

# 培养条件及贮藏温度和时间对木麻黄花粉萌发率的影响

武冲<sup>1,2</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 仲崇禄<sup>1\*</sup>, 唐树梅<sup>2</sup>, K. PINYOPUSARERK<sup>3</sup>

(1. 中国林科院热带林业研究所, 广州 510520; 2. 海南大学农学院, 海南 儋州 571737; 3. CSIRO Forest Biosciences, Canberra, Australia)

**摘要:** 用离体培养的方法研究了不同蔗糖、硼酸浓度, 以及不同贮藏温度和贮藏时间对木麻黄(*Casuarina*)花粉萌发的影响。结果表明: 15% 的蔗糖是木麻黄花粉萌发的最佳浓度; 在 15% 蔗糖培养基上添加硼酸显著促进木麻黄花粉萌发, 250 mg kg<sup>-1</sup> 硼酸是木麻黄花粉萌发的最佳浓度; 添加了琼脂的固体培养基更有利于木麻黄花粉萌发; 在常温下木麻黄生活力丧失很快, 但低温下花粉的萌发力可保持较长时间。

**关键词:** 木麻黄; 花粉; 萌发率

中图分类号: Q944.58

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)03-0316-05

## Effects of Storage Conditions on Pollen Germination of *Casuarina cunninghamiana*

WU Chong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, ZHONG Chong-lu<sup>1\*</sup>, TANG Shu-mei<sup>2</sup>, K. PINYOPUSARERK<sup>3</sup>

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China;

2. College of Agriculture, Hainan University, Danzhou 571737, China; 3. CSIRO Forest Biosciences, Canberra, Australia)

**Abstract:** The effects of storage conditions on pollen germination of *Casuarina cunninghamiana* Miq. *in vitro* were studied. The results showed that the optimum concentrations of sucrose and boric acid on pollen germination of *C. cunninghamiana* Miq. were 15% and 250 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. The solid medium supplemented with agar was beneficial to pollen germination. Pollen at low temperature could maintain germination ability for long time.

**Key words:** *Casuarina cunninghamiana* Miq.; Pollen; Germination rate

木麻黄科(Casuarinaceae)植物有 4 属 96 种<sup>[1]</sup>, 分布于澳大利亚、东南亚和太平洋群岛的海平面潮线至海拔 3000 m 的高山。木麻黄有多种用途, 为重要的生态林、用材林树种, 对防风固沙及对贫瘠干旱的沿海沙地生态系统的恢复有不可替代的作用。在我国, 浙江、福建、广东、广西和海南省的沿海木麻黄防护林面临着林分退化、病虫害严重、种质资源贫乏、品种单一等严重问题, 开展木麻黄杂交育种研究、选育新品种的要求非常迫切。因此, 我们开展了木麻黄人工杂交育种的研究。在进行木麻黄杂交育种前, 必须解决亲本间花期不一致、

远距离杂交等问题, 所以对木麻黄花粉进行贮藏和花粉生活力的研究具有非常重要的实践意义。

影响贮藏花粉生活力最大的有温度、湿度和氧气 3 个因素<sup>[2]</sup>。大多数植物花粉在 -20℃ 下可较长时间保持生活力, 在超低温下 (-80 ~ -196℃) 可长期保持生活力<sup>[3]</sup>。花粉在贮藏过程中较低的湿度和氧气浓度使酶的活性减弱, 呼吸作用降低, 花粉的代谢受到抑制, 从而保持较高的生活力。通常花粉的保存方法有低温干燥贮藏法、超低温贮藏法和冻干贮藏法。离体萌发法是测定花粉生活力的一种可靠性较高、操作简便、且可完全定量的方法, 应

收稿日期: 2009-08-20

接受日期: 2009-11-16

基金项目: 中国林科院热带林业研究所基本科研业务专项基金(2007-24); “十一五”林业科技支撑计划项目(2006BAD01A1605); 福建省林木种苗科技攻关项目第三期资助

作者简介: 武冲, 男, 硕士, 主要从事木麻黄遗传育种的研究, email: wuchongge@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, email: zhongchl@pub.guangzhou.gd.cn

