

DOI:10.11937/bfyy.201516018

不同处理对“丰花月季”花粉生活力的影响

张立磊, 李桂荣, 娄腾雪, 张文杰, 毛 达

(河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:以“丰花月季”品种为试材,采用正交实验设计,研究蔗糖、硼酸、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 ZnSO_4 5个因素不同浓度对其花粉生活力的影响,以期找出最适宜“丰花月季”花粉萌发的培养条件。结果表明:蔗糖浓度对“丰花月季”花粉萌发的影响最大,其余依次为硼酸浓度、 ZnSO_4 浓度、 CaCl_2 浓度、 MgSO_4 浓度的影响最小。一定浓度的蔗糖、硼酸、 CaCl_2 对花粉的萌发有较大的促进作用,但超过一定浓度时起抑制作用,而 ZnSO_4 浓度对花粉的萌发率影响是在一定范围内先降低后升高, MgSO_4 浓度对花粉的萌发影响不太明显。最适宜“丰花月季”花粉萌发的离体条件是200 g/L蔗糖+100 mg/L 硼酸+50 mg/L CaCl_2 +20 mg/L MgSO_4 +40 mg/L ZnSO_4 。

关键词:“丰花月季”;花粉生活力;正交实验

中图分类号:S 685.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0072-04

近年来随着消费者对“丰花月季”(Rosa hybrida)喜爱,“丰花月季”新品种的选育也越来越重要,迫切需要培育出更多新、奇、罕、特、异的符合消费市场需求品种,因此“丰花月季”的育种愈显显示出其重要性。在花卉的育种过程中,为了进行人工辅助授粉或杂交授粉,或为了解决亲本的花期不一致或远缘杂交的困难,常需要保存花粉的活力。花粉是有性繁殖植物遗传物质的载体,影响有性繁殖植物的授粉、胚胎发育、遗传基础^[1],

研究花粉的生活力和可育性是育种工作必不可少的基础性工作。其中花粉萌发率是衡量花粉生活力大小的指标之一,也是最重要的指标^[2]。因此,如何提高“丰花月季”花粉萌发率是一个需要深入研究的课题。有关适合“丰花月季”花粉萌发的培养基的报道不多,且多集中于对蔗糖和硼酸的研究。为此,现以“丰花月季”品种为试材,选择不同浓度的蔗糖、硼酸、 CaCl_2 、 MgSO_4 和 ZnSO_4 ,采用正交实验设计,研究不同成分组合对“丰花月季”花粉生活力的影响,获得最优花粉离体培养的培养基,以期“丰花月季”人工授粉、杂交育种以及花粉单倍体培养等提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013年5月采集生长健壮的“丰花月季”植株上含苞待放的花蕾为试材。

第一作者简介:张立磊(1978-),女,硕士,讲师,研究方向为园林植物资源研究及设计。E-mail:366893563@qq.com

责任作者:李桂荣(1974-),女,回族,博士,副教授,现主要从事园艺植物育种及生物技术教学与科研工作。E-mail:liguirong10@163.com

基金项目:河南省科技厅资助项目(143400410043)。

收稿日期:2015-03-15

measurement and analysis method. The results showed that plant height of 4-year-old ‘Red Rocket’ and ‘Dynamite’, respectively, 9.2% and 16.0% were higher than control; ground diameter of 4-year-old ‘Red Rocket’ and ‘Dynamite’, respectively, 15.3% and 18.7% were thicker than control; the flower color of ‘Red Rocket’ was bright red(RHS 46B) and ‘Dynamite’ was scarlet(RHS 46A), flower diameter were 4.1 cm and 4.5 cm, length of inflorescence were 25.1 cm and 35.1 cm. The florescence was from the middle of June to november, lasted four months, the flowers density were very high. Proline content increased first, then decreased under drought, the order of drought tolerance was: ‘Red Rocket’ > ‘Dynamite’ > control, proline content were ‘down-up-down’ trend under water-logging stress, the order of water-logging tolerance was: ‘Dynamite’ > ‘Red Rocket’ > control, leaves *in vitro* of ‘Red Rocket’ had higher proline content under freezed, the order of cold tolerance was: ‘Red Rocket’ > ‘Dynamite’ > control.

