

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.074

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

韩 霜

(商丘师范学院生命科学院植物与微生物互作重点实验室, 河南商丘 476000)

摘要:以国庆小菊金陵丰收为试验材料,使用的培养基是 $\text{ME}_3 + 150 \text{ g/L PEG4000} + 100 \text{ g/L 蔗糖}$,添加不同浓度钙和硼酸,研究不同浓度的钙和硼酸对国庆菊花花粉萌发和花粉管生长的影响,旨在获得菊花花粉离体萌发最佳培养基。结果发现:硼酸对花粉萌发率影响明显,当硼酸浓度是 100 mg/L 时,花粉培养 2 h 时花粉萌发率达到最高,为 10.05% 。外源钙能促进花粉的萌发,并影响花粉管的生长速度和生长质量,一定浓度的钙使花粉管生长笔直,在钙浓度为 400 mg/L 时金陵丰收花粉管生长状况最佳。外源钙浓度过高和培养时间过长时,花粉管生长出现细弱、畸形,而且容易断落。

关键词:菊花;离体培养;花粉萌发率;花粉管生长

中图分类号:S682.1+10.4+3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0258-03

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是我国十大传统名花和世界四大切花之一,具有很高的观赏价值。我国是菊花的起源中心,拥有 3 000 余个菊花品种^[1]。菊花是异花授粉植物,具有自交不亲和特性,花粉生活力是决定杂交结实的重要因素之一,因此研究花粉活力对指导菊花育种具有重要理论和现实意义^[2]。花粉的萌发与生长^[3]要通过吸胀、停滞、花粉管发端、花粉管迅速伸长这 4 个阶段。研究报道,许多植物的花粉可以在培养基上萌发,如杜纪红等^[3]、杜玉虎等^[4]、储立明等^[5]分别对桃、榆叶梅、丝瓜等花粉进行了离体培养研究。

国庆菊是菊花中的一种栽培类型,不仅具有生长繁盛、开花期长、分枝性强的优点,而且营造景观效果好、耐盐碱、成活率高^[6]。花粉萌发和花粉管生长是植物受精的一个重要组成部分,不少研究表明,花粉萌发时引发的群体效应可由外源钙离子来替代,这种作用对花粉萌发和花粉管生长过程很重要^[7-8]。花粉管萌发和生长需要硼的作用,花粉管顶端聚集的酯化果胶^[9],是由细胞壁上聚集了细胞中多数的硼,与果胶类物质 RG-Ⅱ(鼠李半乳糖醛酸-Ⅱ)结合形成的,这种酸性果胶物质有利于顶端的延展,整个花粉管内遍布这种酸性的果胶物质,使细胞壁机械强度增大^[10],从而推测,硼酸可能与 RG-Ⅱ结合形成果胶网络的结构,这种结构能调节细胞壁结构和性质,硼酸可防止酚类物质的积累,促进花粉管的生长^[11]。本研究对国庆小菊金陵丰收花粉离体萌发培养基成分及其浓度和萌发时间进行研究,以期获得菊花最适宜的离体培养条件,为花粉萌发和活力测定提供高效、简便的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为菊花品种金陵丰收,该品种初花期在 9 月下旬,盛花期在 10 月中旬,该材料由南京农业大学菊花种质资源中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉采集 于晴天中午 12:00,采取金陵丰收盛开花朵的花粉,装到离心管中,避光,备用。

1.2.2 花粉萌发培养基的确定

1.2.2.1 培养基成分 以 $\text{ME}_3 + 150 \text{ g/L PEG4000} + 100 \text{ g/L 蔗糖}$ 为培养基^[1],培养基中 ME_3 ^[12]的基本成分包含大量元素: $370 \text{ mg/L MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 950 mg/L KNO_3 、 $412.5 \text{ mg/L NH}_4\text{NO}_3$ 、 175 mg/L KCl 、 $85 \text{ mg/L KH}_2\text{PO}_4$;微量元素: 0.83 mg/L KI 、 $7.45 \text{ mg/L Na}_2\text{EDTA}$ 、 $0.25 \text{ mg/L Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.025 \text{ mg/L CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.025 \text{ mg/L FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.025 \text{ mg/L CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;维生素 B_1 、维生素 B_6 各 1 mg/L 。

