江西农业大学学报　2024,46(4)　　http://xuebao.jxau.edu.cn
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis　　https://doi.org/10.3724/aauj.2024083

张薇,蒋诗音,王燕,等.南酸枣花粉离体萌发及活力快速测定[J].江西农业大学学报,2024,46(4):935-943.
ZHANG W,JIANG S Y,WANG Y,et al.*In vitro* germination and rapid detection of pollen viability for *Choerospondias axillaris*[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2024,46(4):935-943.

南酸枣花粉离体萌发及活力快速测定

张　薇[1,2],蒋诗音[1,2],王　燕[1,2],孙荣喜[1,2],吴南生[1,2],汪家魏[1,2],丁　菲[1,2*]

(1.江西农业大学 林学院/亚热带森林资源培育江西省重点实验室,江西 南昌 330032;2.江西农业大学 南酸枣研究所,江西 南昌 330032)

摘要:【目的】筛选南酸枣花粉离体萌发适宜的培养条件和培养时间,研究其花粉活力快速检测方法,以期为南酸枣人工授粉和杂交育种工作提供参考。【方法】采集将要开放的南酸枣花穗,通过水培法获取成熟南酸枣花粉;设置不同浓度的蔗糖、硼酸、氯化钙,采用$L_{16}(4^3)$正交试验设计和液体培养法进行花粉离体萌发培养,筛选最佳的南酸枣花粉离体培养条件和培养时间;分别采用I_2-KI染色法、TTC染色法和红墨水染色法对花粉进行染色,结合最佳花粉离体萌发条件培养后所得出的萌发率,比较不同染色方法,找出适合南酸枣花粉活力快速检测的方法。【结果】蔗糖、硼酸、氯化钙对南酸枣花粉萌发率和花粉管长度具有显著影响($P<0.05$)。三因素对南酸枣花粉萌发的影响由大到小依次为蔗糖(A)、氯化钙(C)和蔗糖(B)。正交试验结果表明:20%蔗糖、0.3%硼酸和0.03%氯化钙组合花粉萌发效果最好,花粉萌发率为91.41%,花粉管长度为250.91 μm。由极差和方差分析结果得知,蔗糖20%、硼酸0.3%和氯化钙0.02%组合花粉萌发效果最好,经验证,花粉萌发率为93.27%,花粉管长度为296.34 μm,结果优于20%蔗糖、0.3%硼酸和0.03%氯化钙组合。当花粉离体培养6 h时,花粉萌发率趋于稳定,花粉管长度适中、不堆叠,利于观察和统计数据。红墨水染色法与花粉离体萌发培养萌发率相近,两者间无显著差异($P>0.05$),可以作为南酸枣花粉活力的快速检测方法。【结论】南酸枣花粉离体萌发最佳培养组合为20%蔗糖、0.3%硼酸和0.02%氯化钙,最适的培养时间为6 h,红墨水染色法适用于南酸枣花粉活力快速测定。

关键词:南酸枣;花粉;离体萌发;花粉活力
中图分类号:S665.1　　**文献标志码:**A
文章编号:1000-2286(2024)04-0935-09
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

In vitro germination and rapid detection of pollen viability for *Choerospondias axillaris*

ZHANG Wei[1,2],JIANG Shiyin[1,2],WANG Yan[1,2],SUN Rongxi[1,2],
WU Nansheng[1,2],WANG Jiawei[1,2],DING Fei[1,2*]

(1. Colleg of Forestry, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Subtropical Forest Resources Cultivation, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330032, China; 2. Institute of *Choerospondias Axillaris*, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330032, China)

Abstract:[**Objective**]This study aims to screening the suitable cultivation conditions and time of in vitro pollen germination as well as studying the rapid detection method of pollen viability for *Choerospondias axillaris*,

收稿日期:2024-01-29　　**修回日期:**2024-03-28
基金项目:国家自然科学基金项目(32160387)
Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32160387)
作者简介:张薇,硕士生,orcid.org/0009-0009-4165-7010,2540137052@qq.com;*通信作者:丁菲,教授,博士,主要从事经济林栽培研究,orcid.org/0000-0003-3429-2438,403491241@qq.com。
©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

thus providing reference for artificial pollination and hybrid breeding of *Choerospondias axillaris* in the future. [**Method**] The flower spikes of *Choerospondias axillaris* which will be bloomed were collected. Mature pollen of *Choerospondias axillaris* through hydroponic method was collected. Different concentrations of sucrose, boric acid and calcium chloride were set up. The $L_{16}(4^3)$ orthogonal test design and liquid culture method were used to select the best pollen culture conditions and culture time of *Choerospondias axillaris* in vitro. I_2-KI staining method, TTC staining method and red ink staining method were used to dyeing the pollen respectively. Combined with the germination rate obtained after the culture of the best pollen germination conditions in vitro, different staining methods were compared to find a suitable method for rapid detection of pollen viability of *Choerospondias axillaris*. [**Result**] Sucrose, boric acid and calcium chloride had significant effects on pollen germination rate and pollen tube length of *Choerospondias axillaris* ($P<0.05$). The effects of three factors on pollen germination of *Choerospondias axillaris* were as follows: sucrose (A) > calcium chloride (C) > sucrose (B). The results of the orthogonal experiment showed that the combination of 20% sucrose, 0.3% boric acid and 0.03% calcium chloride had the best pollen germination effect. with the pollen germination rate of 91.41% and the pollen tube length of 250.91 μm. According to the results of range and variance analysis, the combination of 20% sucrose, 0.3% boric acid, and 0.02% calcium chloride, had the best pollen germination effect. After verification, the pollen germination rate is 93.27%, and the pollen tube length is 296.34 μm. The results were superior to the combination of 20% sucrose, 0.3% boric acid, and 0.03% calcium chloride. When the pollen was cultured in vitro for 6h, the pollen germination rate tended to stabilize, and the pollen tube length was moderate and not stacked, which was conducive to observation and statistical data. The red ink dyeing method had a similar germination rate to pollen in vitro germination culture, and there was no significant difference between the two methods ($P>0.05$), which can be used as a rapid detection method of the pollen vitality of *Choerospondias axillaris*. [**Conclusion**] The best culture combination for pollen germination in vitro of *Choerospondias axillaris* is 20% sucrose, 0.3% boric acid and 0.02% calcium chloride. The optimal cultivation time is 6 h. The red ink dyeing method is suitable for rapid detection of pollen viability of *Choerospondias axillaris*.

