

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201907063

5 种通关藤花粉活力测定方法比较*

刘成琴, 赵兴旺, 康志钰, 丁家娟, 孙映雪, 王建军**

(云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】研究通关藤花粉活力和提高其坐果率, 并为其快速繁殖提供理论依据。【方法】采用 TTC 染色法、醋酸洋红染色法、I₂-KI 染色法、过氧化物酶染色法和花粉离体萌发法测定通关藤花粉活力。

【结果】TTC 染色法、醋酸洋红染色法、过氧化物酶染色法和花粉离体萌发法测得的花粉活力均低于 60%, 其中花粉离体萌发法测得的花粉活力最低, 只有 0.02%, 显著低于其他 4 种测定方法 ($P<0.05$)。TTC 染色法、醋酸洋红染色法和过氧化物酶染色法测得的花粉活力分别为 51.44%、52.10% 和 39.02%, 三者之间差异不显著 ($P>0.05$)。I₂-KI 染色法测得的花粉活力高达 90.85%, 显著高于其他 4 种测定方法 ($P<0.05$)。【结论】最适合通关藤花粉活力的测定方法为 I₂-KI 染色法, 并且随着花龄增大花粉活力有所下降。

关键词: 通关藤; 花粉活力; 测定方法

中图分类号: S 567.190.32

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0179-04

Comparison of Five Determination Methods of *Marsdenia tenacissima* Pollen Viability

LIU Chengqin, ZHAO Xingwang, KANG Zhiyu, DING Jiajuan,

SUN Yingxue, WANG Jianjun

(College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] In order to study pollen viability and improve fruiting rate, and to provide theoretical basis for rapid propagation. [Method] TTC staining, acetic acid magenta staining, I₂-KI staining, peroxidase staining and pollen germination *in vitro* were used to determine pollen viability of *Marsdenia tenacissima*. [Result] It was found that the pollen viability measured by TTC staining, acetic acid magenta staining, peroxidase staining and *in vitro* pollen germination were all lower than 60%, among which the pollen viability measured by *in vitro* pollen germination was the lowest, only 0.02%, significantly lower than the other four methods ($P<0.05$). The pollen viability measured by TTC staining, acetic acid magenta staining and peroxidase staining was 51.44%, 52.10% and 39.02%, respectively, with no significant difference among the three ($P>0.05$). The pollen viability measured by I₂-KI staining was up to 90.85%, which was significantly higher than the other four methods ($P<0.05$). [Conclusion] The most suitable method for the determination of pollen viability is I₂-KI staining, and the pollen viability decreases with the increase of flower age.

Keywords: *Marsdenia tenacissima*; pollen viability; determination methods

收稿日期: 2019-07-30

修回日期: 2019-10-04

网络首发时间: 2021-01-08 07:12:04

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660636)。

作者简介: 刘成琴 (1995—), 女, 云南大理人, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物繁殖生物学。

E-mail: 1130470776@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 王建军 (1973—), 女, 河南荥阳人, 硕士, 副教授, 主要从事植物学及繁殖生物学的教学与科研工作。E-mail: wjjken@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210106.1257.003.html>



通关藤 [*Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn.] 为萝藦科牛奶菜属藤本植物, 分布于云南、广西和贵州等省区, 是西南地区常用的民族药之一^[1-2]。其味苦, 性微甘, 具有消炎止痛、清热解毒、止咳平喘等作用。临床广泛应用于治疗各种恶性肿瘤, 疗效良好, 是临床必用的抗肿瘤药物之一^[3]。云南省红河州是通关藤的地道产区, 近几年通关藤的贮藏量急剧下降, 很多地方的通关藤遭到了严重砍伐, 有些甚至是连根挖走, 极不利于通关藤的自然更新^[4]。

