

# ‘凯特’杏花粉离体培养条件筛选

韩雪平, 薛晓敏, 王金政, 聂佩显, 陈 汝

(山东省果树研究所, 山东 泰安 271000)

**摘 要:**以‘凯特’杏为试材,采用不同培养基组分及不同培养基类型的方法,测定了花粉萌发率和花粉管伸长长度,研究了不同培养基组分及不同培养基类型对花粉萌发和花粉管伸长的影响。结果表明:固体培养基适合‘凯特’杏离体萌发,最适培养基组分是10%蔗糖+0.10%硼酸+0.5%琼脂;在该培养基上,花粉萌发率达90%以上,花粉管生长长度为13 510.30  $\mu\text{m}$ 。

**关键词:**‘凯特’杏;花粉萌发;蔗糖;硼酸

**中图分类号:**S 662.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0096-04

‘凯特’杏(*Prunus armeniaca* L. cv ‘Katy’)是山东省果树研究所从美国引进品种,该品种于1978年选育,具有果型大、丰产稳产、品质佳、耐贮运等优良特点<sup>[1]</sup>,但是杏树普遍坐果率低,原因之一是花粉生命力的影响,因此研究其花粉离体萌发对杂交育种、良种繁育和高产优质栽培具有十分重要的意义<sup>[2]</sup>。但是,前人对‘凯特’杏的研究多侧重于生理、品种栽培、温室栽培等方面<sup>[3-4]</sup>。对于其花粉萌发,尤其是固体培养基和液体培养基的系统比较研究尚鲜见报道,为此该试验研究了不同培养基组分及不同培养基类型对‘凯特’杏花粉萌发和花粉管伸长的影响,旨在对比和筛选出一种适合‘凯特’杏花粉萌发培养基,以期生产提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料取自山东省果树研究所泰东基地,2014年3月取‘凯特’杏品种含苞待放的气球状花蕾,剥取花药,呈一薄层于硫酸纸盒中,室温下阴干使其自然散粉,收集散出的花粉,置于4℃冷藏箱中贮藏备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基组分 配制培养基组分时,采用随机区组设计蔗糖和硼酸的浓度,蔗糖的浓度设计为5%、10%和

15%,硼酸为0.01%、0.05%和0.10%,共9个处理。

1.2.2 培养基类型 花粉活力测定采用2种培养基类型,即固体培养基(表1)和液体培养基(表2),琼脂浓度分别为0.5%和0%。

1.2.3 培养条件 将琼脂用微波炉加热至透明状,定容后将各处理倾倒在载玻片上,呈一均匀薄层,待其冷却至室温。用棉棒弹撒接种适量花粉。于恒温培养箱(温度25℃,湿度75%)黑暗条件下培养4 h,每2 h镜检1次。

### 1.3 数据分析

每处理3次重复,每次重复检测3个视野,共9个视野。统计视野内的花粉总数、发芽花粉粒数,取其平均值。花粉萌发以花粉管超过花粉粒半径为标准。萌发率(%)=(萌发的花粉数/观察花粉总数)×100%。

试验数据显著性分析采用SPSS 17.0进行Duncan检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 固体培养基对花粉萌发和花粉管伸长的影响

由表1可知,蔗糖浓度不同花粉萌发率和花粉管伸长长度不同。‘凯特’杏在6号培养基中花粉萌发率最高,花粉管长度最长。当蔗糖浓度为5%时(图1A),花粉壁破裂,内容物散出;而当蔗糖浓度为15%时,又会出现花粉质壁分离(图1D)。在同一蔗糖浓度下,0.10%和0.05%的硼酸浓度均对花粉萌发和花粉管伸长有较好的促进作用,但是当硼酸浓度为0.10%,花粉萌发率最高,花粉管伸长长度最长,因此该试验选择6号培养基(10%蔗糖+0.10%硼酸+0.5%琼脂,图1B)为‘凯特’杏花粉萌发的最佳培养基。

