

柚木花粉离体萌发试验

黄桂华, 梁坤南*, 周再知, 林明平, 马华明

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

关键词: 柚木; 花粉离体萌发; 花粉萌发率; 花粉管长度

中图分类号: S792.99

文献标识码: A

In Vitro Pollen Germination of Teak (*Tectona grandis*)

HUANG Gui-hua, LIANG Kun-nan, ZHOU Zai-zhi, LIN Ming-ping, MA Hua-ming

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: Different concentrations of sucrose and boracic acid were designed for *In vitro* germination of teak pollen at room temperature, and the effects were studied, and the germination process was also analyzed. The results showed that boracic acid could facilitate the germination of teak pollen significantly, and a satisfactory medium for pollen germination of teak was achieved in a liquid medium supplemented 200 g · L⁻¹ of sucrose and 200 mg · L⁻¹ of boracic acid. The pollen germinated after incubating for 1.5 hours, and the pollen germination rate and pollen tube length became stabilized after 5 hours and 10 hours, respectively.

Key words: *Tectona grandis*; teak; *In vitro* pollen germination; pollen germination rate; pollen tube length

柚木 (*Tectona grandis* L. f.) 是世界名贵的用材树种, 天然分布于印度、缅甸、泰国和老挝^[1], 具有生长快、用途广、纹理美观和价格昂贵的特点, 已在热带、南亚热带地区广为引种, 是世界上人工林种植面积最大的 4 个树种之一, 也是单位面积产值最高的一个造林树种^[2-3]。我国引种柚木已有 170 多年的历史, 20 世纪 70 年代初开始了柚木遗传育种和栽培技术的系统研究, 取得了可喜的成就^[4-7]。目前, 推广种植范围遍及 10 个省(自治区) 60 多个县(市), 总面积约 1.5 万 hm²^[8]。柚木新品种是柚木推广的物质基础, 开展柚木人工杂交授粉是培育柚木新品种的重要途径, 而花粉收集和花粉活力检测是开展人工杂交育种的前提工作。花粉活力检测的方法有多种, 有染色法、离体萌发测定法、田间授粉测定法等^[9]。离体萌发测定法是一种检测花粉活力的简单实用、高效可靠的方法, 其所用培养基主要成

分是蔗糖和硼酸, 已在许多树种中得到广泛应用^[10-11]。Suwan 等^[12-13] 及 Palupi 等^[14] 在柚木自由授粉及其花粉管生长方面已有研究报道; Chuka^[15] 在 1978 年摸索了柚木花粉离体萌发条件, 得出培养基为 14% 的蔗糖溶液, 不添加任何其它物质, 而作者根据该方法进行柚木花粉离体萌发试验时, 得不到理想的萌发效果, 发现萌发率极低, 大量花粉稍微长出花粉管, 但不继续生长伸长, 最终花粉破裂, Suwan^[13] 对此亦持相同看法。本文旨在研究柚木花粉离体萌发的适宜培养基, 进行柚木新鲜花粉的活力检测和萌发特征分析, 为开展柚木人工杂交育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

在海南尖峰岭柚木保存圃的种子园内选定 4 个

收稿日期: 2009-11-17

基金项目: 国家科技支撑计划“优质珍贵用材树种柚木、黄檀、福建柏新品种选育”(2006BAD01A1604)

作者简介: 黄桂华(1979—), 男, 江西宜春人, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向: 林木遗传育种, E-mail: huanggh@ritf.ac.cn.

* 通讯作者: 梁坤南, 男, 首席专家, 研究员. E-mail: chinateak@163.net.

