

夏春英,谢小敏,刘江枫,等. 澳洲石斛花粉离体萌发液体培养基研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):149-152.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.027

澳洲石斛花粉离体萌发液体培养基研究

夏春英¹, 谢小敏¹, 刘江枫^{2,3}, 郑诚乐¹

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002; 2. 福建农林大学园林学院, 福建福州 350002;

3. 福建省福州市于山风景区管理处, 福建福州 350001)

摘要:以澳洲石斛(*Dendrobium kingianum*)新鲜花粉为试验材料,在单因素试验基础上,设计正交试验,比较蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 对澳洲石斛花粉萌发的影响,旨在筛选出适合澳洲石斛花粉离体萌发的液体培养基配比,为澳洲石斛花粉离体培养及杂交育种提供参考依据。结果表明,单因素试验中,在一定浓度范围内的蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$,对澳洲石斛花粉萌发具有一定促进作用,超过一定浓度则起抑制作用;正交试验中,蔗糖、 H_3BO_3 和 $CaCl_2$ 对澳洲石斛花粉萌发的影响都极显著,适宜的花粉离体萌发培养液为10 g/L蔗糖+40 mg/L H_3BO_3 +30 mg/L $CaCl_2$,花粉萌发率为37.02%。

关键词:澳洲石斛;花粉;离体萌发;液体培养基

中图分类号: S682.310.4⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2020)08-0149-04

澳洲石斛(*Dendrobium kingianum*)是兰科石斛属植物,原产于澳大利亚,生长在阔叶林的树干上,为附生兰。澳洲石斛植株较小,其叶茎特殊,具有根茎、直立、匍伏或具假球茎等生育形式,上部略呈回折状,类似竹节,呈黄绿色^[1];叶着生于近茎顶,2~4张叶,一般为椭圆形,与竹叶形似;花葶从叶腋抽出,花簇生,花径2~3 cm,萼片及花瓣为紫红色,唇瓣前端带有紫色条斑,瓣心泛白^[2]。石斛兰是兰科石斛属的总称,与卡特兰、蝴蝶兰、文心兰同为世界四大观赏洋兰^[3]。随着人们对观赏石斛消费需求的扩大,观赏石斛的育种及其杂交新品种的研究越来越受关注^[4]。澳洲石斛花色鲜艳,可切花观赏,在兰花爱好者中颇受欢迎,相关的学术研究也逐渐开展,其中,培育品种是最首要的一个方面。

花粉作为雄配子体,其质量和生活力是保证受精成功所必备的条件之一,在杂交育种工作中,具有较高生活力的花粉是确保杂交成功的关键,其地位举足轻重^[5-7]。兰科植物的花粉块状结构为四分体,从而降低了花粉离体萌发的速率,液体培养时,在培养前将花粉加以浸泡研磨,不仅可以提高试验

效率还可提高花粉的萌发率^[8]。澳洲石斛是石斛兰中的一个新兴品种,目前,国内外关于澳洲石斛的相关研究报道还比较少见。因此,本研究在前人研究的基础上,以澳洲石斛的花粉为试验材料,采用液体培养法,研究了不同蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 浓度及其正交组合对花粉萌发的影响,以期对澳洲石斛花粉生活力测定提供技术参考与试验方法,进而为其杂交育种和繁殖生物学的深入研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于2018年1—5月进行,材料为栽培于福建省福州市于山风景区兰花圃内的澳洲石斛,所用花粉取自澳洲石斛盛花期当天开放的新鲜花朵,09:30—10:30采集花粉(图1右第4朵花的花粉)。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验 在澳洲石斛盛花期,于晴天的09:30—10:30采集澳洲石斛当天开放的花朵于滤纸上,迅速转至实验室条件进行下一步试验操作。采用液体培养法,首先进行单因素试验设计,分别对蔗糖、 H_3BO_3 和 $CaCl_2$ 这3个培养基组分进行研究,并作如下质量浓度梯度设置,即蔗糖为1、5、10、20、30、40、50、60 g/L, H_3BO_3 为10、20、30、40、50、60、70、80 mg/L, $CaCl_2$ 为1、5、10、20、30、40、50、60 mg/L,各设置8个质量浓度梯度,并正确配制相应的液体培养基。将配制好的培养液每种取3 mL加入离心管,然后把适量花粉团装入离心管中并用

