

正交法优化普通油茶花粉萌发的培养成分

黄国文, 管天球, 赵雨云, 陈莫林, 刘宏辉 (湖南科技学院生化系, 湖南永州 425199)

摘要 [目的]研究普通油茶离体花粉的培养条件。[方法]以蔗糖、维生素 C、 H_3BO_3 、 $MgSO_4$ 、培养液 pH 为影响油茶花粉萌发的因素, 进行单因素试验和正交试验, 研究这些成分对油茶花粉萌发的影响。[结果]油茶花粉萌发的最佳培养液成分为蔗糖 150 g/L, 维生素 C 0.02 g/L, H_3BO_3 0.15 g/L, $MgSO_4$ 0.07 g/L, 培养基 pH 6; 影响油茶花粉萌发主要的因素是蔗糖, 其次是 H_3BO_3 。[结论]该研究结果为油茶茶的有性杂交打下了基础。

关键词 油茶; 花粉萌发; 培养液成分; 正交法

中图分类号 S794.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)19-150-02

The Optimization of Medium Compositions of the Pollen Germination of *Camellia oleifera* by Orthogonal Method

HUANG Guo-wen, GUAN Tian-qiu, ZHAO Yu-yun et al (Department of Biological Sciences and Chemical Engineerings, Hunan College of Science and Technology, Yongzhou, Hunan 425199)

Abstract [Objective] This paper researched the cultivation conditions of vitro pollen of *Camellia oleifera*. [Method] The single factor experiments and the orthogonal experiments on the liquid medium pH and elements (sucrose, vitamine C, boric acid and magnesium sulfate) were carried out. The effects of these nutrient elements on the pollen germination rate of *Camellia oleifera* were studied. The results showed that the optimal medium elements of pollen germination from *Camellia oleifera* were as follow: sucrose 150 g/L, vitamine C 0.02 g/L, boric acid 0.15 g/L, magnesium sulfate 0.07 g/L and pH 6. The main effect factor of pollen germinations was sugar, and follow by boric acid. [Conclusion] The results of this study will lay a foundation for sexual hybridization of *Camellia oleifera*.

Key words *Camellia oleifera*; Pollen germination; Nutrient element; Orthogonal method

普通油茶(*Camellia oleifera* Abel)也称中果油茶, 属山茶科山茶属常绿小乔木或灌木, 是我国南方特有的木本食用油料树种^[1], 具有较高的经济价值。茶油营养丰富, 不饱和脂肪酸含量高, 并含有丰富的蛋白质, 维生素 A、B、D、E 和抗氧化物等成分, 是优质保健油; 其茶籽粕和果壳可制茶皂素、活性炭、橡胶等多种产品, 是重要的工业原料。油茶的花苞在每年 4~5 月份开始形成, 10~11 月份开花, 花两性, 异花授粉, 自花授粉和风媒传粉率低, 主要由昆虫传粉, 上年的果实也在此时成熟。长期以来, 油茶落花落果严重, 坐果率低, 导致大面积油茶产量低^[2]。花粉生活力高低影响授粉受精。离体花粉在碳源、 H_3BO_3 及矿质元素等成分的参与下才能萌发、花粉管才能正常生长^[3]。该文以普通油茶花粉为材料, 研究培养基成分和培养液 pH 对油茶离体花粉萌发的影响, 为理解油茶花粉离体萌发特性和受精过程、调控油茶花粉萌发和人工辅助授粉提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料 在位于湖南科技学院周围的西山上, 于 2014 年 12 月中旬切取生长健壮的有含苞待放花蕾的普通油茶花枝, 带回实验室水培, 收集快散落的花粉用于试验。

1.2 研究方法

1.2.1 花粉液体培养法。采用液体培养基培养油茶花粉。在凹槽载玻片上滴加 50 μ L 特定液体培养基, 用大头针蘸取适量花粉使其均匀地撒在培养基上。将载玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿内, 放在黑暗、25 $^{\circ}C$ 恒温箱中保湿培养 4 h。用光学显微镜观察每个玻片, 随机选取 5 个不重复的视野, 计数每个视野花粉数目不少于 50 个, 以花粉管长度等于或

