

杂种卡特兰花粉萌发和花粉贮藏性研究

郑宝强¹, 王雁^{1*}, 彭镇华¹, 李莉²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要: 以杂种卡特兰品种‘绿世界’(*Rhyncholaeliocattleya* Sung Ya Green ‘Green World’)的新鲜花粉为试材, 采用正交试验比较了蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 对花粉萌发的影响。结果表明, 适宜的花粉培养基为: 蔗糖 100 g L^{-1} + H_3BO_3 40 mg L^{-1} + $CaCl_2$ 150 mg L^{-1} 。不同贮藏方法对杂种卡特兰花粉萌发率的影响较大, 4°C 低温湿润贮藏 30 d 后, 花粉萌发率仅为 3.5%, 而 4°C 低温干燥贮藏、 -20°C 冷冻湿润和干燥贮藏 720 d 后, 花粉仍然具有较高的活力, 花粉萌发率均达 32.5% 以上, 且对授粉结实率没有明显影响。杂种卡特兰的授粉最佳时期为开花后 0~8 d, 花粉块在整个花期均保持较高的活性。

关键词: 杂种卡特兰; 花粉活力; 花粉贮藏; 可授性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.003

Germination and Preservation of *Rhyncholaeliocattleya* Pollen

ZHENG Bao-qiang^{1*}, WANG Yan^{1*}, PENG Zhen-hua¹, LI Li²

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The effects of sucrose, boron and calcium on the germination of *Rhyncholaeliocattleya* Sung Ya Green ‘Green World’ pollen were studied by orthogonal design experiment. The results showed that the optimum culture medium for pollen germination was 100 g L^{-1} sucrose + 40 mg L^{-1} H_3BO_3 + 150 mg L^{-1} $CaCl_2$. Different storage methods had different effects on pollen viability of ‘Green World’. The pollen germination rate was only 3.5% humid stored under 4°C for 30 days. However, after dry stored in 4°C , freeze-wetting and freeze-drying stored in -20°C for 720 days, respectively, the pollen germination rate still maintained at high level, reaching up to above 32.5%, and there was not effect on seed setting. The best time for pollination was 0–8 days after flowering and the pollinium had high vitality during whole florescence.

Key words: *Rhyncholaeliocattleya*; Pollen viability; Pollen storage; Receptivity

卡特兰(*Cattleya hybrida*)为兰科(Orchidaceae)附生兰类, 原产于美洲热带和亚热带地区, 其花型硕大多姿、气息芬芳可人, 色彩丰富, 有“洋兰之王”之称^[1]。目前报道的卡特兰约有 110 种(<http://apps.kew.org/wcsp/home.do>), 且已育成大量的杂交种, 特别是它们与近缘属成功进行了属间杂交, 现以卡特兰为直接亲本的杂交种已达 35933 个, 形成了庞大的卡特兰家族品种^[2]。由于各种类卡特兰花期不一致, 在杂交育种过程中, 常出现花期不遇, 需要对

采集的花粉块进行贮藏, 贮藏后花粉生活力对杂交育种的成功与否具有重要影响。本文采用液体培养基, 研究了蔗糖、硼、钙、镁、钾等因素对杂种卡特兰花粉萌发的影响, 同时比较了不同贮藏方法对花粉生活力的影响, 以及花朵开放持续时间与授粉的关系, 以期找出适宜花粉萌发及生活力测定的培养液配方, 为有效开展卡特兰杂交育种研究提供技术支撑。

收稿日期: 2011-04-07 接受日期: 2011-06-01

基金项目: 中央级公益性科研院所专项基金(2724-14); 北京市园林绿化局计划项目(Y1HH200900304)资助

作者简介: 郑宝强(1981~), 男, 山东淄博人, 主要从事园林植物与观赏园艺研究, email: newpeasant@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: wangyan@caf.ac.cn

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2008 年 11 月到 2010 年 12 月进行,供试品种为杂种卡特兰 ‘绿世界’ *Rhyncholaeliocattleya* Sung Ya Green ‘Green World’,能够自花授粉结实。温室中 11、12 月份的平均昼/夜温度为 23℃/20℃,平均昼/夜空气湿度为 30%/40%。