单株,于柚木花期分别采回花枝水培;待花开放后,将80目的筛子放于硫酸纸上,剪下花朵放于筛子上,拨动花朵,抖动筛子,花粉自然落于硫酸纸上,分别收集新鲜花粉用于实验。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 用1个母株的花粉,设置5个蔗糖浓度(50、100、150、200、250 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)进行萌发对比试验,重复3次,观察花粉的萌发效果,摸索适合柚木花粉离体萌发的基本培养基。用筛选出的基本培养基,设置4个硼酸浓度(50、100、200、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),重复3次,观察硼酸对花粉萌发的促进作用,筛选出合适的硼酸浓度,以期找到柚木花粉离体萌发的适宜培养基。用摸索出的适宜培养基,进行4个母株花粉的萌发试验,观察柚木花粉离体萌发特征。

1.2.2 培养方法 于2009年7—10月,在海南尖峰岭中国林科院热带林业研究所实验站进行试验,柚木花粉萌发采用液滴悬浮离体培养萌发法。用本实验室蒸馏水($\text{pH} = 5.73$)配好培养溶液后,用移液管滴于载玻片上,用细针蘸少许柚木花粉置于液滴中,室温条件下(29 ~ 33 $^{\circ}\text{C}$)将载玻片置于铺有湿润滤纸的培养皿中,盖上盖子保湿培养。

1.2.3 观测方法 用显微镜观察柚木花粉萌发情况,每培养1 h观测1次,每个玻片随机抽取3个视

野进行统计,以花粉管长度大于或等于柚木花粉粒直径视为萌发。每个视野随机抽取10粒萌发花粉,用显微镜测微尺测量花粉管长度,直到萌发花粉数和花粉管长度基本稳定。

1.2.4 数据分析 计算每个视野的柚木花粉萌发率和平均花粉管长度,进而计算每个重复的平均花粉萌发率和平均花粉管长度。百分数进行反正弦转换后,用SAS软件对数据进行方差分析和Duncan多重比较,用Excel对花粉萌发率和花粉管长度随时间变化的特征进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖浓度下柚木花粉离体萌发的差异

方差分析表明:不同蔗糖浓度处理间柚木花粉离体萌发率和花粉管长度都呈极显著差异($P < 0.01$)。邓肯多重比较(表1)表明:蔗糖浓度较小时,随着蔗糖浓度的增加,萌发率和花粉管长度均呈递增趋势;当蔗糖浓度为200 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,花粉萌发率和花粉管长度均达最大值,分别为21.86%、347.33 μm ;当蔗糖浓度增至250 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,萌发率和花粉管长度开始下降。可见,蔗糖浓度过高对柚木花粉的离体萌发具有抑制作用。因此,适合柚木花粉离体萌发的基本培养基为蒸馏水配制蔗糖浓度200 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表1 蔗糖浓度对柚木花粉离体萌发的影响

处理号	蔗糖浓度/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	萌发率/%	标准差/%	变异系数	花粉管长度/ μm	标准差/ μm	变异系数
1	50	1.49 e	0.57	0.38	41.27 c	15.87	0.38
2	100	4.50 d	1.05	0.23	87.21 c	20.94	0.24
3	150	9.14 c	2.14	0.23	94.26 c	22.06	0.23
4	200	21.86 a	5.38	0.25	347.33 a	87.65	0.25
5	250	15.27 b	4.16	0.27	250.89 b	66.19	0.26

注:表中同列不同小写字母表示0.05水平差异显著。

试验中还发现:各蔗糖浓度处理均有大量花粉稍微长出花粉管,但其长度不及花粉粒的直径。培养5 h后,花粉开始破裂。

2.2 不同硼酸浓度对柚木花粉离体萌发的促进作用

方差分析表明:不同硼酸浓度对柚木花粉萌发率和花粉管长度的影响各处理间呈极显著差异($P < 0.01$)。邓肯多重比较(表2)表明:在200 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖浓度的基本培养基里添加不同浓度的硼酸,对柚木花粉萌发的促进作用都非常显著,极大地提高了花粉的萌发率和花粉管长度;花粉萌发率和花粉管长度在不同硼酸浓度下呈现相同的变化规律,即