Keywords: Lagerstroemia indica; introduction; stress resistance; proline

1.2 试验方法

1.2.1 花粉采集 6:00—7:00,从生长健壮的“丰花月季”植株上随机选取 10 朵含苞待放的花蕾。放进广口瓶带回实验室。轻轻剥掉花瓣,取出花药,放在垫有硫酸纸的带盖培养皿中,及时剔除其中的杂质和破裂的花药,然后将培养皿放置在阴凉干燥处阴干,室温条件下,经一定时间后花粉开裂,待花粉完全散出后放在 4℃ 的冰箱中密闭干燥保存,备用。

1.2.2 试验设计 试验设计蔗糖、硼酸、CaCl₂、MgSO₄ 和 ZnSO₄ 5 个因素,各因素设置 5 个水平,蔗糖(g/L):0、100、150、200、250;硼酸(mg/L):0、50、100、150、200;CaCl₂ (mg/L):0、50、100、150、200;MgSO₄ (mg/L):0、10、20、30、40;ZnSO₄ (mg/L):0、10、20、30、40。采用正交表 L₂₅(5⁶),共设置 25 个组合,详见表 1,其中添加琼脂粉 6 g/L,pH 5.8~6.0,设定温度为 28℃。以下每处理组合重复 4 次,每次重复相当于一个区组,各区组间采用随机区组设计。

表 1 “丰花月季”花粉萌发的正交实验设计

Table 1 The orthogonal experiment design of 'Floribunda Roses' pollen germination

试验号 No. of experiment	因素 Factor				
	蔗糖浓度 Concentration of sucrose /(g·L ⁻¹)	硼酸浓度 Concentration of boric acid /(mg·L ⁻¹)	CaCl ₂ 浓度 Concentration of CaCl ₂ /(mg·L ⁻¹)	MgSO ₄ 浓度 Concentration of MgSO ₄ /(mg·L ⁻¹)	ZnSO ₄ 浓度 Concentration of ZnSO ₄ /(mg·L ⁻¹)
1	0	0	0	0	0
2	0	50	50	10	10
3	0	100	100	20	20
4	0	150	150	30	30
5	0	200	200	40	40
6	100	0	50	20	30
7	100	50	100	30	40
8	100	100	150	40	0
9	100	150	200	0	10
10	100	200	0	10	20
11	150	0	100	40	10
12	150	50	150	0	20
13	150	100	200	10	30
14	150	150	0	20	40
15	150	200	50	30	0
16	200	0	150	10	40
17	200	50	200	20	0
18	200	100	0	30	10
19	200	150	50	40	20
20	200	200	100	0	30
21	250	0	200	30	20
22	250	50	0	40	30
23	250	100	50	0	40
24	250	150	100	10	0
25	250	200	150	20	10

1.2.3 花粉培养 按照培养液配方配制培养基,用洁净的玻璃棒蘸取一定量的培养基滴在凹玻片的凹槽内(要适量,过多会影响后期的观察,而过少又不适宜花粉生

长),制作发芽床,待凝固后,用牙签挑取花粉,轻轻振动,使花粉均匀地撒在发芽床上(避免出现重叠),每凹槽内 50~100 粒花粉,然后用凡士林涂抹盖玻片,盖住发芽床并密封,最后贴上标签写明处理、播种日期。各处理在 28℃,黑暗培养。

1.2.4 观察及记录结果 供试“丰花月季”花粉在 28℃ 下培养,培养 4 h 后,在 10×40 倍光学显微镜下观察花粉萌发率,每处理组合重复 4 次,每个培养基随机观察 3 个视野,每个视野不少于 50 粒花粉,记录萌发花粉粒数和花粉总粒数。花粉萌发标准:以花粉管长度超过花粉粒直径的 1/2 为萌发花粉。花粉萌发率(%)=视野中萌发花粉粒数/视野中花粉总粒数×100。

1.3 数据分析

采用 DPS 数据分析软件进行数据处理及 Duncan 新复极差多重比较分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 正交实验设计“丰花月季”花粉的萌发率

由图 1 可知,25 个不同处理之间“丰花月季”花粉的萌发率存在明显的差异。其中处理 14 花粉萌发率最高,达到 21.75%;处理 19、16、23 花粉萌发率稍低于处理 14,分别为 21.48%、20.53%、20.21%;其余的处理均在 20% 以下,花粉萌发率最低的是处理 12,萌发率只有 1.08%。图 1 是不同处理组合下“丰花月季”花粉萌发率的测定结果,但其并不能说明各试验因素对“丰花月季”花粉萌发率的影响,所以仍需对其进行进一步的数据分析。

