

天女木兰花粉形态特征及其生活力

王子华, 张凤娟, 秦素平, 龙茹, 孟宪东, 徐兴友*

(河北科技师范学院野生植物资源应用研究所, 河北 昌黎 066600)

摘要: 对天女木兰(*Magnolia sieboldii*)花粉的采集时期、形态以及培养的温度和培养基进行了研究, 并探讨贮存温度和时间对花粉生活力的影响。结果表明, 扫描电镜观察到的花粉形状和萌发孔与其他已报道的木兰科植物相同, 但大小和花粉外壁的纹理不同。在花瓣刚刚展开的初花期采集的花粉生活力最高。25℃下最适于花粉的萌发; 花粉在含 10% 蔗糖 + 0.1% 硼酸的培养基上培养 14 h 的萌发率最高, 0.01% ~ 0.05% 的氯化钙对花粉的萌发影响不显著, 0.1% 的氯化钙对花粉的萌发有抑制作用。随着贮存时间的延长, 花粉萌发率不断降低。不同贮存温度下花粉萌发率的降低速度依次为 -10℃ < 4℃ < 25℃, -10℃ 下贮藏 5 d 的花粉萌发率降低了 48.8%, 10 d 后萌发率降低为 0。

关键词: 天女木兰; 花粉; 花粉形态; 生活力; 贮藏

中图分类号: Q944.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)06-0551-06

Pollen Morphology and Viability of *Magnolia sieboldii*

WANG Zi-hua, ZHANG Feng-juan, QIN Su-ping, LONG Ru,
MENG Xian-dong, XU Xing-you*

(Research Institute of Wild Plant Resources Application, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, China)

Abstract: The collection, morphology characters and culture condition of pollens of *Magnolia sieboldii* were studied, and the effects of storage temperature and time on pollen viability were investigated. The pollen morphological characters and germinal aperture of *Magnolia sieboldii* under scanning electron microscope are similar to that of the other species in Magnoliaceae, but the size and exine sculpture are different. The pollen collected in the initial bloom stage has the highest germination rate at 25℃. Pollens cultured on medium with 10% sucrose and 0.1% boric acid for 14 hours had the highest germination rate. The 0.01% ~ 0.05% CaCl₂ had no significant effect on pollen germination, but 0.1% CaCl₂ had negative effect. The viability of pollen of *Magnolia sieboldii* decreases gradually as increasing of preservation at different storage temperature, and the pollen viability are decreased in order of 25℃ > 4℃ > -10℃. The pollen germination rate reduced from 87.9% to 48.8% when they were stored at -10℃ for 5 days and reduced to 0 for 10 days.

Key words: *Magnolia sieboldii*; Pollen; Pollen morphology; Viability; Storage

天女木兰(*Magnolia sieboldii* K. Koch)又名小花木兰, 系木兰科(Magnoliaceae)木兰属(*Magnolia*)的落叶小乔木, 是第四纪冰川孑遗植物, 也是唯一在东北地区有天然分布的木兰科植物^[1]。河北青龙县的祖山为东北和华北的交界处, 有大片天女木兰的分布。天女木兰花期在 5 月中旬 ~ 6 月上旬, 花瓣洁白芬芳, 其花、果、叶均可提取高级香料, 是很有开发利用前途的珍贵野生植物资源, 也是美化庭

院、街道、公园和风景游览区的理想花卉, 同时也是木兰科一种重要的育种资源。但是天女木兰多生长在海拔较高山脉的北麓, 大多是跳石塘地貌的岩隙之中, 土壤稀少, 环境恶劣, 因此自然繁殖力很低, 而且由于近几年来旅游开发造成的破坏, 致使这一珍稀野生植物的数量日趋减少, 目前天女木兰已经被《中国物种红色名录》列为易危种^[2], 所以保护和扩大天女木兰种群尤为重要。花粉是种子植

