种提供重要技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2017年1月从浙江金华国际山茶物种园采集即将开放且尚未散粉的细萼连蕊茶花蕾。试验在广东省园林花卉种质创新综合利用重点实

验室进行。将采回的花蕾置于25 (± 1)℃恒温下干燥处理12 h。待花药打开散粉时, 收集花粉。先用镊子将散粉的花药轻轻取下, 放在纸片上, 于25 (± 1)℃恒温下干燥处放置24 h。然后将花粉连同花药壳一起分装到1.5 mL冻存管中, 拧紧管盖, 置于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2 花粉生活力测定

1.2.1 花粉萌发适宜碳源测定 以无糖为对照, 分别将含有 0.292 mol/L 的糖即蔗糖 (100.0 g/L)、麦芽糖 (105.2 g/L)、葡萄糖 (52.6 g/L)、乳糖 (100.0 g/L) 和山梨醇 (52.6 g/L) 等 5 种固体培养基 (8 g/L 琼脂, pH 5.5 ~ 6.0) 处理滴于载玻片上, 用无菌牙签将新鲜花粉均匀涂布在固体培养基表面。将载玻片置于放有湿润滤纸的培养盒内, 然后将培养盒装入塑料自封袋密封, 置于 25 (± 1)℃ 的生化培养箱内, 培养 24 h 后, 于 ZEISS 正置显微镜下观察统计花粉的萌发率, 以确定花粉萌发的最适碳源。

1.2.2 花粉萌发适宜蔗糖浓度测定 设计 5 种蔗糖浓度处理, 分别为 0.000、0.146、0.292、0.584、0.876 mol/L, pH 5.5 ~ 6.0。培养 24 h 后, 于显微镜下观察并统计花粉萌发率, 以确定适合细萼连蕊茶花粉萌发的最佳糖源浓度。

1.2.3 低温或高温对花粉萌发效应的测定 模拟华南地区冬春季温度, 将花粉培养分为两个阶段, 第一阶段设置 7 个温度梯度处理, 分别为 5、15、20、25、30、35、40℃, 进行 6 h 培养处理, 模拟夜间低温或中午高温, 然后转移至 25 (± 1)℃ 条件下恢复培养 18 h, 于 ZEISS 正置显微镜下观察并统计花粉萌发率, 以测试冬季低温和春季高温对细萼连蕊茶花粉萌发的影响。上述试验培养基为 100 g/L 蔗糖, pH 5.5 ~ 6.0。

统计花粉萌发率时, 每个处理重复 3 次,

每个重复观测 100 粒花粉以上。花粉管长度大于花粉粒直径作为萌发标准。计算方法为：

花粉萌发率 (%) = $\frac{\text{萌发花粉数}}{\text{花粉总数}} \times 100$

1.3 花粉低温贮藏力测定

将花粉置于 -80℃ 条件下保存，分别贮藏 0、3、6、12 个月，取低温处理的花粉按上述 1.2 探索得到的最适宜条件进行萌发率测定。

1.4 显微观察

花粉萌发观察采用 ZEISS 正置显微镜 (Axio Scope A1, 德国)。使用 AxioVision 软件进行图像捕捉和保存。

试验数据使用 SAS V8.02 软件进行分析，采用 Duncan's 多重比较法进行差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 不同碳源处理花粉萌发率比较

本试验研究了浓度为 0.292 mol/L (即 100 g/L 蔗糖当量) 的不同碳源处理对细萼连蕊茶花粉萌发率的影响，调查观察结果见表 1 和图 1 (封二)。结果表明，以蔗糖和乳糖为碳源处理的花粉萌发率最高，分别为 20.07% 和 19.48%，与其他处理相比差异极显著；葡萄糖处理次之，为 14.42%，与无糖对照差异极显著；山梨醇处理的萌发率为 7.90%，与无糖对照相当；麦芽糖处理的萌发率最低，仅为 4.48%，低于无糖对照且差异显著。

