

几种忍冬属植物花粉离体萌发研究^①

刘安成, 尉倩, 李淑娟, 王庆, 王宏, 庞长民

陕西省西安植物园, 西安 710061

摘要: 为了探讨忍冬属(*Lonicera* Linn.)植物花粉萌发特性, 为有性杂交奠定基础, 研究了不同质量分数的蔗糖溶液(15%, 20%, 25%, 30%)对贯月忍冬(*L. sempervirens* Linn.)离体花粉的萌发作用, 分别进行了不同花粉采集时间(8:00~18:00)和不同培养温度(15℃, 20℃, 25℃, 30℃)对 4 种离体花粉的萌发影响. 结果表明 30%蔗糖+0.01%硼酸的培养液中贯月忍冬花粉萌发迅速、萌发率高, 可以作为测定花粉萌发的培养基; 贯月忍冬、“格雷姆”忍冬(*L. periclymenum* “Geleimu”)和滇西忍冬(*L. buchananii* Lace)早晨 8:00 采集的花粉萌发率高, 红白忍冬(*L. japonica* var *Chinensis*) 18:00 采集的花粉萌发率显著高于其他时间; 25℃条件下贯月忍冬离体花粉萌发速度快, 4 h 萌发率为 95.1%; 30℃条件下“京红久”忍冬(*L. ×heckrottii*)、滇西忍冬和红白忍冬萌发率高, 4 h 萌发率分别为 12.4%, 84.7%, 34.1%; 贯月忍冬、“京红久”忍冬、滇西忍冬离体花粉在 25℃和 30℃条件下差异不具有统计学意义, 红白忍冬差异具有统计学意义. 不同品种间花粉萌发率存在明显差异, 贯月忍冬的花粉萌发率最高.

关键词: 忍冬属; 花粉; 萌发

中图分类号: S685.99

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)07-0076-06

忍冬属(*Lonicera* Linn.)隶属于忍冬科(Caprifoliaceae), 约 200 种, 产于北美洲、欧洲、亚洲和非洲北部的温带和亚热带地区, 中国有 98 种, 广布于全国各省区, 西南地区种类最多^[1]. 忍冬属植物中不仅有中国传统中药材金银花和山银花的药源植物^[2], 还有许多具有很高观赏特性的种类, 有花灌木、藤本和匍匐灌木类, 如金银忍冬(*L. maaekii* (Rupr.) Maxim.)、“京红久”忍冬(*L. ×heckrottii*)、贯月忍冬(*L. sempervirens* Linn.)等, 具有很高的园艺应用价值^[3-4]. 迄今为止, 忍冬属植物种质资源、栽培技术、化学成分、药理等方面都有系统、全面的研究报道^[5-7], 金银花等在医药、花茶、饮料等领域的应用广泛.

忍冬属植物花繁叶茂, 但结实率却差异很大, 如金银忍冬等灌木结实率很高, 而一些藤本类如贯月忍冬、红白忍冬(*L. japonica* var *Chinensis*)等的结实率相对较低, 一些杂交品种如“京红久”忍冬等在栽培中一直未见结实. 结实特性是植物有性繁殖和杂交育种的必要条件, 植物的结实不仅受自然条件、生物因素影响, 更重要的是受植株本身花粉活力、能否成功受精及正常发育等多方面因素的控制. 花粉是许多植物有性生殖途径中进行遗传物质传递的载体, 其活力的有无直接影响遗传物质传递的成败^[8]. 一般通过测定花粉萌发率来反映花粉的活力, 花粉萌发率由两个因素决定: 一是花粉本身的活力, 二是花粉萌发的条件. 曲波等人^[9]通过扫描电子显微镜对 4 种忍冬属植物花粉的形态进行了比较; 张芳等人^[10]比较了山东主产区忍冬 5 个农家品种花粉形态特征, 发现花粉粒形态特征可作为忍冬不同农家品种划分的参考. 江幸山等人^[11]对忍冬属植物花药药隔的特化结构及其生物学意义进行了论述. 杨爱微等人^[12]对 5 个不同产地及类

① 收稿日期: 2015-01-01

基金项目: 陕西省农业科技创新与攻关项目(2016NY-022).