物的雄配子体,在有性繁殖中发挥着重要作用,利用花粉贮藏也是种质资源保存非常重要的手段之一,而花粉生活力又是影响受精的关键因素。关于木兰科植物花粉的研究较多^[3-13],但有关天女木兰花粉的形态研究尚未见报道。本文对野生天女木兰花粉的形态和生活力进行测定和研究,以期为天女木兰种质资源的利用和保存提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 花粉的采集

花粉于 2007 年 5 月 25 日采自秦皇岛地区青龙县祖山海拔 936 m(用手持 GPS 测定)处自然生长的天女木兰(*Magnolia sieboldii*)植株上,分别在花蕾期、初花期和盛花期采集花粉。花蕾期是指花瓣未开、花药幼嫩、药室尚未开裂;初花期是指花瓣刚刚展开,初放的花药膨大饱满但药室尚未开裂;盛花期是指花瓣充分展开,药室已经全部裂开。花蕾期采集花蕾,初花期采集花朵,装入速冻袋密封带回室内,在室内去掉花瓣自然阴干,待花粉散出后收集花粉;盛花期采集花朵,去掉花瓣后装入磨口瓶中密封带回室内,收集散出的花粉。

1.2 花粉的形态观察

取适量盛花期花粉,直接粘于双面胶纸上,在 SCD005 Sputter Coater 离子溅射机上镀金后,用 KYKY-2800 型扫描电子显微镜观察并拍照,花粉粒大小取 20 粒花粉的平均值。

1.3 花粉生活力的测定

采用培养基发芽法测定花粉生活力,配制含有蔗糖和硼酸的培养基,滴一滴培养基于凹形载玻片上,撒少量花粉于培养基上,混匀将其放入铺有湿润滤纸的培养皿中,盖上皿盖,进行培养,定期取出在光学显微镜下观察,统计发芽率。每个处理重复 3 次,每次镜检 3 个视野,计算花粉萌发率。

采集花粉时期的确定 花蕾期、初花期、盛花期采集的花粉分别用含有 10% 蔗糖 + 0.05% 硼酸的培养基,在 25℃ 光照培养箱中培养,分别在培养 2 h、4 h、6 h、10 h、14 h、18 h 时观察统计花粉的萌发率。

花粉萌发最适宜温度的确定 取初花期采集的花粉,在含有 10% 蔗糖 + 0.05% 硼酸的培养基,分别于 10℃、15℃、25℃、30℃ 和 37℃ 下恒温培养 10 h,统计花粉的萌发率。

花粉萌发适宜培养基优化 配制含有蔗糖(5%、10%、15%)和硼酸(0.01%、0.05%、0.1%)的培养基,在 25℃ 培养初花期的花粉,10 h 后统计花粉的萌发率。在萌发率最高的培养基中分别加入 0.01%、0.02%、0.05%、0.1% 的氯化钙,统计钙离子对花粉萌发的影响。

贮藏条件对花粉生活力的影响 将不同时期采集的花粉阴干后分别装入小瓶中,分别置于室温(25℃)、低温(4℃)和冷冻(-10℃)条件下保存。每隔一定时间取少量的花粉在室温下培养 10 h 后镜检,统计花粉萌发率。

2 结果和分析

2.1 花粉的形态

天女木兰花粉粒极面观呈椭圆形,赤道面观为船形,长赤道轴 × 极轴约为 85.5 μm × 36.4 μm。具一远极沟,左右对称,沟宽约 0.45 μm,沟长几乎达两端(图 1c, d)。外壁粗糙,外壁上具小穴,小穴分布较均匀(图 1b),在 7 000 倍时可见弯曲而短蠕虫状条纹(图 1a)。

2.2 采集时期和培养时间对花粉萌发率的影响

从不同开放状态花朵上采集的花粉培养后的萌发率不同(图 2),初花期花粉的萌发率最高,为 84.9%,显著高于花蕾期和盛花期;花蕾期的花粉因在采收时尚未完全成熟,萌发率为 75.1%;盛花期的花药已经完全开裂,在测定前受储运环境的影响,花粉萌发率很低,仅为 24.8%。因而选择花瓣刚刚展开处于初花期的花朵采集花粉,便于处理和研究。