大于花粉粒直径视为萌发, 统计萌发率。各试验均重复 3 次。萌发率 = 已萌发芽粉数/花粉总数 $\times 100\% \pm SD$ 。

1.2.2 单因素试验。以 30 mmol/L MES (pH 7) 溶液配成含有蔗糖浓度 100 g/L、维生素 C 浓度为 0.01 g/L、 H_3BO_3 浓度 0.10 g/L、 $MgSO_4$ 浓度 0.03 g/L 的花粉粒萌发基本培养基, 以基本培养基中缺少相应成分的培养基为对照。变动其中的因素, 蔗糖浓度为 50、100、150、200、250 g/L, 维生素 C 浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/L, H_3BO_3 浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.30 g/L, $MgSO_4$ 浓度为 0.01、0.03、0.05、0.07、0.09 g/L, 培养基 pH 为 4、5、6、7、8、9。研究各种成分对普通油茶花粉萌发的影响, 确定适于花粉萌发的各种组分浓度。

1.2.3 正交试验。在单因素试验的基础上, 选取对普通油茶花粉萌发影响较大的水平, 以正交表 $L_{18}(3^5)$ 安排试验, 确定花粉萌发培养基中各种组分的最佳浓度组合。

2 结果与分析

2.1 蔗糖浓度对油茶花粉萌发的影响 蔗糖浓度是影响油茶花粉萌发的重要因素(图 1a)。蔗糖浓度为 150 g/L 时萌发率最大, 浓度过低或者过高萌发率降低。原因可能是蔗糖浓度调节花粉粒的渗透压, 浓度过高或过低影响花粉水分代谢, 不利于花粉萌发的物质代谢活动, 因此选择 100、150、200 g/L 3 个水平作为蔗糖浓度的优化条件。

2.2 维生素 C 浓度对油茶花粉萌发的影响 维生素 C 影响油茶花粉的萌发(图 1b)。维生素 C 浓度为 0.02 g/L 时萌发率最大, 浓度过低或者过高萌发率降低。说明还原剂维生素 C 能够影响油茶花粉的萌发, 因此选择 0.01、0.02、0.03 g/L 3 个水平作为维生素 C 浓度的优化条件。

2.3 H_3BO_3 浓度对油茶花粉萌发的影响 H_3BO_3 影响油茶花粉的萌发(图 1c)。 H_3BO_3 浓度为 0.15 g/L 时萌发率最大, 浓度过低或者过高萌发率降低, 因此选择 0.10、0.15、

基金项目 湖南省科技计划重点项目(2014NK2021)。

作者简介 黄国文(1965-), 男, 湖南郴州人, 讲师, 博士, 从事植物生物学研究。

收稿日期 2015-05-11

0.20 g/L 3 个水平作为 H_3BO_4 浓度的优化条件。

2.4 MgSO_4 浓度对油茶花粉萌发的影响 镁离子影响花粉的萌发(图 1d)。 MgSO_4 溶液浓度为 0.05 g/L 时萌发率最大,浓度过低或者过高萌发率降低;浓度为 0.09 g/L 时抑制了花粉萌发,因此选择 0.03、0.05、0.07 g/L 3 个水平作为 MgSO_4 浓度的优化条件。

