

聚石斛花粉生活力及贮藏的研究

邓茜玫, 郑宝强, 郭欣, 王雁*

(国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:以聚石斛花粉为试材,研究了其花粉生活力的检测方法及贮藏方法。结果表明:(1)检测聚石斛花粉萌发适宜的培养基为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$, TTC 染色法不适用于聚石斛花粉生活力的检测;(2)聚石斛开花第 0~8 天的花粉生活力高于 65%,作为父本,授粉结实率高于 85%,显著高于蕾期和衰败期。(3)不同贮藏方法对聚石斛花粉生活力的影响较大,4℃ 冷藏干燥贮藏 80 d 后,花粉生活力下降为 0,而 4℃ 冷藏湿润贮藏、-20℃ 冷冻湿润贮藏和干燥贮藏 90 d 后,花粉生活力分别为 1.4%、21.7%、6.4%。经 -20℃ 冷冻湿润贮藏 90 d 后的花粉经杂交授粉后仍然能够正常结实,其他处理的结实率明显降低。

关键词:聚石斛;花粉生活力;可授性;花粉贮藏

中图分类号:S722

文献标识码:A

Pollen Viability and Preservation of *Dendrobium lindleyi*

DENG Xi-mei, ZHENG Bao-qiang, GUO Xin, WANG Yan

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The pollen of *Dendrobium lindleyi* was employed as experimental material to investigate the determination method of pollen viability and pollen storage. The results showed that: (1) The optimum culture medium was $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$. TTC staining was not adapted to detect pollen viability of *Den. lindleyi*. (2) The pollen germinating rate was over 65% during 0~8 days after blooming. As pollen parents, the male receptivity was over 85% during this period, which showed a better result than bud stage and droop stage. (3) Different storage methods had different effects on pollen viability of *Den. lindleyi*. The viability of pollen stored at dry condition in 4℃ declined to 0 after 80 days. However, after stored at humid condition in 4℃, freeze-wetting and freeze-drying in -20℃ for 90 days, the pollen viabilities were about 1.4%, 21.7%, and 6.4% respectively. As pollen parents, the pollen freeze-wetting stored in -20℃ for 90 days could still set seeds normally, while the setting rate was obviously decreased when using other storage methods.

Key words: *Dendrobium lindleyi*; pollen viability; receptivity; pollen storage

石斛兰 (*Dendrobium*) 是兰科石斛属植物的总称,与卡特兰 (*Cattleya*)、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*)、文心兰 (*Oncidium*) 同为世界上四大观赏洋兰^[1]。随着人们对观赏石斛消费需求的扩大,观赏石斛的育种已成为越来越关注的热点。至 2012 年,已有超过

10 000 种石斛兰杂交种在国际兰花品种登录机构上登录^[2]。现今世界洋兰发展趋向微型化,人们正努力从原生种或杂交种中选择这方面的资源,而石斛属植物中的矮小型原生种—聚石斛 (*Den. lindleyi* Stendel.) 正是这方面的代表。聚石斛又名“上树

收稿日期:2012-12-31

基金项目:“十二·五”农村领域国家科技计划课题(2013BAD01B0703);北京市园林绿化局设计项目(Y1HH200900304)

作者简介:邓茜玫(1990—),女,贵州都匀人,硕士研究生,主要从事园林植物应用。Email: tangtangmaymay331@gmail.com

* 通讯作者。E-mail: chwy8915@sina.com

虾”,肉质茎短小且密集簇生,花序悬垂,形如金币^[3],是石斛兰矮化育种的优良亲本,但聚石斛作为母本杂交结实率低,一般以聚石斛作为父本。至今,聚石斛作为父本登录的杂交种有7个^[2]。由于经常出现聚石斛与杂交对象花期不一致,所以需要聚石斛的花粉进行贮藏以解决杂交花期不遇的问题,但目前针对聚石斛花粉贮藏及花粉生活力检测方法未见相关的研究报道。