花粉的萌发率随着培养时间的延长而增加,在培养 10 h 内迅速增加,10 h 后增加缓慢,14 h 后萌发率趋于平稳,说明有生活力的花粉已萌发完毕。不同开放状态的花粉培养 10 h 和 14 h 的萌发率仅相差 0.7% ~ 3.4%,考虑试验的可操作性和效率性,故随后的试验均在培养 10 h 后统计花粉活力。

2.3 花粉培养条件

2.3.1 温度

天女木兰花粉的萌发率与培养温度关系密切,低于 10℃ 时花粉不能萌发,超过 10℃ 后萌发率随温度升高而升高,25℃ 时高达 79.4%,显著高于 15℃(22.6%)、30℃(59.8%)、37℃(40.1%)的培养。因此 25℃ 为天女木兰花粉萌发的适宜温度。

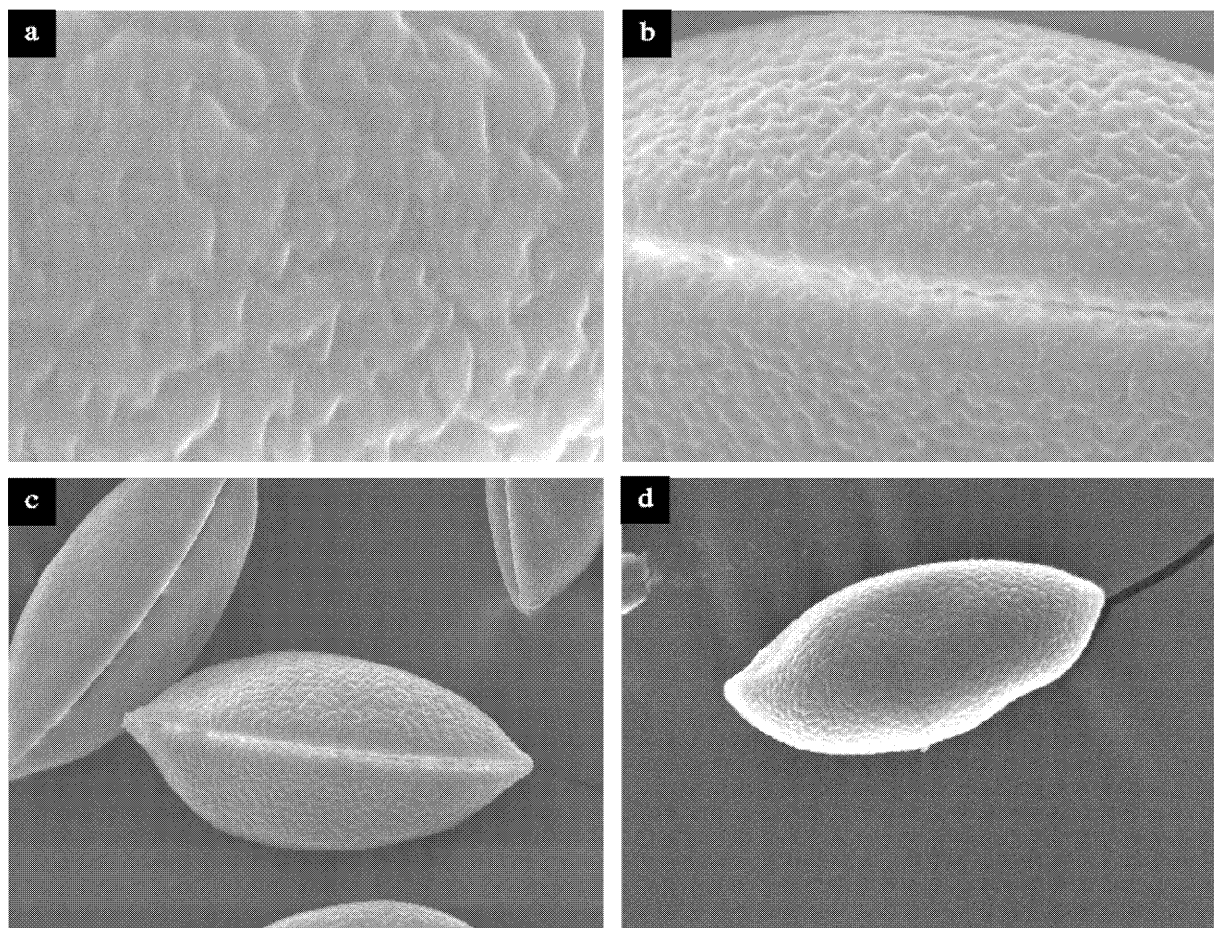


图 1 天女木兰花粉扫描电镜下的形态

Fig 1 Pollen morphology of *Magnolia sieboldii* under SEM

- a. 表面雕纹 Surface sculpture, × 7 000; b. 远极沟 Anacolpus, × 3 000;
- c. 远极面观 Far polar view, × 1 000; d. 赤道面观 Equatorial view, × 1 000.

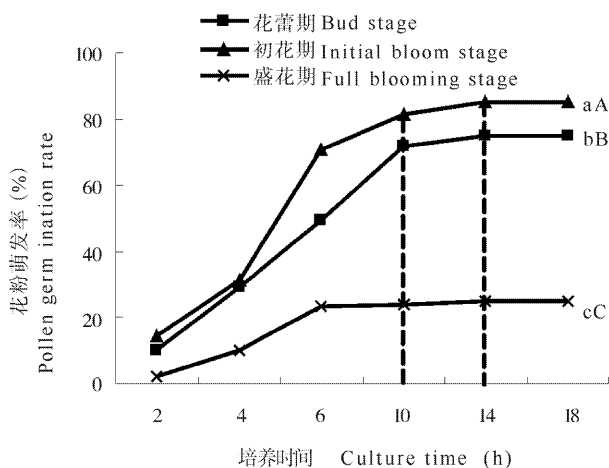


图 2 天女木兰花粉的萌发率

Fig 2 The germination rate of *Magnolia sieboldii* pollens

不同小写和大写字母分别表示处理间在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。The different small and capital letters beside lines present significant difference at 0.05 and 0.01 levels (LSD test), respectively.

2.3.2 最佳培养基

