

苏铁属花粉萌发及保存条件研究

杨泉光^{1,2}, 李楠^{1*}, 李志刚², 林平义¹, 罗斌¹

(1. 深圳市仙湖植物园 国家苏铁种质资源保护中心, 广东 深圳 518004; 2. 广西大学 农学院, 南宁 530005)

摘要: 以不同浓度梯度的蔗糖与硼酸组合在不同 pH 条件下用悬浮培养法测定德保苏铁、叉叶苏铁、元江苏铁和越南篔齿苏铁花粉的活力; 将元江苏铁和越南篔齿苏铁花粉分别保存在不同低温、不同湿度的环境中, 研究温度和湿度对保存花粉的影响。结果表明: (1) 最适合苏铁属植物花粉萌发的培养液配方为蔗糖(1%~2.5%) + 硼酸(100~500 mg/L), pH6.0~7.0; (2) 在室温下, 将苏铁花粉密封保存在有干燥剂的容器中, 可存活 30 d 以上; (3) 在 0 °C 条件下, 不加干燥剂, 花粉可保存 4 个月以上; (4) 用液氮保存后的越南篔齿苏铁花粉进行人工授粉, 结实率高达 90.3%, 与用新鲜花粉人工授粉的结实率无明显差异; (5) 将花粉含水率降低到 15.5%~13.2% 后, 能在液氮中进行长期保存, 表明花粉液氮保存可以作为苏铁花粉长期和超长期保存的方法。

关键词: 苏铁; 花粉; 萌发; 保存条件

中图分类号: Q945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0673-05

Studies on pollen germination and storage of *Cycas* species

YANG Quan-Guang^{1,2}, LI Nan^{1*}, LI Zhi-Gang², LIN Ping-Yi¹, LUO Bin¹

(1. National Cycad Conservation center, Shenzhen FairyLake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Pollen suspension culture was conducted under combinational conditions of different grades of pH and concentrations of sucrose and boric acid to estimate pollen viability of *Cycas debaoensis*, *C. bifida*, *C. parvulus*, *C. elongata*. Pollen viability of *C. parvulus* and *C. elongata* was also estimated after being stored in different temperature and humidity conditions. The results showed that: (1) the optimal medium for the germination of those cycad's pollen was compose of 1% - 2.5% sucrose + 100 - 500 mg/L boric acid and pH was in the range of 6.5 - 7.0; (2) the pollen stored in a sealed container with desiccant in room temperature was viable up to one month; (3) the pollen being stored under 0 °C in a container without desiccant could kept its viability over 4 months; (4) through artificial pollination, the seed setting rate of *C. elongata* could be up to 90.3% by using liquid nitrogen stored pollen, which is no remarkable difference to those of using fresh pollen; (5) the pollen of *C. elongata*, after stored in liquid nitrogen for period of time, did not show significant loss of viability after dried to 13.2% - 15.5% of water content and the results indicated that stored in liquid nitrogen can be used as a long term storage measure for cycad pollen.

Key words: *Cycas*; pollen; germination; storage condition

通过人工授粉能大大提高结实率及种子的可育率(Kiem, 1972; Tang, 1986a)。但由于雄花开花早于雌花, 所以测定花粉活力, 并通过花粉保存, 进行

人工授粉, 对苏铁繁殖和保护有重要意义。有关苏铁类植物花粉保存的相关报道较少。Chamberlain (1926)报道角果铁属(*Ceratozamia* sp.)的花粉在

收稿日期: 2008-01-10 修回日期: 2009-01-15

基金项目: 国家林业局专项基金(2006 野生植物保护)[Supported by National Forestry Bureau of China(2006)]

作者简介: 杨泉光(1982-), 男, 广西南宁市人, 硕士研究生, 主要研究方向为植物生理生态, (E-mail)yqgsunny@tom.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail:liandrea1963@yahoo.com.cn)

自然条件下最多能存活1个月, Tang(1986b)指出将苏铁花粉放进有硅胶的玻璃瓶, 然后保存在家用冰箱里, 一年后花粉仍有部分活力。Osborne等(1992)等研究了温度、湿度和气体成分对保存非洲铁属(*Encephalartos*)花粉保存的影响。国内迄今未见苏铁花粉保存的报道。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