1.2.2.2 培养基设置 在 $\text{ME}_3 + 150 \text{ g/L PEG4000} + 100 \text{ g/L 蔗糖}$ 的培养基^[1]中加入不同浓度的钙和硼酸,其中硼酸浓度分别为 5 、 50 、 100 、 200 mg/L ,钙浓度分别为 0 、 200 、 400 、 800 mg/L ,以 $\text{ME}_3 + 150 \text{ g/L PEG4000} + 100 \text{ g/L 蔗糖} + 0 \text{ mg/L 硼酸}$ 的培养基为对照(CK I),再分别加入上述浓度的硼酸,得出最适的硼酸浓度 A;再加入上述浓度的外源钙,以 $\text{ME}_3 + 150 \text{ g/L PEG4000} + 100 \text{ g/L 蔗糖} + \text{A 浓度硼酸}$ 的培养基为对照(CK II),从而得出最适的钙浓度 B。

1.2.3 花粉萌发与花粉管长度检测

1.2.3.1 花粉萌发方法 花粉萌发方法参照赵宏波等的方法^[13]加以修改,将采集来的菊花花粉,从离心管里倒出,放于玻璃纸上,然后用毛笔蘸取,轻撒适量的花粉到凹形载玻片的凹槽中,用胶头滴管吸取培养液 $2 \sim 3$ 滴,滴在盛有花粉的载

收稿日期:2015-09-18

基金项目:河南省科技厅基础与前沿项目(编号:142300410321);河南省重点科技攻关项目(编号:142102110184)。

作者简介:韩 霜(1982—),女,博士,讲师,主要从事植物光合作用方面研究。E-mail:htshd_012@163.com。

玻片凹槽中。将培养皿底部垫上 1 层吸水的滤纸,将载玻片放上,并在两旁放上吸水的脱脂棉球,用以保湿,盖上培养皿盖后放入恒温箱内 20 ℃ 进行培养,定时取出,在显微镜下 (10×10) 观察统计花粉的萌发率并用显微测微尺测量花粉管的长度。

1.2.3.2 花粉萌发率 将花粉放于不同浓度培养基中,分别培养 0.5、1.2、4 h 后从恒温培养箱里取出凹形载玻片在显微镜下观察。每种试验处理重复 3 次,每次重复随机观察 3 个视野,每个视野观察的花粉总数不少于 60 粒,以花粉管的长度大于花粉粒的直径为花粉萌发的标准^[1],以花粉萌发率 = 萌发花粉粒数/花粉粒总数 × 100% 为计算方法,最后将花粉的萌发率进行统计。

1.2.3.3 显微测微尺的使用 显微测微尺包括镜台测微尺和目镜测微尺,测量前,要先进行校正,镜台测微尺的中央有 1 个全长 1 mm 的刻度标尺,等分成 100 个小格,每小格的长度为 0.01 mm,可以用它来校正目镜测微尺每小格的长度。校正后的目镜测微尺以每小格所代表的实际长度作为测量的尺度。

1.2.3.4 花粉管长度检测 将花粉放于不同浓度培养基中,分别培养 0.5、1.0、2.0、4.0 h 后从恒温培养箱里取出凹形载

玻片在显微镜下观察。每种试验处理重复 3 次,每个视野随机测量 20 个花粉管的长度,用显微镜的测微尺测量花粉管长度,计算随机测量的 20 个花粉管长度的平均值。

1.3 统计分析

结果用“平均值 ± 标准误”表示,用 SPSS v17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析,处理之间差异显著水平用单因素邓肯检验, $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 硼酸对花粉萌发的影响

金陵丰收花粉萌发率随着硼酸浓度的升高而增加,与对照相比,在培养时间 0 ~ 1 h 内,5、50 mg/L 处理中的花粉萌发率增加最显著。不同硼酸浓度处理的花粉萌发率差异显著,其中 100 mg/L 2 h 时的花粉萌发率达到 10.050%,比 50、5 mg/L 花粉萌发率分别增加了 89%、92%。当硼酸浓度升高到 200 mg/L 时,每个时间段的萌发率基本相同,而且与 100 mg/L 硼酸浓度相比,花粉萌发率有所下降(表 1)。说明硼酸只有在适宜的浓度下,才会对花粉萌发率有一定促进作用,高浓度的硼酸对花粉的萌发反而有一定的抑制作用。