培养基中蔗糖和硼酸的含量影响天女木兰花粉的萌发率, 由表 1 看出, 花粉在含有 10% 蔗糖和 0.1% 硼酸的培养基上的萌发率显著高于其它组合, 可以作为最佳的培养基配方。

许多研究表明 Ca^{2+} 对花粉的萌发有促进作用^[11,14], 本研究中, 在培养基中添加 0.01% ~ 0.05% $CaCl_2$ 天女木兰花粉的萌发率从 89.5% 提高到 92.7%, 方差分析表明处理间不显著, 但当 $CaCl_2$ 含量为 0.1% 时花粉萌发率显著降低为 67.3%。

2.3.3 贮藏温度和时间的影响

贮藏温度和贮藏时间对天女木兰花粉萌发率影响显著(图 3), 室温下贮藏 2 d 花粉萌发率下降一半以上, 贮藏 5 d 后已检测不到萌发的花粉; 4℃ 贮藏推迟了花粉萌发率的下降, 4d 后的萌发率降低了 50.8%,

表 1 不同培养基对花粉萌发的影响

Table 1 Effect of different culture medium on pollen germination rate

序号 No.	蔗糖 Sugar (%)	硼酸 Boric acid (%)	花粉萌发率 Pollen germination rate (%)
1	5	0.01	70.9dD
2	5	0.05	76.9cC
3	5	0.10	85.1bB
4	10	0.01	77.8cC
5	10	0.05	84.9bB
6	10	0.10	89.5aA
7	15	0.01	60.9eE
8	15	0.05	80.0cC
9	15	0.10	85.4bB

数据后不同小写字母和大写字母分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。Data followed different small letters and capital letters present significant difference at 0.05 and 0.01 level (LSD test), respectively.