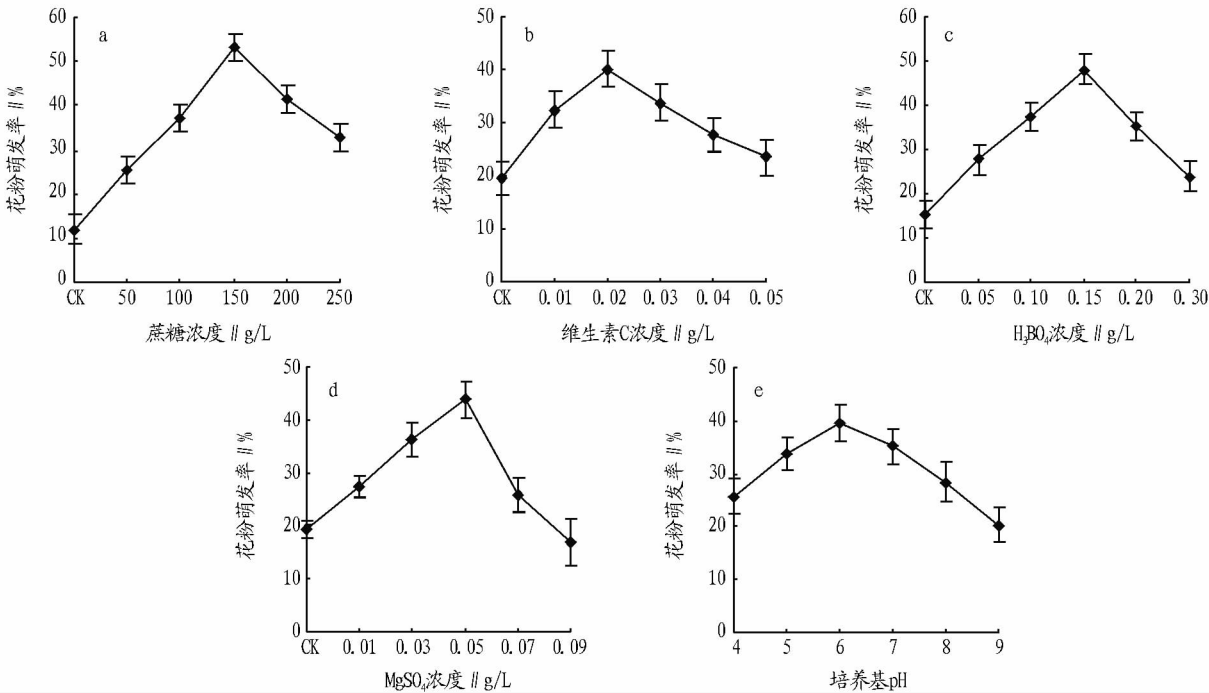


图 1 培养条件对普通油茶花粉萌发率的影响

2.6 正交试验结果 根据蔗糖浓度、维生素 C 浓度、 H_3BO_4 浓度、 MgSO_4 浓度、培养液 pH 这 5 个单因素试验结果,进行正交试验 $\text{L}_{18}(3^5)$,以普通油茶花粉萌发率为指标,结果见表 1。由极差分析可知,这 5 个因素对普通油茶花粉萌发的影响程度依次是蔗糖浓度、 H_3BO_4 浓度、 MgSO_4 浓度、维生素 C 浓度、培养液 pH;最优水平组合为蔗糖 150 g/L,维生素 C 浓度 0.02 g/L, H_3BO_4 浓度 0.15 g/L, MgSO_4 浓度 0.07 g/L,培养液 pH6。

3 结论与讨论

植物花粉萌发是一个复杂的生理过程和形态建成过程,涉及花粉管的极性生长和管壁的构建等过程^[4],有多种成分参与花粉萌发和花粉管生长过程。蔗糖在花粉萌发中主要起到提供能源和碳源以及调节渗透压的作用^[5]。蔗糖浓度过高,导致花粉细胞脱水死亡。硼离子除了能够调节花粉粒的渗透压以外,还能与蔗糖形成络合物,还利于花粉管壁的建立^[6];此外,硼能够影响果胶甲酯酶活性,缺硼导致酸性果胶质在顶端大量富集,造成花粉管破裂^[7]。钙离子能够结合果胶质聚集在花粉管壁中,能够增强管壁强度,促进花粉管伸长。在没有钙离子的情况下需要镁离子来促进花粉管伸长^[8]。维生素 C 是一种还原剂,能促进分生组织和中柱鞘细胞从 G1 期到 S 期的分裂,并使不活动中心细胞数量明显减少^[9]。该文研究了培养基的一些成分和 pH 对油茶花粉萌

2.5 培养基 pH 对油茶花粉萌发的影响 培养基 pH 影响油茶花粉的萌发(图 1e)。培养基 pH6 时萌发率最大,培养基 pH 过低或者过高萌发率降低。原因可能是适宜的 pH 是花粉粒正常生命活动的前提,pH 影响了花粉萌发的物质代谢和能量代谢活动,因此选择 pH5、6、7 共 3 个水平作为 pH 优化条件。