收稿日期:2019-03-29

基金项目:福建省福州市园林局2014年度绿化专项科研项目(编号:201404)。

作者简介:夏春英(1996—),女,福建三明人,硕士研究生,从事花卉与景观园艺研究。E-mail:1144179784@qq.com。

通信作者:郑诚乐,博士,教授,从事果树栽培生理与生化、花卉与景观园艺、设施园艺等研究。E-mail:zcl2003@126.com。

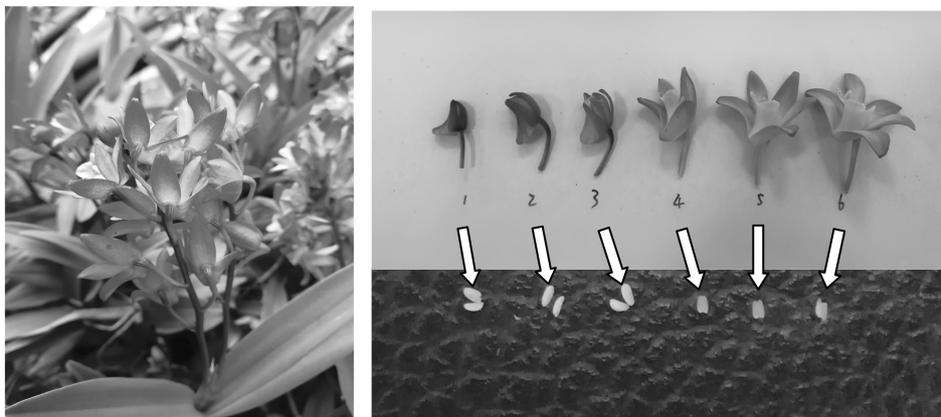


图1 澳洲石斛花序(左)和澳洲石斛开花动态变化及其花粉变化(右)

镊子轻轻摩擦花粉团使花粉粒均匀分散于培养液中,在 26 ℃ 恒温箱中暗培养。培养 36 h 后取数个样进行花粉萌发情况预观测,培养至 48 h 后,将培养的花粉从恒温箱中全部取出,用胶头滴管取适量培养液于载玻片上,盖上盖玻片,在生物显微镜 4 倍镜下镜检,每次观测时随机选取 10 个视野,排除畸形花粉后,统计花粉萌发情况。试验重复 3 次,以花粉管长度大于花粉粒直径为标准。

花粉萌发率 = 萌发花粉数 / 花粉总数 × 100%。

1.2.2 正交试验设计 在单因素试验的基础上,选择在单因素试验中对澳洲石斛花粉离体萌发影响较大的蔗糖、 H_3BO_3 和 $CaCl_2$ 的 4 个质量浓度水平,采用 $L_{25}(5^3)$ 正交试验设计,每个组合重复 3 次,以确定培养基不同组分的最佳配比,培养与检测方法同“1.2.1”节。

1.3 数据处理

所测数据用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析。在处理正交试验原始数据时,如果服从二项分布的百分率资料中有小于 30% 或大于 70% 的百分率,则应对资料中全部百分率数据进行反正弦转换,然后再进行方差分析^[9]。因此,由于本试验中有许多小于 30% 的百分率数据,所以先对数据进行反正弦函数转换,再用转换后的数据进行 SPSS 方差分析,反正弦函数公式为 $x = \arcsin \sqrt{P}$ (其中, P 为萌发率百分数)。

2 结果与分析

2.1 不同培养基组分对澳洲石斛花粉离体萌发的影响

由表 1 可知,随着蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 这 3 个单因素培养基组分的质量浓度变化,花粉萌发率均呈

现先上升后下降的趋势。通过 Excel 和 SPSS 软件对原始数据处理的结果来看,在单因素方差分析和多重比较中,蔗糖对澳洲石斛花粉萌发率的影响最明显,当其质量浓度为 10 mg/L 时,萌发率与其他组均有显著差异,萌发率为最大值 17.19%;当 H_3BO_3 质量浓度为 30 mg/L 时,花粉萌发率最高,为 13.31%; $CaCl_2$ 质量浓度为 30 mg/L 时,花粉萌发率最高,为 5.13%。

