

山杏花粉离体培养条件及花粉管生长动态研究

李 民, 刘 明 国, 吴 月 亮, 董 胜 君

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以山杏优良无性系为试材,采用花粉离体培养的方法,研究了山杏花粉离体培养条件对花粉萌发率的影响、不同采样方式对花粉萌发率的影响和花粉管的发育过程,旨在为了解和控制山杏授粉受精过程提供参考依据。结果表明:当蔗糖、琼脂浓度为 10.0% 和 0.5% 时,0.010% 的硼酸浓度最适合山杏花粉离体培养。室内水培花枝取样的花粉活力显著低于野外自然开花取样的花粉活力,在相关科研和生产实践中,应尽量缩短室内水培时间或从野外自然开花中获得花粉。不同山杏无性系的花粉活力差异明显。山杏花粉管在培养基中生长可以划分为 4 个时期:花粉萌发期(0.3~0.6 h),快速生长期(0.6~2.0 h),生长速度缓慢期(2.0~4.0 h)和生长停滞期(4.0 h 以后)。

关键词:硼酸浓度;取样方式;花粉萌发率;花粉管生长;山杏

中图分类号:S 662.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0081-04

山杏(*Prunus sibirica*)属蔷薇科李属植物,又名西伯利亚杏,为我国“三北”地区重要的生态经济型树种,喜光、耐旱、耐寒、耐瘠薄,适应性强,分布范围广。山杏具

有很高的经济价值,苦杏仁广泛应用于食品、医药及工业领域。产量低而不稳的问题为山杏产业发展的瓶颈。

许多研究认为,花粉萌发及花粉管生长需要一定条件。果树从授粉到完成受精所需要的时间首先取决于果树的种类、品种,也受树体的营养状况以及环境因素的影响^[1]。适宜的硼酸可以促进花粉萌发、花粉管生长及子房发育^[2-3]。三十烷醇、吡啶乙酸、2,4-D 对花粉萌发和花粉管生长也有促进作用^[4-5]。此外,取样方式以及不同品种对花粉萌发会产生显著性影响^[6]。目前有

第一作者简介:李民(1989-),女,新疆奎屯人,硕士研究生,研究方向为森林培育。E-mail:lm1449853120@163.com.

责任作者:刘明国(1964-),男,辽宁朝阳人,博士,教授,现主要从事森林培育和经济林等研究工作。E-mail:liumingguo916@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004034)。

收稿日期:2014-11-10

Construction of Fingerprint and Analysis of Genetic Diversity with EST-SSR Markers for Thirty-seven Peony Cultivars in Shandong

YANG Zhi-gang, ZHU Dong, LUO Bing, SUN Hai-yan

(Department of Bioengineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500)

Abstract: Taking thirty-seven peony cultivars from Shandong as experimental materials, the DNA fingerprinting database was successfully constructed, and the genetic diversity was analyzed based on ten evenly distributed EST-SSR primer pairs with high polymorphisms and good repeatability. The results showed that, among the 37 varieties, 10 primer pairs had 58 polymorphic loci, and 5.8 polymorphic loci were detected by each EST-SSR primer pair on an average with the range from 2 to 13. EST-SSR markers were suitable for using in construction of peony DNA fingerprint with polymorphism differences between the selected varieties. Thirty-seven cultivars could be identified by 4 primer combinations at least. The genetic diversity analyzed indicated that, 37 peony varieties could be divided into five types based on the genetic similarity coefficient of 0.69 threshold.