Keywords: *Choerospondias axillaris*; pollen; *in vitro* germination; pollen vitality

【研究意义】南酸枣(*Choerospondias axillaris*)系漆树科(Anacardiaceae)南酸枣属(*Choerospondias*)落叶乔木,别名五眼果、山枣子、鼻涕果等。该树种具有生长快、适应性强等特点,为速生多用途优良树种,在我国多个省份均有分布,国外主要分布于印度、中南半岛和日本等地[1]。南酸枣用途广泛,具有较高的材用、食用和药用价值[2],研究和开发价值前景广阔。当前,对于南酸枣的研究主要集中在栽培繁育[3]、药用价值[4]、果品加工[5]等方面,但目前尚未有关于南酸枣花粉活力相关的研究报道。花粉作为父本遗传信息的载体[6],对于开展人工授粉及杂交育种工作有着重要意义。南酸枣为雌雄异株植物,雄花花粉量大,在调查中发现不同雄花花期有较大差异,雌雄株花期也有所不同[7],在常规育种时,如若发生花期不遇或气候不宜等问题[8],测定花粉活力对于解决此类问题极为重要。【前人研究进展】常规的花粉活力检测方法主要分为离体培养法和染色法,离体培养法具有直观可靠性,但易受到如培养基组分(蔗糖、硼酸、钙离子等),环境因素(温度、湿度等)和培养时间等体外培养条件的影响[9-11];此外,不同植物花粉对于离体萌发培养的条件也存在差异,因此确定合适的培养基是保证花粉活力可靠性的前提。花粉活力染色法主要有TTC染色法、I_2-KI染色法、FDA荧光染色法、红墨水染色法等[12-13]。染色法作为一种快速检测花粉活力的方法,具有操作简便,时间简短等优势,但准确性有待检测,需经过花粉离体萌发培养得出的结果进行检验,才能用于花粉活力的快速测定。

【本研究切入点】目前,有关南酸枣花粉离体萌发培养和花粉活力快速检测方面的研究仍处于空白阶段。【拟解决的关键问题】本研究以南酸枣花粉为研究材料,采用$L_{16}(4^3)$正交试验设计,筛选南酸枣花粉离体萌发最适培养基与培养时间,并以离体萌发培养测定的萌发率为参照,选取TTC染色法、I_2-KI染色法和红墨水染色法对南酸枣花粉活力进行快速检测,以期找出最适合南酸枣花粉活力快速测定的方法。旨在为南酸枣的种质资源保存、杂交育种提供理论参考依据。

1　材料与方法

1.1　试验地概况及试验材料

试验地位于江西省南昌市江西农业大学南酸枣种质资源圃,地理坐标为28°57′N,115°39′E,属于亚热带季风湿润型气候,四季分明,年平均降水量约1 600 mm,年平均气温约19.1 ℃。试验地地势平坦,立地条件一致,土壤类型为红壤。

选取苗圃内健壮无病虫害9年生南酸枣雄株为试验材料。

1.2　花粉收集

2023年4月16日,于09:00—10:00,选择长势良好、无病虫害和开花旺盛的3株南酸枣雄株作为采粉树,剪下东南西北4个方位长势一致、将要开放的花穗,带回实验室插入盛有清水的锥形瓶中培养1~2 d,待花朵大量散粉时,将花粉抖落到硫酸纸上,混合收集至2 mL离心管中备用。

1.3　花粉离体萌发

根据前期预实验结果,与固体培养基相比,液体培养基对南酸枣花粉离体萌发效果更好,因此选取液体培养基为本试验培养基。采用正交试验设计($L_{16}(4^3)$),设置蔗糖(A)、硼酸(B)、氯化钙(C)3个因素,每个因素4个水平,共设16个处理,正交试验设计因素水平见表1。

取干净凹槽载玻片置于垫有湿润滤纸的培养皿内,滴加1~2滴培养液,用发丝蘸取少量花粉至培养液中,将其分散均匀,盖上培养皿盖子,置于25 ℃恒温培养箱内黑暗环境下培养,在10倍镜下镜检,以花粉管长度超过花粉直径为萌发,培养基分别设置培养时间2,4,6,8,10 h统计萌发结果,随机选取5个视野,每个视野花粉数大于100,重复3次。用显微测微尺测量花粉管长度,随机选取3个视野,每视野测量15根花粉管,计算其平均值,每个处理均重复3次。

花粉萌发率=(花粉萌发粒数/花粉总数)×100%　　(1)

表1　正交试验因素水平 $L_{16}(4^3)$

Tab.1　Orthogonal test design factors and levels

水平 Level	因素/% Factors		
	蔗糖(A) Sucrose	硼酸(B) H_3BO_3	氯化钙(C) $Cacl_2$
1	5	0.05	0.01
2	10	0.1	0.02
3	15	0.2	0.03
4	20	0.3	0.04