作者简介: 刘安成(1973-), 男, 陕西山阳人, 副研究员, 主要从事观赏植物资源开发利用研究.

型的细毡毛忍冬(*L. similes* Hemsl.)、淡红忍冬(*L. acuminata* Wall.)花粉粒的形态特征进行了研究. 黄丽华等人^[13]对黄褐毛忍冬花形态结构进行了研究. 目前忍冬属植物花粉研究主要集中在花粉形态上, 为种及种以下分类提供科学依据. 花粉萌发方面研究报道有: 许珂等人^[14]以金银忍冬为试材, 研究了不同种类糖、硼酸、钙离子、pH 值、光照等单因子对花粉萌发的影响, 发现分别含有 25% 的蔗糖、0.01% 的硼离子、0.02%~0.05% 的钙离子以及 pH=6.7 时较适合金银忍冬的花粉萌发; 王丽瑛等人^[15]分析了鞑靼忍冬(*L. tatarica* Linn.)、金银忍冬和忍冬(*L. japonica*)花粉活力及不同贮藏温度对花粉活力的影响, 结果表明 3 种忍冬属植物花粉活力存在极显著差别, 其中鞑靼忍冬的生活力和耐贮力最强, 低温有效地延长了花粉活力的保持时间, 忍冬属植物花粉最适萌发培养基成分为 10% 蔗糖+1% 琼脂; 孙年喜等人^[16]进行了灰毡毛忍冬(*L. macranthoides* Hand-Mazz)开花特性及繁育系统的研究, 采用离体培养法测定了花粉活力, 结果发现灰毡毛忍冬单株整个花期花粉萌发率以盛花期最高, 为 43.1%, 初花及末花期萌发率稍低, 平均为 35.4%. 在植物杂交工作中, 花粉具有较高的活力是保证有效杂交的关键, 也是选择父本的基础, 为了探讨花粉萌发率对结实的影响, 本研究对几种忍冬属藤本植物的花粉进行离体培养, 观测花粉的萌发率, 为下一步开展忍冬属植物杂交育种提供理论依据, 也为忍冬属植物花粉的生殖生物学研究、品种改良等提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

“京红久”忍冬、贯月忍冬、红白忍冬、滇西忍冬(*L. buchananii* Lace)和“格雷姆”忍冬(*L. periclymenum* “Geleimu”)为 2010 年来分别从北京植物园、云南腾冲、银川植物园等地引种栽培在西安植物园植物资源圃中. 试验于 2014 年 4-6 月在西安植物园植物生理实验室进行.

1.2 方法

1.2.1 不同蔗糖质量分数对贯月忍冬花粉萌发的影响

采用离体萌发法, 配制质量分数为 15%, 20%, 25%, 30% 的蔗糖溶液(Sucrose solution, 简称为 S), 另一组为同样质量分数的蔗糖溶液, 但加入 0.01% 的硼酸(Boric Acid, 简称为 B). 用胶头滴管在载玻片上滴 1 滴培养液, 将 3~5 朵贯月忍冬花的花粉混合, 用棉签轻弹撒于培养液上, 每种花粉做 3 个重复. 载玻片放入铺有湿滤纸的培养皿内, 在 25 °C 条件下培养, 3, 6, 9, 24 h 后分别在显微镜下观察萌发情况, 镜检时每视野花粉粒在 50 粒以上, 取平均值. 花粉萌发率(%)=(花粉管长度大于或等于花粉直径的花粉粒的数量/观察花粉数量)×100%.

1.2.2 不同采集时间对离体花粉萌发的影响

于晴天 8:00-18:00 每隔 2 h 采集“格雷姆”忍冬、贯月忍冬、红白忍冬、滇西忍冬的花粉, 置于 30% 蔗糖+0.01% 硼酸的培养基中, 于 20 °C 恒温箱内暗光培养. 2, 4 h 后分别观察萌发情况, 并统计萌发率.