贮藏 9 d 后下降为 0; -10℃ 贮藏 5 d 后的萌发率降低了 48.8%, 10 d 后降为 0。

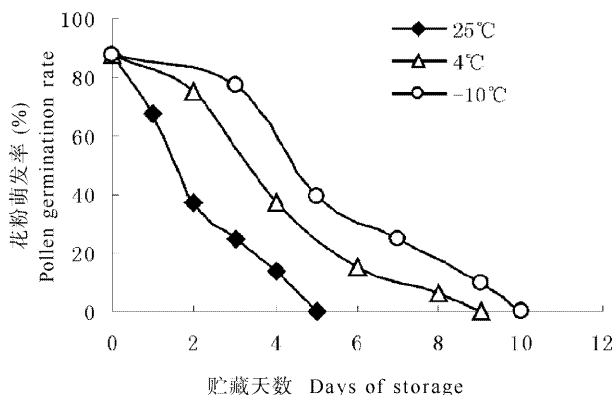


图 3 贮藏温度和时间对天女木兰花粉萌发率的影响

Fig. 3 Effects of storage temperature and time on pollen germination rate of *Magnolia sieboldii*

3 结论和讨论

花粉形态特征可为植物分类、系统发育和进化提供依据,且在目以上的分类单位中,花粉形态特点的相似性和植物分类系统是非常一致的,对科、属、种甚至种下等级的分类常可提供有价值的资料^[4,9]。天女木兰花粉粒形状和其他已报道的木兰科植物,如木莲属的华木莲(*Sinomanglietia glauca*)、巴东木莲(*Manglietia patungensis*)^[3],含笑属的美毛含笑(*Michelia caloptila*)、乐昌含笑(*Michelia chapensis*)、深山含笑(*Michelia maudiae*)^[3],木兰属的白玉兰(*Magnolia denudata*)^[3-6,11]、紫玉兰(*Magnolia liliflora*)^[4-6,11]、广玉兰(*Magnolia grandiflora*)^[6,8,11]、朱砂玉兰(*Magnolia × soulangeana*)^[4-5]、望春玉兰(*Magnolia*

biondii)^[3,5]、天目木兰(*Magnolia amoena*)^[3]、长叶玉兰(*Magnolia paenetauma*)、大叶玉兰(*Magnolia henryi*)、山玉兰(*Magnolia delavayi*)^[8]、红花玉兰(*Magnolia wufengensis*)^[5]、宝华玉兰(*Magnolia zenii*)^[4],鹅掌楸属的鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)和北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)^[10],拟单性木兰属的乐东拟单性木兰(*Parakmeria lotungensis*)^[7]等花粉的形状和萌发孔类型基本一致,具远极沟,沟直达两端。但在花粉大小和外壁纹饰等方面存在明显的差异:天女木兰花粉和广玉兰、山玉兰花粉大小相近,属于大花粉;外壁表面粗糙,具有典型的蠕虫状条纹(图 1a),呈镶嵌状排列,条纹间具有明显深浅不同的沟,条纹间具有孔穴。由于花粉观察时所用的电子显微镜型号、参数、观察倍数以及拍照的角度不同,根据现有的图片资料对这些木兰科植物很难从孢粉学建立检索表。有一点可以肯定,木兰科植物孢粉形态的确可以作为该科植物进化和分类的依据,但仍需进一步系统的工作才能提供可靠的证据^[3]。