表 1 澳洲石斛花粉离体萌发单因素试验

蔗糖 (g/L)	萌发率 (%)	H_3BO_3 (mg/L)	萌发率 (%)	$CaCl_2$ (mg/L)	萌发率 (%)
1	9.26	10	8.83	1	1.41
5	9.75	20	11.06	5	1.44
10	17.19	30	13.31	10	2.70
20	9.60	40	12.17	20	2.85
30	9.25	50	6.38	30	5.13
40	8.42	60	6.99	40	4.73
50	4.21	70	6.11	50	2.73
60	3.44	80	5.51	60	1.65

2.2 最适培养基筛选

选择在单因素试验中对澳洲石斛花粉离体萌发影响较大的蔗糖、 H_3BO_3 和 $CaCl_2$ 的 4 个质量浓度水平,采用 $L_{25}(5^3)$ 正交试验设计,寻找 3 因子的最佳配比(表 2)。对该正交试验反正弦函数转换后的数据做方差分析,其中,主体间效应检验结果表明,蔗糖、 H_3BO_3 和 $CaCl_2$ 这 3 个因素对花粉萌发都有极显著影响;正交方差分析的多重比较结果显示,蔗糖 30 g/L、 H_3BO_3 60 mg/L、 $CaCl_2$ 30 mg/L 时的花粉萌发率与其他组合存在显著差异,此组合在正交试验中编号为 25,萌发率为 22.52%。进一步分析,花粉萌发率平方和最高值的组合为 10 g/L 蔗

表 2 澳洲石斛花粉离体萌发正交试验

编号	蔗糖 (g/L)	H ₃ BO ₃ (mg/L)	CaCl ₂ (mg/L)	萌发率 (%)
1	0	0	0	3.39
2	0	20	20	4.68
3	0	30	30	3.32
4	0	40	40	6.96
5	0	60	50	18.87
6	1	0	30	10.28
7	1	20	40	5.64
8	1	30	50	2.02
9	1	40	0	27.46
10	1	60	20	11.67
11	10	0	50	5.48
12	10	20	0	17.14
13	10	30	20	17.13
14	10	40	30	37.02
15	10	60	40	19.53
16	20	0	20	12.97
17	20	20	30	30.09
18	20	30	40	6.38
19	20	40	50	8.11
20	20	60	0	28.96
21	30	0	40	13.72
22	30	20	50	6.53
23	30	30	0	13.45
24	30	40	20	10.61
25	30	60	30	22.52
MS	656.189	472.185	532.209	
F	8.462**	6.089**	6.863**	

注：“*”表示在 0.05 水平上差异显著；“**”表示在 0.01 水平上差异极显著。

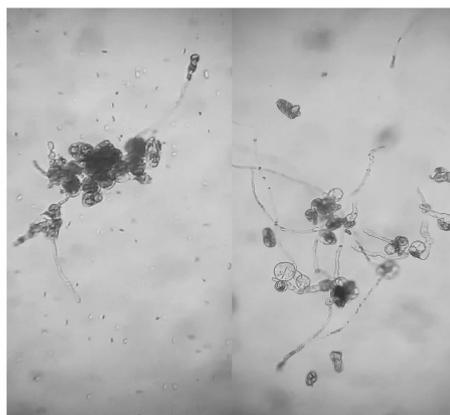
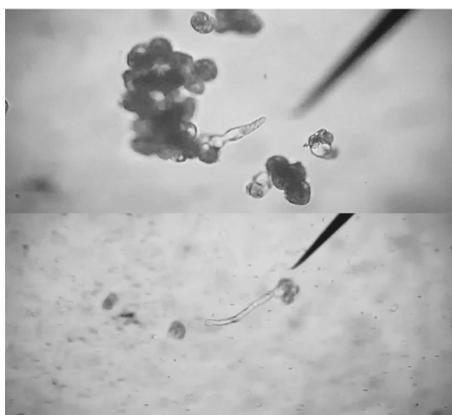


图 2 澳洲石斛花粉离体培养 36 h(左)、48 h(右)的萌发情况(4 倍显微镜下)

用,在质量浓度过高时还会造成原生质脱水,反而抑制了萌发^[11-13]。在本试验中,蔗糖不是澳洲石斛花粉离体萌发所必需的成分,这一结果与杂种卡特兰 (*Cattleya hybrida*)^[14]、聚石斛 (*Dendrobium lindleyi*)^[15] 相同,用蒸馏水培养就可使其萌发,但萌