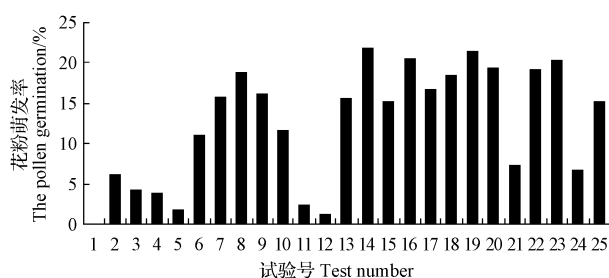


图 1 正交实验设计“丰花月季”花粉的萌发率

Fig. 1 'Floribunda Roses' pollen germination by the orthogonal experiment design

2.2 正交实验结果极差分析

为进一步探讨各试验因素对“丰花月季”花粉萌发率的影响,对图 1 进行极差分析,结果如表 2 所示,在 5 个因素中蔗糖浓度的极差最大,表明其对花粉萌发的影响最大,其次是硼酸浓度、ZnSO₄ 浓度和 CaCl₂ 浓度, MgSO₄ 浓度对花粉萌发的影响最小。

2.3 正交实验结果方差分析

由表 3 可知,区组和 MgSO₄ 浓度的 $P>0.05$,即区

表 2 $L_{25}(5^6)$ 正交实验极差分析Table 2 The range analysis of the $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment design

试验因素 Experiment factor	极小值 Minimum	极大值 Maximum	极差 R Range	调整 R' Adjustment
蔗糖浓度 Concentration of sucrose	3.12	19.28	16.17	14.46
硼酸浓度 Concentration of boric acid	8.23	15.39	7.15	6.40
CaCl_2 浓度 Concentration of CaCl_2	9.62	14.77	5.15	4.61
MgSO_4 浓度 Concentration of MgSO_4	11.36	13.75	2.39	2.14
ZnSO_4 浓度 Concentration of ZnSO_4	9.12	15.97	6.85	6.12

表 3 $L_{25}(5^6)$ 正交实验方差分析(随机区组模型)Table 3 The variance analysis of the $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment design (randomized block model)

变异来源 Source of variation	平方和 Ss	自由度 df	均方 Ms	F 值 F value	P 值 P value
区组 Block	0.24	2	0.12	<1	
蔗糖浓度 Concentration of sucrose	21.27	4	5.32	37.268 4	0.000 1
硼酸浓度 Concentration of boric acid	4.38	4	1.09	7.668 8	0.000 1
CaCl_2 浓度 Concentration of CaCl_2	2.65	4	0.66	4.643 2	0.003
MgSO_4 浓度 Concentration of MgSO_4	0.49	4	0.12	0.859 1	0.495 3
ZnSO_4 浓度 Concentration of ZnSO_4	4.01	4	1	7.035	0.000 2
误差 Error	6.85	48	0.14		
总和 Sum	45.43				

组和 MgSO_4 浓度对花粉萌发率的影响不显著;蔗糖浓度、硼酸浓度、 ZnSO_4 浓度和 CaCl_2 浓度的 $P \leq 0.01$, 即蔗糖浓度、硼酸浓度、 ZnSO_4 浓度和 CaCl_2 浓度对花粉萌发率的影响极显著。其影响大小顺序为:蔗糖浓度 > 硼酸浓度 > ZnSO_4 浓度 > CaCl_2 浓度 > MgSO_4 浓度。由方差分析得出的影响大小顺序与极差分析得出的结果相同。

2.3 试验因素各水平间的多重比较

由表 4 可知,采用 Duncan 新复极差法进行多重比较,蔗糖浓度的最优水平是水平 4(200 g/L),硼酸浓度的最优水平是水平 3(100 mg/L), CaCl_2 浓度的最优水平是水平 2(50 mg/L), MgSO_4 浓度的最优水平是水平 3(20 mg/L), ZnSO_4 浓度的最优水平是水平 5(40 mg/L)。

表 4 $L_{25}(5^6)$ 正交实验的 5 个影响因素各水平的差异显著性检验(SSR 检验)Table 4 Difference significance of the each level of 5 affecting factors in the $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment design (SSR test)

水平 Level	蔗糖浓度 Concentration of sucrose	硼酸浓度 Concentration of boric acid	CaCl_2 浓度 Concentration of CaCl_2	MgSO_4 浓度 Concentration of MgSO_4	ZnSO_4 浓度 Concentration of ZnSO_4
1	3.12dC	8.23cB	14.18abA	11.36aA	11.45bcBC
2	14.64bB	11.72bAB	14.77aA	12.05aA	11.61bcBC
3	11.16cB	15.39aA	9.62cB	13.75aA	9.12cC
4	18.28aA	13.94abA	11.85bcAB	12.02aA	13.73abAB
5	13.68bcB	12.59abA	11.47bcAB	12.7aA	15.97aA

注:同列中不同小写字母和大写字母分别代表差异性显著($P \leq 0.05$)和极显著($P \leq 0.01$)。

Note: The lowercase letters and capital letters in the same column after the number stand for significant difference at the level of 5% and at the level of 1%.