表 1 普通油茶花粉萌发的正交试验结果

试验号	蔗糖浓度 g/L	维生素 C g/L	H_3BO_4 浓 度 // g/L	MgSO_4 浓度 g/L	pH	萌发率 %
1	100	0.01	0.10	0.03	5	37.3
2	100	0.02	0.15	0.05	6	55.1
3	100	0.03	0.20	0.07	7	49.6
4	150	0.01	0.10	0.05	6	61.5
5	150	0.02	0.15	0.07	7	80.1
6	150	0.03	0.20	0.03	5	75.3
7	200	0.01	0.15	0.03	7	63.2
8	200	0.02	0.20	0.05	5	60.2
9	200	0.03	0.10	0.07	6	65.3
10	100	0.01	0.20	0.07	6	61.7
11	100	0.02	0.10	0.03	7	58.2
12	100	0.03	0.15	0.05	5	64.9
13	150	0.01	0.15	0.07	5	82.7
14	150	0.02	0.20	0.03	6	76.1
15	150	0.03	0.10	0.05	7	70.8
16	200	0.01	0.20	0.05	7	63.4
17	200	0.02	0.10	0.07	5	64.1
18	200	0.03	0.15	0.03	6	67.4
K1	54.47	61.63	59.53	62.92	64.08	
K2	74.42	65.63	68.90	62.65	64.52	
K3	63.93	65.55	64.38	67.25	64.22	
R	19.95	4.00	9.37	4.60	0.44	

部分穿透进大棚内,为绿色植物光合作用提供能量,而薄膜光伏玻璃还将光能转化为电能,实现了低成本光能发电,已经在山东寿光 17 kW 薄膜太阳能温室大棚中得到成功的应用。该项目年发电 2.6 万 kW·h,全部送入寿光当地电网,造福周边群众,而且成本比多晶硅太阳能电池低 40% 以上。该公司研发人员考虑到不同蔬菜种类、生长发育阶段所需的光强不同,设计了 60%、40%、20%、10% 不同的透光率方案,包括电气设计、光伏系统设计、逆变器的配置方案等^[6]。根据不完全统计,全国已有近 30 个薄膜太阳能电池农业大棚发电站的“示范点”,如江西、湖北、河北、江苏、宁夏、广西、山东、青海等地都已经开始积极的探索光伏温室大棚,有些地区已经取得了成效,部分实现并网发电。这种薄膜太阳能大棚的开发应用,对于农业结构的调整、升级和“三农”问题的解决有重要作用和推广意义。

太阳能光伏与物联网技术应用于农场更是现代农业的前沿水平。2012 年福建泉州百来太阳能有限公司探索与众不同的农业太阳能应用研究。该公司计划建成一个示范农场,把太阳能、物联网技术应用于农场中,边研发边实践,让农户们亲眼见证高科技农业产生的奇迹。利用太阳能玻璃电池板搭建成的温室大棚,不仅可以发电,还冬暖夏凉;埋在土壤中的传感器会自动感知土壤温湿度和土壤的肥力,在太阳能电力的趋动下自动为棚内的植物浇水施肥等,这是未来太阳能农场的生产场景,也是泉州百来太阳能有限公司目前攻关的重点。

4 发展光伏农业存在的问题及对策

光伏农业具有相当的经济、生态、社会效益,因而具有广泛的应用前景,但发展时间还不长,技术还不成熟,推广普及还有困难。太阳能光伏农业应用需要多学科融合,农业种植、机械制造、太阳能技术、传感技术等多方面都有涉及,目前靠单一学科领域各自为政,重复研究现象严重,影响光伏技术在农业产业的发展与应用。作为新能源与农业结合的新兴产业,光伏农业还需要国家的大力扶持,包括政策、资金

等。此外,太阳能农业应用所属范围不够清晰,目前国家并没有相关针对性的补贴标准。通常使用的电源是交流电,而太阳能光伏发电则是直流电,目前市场上出售的农机设备大多是使用交流电,因此,需要对现有农机进行改造,使其与太阳能发电完美融合,目前这还是个难题。建造成本高,投资回收期较长,不适合小规模的经营。由于透光问题,对种植的植物要求较高,在喜光植物上的应用还有待深入探讨。