用最广<sup>[4]</sup>。研究表明,花粉萌发受到培养基中 pH 值、糖浓度、硼和钙离子浓度等的影响,也受到培养温度的影响。与木麻黄科亲缘关系比较近的西南桦(*Betula alnoides*)花粉离体萌发的最适温度是 30℃,最佳蔗糖浓度是 15%,硼酸浓度是 200 mg kg<sup>-1</sup><sup>[5]</sup>。目前还未见有关木麻黄花粉生活力测定和贮藏方法的研究报道。对木麻黄花粉生活力测定和贮藏方法进行研究,对木麻黄杂交育种工作的开展有重要的意义。

在本研究中,我们用离体萌发法对细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq.)花粉的生活力进行测定,筛选离体萌发培养基中营养元素的最佳浓度和最适培养条件,采用低温干燥减压法对木麻黄花粉进行贮藏,探讨木麻黄花粉在不同贮藏条件下生活力的变化,为花粉的长时间贮藏和远距离运输提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 花粉收集

2009年4月在福建省泉州市惠安赤湖林场,选择长势旺盛的细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana*)雄性优树,取即将成熟的雄花枝带回室内水培。待花序开始散粉时,摘取花序在铺开的硫酸纸上将花粉抖落,用250目网筛过筛,用青霉素小瓶装好,再用医用注射器抽真空后密封,分别于室温、4℃、-20℃冰箱中贮存,用于不同贮藏温度和不同贮藏时间木麻黄花粉萌发率的测定。

### 1.2 试验设计

采用1个单株的新鲜花粉,研究花粉离体萌发培养基中蔗糖和硼酸的最佳浓度及不同贮藏条件下花粉的活力变化。

蔗糖浓度设置6个水平,分别是0%、5%、10%、15%、20%、30%,筛选最佳蔗糖浓度。

选择最佳的蔗糖浓度加入不同浓度的硼酸,硼酸浓度设9个水平,分别是0、50、100、150、200、250、300、400、500 mg kg<sup>-1</sup>,筛选最佳硼酸浓度。

取贮藏于室温(25℃)、4℃、-20℃的花粉,分别在3 d、7 d、15 d和30 d在含最佳蔗糖和硼酸浓度的培养基上培养,测定花粉的萌发率。

以上3个实验中,培养基中加入1%的琼脂,调节pH值为6.8。每实验3次重复。

### 1.3 培养方法

在凹槽载玻片中滴1小滴培养基,将花粉轻轻

抖落在培养基表面,使花粉均匀分布。将载玻片放入铺有湿滤纸的培养皿内,盖上盖子保持湿度,然后置于29℃恒温箱内培养。

### 1.4 统计分析

培养24 h后用显微镜(Olympus BH-2)观察花粉萌发情况,花粉管长度大于花粉管直径视为萌发,重复观察3个视野,取平均值。花粉萌发率(%) = 萌发花粉数/花粉总数 × 100%。

用SAS统计软件进行方差分析和Duncan多重比较( $P=0.05$ 水平)分析差异显著性。

### 1.5 电镜观察

用扫描电子显微镜观察木麻黄新鲜花粉和4℃贮藏1个月后花粉的形态差异,把花粉撒在粘有双面胶的铜台上,用IB-5型离子镀膜仪镀金后,用S-530型扫描电子显微镜进行观察并拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 蔗糖对花粉萌发的影响

从图1可见,不同浓度的蔗糖对木麻黄花粉的萌发率有显著影响,当蔗糖浓度为15%时木麻黄花粉萌发率最高(7.02%),而蔗糖浓度高于或低于15%时花粉的萌发率相应降低,没有蔗糖时萌发率最低,只有1.20%。SAS方差分析和Duncan多重比较表明,培养基蔗糖浓度为15%时的花粉萌发率显著高于其他浓度处理。这说明15%的蔗糖浓度是最适合木麻黄花粉萌发的浓度。