1.2 培养液的选择

蔗糖培养液设置 7 个浓度梯度:0、50、100、150、200、250、300 g L⁻¹, H₃BO₃、CaCl₂、MgSO₄、KNO₃ 培养液各设置 7 个浓度梯度:20、30、40、50、100、200、300 mg L⁻¹,分别进行单因子筛选。培养方法是:每种培养液取 5 mL,加入 4 个花粉块,装入指形管内,在 25℃ 的光照培养箱内培养,光照强度为 60 μmol m⁻²s⁻¹。每隔 1 h 观测 1 次,用移液器分装培养物在双孔凹玻片上,每孔 200~250 μL,每种培养液观测 5 个玻片 10 个凹孔,每个凹孔观察 100 粒花粉,共观测 1000 粒花粉。统计时,花粉管长度大于花粉粒直径视为有生命力的花粉,计算花粉萌发率,萌发率=已萌发的花粉粒数/花粉粒总数×100%。

在单因子试验的基础上,选取对杂种卡特兰花粉萌发影响较大的 3 个因子进行正交试验设计。培养方法同上。

1.3 贮藏方法对花粉萌发率的影响

采集开花第 1 天的杂种卡特兰新鲜花粉块,采用湿存和干存两种方法,湿存是将新鲜花粉块直接放入指形管中,干存是将新鲜花粉块与硅胶粒干燥剂充分混合后放入指形管中,分别进行 4℃ 冷藏和

-20℃ 冷冻贮藏,并分别在贮藏后 0、15、30、60、90、180、360、720 d 采用培养液法测定花粉萌发率。在花粉贮藏 720 d 后对杂种卡特兰进行人工自花授粉,1 个月后统计结实率。

1.4 开花期花朵和花粉块的可授性

取开花第 1 天的新鲜花粉块对开花后 0、2、4、6、8、10、12、14、16 d 的花朵进行授粉,每个花朵授 2 个花粉块。同时取开花后 0、2、4、6、8、10、12、14、16 d 的花粉块对第 1 天开花的花朵进行授粉,每个花朵授 2 个花粉块。每个处理授 24 朵花,不设重复。授粉 1 个月后统计结果率。

2 结果和分析

2.1 花粉萌发的单因子试验

培养液中蔗糖浓度对杂种卡特兰花粉的萌发有一定的影响(表 1)。蔗糖浓度为 100 g L⁻¹ 时,花粉萌发率最高(41.2%),浓度为 150 g L⁻¹ 的次之(32.4%),而对照的仅为 1.4%,说明花粉萌发需要消耗能量;当蔗糖浓度为 200、250、300 g L⁻¹ 时,花粉的萌发率较低,分别为 17.6%、12.4%、5.5%,部分花粉原生质体出现脱水现象,说明蔗糖浓度过高导致原生质体脱水,花粉萌发受到抑制。H₃BO₃ 对花粉的萌发影响较大,加入 H₃BO₃ 后花粉管生长快且长,H₃BO₃ 的最佳浓度为 40 mg L⁻¹,萌发率为 16.8%,浓度高于 50 mg L⁻¹ 时,萌发率快速下降。CaCl₂ 对杂种卡特兰花粉的萌发也有影响,当 CaCl₂ 浓度为 100 mg L⁻¹ 时萌发率最高,达 13.4%;MgSO₄ 和 KNO₃ 浓度分别为 50 mg L⁻¹ 和 100 mg L⁻¹ 时的萌发率最高,分别为 7.2% 和 6.4%。