本研究采用液体培养基,研究了蔗糖、硼酸、钙三因素对花粉萌发的影响;比较了不同开花期的花粉生活力及可授性;对比了不同贮藏温度、不同贮藏方法、不同贮藏时间对花粉生活力的影响。以期找出最佳花粉离体萌发培养基,确定适宜的花粉采集时间,找出适合聚石斛花粉贮藏的方法,为有效开展石斛兰杂交育种工作提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于2011年6月到9月进行,试验材料为石斛兰原生种聚石斛,生长于中国林业科学研究院科研温室中。

1.2 试验方 法

1.2.1 花粉生活力的测定 单因子培养液的选择:将蔗糖培养液设0、50、100、150、200、250、300 g·L⁻¹7个质量浓度梯度,H₃BO₃、CaCl₂培养液各设20、40、60、80、100、150、200 mg·L⁻¹7个质量浓度梯度。每个处理将5~6个开花当天的新鲜花粉块放入指形管中,加入2 mL培养液,等花粉块在培养液中吸胀1 h后用玻璃棒沿管壁摩擦捣碎,25℃条件下恒温培养,光照强度为60 μmol·m⁻²·s⁻¹,24 h后在Olympus BH-2显微镜下观察花粉萌发情况。每处理重复3次,每个重复观察5个视野,每个视野观察至少100粒花粉。统计时,花粉管长度达到花粉粒直径以上视为萌发,统计萌发率。

在单因子试验的基础上,设计不同组合的4种培养液对花粉进行离体培养,统计萌发率。处理方法同上。

配制0.5% TTC染色液,每个处理将5~6个开花当天的新鲜花粉块放入指形管中,加入2 mL染色液,花粉块在染色液中吸胀1 h后用玻璃棒沿管壁摩擦捣碎,37℃暗培养12 h后观察染色情况,统计染色率。

1.2.2 不同开花期花粉生活力及可授性的比较 采集同株系不同开花期的聚石斛花粉—大蕾显色期

(早期),开花第0天(当天),开花第4天(盛花初期),开花第8天(盛花末期),开花第12天(衰败期),以花粉离体萌发率作为衡量花粉生活力的标准。将不同开花期的花粉放入最适培养液中进行离体培养,统计萌发率,处理方法同1.2.1。

将不同开花期的聚石斛花粉作为父本,以盛花初期的喉红石斛(*Den. christyanum* Rehb. f.)为母本进行杂交,以母本的结实率作为评价花粉可授性的标准。每处理授粉12朵花,不设重复。在授粉1个月后进行统计结实率。

1.2.3 低温贮藏对花粉生活力的影响 取盛花末期的聚石斛新鲜花粉块,除去药帽、杂质,分别采用湿存和干存2种方法进行贮藏,其中,湿存指将新鲜花粉块直接放入指形管中,干存指将新鲜花粉块与硅胶粒干燥剂混合后放入指形管中,分别进行4℃冷藏和-20℃冷冻贮藏,并分别在0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 d采用离体萌发法检测花粉生活力。以不同条件下贮藏90 d后的花粉作父本对盛花初期的杂种石斛兰(*Den. little Green Apple*)进行人工授粉,每处理授粉12朵花,不设重复。在授粉1个月后进行统计结实率。

2 结果与分 析

2.1 花粉生活力的测定

培养液中蔗糖因子的质量浓度对花粉萌发具有较大的影响(表1)。当蔗糖质量浓度为100 g·L⁻¹时,花粉萌发率最高,达到68.8%(图1),而在蒸馏水中培养的花粉萌发率仅为8.5%,当蔗糖质量浓度上升到300 g·L⁻¹时,花粉萌发率仅为4.2%,高质量浓度蔗糖导致大部分花粉原生质体脱水发生质壁分离(图2)。单因子H₃BO₃质量浓度为100 mg·L⁻¹时,花粉萌发率最高(37.4%),并且花粉管能够快速生长(图3)。单因子CaCl₂对花粉萌发率影

