

光皮桦花粉离体萌发试验

刘宝^{1,2}, 赵志刚¹, 程伟³, 郭俊杰¹, 赖家业², 曾杰^{1*}

(1. 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广州 510520; 2. 广西大学 林学院, 南宁 530001; 3. 山东省淄博市淄川区林业局, 山东 淄博 255100)

摘要: 设置若干温度的培养环境以及各种浓度蔗糖、蔗糖+硼酸、蔗糖+硝酸钙、蔗糖+硼酸+硝酸钙培养基, 研究温度以及蔗糖、硼、钙对光皮桦花粉离体萌发的影响, 探明光皮桦花粉萌发的适宜温度和最佳培养基。结果表明: 合适浓度的蔗糖、硼酸和硝酸钙均能显著促进光皮桦花粉萌发, 而高浓度的蔗糖、硼和钙均抑制其花粉萌发; 光皮桦花粉离体萌发的合适培养基为 10% 蔗糖+200 mg·L⁻¹ 硼酸+200 mg·L⁻¹ 硝酸钙, 适宜培养温度为 30℃; 在此条件下培养 4 h 后花粉萌发率基本稳定, 培养 6 h 后花粉管长度亦趋于稳定。

关键词: 光皮桦; 花粉; 离体萌发; 硼; 钙

中图分类号: S722.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)02-0264-05

Tests on *in vitro* germination of *Betula lumini fera* pollens

LIU Bao^{1,2}, ZHAO Zhi-Gang¹, CHENG Wei³,
GUO Jun-Jie¹, LAI Jia-Ye², ZENG Jie^{1*}

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 2. College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530001, China; 3. Forest Bureau of Zichuan District, Zibo 255100, China)

Abstract: In this paper suitable temperature and optimized medium were determined for *in vitro* germination of *Betula lumini fera* pollens through comparison tests under different temperatures and on serials of culture media containing various concentrations of sucrose, H₃BO₃ and Ca(NO₃)₂. It was indicated that the germination of *B. lumini fera* pollens could be promoted in the sucrose (basic) media supplementing suitable concentration of H₃BO₃ and Ca(NO₃)₂, while excess of sucrose, boron or calcium could inhibit their germination; the suitable temperature was 30℃ and the optimum culture medium was 10% sucrose+200 mg·L⁻¹ H₃BO₃+200 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂ for pollen germination of this species; under these conditions, the pollen germination rate and pollen tube growth became stable after 4 h and 6 h, respectively.

Key words: *Betula lumini fera*; pollen; *in vitro* germination; boron; calcium

光皮桦(*Betula lumini fera*)又名亮叶桦, 为桦木科(Betulaceae)桦木属(*Betula*)落叶乔木, 天然分布于秦岭、淮河流域以南至两广北部及西部, 是我国特有的优良速生用材树种。光皮桦因其分布广、生长快、材质优良、病虫害少、适应性强, 具有极其重要

的生态和经济价值。自 20 世纪 80 年代后期以来, 我国较为系统地开展了光皮桦生物学特性、育苗与造林技术、良种选育以及种群生态学等方面的研究(胡晓媛等, 2006; 王献溥等, 1998), 有力地推动了光皮桦人工林的规模发展。

收稿日期: 2007-09-03 修回日期: 2008-10-28

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD01A1605-03)[Supported by National Science and Technology Supporting Program of State 11th Five-Year Plan Project(2006BAD01A1605-03)]

作者简介: 刘宝(1981-), 男, 山东青岛人, 硕士, 主要从事森林培育和遗传育种研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zengj69@pub. guangzhou. gd. cn)