糖 + 40 mg/L H₃BO₃ + 30 mg/L CaCl₂,此组合在正交试验中编号为 14,萌发率最高,为 37.02%,且与其他组合存在显著差异 ($P < 0.05$),优于编号 25 的组合。综合单因素试验及正交试验结果的方差分析和比较,得出澳洲石斛的最适培养基组合为 10 g/L 蔗糖 + 40 mg/L H₃BO₃ + 30 mg/L CaCl₂。

正交试验培养 36 h 后取部分样进行花粉萌发情况预测,培养 48 h 后,在 4 倍显微镜下其萌发情况见图 2。

3 讨论与结论

由于兰科植物的花粉是 4 个花粉块黏结组成的花粉团,花粉团外面包裹着类脂膜,这使得花粉萌发的速度降低,往往在研磨浸泡时也不能完全排除黏连物质对花粉萌发的影响^[10]。因此本研究采用液体培养法,来提高试验效率和花粉萌发率。其次,多数研究都发现蔗糖、H₃BO₃ 和 CaCl₂ 对兰科植物花粉的萌发起关键作用,因此本试验将蔗糖、H₃BO₃ 和 CaCl₂ 作为花粉离体萌发主要的培养基成分。

蔗糖在花粉萌发过程中,不仅作为重要的能源物质为花粉萌发提供营养,并且作为渗透物质为花粉萌发和生长起到调节渗透压的作用,恰到好处的蔗糖质量浓度可以维持好花粉和培养基间的渗透压,在一定程度上缓解花粉破裂,但若质量浓度过高或者过低,对花粉的萌发生长不仅没有促进作

发率较低,本试验结果为 3.39%。其原因可能是花粉自身含有的营养物质能够满足花粉萌发的需求^[16]。本研究结果表明,蔗糖质量浓度以 10 g/L 为澳洲石斛花粉离体萌发的最适质量浓度,此结果低于杂种卡特兰^[14]、聚石斛^[15]、白芨^[17]、无距虾脊

兰(*Calanthe tsoongiana*)^[6]、大花蕙兰^[18]的最适萌发蔗糖质量浓度。

单因素试验中, H₃BO₃ 质量浓度为 20、30、40 mg/L 下培养的花粉萌发率与其他组存在明显差异, 分别为 11.06%、13.31%、12.17%, 且三者间无明显差异; 正交试验的方差分析显示 H₃BO₃ 与其他 2 个组分对澳洲石斛花粉萌发的影响都是极显著的 ($P < 0.01$), 且在质量浓度为 40 mg/L 时的组合花粉萌发率最高。综合单因素和正交试验结果, 澳洲石斛花粉萌发的 H₃BO₃ 最适质量浓度为 40 mg/L。虽然 H₃BO₃ 在植物组织中含量很低^[19], 但是 H₃BO₃ 能与蔗糖形成络合物, 促进了糖的吸收、转运与代谢, 提高花粉的萌发率。此外, H₃BO₃ 还参与果胶的合成, 促进花粉管壁的形成^[20], 大大增加了花粉管生长的长度。

相关研究表明, 花粉的离体萌发还需要从培养基中吸收大量钙离子, 降低培养基中的钙离子质量浓度会明显抑制花粉萌发, 并且外源钙可以替代花粉萌发时的群体效应^[21], 因此, 适宜的钙离子质量浓度是花粉体外萌发所必需的^[22]。本研究结果表明, CaCl₂ 在单因素试验中作用不是很明显, 在最适质量浓度 30 mg/L 时花粉萌发率为 5.13%; 但与蔗糖和 H₃BO₃ 组合时, 能起到交互作用, 促进花粉萌发, 在 30 mg/L 时萌发率最高。究其原因, 花粉萌发时不需要外源 Ca²⁺ 并不表明就不需要 Ca²⁺ 的参与, 很有可能是不同品种花粉自身释放的 Ca²⁺ 含量不一样, 花粉大多储存在花粉壁中, 当在液体培养液中培养时, 花粉水合释放自身 Ca²⁺, 有的品种花粉自身所含 Ca²⁺ 就足以满足生长发育所需, 故而对外源 Ca²⁺ 表现为非必需^[23]。因此, 澳洲石斛正交试验时, 30 mg/L CaCl₂ 与蔗糖和 H₃BO₃ 组合起促进作用的确切机制还有待进一步探讨。