表1 聚石斛花粉萌发的单因子试验结果

蔗糖		H ₃ BO ₃		CaCl ₂	
ρ(蔗糖)/ (g·L ⁻¹)	萌发率/ %	ρ(H ₃ BO ₃)/ (mg·L ⁻¹)	萌发率/ %	ρ(CaCl ₂)/ (mg·L ⁻¹)	萌发率/ %
0	8.5f	20	14.1d	20	10.8b
50	45.5c	40	18.7cd	40	9.5bc
100	68.8a	60	22.5c	60	12.1b
150	60.4b	80	31.6b	80	16.4a
200	32.2d	100	37.4a	100	11.2b
250	20.0e	150	25.5c	150	10.4b
300	4.2g	200	6.4e	200	8.9c

注:数据后不同小写字母表示差异显著,相同小写字母表示差异不显著(P>0.05)。下同。

响不大,在质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萌发率能达到 16.4%,但 CaCl_2 培养液可以有效的抵消花粉萌发积聚效应,便于花粉观察和计数(图4)。

在单因子试验基础上,选取各单因素的最佳质量浓度,设计以下4种不同组合的培养液:

- (1) 蔗糖 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
- (2) 蔗糖 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{H}_3\text{BO}_3 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- (3) 蔗糖 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{CaCl}_2 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- (4) 蔗糖 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{H}_3\text{BO}_3 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{CaCl}_2 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

4种培养液中花粉萌发情况见表2。

表2 不同培养液中聚石斛花粉的生活力

培养液号	观察花粉数/粒			萌发数/粒			花粉生活力/%
	处理1	处理2	处理3	处理1	处理2	处理3	
(1)	578	603	552	392	442	358	$68.78 \pm 3.10\text{b}$
(2)	618	662	543	457	523	451	$78.50 \pm 3.15\text{a}$
(3)	553	548	592	386	384	401	$69.17 \pm 0.98\text{b}$
(4)	576	505	544	451	378	409	$76.18 \pm 1.46\text{a}$

表2所示:聚石斛花粉在培养液2中的花粉生活力最高,为78.50%,在培养液4中的花粉生活力次之,为76.18%;培养液1和培养液3中的萌发率较低,分别为68.78%和69.17%;培养液2与培养液4的聚石斛花粉生活力差异不显著,但由于培养液4加入了 CaCl_2 可以有效的抵消花粉萌发积聚