花粉离体萌发是检测花粉活力简便而可靠的方法之一,在植物人工辅助授粉和杂交育种研究中已广泛应用。而光皮桦花粉离体萌发的研究尚未见报道。赖焕林等(1994)报道马尾松(*Pinus massoniana*)花粉在 5%蔗糖+50 mg/L 或 30 mg/L 硼酸的培养基中萌发和生长效果最好;赵宏波等(2007)认为 ME3+200 g·L⁻¹ PEG4000(pH5.0)是梅花花粉离体萌发的最适培养基,蔗糖浓度低于 50 g·L⁻¹ 促进作用不显著,超过 100 g·L⁻¹ 则显著抑制花粉萌发;而采自 30~40 年生悬铃木(*Platanus acerifolia*)花粉,其离体萌发的最适培养基为 15%蔗糖+0.01%硼酸(李志能等,2006)。笔者在开展光皮桦和西南桦(*B. alnoides*)杂交育种的研究中,已经掌握了西南桦花粉离体萌发的适宜条件(程伟等,2007),亦见关于白桦(*B. platyphylla*)和垂枝桦(*B. pendula*)花粉离体萌发的报道(Pasonen & Kapyla,1998;詹亚光等,1998),但其方法并不适用于光皮桦花粉活力检测,因此本文通过系列光皮桦花粉离体萌发试验,摸清光皮桦花粉离体萌发的合适培养基、培养温度以及花粉萌发特征,探明快速检测花粉活力和质量的方法,为光皮桦的人工辅助授粉和杂交育种乃至新品种培育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2007 年 3 月于广西壮族自治区田林县老山林场天然林内选择 20 余株光皮桦优树,其间距均在 100 m 以上,于雄花即将散粉时采集花枝带回室内,摘取花序置于硫酸纸上铺开,待花粉散落、阴干 24 h 后,用 100 目网筛过筛,医用小瓶抽真空 3 ℃保存。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 考虑到采集花粉的活力可能因单株而异,采用混合花粉,设计 5 个试验探讨光皮桦花粉离体萌发条件。在此基础上选择萌发率较高的 3 个单株的花粉开展萌发试验(试验六),观察其萌发过程。各试验均设 3 次重复,即 3 个载玻片。

试验一:设置 25、30、35、40 ℃四个温度环境,在 10%蔗糖浓度下筛选光皮桦花粉离体萌发的最适温度。

试验二:设置 0%、5%、10%、15%、20%、25%六个蔗糖浓度,筛选适合光皮桦花粉萌发的蔗糖浓度。

试验三:设置 5%、10%和 15%三个蔗糖浓度与 0、100、200、300、400、500 mg·L⁻¹和 600 mg·L⁻¹七个硼酸浓度组合,研究不同浓度硼对光皮桦花粉萌发的影响。

试验四:设置 5%、10%和 15%三个蔗糖浓度与 0、100、200、300、400、500 mg·L⁻¹和 600 mg·L⁻¹七个硝酸钙浓度组合,研究不同浓度钙对光皮桦花粉萌发的影响。

试验五:在试验三、四的基础上,采用正交试验设计 L₁₈(3⁷),蔗糖、硼酸和硝酸钙均设置 3 个浓度,分别为 5%、10%、15%,100、200、300 mg·L⁻¹和 100、200、300 mg·L⁻¹,从各种组合中筛选最佳培养基配方。若最佳组合未包含在正交试验方案中,则补充试验进行验证。

试验六:在最适温度条件下采用最佳培养基对光皮桦花粉离体萌发过程进行初步研究。

1.2.2 培养与观测 参照程伟等(2007)的方法进行花粉离体培养。试验一至五,均培养 4 h,在显微镜(Olympus BH-2,日本制造)放大 200 倍下观察花粉萌发情况;每个载玻片随机抽取 3 个视野进行观察,每个视野的花粉需在 100 粒以上,花粉管长度大于花粉粒直径即视为萌发,统计每个视野的花粉粒总数和萌发花粉数;每个视野随机抽取 10 粒花粉,用测微尺测定其花粉管长度。对于试验六,培养后每 2 h 观测 1 次萌发情况和花粉管长度,直到花粉萌发率和花粉管长度稳定时即停止观察。

1.2.3 数据处理 统计每个视野的花粉萌发率,计算其花粉管平均长度,进而算出每次重复各项指标的平均值。应用 SPSS12.0、SAS 软件对数据进行方差分析和 Duncan 多重比较。对于萌发率数据,若不符合方差齐性要求则进行反正弦转换。

2 结果与分析

2.1 温度对光皮桦花粉离体萌发与生长的影响

不同温度处理间光皮桦花粉萌发率和花粉管长度均呈现极显著差异($P<0.01$,下同)。多重比较结果(表 1)表明,在 30 ℃下光皮桦花粉萌发率最大,显著高于 25 ℃和 35 ℃,35 ℃下花粉萌发率显著高于 25 ℃;花粉管长度在 30 ℃时亦显著高于 25 ℃和 35 ℃,但 25 ℃和 35 ℃处理间差异不显著。在 40 ℃下培养,仍可见花粉管伸出,但其长度小于花粉粒直径。上述结果均说明光皮桦花粉离体萌发的