Keywords: EST-SSR; DNA fingerprint; genetic diversity; peony

关山杏花粉萌发条件的研究报道较少,尚鲜见山杏花粉管发育动态的研究文献。该试验通过探讨花粉离体培养条件及花粉管的发育动态,旨在了解和控制山杏授粉受精过程、开展良种选育和丰产栽培提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为辽宁省北票市林木良育繁种中心的 42 号、43 号、37 号、39 号和 22 号 5 个山杏优良无性系,于 2014 年 4 月进行花粉取样,一是在野外自然开花条件下收集花粉样本,二是在小花蕾期剪取花枝带回实验室中水培收集花粉样本。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉的收集方法 采集以上 5 个山杏无性系大蕾期的花蕾,剥取花药,均匀地铺洒在硫酸纸上,分别注明标号,置于室内阴干 1~2 d 使其自然散粉,避免太阳直射,待完全散粉后装入硫酸纸袋中,放入硅胶干燥剂中储存备用。

1.2.2 花粉离体培养基的筛选方式 采用花粉离体培养方法测定花粉活力,培养基中蔗糖与琼脂的浓度一定,分别是 10.0% 和 0.5%,硼酸浓度分别设 0.005%、0.010%、0.020% 和 0.030% 4 个梯度,以 0(CK)为对照。将配置好的处于透明液体状态的培养基分别倒入培养皿中,液体覆盖培养皿底即可。当培养基凝固时,在表面上均匀地撒上 42 号山杏无性系花粉,在室内放置 4 h 后用 Olympus BX51 光学显微镜观察,测定花粉萌发率。镜检观察时设 5 次重复,每重复选 5 个视野(10×10)。

1.2.3 不同取样方式花粉活力的比较分析 对 42 号、43 号、37 号、39 号和 22 号 5 个山杏无性系分别采取野外自然开花花粉取样和室内花枝水培花粉取样,将收集的花粉均匀地洒在筛选出的培养基中,放置 4 h 后用光学显微镜观察测定花粉萌发率。每个处理 3 次重复,每重复选取 3 个视野(10×10)。

1.2.4 花粉管离体培养观察 将 42 号山杏无性系花粉洒在筛选出的培养基中,以 0.3、0.6、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0 h 为时间段分别观察并统计花粉管生长的长度。每个处理 3 次重复,测定 20 根花粉管长度,取花粉管长度平均值。

1.3 数据分析

在用显微镜观测花粉萌发率时,统计视野内的花粉总数、花粉萌发数,花粉萌发以其花粉管长度超过花粉直径为标准。萌发率(%)=(发芽花粉数/观察花粉总数)×100%。

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析以及

LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 花粉离体培养基的筛选

由图 1 可知,当培养基蔗糖浓度为 10.0%、琼脂浓度为 0.5% 时,花粉萌发率随着硼酸的浓度改变呈规律性变化。当培养基中没有硼酸时,花粉萌发率低,仅为 6.93%。硼酸浓度为 0.010% 时,花粉萌发率最高,达 41.19%。当硼酸浓度低于 0.010% 时,随着硼酸浓度的增加,花粉萌发率逐渐提高;当硼酸的浓度高于 0.010% 时,随着硼酸浓度的增加,花粉萌发率逐渐降低。这说明 0.010% 硼酸浓度适宜山杏花粉萌发,因此在后续试验中选用该浓度硼酸进行花粉培养。

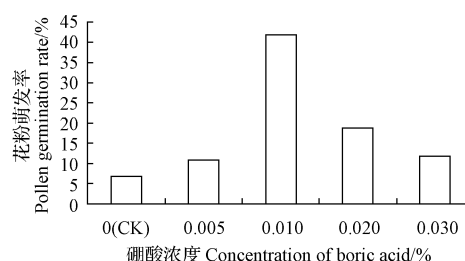


图 1 不同硼酸浓度下花粉萌发率

Fig. 1 Pollen germination rate under different concentrations of boric acid

2.2 不同取样方式对花粉活力的影响

对不同取样方式采集的花粉在最适培养基中进行培养,测定花粉活力。由表 1 可知,室内水培花枝取样的花粉萌发率显著低于野外自然开花取样的花粉萌发率($P<0.05$)。对 5 个无性系花粉活力进行 LSD 多重比较表明,相同取样方式,不同无性系之间花粉萌发率差异明显,室外自然开花取样的 39 号花粉萌发率最高,为

表 1 5 种不同无性系
不同取样方式花粉萌发率的比较

Table 1 Comparison of pollen germination rate between different sampling methods for five different clones