1.4　花粉活力快速检测方法

1.4.1　TTC(氯化三苯基四氮唑)染色法

在凹槽载玻片上滴加1~2滴试剂,用发丝蘸取少许花粉置于染液中,混合均匀,盖上盖玻片,在35 ℃恒温箱中染色30 min,TTC将有活力的花粉染成红色,无活力花粉呈浅色或无色[14]。随机选取5个视野观测,每个视野花粉数大于100,重复3次,下同。

1.4.2　I_2-KI(碘-碘化钾)染色法

操作同上,在室温下染色10 min,碘-碘化钾染色法是根据细胞内含物淀粉遇碘变蓝的原理进行,正常的花粉染成蓝色,生活力衰弱、内含物少的花粉呈黄褐色或不被染色[15]。

1.4.3　红墨水染色法

配制5%的红墨水染液,滴加1~2滴于凹槽载玻片上,用发丝蘸取少许花粉置于染液中,搅拌均匀后盖上盖玻片,室温染色,即刻镜检,有活力的花粉不被染色,无活力的花粉被染成红色。

花粉活力=(有活力的花粉数量 / 观测花粉数量)×100%　　(2)

1.5　数据统计分析

尼康ECLIPSE Ci-L显微镜下观察,并用NIS-Elements进行拍照,采用Image J进行花粉计数,Excel 2010进行数据统计,SPSS 26.0进行极差、方差分析和邓肯多重比较,Origin 2023和PS 2020进行绘图。

2 结果与分析

2.1 培养基组分对南酸枣花粉离体萌发影响

南酸枣正交试验结果(表2)表明,不同培养基上的花粉萌发率和花粉管长度均具有差异,组间差异显著(P<0.05)。其中,16号培养基($A_4B_4C_3$)的萌发率最高为91.47%,显著高于其他培养基(P<0.05),3号培养基($A_1B_3C_4$)的萌发率最低为2.20%,两者相差高达89.27%;14号培养基($A_4B_2C_2$)的花粉管长度最长为339.92 μm,显著高于其他培养基(P<0.05),8号培养基的花粉管长度最短为68.98 μm,显著低于其他培养基(P<0.05)。对表2的数据进行极差分析和方差分析,结果详见表3、表4。

表2 南酸枣花粉离体萌发正交实验结果

Tab.2 The results of orthogonal experiment on pollen germination *in vitro* of *Choerospondias axillaris*

培养基编号	因素 Factors			组合	萌发率/%	花粉管长度/μm
Medium number	A	B	C	Combinations	Germination rate	Pollen tube length
1	5	0.05	0.01	$A_1B_1C_1$	23.46±2.33^{e}	112.33±22.32^{hi}
2	5	0.1	0.03	$A_1B_2C_3$	2.71±0.51^{h}	136.18±3.60^{fgh}
3	5	0.2	0.04	$A_1B_3C_4$	2.20±0.23^{h}	102.55±4.07^{i}
4	5	0.3	0.02	$A_1B_4C_2$	45.13±4.55^{c}	98.43±10.69^{i}
5	10	0.05	0.02	$A_2B_1C_2$	28.31±2.07^{e}	243.05±25.37^{cde}
6	10	0.1	0.04	$A_2B_2C_4$	12.06±1.96^{fg}	160.61±11.30^{f}
7	10	0.2	0.03	$A_2B_3C_3$	37.69±3.14^{d}	141.95±6.28^{fg}
8	10	0.3	0.01	$A_2B_4C_1$	22.81±1.52^{e}	68.98±14.35^{j}
9	15	0.05	0.03	$A_3B_1C_3$	23.78±2.11^{e}	120.34±7.70^{ghi}
10	15	0.1	0.01	$A_3B_2C_1$	7.08±1.40^{gh}	265.98±11.55^{bc}
11	15	0.2	0.02	$A_3B_3C_2$	45.67±2.48^{c}	219.73±18.70^{e}
12	15	0.3	0.04	$A_3B_4C_4$	25.50±4.14^{e}	285.28±8.91^{b}
13	20	0.05	0.04	$A_4B_1C_4$	63.09±5.66^{b}	227.54±7.68^{de}
14	20	0.1	0.02	$A_4B_2C_2$	67.45±2.79^{b}	326.92±22.47^{a}
15	20	0.2	0.01	$A_4B_3C_1$	14.58±3.37^{f}	262.74±15.13^{bc}
16	20	0.3	0.03	$A_4B_4C_3$	91.41±3.33^{a}	250.91±25.47^{cd}

同列字母不同表示差异显著(P<0.05),同列字母相同表示差异不显著(P>0.05),表格内数据为平均值±标准差。

Different letters in the same column indicate significant differences(P<0.05), while identical letters in the same column indicate insignificant differences(P>0.05).The data in the table is the mean±standard deviation.