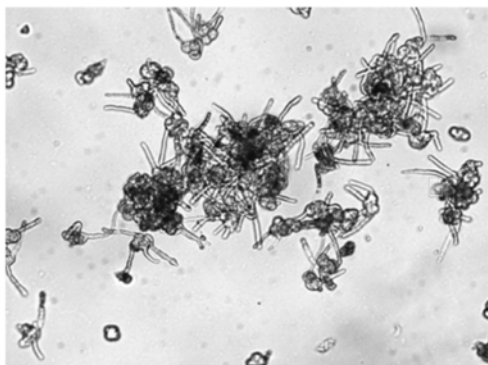


图1 蔗糖单因素培养液中聚石斛花粉萌发情况



图2 高浓度蔗糖培养液中聚石斛花粉的质壁分离现象



图3 硼酸单因素培养液中聚石斛花粉萌发情况

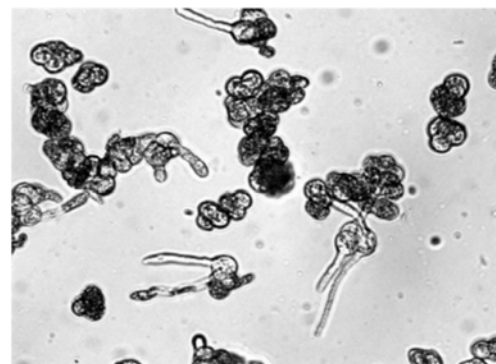


图4 CaCl_2 单因素培养液中聚石斛花粉萌发情况

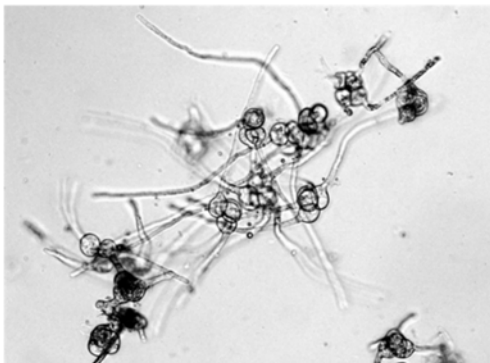


图5 最佳培养液中聚石斛花粉萌发情况

择培养液4(蔗糖 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{H}_3\text{BO}_3 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{CaCl}_2 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)作为检测聚石斛花粉生活力的最佳离体萌发培养液(图5)。

采用 TTC 染色法,经过 12 h 后部分花粉粒被染成浅红色,染色与未被染色的花粉粒颜色差异不明显,无法准确的判断花粉有无生活力(图6)。

2.2 不同开花期的花粉生活力及花粉可授性

在温室环境条件下,聚石斛单花从开放到凋落约经历 12 d。不同开花期的花粉生活力和可授性都具有一定的差异(图7)。聚石斛大蕾显色期的花粉生活力为 57.8%,随后花粉生活力逐渐升高,开花第 8 天

效应,便于统计时对花粉粒和花粉管计数,因此,选

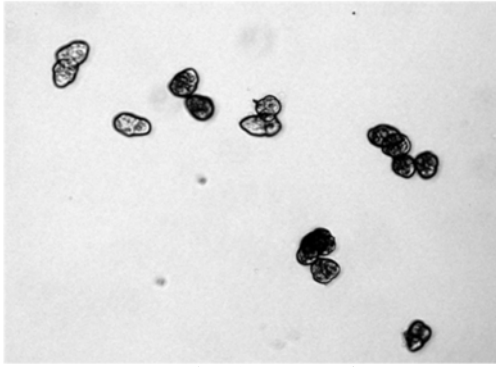


图6 聚石斛花粉的TTC染色情况

的花粉生活力最高(80.5%),随后花粉生活

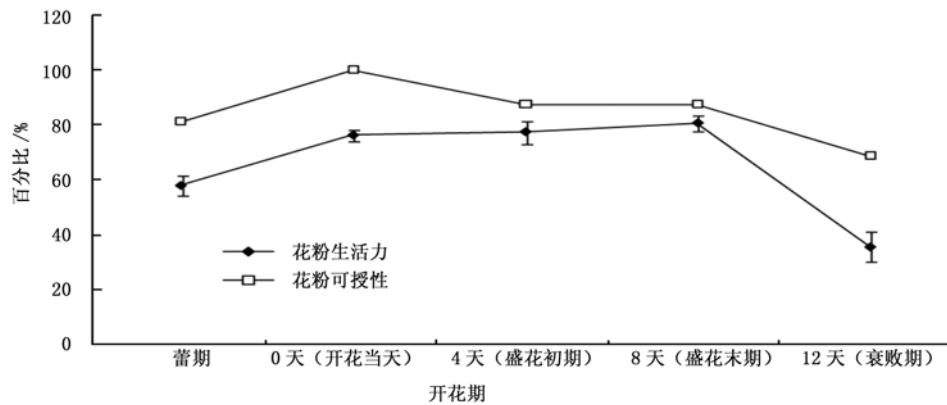


图7 不同开花期花粉生活力及可授性

2.3 低温贮藏对花粉生活力和可授性的影响

表3表明:随着贮藏时间的延长,花粉块生活力逐渐丧失。花粉在-20℃冷冻湿润贮藏的条件下生活力下降最慢,贮藏90d后生活力仍有21.7%,授粉结实率达到83.3%;在-20℃冷冻干燥贮藏条件下,花粉经90d贮藏后,花粉生活力降至6.4%,