实验材料为德保苏铁(*Cycas debaoensis*)、叉叶苏铁(*C. micholitzii*)、元江苏铁(*C. parvulus*)和越南篦齿苏铁(*C. elongata*)的花粉, 2007年4~7月在深圳市仙湖植物园国家苏铁种质资源保护中心收集。

1.2 花粉生活力检测

本实验采用悬浮培养方法来摸索苏铁花粉的最适萌发条件, 培养液成分为蔗糖和硼酸, 配制的蔗糖浓度分别为: 0%、1%、2.5%、5%、10%、15%、20%, 硼酸浓度分别为: 0、50、100、500、1 000 mg/L, pH分别为: 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5。将配好的培养液用玻棒蘸取滴到有凹槽的载玻片上, 用牙签取花粉均匀撒在液滴上, 把载玻片放进垫有湿滤纸的培养皿里, 再放进30℃的恒温箱中避光培养, 24 h后在20倍显微镜(德国 Carl Zeiss 公司生产)下观察, 随机取6个视野统计其萌发率(花粉管长度为花粉直径2倍以上视为花粉萌发), 最后求平均值(花粉萌发率=萌发花粉数/花粉总数×100%)。

1.3 花粉保存实验设计

1.3.1 室温保存 将新鲜花粉分别装进两个叠好的纸袋内, 然后将其中的一袋放进无硅胶的容器中, 另一袋放进装有硅胶的容器中, 放在室温条件下保存, 每隔5 d或7 d测1次萌发率。

1.3.2 冰箱保存 取两份新鲜花粉分别装进两个纸袋内, 其中一份装进无硅胶的容器后放进0℃冰箱中保存, 另一份装进有硅胶的容器后放进同一个冰箱中保存, 每隔5 d或7 d测1次萌发率。

1.3.3 液氮保存 (1)花粉干燥预处理: 室温下, 将花粉分成若干份称鲜重(Wf), 分装在叠好的锡纸盒中(7 cm×5 cm×0.8 cm), 然后放进有硅胶的干燥器(其中硅胶1.03 kg, 干燥器容积10 L)里脱水, 脱水期间用玻棒搅动花粉几次, 以后每隔6 h, 称取脱水后重量, 另取一份(鲜质量Wf')于烘箱内, 在105℃温度下干燥48 h至恒质量(Wd), 以此数据换算

各组干燥脱水后的花粉含水量。(2)保存实验处理: 将不同含水量的花粉盛入指形管(指形管盖打小孔以免从液氮取出时发生爆炸), 然后用锡纸包住, 拴上细绳(以便从液氮罐中取出), 最后投入液氮中, 保存一星期后测定花粉萌发率。以上用于保存花粉的器具均经过高压蒸汽灭菌, 计算花粉萌发率的方法均与培养花粉时的计算方法相同, 文中所提到的室温为25~30℃。

1.4 人工授粉实验

2007年7月22日至2007年8月1日分别用液氮保存了24 h的越南篦齿苏铁(*C. elongata*)花粉和新鲜越南篦齿苏铁花粉进行人工授粉, 每处理3株, 每株授粉2次。大孢子叶张开之前的一星期左右, 用无纺布将雌球花与外界隔离, 每次人工授粉之后立即将球花包好, 另外, 选取3株雌株, 在大孢子叶张开之前用无纺布将整个球花包住, 直至授粉期过后再揭开无纺布, 以作对照。2个月左右观察结实情况并照相, 种子成熟后采收种子, 统计结实率(结实率=种子数/胚珠数×100%)