表 1 不同硼酸浓度对花粉离体萌发率的影响

硼酸浓度 (mg/L)	萌发率 (%)			
	0.5 h	1.0 h	2.0 h	4.0 h
0	1.340 ± 0.146c	3.333 ± 0.240c	4.543 ± 0.413c	4.752 ± 1.340b
5	4.697 ± 0.497b	5.103 ± 0.552b	5.223 ± 0.297c	5.450 ± 0.124b
50	4.870 ± 0.245b	5.587 ± 0.160b	5.327 ± 0.104c	6.193 ± 0.116b
100	6.907 ± 0.281a	6.907 ± 0.281a	10.050 ± 0.843a	10.033 ± 0.910a
200	7.039 ± 0.057a	7.043 ± 0.578a	7.337 ± 0.538b	7.480 ± 0.125ab

注:数值代表“平均值 ± 标准误”(n = 3),表中不同字母代表同一个时间的不同硼酸浓度之间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.2 硼酸对花粉管生长的影响

硼酸对花粉管生长具有明显影响(图 1)。在无硼酸的培养基上,花粉管细长且弯曲(图 1-d),加上硼酸之后,花粉管生长变粗而且直(图 1-h)。不同浓度硼酸对金陵丰收花粉管生长的影响达到显著水平,在 2 h 之内,增加硼酸浓度金陵丰收花粉管有伸长的趋势,但 2 h 以后,花粉管的伸长速度明显缓慢。硼酸 200 mg/L 时的每个时间段的平均花粉长度与 100 mg/L 的相比无明显的变化。试验中发现在无硼酸和有硼酸的条件下都出现了 1 个花粉粒长出 2 根花粉管的现象(图 1-d,图 1-h,红色箭头)。在无硼条件下,随着时间的延长花粉管有伸长趋势,但添加硼之后能促进金陵丰收花粉管的生长(表 2)。

表 2 不同硼酸浓度对花粉管长度的影响

硼酸 浓度 (mg/L)	花粉管长度(mm)			
	0.5 h	1.0 h	2.0 h	4.0 h
0	0.027 ± 0.002b	0.041 ± 0.004b	0.047 ± 0.003b	0.043 ± 0.004b
5	0.042 ± 0.003a	0.048 ± 0.005b	0.059 ± 0.006b	0.059 ± 0.006b
50	0.049 ± 0.005a	0.05 ± 0.005b	0.067 ± 0.007a	0.070 ± 0.007a
100	0.054 ± 0.005a	0.061 ± 0.006a	0.073 ± 0.008a	0.072 ± 0.008a
200	0.055 ± 0.006a	0.062 ± 0.007a	0.075 ± 0.008a	0.074 ± 0.008a

2.3 钙对花粉萌发的影响

钙显著提高了金陵丰收花粉萌发率,随着钙浓度的升高花粉萌发率显著增加,以钙浓度为 400 mg/L 处理中的花粉萌

发率最高,当其浓度增加到 800 mg/L 时,花粉的萌发率反而下降(表 3)。

2.4 钙对花粉形态和花粉管生长的影响

培养基中添加 Ca^{2+} 对花粉管生长的影响不显著(表 4),对花粉管品质的影响较大,外源钙浓度过高以及离体培养时间过长都不适合金陵丰收花粉管生长,当外源 Ca^{2+} 达到 400 mg/L 时,在 0 ~ 1 h 期间花粉管生长正常(图 2-e,图 2-f),2 h 后花粉生长出现异常(图 2-g,图 2-h);当外源 Ca^{2+} 达到 800 mg/L 时花粉管末端细弱、畸形(图 2-j 至图 2-l)。