无性系 Clone number	不同取样方式的萌发率 Pollen germination rate of sampling method/ %	
	室外自然开花取样	室内水培花枝取样
	Outdoor natural flower sampling	Indoor hydroponic flower sampling
39 号	85±5a*	37±5a*
22 号	79±6a*	38±4a*
37 号	72±5b*	41±7ab*
42 号	67±6bc*	45±13bc*
43 号	61±6c*	30±7d*

注:表中数据为平均数±标准差;同一列中具有相同字母的表示无性系间花粉萌发率差异未达显著水平(LSD 多重比较, $P>0.05$);同一行中标注* 的表示取样方式间花粉萌发率差异达到显著水平(方差分析, $P<0.05$)。以下同。

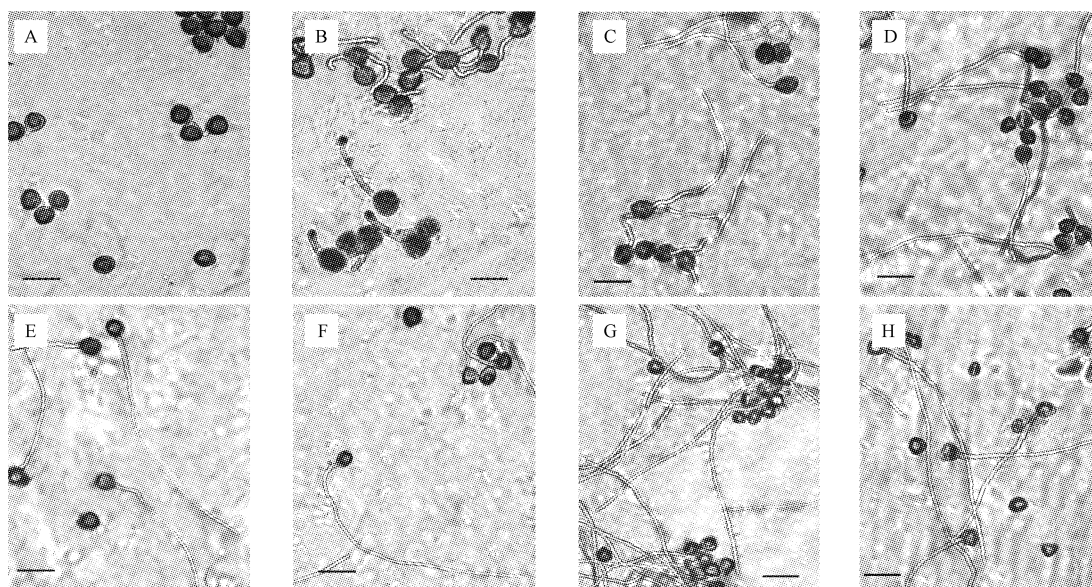
Note: Data in the table is the mean± standard deviation; with the same letters in the same column mean difference was not significant (LSD multiple comparison, $P>0.05$); in the same row * average difference significant (analysis of variance, $P<0.05$). The same below.

85%, 43号花粉萌发率最低, 为61%。39号、22号与其它3个无性系花粉活力均差异显著, 42号与37号、43号差异不显著, 但是37号和43号差异显著; 对于室内水培花枝取样, 42号无性系花粉平均萌发率最高, 为45%, 43号花粉平均活力最低, 为30%。43号与其它4个无性系花粉活力差异均显著, 39号、22号和37号3个无性系之间差异不显著, 但是39号、22号与42号差异显著, 而37号与42号差异不显著。

2.3 花粉管离体培养生长动态变化

由图2、3可以看出, 在0.3 h时(图2A), 部分花粉的花粉管已经长出, 其花粉管的长度不超过花粉直径的一半, 0.6 h时(图2B), 花粉管长度平均251.60 μm , 在1.0 h时(图2C), 花粉管的平均长度为514.14 μm , 而在1.5 h时(图2D), 花粉管平均长度为785.36 μm , 2.0 h时(图2E), 花粉管平均长度为937.64 μm , 在2.5 h时