花朵不同开放状态表示花粉的成熟程度,天女木兰花蕾期的花粉因在采收时尚未完全成熟,采收后由于脱离了原发育环境,花粉因湿度、温度等条件发生变化不能继续发育成熟,盛花期的花药已经完全开裂,花粉成熟,因代谢旺盛而易丧失活力,以初花期采集的活力最高。采集二乔玉兰(*Magnolia × soulangeana*)微开的花朵,花粉萌发率高达 79.8%^[16],花朵的开放程度比本研究的初花期要大。考虑天女木兰生长在深山海拔较高的生境,花粉采集后需要经过较长时间才能进行处理,因此选择初花期采

集为宜。

花粉的生活力多用萌发率表示, 萌发率的测定方法准确, 但需要时间较长。天女木兰花粉培养 10 h 后, 萌发率虽有升高, 但经方差分析与培养 14 h 的差异不显著, 因此确定 10 h 为适宜的培养时间。培养温度直接影响花粉的活力, 天女木兰通常生长在海拔较高的山区, 花期虽是初夏, 但授粉环境的温度因高海拔一般在 25℃ 左右, 培养试验也证实在 25℃ 培养的花粉萌发率最高。蔗糖和硼酸是花粉培养基的基本组成成分, 蔗糖可调节花粉培养环境的渗透势, 硼酸促进花粉管的伸长。通常花粉培养的适宜蔗糖含量为 5%^[16-17], 但本研究中最适宜蔗糖含量为 10%, 说明天女木兰花粉萌发需要较高的渗透势。硼是花粉萌发和花粉管伸长的必需元素, 天女木兰最适宜的硼酸含量和二乔玉兰相同^[7], 为 0.1%。Ca²⁺ 可通过多种途径影响花粉萌发和花粉管的生长, 其中涉及细胞骨架的组装、分泌小泡的运输和融合、花粉管顶端的脉冲式生长、花粉管生长方向调控等多个方面, 因此 Ca²⁺ 浓度过低将会导致花粉管生长受到抑制或完全停止。在含有 10% 蔗糖、0.01% 硼酸的培养基中添加 0.02% 的 CaCl₂ 使花粉萌发率提高了 3.2%, 虽未达显著水平, 但超过 0.1% 则显著抑制花粉的萌发。Ca 不是花粉萌发的必需元素, 草莓 (*Fragaria ananassa*)^[18]、黄瓜 (*Cucumis sativus*)^[19] 的花粉在无钙培养基萌发生长状况良好, 同样 CaCl₂ 含量超过 0.1% 后显著抑制花粉的萌发, 但从提高花粉萌发率考虑, 可以在培养基中添加 0.02% 的 CaCl₂ 以确保花粉萌发。

花粉贮藏不仅是保存种质资源的重要方法, 还可以解决杂交育种时的花期不遇问题, 因此一直是花粉研究的重点。天女木兰花粉无论在室温、冷藏还是冷冻条件下, 其生活力都随贮藏时间的延长而迅速下降, 且室温贮藏的下降最快; 花粉在 -10℃ 冷冻贮藏能保持较长时间的生活力, 冷藏次之。花粉在贮藏过程中仍然要进行新陈代谢的生命活动, 在室温条件下可溶性营养物质消耗过多, 酶活力下降和水分过度缺乏可能导致花粉生活力迅速降低。而低温和冷冻贮藏中可溶性糖类和有机酸的消耗较少, 所以花粉生活力下降较慢。本研究天女木兰花粉室温贮藏 5 d 生活力完全丧失, 而黄山天女木兰花粉室温贮存了 6 d 活力完全消失^[7], 这可能是操作不同造成的微小差异。低温和冷冻贮藏虽延长了花粉寿命, 但仅有短短几天, 尚不能满足种质

资源保存和育种要求, 有待进一步研究天女木兰花粉贮藏时间短的问题。

总之, 天女木兰的花粉采集应选择花朵初开期, 花粉具有木兰科植物花粉典型的形态, 适宜花粉萌发的培养基为 10% 蔗糖 + 0.1% 硼酸 + 0.02% CaCl₂, 培养适宜温度为 25℃, 培养时间 10 h。4℃ 低温和 -10℃ 冷冻贮藏可短期保存花粉 5 d, 但花粉萌发率降低近 50%。