力下降,开花第12天的花粉生活力最低(35.5%)。

在聚石斛整个花期内花粉块均保持较高的可授性,母本结实率都保持在65%以上,其中,利用大蕾显色期到盛花末期(开花第8天)这段时期内的花粉进行授粉后,母本的结实率都稳定大于80%,衰败期(开花第12天)的花粉相对可授性较低(68.8%)。由图7可以看出:花粉生活力和可授性在整个开花期内的变化趋势基本保持一致,花粉的生活力和可授性在蕾期和衰败期较低,在开花当天至盛花末期相对较高。

授粉结实率在25%;花粉在4℃冷藏湿润贮藏条件下贮藏90d后,花粉生活力仅有1.4%,授粉结实率为16.7%;而在4℃冷藏干燥贮藏条件下,贮藏80d后的花粉生活力即下降为0,贮藏90d后的花粉仍存在一定的授粉结实率(8.3%)。

表3 不同贮藏条件下贮藏不同时间的聚石斛花粉生活力

贮藏时间/d	花粉的生活力/%			
	4℃冷藏湿润贮藏	4℃冷藏干燥贮藏	-20℃冷冻湿润贮藏	-20℃冷冻干燥贮藏
0	76.2a	76.2a	76.2a	76.2a
10	72.4a	61.5b	77.4a	51.2b
20	66.8ab	48.0c	69.5a	39.3c
30	58.1b	42.5c	59.8bc	36.4c
40	54.8b	24.4d	60.6b	23.2d
50	36.7c	11.7e	55.7bc	21.6d
60	22.1d	10.8e	54.4c	15.4de
70	14.2e	6.6e	32.6d	17.8d
80	6.8e	0.0f	24.5e	10.5e
90	1.4f	0.0f	21.7e	6.4e

3 结论与讨论

由于兰科植物花粉块不易分散,与固体培养基相比,液体培养基能提高花粉离体萌发的效率。另

外,多数研究都发现蔗糖、硼酸和钙对兰科植物花粉的萌发起关键作用,其中,蔗糖浓度是最重要且独立的因素,根据植物种类的不同,萌发所需要的蔗糖浓度为5%~30%^[4];而其它因素的浓度由于植物种

类的不同也会有明显的差异。郑宝强等^[5]认为,卡特兰最适合的培养液为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$;郭丽霞等^[6]认为, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 的培养液最适合野生墨兰花粉的离体萌发。本研究认为,适合聚石斛花粉萌发的培养液为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$,蔗糖对聚石斛花粉萌发起关键作用。另外,硼酸能有效的促进花粉管的伸长,而 CaCl_2 的添加可以明显抵消花粉积聚萌发效应。尽管本研究发现是否添加钙对萌发率影响不大,但是加入 CaCl_2 可抵消花粉的积聚萌发效应,所以建议培养液应该添加 CaCl_2 ,以便更准确地进行花粉的观察和计数。

部分兰科植物拥有四合花粉结构,本研究观察到聚石斛花粉块在培养液中分离出许多四合花粉,而四合花粉不再分散成花粉单粒。有研究表明,造成四合花粉互不分离的原因在于类脂膜的包裹、四合花粉中有内壁形成的桥、花粉之间形成胞质通道和不完全细胞壁等^[7]。本研究观察到聚石斛四合花粉通常四个花粉单粒一起萌发或都不萌发,原因可能是由于四合花粉内的花粉单粒发育程度相同,而四合花粉之间发育不同步,还有可能因为已丧失活力的花粉单粒产生的次生代谢物质会强烈影响到同一个四合花粉中的其它花粉单粒,造成四个花粉单粒同时失活^[8]。

TTC 染色法是根据花粉粒的呼吸酶活性来判断花粉生活力的一种快速简便的检测方法,用该方法检测牡丹、芍药等新鲜花粉生活力的准确性很高^[9-10];但可能是由于兰科植物的花粉块有类脂膜的包裹而不易分散,且花粉壁相对较厚,导致染色剂无法在短时间内使兰科植物的花粉着色^[11]。本研究通过延长染色时间、增加 TTC 染色液浓度等方法仍然无法对花粉粒进行清楚的染色,因此,认为在实际应用中 TTC 染色法不适用于聚石斛花粉生活力的检测。