本研究综合单因素试验及正交试验结果的方差分析和比较, 得出澳洲石斛的最适培养基组合为 10 g/L 蔗糖 + 40 mg/L H₃BO₃ + 30 mg/L CaCl₂。影响植物花粉萌发的因素有很多, 不同的植物种类花粉萌发所需要的蔗糖、H₃BO₃、CaCl₂ 的最适质量浓度都不完全一致^[24], 且不同的培养条件下, 花粉的萌发情况也各不相同, 本试验仅对同一培养条件下的不同培养液组分进行了研究, 关于澳洲石斛的最适培养条件还待进一步探讨, 本试验结果仅供后续的深入研究作参考。

参考文献:

- [1] 刘明华, 朱瑾. 石斛兰[J]. 中国花卉盆景, 2005(2): 17.
- [2] 吴应祥. 中国兰花[M]. 2版. 北京: 中国林业出版社, 1993: 106-107.
- [3] 邓茜改. 石斛兰杂交亲和性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013: 1-2.
- [4] 李枝林, 王玉英, 王卜琼, 等. 兰花远缘杂交育种技术研究[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(4): 52-56.
- [5] 王晓乐, 杨艳萍, 付双彬, 等. 浙江寒兰花粉萌发及贮藏特性[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(2): 241-243.
- [6] 钱鑫, 刘芬, 牛晓玲, 等. 无距虹脊兰花粉离体萌发及储藏条件的研究[J]. 西北植物学报, 2014, 34(2): 341-348.
- [7] 朱根发, 王碧青, 陈明莉, 等. 大花蕙兰与兰属植物种间杂交研究[J]. 植物学通报, 2005, 22(4): 445-448.
- [8] 朱根发. 红花系大花蕙兰的杂交亲本及育种进展[J]. 中国花卉园艺, 2003(8): 20-22.
- [9] 季彪彪. 田间试验的 SPSS 统计分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 92-93.
- [10] 尚忠林. 细胞外钙调素对花粉细胞内钙离子的影响及其信号传递途径的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001: 88-90.
- [11] 马力耕, 徐小冬, 崔素娟, 等. 细胞外钙调素对花粉萌发和花粉管伸长的影响[J]. 科学通报, 1997, 42(24): 2648-2652.
- [12] 于金平, 王媛媛, 张琪, 等. 百合不同品种间花粉萌发活力检测分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(1): 14-19.
- [13] 李凤荣. 几种杜鹃花粉萌发和花粉贮藏方法研究[C]//张启翔. 中国观赏园艺研究进展 2013. 北京: 中国林业出版社, 2017: 147-150.
- [14] 郑宝强, 王雁, 彭镇华, 等. 卡特兰花粉萌发和花粉贮藏性研究[C]//中国园艺学会观赏园艺专业委员会 2011 年学术年会论文集. 北京: 中国林业出版社, 2011: 188-192.
- [15] 邓茜改, 郑宝强, 郭欣, 等. 聚石斛花粉生活力及贮藏的研究[J]. 林业科学研究, 2014, 27(5): 657-661.
- [16] 刘自刚, 呼天明, 杨亚丽. 黄芩花粉离体萌发与花粉管生长研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2636-2640.
- [17] 黄春球, 宋天顺, 李明静, 等. 白芨花粉活力测定与花粉保存[J]. 北方园艺, 2011(3): 182-184.
- [18] 王利民, 王四清, 王彩霞, 等. 大花蕙兰花粉离体萌发试验初报[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 122-124, 161.
- [19] 年玉欣, 罗凤霞, 张颖, 等. 测定百合花粉生命力的液体培养基研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 922-925.
- [20] 志佐诚, 加藤幸雄. 植物生殖生理学[M]. 东京: 诚文堂新光社, 1962: 176-180.
- [21] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1982: 103-136.
- [22] Brewbaker J L, Kwack B H. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth[J]. American Journal of Botany, 1963, 50(9): 859-865.
- [23] 贾文庆, 刘宇, 陈韵, 等. Ca²⁺ 与蕙兰花粉萌发和花粉管生长的关系[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(4): 98-99, 105.
- [24] 芦娟, 苏瑾, 姜成英, 等. 不同浓度的糖、硼、钙对油橄榄花粉萌发的影响[J]. 经济林研究, 2017, 35(1): 103-107.