表 1 碳源对细萼连蕊茶花粉萌发的影响

处理	碳源	萌发率 (%)
A ₁	蔗糖	20.07 ± 1.86 aA
A ₄	乳糖	19.48 ± 1.64 aA
A ₃	葡萄糖	14.42 ± 2.16 bB
A ₅	山梨醇	7.90 ± 2.03 cC
A ₆ (CK)	无糖	7.96 ± 1.67 cC
A ₂	麦芽糖	4.48 ± 1.41 dC

注：同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著，大写英文字母不同者表示差异极显著，表 2~ 表 4 同。

2.2 不同浓度蔗糖处理花粉萌发率比较

本试验还研究了培养基中蔗糖 5 个浓度梯度处理对细萼连蕊茶花粉萌发率的影响，结果见表 2 和图 2 (封二)。结果表明，当培养基中含有 0.292 mol/L 蔗糖时，花粉萌发率最高，

达 20.07%；随着蔗糖浓度降低或升高，花粉萌发率呈现逐渐递降趋势。当蔗糖浓度处理为 0.146 mol/L 时，花粉萌发率为 16.08%；当蔗糖浓度处理为 0.000 时，花粉萌发率降为 7.96%；当蔗糖浓度处理为 0.584 mol/L 时，花粉萌发率降为 13.76%；当蔗糖浓度处理升高到 0.876 mol/L 时，萌发率仅为 3.55%，反映出高浓度蔗糖同样对花粉萌发产生明显的抑制效应。

表 2 蔗糖浓度对细萼连蕊茶花粉萌发的影响

处理	蔗糖浓度 (mol/L)	萌发率 (%)
B ₁	0.000	7.96 ± 1.67 c
B ₂	0.146	16.08 ± 1.68 b
B ₃	0.292	20.07 ± 1.86 a
B ₄	0.584	13.76 ± 2.11 b
B ₅	0.876	3.55 ± 2.06 d

2.3 低温或高温对花粉萌发的影响

本试验模拟华南地区冬春季温度，对花粉培养分为两个阶段，研究第一阶段的高温或低温对细萼连蕊茶花粉萌发率的影响，结果见表 3 和图 3 (封二)。结果表明，将花粉置于 5、15、20、25℃ 环境下培养 6 h，再恢复培养 18 h，花粉萌发率较高，分别为 20.17%、20.21%、20.22%、20.07%，各低温处理之间差异不显著。随着第一阶段处理温度的升高，花粉萌发率显著降低，当处理温度为 30℃ 时，花粉萌发率降为 14.30%；当处理温度升高到 35℃ 时，花粉萌发率进一步降低，仅为 3.17%；当处理温度升高到 40℃ 时，花粉完全没有萌发。

表 3 温度对细萼连蕊茶花粉萌发的影响

处理	处理温度 (℃)	萌发率 (%)
C ₁	5	20.17 ± 1.92 a
C ₂	15	20.21 ± 2.08 a
C ₃	20	20.22 ± 2.02 a
C ₄	25	20.07 ± 1.86 a
C ₅	30	14.30 ± 2.02 b
C ₆	35	3.17 ± 1.88 c
C ₇	40	0.00 ± 0.00d

2.4 花粉低温贮藏力测定

花粉 -80℃ 低温贮藏试验结果 (表 4) 显

示花粉保存前萌发率为 20.07%；贮藏 3 个月，萌发率为 20.33%；随着贮藏时间延长，花粉萌发率有所下降，贮藏 9 个月，花粉萌发率降为 15.43%；贮藏 12 个月，花粉萌发率虽然继续下降，但仍然可达 11.54%。

表 4 -80℃贮藏细萼连蕊茶花粉萌发率

处理	贮藏时间(月)	萌发率(%)
D ₁	0	20.07 ± 1.86 a
D ₂	3	20.33 ± 1.61 a
D ₃	6	15.43 ± 1.48 b
D ₄	12	11.54 ± 1.33 c