随着硼酸浓度的增加,萌发率和花粉管长度都是先上升后下降。在硼酸浓度为200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,花粉萌发率和花粉管长度同时达最大值,分别为96.48%、1 185.73 μm 。

试验还发现:在硼酸浓度为200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,花粉管生长速率快,且较为透明、通直,形状也较一致;在硼酸浓度为50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对柚木花粉萌发率和花粉管伸长生长的促进作用有限,部分花粉管生长到一定长度时,停止生长;在硼酸浓度为100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,部分花粉管生长弯曲不通直,甚至交叉,花粉管顶端膨大,停止生长;在硼酸浓度为400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

时,花粉管不正常生长的现象更为严重,有的花粉管生长弯曲不通直甚至交叉,有的粗细不均匀,有的顶端膨大,有的花粉管颜色较深不透明,生长到一定长

度时,停止生长。因此,柚木花粉离体萌发的适宜培养基为蒸馏水配制蔗糖浓度 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硼酸 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表2 硼酸浓度对柚木花粉离体萌发的影响

处理号	硼酸浓度/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	萌发率/%	标准差/%	变异系数	花粉管长度/ μm	标准差/ μm	变异系数
1	50	76.92 b	19.42	0.25	288.50 c	69.42	0.24
2	100	82.26 b	20.58	0.25	542.20 b	137.09	0.25
3	200	96.48 a	24.18	0.25	1 185.73 a	278.74	0.23
4	400	81.95 b	20.87	0.25	355.69 c	84.84	0.23

注:表中同列不同小写字母表示0.05水平差异显著。

2.3 柚木花粉离体萌发特征

用适宜培养基进行4个母株花粉的离体萌发,萌发过程见图1。从图1可看出:各母株花粉萌发均出现相似的萌发过程,即培养1 h后,未见花粉管伸出;在培养1.5~2 h时出现花粉管,开始萌发;培养2~3 h为花粉萌发的高峰时段,萌发率快速上升;在培养5 h时花粉萌发率达峰值,之后趋于稳定。

母株1萌发率最高,达94%,母株4萌发率最低,为79%。

从图1还看出:花粉管在培养1.5~2 h时生长缓慢,在培养2~10 h时花粉管快速生长,培养10 h后花粉管生长变缓,并逐渐趋于稳定。母株1花粉管长度最长,达到1 247 μm ,母株4花粉管长度最短,为986 μm 。

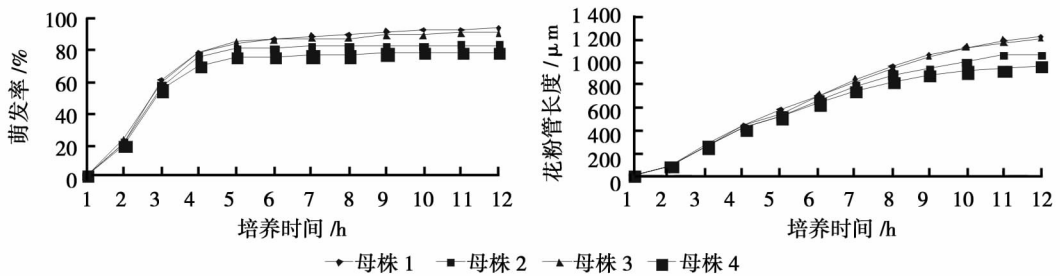


图1 柚木花粉萌发率和花粉管长度随培养时间的变化过程

3 讨论

花粉离体萌发培养基中蔗糖的作用是提供合适的渗透压和花粉管形成所需的能量,硼的主要作用是参与花粉管顶端细胞壁的形成,促进花粉萌发和花粉管生长。不同植物种类所需的蔗糖和硼酸浓度不同,同时萌发特征也会有所差别,如西南桦^[10]花粉离体萌发的合适培养基为 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸,培养3 h后花粉萌发率基本稳定,培养7 h后花粉管长度也趋于稳定;悬铃木^[11]花粉在 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸的培养基上培养24 h后萌发率最高。这些差异可能与不同植物花粉具有不同的生物学特性有关。本研究表明,对柚木花粉离体萌发效果最好的蔗糖浓度为 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,但在只有蔗糖的条件下,萌发率依然不高,添加硼酸后,4个硼酸浓度都较大促进了柚木花粉的萌发,以200