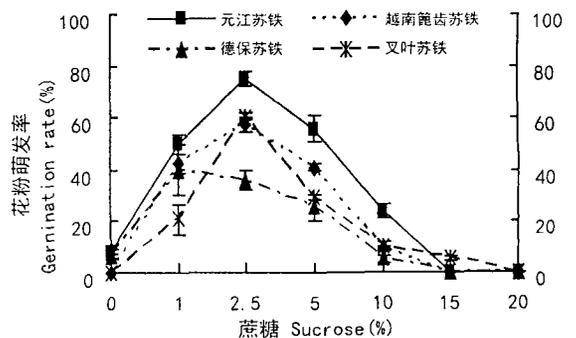


图1 蔗糖浓度对花粉萌发率的影响

Fig. 1 Effect of sucrose concentration on the germinability of *Cycas* pollen

2 结果与分析

2.1 不同培养条件对花粉萌发的影响

2.1.1 不同蔗糖浓度对花粉萌发的影响 在硼酸浓度为100 mg/L, 蔗糖浓度分别0%、1%、2.5%、5%、10%、15%、20%, pH6.8的培养液中, 培养24 h后, 显微镜观察, 统计萌发率(图1)。由图1可知, 元江苏铁、越南篦齿苏铁和叉叶苏铁的花粉萌发率达到最大值时的蔗糖浓度为2.5%, 而德保苏铁的花粉萌发率在蔗糖浓度为1%时达到最大值。

2.1.2 不同硼酸浓度对花粉萌发的影响 在蔗糖浓度为2.5%, 硼酸浓度分别为: 0、50、100、500、1 000

mg/L, pH 6.8 的培养液中, 培养 24 h 后, 显微镜观察, 统计萌发率(图 2)。由图 2 可知, 除元江苏铁花粉萌发在硼酸浓度为 500 mg/L 达到峰值外, 其余 3 种苏铁花粉均在硼酸浓度为 100 mg/L 达到萌发峰值。

2.1.3 不同 pH 对花粉萌发的影响 在蔗糖和硼酸浓度分别为 2.5% 和 100 mg/L, pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的培养液中, 培养 24 h 后, 显微镜观察, 统计萌发率(图 3)。由图 3 可知, pH 为 6.5 时最适合越南篔齿苏铁和叉叶苏铁的花粉萌发, pH 为 7.0 时最适合元江苏铁和德保苏铁花粉萌发。

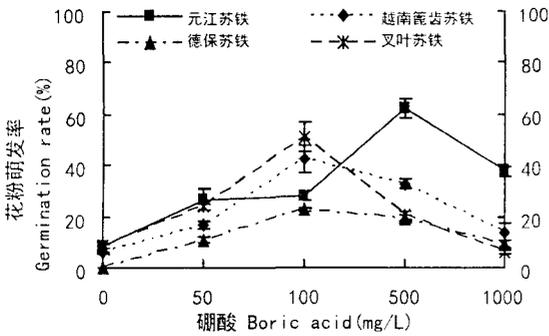


图 2 硼酸浓度对花粉萌发率的影响

Fig. 2 Effect of boric acid on the germinability of *Cycas* pollen

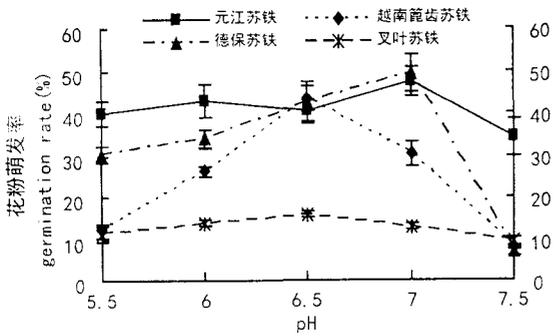


图 3 pH 对花粉萌发率的影响

Fig. 3 Effect of pH on the germinability of *Cycas* pollen

2.2 花粉保存

2.2.1 干燥剂对花粉寿命的影响 (1) 室温保存: 每隔 5 d 或 7 d, 将分别保存在有干燥剂和无干燥剂容器中的花粉取出测萌发率(图 4、5)。由图 4、5 可知, 在室温条件下将花粉保存在有硅胶的容器中能延长花粉的寿命, 在无硅胶情况下, 花粉保存 21 d 即无花粉萌发, 而在有硅胶情况下保存花粉, 42 d 后仍有 14.43% 萌发。(2) 低温保存: 每隔 5 d 或 7 d, 将分别保存在有干燥剂和无干燥剂容器中的花粉从 0 °C 冰箱中取出测萌发率(图 6、7)。由图 6、7 可知, 花粉在 0 °C 冰箱中, 对于是否密封于有硅胶的容