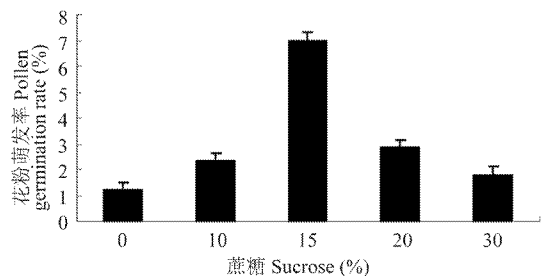


图1 蔗糖浓度对木麻黄花粉萌发率的影响

Fig. 1 Effect of sucrose on pollen germination rate of *C. cunninghamiana*

### 2.2 硼酸对花粉萌发的影响

在含15%蔗糖的培养基中加入不同浓度的硼酸,由表2可知,硼酸对木麻黄花粉萌发的影响非常明显。不加硼酸的萌发率只有7.02%,加入硼酸时,最高可以达到13.16%。硼酸浓度为0~250 mg kg<sup>-1</sup>时,木麻黄花粉的萌发率随着硼酸浓度的增加而提高,当超过250 mg kg<sup>-1</sup>时,花粉的萌发率显著降低,说

明过高的硼酸抑制了花粉的萌发。SAS 方差分析和 Duncan 多重比较表明, 硼酸浓度为  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  时的花粉萌发率与其他浓度处理有显著差异, 是木麻黄花粉萌发培养基的最适硼酸浓度。

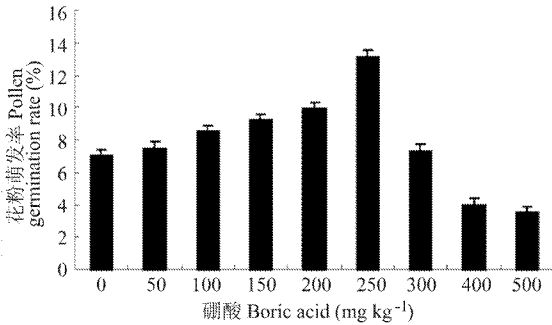


图 2 硼酸对木麻黄花粉萌发率的影响

Fig. 2 Effect of boric acid on pollen germination rate of *C. cunninghamiana*

### 2.3 贮藏条件和时间对花粉生活力的影响

实验结果(图 3)表明, 木麻黄花粉萌发率在各种贮藏温度下都随贮藏时间的延长而下降, 但下降速度差异很大。在室温下, 花粉贮藏 3 d 的萌发率只有 0.79%, 贮藏 7 d 已不见萌发的花粉粒; 在  $4^\circ\text{C}$  冷藏的花粉贮藏 3 d 的萌发率为 11.20%, 贮藏 7 d 的萌发率为 8.47%, 贮藏 15 d 的降低到 4.79%, 贮藏 30 d 后只有 2.33%; 而在  $-20^\circ\text{C}$  冷冻的花粉贮藏

3 d 的萌发率高达 13.16%, 贮藏 7 d 的达 10.32%, 贮藏 15 d 下降为 9.86%, 贮藏 30 d 的萌发率仍有 8.32%。这说明木麻黄花粉在室温下的贮藏时间很短, 3 d 后绝大部分花粉失去了活力。低温能非常有效地保持木麻黄花粉的生活力, 如  $-20^\circ\text{C}$  贮藏 30 d 的花粉比贮藏 7 d 的萌发率仅降低了 2.0%。从图 4 A 和 B (不同视野下木麻黄花粉的萌发情况) 可以看出有些花粉没有吸水膨胀说明本身已丧失活力, 花粉管在培养 20 h 开始萌发, 24 h 基本趋于稳定。

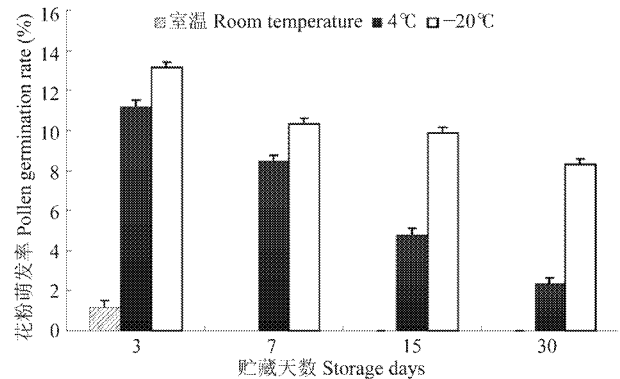


图 3 贮藏温度和时间对木麻黄花粉萌发率的影响

Fig. 3 Effects of storage temperature and time on pollen germination rate of *C. cunninghamiana*

