

# 培养基组分对锦带花粉离体萌发的影响

刘雪莲, 秦佳梅, 孙珺博

(通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002)

**摘要:**以锦带新鲜花粉为试材,采用正交设计  $L_{16}(4^5)$ ,研究了蔗糖浓度、钙离子浓度、硼酸浓度对锦带花粉离体萌发的影响,以期筛选出锦带花粉离体萌发的最适宜培养基成分。结果表明:蔗糖浓度和钙离子浓度对花粉萌发和生长影响较大,硼酸的影响不如二者显著。锦带花粉离体萌发最适宜培养基成分为:蔗糖 25%、硼酸 0.016%、钙离子 0.0050%。

**关键词:**锦带;花粉萌发;培养基成分

**中图分类号:**S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0129-03

锦带(*Diervilla sessilifolia*)为忍冬科落叶直立灌木,花期 4~6 月,锦带花枝叶茂密,花色艳丽,花期可长达 2 个多月<sup>[1-2]</sup>,适宜庭院墙隅、湖畔群植;也可在树丛林缘作花篱、丛植配植;点缀于假山、坡地。锦带属阳性树种,喜光、耐寒、耐旱、怕水涝,对土壤要求不严,是一种很好的园林绿化装饰树种<sup>[3]</sup>。近年来,很多学者对观赏植物<sup>[4-6]</sup>、果树<sup>[7-8]</sup>等的花粉离体萌发研究报道很多,但锦带花粉离体萌发的研究报道较少,该试验以锦带新鲜花粉为试材,采用正交实验方法,研究了其花粉离体萌发的最适培养基成分及其浓度,以期对锦带花粉的生殖生物学研究、植物的品种改良与育种操作、种质库保存提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选择通化师范学院校园内新鲜的锦带花粉,于盛花

期上午 8:00~10:00 采集花粉进行萌发试验。选择当天开放完整、花粉多的花朵,最好在晴天采集。

### 1.2 试验方法

将加热的培养基均匀地倒在载玻片上,等冷凝后形成厚度均匀的固体培养基,采集当天开放的花朵,将花粉抖落在上述载玻片上的培养基表面,每个载玻片 2~3 朵花,每个浓度处理重复 3 次。为防止培养基水分蒸发,将载玻片放入垫有湿润滤纸的培养皿中,每个处理的玻片放入同一个培养皿中,置于 25℃ 条件下培养,2~3 h 后用显微镜 10×10 倍观测花粉萌发率和花粉管长度,以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准,每处理统计约 100 粒花粉和 10 个花粉管。试验中每个处理重复 3 次。试验采用固体培养基(培养基的基础成分:5 g/L 琼脂+蒸馏水)。蔗糖设置 10%、15%、20%、25% 4 个浓度梯度;硼酸设置 0.014%、0.016%、0.018%、0.020% 4 个浓度梯度;硝酸钙为 0.0025%、0.0050%、0.0075%、0.0100% 4 个浓度梯度。采用 3 因素 4 水平  $L_{16}(4^5)$  正交实验,各因素和水平见表 1。

**第一作者简介:**刘雪莲(1978-),女,硕士,讲师,现主要从事植物资源多样性保护与利用方面的研究工作。E-mail:liuxuelian1023@163.com.

**收稿日期:**2012-09-03

## Study on Detection of Pepper Mild Mottle Virus by RT-PCR

ZHENG Min<sup>1</sup>, GUO Shi-hui<sup>1</sup>, ZHANG Na-na<sup>1</sup>, YANG Hong-yi<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** A number of peppers infected virus were found by field survey. The virus was inoculated mechanically to tobacco leaves, and the symptoms including mottle and mosaic leaves, could be observed in tobacco. Total RNA, extracted from infected pepper and tobacco with CTAB method, was used as template in RT-PCR with the special primers of pepper mild mottle virus (PMMoV). Expected fragments were obtained and sequenced. It showed that this virus was identified as PMMoV. RT-PCR detection system for PMMoV was established.