由极差分析(表3)可知,以花粉萌发率为评价标准,参试3个因素对花粉萌发率影响的主次关系依次为A(蔗糖)、C(氯化钙)和B(硼酸),最佳萌发率组合为$A_4B_4C_2$,即20%蔗糖、0.3%硼酸和0.02%氯化钙,但试验结果表明$A_4B_4C_3$为最佳萌发率组合,因此,需要进一步验证。以花粉管长度为评价标准,各因素对花粉管长度的影响由大到小次序为A(蔗糖)、C(氯化钙)和B(硼酸),最佳组合为$A_4B_2C_2$,即20%蔗糖、0.1%硼酸和0.02%氯化钙,与试验结果吻合。

由方差分析(表4)可知,蔗糖、硼酸、氯化钙对南酸枣花粉萌发率的影响均达到极显著水平(P<0.01),是影响南酸枣花粉萌发的关键因素,根据F值的大小对影响南酸枣花粉萌发率的因素进行排序,从强到弱依次为A(蔗糖)、C(氯化钙)和B(硼酸),结果与极差分析一致。蔗糖对于南酸枣花粉管长度的影响达到极显著水平(P<0.01),硼酸、氯化钙对于南酸枣花粉管长度的影响达到显著水平(P<0.05),根据影响南酸枣花粉管长度3个因素的F值大小进行排序,从大到小依次为A(蔗糖)、C(氯化钙)和B(硼酸),结果与极差分析完全一致。进一步对这3个因素进行邓肯多重比较。

极差分析(表3)和方差分析(表4)结果均表明,蔗糖对于南酸枣花粉萌发率和花粉管长度影响最明显,其萌发率和花粉管长度均随着蔗糖浓度的增大而增大。邓肯多重比较显示,对于花粉萌发率,蔗糖浓度水平4与其他3个水平间差异显著,其他水平间差异不显著;对于花粉管长度,蔗糖浓度4个水平间均差异显著(表3)。蔗糖浓度20%时,南酸枣花粉萌发率和花粉管长度均最大,因此蔗糖浓度最适为20%。

氯化钙是仅次于蔗糖对试验结果影响的因素。由邓肯多重比较显示,对于花粉萌发率,氯化钙浓度水平 1 和水平 4、水平 2 和水平 3 之间差异不显著,其余水平间差异显著;对于花粉管长度,氯化钙浓度水平 2 与其他 3 个水平间差异显著,其他水平间差异不显著(表 3)。低浓度的氯化钙对南酸枣萌发率有促进作用,氯化钙浓度 0.02% 时,南酸枣花粉萌发率和花粉管长度均最大,因此氯化钙浓度最适为 0.02%。

硼酸对试验结果影响最小,根据邓肯多重比较分析来看,对于花粉萌发率,硼酸浓度水平 4 与其余 3 个水平之间差异显著,水平 1 与水平 2、水平 3 有显著差异,水平 2 与水平 3 之间无显著差异;对于花粉管长度,硼酸浓度水平 2 与其他 3 个水平间差异显著,其他水平间差异不显著(表 3)。当硼酸浓度为 0.3% 时,花粉萌发率最高,当硼酸浓度为 0.1% 时,花粉管长度最大。

根据上述结果分析可知,南酸枣花粉最适蔗糖浓度为 20%,最适氯化钙浓度为 0.02%,硼酸浓度有待进一步验证。对组合 $A_4B_4C_2$ 和组合 $A_4B_2C_2$ 进行验证,培养 6 h 时,组合 $A_4B_4C_2$ 南酸枣花粉萌发的萌发率和花粉管长度分别为 93.27% 和 296.34 μm,组合 $A_4B_2C_2$ 南酸枣花粉萌发的萌发率和花粉管长度分别为 67.83% 和 321.46 μm。以花粉萌发率为花粉萌发效果的主要评价指标,综上所述,南酸枣花粉萌发的最优培养组合为 $A_4B_4C_2$,即 20% 蔗糖、0.3% 硼酸和 0.02% 氯化钙。

表 3　不同培养基上花粉萌发率与花粉管长度极差分析

Tab.3　Range analysis of pollen germination rate and pollen tube length on different media

指标 Index	萌发率/% Germination rate			花粉管长度/μm Pollen tube length		
	A	B	C	A	B	C
K_1	18.38^{b}	34.66^{b}	16.98^{b}	112.37^{d}	175.82^{b}	177.51^{b}
K_2	25.22^{b}	22.33^{c}	46.64^{a}	153.65^{c}	222.42^{a}	222.03^{a}
K_3	25.51^{b}	25.04^{bc}	38.90^{a}	222.83^{b}	181.74^{b}	162.35^{b}
K_4	59.13^{a}	46.21^{a}	25.71^{b}	267.03^{a}	175.90^{b}	194.00^{ab}
R	40.76	23.89	29.66	154.65	46.61	59.69

K_1、K_2、K_3、K_4 分别表示各因素 4 个水平的均值,R 代表极差,同列字母不同表示差异显著(P<0.05),同列字母相同表示差异不显著(P>0.05)。

K_1, K_2, K_3, and K_4 represent the mean values of the four levels of each factor. R stands for range. Different letters in the same column indicate significant differences (P<0.05), while identical letters in the same column indicate insignificant differences (P>0.05).

表 4　不同培养基上花粉萌发率与花粉管长度方差分析

Tab.4　Variance analysis of pollen germination rate and pollen tube length on different media

项目 Items	因素 Factors	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	显著性 Significance
萌发率 Germination rate	A	12 119.454	3	4 039.818	24.730	**
	B	4 214.089	3	1 404.696	8.599	**
	C	6 323.395	3	2 107.798	12.903	**
	误差 Error	6 207.469	38	163.354		
花粉管长度 Pollen tube length	A	172 253.979	3	57 417.993	27.590	**
	B	18 182.225	3	6 060.742	2.912	*
	C	23 503.909	3	7 834.636	3.765	*
	误差 Error	79 083.415	38	2 081.142		