**第一作者简介:**韩雪平(1985-),女,硕士,研究实习员,现主要从事核果类育种等研究工作。E-mail:hanxuepingrun@163.com。

**责任作者:**薛晓敏(1979-),女,硕士,助理研究员,现主要从事果树育种与栽培等研究工作。

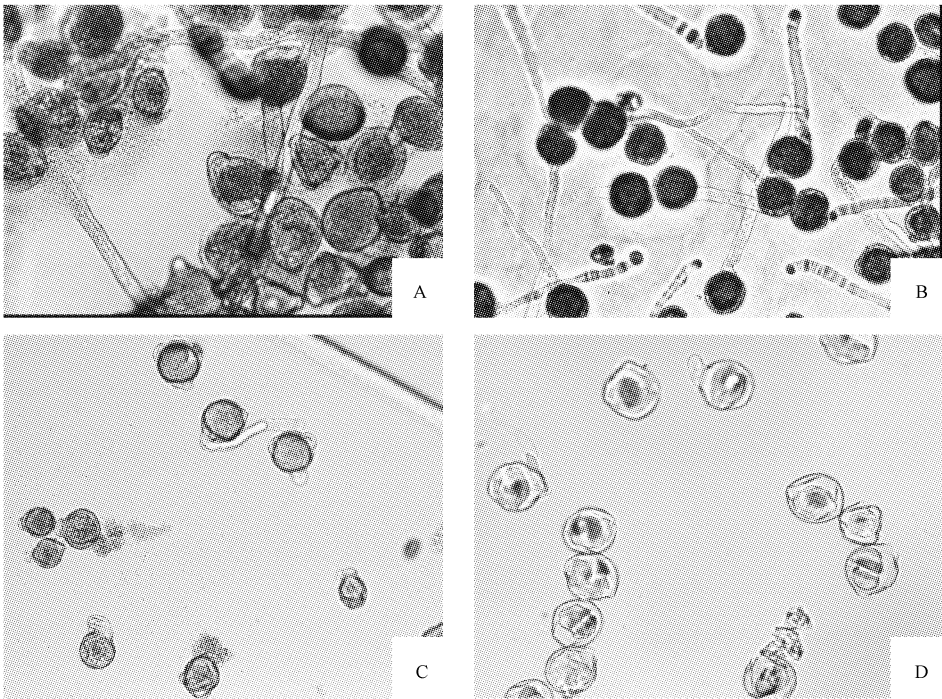
**基金项目:**国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2013BAD02B03-3-3)。

**收稿日期:**2014-11-12

表 1 固体培养基中不同浓度的蔗糖和硼酸对‘凯特’杏花粉离体萌发率和花粉管生长的影响

Table 1 Germination rate and tube length *in vitro* of pollen in *P. armeniaca* L. cv ‘Katy’ with different concentrations of sucrose and boric acid in the solid medium

培养基序号 Code of medium	蔗糖浓度 Concentration of sucrose/%	硼酸浓度 Concentration of boric acid/%	花粉萌发率 Rate of pollen germination/%	花粉管长度 Length of pollen tube/ $\mu\text{m}$
1	5	0.01	25.00	5 769.59
2	5	0.05	48.50	3 447.10
3	5	0.10	66.19	1 768.12
4	10	0.01	71.68	9 493.54
5	10	0.05	88.89	12 516.90
6	10	0.10	96.55	13 510.30
7	15	0.01	68.49	7 507.49
8	15	0.05	80.00	8 441.31
9	15	0.10	81.23	9 050.40



注:A: 5%蔗糖+0.01%硼酸+0.5%琼脂,B:10%蔗糖+0.10%硼酸+0.5%琼脂,C: 5%蔗糖+0.10%硼酸,D:15%蔗糖+0.10%硼酸。

Note: A:5% sucrose+0.01% boric acid+0.5% agar,B:10% sucrose+0.10% boric acid+0.5% agar,C:5% sucrose+0.10% boric acid,D:15% sucrose+0.10% boric acid.