3 结论与讨论

花粉萌发时需要能量物质，花粉自身会贮藏一些淀粉等糖类物质，这些物质能够促进花粉在适宜条件下启动萌发。随着花粉管的伸长，外源的糖类物质将会影响花粉管生长。花粉培养使用较为普遍的是蔗糖。前人相似的研究结果表明，蔗糖比果糖和甘露醇更能促进櫻桃花粉的萌发^[5]；在野生龙蒿萌发试验中，蔗糖优于麦芽糖和葡萄糖^[6]。但也有不同结论，陈暄等对茶树花粉萌发的研究表明，麦芽糖优于蔗糖^[7]；安国宁等对桃树花粉萌发的研究则发现，葡萄糖优于蔗糖^[8]；许珂等对金银忍冬花粉萌发的研究则表明，乳糖优于葡萄糖、蔗糖和果糖^[9]。因此，在进行某个物种花粉培养时，要先试验才能确定适宜的碳源。本研究结果表明，蔗糖与乳糖能较好地促进细萼连蕊茶花粉萌发，效果较佳；葡萄糖 0.292 mol/L 促进花粉萌发效果次之；无糖或山梨醇再次之；麦芽糖最差。值得注意的是，山梨醇 0.292 mol/L 处理促进花粉萌发的效果与无糖处理差异不显著，表明作为碳源的山梨醇在此浓度下对花粉萌发促进效果不明显；麦芽糖 0.292 mol/L 处理培养基上的花粉萌发率不及无糖处理，说明麦芽糖在此浓度下对花粉萌发不仅不具有促进作用，还具有明显的抑制作用。

蔗糖不仅提供花粉萌发和花粉管生长所需的能量，同时也能够维持细胞内外渗透压。

前人研究结果表明，山茶属多个物种如连蕊茶^[3-4]、油茶^[10-11]、红山茶^[12-15]、金花茶^[16]、茶树^[7, 17]的花粉体外萌发所需适宜蔗糖浓度为 0.146 ~ 0.584 mol/L，如川鄂连蕊茶为 0.584 mol/L，毛柄连蕊茶为 0.292 mol/L。本研究结果表明，细萼连蕊茶花粉体外萌发所需适宜蔗糖浓度为 0.292 mol/L，因此，进行连蕊茶组物种的花粉培养试验时，也要先试验适宜的糖浓度。

温度对花粉萌发至关重要。通常，许多植物花粉萌发的适宜温度为 20~28℃^[16-18]；但一些植物花粉适宜萌发温度较高，达 30℃^[19-20]；而另外有的植物花粉萌发适宜温度较低，仅为 10℃^[21]，超过适宜温度范围，花粉萌发就会受到不同程度的抑制。本研究模拟华南地区冬春季温度，对花粉培养分为两个阶段，第一阶段设置了 7 个温度梯度处理，培养 6 h 后再转移至 25℃ 恢复培养，主要目的是为了研究第一阶段的高温或低温对细萼连蕊茶花粉萌发率的影响。本研究结果表明，第一阶段 5 ~ 25℃ 的培养，花粉萌发率较高且差异不显著，表明低温对花粉萌发率没有不良影响。而第一阶段 30 ~ 40℃ 的培养，花粉萌发率明显降低，尤其超过 40℃，花粉完全不能正常萌发。因此，在华南地区冬季、春季进行茶花杂交授粉时，不用担心夜间低温对花粉的影响；而是要充分考虑中午高温对花粉萌发的影响。

花粉保存可分为冷藏（4 ~ 5℃）、低温（-20 ~ -80℃）和超低温（-196℃液氮）保存等几种方式。一般来说，冷藏保存可短期内保持花粉活力^[3]；低温保存可较长时间保持花粉活力^[22-23]；超低温保持可长期保持花粉活力^[24]，但成本较高。本研究，在 -80℃ 保存 1 年后，细萼连蕊茶的花粉萌发率仍然达到 10% 以上，可以解决花期不遇的问题，满足杂交授粉对花粉活力的需求。

参考文献：

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 172.
- [2] 倪穗, 李纪元. 我国连蕊茶组植物资源及其园