器, 其花粉萌发变化相差不大, 萌发率都较高, 其中元江苏铁花粉保存了 42 d 后, 萌发率仍高达 65% 以上。

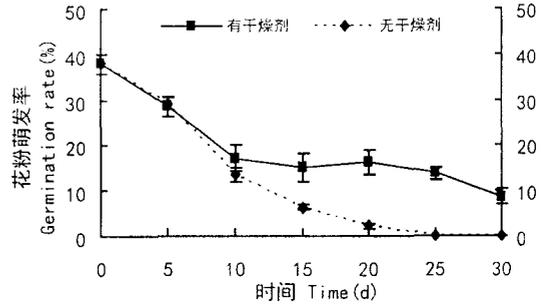


图 4 室温下水分对保存元江苏铁花粉萌发率的影响
Fig. 4 Effect of storage humidity on the germinability of *Cycas parvulus* at room temperature

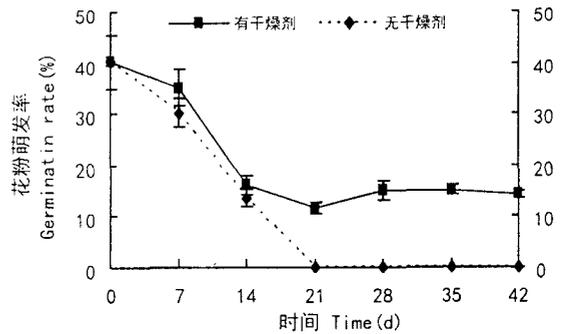


图 5 室温下水分对保存越南篔齿苏铁花粉萌发率的影响

Fig. 5 Effect of storage humidity on the germinability of *Cycas elongata* at room temperature

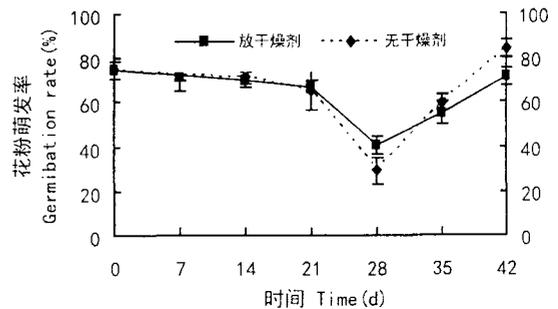


图 6 0 °C 条件下水分对保存元江苏铁花粉萌发率的影响
Fig. 6 Effect of storage humidity on the germinability of *Cycas parvulus* at 0 °C

2.2.2 保存温度对花粉寿命的影响 将图 4、5 与图 6、7 比较可以看出, 花粉在 0 °C 冰箱中保存的存活时间比在放室温条件下的存活时间长。花粉在 0 °C 冰箱中保存 42 d 后, 萌发率下降不多。

2.2.3 不同花粉含水率对液氮保存花粉的影响 将经过不同干燥时间处理的花粉放进液氮中保存一星

期,然后取出测花粉萌发率(图 8)。由图 8 可知,经过干燥预处理的花粉放进液氮中保存,其萌发率明显比不经过干燥而直接投入液氮的高。将越南篔齿苏铁花粉含水率减少至 15% 以下后,放进液氮中保存,其萌发率几乎与初始萌发率一样。

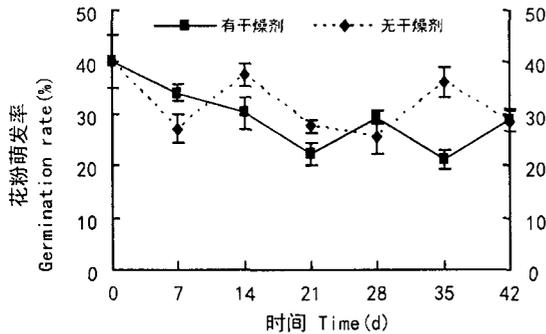


图 7 0 °C 条件下水分对保存越南篔齿苏铁花粉萌发率的影响

Fig. 7 Effect of storage humidity on the germinability of *Cycas elongata* at 0 °C

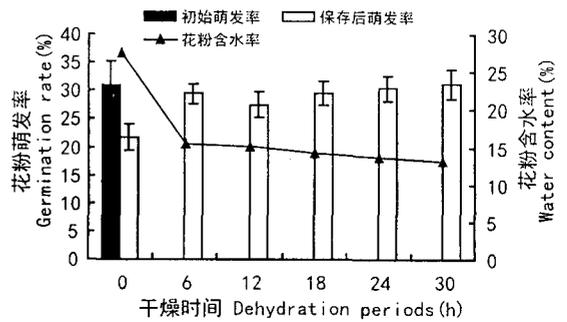


图 8 水分对液氮保存越南篔齿苏铁花粉萌发率的影响
Fig. 8 Effect of moisture on the germinability of *Cycas elongata* pollen after storing in liquid nitrogen

