

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201503024

詹妮,黄烈健.马占相思花粉离体萌发研究[J]. 广西植物, 2016, 36(5):595-599

ZHAN N, HUANG LJ. Study on *Acacia mangium* pollen germination *in vitro*[J]. *Guihaia*, 2016, 36(5):595-599

马占相思花粉离体萌发研究

詹妮,黄烈健*

(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广州 510520)

摘要: 马占相思(*Acacia mangium*)是含羞草科(Mimosaceae)金合欢属(*Acacia* Mill.)树种,在我国的广东、广西、福建以及海南等省(区)大面积种植推广。马占相思用途广泛,其杂交育种工作近年来逐渐受到重视,马占相思花粉研究对其杂交育种成败具有重要影响。该研究以新鲜的马占相思花粉为供试材料,开展不同蔗糖浓度(50、100、150、200、250和300 g·L⁻¹)、不同硼酸浓度(100、200和300 mg·L⁻¹)以及不同培养温度(26、28和30℃)对马占相思花粉离体萌发影响的研究,同时使用筛选出的马占相思花粉离体萌发的最佳处理,开展对另外3株与初试的马占相思生长发育状况接近的马占相思的花粉活力检测研究,并观察记录马占相思花粉离体萌发特征。结果表明:将刚开放的马占相思花序采回室内阴干,于次日10:00后,用毛笔刷法成功收集大量马占相思花粉,经显微镜观察检测,花粉纯度较高,可以保证后续研究备用;马占相思花粉离体萌发的最佳处理为200 g·L⁻¹蔗糖、100 mg·L⁻¹硼酸、28℃培养温度;马占相思花粉在培养24 h之后,花粉萌发率最高(为94.28%),花粉管最长(为6.0 D);检测3株马占相思的花粉萌发率分别为90.11%、82.31%、85.67%,具有显著差异。该研究结果为今后进一步开展人工控制授粉、选育优良的相思杂交新品种提供了基础。

关键词: 马占相思, 花粉收集, 培养温度, 萌发率, 花粉管长度

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)05-0595-05

Study on *Acacia mangium* pollen germination *in vitro*

ZHAN Ni, HUANG Lie-Jian*

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

Abstract: *Acacia mangium* is a member of Mimosaceae *Acacia* Mill., and it is planted and promoted in Guangdong, Fujian and Hainan provinces and Guangxi Autonomous Region. *A. mangium* is used widely, and its hybrid breeding has received great attention. The research on the *A. mangium* pollen is key to the hybrid breeding. In this study, we studied the effects of the different sucrose concentrations (50, 100, 150, 200, 250 and 300 g·L⁻¹), the different boric acid concentrations (100, 200 and 300 mg·L⁻¹) and different culture temperatures (26, 28 and 30℃) on the pollen *in vitro* germination using the fresh pollen from one plant of *A. mangium* as experiment materials detected the pollen viability of the other 3 plants of *A. mangium* using the best *A. mangium* pollen *in vitro* germination treatment, whose growths and developments closed to the preliminary *A. mangium*s and observed and recorded the characteristics of *A. mangium* pollen *in vitro* germination. The results showed that the inflorescences of just open of *A. mangium* were collected and took to the chamber and air dried at room temperature. On the next day after 10:00, a large number of pollen was collected successfully with brush method. The pollen of high purity by microscope detection could ensure the follow-up study in the

收稿日期: 2015-04-16 修回日期: 2015-07-27

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD01B0402) [Supported by National Key Technology R & D Program of the Ministry of Science and Technology of China during the “12th Five-Year Plan” (2012BAD01B0402)].

作者简介: 詹妮(1990-),女,天津塘沽人,在读硕士研究生,主要研究方向为相思树的育种, (E-mail) jennyzn1122@163.com。

*通讯作者: 黄烈健,博士,副研究员,主要从事相思树的育种研究, (E-mail) 13802987948@163.com。

future. The optimum treatments of pollen germination *in vitro* of *A. mangium* were 200 g · L⁻¹ sucrose, 100 mg · L⁻¹ boric acid and 28 °C culture temperature. After *A. mangium* pollen cultured for 24 h, the pollen germination percentage was the highest (94.28%) and the pollen tube was the longest (6.0 D). The pollen germination percentage of the other 3 plants of *A. mangium* had significant difference, 90.11%, 82.31%, 85.67%, respectively. This study provide the basis for further development of artificial control pollination and breeding excellent new hybrid of *Acacia*.