图 1 不同培养基条件下对‘凯特’花粉的萌发率和花粉管伸长的影响

Fig. 1 Pollen germination rate and pollen tube length of *P. armeniaca* L. cv ‘Katy’ under different mediums in the liquid medium

2.2 液体培养基对花粉萌发和花粉管伸长的影响

影响与固体培养基中一致,但是,在液体培养基中花粉

由表 2 可知,不同浓度的蔗糖和硼酸对花粉萌发的

的萌发率明显低于固体培养基,花粉萌发率只有 50%左

表 2 液体培养基中不同浓度的蔗糖和硼酸对‘凯特’杏花粉离体萌发率和花粉管生长的影响

Table 2 Germination rate and tube length *in vitro* of pollen in *P. armeniaca* L. cv ‘Katy’ with different concentrations of sucrose and boric acid in the liquid medium

培养基序号 Code of medium	蔗糖浓度 Concentration of sucrose/%	硼酸浓度 Concentration of boric acid/%	花粉萌发率 Rate of pollen germination/%	花粉管长度 Pollen tube length/ $\mu\text{m}$
10	5	0.01	11.54	182.23
11	5	0.05	27.65	241.56
12	5	0.10	39.88	386.56
13	10	0.01	26.42	985.46
14	10	0.05	45.00	1 045.23
15	10	0.10	55.37	1 152.45
16	15	0.01	6.32	907.14
17	15	0.05	11.56	987.15
18	15	0.10	45.87	1 033.12

右而固体培养基达到 90% 以上,花粉管的伸长长度也只有固体培养基的 1/10 左右。5% 蔗糖浓度引起细胞内容物的散出(图 1C),15% 蔗糖浓度引起花粉细胞壁发生质壁分离(图 1D)。在固体培养基和液体培养基中,随着硼酸浓度升高,花粉萌发率和花粉管伸长长度都有上升的趋势,在不同蔗糖浓度下,0.10% 硼酸促进花粉萌发和

花粉管伸长的效果最好。

表 3 方差分析表明,在 2 种培养基类型中蔗糖对花粉萌发和花粉管伸长的影响都达到了显著水平( $P < 0.05$ ),除了固体培养基中硼酸对花粉管伸长未达到显著水平( $P < 0.05$ ),硼酸对花粉萌发和花粉管伸长的影响均达到了显著水平( $P < 0.05$ )。

表 3 培养基组分对‘凯特’杏花花粉萌发率和花粉管长度影响的显著性分析

Table 3 Significant leve of pollen germination rate and pollen tube length of *P. armeniaca* L. cv ‘Katy’ on different mediums

F 临界值 <i>F critical threshold</i>	固体培养基 <i>Solid medium</i>		液体培养基 <i>Liquid medium</i>	
	花粉萌发率 <i>Germination rate</i>	花粉管长度 <i>Pollen tube length</i>	花粉萌发率 <i>Germination rate</i>	花粉管长度 <i>Pollen tube length</i>
蔗糖 <i>Sucrose</i>	24.461 *	10.904 *	17.712 *	812.957 *
硼酸 <i>Boric acid</i>	10.416 *	0.218	8.084 *	30.024 *

注: \* 表示在 5% 水平下差异显著。

Note: \* shows significant difference at 5% level.

### 3 讨论与结论

培养基组分中主要影响因子是蔗糖和硼酸,蔗糖主要有 2 个作用:一是为花粉的萌发和花粉管生长提供碳源,二是维持细胞内外的渗透压;而硼酸对花粉萌发的作用是能促进花粉对糖的吸收和代谢,形成糖-硼酸复合体,增加氧的吸收,并促进构成花粉管膜的成分-果胶物的合成<sup>[2]</sup>。