2.3 人工授粉

2007 年 9 月 28 日初步观察结实情况(图版 I: 1、2、3),用液氮保存后的花粉进行人工授粉结实情况与新鲜花粉授粉的结实无明显差别。2007 年 12 月 15 日采收种子,统计结实率(表 1),从表 1 可以看出分别用液氮保存的花粉和新鲜花粉人工授粉的



图版 I 液氮保存后的花粉与新鲜花粉人工授粉的结实情况 1. 液氮保存花粉后人工授粉; 2. 新鲜花粉人工授粉; 3. 无纺布遮盖排除风和昆虫传粉。

Plate I Seed set after conducting hand-pollinating to different female cones by using cryostored pollen and fresh pollen respectively 1. Hand pollinated by using cryostored pollen; 2. Hand pollinated by using fresh pollen; 3. Excluding both air-borne and insects by covering cone with non-woven.

平均结实率都在 90% 以上,远比对照株结实率高,经过方差分析,两者的结实率差异不显著。

在进行花粉培养和保存实验时,出现同一种苏铁花粉的初始萌发率有差异(图 4、6)。同是元江苏铁,但花粉初始萌发率相差较大,主要是因为实验时分不同批次收集花粉,所以初始萌发率有差异,这并不影响实验结果。

3 结论与讨论

上述结果表明,四种苏铁花粉培养液中,适合的蔗糖浓度比较低,为 1%~5%,据 Osborn 等(1992)报道, *Encerphalartos woodii* 花粉培养的最适蔗糖

浓度为 10%,Burke 等(2002)等培养棉花花粉所需的蔗糖浓度为 25%。本研究四种苏铁属植物花粉在蔗糖浓度为 10% 以上的培养液中萌发率极低,甚至无萌发。另外,James 等(1963)对 39 科的 86 种植物花粉的研究表明,钙离子在花粉萌发和花粉管伸长过程中是必要的,夏快飞等(2005)认为钙是高等植物中普遍存在的一种信号转导分子,至于钙离子在苏铁花粉萌发中的作用如何有待研究。

在室温条件下将花粉保存于有干燥剂的密封容器中比暴露在空气中的花粉存活时间长;在 0 °C 条件下两者的存活时间相差不明显,这与 Osborn 等(1992)报道的结果类似,而 Tang(1986b)认为,将花粉放进硅胶后,再放进冰箱中的保存效果好。将花

粉保存在干燥剂中, 由于部分失水而降低代谢活动, 使得花粉能够存活较长时间。保存植物种子前进行晒种, 最主要的目的也是降低种子水分从而降低代谢活动, 将花粉放进干燥剂中保存以及保存前进行干燥与晒种的目的是是一样的。前述诸作者的不同结果可能原于失水程度的差异。

将花粉放进 0 °C 冰箱中保存 1~2 个月能达到较好的保存效果, Osborne 等(1992)等报道非洲铁属(*Encephalartos*)花粉在 0 °C 条件下保存两年后仍有 50% 萌发, 本实验在 4 月 20 日从苏铁中心收集元江苏铁花粉直接保存在 0 °C 冰箱中, 到当年 9 月 18 日仍有 85% 萌发, 几乎与初始萌发率相等。

表 1 人工授粉结实情况

Table 1 The seed set after conducting artificial pollination

| 胚珠数(个) No. of ovules | | | 种子数(个) No. of seeds | | | 结实率 Percentage of seed set(%) | | | 平均结实率 Seed set on average(%) | | |
|----------------------|------|------|---------------------|------|------|-------------------------------|------|------|------------------------------|--------|--------|
| 处理 1 | 处理 2 | 处理 3 | 处理 1 | 处理 2 | 处理 3 | 处理 1 | 处理 2 | 处理 3 | 处理 1 | 处理 2 | 处理 3 |
| 972 | 402 | 756 | 879 | 362 | 0 | 90.4 | 90.0 | 0 | | | |
| 270 | 863 | 583 | 243 | 753 | 10 | 90.0 | 87.3 | 1.72 | 90.3aA | 90.0aA | 1.24bB |
| 527 | 379 | 298 | 477 | 350 | 6 | 90.5 | 92.3 | 2.01 | | | |