Key words: *Acacia mangium*, pollen collection, culture temperature, germination percentage, pollen tube length

马占相思(*Acacia mangium*)是含羞草科(Mimosaceae)金合欢属(*Acacia* Mill.)的速生丰产树种,原产于昆士兰北部、巴布亚新几内亚西部、伊里安岛以及印度尼西亚的鲁古群岛(Doran et al, 1982)。马占相思的用途广泛,其木材可用作建筑、纸浆、家具材料等;其根系具有根瘤菌,可以增加土壤肥力,是荒山造林的优良树种。马占相思自1979年引入中国之后,已在我国的广东、广西、福建以及海南等省区大面积种植推广。

目前,马占相思的杂交育种工作越来越受到重视,关于马占相思花粉的研究则是影响其杂交育种成败的关键因素,而开展花粉收集和花粉活力检测是开展杂交育种的前提工作。已有研究表明马占相思花粉颗粒极小、难收集(黄烈健等, 2014),因此花粉收集是开展其杂交育种必须解决的问题。花粉活力检测方法有染色法、受精力测定法以及离体萌发测定法等(王钦丽等, 2002)。对于花粉离体萌发培养基组分研究,已有对桂花(*Osmanthus fragrans*) (张洪伟等, 2014)、刺槐(*Black locust*) (戴丽等, 2012)、柚木(*Tectona grandis*) (黄桂华等, 2011)、有斑百合(*Lilium concolor* var. *buschianum*) (李晶等, 2011)、杏花(*apricot*) (安晓芹等, 2011)以及小黑杨(*Populus simonii* × *P. nigra*) (赵丽娟等, 2011)等的花粉培养基组分以及对花粉活力试验研究,均认为蔗糖浓度和硼酸是影响花粉萌发的主要因素。国内外有关马占相思花粉、其离体萌发体系以及培养温度筛选的研究均较少。本文旨在研究马占相思花粉收集、离体萌发的最佳处理以及最佳培养温度,为马占相思人工辅助授粉和杂交育种提供了理论与实践依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料取自广东省江门市国家重点相思良种基地,该基地位于江门市新会区沙堆镇南坑林场

(113°08' E, 22°18' N),属亚热带季风性气候。马占相思种子园于1998年1月建立,面积共4.2 hm²,园内植株的株行距为5 m × 8 m。

1.2 方法

1.2.1 马占相思花粉收集方法 清晨采集当天开放的新鲜马占相思花穗装入硫酸纸袋中,放入25~30 °C室内阴干,待次日用毛笔收集花粉,并过筛,装入加有干燥硅胶的小玻璃瓶中,抽真空待用。

1.2.2 培养基成分筛选 选取种子园中1株马占相思花粉为试验材料,设计6个蔗糖浓度50、100、150、200、250、300 g · L⁻¹和3个硼酸浓度100、200、300 mg · L⁻¹,共18个培养基,每个处理3次重复。

1.2.3 培养温度筛选 设计3个培养温度梯度,为26、28、30 °C,培养24 h。

1.2.4 不同单株花粉萌发差异 根据对蔗糖浓度和硼酸浓度以及培养温度的筛选结果,选择出马占相思花粉最适宜的处理,对另外3株与初试单株生长发育状况接近的马占相思的花粉进行活力检测,进行花粉萌发过程及花粉萌发差异等研究。

1.2.5 培养方法 在载玻片的凹槽上滴加培养液1~2滴,将收集好的新鲜的马占相思花粉掸在培养液上,将载玻片放入培养皿中培养,培养皿中放入2张湿润滤纸。

1.2.6 观测方法 马占相思花粉在培养3、6、9、12、24 h时,用光学显微镜观察花粉的萌发情况,并进行记录,随机选取2个视野,进行3次重复,保证每个处理统计观察的花粉粒不少于200粒。