3 讨论

硼在植物体内含量低,分布不均匀,以花中含量最高,参与果胶物质的合成,有利于花粉管壁的形成,因此有利于花粉管的生长^[14]。迄今有关硼酸对花粉萌发和花粉管生长的研究报道较多,均认为一定浓度的硼酸有利于花粉萌发和花粉管生长^[15]。赵宏波等研究认为菊花花粉在离体培养 0.5 ~ 2.0 内,萌发率呈直线上升趋势,2 h 之后花粉的萌发率增加不显著,外源硼和钙对金陵丰收花粉萌发都是必需的^[13],本研究得出以上相同的结论。本研究还发现,一定浓度的钙能显著提供花粉萌发率并使生长健壮,但浓度过高或培养时间过长时花粉萌发率反而受到抑制,2 h 后花粉细弱畸形。不同植物种类的花粉萌发和花粉管生长所需的最适硼酸浓度不同,杜

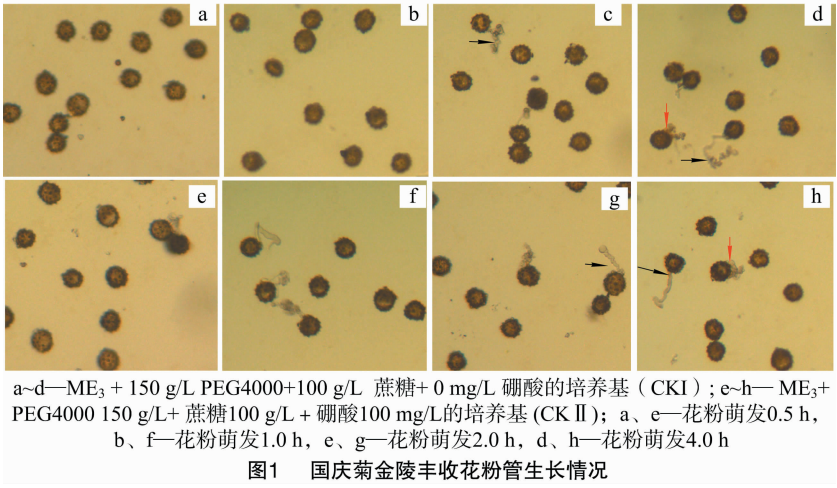


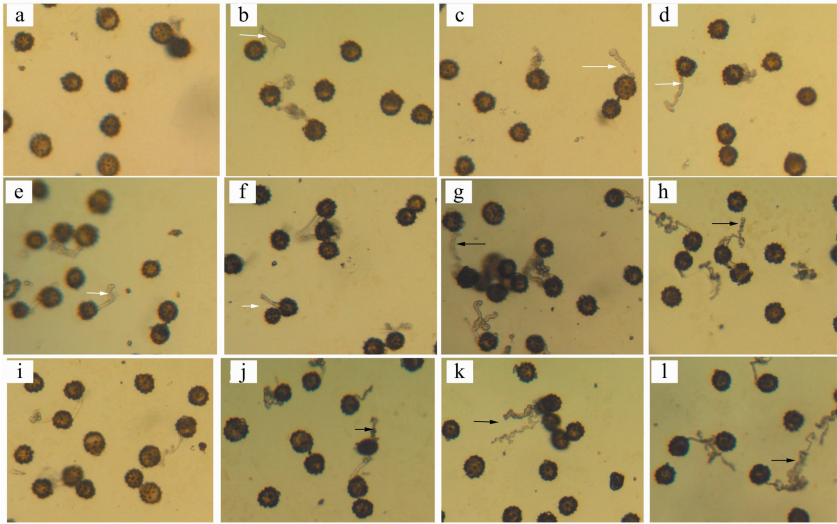
图1 国庆菊金陵丰收花粉管生长情况

表 3 不同钙浓度对花粉离体萌发率的影响

钙浓度 (mg/L)	萌发率(%)			
	0.5 h	1.0 h	2.0 h	4.0 h
0	6.909 ± 0.567c	7.818 ± 0.767c	10.050 ± 1.501b	9.933 ± 1.102c
200	9.438 ± 0.611c	10.151 ± 0.754c	15.368 ± 1.411b	15.534 ± 1.131c
400	20.577 ± 1.322a	21.795 ± 1.987a	22.464 ± 1.909a	23.279 ± 2.098a
800	10.405 ± 0.132b	13.345 ± 1.112b	12.038 ± 1.221b	12.097 ± 1.209b