萝藦科植物的花粉以花粉块的形式存在, 这是该科植物的典型特征, 通关藤尤为典型。萝藦科植物的坐果率一般较低, 平均 0.33%~5.00%^[5]。目前, 国内外对通关藤的研究主要集中在化学成分、药理活性、种子萌发、资源调查和真伪鉴定等方面, 而对其花粉活力测定方法鲜见报道。目前, 规范化栽培和野生抚育种植的种苗均以种子为繁殖材料^[6]。但由于通关藤坐果率普遍较低, 使通关藤花多果少, 产生的种子数量也少, 成为利用种子进行扩大繁殖的限制因素之一。本研究采用不同方法测定通关藤花粉活力, 并通过对比分析, 筛选出通关藤花粉活力测定的最佳方法。对提高通关藤坐果率具有重要意义, 也为通关藤的快速繁殖提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料的采集与处理

试验材料于 2019 年 5—6 月采自云南省红河州蒙自市水田乡通关藤种植示范基地, 选取处于初花期、盛花期和末花期的花, 迅速带回实验室, 用解剖针将花粉块取下, 分别利用 TTC 染色法、醋酸洋红染色法、I₂-KI 染色法、过氧化物酶染色法以及花粉离体萌发法 5 种方法进行花粉活力测定。

1.2 花粉活力测定方法

(1) TTC 染色法

取 3 朵花的花粉置于普通载玻片上, 滴入质量分数为 0.5% 的 TTC 溶液 2 滴, 用镊子搅拌均匀, 盖上盖玻片, 于 25~28 ℃ 放置 15~20 min。在显微镜下观察不同的 5 个视野, 凡被染成红色的均为有生活力的花粉粒^[7]。

(2) I₂-KI 染色法

取 3 朵花的花粉于干净的普通载玻片上, 加

水 1 滴, 使花粉散开, 再加 1 滴碘—碘化钾溶液, 盖上盖玻片, 置于显微镜下观察。取 5 个视野进行观察并计数, 凡被染成蓝色的均为有生活力的花粉粒^[7]。

(3) 醋酸洋红染色法

取 3 朵花的花粉放在载玻片上, 并滴入 1~2 滴醋酸洋红溶液, 用镊子搅拌均匀, 盖上盖玻片, 片刻后在显微镜下观察 5 个不同的视野, 有活力的花粉被染成红色^[8]。

(4) 过氧化物酶沉淀法

先配制试剂 I: 0.5% 联苯胺、0.5% α-萘酚、0.25% 碳酸钠各 10 mL 混合均匀。在干净载玻片上放 3 朵花的花粉, 然后加试剂 I 和 0.3% 过氧化氢各 1 滴, 搅匀后盖上盖玻片, 将制片放置 30 ℃ 恒温箱中 10 min, 置于显微镜下观察, 取 5 个视野统计并记录被染为红色的花粉数量^[9]。

(5) 花粉离体萌发法

先配置 A、B 2 种培养基^[10], 用解剖针将 3 朵花的花粉块取下放在凹面载玻片上, 分别滴入 2~3 滴 B 培养基, 将载玻片放入装有湿滤纸的培养皿中再盖上一较大的培养皿, 置于 30 ℃ 的恒温培养箱中暗培养, 培养 24 h, 取出, 滴入 20% 的 KOH 溶液使花粉块壁溶解, 然后压片并在显微镜下选 5 个不同视野观察并计数。

$$\text{花粉萌发率} = \frac{\text{已萌发芽粉数量}}{\text{花粉总数}} \times 100\%。$$

以上 5 种方法均在 10 倍显微镜下观察, 每种方法 3 次重复。

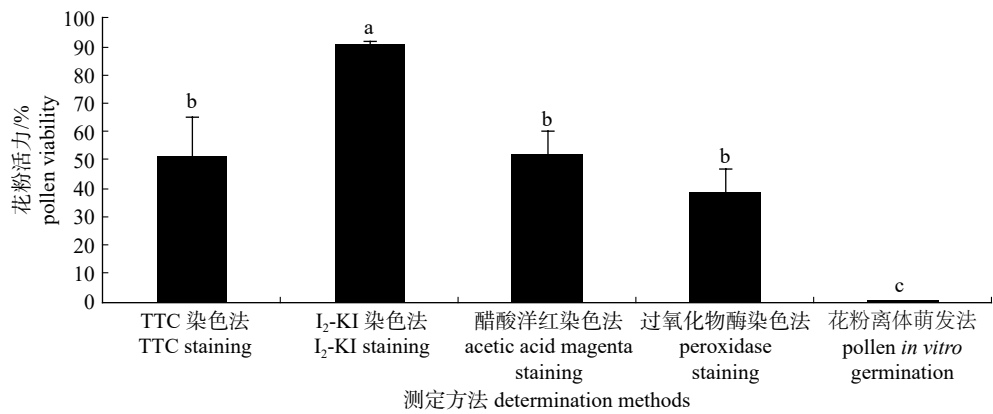
1.3 数据处理

数据采用 SPSS 19.0 和 Excel 2010 处理, 显著性方差分析利用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 不同测定方法下花粉活力比较