**和*分别表示极显著差异(P<0.01)和显著差异(P<0.05)。

** and * indicate extremely significant difference (P<0.01) and significant difference (P<0.05) respectively.

2.2　花粉萌发最佳培养时间筛选

在最适培养基条件下(20% 蔗糖、0.3% 硼酸和 0.02% 氯化钙)进行花粉培养,由图 1、图 2 可知,南酸枣花粉在 2 h 时开始萌发,随着时间增长萌发率快速上升后趋于稳定,在培养 2~4 h 和 4~6 h 内南酸枣花粉萌发率和花粉管长度均显著增加(P<0.05),培养 6 h 后花粉萌发率趋于稳定,花粉管长度在培养 6~10 h 内增长缓慢,培养 8 h 时,花粉管有所堆叠,10 h 时花粉管已有破损迹象且花粉管弯曲交织,不利于花粉萌发率的统计以及花粉管长度的测量,因此南酸枣花粉最佳离体培养统计时间为 6 h。

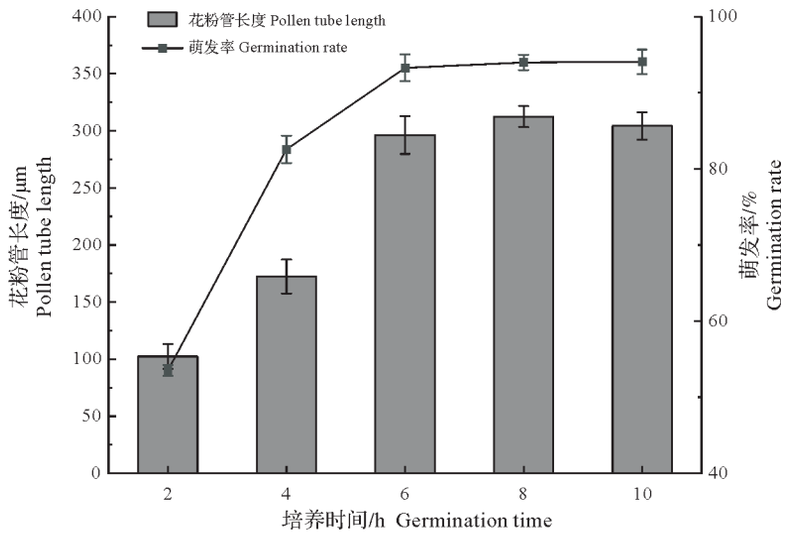


图 1 离体培养时间对南酸枣花粉萌发和花粉管伸长的影响

Fig.1 Effects of germination time in vitro on pollen germination and pollen tube length of *Choerospondias axillaris*

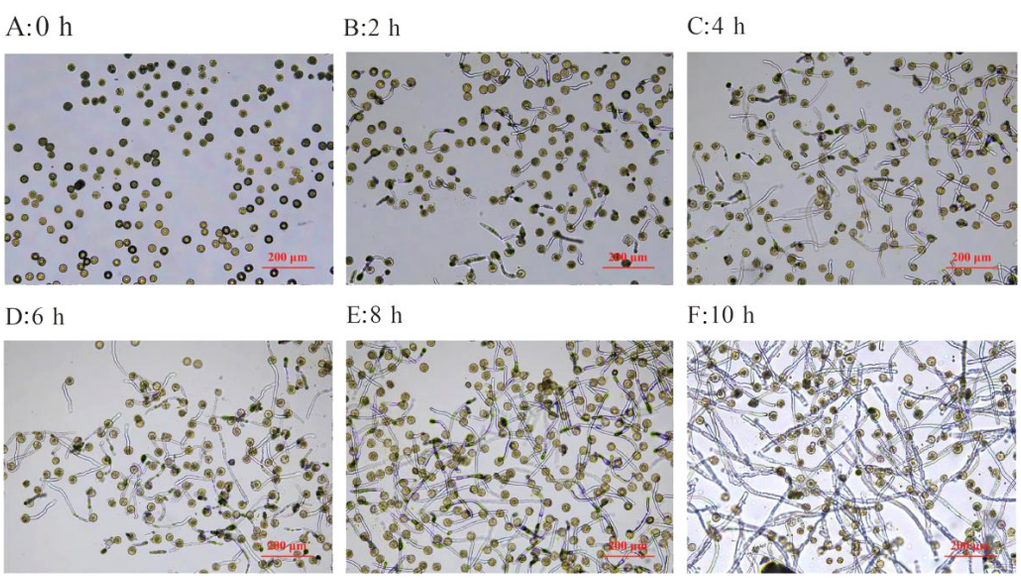
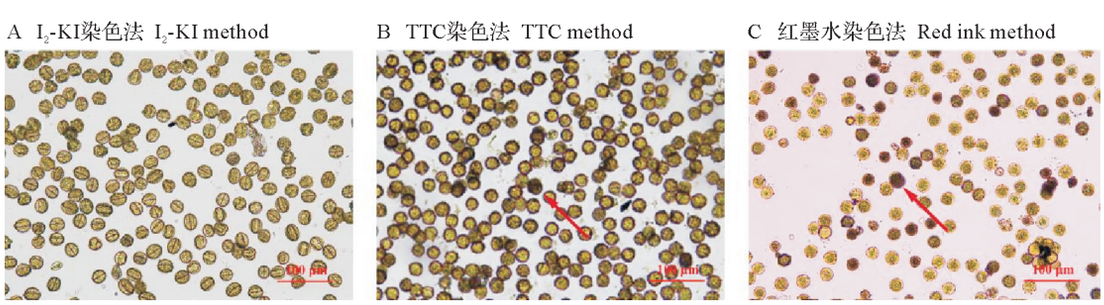


图 2 南酸枣花粉萌发和花粉管生长随时间的变化情况

Fig.2 Changes of pollen germination and pollen tube growth with germination time of *Choerospondias axillaris*

2.3 花粉染色方法比较

3 种染色方法的结果表明，使用 I_2-KI 不能将南酸枣花粉染色（图 3A），重复试验，花粉仍然不能着色，因此 I_2-KI 染色法不适用于南酸枣花粉活力快速检测。使用 TTC 对南酸枣花粉进行染色，有活力的



箭头指向被染色花粉。

The arrow points to the stained pollen.