1.2.3 不同萌发温度对不同种花粉离体萌发的影响

采集“京红久”忍冬、贯月忍冬、红白忍冬、滇西忍冬的花粉, 采用 30% 蔗糖+0.01% 硼酸的培养基, 分别放置在 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C 散射光条件下培养. 2 h, 4 h 后分别观察萌发情况, 并统计萌发率.

1.3 数据处理

利用 SPSS 软件对所取得的实验数据进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖质量分数对贯月忍冬花粉萌发的影响

贯月忍冬花粉在培养基不加硼酸的情况下, 蔗糖质量分数在 15%~25% 之间, 随蔗糖质量分数的增加花粉萌发率呈递增趋势. 3 h 内 30% 蔗糖溶液条件下萌发率最高, 随着培养时间的延长, 25% 蔗糖溶液条件下萌发率迅速超过 30% 蔗糖溶液, 24 h 萌发时间内, 最高萌发率为 25% 蔗糖溶液条件下, 萌发

率为 29.2%(图 1). 加入 0.01% 硼酸后, 贯月忍冬花粉萌发率迅速提高, 由 30% 蔗糖 3 h 的 13.5% 提高到 30% 蔗糖+0.01% 硼酸 3 h 的 79.7%, 并且随着培养时间的延长, 不同质量分数的蔗糖溶液条件下萌发率都在缓慢增长(图 2), 说明 0.01% 的硼酸对花粉萌发起促进作用, 并且抑制高质量分数蔗糖溶液对花粉的损伤; 含 30% 蔗糖+0.01% 硼酸的培养基 3 h 萌发率为 79.7%, 6 h 内就达到 90.8%, 6 h 与 9 h 的 91.8%、24 h 的 92.4% 差异不具有统计学意义, 说明可以选择 30% 蔗糖+0.01% 硼酸溶液作为测定贯月忍冬花粉萌发试验的培养基.

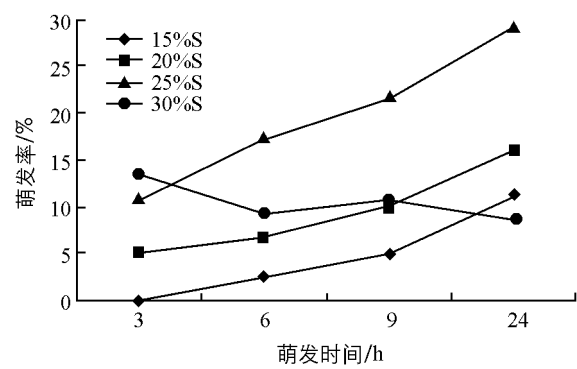


图 1 贯月忍冬离体花粉在不同质量分数蔗糖(S)溶液中的萌发率

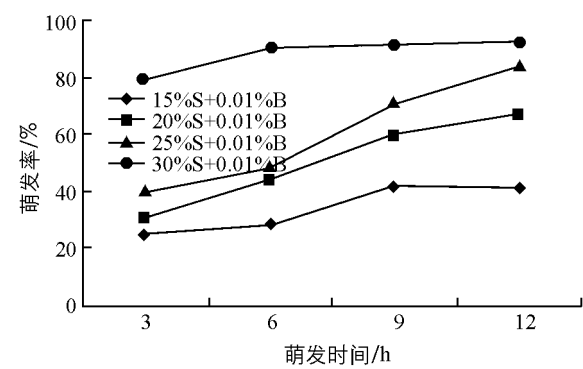
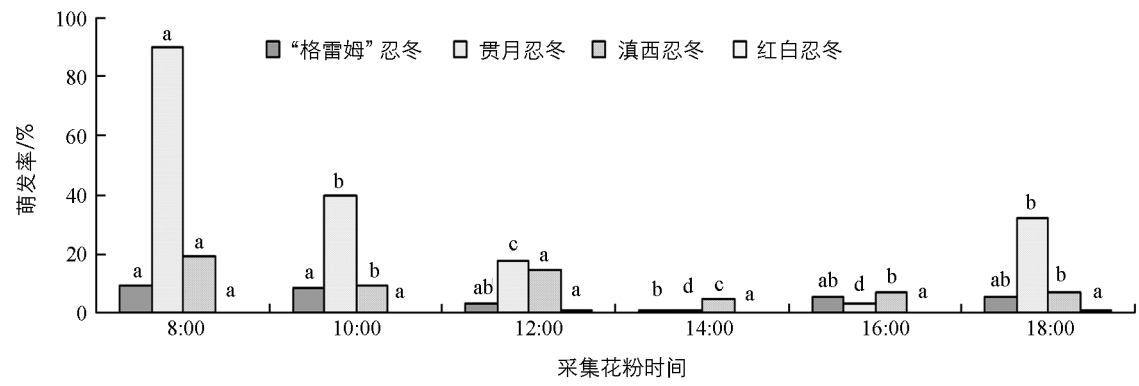