最适温度为 30℃。

2.2 培养基组分对光皮桦花粉离体萌发与生长的影响

2.2.1 不同浓度蔗糖对光皮桦花粉萌发与生长的影响 不同蔗糖浓度间光皮桦花粉萌发率和花粉管长度均呈极显著差异。由表 2 可知,花粉萌发率和花粉管长度随蔗糖浓度升高均呈先增大后减小的趋势,且两个指标在蔗糖浓度为 10% 时均达最大值,分别比未加蔗糖处理高 155.6% 和 169.4%。10% 浓度下的花粉萌发率显著高于其它浓度,而其花粉管长度仅与 15% 浓度间差异不显著。蔗糖浓度为 25% 时,虽可见花粉管伸出,但其长度均未达到花粉直径大小。可见,以 10% 蔗糖为培养基进行光皮桦花粉离体培养效果最佳。

2.2.2 不同浓度硼酸对光皮桦花粉萌发与生长的影响 从图 1 看出,在 5%、10% 和 15% 三种蔗糖培养基中分别添加不同浓度的硼酸,在硼酸浓度为 0~200 mg·L⁻¹ 时,光皮桦花粉萌发率和花粉管长度随着硼酸浓度的增加均显著递增,硼酸浓度增至 200 mg·L⁻¹ 时达最大值,此后随着硼酸浓度的增加大致呈递减趋势。双因素方差分析结果表明,蔗糖和

硼酸浓度以及两者间的交互作用对花粉萌发率和花粉管长度均存在极显著的影响。在添加适量硼酸的 3 个蔗糖浓度中,花粉萌发率和花粉管长度仍以 10% 处理为最高,显著高于 5% 和 15% 处理。10% 蔗糖分别与 200 mg·L⁻¹、300 mg·L⁻¹ 和 400 mg·L⁻¹ 硼酸组合的培养基之间,光皮桦花粉萌发率和花粉管长度均差异不显著,然而显著高于 10% 蔗糖与其他硼酸浓度的组合。

表 1 培养温度对光皮桦花粉萌发的影响
Table 1 Effect of temperature on pollen germination of *Betula luminiifera*

项目 Item	温度 Temperature (℃)			
	25	30	35	40
花粉萌发率 Pollen germination rate (%)	1.15 c	5.24 a	2.34 b	0 d
花粉管长度 Pollen tube growth (μm)	24.67 b	53.00 a	28.50 b	10.00 c

注:表中字母为 Duncan 多重比较结果,两两处理间含相同字母表示差异不显著,字母不同表示差异显著(0.05 显著性水平)。下同。
Note: The letters above are results of Duncan multiple comparison, there is no significant difference between treatments with same letters, while significant difference between treatments with different letters (at 0.05 level). The same below.

表 2 蔗糖浓度对光皮桦花粉萌发的影响
Table 2 Effect of sucrose concentration on pollen germination of *B. luminiifera*

项目 Item	蔗糖浓度 Sucrose concentration (%)					
	0	5	10	15	20	25
花粉萌发率 Pollen germination rate (%)	2.05 c	3.90 b	5.24 a	3.67 b	3.43 b	0 d
花粉管长度 Pollen tube growth (μm)	19.67 c	40.50 b	53.00 a	50.67 a	24.17 c	9.67 d