1.2.7 数据分析 计算每个视野的马占相思花粉萌发率和最长花粉管长度(本研究花粉管长度以单颗复合花粉粒长度为计数单位,1 D),采用Excel和SPSS 19.0对数据进行处理和方差分析,用邓肯(Duncan)多重比较评价差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 马占相思花粉收集

在早上9:00之前,采当天开放的马占相思花

穗,带回室内阴干,待次日 10:00 花药大量爆裂之后收集花粉。用毛笔反复轻刷马占相思花穗 5~6 次,200 目筛子过筛,装入加有干燥硅胶的小玻璃瓶中,盖上盖,抽真空待用。用此方法收集到的马占相思花粉(图 1),可用作花粉活力检测及贮藏研究。

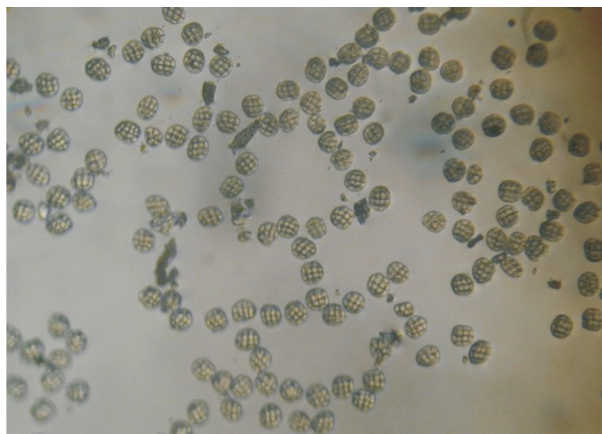


图 1 收集的马占相思花粉 (20 × 10 倍显微镜下观测)

Fig. 1 Collected pollen of *Acacia mangium* (20 × 10 microscope)

2.2 马占相思花粉萌发的最佳处理及培养温度筛选

马占相思花粉在 26 °C 恒温下培养(表 1)。表 1 显示,当蔗糖浓度为 150 g · L⁻¹、硼酸浓度为 200 mg · L⁻¹时,花粉萌发率最高(86.14%),显著高于其他处理;花粉管长度最长(6.0 D)。

马占相思花粉在 28 °C 恒温下培养(表 2)。表 2 显示,当蔗糖浓度为 200 g · L⁻¹、硼酸浓度为 100 mg · L⁻¹时,花粉萌发率最高(为 94.28%),显著高于其他处理;花粉管长度最长(为 6.0 D)。

马占相思花粉在 30 °C 恒温下培养(表 3)。表 3 显示,200 g · L⁻¹蔗糖浓度和 100 mg · L⁻¹硼酸浓度的处理,花粉萌发率最高(为 57.68%);150 g · L⁻¹蔗糖浓度和 200 mg · L⁻¹硼酸浓度的处理,花粉萌发率为 52.48%;250 g · L⁻¹蔗糖浓度和 100 mg · L⁻¹硼酸浓度的处理,花粉萌发率为 52.46%,其花粉萌发率显著高于其他处理。在蔗糖浓度 200 g · L⁻¹和硼酸浓度 200 mg · L⁻¹处理下,花粉管长度最长。

这说明不同的蔗糖浓度和硼酸浓度以及不同培养温度的处理之间,马占相思花粉萌发率、花粉管长度差异显著。当蔗糖浓度到达 200 g · L⁻¹时,随着其浓度的增加对马占相思花粉生长起到抑制作用。在 26、28、30 °C 培养下的花粉,最高萌发率分别为 86.14%、94.28%、57.68%。

表 1 在 26 °C 下马占相思花粉不同处理花粉萌发率、花粉管长度

Table 1 Pollen germination rate, pollen tube length of *Acacia mangium* in different treatments