(图2F)花粉管生长的平均长度为1 063.18 μm , 在3.0 h时(图2G), 花粉管相互交错, 但不难看出花粉管依然在继续生长, 平均长度为1 174.90 μm , 在4.0 h时(图2H), 花粉管生长平均长度为1 213.52 μm , 在6.0 h时花粉管平均长度为1 222.88 μm 。通过多重比较, 除4.0 h和6.0 h时间段花粉管长度差异不显著($P < 0.05$), 其它时间段花粉管长度差异均显著。综上, 将山杏花粉管在培养基中的生长划分为花粉萌发期、快速生长期、生长速度缓慢期和生长停滞期4个时期, 山杏花粉萌发时间约在0.3~0.6 h之间, 花粉管快速生长阶段在0.6~2.0 h之间, 花粉管在此时间段平均生长速度为528.12 $\mu\text{m}/\text{h}$ 。花粉管生长减慢在2.0~4.0 h之间, 在此时间段内花粉管生长平均速度为141.65 $\mu\text{m}/\text{h}$ 。在4.0~6.0 h时间段, 花粉管生长平均速度为1.35 $\mu\text{m}/\text{h}$, 说明花粉管在4.0 h时基本停止生长了。



注: 比例尺为200 μm 。

Note: The scale was 200 μm .

图2 不同培养时间花粉管生长状态

Fig. 2 The states of pollen tube grow at different incubation time

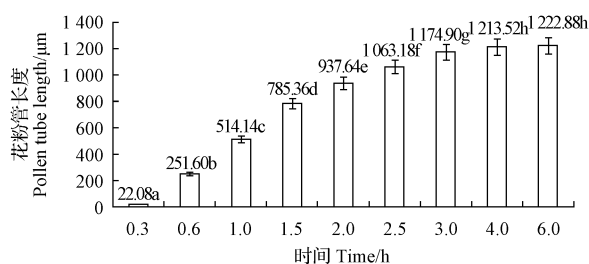


图3 花粉管长度随培养时间的变化

Fig. 3 Change of pollen tube length with incubation time

3 结论与讨论

该研究表明, 当蔗糖、琼脂浓度为10.0%和0.5%时, 0.010%的硼酸浓度最适合山杏花粉离体培养, 也为山杏花期喷施硼酸提供了技术参考。适量的硼酸和钙是花粉萌发和生长的必需物质, 迄今有关硼酸对花粉萌发和生长影响的研究报道较多, 前人对多种果树研究表明, 硼是提高花粉活力最显著也最具有广泛效果的矿物质元素之一^[7]。硼酸主要参与花粉管顶端细胞壁的构建^[2], 一般认为, 花粉内存在较多的钙, 而缺乏硼^[8]。一定浓度的硼酸有利于花粉萌发和花粉管生长^[9-10], 但不

同植物种类的花粉萌发和生长所需最适硼酸浓度不同。

研究发现,室内水培花枝取样的花粉活力显著低于野外自然开花取样的花粉萌发率。这是由于野外自然开花过程中,山杏不仅能够从土壤中获得氮、钙、铁、磷等植物生长必需的元素,自身还能合成植物生长物质,这些生长物质对营养生长、花芽分化、授粉受精等有重要作用^[11]。而室内水培花枝只能靠枝条本身所储备的营养和生长物质使花蕾生长开花和花粉成熟^[12]。因此在相关科研和生产实践中,尽量缩短室内水培时间或从野外自然开花中获得花粉。该研究还发现,不同山杏无性系的花粉活力差异显著,花粉生活力的高低取决于品种自身的遗传特性^[13]。

该研究认为,山杏花粉管在培养基中生长可以划分为4个时期:花粉萌发期(0~0.6 h),快速生长期(0.6~2.0 h),生长速度缓慢期(2.0~4.0 h),生长停滞期(4.0 h以后)。花粉萌发和花粉管生长是一个极其复杂的生理代谢过程,不仅受生长调节物质的影响并且还有许多酶的参与,其中 Ca^{2+} 与硼是花粉管生长的必需物质^[14]。花粉管生长前期速度快是因为所需营养物质来自于花药本身所储存的营养,随着花粉管的生长,花药中的营养物质不断减少,因此花粉管生长速度减慢,最后停滞不生长。而花粉管在花柱中生长所需营养物质不仅来自于花药本身,也可以通过花柱内部从花柱道或引导组织的分泌物中吸取养料,作为生长和建成管壁合成物质之用^[15]。