在同一蔗糖浓度下,随着硼酸浓度的升高,花粉萌发率不断升高和花粉管生长长度不断增长,李桂云等<sup>[5]</sup>认为花粉在 0.3% 硼酸浓度的固体培养基上发芽率最高,而周怀军等<sup>[6]</sup>的研究结果表明,硼酸适宜浓度远小于 0.3%,该研究介于二者之间。在同一硼酸浓度下,蔗糖浓度过高和过低都不利于花粉的萌发<sup>[7]</sup>,最适‘凯特’杏花花粉萌发和花粉管伸长的蔗糖浓度是 10%,这与赵长星等<sup>[8]</sup>、王佳<sup>[9]</sup>的研究结果一致,而与黄家兴等<sup>[1]</sup>的不同。5% 蔗糖浓度小于细胞内渗透压使细胞内容物外渗,而 15% 蔗糖浓度大于细胞内渗透压细胞发生质壁分离,这与余义和等<sup>[2]</sup>研究结果一致。

方差分析表明,硼酸在固体培养基花粉管伸长中未达到显著水平,原因可能有以下 2 个:第一,存在试验误差;第二,设计硼酸浓度可以再大些。

花粉萌发和花粉管伸长长度在固体培养基上效果明显好于液体培养基,表明琼脂在花粉萌发中起到很重要的作用,其一是固定和支持的作用,其二锁住水分,防止水分在花粉萌发过程中过度蒸发。琼脂浓度因生产厂家不同而异,但是一般琼脂浓度不易太高,在 0.5%~1.0% 为宜,呈均匀透明状,最有利于花粉的萌发,琼脂浓度太高,就会使培养基过硬,使花粉萌发和花粉管伸长的难度加大;而琼脂浓度过低,又会出现和液体培养基一样的情况。

在设计 9 个处理中,最适合‘凯特’杏花花粉萌发的培养基是 10% 蔗糖+0.10% 硼酸+0.5% 琼脂,花粉的萌芽率达到 90% 以上,而花粉管伸长长度达到

13 510.30  $\mu\text{m}$ 。5% 蔗糖浓度小于细胞内渗透压使细胞内容物外渗,而 15% 蔗糖浓度大于细胞内渗透压细胞发生质壁分离,说明‘凯特’杏花花粉细胞内渗透压与 10% 蔗糖浓度相当。硼酸促进花粉的萌发和花粉管的伸长,在 0.10% 浓度下花粉萌发率达到最大,花粉管伸长长度最长,在 0.10% 以上浓度花粉萌发率是否不断升高和花粉管生长长度是否不断增长还有待于进一步的研究。另外,蔗糖在‘凯特’杏花花粉萌发和花粉管伸长中起到重要作用,硼酸在其中作用还需要进一步研究。

在固体培养基中花粉萌芽率达到 90% 以上,而在液体培养基中花粉最高的萌芽率是 50%,花粉管的伸长长度只有最适固体培养基的 1/10 左右。说明琼脂在花粉的萌发和花粉管的生长长度中作用十分重要,因此固体培养基比液体培养基更适合花粉萌芽率和花粉管伸长,这与李桂云等<sup>[5]</sup>研究结果一致。

该研究只是初步探讨了蔗糖和硼酸对花粉萌发和花粉管伸长的影响,激素、钙和其它营养元素对其的影响还有待于进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 余义和,李桂荣,王新娟,等. 蔗糖和硼酸浓度对金光杏梅花粉离体萌发的影响[J]. 山西果树,2006,7(4):7-8.
- [3] 黄永红,王金政,李元亭,等. 凯特杏不同栽培条件还原性维生素 C 含量的比较[J]. 北方园艺,2009(12):82-83.
- [4] 王金政,单守明,张安宁. 凯特杏设施栽培特性研究[J]. 中国农学通报,2005,21(6):267-269.
- [5] 李桂云,顾景梅,王峰. 不同培养基对果树花粉发芽率影响的试验[J]. 山西果树,2001,2(1):4-5.
- [6] 周怀军,安连荣,朱哲锋,等. 杏树不同品种及果枝花粉发芽试验研究[J]. 河北林果研究,2000,15(3):253-256.
- [7] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京:人民教育出版社,1982:561.
- [8] 赵长星,刘成连. 培养基种类及蔗糖浓度对部分果树花粉发芽率的影响[J]. 河北林果研究,2001,16(3):240-243.
- [9] 王佳. 杏品种授粉与果实发育生物学特性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011.