图 2 贯月忍冬离体花粉在含 0.01% 硼酸(B)的不同质量分数蔗糖(S)溶液中的萌发率

2.2 花粉不同采集时间对离体萌发的影响

如图 3-4 所示,“格雷姆”忍冬、贯月忍冬、滇西忍冬早晨 8:00 采集的花粉萌发率最高,贯月忍冬花粉离体培养 2 h 萌发率为 90.4%, 4 h 后达到 97.3%; 红白忍冬花粉培养 2 h 未见萌发, 4 h 后萌发率仅 2.7%. 上午随着气温升高,花粉的萌发率迅速下降, 14:00 采集的花粉萌发率最低,贯月忍冬花粉离体培养 2 h 萌发率仅为 4.7%; 下午气温下降,采集的花粉萌发率又缓慢升高. 红白忍冬 18:00 采集的花粉培养 2 h 萌发率为 1%, 培养 4 h 为 10%, 高于其他时间点采集的花粉. 4 个种间的花粉萌发率差异具有统计学意义, 其原因是物种间花粉活力存在差异, 也与物种不同开花时间特性、温度、太阳直射等各种因素的影响共同作用. 本试验主要目的是探讨花粉的采集时间和授粉时间, 因而未统计更长时间的花粉萌发率.



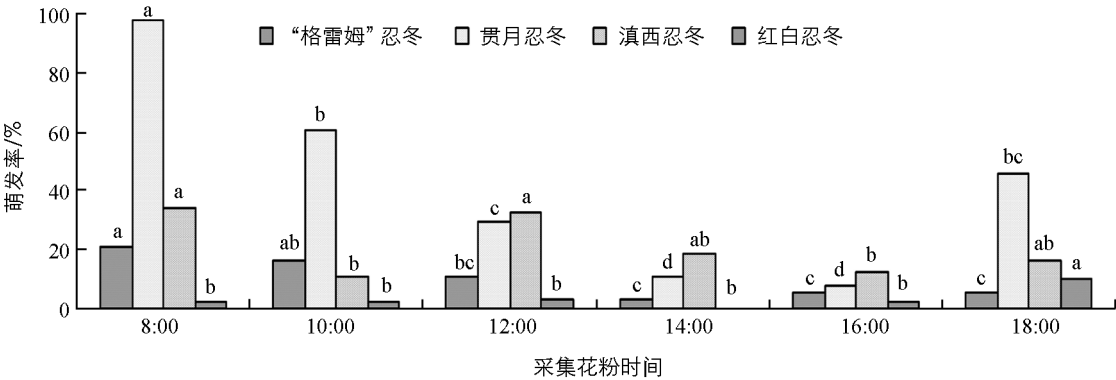
图中相同图形上不同小写字母表示差异具有统计学意义($p < 0.05$).