**Key words:** pepper mild mottle virus; inoculate mechanically; RT-PCR

表 1 正交设计的因素和水平

水平	因素		
	(A)蔗糖/%	(B)硼酸/%	(C)硝酸钙/%
1	10	0.014	0.0025
2	15	0.016	0.0050
3	20	0.018	0.0075
4	25	0.020	0.0100

## 1.3 数据分析

采用 DPS 统计软件对各处理进行方差分析。

## 2 结果与分析

## 2.1 不同培养基中花粉萌发率和花粉管长度的比较

在 25℃ 的培养条件下 2~3 h 后在显微镜下观察,不同处理下的培养基中都发现有花粉粒萌发,只是在不同培养基中萌发率和花粉管长度各不相同。由表 2 可以看出,12 号培养基的萌发率最高,达到 90%,花粉管平均长度为 0.478 mm,长势较好,长短适宜,且分布均匀。而 9 号培养基的萌发率最低,仅达到 14.06%,萌发的数量较少,花粉管长势不好,分布也不均匀,但并没有出现畸形,只是花粉粒有部分内容物溢出,这可能是由于培养基成分最简单,其水势高花粉粒吸水胀破引起的。

表 2  $L_{16}(4^5)$  正交实验结果

编号	蔗糖/%	硼酸/%	硝酸钙/%	萌发率/%	花粉管长度/mm
1	10	0.014	0.0025	77.90	0.33
2	10	0.016	0.0050	65.33	0.29
3	10	0.018	0.0075	62.89	0.34
4	10	0.020	0.0100	70.67	0.34
5	15	0.014	0.0050	68.85	0.25
6	15	0.016	0.0025	62.52	0.37
7	15	0.018	0.0100	57.70	0.41
8	15	0.020	0.0075	37.84	0.37
9	20	0.014	0.0075	14.06	0.23
10	20	0.016	0.0100	64.91	0.39
11	20	0.018	0.0025	24.00	0.18
12	20	0.020	0.0050	90.00	0.478
13	25	0.014	0.0100	66.67	0.43
14	25	0.016	0.0075	76.00	0.44
15	25	0.018	0.0050	81.82	0.29
16	25	0.020	0.0025	54.00	0.32

## 2.2 3 个因素对萌发率和花粉管长度的影响

对萌发率和花粉管长度进行极差分析可知,各因素内的水平极差值( $R$ )和水平均值( $K_i$ ), $R$  的大小可反映该因素对试验结果的影响程度。3 种因素对锦带花粉萌发率的影响的主次关系依次为:C、A、B;对花粉管长度的影响的主次关系依次为:C、B、A。由此可以看出,培养基中硝酸钙对花粉的萌发率影响最大,其次是蔗糖,而硼酸的影响最小。而对花粉管长度的影响而言,硝酸钙的影响最大,硼酸次之,影响最小的是蔗糖。根据各因素的水平均值( $K_i$ )的大小,可得出各因素对锦带花粉萌发

率的大小依次是:A(1,4,2,3),B(2,4,3,1),C(2,4,1,3);花粉管长度的大小依次是:A(4,2,1,3),B(2,4,1,3),C(4,3,2,1)。由此得出最适合锦带花粉萌发的组合是  $A_1B_2C_2$  (对于萌发率)或  $A_4B_2C_4$  (对于花粉管长度)。

表 3  $L_{16}(4^5)$  正交实验结果

水平均值	蔗糖/%	硼酸/%	硝酸钙/%
K1	69.6917	56.5417	55.2417
K2	56.6917	66.6083	76.5250
K3	48.0667	57.1583	47.3667
K4	69.6000	63.7417	64.9167
R	21.625	10.0667	29.1583
K1	0.323	0.306	0.292
K2	0.346	0.369	0.318
K3	0.312	0.293	0.339
K4	0.356	0.368	0.388
R	0.044	0.076	0.096