# 决明巴豆酰辅酶 A 羧化酶基因的克隆、序列分析以及组织差异表达

刘祖碧, 李娟娟, 朱乾坤, 宋涛, 周嘉裕, 廖海

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

**摘要:**通过 RACE 克隆得到了决明 MCCase 的 cDNA, 利用生物信息学进行系统分析, 并利用荧光定量 PCR 对决明 MCCase 进行了差异表达分析。结果表明:决明 MCCase 全长 1 269 bp, 编码 423 个氨基酸的蛋白质, 为偏酸性不稳定蛋白质, 定位于线粒体或细胞质中。决明 MCCase 与拟南芥的 MCCase 同源性最高。MCCase 上有一个保守的功能结构域, 与乙酰 CoA 羧化酶显示出较高的相似性, 并在该结构域内发现了 4 个高度保守的氨基酸基序, 可能在催化过程中发挥关键作用。MCCase 在不同组织中存在差异表达, 在根与胚轴中显示出高表达, 在其它组织中表达量低, 这可能与光和糖类抑制 MCCase 的表达有关。

**关键词:**巴豆酰辅酶 A 羧化酶; 决明; 基因克隆; 生物信息学; 基因表达

**中图分类号:**S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0099-06

甲基巴豆酰-CoA 羧化酶 (Methylcrotonyl-CoA carboxylase, MCCase) 是一种催化 ATP 依赖性的羧化反应, 催化 3-甲基巴豆酰-CoA (3-Methylcrotonyl-CoA, MC-CoA) 生成 3-甲基戊二酰-CoA (3-methylglutonyl-CoA, MG-CoA)<sup>[1]</sup>, 反应机制如图 1 所示。在动物、细菌和真菌中, MCCase 在一些代谢途径中是必需的, 包括参与亮

氨酸的分解代谢, 甲基戊酸分支和类异戊二烯分解代谢<sup>[2]</sup>。植物中 MCCase 被研究的很少, 研究发现, 植物有 2 个不同的分解亮氨酸的代谢途径, 一个是不需要 MCCase 与线粒体的过氧化酶通路, 另一条通路则与动物、细菌和真菌中一样, 后一条代谢通路提供了证据证明 MCCase 在植物代谢中发挥功能<sup>[1]</sup>。

决明子属豆科一年生植物决明 (*Cassia obtusifolia* L.) 或小决明 (*Cassia tora* L.) 的干燥成熟种子<sup>[4]</sup>, 决明子中含有多种有效成分, 具有降血压、降血脂、保肝及抑菌等生理活性<sup>[5]</sup>。决明中还含有多种营养成分, 富含脂类、蛋白质以及糖类, 其中必需氨基酸中以亮氨酸和赖氨酸的含量最高, 是极具营养价值的保健食品, 是国家

**第一作者简介:**刘祖碧 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。

**责任作者:**廖海 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: hliao2012@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目 (31371232)。

**收稿日期:**2014-09-17

## Screening Factors That Impact Pollen Growth of *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy' in vitro

HAN Xue-ping, XUE Xiao-min, WANG Jin-zheng, NIE Pei-xian, CHEN Ru  
(Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000)

**Abstract:** Taking *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy' as material, the pollen germination rate and the pollen tube length that different types of mediums and different concentrations of sucrose and boric acid were determined. The effect of different types of mediums and different concentrations of sucrose and boric acid for pollen germination and pollen tube elongation were studied. The results showed that, most suitable medium for *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy' was 10% sucrose + 0.10% boric acid + 0.5% agar. It was more than 90% pollen germination rate and the length of pollen tube growth 13 510.30  $\mu\text{m}$  in vitro.

**Keywords:** *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy'; pollen germination; sucrose; boric acid