表 4 不同钙浓度对花粉管长度的影响

钙浓度 (mg/L)	花粉管长度(mm)			
	0.5 h	1.0 h	2.0 h	4.0 h
0	0.051 ± 0.005a	0.061 ± 0.007b	0.073 ± 0.006a	0.072 ± 0.009a
200	0.054 ± 0.004a	0.065 ± 0.007b	0.082 ± 0.005a	0.083 ± 0.009a
400	0.052 ± 0.007a	0.083 ± 0.007a	0.093 ± 0.013a	0.093 ± 0.009a
800	0.053 ± 0.008a	0.090 ± 0.009a	0.090 ± 0.009a	0.091 ± 0.009a



a~d—ME₃+150 g/L PEG4000+100 g/L蔗糖+硼酸100 mg/L的培养基(CK II)；e~h—ME₃+150 g/L PEG4000+100 g/L蔗糖+硼酸100 mg/L+Ca²⁺ 400 mg/L的培养基；i~l—ME₃+PEG4000 150 g/L+蔗糖100 g/L+100 mg/L硼酸+Ca²⁺ 800 mg/L的培养基。a、e、i—花粉萌发0.5 h，b、f、j—花粉萌发1 h，e、g、k—花粉萌发2 h，d、h、l—花粉萌发4 h

图2 国庆菊金陵丰收花粉管生长情况

纪红等研究表明,0.1%的硼酸可提高大多数桃品种花粉萌发率^[3],本研究发现100 mg/L硼酸对金陵丰收萌发最有利。

参考文献:

[1]李辛雷,陈发棣.菊花二倍体野生种与栽培种间杂种的幼胚拯救[J].林业科学,2006,42(11):42-46.
[2]龚明,曹宗巽.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,1995,31(5):321-328.
[3]杜纪红,叶正文,苏明申,等.桃花粉离体萌发和花粉管生长特性研究[J].西北植物学报,2011,31(1):64-71.
[4]杜玉虎,蔡影,蒋锦标,等.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):106-109.
[5]储立民,金爱红,徐冬青,等.钙离子浓度对丝瓜花粉萌发和花粉管生长的影响[J].河南农业科学,2005(4):56-58.
[6]陈俊愉,崔娇鹏.地被菊培育与造景[M].北京:中国林业出版社,2006:6-36.
[7]龚明,杨中汉,曹宗巽.钙对花粉萌发的启动产效应对花粉管生长的调节作用[J].北京大学学报:自然科学版,1995,31(2):249,238-249.
[8]胡适宜.被子植物胚胎学[M].北京:人民教育出版社,1982:103-136.
[9]Blevins D G,Lukaszewski K M. Boron in plant structure and function[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,1998,49:481-500.

田慧敏,文 静,任 芳. 色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)形态学和 ITS 测序鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):261-263.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.075

色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)形态学和 ITS 测序鉴定

田慧敏,文 静,任 芳

(赤峰学院生命科学学院,内蒙古赤峰 024000)

摘要:利用子实体形态特征和 rDNA-ITS 测序分析相结合的方法,对采自内蒙古赤峰市赛罕乌拉自然保护区的 1 份色钉菇[*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill.]进行了鉴定,对其 rDNA-ITS 区段进行扩增,片段约为 730 bp,并对其外形特征及显微特征进行了详细描述。

关键词:色钉菇;ITS 测序;形态学;菌种鉴定

中图分类号:S646.901 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0261-03

色钉菇[*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill.],别称血红铆钉菇,俗称红蘑、松蘑等,属担子菌门牛肝菌目(Boletales)铆钉菇科(Gomphidiaceae)色钉菇属(*Chroogomphus*),首次由 Jacob 于 1774 年描述为 *Agaricus rutilus*,后 Miller 于 1964 年划入色钉菇属 *Chroogomphus*^[1]。该菌与松属的植物共生,最早发现于欧洲和北美,主要识别特点是菌盖近圆锥形,后平展中部凸起,边缘内卷,浅紫褐色至咖啡褐色、砖红色、红褐色,湿时黏,干有光泽。菌褶延生,稀,青黄色渐变紫褐色,不等长,菌柄与菌盖色相近且基部带黄色,上部有易消失的红褐色菌环,囊状体呈长棒状^[2]。