图 3 不同染色法南酸枣花粉活力镜检结果

Fig.3 Microscopic examination results of pollen viability of *Choerospondias axillaris* by different staining methods

花粉被染成红色(图 3B),花粉活力为 13.09%,结果显著低于花粉离体萌发法(P<0.05)(表 5),因此不适合作为南酸枣花粉活力快速检测的方法。红墨水染色法效果如图 3C 所示,没有活力的花粉被染成红色,有活力的花粉未被染色,测得红墨水染色法的南酸枣花粉活力为 92.54%,与离体萌发培养结果差异不显著(P>0.05)(表 5),证明其准确度较高,适宜作为南酸枣花粉活力快速检测的方法。

表 5　不同方法检测南酸枣花粉活力比较

Tab.5　Comparison of different methods for detecting pollen viability of *Choerospondias axillaris*

方法 Methods	花粉活力 Pollen viability
离体萌发法 Germination in vitro	93.27%±3.96^{a}
I_2-KI 染色法 I_2-KI method	0%±0^{c}
TTC 染色法 TTC method	13.09%±1.43^{b}
红墨水染色法 Red ink method	92.54%±5.47^{a}

同列字母不同表示差异显著(P<0.05),同列字母相同表示差异不显著(P>0.05),表格内数据为平均值±标准差。

Different letters in the same column indicate significant differences(P<0.05), while identical letters in the same column indicate insignificant differences(P>0.05).The data in the table is the mean±standard deviation.

3　讨论与结论

蔗糖对于花粉离体培养起着至关重要的作用,它能够维持花粉萌发所需的渗透压,是花粉萌发和花粉管形成的主要营养物质[16]。适当浓度的蔗糖在花粉萌发和花粉管生长中起主导作用[17],合适浓度的蔗糖可以促进花粉萌发和花粉管发育,而过高或过低浓度的蔗糖则会抑制这两个过程。本研究结果表明,蔗糖浓度对南酸枣花粉萌发和花粉管生长方面存在极显著影响,南酸枣花粉萌发率和花粉管长度随着蔗糖浓度的增加而增加,当蔗糖浓度为 20% 时,萌发率达到最高,此时花粉管生长健壮、长度均匀,这与核桃[18]、甘蔗[19]、大叶相思花[6]所需的蔗糖浓度一致,说明 20% 的蔗糖浓度适合多种植物的离体萌发培养。

硼酸是影响花粉萌发率和花粉管生长的重要因素。硼酸参与花粉管顶端细胞壁的形成和果胶的合成,它可以与糖形成糖-硼酸化合物,促进糖的吸收与代谢[17,20],因此适宜的硼酸浓度可以提高花粉的萌发率和花粉管长度。本研究结果表明,硼酸对南酸枣花粉萌发有显著影响,当硼酸浓度为 0.1% 和 0.3% 时,南酸枣花粉管长度和花粉萌发率最好,显著高于其他浓度处理。在本试验中,发现南酸枣花粉萌发率和花粉管伸长所需的硼酸浓度不同,李千惠等[21]对日本海棠花粉的研究中也存在这一现象,导致该结果的原因有待深入探究。

钙离子是花粉萌发和花粉管生长必需的物质成分和信号分子,它对于启动花粉萌发、调节花粉管伸长等环节具有重要作用[22-23]。已有大量研究[21,24-26]结果表明,一定浓度的外源钙离子可以促进花粉萌发和花粉管生长,过高浓度的钙离子则会导致细胞嘭压,抑制花粉管的伸长。常海龙等[19]对甘蔗花粉离体萌发的研究结果与李千惠等[21]对日本海棠离体萌发培养的研究结果发现,花粉本身携带有一定量的内源钙离子,低浓度的外源钙离子更有利于花粉萌发和花粉管生长。本试验结果与前人研究结果类似,在氯化钙浓度为 0.02% 时,南酸枣花粉萌发率和花粉管长度最好,超过这个浓度时,花粉萌发率和花粉管长度逐渐被抑制,分析可能是由于南酸枣花粉体内本身便具有一定量的钙离子,所以对于外源钙离子的需求量较少。

培养时间是影响花粉萌发的重要因素,培养时间的长短对花粉萌发观测结果具有显著影响。培养时间过短,花粉还没完全萌发,统计的数据不准确;培养时间过长,花粉管堆积交叠在一起,甚至是破裂,不利于花粉萌发率的统计和花粉管的测量,因此选择最恰当的花粉培养时间极为重要。本研究结果表明,培养 6 h 时,南酸枣花粉萌发率趋于稳定,此时花粉管长度适宜、不堆叠,易于观察统计数据,所以 6 h 为南酸枣花粉最佳培养时间。

染色法作为检测花粉活力的方法,具有快速、简便的优势,对于杂交育种工作有着重要意义。染色法是以细胞中活性物质、酶活性的高低以及细胞膜的通透性和完整性为检测基础,受花粉自身特性的影响较大,不同物种之间适用的染色方法差异极大[27-28]。在本试验中,I_2-KI 不能使花粉染色,分析这是由于南酸枣花粉体内所含淀粉不足导致的这一现象。魏冬梅等[29]的研究发现,油茶花粉属于脂质型而不属于淀粉型,花粉体内淀粉含量少,I_2-KI 很难将油茶花粉染色,陈雅等[30]的研究也印证了这一发现,所以