目前,光伏农业的建设还处在美好的规划及小范围的试点阶段,摆在政府、科研人员面前的还有不少问题需要解决。光伏农业是庞大的产业链,产学研各个部门应通力合作,联合攻关。太阳能光伏产品外销受挫情况下,更应该积极推广光伏产品在工农业个领域的应用,推动产业升级,开拓国内市场,使光伏产品这一高新技术推动我国环境质量提升,使地方老百姓受益。就光伏农业来说,国家应该宣传光伏农业是农业现代化的重要组成部分,是实现美丽中国、美丽乡村的标志,应该组织多学科专家解决太阳能光伏与传统农业设施、器械对接等技术问题,提高电池产品性能,降低成本,研究作物对光伏设施的适应性问题。此外政府应该站在节省能源,保护环境高度,鼓励光伏企业研发、生产光伏农业设施产品,加大财政补贴力度。我国作为农业大国,光伏农业与当前经济转型的目标以及生态文明建设相契合,已成为现代农业发展的一种全新模式。光伏农业将是解决我国现代农业发展长期困境的发动机,是进一步发展农村经济、改善农民生活的必然选择,也是农业生产方式变革时势所趋。

参考文献

- [1] 刘文科. 迅速发展的光伏农业[J]. 中国农村科技, 2014(8): 54-55.
- [2] 夕月. 光伏太阳能 农业发展的强心剂[J]. 绿色中国, 2014(10): 67-69.
- [3] 中国储能网新闻中心. 以色列: 最具潜力的新兴光伏市场[EB/OL]. (2014-07-18) <http://www.es.cn.com.cn/news/show-154805.html>.
- [4] 人民网, 日本建起太阳能农业园[N]. 四川农村日报, 2013-03-20.
- [5] 我国首个太阳能大棚发电系统正式运行[EB/OL]. (2009-10-27) <http://news.sina.com.cn/c/p/2009-10-27/092918917137.shtml>.
- [6] 我国首个薄膜太阳能大棚发电系统投入使用[J]. 农业工程技术: 温室园艺, 2010(10): 76.
- [7] 刘雪莲, 陈莹. 培养基组分对花粉离体萌发的影响研究进展[J]. 通化师范学院学报, 2009, 30(12): 43-46.
- [8] 王晓华, 郝怀庆, 王钦丽, 等. 花粉管细胞结构与生长机制研究进展[J]. 植物学通报, 2007, 24(3): 340-354.
- [9] 胡适宜, 杨弘远. 被子植物受精生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 116-128.
- [10] 杜玉虎, 张绍铃, 姜雪婷, 等. 果梅花粉离体萌发及花粉管生长特性研究[J]. 西北植物学报, 2006(9): 1846-1852.
- [11] 曾丽霞, 应艾伟. 硼对花粉生物化学功能影响的研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2008(3): 9-11.
- [12] KWACK B H. Effects of calcium ion and the protective action on survival and growth[J]. Plant Physiology, 1967, 20: 852-833.
- [13] 安华明, 陈力耕, 樊卫国, 等. 高等植物中维生素 C 的功能、合成及代谢研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 608-617.

(上接第 151 页)

发的影响,表明在该试验中影响花粉萌发最大的因素是蔗糖浓度,其次是 H_3BO_4 浓度,说明蔗糖和 H_3BO_4 是花粉萌发培养基的最基本成分。培养基的最优水平组合为蔗糖浓度 150 g/L, 维生素 C 浓度 0.02 g/L, H_3BO_4 浓度 0.15 g/L, $MgSO_4$ 浓度 0.07 g/L, 培养液 pH 6。

参考文献

- [1] 张宏达, 任善湘. 中国植物志(第四十九卷第三分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 13-14.
- [2] 闻丽, 张日清, 李建安, 等. 油茶种质改良现状及其花药培养技术的应用前景[J]. 经济林研究, 2004, 22(4): 87-90.