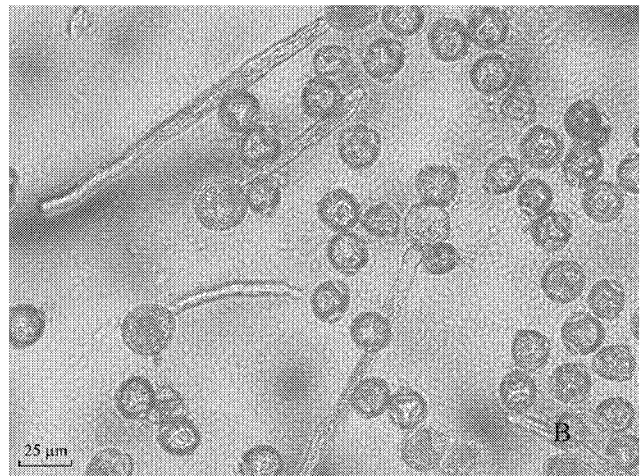
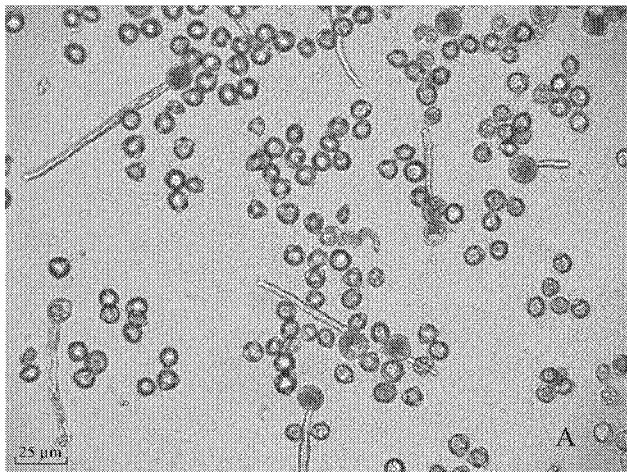


图 4 花粉在 15% 蔗糖和  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  硼酸培养基上的萌发

Fig. 4 Pollen germination on the medium with 15% sucrose and  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  boric acid

### 2.4 花粉贮藏后的形态变化

在电镜下观察新鲜花粉(图 5A)和  $4^\circ\text{C}$  贮藏 30 d 的花粉(图 5B), 可以明显看出新鲜花粉粒多数形态饱满, 而  $4^\circ\text{C}$  储藏 30 d 后大部分花粉粒收缩变形。新鲜花粉粒的萌发孔处有清晰的胶质。但脱水条件下, 花粉粒发生收缩变皱, 并且出现 2~3 处下陷的凹