蔗糖浓度 Sucrose concentration (g · L ⁻¹)	硼酸浓度 Boric acid concentration (mg · L ⁻¹)	花粉萌发率 Pollen germination percentage (%)	花粉管长度 Pollen tube length (D)
50	100	45.66e	4bc
	200	51.71de	5ab
	300	34.30f	3cd
100	100	53.14d	4bc
	200	83.36ab	6a
	300	46.12e	4bc
150	100	61.00c	4bc
	200	86.14a	6a
	300	34.35f	3cd
200	100	78.79b	4bc
	200	34.95f	3cd
	300	29.70fg	5ab
250	100	78.74b	4bc
	200	35.97f	3cd
	300	33.97f	2d
300	100	53.73d	3cd
	200	22.50h	3cd
	300	26.22gh	2d

注:每列中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercases among treatments in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

表 2 在 28 °C 下马占相思花粉不同处理花粉萌发率、花粉管长度以及花粉管条数

Table 2 Pollen germination rate, pollen tube length of *Acacia mangium* in different treatments at 28 °C

蔗糖浓度 Sucrose concentration (g · L ⁻¹)	硼酸浓度 Boric acid concentration (mg · L ⁻¹)	花粉萌发率 Pollen germination percentage (%)	花粉管长度 Pollen tube length (D)
50	100	31.03jk	2.0cd
	200	32.99jk	3.0bc
	300	35.52hij	2.0cd
100	100	34.78hij	2.0cd
	200	46.08f	3.0bc
	300	38.68ghi	3.0bc
150	100	69.09c	3.0bc
	200	51.72e	3.0bc
	300	33.86ij	2.0cd
200	100	94.28a	6.0a
	200	61.25d	4.0b
	300	33.71ij	1.0d
250	100	73.74b	4.0b
	200	42.19fg	1.0d
	300	28.33k	1.0d
300	100	39.44gh	2.0cd
	200	28.00k	2.0cd
	300	23.34l	0.5d

表 3 在 30 °C 下马占相思花粉不同处理花粉萌发率、花粉管长度以及花粉管条数

Table 3 Pollen germination rate, pollen tube length of *Acacia mangium* in different treatments at 30 °C

蔗糖浓度 Sucrose concentration (g · L ⁻¹)	硼酸浓度 Boric acid concentration (mg · L ⁻¹)	花粉萌发率 Pollen germination percentage (%)	花粉管长度 Pollen tube length (D)
50	100	32.97de	3.0ab
	200	29.46def	3.0ab
	300	21.83gh	1.0c
100	100	39.17bc	3.0ab
	200	44.03b	3.0ab
	300	31.36def	3.0ab
150	100	42.71b	3.0ab
	200	52.48a	3.0ab
	300	27.59df	2.0bc
200	100	57.68a	3.0ab
	200	44.71b	4.0a
	300	35.21cd	2.0bc
250	100	52.46a	3.0ab
	200	30.78def	1.0c
	300	26.36fg	1.0c
300	100	20.85h	2.0bc
	200	19.12h	0.5c
	300	31.54def	0.5c

表 4 3 株马占相思花粉萌发率比较分析

Table 4 Pollen germination rates of 3 plants of *Acacia mangium*

单株编号 Plant No.	花粉萌发率 Pollen germination percentage (%)
1	90.11a
2	82.31c
3	85.67b

综合以上分析,马占相思花粉离体萌发的最佳处理组合为 200 g · L⁻¹蔗糖、100 mg · L⁻¹硼酸、28 °C 培养温度,花粉萌发率为 94.28%。

2.3 马占相思花粉离体萌发特征

用最佳处理培养马占相思花粉,培养 3 h,花粉开始萌发;培养 6 h,花粉管生长到复合花粉粒长度的 3~4 倍(图 2:A);培养 9 h,花粉管数量为 4~5 条,花粉管前端开始膨大(图 2:B);培养 24 h,花粉管为 6~7 倍复合花粉粒的长度,有 6~7 条花粉管(图 2:C);再继续培养,花粉管基本停止生长。