注: 处理 1 为液氮保存后的花粉人工授粉; 处理 2 为新鲜花粉人工授粉; 处理 3 为隔离对照。不同字母表示差异显著, 显著水平为分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

用液氮保存花粉时, 不经过干燥处理的花粉萌发率最低, 将越南篦齿苏铁花粉干燥 6 h 以上之后, 其含水率由 27.4% 降至 15% 以下, 液氮保存能达到较好的保存效果。如果将含水量较高的花粉直接投入液氮中, 由于温度急剧降低使得花粉胞间结冰受伤害而丧失活力。刚从室外收集的苏铁花粉含水量一般为 20%~30%, 这样含水量的花粉直接保存在普通低温条件其萌发率下降不多, 但直接保存在液氮中就会使大量花粉丧失活力。所以液氮保存前, 花粉干燥预处理是必要的。本实验表明, 苏铁花粉经干燥预处理, 花粉含水率降至 15% 以下, 投入液氮保存, 其萌发率基本不变, 表明利用超低温保存技术可以长期和超长期保存苏铁花粉。

另外, 在 0 °C 冰箱中保存元江苏铁花粉时发现经过保存后萌发率比新鲜花粉高, 一种较合理的解释是花粉在散粉过程中有段生理后熟过程或者是冷冻过程中引起某些基本必需养分元素释放(Poltito & Luza, 1988)。有些花粉在保存过程中, 萌发率出现时高时低波动现象, Osborne 等(1992)对此的猜想是生物钟机理控制休眠与活动交替变化的信号所致。

苏铁花粉短期保存之后进行人工授粉可获得大量种子, 从而弥补因花期不遇造成自然授粉率和结实率低, 最终导致自然繁殖能力下降的缺点。本文推荐的 0 °C 冰箱在研究和生产单位都容易找到, 适合推广应用。

液氮保存花粉后, 仍保持较高的萌发率。利用液氮保存后的花粉进行了人工授粉实验, 结实率高达 90% 以上, 与新鲜花粉授粉的结果差别不大, 而

未经过人工授粉的隔离植株结实率不到 2%。唐安军等(2007)认为超低温保存顽拗性种子种质是最理想的方法, 本实验也证明了液氮(超低温)也能长期保存苏铁花粉, 这对保存苏铁种质资源有重要意义。

致谢 本试验是在深圳市仙湖植物园完成, 从试验的取材与构思到论文的撰写得到中国科学院北京植物所白克智研究员的指导, 英文写作也得到了焦根林博士的指导, 在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- Burke JJ, Velten J, Oliver MJ. 2004. In Vitro Analysis of Cotton Pollen Germination[J]. *Agronomy Journal*, **96**:359-368
- Chamberlain CJ. 1926. Hybrids in cycads[J]. *Bot Gaz*, **81**:401-408
- James L, Brewbaker, Beyoung HK. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth[J]. *Amer J Bot*, **50**(9):859
- Kiem SC. 1972. Pollination of Cycads[J]. *Fairchild Trop Gdn Bull*, **27**:13-19
- Osborne R, Robbertse PJ, Claassen ML. 1992. The longevity of cycad pollen in storage[J]. *South African J Bot*, **58**(4):250-254
- Poltito V, Luza. 1988. Low temperature storage of pistachio pollen [J]. *Euphytica*, **39**: 265-269
- Tang W. 1986a. Pollinating cycad[J]. *J Cycad Society South Africa*, **8**:16-19
- Tang W. 1986b. Collection and storing pollen[J]. *J Cycad Society South Africa*, **7**:4-6
- Tang AJ(唐安军), Long CL(龙春林). 2007. Cryopreservation of recalcitrant seed germplasm(低温保存技术在顽拗性种子种质保存中的利用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(5):759-764
- Xia KF(夏快飞), Liang CY(梁承郅), Ye XL(叶秀彝). 2005. Study on calmodulin and calmodulin-related proteins in plant cells(钙调素及钙离子相关蛋白在植物细胞中的研究进展)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(3):269-273