穴, 穴内有一束胶质丝。

## 3 结论和讨论

植物花粉离体萌发大多采用蔗糖作为基本培养基, 再添加硼、钙等微量元素。蔗糖除了为花粉萌发提供能量物质外, 还可以调节花粉的渗透压<sup>[6]</sup>,

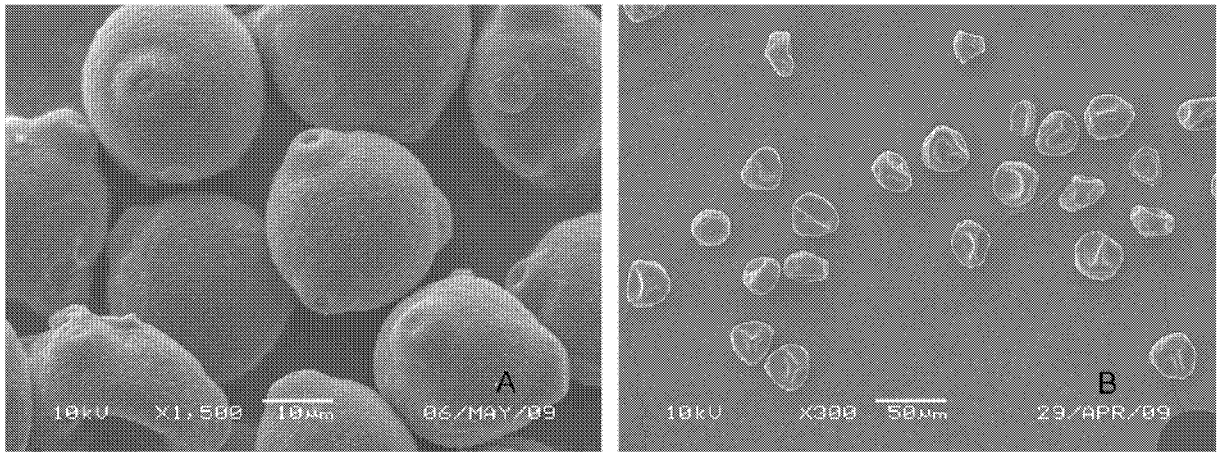


图5 扫描电镜下的花粉形态

Fig. 5 Pollen morphology under SEM

利于花粉在培养基上萌发;硼主要是参与花粉管顶端细胞壁的形成,而花粉大多缺硼,因此,在基本培养基中添加硼,能够促进花粉萌发和花粉管生长<sup>[7]</sup>,硼通过影响  $H^+$ -ATP 酶从而促进花粉萌发和花粉管的生长<sup>[8-9]</sup>。不同植物花粉萌发的最佳蔗糖和硼酸浓度差别较大,如红花三叶草(*Trifolium pratense*)花粉萌发的最佳蔗糖浓度要高达 40%<sup>[10]</sup>,最佳硼酸浓度是 50 mg kg<sup>-1</sup><sup>[11]</sup>,而琉璃苣(*Borago officinalis*)花粉萌发的最佳蔗糖浓度是 20%,最佳硼酸浓度是 100 mg kg<sup>-1</sup><sup>[12]</sup>;我们的实验结果表明木麻黄花粉的最佳蔗糖和硼酸浓度分别是 15% 和 250 mg kg<sup>-1</sup>,而西南桦花粉萌发的最佳蔗糖和硼酸浓度分别是 15% 和 200 mg kg<sup>-1</sup><sup>[5]</sup>。木麻黄科和西南桦同为桦木科,在分类上亲缘关系较近,但花粉相似的萌发条件和植物的亲缘关系之间是否有相关性,还需进一步的研究。

本实验中木麻黄花粉在不同温度下贮藏,花粉萌发率下降速度差异极为显著。在-20℃贮藏 30 d 的花粉萌发率为 8.32%,且花粉萌发率下降速度缓慢,是木麻黄花粉贮藏的可行方法,完全可以满足木麻黄杂交育种中花期不遇和异地授粉的要求。有研究表明花粉在超低温下(-80 ~ -196℃)可长期贮藏,但设备要求高且成本较高,主要是用于种质资源保存用途。与其他植物的花粉萌发率相比,如红花三叶草的新鲜花粉萌发率为 57.41%<sup>[10]</sup>,落花生(*Arachis hypogaea*)的为 73.0%<sup>[13]</sup>,木麻黄新鲜花粉萌发率相对较低,最高仅 13.16%(图 2)。这可能是木麻黄花药产生小孢子时败育率高<sup>[14]</sup>,同时也有许多花粉萎缩变形,在贮藏过程中水分及养分的消耗也是导致花粉萌发率低的一个重要原因。

Sparks 观察了液氮中保存 10 年以上的美国山核桃(*Carya illinoensis*)完整的花粉粒的横切面,存活的花粉细胞质分布均匀,细胞膜结构完整,而死亡的花粉粒细胞质分布不均匀,细胞膜的瓦解导致细胞质中明显缺少填充物<sup>[15]</sup>。这是木麻黄死亡花粉收缩变形的原因。但由于木麻黄花粉量非常大,每朵花可产生 850 粒花粉<sup>[6]</sup>,每个花序多达 144 ~ 648 朵花,而且花期可长达 9 周<sup>[17]</sup>,数量巨大的花粉弥补了花粉生活力较低的缺陷,保证了木麻黄正常的传粉需求。