2.4 马占相思不同单株花粉萌发差异

在马占相思种子园中选取 3 株马占相思,用花粉离体萌发的最佳处理组合(蔗糖浓度 200 g · L⁻¹、硼酸浓度 100 mg · L⁻¹、培养温度 28 °C)进行花粉离体萌发检测。培养 3 h 后,花粉开始萌发,最长花粉管长度为 3.0 D。

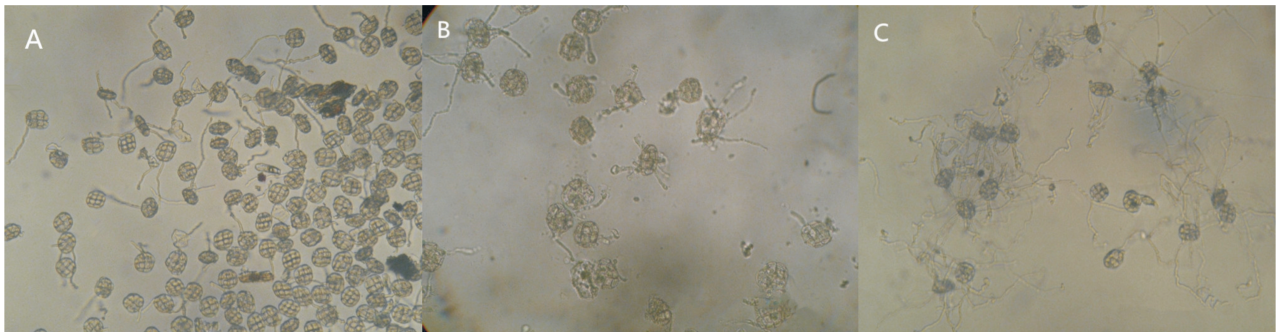


图 2 马占相思花粉培养萌发情况

Fig. 2 State of *Acacia mangium* pollen germination

A. 培养 6 h; B. 培养 9 h; C. 培养 24 h。

A. Cultured for 6 h; B. Cultured for 9 h; C. Cultured for 24 h.

3 株马占相思的花粉萌发率之间存在显著差异(表 4)。其中,1 号马占相思单株萌发率最高,为 90.11%;2 号马占相思单株的萌发率为 82.31%,是 3 株中最低的。从图 3 可以看出,随着培养时间增加,3 株马占相思的花粉萌发趋势相似,近乎线性上升。

由图 4 可知,马占相思 3 个单株的花粉,其花粉管的长度随时间的变化趋势相近。1 号、3 号单株的

花粉培养 3 h 后,花粉管长度可达 3 D;培养 24 h 后,花粉管长度趋于稳定,2 号、3 号单株的花粉管长度为 6 D。

3 讨论与结论

黄烈健等(2014)对马占相思开花生物学特征

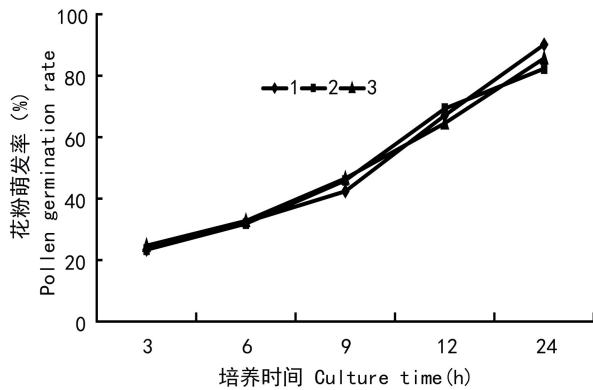


图 3 3 株马占相思花粉萌发率随培养时间的变化过程

Fig. 3 Pollen germination rate changing of 3 plants of *Acacia mangium* during the culture time