从 5 种通关藤花粉活力测定结果来看 (图 1): 花粉活力由高到低依次为 I₂-KI 染色法>醋酸洋红染色法>TTC 染色法>过氧化物酶染色法>花粉离体萌发法。其中花粉离体萌发法测得的花粉活力最低, 只有 0.02%。醋酸洋红染色法、TTC 染色法和过氧化物酶染色法也比较低, 分别为 52.10%、51.44% 和 39.02%, 且三者之间差异不显著。I₂-KI 染色法测得的花粉活力最高, 达到



注: 不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平; 下同。
Note: Different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level; the same as below.

图 1 不同测定方法下通关藤花粉活力比较

Fig. 1 Comparison of pollen viability of *M. tenacissima* under different determination methods

了 90.85%。因此最适合的通关藤花粉活力测定方法为 I₂-KI 染色法。

2.2 不同花期花粉活力比较

由于测定花粉活力最好的方法为 I₂-KI 染色法, 所以用该方法测定了通关藤初花期、盛花期和末花期的花粉活力。从各个时期花粉活力比较来看 (图 2), 花粉活力最高的为初花期达到 90.85%, 盛花期次之为 79.40%, 最低的是末花期花粉活力为 69.16%。初花期和末花期差异显著, 初花期和盛花期差异不显著, 盛花期和末花期差异不显著。

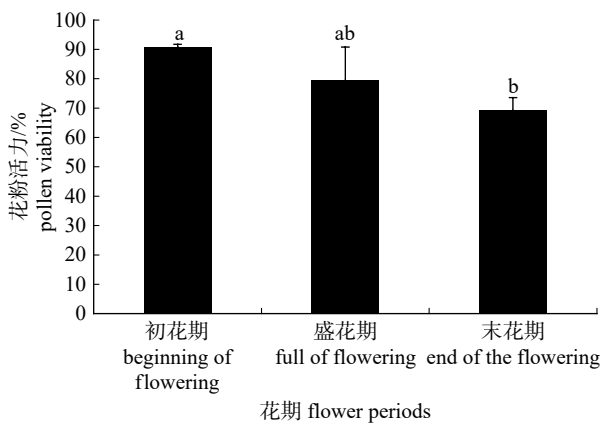


图 2 不同花期通关藤花粉活力比较

Fig. 2 Comparison of pollen viability in different *M. tenacissima* flower periods

3 讨论

花粉活力直接关系到杂交授粉的成功率。花粉活力检测方法主要有花粉离体培养法和染色

法^[11]。花粉离体萌发法测定花粉活力时易受温度、pH 值、营养物质和矿质元素等的影响^[12]。染色法对花粉活力测定具有简单、快速的优点, 但不同植物花粉适宜的染色方法不同^[13]。因此筛选适合测定某种植物花粉活力的染色法在杂交育种上具有非常重大的意义。

本研究采用的 TTC 染色法、醋酸洋红染色法、I₂-KI 染色法、过氧化物酶染色法和花粉离体萌发法 5 种测定通关藤花粉活力的方法中, TTC 染色法、醋酸洋红染色法和过氧化物酶染色法测出的花粉活力都相对较低, 颜色较浅, 染色效果不佳。可能是由于花粉块的膜没有充分破坏, 导致花粉不能完全分散开, 也有可能是通关藤花粉块的特殊结构和含有特殊成分使得这 3 种方法不适合其花粉活力的测定。此外, TTC 染色法的染色效果还可能与花粉的呼吸作用和花粉外壁的结构有关^[14]。花粉离体萌发法测定的花粉活力最低, 在试验中发现培养 4、6 和 8 h 花粉都不萌发, 只在培养 24 h 时分别在初花期和盛花期的 1 个视野中发现了 1 粒花粉萌发。可能是本试验所用培养基不适合通关藤花粉萌发, 对其萌发最适合的培养基的确定还有待进一步的研究。本研究中 I₂-KI 染色法的染色率最高, 而且各重复之间差异显著, 所以 I₂-KI 染色法能准确地反应通关藤的花粉活力, 可作为测定通关藤花粉活力最佳的方法。这与在肋柱花^[13]、大叶相思^[15]等植物上的研究结果一致。这可能是通关藤花粉中淀粉含量较高, I₂-KI 容易渗透进花粉壁使花粉