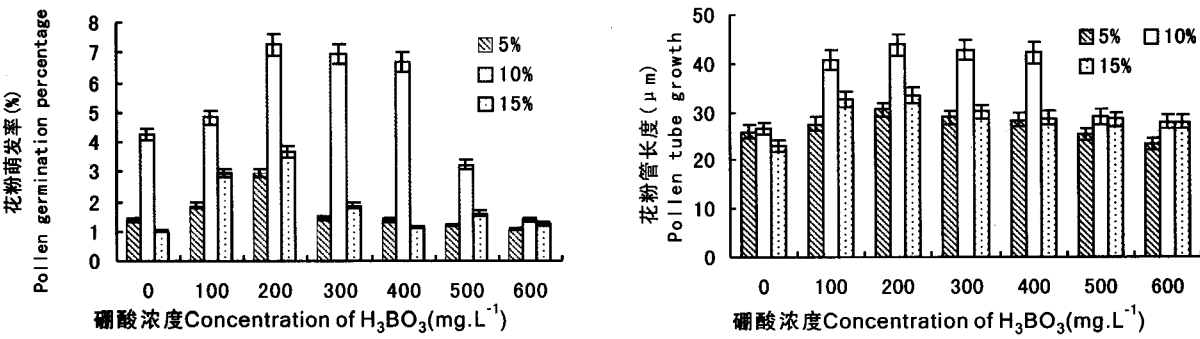


图 1 硼酸对光皮桦花粉离体萌发的影响
Fig. 1 Effect of boron on *in vitro* germination of *B. luminiifera* pollens

2.2.3 不同浓度硝酸钙对光皮桦花粉萌发与生长的影响 由图 2 可知,在 5%、10%、15% 三种浓度蔗糖培养基中加入不同浓度的硝酸钙进行光皮桦花粉离体培养,其萌发率和花粉管长度随着硝酸钙浓度的增加均呈现先递增后递减的变化趋势,在硝酸钙浓度升

至 300 mg·L⁻¹ 达最大值,但花粉管长度的变化幅度明显大于萌发率。双因素方差分析结果表明,蔗糖和硝酸钙浓度以及两者间的交互作用对花粉萌发率和花粉管长度影响均极显著。在添加硝酸钙的 3 种蔗糖浓度处理中,花粉萌发率和花粉管长度均以 10%

处理为最高。在10%蔗糖培养基中添加200 mg·L⁻¹和300 mg·L⁻¹硝酸钙进行光皮桦花粉离体培养,其萌发率差异不显著,均能达到良好效果,但花粉管长

度仅以300 mg·L⁻¹硝酸钙处理效果最佳。
2.3 光皮桦花粉离体萌发与生长最适培养基的确定
在上述试验基础上,综合考虑蔗糖、硼和钙3个

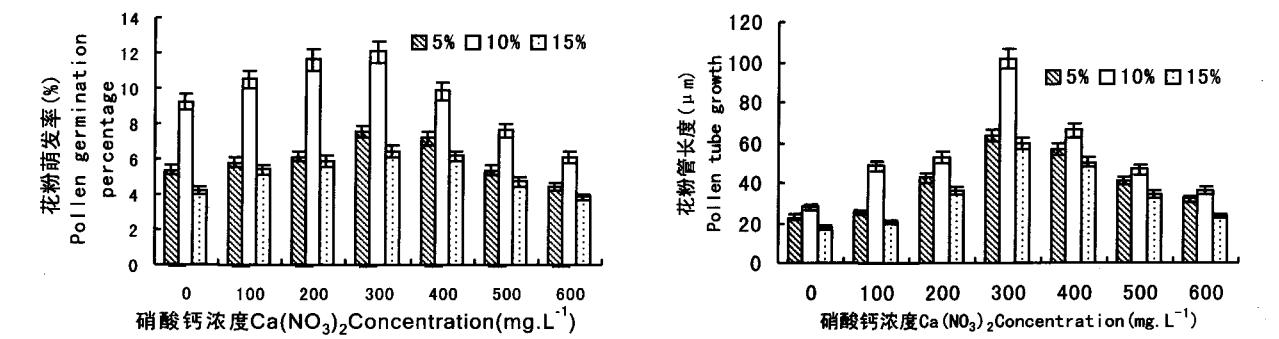


图2 钙对光皮桦花粉离体萌发的影响
Fig. 2 Effect of calcium on *in vitro* germination of *B. lumini fera* pollens

因子,采用正交试验设计 L₁₈(3⁷),确定光皮桦离体培养的最佳培养基。正交试验结果表明,在所设计的18种组合培养基中,以10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸+300 mg·L⁻¹硝酸钙效果最好,且远远高于其它组合。进一步对试验结果作平方和比较分析发现,蔗糖、硼酸和硝酸钙分别以10%、200 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹为最好,而其组合并未包含在正交试验中。为了验证正交试验得出的结论,采用10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸培养基中分别加入100 mg·L⁻¹、200 mg·L⁻¹、300 mg·L⁻¹的硝酸钙,对3个单株的花粉进行离体培养。结果表明,200 mg·L⁻¹硝酸钙浓度处理的花粉萌发率和花粉管长度均显著高于其他两个处理,而且无明显破损现象。由此可见,10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸+200 mg·L⁻¹硝酸钙