表 1 杂种卡特兰花粉萌发单因子试验

Table 1 Pollen germination of ‘Green World’ in single-factor test

蔗糖 (g L ⁻¹)	萌发率 (%) Germination rate	H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	萌发率 (%) Germination rate	CaCl ₂ (mg L ⁻¹)	萌发率 (%) Germination rate	MgSO ₄ (mg L ⁻¹)	萌发率 (%) Germination rate	KNO ₃ (mg L ⁻¹)	萌发率 (%) Germination rate
0	1.4Ef	20	2.3Ff	20	2.4Ee	20	1.9Ee	20	1.8De
50	14.2CDd	30	8.1Bb	30	5.0Dd	30	4.2Cc	30	2.4Dd
100	41.2Aa	40	16.8Aa	40	6.1Cc	40	5.3Bb	40	4.3Cc
150	32.4Bb	50	7.5Cc	50	6.4Cc	50	7.2Aa	50	5.6Bb
200	17.6Cc	100	5.0Dd	100	13.4Aa	100	3.6Dd	100	6.4Aa
250	12.6Dd	200	4.1Ee	200	8.6Bb	200	3.4Dd	200	2.1Dde
300	5.5Ee	300	1.2Gg	300	2.5Ee	300	1.5Ef	300	0.9Ef

数据后不同大写字母和小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)。下表同。
Data followed different capital and small letters indicate significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same as following Tables.

2.2 花粉萌发的正交试验

在单因子试验的基础上,选取对杂种卡特兰花粉萌发影响较大的蔗糖、 H_3BO_3 和 CaCl_2 3 个因子,各设 5 水平,设计正交试验(表 2)。结果表明,蔗糖的作用极显著, H_3BO_3 次之, CaCl_2 是在蔗糖和 H_3BO_3 的主导作用下起辅助作用。杂种卡特兰花粉萌发率的平方和以 100 g L^{-1} 蔗糖、 40 mg L^{-1} H_3BO_3 和 150 mg L^{-1} CaCl_2 最高,因此,3 因子的最佳组合为蔗糖 100 g L^{-1} + H_3BO_3 40 mg L^{-1} + CaCl_2

150 mg L^{-1} ,但该组合并未设计在正交试验中,表 2 中的最佳组合为蔗糖 100 g L^{-1} + H_3BO_3 40 mg L^{-1} + CaCl_2 50 mg L^{-1} ,萌发率达 64.4%。为了验证正交试验的结论,再次用蔗糖 100 g L^{-1} + H_3BO_3 40 mg L^{-1} 分别加入 50、100、150 mg L^{-1} 的 CaCl_2 配制成 3 种培养液培养花粉,萌发率分别为 63.6%、64.1% 和 68.7%。所以,杂种卡特兰花粉培养的最佳组合为蔗糖 100 g L^{-1} + H_3BO_3 40 mg L^{-1} + CaCl_2 150 mg L^{-1} 。

表 2 杂种卡特兰花粉萌发的正交试验
Table 2 Pollen germination of ‘Green World’ in orthogonal test

序号 No.	蔗糖 (g L ⁻¹) Sucrose	H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	CaCl ₂ (mg L ⁻¹)	萌发花粉数 Number of germinated pollen	萌发率 (%) Germination rate
1	0	0	0	12	1.2
2	0	20	50	28	2.8
3	0	40	100	176	17.6
4	0	60	150	170	17.0
5	0	80	200	155	15.5
6	50	0	100	160	16.0
7	50	20	150	333	33.3
8	50	40	200	420	42.0
9	50	60	0	394	39.4
10	50	80	50	252	25.2
11	100	0	200	418	41.8
12	100	20	0	488	48.8
13	100	40	50	644	64.4
14	100	60	100	538	53.8
15	100	80	150	410	41.0
16	150	0	50	353	35.3
17	150	20	100	423	42.3
18	150	40	150	539	53.9
19	150	60	200	342	34.2
20	150	80	0	364	36.4
21	200	0	150	243	24.3
22	200	20	200	234	23.4
23	200	40	0	239	23.9
24	200	60	50	176	17.6
25	200	80	100	139	13.9
MS	103.03	204.6	22.3		
F	27.00**	4.93*	0.50		

$\alpha=0.01$ 。每处理的花粉数均为 1000。
 $\alpha=0.01$. The number of pollen in each treatment is 1000.