粒着色。在本研究中还发现通关藤花粉活力随着花龄的增大而减小,但是在通关藤的整个花期中都保持着花粉活力,这可能是通关藤适应萝藦科植物传粉率低、坐果率低的一种机制。

4 结论

本研究采用的 5 种测定通关藤花粉活力方法中,TTC 染色法、醋酸洋红染色法和过氧化物酶染色法测出的花粉活力都相对较低,颜色较浅,染色效果不佳,而 I2-KI 染色法测得的花粉活力高达 90.85%。所以,I2-KI 染色法为测定通关藤花粉活力有效的方法,并且随着花龄增大花粉活力有所下降。

[参考文献]

- [1] 赵久霞,孟珍贵,郑开颜,等. 通关藤的资源调查研究[J]. 中药材, 2018, 41(4): 806. DOI: [10.13863/j.issn.1001-4454.2018.04.008](#).
- [2] 肖雪峰,张稳,张新卓,等. 药用植物通关藤研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(9): 19. DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2018.09.006](#).
- [3] 韩丽,张慧,康廷国,等. 中药通关藤的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2329. DOI: [10.13193/j.issn.1673-7717.2016.10.006](#).
- [4] 孟珍贵,杨生超,陈军文,等. 云南红河州通关藤药材资源调查[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(13): 2478. DOI: [10.4268/cjcmm20141324](#).
- [5] ROBERT W, STEVEN B, BROYLES. Ecology and evolution of reproduction in milkweeds[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1994(25): 423. DOI: [10.2307/2097319](#).
- [6] 李敬仁,信辉,赵光荣,等. 不同采种期对通关藤种子品质的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8): 1978. DOI: [10.3969/j.issn.10080805.2018.08.065](#).
- [7] 于晓英,卢向阳,龚明福,等. 瓜叶菊花粉生活力研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(1): 42. DOI: [10.13331/j.cnki.jhau.2005.01.011](#).
- [8] 王定康,孙桂芳,郭志明,等. 青阳参花粉活力测定方法比较[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 5104. DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2008.12.111](#).
- [9] 伏秦超,王娟,张西玉,等. 肉果秤锤树花粉活力测定方法[J]. 分子植物育种, 2015, 13(5): 1146. DOI: [10.13271/j.mpb.013.001146](#).
- [10] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(一)花粉生活力的测定[J]. 植物学通报, 1993, 10(2): 60.
- [11] 徐斌,彭莉霞,潘文,等. 杜鹃红山茶花粉活力测定方法的比较研究[J]. 北方园艺, 2015(13): 88. DOI: [10.11937/bfyy.201513026](#).
- [12] 高露璐,李林芳,马育珠,等. 毛叶铁线莲花粉活力测定方法[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4667. DOI: [10.13271/j.mpb.015.004667](#).
- [13] 李旭新,巴根那,杨恒山,等. 肋柱花花粉萌发及其活力测定方法比较[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(13): 127. DOI: [10.13989/j.cnki.0517-6611.2017.13.038](#).
- [14] 肖真真,陈虹,潘存德,等. 新新2号核桃花粉活力测定方法比较[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(10): 1777. DOI: [10.6048/j.issn.1001-4330.2014.10.003](#).
- [15] 詹妮,黄烈健. 大叶相思花粉离体萌发适宜条件及活力检测方法[J]. 林业科学, 2016, 52(2): 67. DOI: [10.11707/j.1001-7488.20160208](#).

责任编辑: 何承刚