表3 硝酸钙浓度对光皮桦花粉离体萌发的影响
Table 3 Effect of Ca(NO₃)₂ concentration on pollen germination of *Betula lumini fera*

培养基 Culture medium	花粉萌发率(%) Pollen germination rate			花粉管长度(μm) Pollen tube growth		
	单株 Tree 1	单株 Tree 2	单株 Tree 3	单株 Tree 1	单株 Tree 2	单株 Tree 3
I	9.05 b	14.10 b	7.63 b	40.02 b	33.60 b	31.00 b
II	18.84 a	22.69 a	12.41 a	53.48 a	44.68 a	47.36 a
III	6.18 c	7.98 c	4.60 c	35.77 b	31.53 b	28.13 b

注:培养基I、II和III分别为10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸+100 mg·L⁻¹硝酸钙、10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸+200 mg·L⁻¹硝酸钙和10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸+300 mg·L⁻¹硝酸钙。
Notes: Culture medium I, II and III are 10% sucrose + 200 mg·L⁻¹ H₃BO₃ + 100 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 10% sucrose + 200 mg·L⁻¹ H₃BO₃ + 200 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂ and 10% sucrose + 200 mg·L⁻¹ H₃BO₃ + 300 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂, respectively.

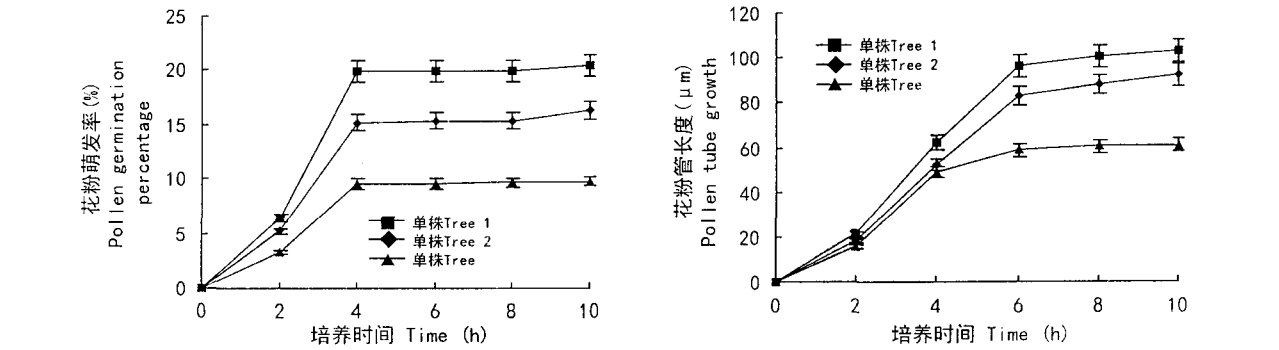


图3 光皮桦花粉的萌发过程
Fig. 3 The germination process of *B. lumini fera* pollens

为光皮桦花粉离体培养的最佳培养基(表3)。
2.4 光皮桦花粉萌发特征的初步研究

应用上述最佳培养基在30℃温度条件下进行

光皮桦花粉离体萌发(图3)。由图3可知,3个单株的花粉均呈现相似的萌发过程,即随着培养时间的增长,其萌发率随之增高,在培养4 h后花粉萌发率

趋于稳定;3个单株的花粉管长度亦随培养时间的推移而不断伸长,在培养6h后伸长速度明显减缓,逐渐趋于稳定。

3 结论与讨论

花粉离体萌发需要适宜的温度、碳源、矿质元素(如钙、硼等)的参与,而当培养基中的一些组分浓度过高时,会抑制花粉萌发。本研究中光皮桦花粉离体萌发的适宜温度为30℃;通过单因素和双因素试验发现蔗糖浓度以10%为最佳,其花粉萌发率和花粉管长度分别比未加蔗糖的高156%和169%,而浓度升至25%时,其花粉基本不萌发;在10%蔗糖培养基中分别添加硼酸和硝酸钙时,在一定浓度范围内均能促进光皮桦花粉萌发和花粉管生长,其中硼酸以200 mg·L⁻¹效果最好,其花粉萌发率和花粉管长度分别比未加硼酸处理高170.0%和164.5%,这与程伟等(2007)在西南桦上的研究结果一致;而硝酸钙以300 mg·L⁻¹效果最佳,分别比未加硝酸钙处理高131.0%和362.8%,这与蒋桂华等(2007)对草莓以及何金环等(2006)对黄瓜花粉的研究结果一致;过高浓度的硼酸和硝酸钙均能抑制花粉萌发和花粉管的生长,而且出现花粉管破裂,释放内含物;综合考虑蔗糖、硼和钙三个因素时,通过正交试验及其补充试验发现,光皮桦花粉离体萌发的最佳培养基为10%蔗糖+200 mg·L⁻¹硼酸+200 mg·L⁻¹硝酸钙。

本文用3个单株的花粉研究了光皮桦花粉的萌发特征,发现其萌发率、花粉管长度均随着培养时间的增长呈现上升趋势,花粉萌发率在培养4h后逐渐趋于稳定,花粉管长度在培养6h后逐渐趋于稳定,因此采用最佳培养基于30℃温度下培养4h即可进行光皮桦花粉活力检测。

参考文献:

Cheng W(程伟),Zhao ZG(赵志刚),Zeng J(曾杰),*et al.* 2007.