## 2.3 花粉萌发率和花粉管长度的方差分析

由表 4 方差分析可知,蔗糖(A)对花粉萌发率的影响达到极显著水平,对花粉管长度的影响达到显著水平,硼酸(B)对花粉萌发率影响均达到显著水平,对花粉管长度的影响达到极显著水平,硝酸钙(C)无论对花粉萌发率还是花粉管长度的影响都达到极显著水平,说明培养基中蔗糖和硝酸钙的浓度对花粉萌发率有着重要的影响,而硼酸对萌发率的影响则不如二者显著。硼酸和硝酸钙的浓度对花粉管长度有着重要的影响,而蔗糖对花粉管长度的影响则不如二者显著。

表 4  $L_{16}(4^5)$  正交实验的方差分析

项目	变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著性水平
萌发率/%	A	3	4 024.048	1 341.349	17.0547**	0.0001
	B	3	883.2558	294.4186	3.7434*	0.0206
	C	3	5 704.698	1 901.566	24.1776**	0.0001
	误差	32	2 516.8	1 444.279		
花粉管长度/mm	A	3	0.015	0.005	1.9257*	0.1467
	B	3	0.0577	0.0192	7.4173**	0.0007
	C	3	0.0594	0.0198	7.6446**	0.0006
	误差	30	0.0778	0.0026		

注:表中\*和\*\*分别表示显著(0.05)和极显著(0.01)水平。

## 2.4 各因素浓度之间的多重比较

对蔗糖(A)、硼酸(B)和硝酸钙(C)浓度的多重比较见表 5。对 3 个因素进行 SSR 检验,由表 5 可知,蔗糖浓度  $A_1$ 、 $A_4$  水平间花粉萌发率无显著差异。但是  $A_4$  对花粉管长度的影响更好一些,所以选择  $A_4$  蔗糖浓度。 $B_2$ 、 $B_4$  比其它 2 组更有优势,但综合来看  $B_2$  水平略微高于  $B_4$  水平,在实际观察中长势较好优于  $B_4$  水平,应取  $B_2$  水平。对于硝酸钙浓度, $C_1$ 、 $C_3$  水平的萌发率明显低于  $C_2$ 、 $C_4$  水平, $C_2$  萌发率最高为 76.5250%,其花粉管长度亦最长,所以应取  $C_2$  水平。通过以上综合分析可以看出,最适合锦带花粉离体萌发的最适培养基成分组合为  $A_4B_2C_2$ ,即蔗糖浓度为 25%,硼酸浓度为 0.016%,钙离子浓度为 0.0050%。

表 5 各因素浓度之间的多重比较

蔗糖 /%	萌发率 /%	花粉管长 度/mm	硼酸 /%	萌发率 /%	花粉管长 度/mm	硝酸钙 /%	萌发率 /%	花粉管长 度/mm
10	69.6917a	0.3225a	0.014	56.5417b	0.3058b	0.0025	55.2417c	0.2917c
15	56.6917b	0.3458a	0.016	66.6083a	0.3692a	0.0050	76.5250a	0.4175bc
20	48.0667c	0.3117a	0.018	57.1583b	0.2933b	0.0075	47.3667d	0.3392b
25	69.6000a	0.3558a	0.020	63.7417ab	0.3670a	0.0100	64.9167b	0.3875a

注:表中不同小写字母表示 5% 水平差异性显著。

### 3 结论与讨论

该试验采用正交实验设计研究了 3 种因素(蔗糖、硼酸、硝酸钙)在 4 个不同浓度水平上对锦带花粉离体萌发的影响,比较每组花粉萌发率和花粉管长度并运用数据处理系统进行极差和方差分析以及各因素浓度间的多重比较,从而得出各因素在相应水平上对花粉萌发的影响程度。通过试验发现钙离子浓度对锦带花粉萌发影响最大,而硼酸浓度影响最小,筛选出最适合锦带花粉离体萌发的培养基成分组合为蔗糖 25%、硼酸 0.016%、硝酸钙 0.0050%。花粉活力是杂交成功的先决因子,不仅与品种有关,同时与开花时外界环境因素