研究表明,色钉菇含有多种氨基酸、蛋白质、维生素、多糖、萜类、内酯、香豆素、酚类、甾类等营养物质,具有广泛的药用活性^[3],其多糖具有明显的抗肿瘤活性,尤其对肝癌的治疗具有辅助作用^[4-7],在我国该菌广泛分布,是名贵的野生食用真菌和药用菌,深受人们的喜爱,但是其子实体受环境和地域的影响,颜色、大小会有一定的变化,而且该种与多种铆钉菇科真菌外形相似,如粘铆钉菇(*Gomphidius glutinosus*)、红铆钉菇(*G. roseus*)、亚红铆钉菇(*G. subroseus*)等,采食时容易混淆,市场上的干品经常会混有其他品种,因此仅靠形态识别会产生误差。国内外许多菌物学家利用 ITS 测序技术对其进行鉴定并研究了演化地位^[8-10]。本研究利用形态学和 rDNA-ITS 序列测序法相结合的方法对色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)进行了分类鉴定并做了详细的描述。

收稿日期:2015-03-31

基金项目:内蒙古高等学校科学研究项目(编号:NJZZ16248)。

作者简介:田慧敏(1980—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士,讲师,从事真菌学研究。E-mail:tiancfxy2009@126.com。

1 材料与方法

1.1 供试标本

供试标本子实体于 2013 年 8 月 17 日采自内蒙古赤峰市赛罕乌拉自然保护区庆云山(43°12'~44°28'N,118°11'~120°05'E),樟子松地上散生。标本晾干后,编号(CFSZ10397、10390)、分类、鉴定,超低温冷冻后存放于赤峰学院菌物标本室(CFSZ)。

1.2 形态鉴定

宏观观察使用体视显微镜,颜色的判断主要依据采集时拍摄的彩色照片,大小用游标卡尺测量新鲜子实体 2~5 个,菌盖、菌柄大小、颜色、形状、附属物等,菌褶颜色,变化,着生方式,菌肉颜色、味道、气味等项。显微观察通常 4%~5% KOH 作浮载剂。孢子、菌丝、囊状体、担子等的淀粉质反应是将材料置于 Melzer 氏试剂中来判断。

1.3 ITS 鉴定

1.3.1 基因组 DNA 的提取及检测 子实体干品菌盖部分(含菌褶)用液氮研磨,使用北京鼎国生物公司的真菌 DNA 提取试剂盒对提取的 DNA 进行纯化后,先用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 rDNA-ITS 区 PCR 扩增 ITS-PCR 的扩增体系为:PCR mix 25 μL,20 mol/L ITS1/ITS4 引物各 0.5 μL,模板 DNA 2 μL,ddH₂O 22 μL,反应总体积为 50 μL。扩增反应在德国 eppendorf 公司的 5331 型 PCR 扩增仪上进行。扩增程序为:94 ℃ 3 min;95 ℃ 40 s,58 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,共 34 个循环;72 ℃ 5 min;4 ℃ 保存。ITS 引物为 ITS1 和 ITS4 通用引物^[11]。

1.3.3 测序 PCR 产物经 Takara 胶回收试剂盒回收纯化

[10] Li Y Q, Chen F, Linskens H F. Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants[J]. Sexual Plant Reproduction, 1994, 7(3): 145-152.

[11] 杨晓东,孙素琴,李一勤. 硼缺乏导致花粉管细胞壁多糖分布的改变[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1169.

[12] Leduc N, Monnier M, Douglas G C. Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*[J]. Sexual Plant Reproduction, 1990, 3(4): 228-235.

[13] 赵宏波,陈发棣,房伟民. 栽培小菊和几种菊属植物花粉萌发研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 22-27.

[14] Jackson J F. Borate control of energy driven protein secretion from pollen and interaction of borate with auxin or herbicide a possible role for boron in membrane events[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1991, 10: 221-229.

[15] 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.