- Preliminary report on *in vitro* pollen germination of *Betula alnoides*(西南桦花粉离体萌发的适宜条件与萌发特征)[J]. *Fore Res*(林业科学研究),20(2):209—212
- He JH(何金环),Li QZ(李巧枝),Ren M(任敏). 2006. The effects of Ca²⁺ on pollen germination and tube growth in cucumber(Ca²⁺对黄瓜花粉萌发和花粉管生长的影响)[J]. *Henan Agric Sci*(河南农业科学),26(1):75—77
- Hu XY(胡晓媛),Li ZZ(李志真),Liang YC(梁一池). 2006. The progress of the studies on the excellent fast-growing tree *Betula lumini fera*(优良速生树种光皮桦研究进展)[J]. *J Fujian Fore Sci Tech*(福建林业科技),33(2):160—163
- Jiang GH(蒋桂华),Xie M(谢鸣),Fang L(方丽),*et al.* 2007. Effects of boron, calcium, pesticide and germicide on pollen germination and tube growth of strawberry(硼、钙和农药对草莓花粉萌发及花粉管生长的影响)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报),24(2):234—236
- Lai HL(赖焕林),Chen TH(陈天华),Xu J(徐进),*et al.* 1994. Study on pollen vitality of clones from a masson pine seed orchard(马尾松种子园无性系花粉生活力研究)[J]. *Fore Res*(林业科学研究),7(5):555—560
- Li ZN(李志能),Liu GF(刘国锋),Luo CL(罗春丽),*et al.* 2006. Studies on the pollen vitality and storage capacity in *Platanus acerifolia*(悬铃木花粉生活力及贮藏力的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),24(1):54—57
- Pasonen HL,Kapyla M. 1998. Pollen-pollen interactions in *Betula pendula in vitro*[J]. *New Phytologist*,138:481—487
- Wang XP(王献博),Sun SZ(孙世洲),Li XX(李信贤). 1998. The classification and succession of *Betula lumini fera* forest in Guangxi(广西光皮桦林的分类和演替研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),18(2):123—138
- Yao CY(姚成义),Zhao J(赵洁). 2004. Effects of calcium and boron on pollen germination and pollen tube growth of *Torenia fournieri*(钙和硼对蓝猪耳花粉萌发及花粉管生长的影响)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),22(1):1—7
- Zhan YG(詹亚光),Chen Y(陈艳),Zhao W(赵文),*et al.* 1998. Birch pollen vitality(白桦花粉的生命力)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报),26(2):77—79
- Zhao HB(赵宏波),Fang WM(房伟民),Chen FD(陈发棣). 2007. Pollen germination *in vitro* of Mei flower(梅花花粉离体萌发和花粉管生长研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(3):393—396