图 3 不同时间采集花粉培养 2 h 后的萌发率

2.3 不同萌发温度对不同种花粉萌发的影响

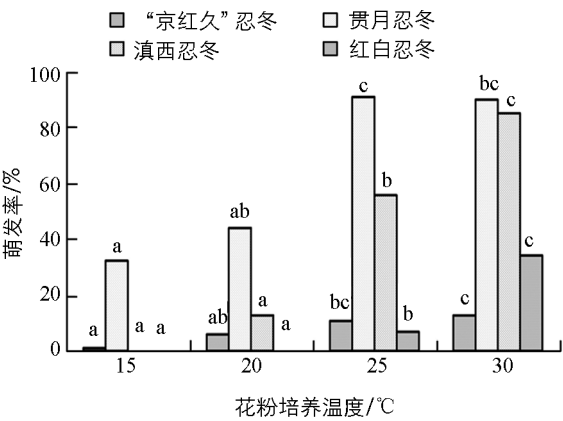
在 15℃ 条件下, 滇西忍冬和红白忍冬培养 4 h 内花粉未见萌发, 贯月忍冬和“京红久”忍冬也与 25℃ 和 30℃ 条件下差异具有统计学意义. 随着培养温度的升高, 萌发率呈上升趋势, 供试的几种忍冬属植物花粉离体萌发最佳温度为 25~30℃, 贯月忍冬在 25℃ 时萌发率最高, 4 h 萌发率为 95.1%; “京红久”忍冬、滇西忍冬和红白忍冬在 30℃ 萌发率最高, 4 h 萌发率分别为 12.4%, 84.7%, 34.1%, 贯月忍冬、“京红久”忍冬、滇西忍冬离体花粉在 25℃ 和 30℃ 条件下差异不具有统计学意义, 红白忍冬差异具有统计学意义.

种间比较可看出, 贯月忍冬和滇西忍冬的花粉萌发率明显高于“京红久”忍冬和红白忍冬(图 5—6). “格雷姆”忍冬花期在西安地区是 4 月, 花期为 15 d 左右, 测定萌发温度对花粉萌发的影响时盛花期已过, 无法进行测试, 因而增加了“京红久”忍冬. 从试验结果看不同种类适宜温度存在差异, 进行人工授粉时也需要考虑温度因素, 合适的温度条件更有利于授粉萌发.



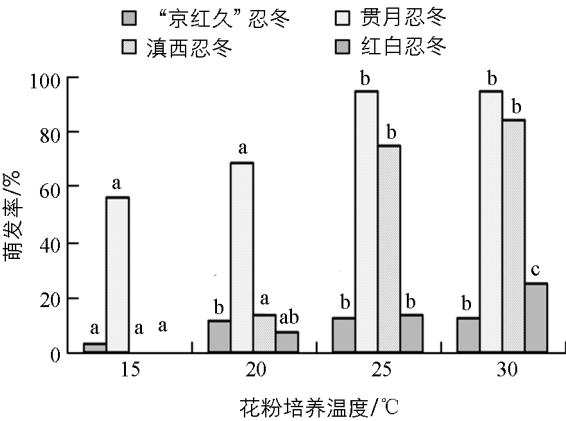
图中相同图形上不同小写字母表示差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

图 4 不同时间采集花粉培养 4 h 后的萌发率



图中相同图形上不同小写字母表示差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

图 5 不同温度条件下培养 2 h 花粉萌发率



图中相同图形上不同小写字母表示差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

图 6 不同温度条件下培养 4 h 花粉萌发率

3 讨论

3.1 植物花粉萌发条件

测定花粉生活力的方法很多, 与染色法相比, 虽然离体萌发法操作较复杂、耗时长, 但花粉在离体萌发培养基中可萌发出花粉管, 这种测定方法与花粉在自然状态的生长萌发相似, 故数据更科学可靠. 因此, 目前离体萌发法仍为花粉生活力测定的首选方法^[17]. 糖类物质是花粉萌发及花粉管生长的重要营养物质, 在花粉萌发过程中能够为花粉提供能源、调节渗透压^[18], 糖质量分数过低, 能量不足; 质量分数过高, 对花粉细胞会造成损伤, 这与本实验中采用 30%蔗糖溶液培养时, 随着培养时间的延长, 统计出的花粉萌发率反而下降一致. 不同植物的花粉萌发条件是不相同的, 通常认为 20~30 °C 是适宜的温度范围, 含有硼、钙以及碳源的培养基适于花粉萌发^[14, 18]. 糖单独应用时 200 g/L 的质量浓度使榛子花粉萌发率最高, 而糖和硼酸同时应用时糖的质量浓度只要 150 g/L 就使花粉萌发率达到最大^[18]. 硼对植物的生殖过程有重要的影响, 与花粉形成、花粉管萌发和受精有密切关系^[19], 硼酸作为微量元素虽对花粉的萌发具有促进作用, 但不是越多越好^[8]. 本试验结果也表明培养基中加入 0.01% 的硼酸能提高离体花粉萌发率和萌发速度, 不