- 林应用前景[J]. 浙江林业科技, 2005, 25(5): 70-73.
- [3] 许林, 杜克兵, 陈法志, 等. 川鄂连蕊茶花粉的形态、生活力及贮藏力研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(11): 1857-1862.
- [4] 唐前瑞, 陈友云. 连蕊茶花粉发芽适宜培养基的探讨[J]. 湖南林业科技, 2004(1): 30-32.
- [5] 魏国芹, 孙玉刚, 安森, 等. 甜樱桃 7 个品种花粉数量及花粉萌芽率测定[J]. 华北农学报, 2010, 25(S2): 123-127.
- [6] 秦勇. 野生龙蒿花粉生活力测定及其主要影响因子 // 中国园艺学会第七届青年学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国园艺学会, 2006.
- [7] 陈暄, 彭英, 郝姍, 等. 茶树花粉的离体萌发研究[J]. 江苏农业科学, 2010, 38(6): 233-235.
- [8] 安国宁, 李军, 高洪卫, 等. 培养基组分对桃树花粉发芽率的影响[J]. 山东农业科学, 2004, 36(3): 39-40.
- [9] 许珂, 古松, 江莎. 金银忍冬花粉离体萌发初探[J]. 热带亚热带植物学报, 2008(2): 109-115.
- [10] 何春燕, 谭晓风, 袁德义, 等. 7 种油茶花粉数量及花粉萌发率的测定[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(1): 74-78.
- [11] 蔡坚, 刘晓飞, 刘喻娟, 等. 油茶花期观察及花粉萌发率影响因素研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(23): 72-75.
- [12] 刘玉玲, 潘文, 张方秋, 等. 杜鹃红山茶花粉保存及其生活力测定[J]. 广东林业科技, 2010, 26(2): 1-6.
- [13] 李天菲, 林田, 徐碧玉, 等. 杜鹃红山茶花粉萌发力及贮藏耐性的研究[J]. 生物技术通报, 2008(S1): 239-243.
- [14] 叶欣, 谢云, 茹华莎. 浙江红山茶花粉萌发与贮藏特性研究[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(1): 103-106, 129.
- [15] 张涛, 黄敏. 蔗糖和 PEG 对山茶花粉离体萌发的影响[J]. 北方园艺, 2009(1): 101-102.
- [16] 张佩霞, 于波, 陈金峰, 等. 金花茶花粉离体萌发及低温处理探究[J]. 西部林业科学, 2016, 45(2): 94-97.
- [17] 刘学良, 姚俊修, 吴海涛, 等. 接骨木花粉活力测定、培养基筛选及贮藏研究[J]. 山东农业科学, 2018, 50(3): 129-131.
- [18] 秦瑶, 董书言, 高婷, 等. 凤丹白牡丹花粉活力测定[J]. 黑龙江农业科学, 2018(4): 96-98.
- [19] 曹明华, 杨俊杰, 苏金强, 等. 天宝野生蕉花粉活力快速检测方法筛选[J]. 福建热作科技, 2018, 43(2): 15-17.
- [20] 范婷婷, 郭臻昊, 傅华君, 等. 翠竹花粉的活力及储藏效果研究[J]. 林业科学研究, 2018, 31(3): 180-185.
- [21] 李颖岳, 续九如, 史良, 等. 台湾青枣不同品种花粉萌发和生活力测定[J]. 果树学报, 2005(6): 132-134.
- [22] 谭莎, 洪文泓, 黄永芳, 等. 金花茶花粉贮藏特性[J]. 福建林业科技, 2016, 43(4): 139-141.
- [23] 周兴文, 杨乐, 黄肇宇, 等. 崇左金花茶花粉萌发及在不同贮藏条件下活力变化的研究[J]. 浙江林业科技, 2017, 37(3): 28-31.
- [24] 常维霞, 姚小华, 龙伟. 普通油茶花粉的超低温保存研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(6): 66-70.

(责任编辑 杨贤智)