I_2-KI染色法不适宜作为南酸枣花粉的快速检测方法。TTC染色的原理是花粉呼吸代谢所产生的$NADH_2$或者$NADPH_2$与TTC结合，从而使花粉着色[13]，TTC只能将少量花粉染色，说明可能是南酸枣花粉呼吸所产生的脱氢酶含量较少导致的。红墨水染色法操作简便，染色效果最佳，与花粉离体培养法结果近似，是快速测定南酸枣花粉活力最适的方法。但在试验操作过程中需抓紧时间，染色后立即镜检，因为红墨水染色法的原理是活性细胞的细胞膜具有选择透过性，红墨水中的酸性大红G染料不能进入有活力的花粉，所以有活力的花粉不被染色，而随着染色时间的延长，多数花粉会失去选择透过性，染料进入细胞导致花粉被染色，影响试验结果的准确性。

综上，蔗糖、硼酸和氯化钙对南酸枣花粉离体培养均有显著影响（$P<0.05$），南酸枣花粉最适的离体萌发培养条件是20%蔗糖、0.3%硼酸和0.02%氯化钙；培养时间为6 h时，观察和统计花粉萌发和花粉管长度最为合适；红墨水染色法是最接近离体萌发效果的染色方法，可以作为南酸枣花粉活力快速检测的方法。

致谢：江西省林业厅科技创新项目（创新专项[2021]04号）同时对本研究给予了资助，谨致谢意！

参考文献 References：

[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，1980.
Editorial Committee of Flora of China.The flora of China[M].Beijing：Science Press，1980.

[2] 高阳，巴元富，李宏宇，等.不同贮藏温度条件下南酸枣果实色泽和质地的变化[J].经济林研究，2021，39(4)：239-245.
GAO Y，BA Y F，LI H Y，et al.Changes of color and texture of *Choerospondias axillaris* fruit at different storage temperatures [J].Non-wood forest research，2021，39(4)：239-245.

[3] 熊伟，汪加魏，孙荣喜，等.南酸枣苗木繁育技术研究进展[J].南方林业科学，2023，51(1)：54-58.
XIONG W，WANG J W，SUN R X，et al.Research progress on seedling breeding technique of *Choerospondias axillaris*[J].South China forestry science，2023，51(1)：54-58.

[4] DOANH N D，HAM N N，TAM N T，et al.The use of a water extract from the bark of *Choerospondias axillaris* in the treatment of second decree burns[J].Journal of plastic surgery and hand surgery，1996，30(2)：139-144.

[5] 高阳，丁菲，吴南生，等.漂烫时间对南酸枣果实糖酸组分的影响[J].江西农业大学学报，2021，43(4)：759-765.
GAO Y，DING F，WU N S，et al.Effect of different blanching time lengths on sugar and acid components of *Choerospondias axillaris* fruit[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis，2021，43(4)：759-765.

[6] 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)：67-73.
ZHAN N，HUANG L J.Conditions for in vitro germination and testing method for pollen viability of *Acacia auriculiformis*[J].Scientia silvae Sinicae，2016，52(2)：67-73.

[7] 丁菲，孙荣喜，汪加魏，等.南昌地区南酸枣物候初步观测[J].生物灾害科学，2019，42(4)：327-331.
DING F，SUN R X，WANG J W，et al.Phenological observation of *Choerospondias axillaris* in Nanchang[J].Biological disaster science，2019，42(4)：327-331.

[8] 李倩中，荣立苹，李淑顺，等.鸡爪槭花粉活力与贮藏特性的研究[J].西南农业学报，2016，29(6)：1307-1310.
LI Q Z，RONG L P，LI S S，et al.Research on pollen germination and pollen preservation characteristics of *Acer palmatum* [J].Southwest China journal of agricultural sciences，2016，29(6)：1307-1310.

[9] LEECH L，SIMPSON D W，WHITEHOUSE A B.Eeffct of temperature and relative humidity on pollen germination in four strawberry cultivars[J].Acta horticulturae，2002，567(53)：261-263.

[10] PHAM V T，HERRERO M，HORMAZA J I.Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth in longan (*Dimocarpus longan* Lour.)[J].Scientia horticulturae，2015，197(14)：470-475.

[11] 刘蓉，吴德军，王因花，等.白蜡花粉最佳离体萌发培养基筛选[J].南京林业大学学报(自然科学版)，2023，47(3)：70-76.
LIU R，WU D J，WANG Y H，et al.Screening of optimal germination medium for *in vitro Fraxinus*[J].Journal of Nanjing forestry university(natural sciences edition)，2023，47(3)：70-76.

[12] PINILLOS V J.Standardization of the fluorochromatic reaction test to assess pollen viability[J].Biotechnic and histochemistry，2008，83(1)：15-21.

[13] 王金花，张健琴，成良强，等.不同方法测定花生花粉活力的比较研究[J].种子，2022，41(8)：126-130.
WANG J H，ZHANG J Q，CHENG L Q，et al.Comparative study on pollen vitality determination of peanut by different methods[J].Seed，2022，41(8)：126-130.

[14] 孙坤，张玉娜，苏雪，等.中国沙棘花粉生活力检测方法比较研究[J].西北师范大学学报(自然科学版)，2009，45(2)：78-81.

SUN K, ZHANG Y N, SU X, et al.Comparison of the detection methods of pollen viability of *Hippophae rhamnoides* L. ssp. sinensis Rousi[J].Journal of northwest normal university(natural science), 2009, 45(2): 78-81.