李振坚等^[12]针对重唇石斛 (*Den. hercoglossum* Rehb. f.) 进行研究时发现,花开第4天后花粉才发育饱满,重唇石斛花开第5~12天花粉萌发率稳定大于70%。本研究发现,聚石斛盛花末期(开花第8天)的花粉生活力最高,且花粉生活力基本与花粉可授性保持一致。衰败期和蕾期的生活力及可授性都相对较低,而其他开花期(0~8 d)的花粉生活力和可授性都相对较高,因此,聚石斛开花当天到盛花末期(0~8 d)适合作为父本进行花粉采集。

有研究认为,兰科植物花粉外部的类脂膜包裹使

兰科花粉粒不易受到外界干扰,能忍耐干燥,寿命长^[13]。在25℃常温条件下,新鲜的聚石斛花粉通常在4 d后完全丧失生活力。本研究发现,无论是干燥或湿润贮藏,-20℃冷冻条件比4℃冷藏条件更适合聚石斛花粉的贮藏;同时本研究发现,聚石斛花粉更适合湿润贮藏,这与欧阳英针对密花石斛(*Den. densiflorum* lindl.)的研究相一致^[14],推测石斛兰花粉脱水后不容易吸水膨大发生水合,直接导致花粉生活力的丧失。在-20℃冷冻湿润贮藏的聚石斛花粉,能在3个月内保持较高的生活力且不影响授粉结实率,因此-20℃冷冻湿润贮藏是聚石斛花粉有效的贮藏方法。另外,本研究发现,聚石斛花粉生活力检测为0的情况下,仍存在较低的授粉结实率,这说明离体萌发法检测得出的花粉生活力略比真实值低。

参考文献:

- [1] 王雁,李振坚,彭红明. 石斛兰资源生产应用[M]. 北京:中国林业出版社,2007:11.
- [2] The International Orchid Register. The Royal Horticultural Society Horticultural Database [DB/OL] [2012-12-25]. <http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/parentageresults.asp>.
- [3] 吉占和,陈心启,罗毅波,等. 中国植物志:第19卷[M]. 北京:科学出版社,2006:78.
- [4] Pacini E. Orchid pollen dispersal units and reproductive consequences [C]// Tiiu K, Arditti J, Sek M W. Orchid biology: reviews and perspectives X. Springer-Verlag New York Inc, 2009: 185-194.
- [5] 郑宝强,王雁,彭镇华,等. 杂种卡特兰花粉萌发和花粉贮藏性研究[J]. 热带亚热带植物学报,2012,20(1):13-18.
- [6] 郭丽霞,莫饶. 海南原生墨兰花粉萌发试验初报[J]. 热带农业科学,2007,23(6):594-597.
- [7] 胡适宜,杨坚. 春兰花粉壁的结构及其与花粉粘合的关系[J]. 植物学报,1989,31(6):414-421.
- [8] Pritchard H W, Prendergast F G. Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen [M]// Pritchard H W. Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management. Cambridge: Cambridge University Press, 1989: 1-16.
- [9] 律春燕,王雁,朱向涛,等. 黄牡丹花粉生活力测定方法的比较研究[J]. 林业科学研究,2010,23(2):272-277.
- [10] 朱惜晨. 芍药花粉生活力测定与杂交亲本选择初步研究[J]. 福建林业科技,2007,34(2):121-123.
- [11] 李枝林,王玉英,王卜琼. 兰花远缘杂交育种技术研究[J]. 中国野生植物资源,2007,26(4):53-56.
- [12] 李振坚,亢秀萍,王雁. 重唇石斛传粉生物学与显微研究动态[J]. 西北植物学报,2009,29(9):1804-1810.
- [13] 吴应祥. 中国兰花[M]. 北京:中国林业出版社,1993:106-107.
- [14] 欧阳英. 几种兰科花卉的离体保存技术研究[D]. 北京:北京林业大学,2010.