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸浓度效果最佳,萌发率最高,花粉管生长快,最终花粉管也最长。

本试验在室温条件下进行,萌发效果非常好。前期预试验中,当温度控制在 $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,与温度控制在 $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时的试验结果相比,发现在一定范围内,高温可以稍微加快花粉萌发的启动时间,但萌发稳定后,结果无明显差异。预试验还发现,光照和遮光对柚木花粉离体萌发无显著影响。试验证明,在本试验体系下,柚木花粉易离体萌发,实验室蒸馏水 $\text{pH} = 5.73$,效果非常好。

Suwan等^[12]研究发现,柚木自由授粉率高达78%,且花粉在活体上也易萌发,其启动时间和花粉管生长速度都比本试验的萌发速度略快,但基本萌发特征与本试验结果一致。自由授粉后1 h内开始萌发,授粉2、8 h,分别有50%和81%的花粉管伸长达到花柱底部。这说明柚木花粉离体萌发的适宜条

件还可进一步摸索完善,特别是分析温度对柚木花粉离体萌发的影响;同时,需要开展柚木花粉贮藏方法及其活力随贮藏时间变化的研究。

参考文献:

- [1] Kadambi K. Silviculture and management of teak [M]. Bulletin School of Forestry, Stephen F. Austin State University, Nacogdoches, Texas, 1972: 137
- [2] 刘 鹏,杨家驹,卢鸿俊. 东南亚热带木材[M]. 北京:中国林业出版社,1993:280
- [3] 中国树木志编委会. 中国主要树种造林技术(下册)[M]. 北京:中国林业出版社,1981:846-851
- [4] 吴坤明,罗明雄. 柚木种子园工作初报[J]. 热带林业科技,1983(3):40-47
- [5] 邝炳朝,郑淑珍. 我国柚木的遗传改良[J]. 林业科学研究,1991,4(2):139-146
- [6] 梁坤南,白嘉雨,周再知,等. 珍贵树种柚木良种繁育发展概况[J]. 广东林业科技,2006,22(3):85-90
- [7] 马华明,梁坤南,周再知. 我国柚木的研究与发展[J]. 林业科学研究,2003,16(6):768-773
- [8] 周铁烽. 中国热带主要经济树木栽培技术[M]. 北京:中国林业出版社,2001:288-291
- [9] 左丹丹,明 军,刘 春,等. 植物花粉生活力检测技术进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745
- [10] 程 伟,赵志刚,曾 杰,等. 西南桦花粉离体萌发的适宜条件与萌发特征[J]. 林业科学研究,2007,20(2):209-212
- [11] 李志强,刘国锋,罗春丽,等. 悬铃木花粉生活力及贮藏力的研究[J]. 武汉植物学研究,2006,24(1):54-57
- [12] Suwan T, Owens J N. Floral biology, pollination, pistil receptivity, and pollen tube growth of teak (*Tectona grandis* Linn f.) [J]. Annals of botany, 1997, 79: 227-241
- [13] Palupi E R, Owens J N. Pollination, Fertilization, and Embryogenesis of Teak (*Tectona grandis* L. f.) [J]. International Journal of Plant Sciences, 1997, 158 (3): 259-273
- [14] Suwan T, Owens J N. Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (*Tectona grandis* Linn. f.) [J]. Annals of botany, 1997, 80: 401-410
- [15] Chuka E. Pollen and stigma viability in teak (*Tectona grandis* L. f.) [J]. Silvae genetica, 1978, 27(1): 29-32