(温度、湿度等)密切相关,因此有关环境条件及外源激素对锦带花粉离体萌发的影响有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 阿达来提,侯正年. 四季锦带引种与栽培技术[J]. 新疆林业,2005,6(1):23-29.
- [2] 周景清,张丽茹,周长虹,等. 锦带花全光喷雾嫩枝扦插繁殖技术[J]. 河北林业科技,2007(1):20-21.
- [3] 汉斌,郑亦津,李法曾. 山东植物志[M]. 青岛:青岛出版社,1997:212-213.
- [4] 刘雪莲,李庆玲,秦佳梅,等. 不同培养基对紫丁香花粉离体萌发的影响[J]. 东北林业大学学报,2010,38(7):61-63.
- [5] 张涛,黄敏. 蔗糖和 PEG 对山茶花粉离体萌发的影响[J]. 北方园艺,2009(1):15-17.
- [6] 杜玉虎,慕影,蒋锦标. 蔗糖、钙和硼对榆叶梅花花粉离体萌发及花粉管生长的影响[J]. 北方园艺,2008(8):45-49.
- [7] 张绍铃,高付永,陈迪新,等. 植物生长调节剂物质对丰水梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北植物学报,2003,23(4):586-591.
- [8] 薛晓敏,王金政,张安宁,等. 植物生长调节剂对旭日桃花花粉萌发及花粉管生长的影响[J]. 园艺园林科学,2008,24(3):274-278.

## Effect of Medium Components on Pollen Germination *in vitro* of *Diervilla sessilifolia*

LIU Xue-lian, QIN Jia-mei, SUN Jun-bo

(Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002)

**Abstract:** Taking the brocade belt fresh pollen as material, using orthogonal design  $L_{16}(4^5)$ , the effect of sucrose density, the calcium ion density, the boric acid density on the brocade belt pollen exsomatic were studied, to screen brocade belt pollen exsomatic sprouts the culture medium ingredient which was suitable. The results showed that the sucrose density and the calcium ion density showed large effect on the pollen germination and the growth influence, the boric acid influence was inferior that the two were remarkable. The brocade belt pollen exsomatic sprouts that were most suitable the culture medium ingredient was: sucrose 25%, boric acid 0.016%, calcium ion 0.0050%.

**Key words:** *Diervilla Sessilifolia*; pollen germination; culture medium ingredient

## 花 粉 管

花粉管是花粉粒内壁通过花粉外壁上的萌发孔(或沟)向外伸出的细管。一般每个花粉粒萌发时产生 1 个花粉管,具多萌发孔的花粉粒开始可以同时长出数个花粉管,但最终只有 1 个继续生长。花粉管是靠其末端生长的,在高倍显微镜下可见花粉管末端有 1 个透明的半球形区域称帽区。帽区之后的细胞质中含有多种细胞器,这与花粉管的生长有关。花粉管长到一定长度后,原来花粉粒中的内含物全部集中到花粉管的前端,花粉管从柱头经花柱到子房,再进入胚珠及胚囊,将花粉管中的 2 个精子及全部内含物释放到胚囊中,以便受精作用的进行。花粉管是雄配子体的一部分。

花粉管通道法:花粉管通道法是花粉管技术的运用。在授粉后向子房注射含目的基因的 DNA 溶液,利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道,将外源 DNA 导入受精卵细胞,并进一步被整合到受体细胞的基因组中,随着受精卵的发育而成为带转基因的新个体。该方法于 20 世纪 80 年代初期由我国学者周光宇提出,我国目前推广面积最大的转基因抗虫棉就是用花粉管通道法培育出来的。该法的最大优点是不依赖组织培养人工再生植株,技术简单,不需要装备精良的实验室,常规育种工作者易于掌握。