同质量分数硼酸对忍冬属各个种有性生殖的影响将需要进一步试验研究. 本研究主要探讨这几种藤本类忍冬属植物的花粉活力情况, 为种间杂交父母本的选择提供依据, 因而未进行钙、镁、钾及 pH 值等因素对离体花粉萌发的影响试验.

3.2 忍冬属植物花粉活力

金银忍冬花粉在培养基为 25%蔗糖+0.01%硼离子+0.02%钙离子, 光照为 $0.5625 \mu\text{mol}(\text{m}^2 \cdot \text{S})$ 和 pH 值为 6.7 的条件下, 6 h 萌发率可达 88.1%^[14]. 鞑靼忍冬、金银忍冬和忍冬在 10%蔗糖的培养基 3 h 花粉萌发率分别为 91.43%, 92.22%, 94.44%^[15]. 灰毡毛忍冬盛花期花粉于蔗糖质量分数为 20%, 硼酸质量浓度为 50 mg/L, pH 5 的培养基上, 置于 25℃下暗培养 1.5 h 后, 萌发率为 43.1%^[16]. 本研究发现贯月忍冬离体花粉在 30%蔗糖+0.01%硼酸培养基, 25℃条件培养 2 h 萌发率为 91.6%, 4 h 为 95.1%; “京红久”忍冬、滇西忍冬和红白忍冬在 30℃条件下, 4 h 萌发率分别为 12.4%, 84.7%, 24.5%. 说明虽然不同试验采用的花粉萌发条件不同、原植物生长环境不同, 但可以看出忍冬属植物花粉活力差异比较大.

3.3 花粉萌发情况对植物授粉结实的影响

花粉必须在具有活力时到达适宜的接受柱头才能完成传粉过程, 花粉活力和柱头可授性是影响传粉成功率的重要因素^[16]. 开花时期、开花时天气等都会影响花粉活力, 晴天中午太阳照射会使忍冬属植物花药迅速干褐, 花粉失去活力. 从实验中发现贯月忍冬和滇西忍冬的花粉活力强, 花期也长, 在栽培中发现其结实率也相对较高, 判断花粉活力是这几种忍冬属植物传粉成功率的一个更重要的影响因素, 因而在人工杂交过程中, 单从花粉活力因素考虑, 选择贯月忍冬和滇西忍冬作父本比“京红久”忍冬和红白忍冬成功授粉结实的几率高, 另外授粉时间和气温也是需要考虑的因素. 试验所选择的几种材料中, 贯月忍冬、滇西忍冬和红白忍冬是引种栽培的原变种或变种, 而“格雷姆”忍冬、“京红久”忍冬为栽培品种, 从其花粉萌发率上看, 花粉活性差异较大, 说明野生种类的有性生殖能力更强.

参考文献:

- [1] 徐炳声, 王汉津. 中国植物志(第 72 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 143.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 中国医药科技出版社, 2010: 28—29; 205—206.
- [3] 张金政, 梁松洁, 石 雷. 忍冬属藤本植物资源的栽培及应用 [J]. 中国园林, 2004, 20(5): 53—56.
- [4] 郑晓军, 马宏伟, 郭二辉, 等. 河南忍冬属植物观赏特性评价及园林应用研究 [J]. 河南科学, 2009, 27(10): 1236—1238.
- [5] 杜佳朋, 张友民, 王 豫. 忍冬属植物的研究进展 [J]. 北方园艺, 2005(4): 11—13.
- [6] 李金英, 赵春莉, 刘树英, 等. 忍冬科 3 属植物种质资源研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(1): 143—148, 154.
- [7] 胡远艳, 张吉贞, 田建平. 忍冬属植物药理毒理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8455—8457, 8465.
- [8] 车代弟, 樊金萍, 王金刚. 东方百合花粉萌发培养基组分的优化 [J]. 植物研究, 2003, 23(2): 178—181.
- [9] 曲 波, 翟 强, 许玉凤, 等. 4 种忍冬属(*Lonicera*)植物花粉的形态比较 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(1): 96—98.
- [10] 张 芳, 张永清, 周凤琴, 等. 忍冬 5 个农家品种花粉形态比较观察 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1266—1268.
- [11] 江幸山, 吴 鸿, 伦 璇, 等. 忍冬属植物花药药隔的特化结构及其生物学意义 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(1): 39—51.
- [12] 杨爱微, 逾 英, 邓 薇, 等. 川银花花粉粒的扫描电镜观察 [J]. 中药与临床, 2010, 1(3): 10—11, 封 3.
- [13] 黄丽华, 李 娟, 陈 训. 黄褐毛忍冬花形态结构研究 [J]. 种子, 2010, 29(11): 62—63.
- [14] 许 珂, 古松枣, 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, 16(2): 109—115.
- [15] 王丽瑛, 王雪莲, 张 洮, 等. 三种忍冬属(*Lonicera*)植物花粉贮藏及生活力的测定 [J]. 安徽农学通报(上半月刊), 2009, 15(7): 90—91.
- [16] 孙年喜, 李隆云, 崔广林. 灰毡毛忍冬开花特性及繁育系统的研究 [J]. 西南农业学报, 2013, 26(3): 1178—1183.

- [17] 孟令威, 毕晓颖, 郑 洋. 紫花鸢尾花粉萌发及贮藏性研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(28): 192—197.
- [18] 翟学杰, 董凤祥, 张日清, 等. 影响杂交榛花粉萌发和花粉管生长的培养基组分研究 [J]. 林业科学研究, 2009, 22(6): 753—757.
- [19] 蔡庆生. 植物生理学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011: 61.

Study on Pollen Germination *in vitro* for Several Species of *Lonicera*

LIU An-cheng, YU Qian, LI Shu-juan,
WANG Qing, WANG Hong, PANG Chang-min

Xi'an Botanical Garden of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

Abstract: In order to investigate pollen germination characteristics of *Lonicera* Linn. species and lay a foundation for their sexual hybridization, the authors studied *in vitro* pollen germination of *L. sempervirens* at different sucrose concentrations (15%, 20%, 25% and 30%). Four kinds of pollen were collected at different times of the day (8:00—18:00) and let to germinate *in vitro* at different temperatures (15 °C, 20 °C, 25 °C and 30 °C). The results showed that the pollen of *L. sempervirens* germinated quickly in the culture liquid containing 30% sucrose+0.01% boric acid with a high germination rate, which could be used as a pollen germination medium. The pollen of *L. sempervirens* Linn., *L. periclymenum* “Geleimu” and *L. buchananii* Lace. had high germination rate when collected at 8:00 a. m., and the pollen of *L. japonica* var. *chinensis* collected at 18:00 p. m. had significantly higher germination rate than that collected at other times. Under the condition of 25 °C, the pollen of *L. sempervirens* Linn. germinated *in vitro* quickly, with a germination rate of 95.1% in 4 h. The pollen of *L. ×heckrottii*, *L. buchananii* Lace and *L. japonica* var. *chinensis* gave a high germination rate at 30 °C, being 12.4%, 84.7% and 12.4%, respectively, in 4 h. No significant difference was noticed between 25 °C and 30 °C in pollen germination rate of *L. sempervirens*, *L. ×heckrottii* and *L. buchananii* Lace, while a significant difference was recorded for *L. japonica* var. *chinensis*. Pollen germination rate was significantly different between different varieties, being the highest for *L. sempervirens* Linn.

Key words: *Lonicera*; pollen; germination

责任编辑 潘春燕