在花粉萌发实验中,我们曾采用不加琼脂的液体培养基对花粉进行培养,但发现花粉粒在液体培养基中吸水膨大后聚集到一块并沉底,萌发率很低,可能花粉粒沉入液体培养基后得不到萌发所需的足够氧气,抑制了花粉的萌发。木麻黄离体萌发的另一个特点是在培养基上萌发所需时间较一般植物花粉要长得多,一般培养 20 h 后才开始萌发,24 h 后才稳定,花粉管生长速度等花粉萌发特征是否受影响尚存在争论<sup>[18]</sup>。

### 参考文献

- [1] Midgley S J W, Turnbull J W, Johnston R D. *Casuarina* Ecology, Management and Utilization [M]. Canberra: CSIRO, 1983: 180-218.
- [2] Wang Q L(王钦丽), Lu L D(卢龙斗). Pollen preservation and its viability test [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2002, 19(3): 365-373. (in Chinese)
- [3] Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: Intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate [J]. Stain Techn, 1970, 45: 115-120.
- [4] Gudín S, Arene L, Pellegrino C. Influence of temperature and hygrometry on rose pollen germination [J]. Adv Hort Sci, 1991, 5: 96-98.

- [5] Cheng W(程伟), Zeng J(曾杰). Preliminary report on *in vitro* pollen germination of *Betula alnoides* [J]. For Res(林业科学研究), 2007, 20(2): 209–212.(in Chinese)
- [6] Fei S, Nelson E. Estimation of pollen viability, shedding pattern, and longevity of creeping bentgrass on artificial media [J]. Crop Sci, 2003, 43(6): 2 177–2 181.
- [7] Yao C Y(姚成义), Zhao J(赵洁). Effects of calcium and boron on pollen germination and pollen tube growth of *Torenia fourmieri* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2004, 22(1): 1–7.(in Chinese)
- [8] Feijo J A, Malho R, Obermeyer G. Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen tubes and tube growths [J]. Protoplasma, 1995, 187: 155–167.
- [9] Obermeyer G, Blatt M R. Electrical properties of intact pollen grain of *Lilium longiflorum*: Characteristics of the non-germination [J]. J Exp Bot, 1995, 46: 803–813.
- [10] Nurhan H, Kkartal B Y. *In vitro* pollen germination and pollen tube characteristics in tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.) [J]. Turk J Bot, 2003, 27: 57–61.
- [11] Kendall W A. Growth of red clover pollen. II. Elongation *in vitro* [J]. Crop Sci, 1967, 7: 342–344.
- [12] Montaner C, Floris E, Alvarez-Grana J E. Study of pollen cytology and evaluation of pollen viability using *in vivo* and *in vitro* test, in borage (*Borago officinalis* L.) [J]. Grana, 2003, 42: 33–37.
- [13] Kakani V G, Prasad P V V, Craufurd P Q, et al. Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature [J]. Plant Cell Environ, 2002, 25: 1651–1661.
- [14] Akiko S, Junko N, Tanguy J. Pollen-tube growth pattern and chalazogamy in *Casuarina equisetifolia* [J]. J Plant Res, 2004, 7: 249–251.
- [15] Sparks D, Yates I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability [J]. Hort Sci, 2002, 37(1): 176–177.
- [16] Sharma S B. Aerobiological studies of urban and rural areas of Bangalore [D]. Bangalore, India: the Bangalore University, 1990: 357–373.
- [17] Primack R B. Longevity of individual flowers [J]. Ann Rev Ecol Syst, 1985, 16: 15–37.
- [18] Pasonen H L, Pulkkinen P, Kapyła M. Do pollen donors with fast-growing pollen tubes sire the best offspring in an anemophilous tree, *Betula pendula* (Betulaceae) [J]. Amer J Bot, 2001, 88 (5): 854–860.