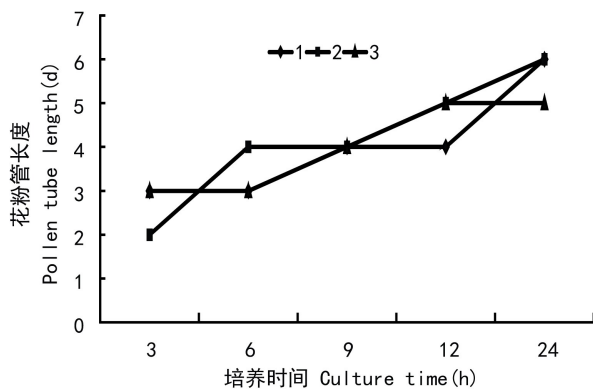


图 4 3 株马占相思花粉管长度随培养时间的变化过程

Fig. 4 Lengths of pollen tube changing of 3 plants of *Acacia mangium* during the culture time

的研究表明,马占相思花药在开花当天 9:00-12:00 开裂散粉。本研究跟踪观察发现,采摘之后的马占相思花穗在室内阴干,其花药在开花次日 10:00 大量开裂散粉。故本研究在开花当天 9:00 之前完成对新鲜花穗的采集,放入室内阴干,次日早晨 10:00 后收集花粉。

Kato et al (2012a) 的研究表明马占相思花粉颗粒小、难收集,采用聚乙烯塑料管可收集少量花粉,但采用该方法收集的马占相思花粉,受花药开裂的时间限制,收集花粉数量十分有限。本研究采用毛笔刷法,进行马占相思花粉收集,根据显微镜的观察结果表明,所收集的马占相思花粉数量大、纯度较高,适用于后续相关研究,是一种简便的相思花粉收集方法。

在花粉离体萌发过程中,蔗糖可以提供花粉管

形成所需的渗透压和能量,硼酸可以促进花粉管顶端细胞壁形成,从而促进花粉萌发和花粉管伸长 (Hedhly et al, 2005)。开展不同树种的花粉离体萌发研究时,需要根据其树种的不同,进行其相应的花粉萌发研究。尽管 Kato et al (2012b) 曾开展了马占相思花粉的离体萌发研究,但其并没有经过系统的试验设计来研究建立马占相思的花粉离体萌发体系,只是直接采用 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+1%琼脂, $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,来研究不同马占相思无性系之间的萌发率等的差异。该研究结果并不能为本研究提供直接有用的参考和借鉴。本研究通过对不同蔗糖浓度、硼酸浓度以及培养温度对马占相思花粉离体萌发的影响研究,筛选出马占相思花粉最佳离体萌发处理:蔗糖浓度为 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硼酸浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,培养温度为 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$,最高萌发率为 94.28%。在本研究中发现,当花粉培养的时间超过 24 h,开始出现真菌的污染,培养时间越长,真菌污染越严重。Beck-Pay (2012) 的研究也得出同样的结论。因此,本研究将马占相思花粉的培养时间确定为 24 h。对马占相思花粉离体萌发体系最佳处理研究,将为今后开展相思类其他树种的花粉相关研究提供参考。

Kato et al (2012b) 研究发现,马占相思不同无性系间的花粉活力存在着显著差异。这就提示我们,在进行以马占相思为父本的杂交工作时,应分别检测所选择的马占相思单株的花粉,选择具有较高萌发率的单株花粉进行授粉,才能保证成功率。因此,本研究在筛选出马占相思最佳离体萌发处理之后,对 3 株不同的马占相思单株进行花粉萌发率等检测分析结果表明,不同马占相思单株花粉的萌发率存在显著差异,1 号单株萌发率为 90.11%,2 号单株萌发率为 82.31%,3 号单株萌发率为 85.67%。本研究结果也证实了 Kato et al (2012b) 的结论。

为了今后能更好地开展马占相思人工授粉、杂交育种工作,我们除了选择生长好、材质优的亲本外,还需对其亲本进行花粉活力测定,择优而用;同时还需开展马占相思花粉贮藏条件、花粉活力随贮藏时间变化的研究。本研究结果为今后开展马占相思杂交育种研究奠定了重要的基础。

参考文献:

- AN XQ, WANG LL, LU DY, et al, 2011. Optimization of culture medium for testing *Apricot* pollen viability and study of the storability of the fruit [J]. *Xingjiang Agric Sci*, 48(11):1 979- (下转第 628 页 Continue on page 628)