综合极差分析和方差分析的结果,因此,200 g/L 蔗糖 + 100 mg/L 硼酸 + 50 mg/L CaCl_2 + 20 mg/L MgSO_4 + 40 mg/L ZnSO_4 是“丰花月季”花粉离体培养的最优培养基。

3 讨论与结论

经正交实验极差分析和方差分析表明,蔗糖浓度对“丰花月季”花粉萌发的影响达到了极显著水平($F=37.268 4$, $P=0.000 1$),在所选的 5 个试验因素中,其对“丰花月季”花粉的萌发影响最大。其最适浓度为 200 g/L,最高萌发率达 18.28%。当蔗糖浓度为 200 g/L 时,供试“丰花月季”花粉萌发率最高,分析原因可能为:此时的蔗糖既能为“丰花月季”花粉提供足够的能源,又能使“丰花月季”花粉内外的渗透压达到平衡,维持正常生活力,使花粉生活力达到最强^[4-6]。该试验筛选出的最适“丰花月季”花粉离体萌发的蔗糖浓度为 200 g/L,这与一些研究结果基本一致,如初庆刚^[7] 研究结果表明,樱桃属植物花粉萌发的最适蔗糖浓度为 150 g/L 和 200 g/L;但与一些研究结果有一定的差异,如周旭红等^[8] 研究结果表明,大多香石竹花粉萌发的最适蔗糖浓度为 100 g/L,这可能与供试材料的种类、栽培条件、品种特性和培养基的类型(固体或液体)有关。

经正交实验极差分析和方差分析表明,硼酸浓度对“丰花月季”花粉萌发的影响达到了极显著水平($F=7.668 8$, $P=0.000 1$)。当硼酸在 100 mg/L 时最有利于“丰花月季”花粉萌发。这一浓度时花粉的萌发率始终高于其它浓度,最高萌发率为 15.39%。如果采用高于这一浓度的硼酸则会与蔗糖一样,降低环境水势而对花粉萌发不利^[9-12]。该试验筛选出的最适“丰花月季”花粉离体萌发的硼酸浓度为 100 mg/L,这与一些研究结果基本一致,如屈海泳等^[13] 研究结果表明,桃花花粉萌发的硼酸浓度 100 mg/L;但与一些研究结果有一定的差异,如初庆刚^[7] 研究结果表明,樱桃属植物的硼酸浓度为 150 mg/L,供试材料的种类、栽培条件、品种特性和培养基的类型(固体或液体)可能是造成差异的原因。

Ca^{2+} 对“丰花月季”花粉的离体培养同样表现出在一定的浓度下促进其萌发,超过这个浓度则表现出抑制作用的特性。最有利于“丰花月季”花粉萌发的 CaCl_2 浓度为 50 mg/L。在不含 Ca^{2+} 的培养基中,“丰花月季”花粉同样能萌发,其萌发率为 14.18%,稍低于 50 mg/L CaCl_2 时的萌发率,但随着 Ca^{2+} 浓度的增加,“丰花月季”花粉萌发率迅速下降,在 Ca^{2+} 浓度为 100 mg/L 时达到最低,说明 CaCl_2 表现出较强的抑制作用,达到 0.05 的显著性抑制水平。在梨花粉的萌发中也有这种趋势^[14]。可见离体培养时正常花粉萌发需适当的外源钙,缺钙或钙浓度过高都会导致花粉和花粉管生长受阻^[15-17]。

MgSO₄ 对花粉萌发和花粉管生长影响不大,但有促进作用。各浓度间无显著差异,最大萌发率仅为 13.75%,这与王岚岚等^[18]以月季品种‘Sorbet fruite’的花粉为试材,通过单因子试验比较液体培养基中 Mg²⁺ 对月季花粉离体萌发的影响是一致的。

40 mg/L ZnSO₄ 对“丰花月季”花粉萌发和花粉管生长有显著的促进作用,其萌发率比不含 Zn²⁺ 的培养基的萌发率提高了 39.48%,达到 0.01 的显著性水平。而在 20 mg/L 时,“丰花月季”花粉生活力最低,为 9.12%。低含量(如 10 mg/L)的 ZnSO₄ 对“丰花月季”花粉萌发的作用不显著;而稍高含量(如 20 mg/L)的 ZnSO₄ 对花粉的萌发却有显著的抑制作用,高浓度(如 30 mg/L 和 40 mg/L)对花粉萌发有显著促进作用。说明在一定范围内,“丰花月季”花粉萌发率随 Zn²⁺ 浓度的增加先下降后提高。李春林等^[19]对普通油茶进行花粉离体萌发研究表明,一定量的锌离子能促进普通油茶无性系花粉萌发,但过高浓度的锌离子会使花粉内部的合成产物大量积累,从而使花粉萌发受到抑制。