参考文献

- [1] Ye G Y (叶桂艳). Trees of Magnolias in China [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1996: 78. (in Chinese)
- [2] Wang S (汪松), Xie Y (解焱). China Species Red List [M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 327. (in Chinese)
- [3] Lin X C (林新春), Yu Z X (俞志雄). Pollen morphology of 9 species from Magnoliaceae [J]. J Zhejiang For Coll (浙江林学院学报), 2003, 20(4): 353-356. (in Chinese)
- [4] Li Y F (李又芬), Zhou Q B (周琴宝), Li Y J (李永敬). Ultramicro-structure of pollen grains of seven species of *Magnolia* [J]. J Nanjing Instit For (南京林学院学报), 1985(3): 139-150. (in Chinese)
- [5] Rui F Y (芮飞燕), Ma L Y (马履一), Peng Z D (彭祚登), et al. Taxonomy significance based on pollen morphology observation of five species of *Magnolia* L. [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2007, 27(4): 393-397. (in Chinese)
- [6] Sun J T (孙京田), Han J K (韩加坤). The study on pollen submicroscopic morphology of *Magnolia* L. [J]. Shandong Sci (山东科学), 2005, 18(3): 34-37. (in Chinese)
- [7] Xu F X (徐凤霞). Study on pollen morphology of *Parakmeria lotungensis* [J]. Guihaia (广西植物), 2002, 22(2): 157-159. (in Chinese)
- [8] Xu F X (徐凤霞), Xu X L (徐信兰), Hu X Y (胡晓颖). Pollen morphology of five species from *Magnolia* [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2004, 26(1): 83-88. (in Chinese)
- [9] Wang F S (王伏雄), Chen N F (钱南芬), Zhang Y L (张玉龙), et al. Pollen Flora of China [M]. Second edition. Beijing: Science Press, 1995: 1-2. (in Chinese)
- [10] Wei Z X (韦仲新), Wu Z Y (吴征镒). Pollen ultra-structure of *Liriodendron* and its systematic significance [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 1993, 15(2): 163-166. (in Chinese)
- [11] Kong H (孔红). Study on pollen morphology of 3 species of *Magnolia* [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin (西北植物学报), 1999, 19(6): 206-208. (in Chinese)
- [12] Agababian V S. Pollen morphology of the family Magnoliaceae [J]. Grana, 1972, 12: 166-176.
- [13] Praglowski J. Magnoliaceae Jus., World Pollen and Spore Flora Vol. 3 [M]. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1974: 1-44.
- [14] Guan J F (关军锋). Effects of Li⁺, inositol and Ca²⁺ on apple, pear and hawthorn pollen germination and tube growth [J]. J Fruit Sci (果树科学), 1998, 15(4): 293-296. (in Chinese)
- [15] Gong M (龚明), Yang Z H (杨中汉). Effect of calcium on the induction of pollen germination and regulation of pollen tube [J]. J

- Beijing Univ(北京大学学报), 1995, 31(2): 238-249.(in Chinese)
- [16] Zhang Y L(张亚利), Tian Z K(田振坤), Liu Y(刘燕). Preservation methods of pollen of *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2006, 14(4): 318-320.(in Chinese)
- [17] Liu Y(刘燕), Zhang Y L(张亚利). Pollen cryopreservation of *Prunus mume* [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 2004, 26(suppl): 22-25.(in Chinese)
- [18] Jiang G H(蒋桂华), Xie M(谢鸣), Fang L(方丽), et al. Effects of boron, calcium, pesticide and germicide on pollen germination and tube growth of strawberry [J]. J Fruit Sci(果树学报), 2007, 24(2): 234-236.(in Chinese)
- [19] He J H(何金环), Li Q Z(李巧枝), Ren M(任敏). The effect of Ca^{2+} on pollen germination and tube growth in cucumber [J]. Henan Agri Sci(河南农业科学), 2006(1): 75-77.(in Chinese)