[15] 胡晋.花粉的保存和生活力测定[J].种子, 1992, 11(6): 33-35.
HU J.Pollen preservation and viability determination[J].Seed, 1992, 11(6): 33-35.

[16] LIN Y, WANG Y, IQBAL A, et al.Optimization of culture medium and temperature for the *in vitro* germination of oil palm pollen[J].Scientia horticulturae, 2017, 220(16): 134-138.

[17] FRAGALLAH S, LIN S, LI N, et al.Effects of sucrose, boric acid, pH, and incubation time on in vitro germination of pollen and tube growth of Chinese fir(*Cunnighamial lanceolata* L.)[J].Forests, 2019, 10(2): 102-117.

[18] 王艳, 金强, 冯一峰, 等.新疆早实核桃花粉离体培养基的筛选[J].塔里木大学学报, 2015, 27(2): 28-33.
WANG Y, JIN Q, FENG Y F, et al.Orthogonal optimization of pollen germinating culturel medium in vitro from precocious walnut in Xinjiang[J].Journal of Tarim university, 2015, 27(2): 28-33.

[19] 常海龙, 张伟, 陈俊吕, 等.甘蔗花粉离体萌发研究[J].热带作物学报, 2019, 40(10): 2068-2075.
CHANG H L, ZHANG W, CHEN J L, et al.Sugarcane pollen germination *in vitro*[J].Chinese journal of tropical crops, 2019, 40(10): 2068-2075.

[20] 杨延红, 宋桂全, 董慧, 等.连翘花粉离体萌发及活力测定[J].北方园艺, 2021, 43(10): 112-117.
YANG Y H, SONG G Q, DONG H, et al.Germination and viability of *Forsythia suspensa* pollen *in vitro*[J].Northern horticulture, 2021, 43(10): 112-117.

[21] 李千惠, 姜文龙, 徐同乐, 等.日本海棠花粉最佳离体萌发培养基筛选及萌发过程研究[J].经济林研究, 2018, 36(2): 154-160.
LI Q H, JIANG W L, XU T L, et al.Selection of pollen *in vitro* germination media and pollen germination process of *Malus floribunda*[J].Non-wood forest research, 2018, 36(2): 154-160.

[22] 戴雨沁, 程梦雨, 顾佩乾, 等.钙源对梨花粉萌发及花粉管生长的影响[J].江苏农业科学, 2020, 48(19): 142-144.
DAI Y Q, CHENG M Y, GU P Q, et al.Impacts of calcium sources on pollen germination and pollen tube growth of pear[J].Jiangsu agricultural sciences, 2020, 48(19): 142-144.

[23] 陈伟, 李江, 孟梦, 等.糖、硼、钙对思茅松花粉离体萌发及花粉管生长的影响[J].云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(3): 496-501.
CHEN W, LI J, MENG M, et al.Effects of sucrose, boron and calcium on the pollen germination and tube growth of *Pinus kesiya* var. *langbianensis in vitro*[J].Journal of Yunnan agricultural university(natural science), 2020, 35(3): 496-501.

[24] 卢梦琪, 周俊琴, 刘懿瑶, 等.外源钙离子对NaCl胁迫下油茶花粉萌发的影响[J].中南林业科技大学学报, 2021, 41(6): 91-98.
LU M Q, ZHOU J Q, LIU Y Y, et al.Effects of exogenous Ca^{2+} on pollen germination of *Camellia oleifera* under NaCl stress[J].Journal of central south university of forestry & technology, 2021, 41(6): 91-98.

[25] 韩霜.钙和硼对菊花品种金陵丰收花粉萌发及花粉管生长的影响[J].江苏农业科学, 2016, 44(5): 258-261.
HAN S.Effects of calcium and boron on pollen germination and pollen tube growth of *Chrysanthemum* cultivar 'jinlingfengshou'[J].Jiangsu agricultural sciences, 2016, 44(5): 258-261.

[26] CONNER P J.Optimization of in vitro pecan pollen germination[J].HortScience, 2011, 46(4): 571-576.

[27] 秦晓君, 潘磊, 牛永志, 等.烟草花粉活力检测方法筛选[J].云南大学学报(自然科学版), 2020, 42(3): 592-598.
QIN X J, PAN L, NIU Y Z, et al.Screening on the methods for detecting the pollen viability of *Nicotiana*[J].Journal of Yunnan university(natural sciences edition), 2020, 42(3): 592-598.

[28] 宋静, 王娟, 杜春, 等.不同海拔分布的滇牡丹种源花粉活力差异分析[J].植物生理学报, 2022, 58(9): 1675-1684.
SONG J, WANG J, DU C, et al.Analysis on the difference of pollen viability of *Paeonia delavayi* provenances at different altitudes[J].Plant physiology journal, 2022, 58(9): 1675-1684.

[29] 魏冬梅, 高超, 袁德义.油茶花药发育中多糖和脂滴组织化学研究[J].中国细胞生物学学报, 2013, 35(11): 1598-1602.
WEI D M, GAO C, YUAN D Y.Histochemical study of polysaccharides and lipids on the developing anthers of *Camellia oleifera* Abel[J].Chinese journal of cell biology, 2013, 35(11): 1598-1602.

[30] 陈雅, 袁德义, 李葵, 等.油茶"三华系列"花粉活力测定及花粉保存[J].江西农业大学学报, 2020, 42(1): 118-126.
CHEN Y, YUAN D Y, LI K, et al.Viability determination and preservation of pollen of *Camellia oleifera* 'huashuo'、'huaxin' and 'huajin'[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2020, 42(1): 118-126.