参考文献

- [1] 成健红,谭敦炎,李疆,等. 巴旦杏授粉试验及花粉管生长的荧光显微观察[J]. 西北植物学报,2001,21(5):894-899.
- [2] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京:人民教育出版社,1982:103-136.
- [3] 王文举,张军翔,张宁. 花期喷硼对元帅苹果座果率及硼对苹果花粉萌发的影响[J]. 宁夏农林科技,1996(6):32-34.
- [4] 丁长奎,程其峰,夏起洲,等. 营养元素与生长调节剂对枇杷花粉萌发和坐果的影响[J]. 中国果树,1991(4):18-20.
- [5] 李秀菊,李香,束怀瑞. 硼和尿素及生长调节剂对苹果花粉萌发与生长的影响(简报)[J]. 植物生理学通讯,1998,34(2):96-100.
- [6] 王朝凤,杨途熙,魏安智,等. 杏不同品种花粉量及花粉萌发特性的研究[J]. 北方园艺,2012(9):1-5.
- [7] 晓燕,张广忠,张新春. 硼酸对桃花花粉萌发的影响[J]. 林业实用技术,2013(8):6-8.
- [8] 孙颖,孙大业. 花粉萌发和花粉管生长发育的信号转导[J]. 植物学报,2001,43(12):1211-1217.
- [9] Říhová L, Hrabětová E, Tupý J. Optimization of conditions for *in vitro* pollen germination and tube growth in potatoes[J]. International Journal of Plant Sciences,1996,157(6):561-566.
- [10] 符碧. 尿素和硼及生长调节剂对荔枝花粉萌发与生长的影响[J]. 云南师范大学学报(自然科学版),2001,21(3):62-65.
- [11] 薛晓敏,王金政,张安宁,等. 植物生长调节物质对桃花花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报,2008,36(4):124-126.
- [12] 郭红彦,吴青霞,彭方仁. 银杏枝条营养贮藏蛋白质的组分及动态变化[J]. 林业科学,2009,45(3):25-28.
- [13] 姜雪婷,杜玉虎,张绍铃,等. 梨43个品种花粉生活力及4种测定方法的比较[J]. 果树学报,2006,23(2):178-181.
- [14] 关军锋,马智宏,张晓敏. Ca^{2+} 与苹果花粉萌发和花粉管生长的关系[J]. 果树科学,1999,16(3):176-179.
- [15] 贺学礼. 植物学[M]. 北京:科学出版社,2008.

Study on Conditions of Pollen Culture *in vitro* and Growth Dynamic of Pollen Tube in *Prunus sibirica*

LI Min, LIU Ming-guo, WU Yue-liang, DONG Sheng-jun

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Taking excellent clones of *Prunus sibirica* as test material, using the method of pollen culture *in vitro*, the effect of *in vitro* culture on pollen of *Prunus sibirica*, different ways of sampling effect on pollen germination rate and the process of pollen tube growth were studied, in order to provide the scientific basis for understanding and controlling of the pollination and fertilization of the tree species. The results showed that, when the concentration of sucrose was 10.0% and the agar was 0.5%, the boric acid concentration of 0.010% was the most suitable for pollen culture *in vitro*. The pollen vitality of indoor hydroponic flower sampling was significantly lower than the pollen of outdoor natural flower sampling, which meant that in the relevant scientific research and production practice, try to shorten the indoor hydroponic time or obtain pollen from the natural blossom in field. Different *Prunus sibirica* clones had evidently different pollen viability. The growth process of pollen tubes in culture could be divided into four periods: pollen germination period (0.3—0.6 hours), rapid growth period (0.6—2.0 hours), slowing growth period (2.0—4.0 hours) and growth lag phase (after 4.0 hours).

Keywords: boric acid concentration; sampling method; pollen germination rate; pollen tube growth; *Prunus sibirica*