参考文献

- [1] 李桂荣,杨鹏鸣. 硼酸与蔗糖对百合花粉生活力的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9494-9495.
- [2] 尹佳蕾,赵惠恩. 花粉生活力影响因素及花粉贮藏概述[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 110-113.
- [3] 赵兴华,张道旭,印东生,等. 百合花粉生活力测定和贮藏方法研究[J]. 北方园艺, 2009(2): 172-175.
- [4] 周怀军,安连荣,朱哲锋. 杏树不同品种及果枝花粉发芽试验报告[J]. 河北林果研究, 2000, 15(3): 253-256.
- [5] 黄家兴,吴杰,安建东,等. 凯特杏花粉的离体培养及影响因子分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1): 52-58.
- [6] 杨贵,罗慈文,张映南,等. 不同蔗糖浓度对辣椒花粉萌发的影响[J]. 辣椒杂志, 2006(3): 24-26.
- [7] 初庆刚. 蔗糖、硼对樱桃属植物花粉萌发的影响[J]. 莱阳农学院学报, 1995(3): 21-13.
- [8] 周旭红,桂敏,莫锡君. 香石竹花粉生活力的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, 33(5): 108-111.
- [9] RIHOVA L, HRABETOVA E, TUPY J. Optimization of conditions for *in vitro* pollen germination and tube growth in potatoes[J]. International Journal of Plant Science, 1996, 157(5): 561-566.
- [10] WANG Q, LU L, WU X, et al. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in Piceameyeri[J]. Tree Physiology, 2003, 23: 345-351.
- [11] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [12] 沈捷,祝晨辰,徐进,等. 硼、钙离子对杉木花粉萌发和花粉管生长影响[J]. 林业科技开发应用研究, 2010, 24(6): 57-60.
- [13] 屈海泳,刘连妹,孔文涛,等. 桃花粉活性检测和离体萌发特性的研究[J]. 中国农学通报, 2010(21): 207-212.
- [14] 张绍玲,陈迪新,康琅,等. 培养基组分及 pH 值对梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 225-230.
- [15] 董晓芬,郑剑宇. 硼酸和钙离子对红叶李花粉萌发影响[J]. 大众技术, 2007(5): 134-135.
- [16] HAO J, YU F L, LIANG S P, et al. Changes of calcium distribution in egg cells, zygotes and two celled proembryos of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Report, 2002, 4: 331-337.
- [17] 龚明,曹宗饬. 钙和钙调素对花粉萌发和花粉管生长的调控[J]. 植物生理学通讯, 1995(5): 321-328.
- [18] 王岚岚,游捷,俞红强. 月季花粉离体萌发液体培养基组分的优化[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(3): 41-45.
- [19] 李春林,杨水平,姚小华,等. 普通油茶无性系花粉离体萌发特性[J]. 林业科学研究, 2009(3): 253-256.

Effect of Different Treatments on Pollen Viability of ‘Floribunda Roses’

ZHANG Lilei, LI Guirong, LOU Tengxue, ZHANG Wenjie, MAO Da

(School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing, Henan 453003)

Abstract: Taking ‘Floribunda Roses’ as experimental materials, the influence of five factors on pollen viability by orthogonal experiment design were discussed, and the five factors were the concentrations of sucrose, boric acid, CaCl₂, MgSO₄ and ZnSO₄, so as to find out the best matching, namely, the optimum culture conditions of ‘Floribunda Roses’ pollen germination. The results showed that the concentration of sucrose had the greatest influence on ‘Floribunda Roses’ pollen germination, the concentrations of boric acid, ZnSO₄ and CaCl₂ had greater influence, and that the concentration of MgSO₄ had minimal impact. A certain concentrations of sucrose, boric acid and CaCl₂ for pollen germination had great role in promoting, but when the factors exceeded a certain concentration, they would have inhibitory effect. The effect of the concentration of ZnSO₄ on pollen germination rate was later increased after the firstly decreased within a certain range. The concentration of MgSO₄ had little effect on pollen germination. 200 g/L sucrose+100 mg/L boric acid+50 mg/L CaCl₂+20 mg/L MgSO₄+40 mg/L ZnSO₄ was the best *in vitro* culture medium for ‘Floribunda Roses’ pollen germination.

Keywords: ‘Floribunda Roses’; pollen germination; the orthogonal experiment method