2.3 培养时间对花粉萌发观察的影响

用优选出的最佳培养液 100 g L⁻¹ + H₃BO₃ 40 mg L⁻¹ + CaCl₂ 150 mg L⁻¹ 培养花粉块,3 h 后就可以观察到花粉管的萌发,但此时萌发量小,而且花

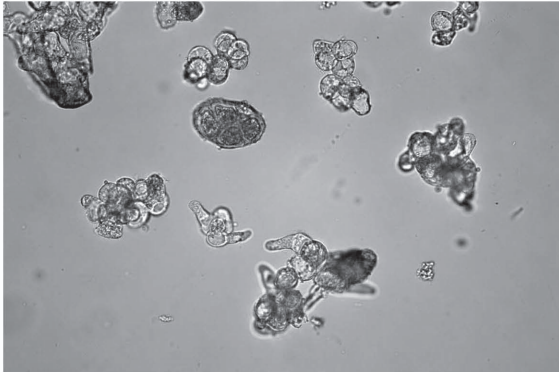


图 1 培养 3 h 后,花粉开始萌发,但相互粘连。
Fig. 1 Pollen began to germinate, but adhered each other after cultured 3 hours.

2.4 贮藏方法对花粉萌发的影响

采用 4 种方法贮藏杂种卡特兰花粉块,并用培养液法测定贮藏花粉的萌发率(表 3)。结果表明:4℃湿润贮藏 15 d 后的花粉萌发率下降较快,仅为 33.6%,贮藏 30 d 后,花粉的萌发率下降到 3.5%,随着贮藏时间的延长,花粉逐渐丧失活力。而其他 3 种贮藏条件下花粉萌发率下降得较慢,贮藏 60 d

表 3 不同贮藏条件下杂种卡特兰花粉的萌发率(%)

Table 3 Pollen germination rate (%) of ‘Green World’ under different storage conditions

贮藏时间 Storage days	4℃贮藏 Storage at 4℃		-20℃贮藏 Storage at -20℃	
	湿润 Wet	干燥 Dry	湿润 Wet	干燥 Dry
0	67.6Aa	67.6Aa	67.6Aa	67.6Aa
15	33.6Bb	62.2Aa	63.5Aa	65.4Aa
30	3.5Bb	58.4Aa	61.7Aa	62.6Aa
60	0Bc	56.6Ab	58.1Aab	60.3Aa
90	0Bb	56.4Aa	57.3Aa	57.4Aa
180	0Bc	52.8Aab	50.5Ab	53.9Aa
360	0Bb	45.7Aa	44.5Aa	47.2Aa
720	0Cd	36.7ABb	32.5Bc	40.4Aa

2.5 开花期花朵和花粉块的可授性

在温室条件下,杂种卡特兰的平均花期为 14 ~ 16 d。由图 3 可以看出,杂种卡特兰在开花初期,花朵的可授性比较高,花朵的结实率在 90% 以上。但随后花朵的可授性逐渐下降,在开花 8 d 后,花朵结

粉相互粘连,不利于观察计数(图 1)。在培养 24 h 后,花粉块能够充分溶解在培养液中,花粉也大量萌发(图 2)。以后随着培养时间的延长,营养液中微生物含量逐渐增加,对观察效果产生影响。



图 2 培养 24 h 后,花粉块溶解,花粉大量萌发。
Fig. 2 Pollinium dissolved and a lot of pollen germinated after cultured 24 hours.

后,花粉的萌发率仍然在 56% 以上,贮藏 720 d 后,花粉仍然具有较高的萌发率,尤其是-20℃冷冻干燥条件下,花粉的萌发率仍高达 40.4%。对杂种卡特兰自花授粉试验表明,用经 4℃干燥贮藏、-20℃湿润和干燥贮藏 720 d 的花粉进行授粉,结实率仍然高达 90% 以上。

实率迅速下降,开花后 12 d,结实率只有 4.17%,随后花朵不再具有结实能力。

在杂种卡特兰的整个花期内,花粉块均保持较高的可授性,结实率都在 90% 以上。表明花期的长短对花粉的生活力影响作用不大。

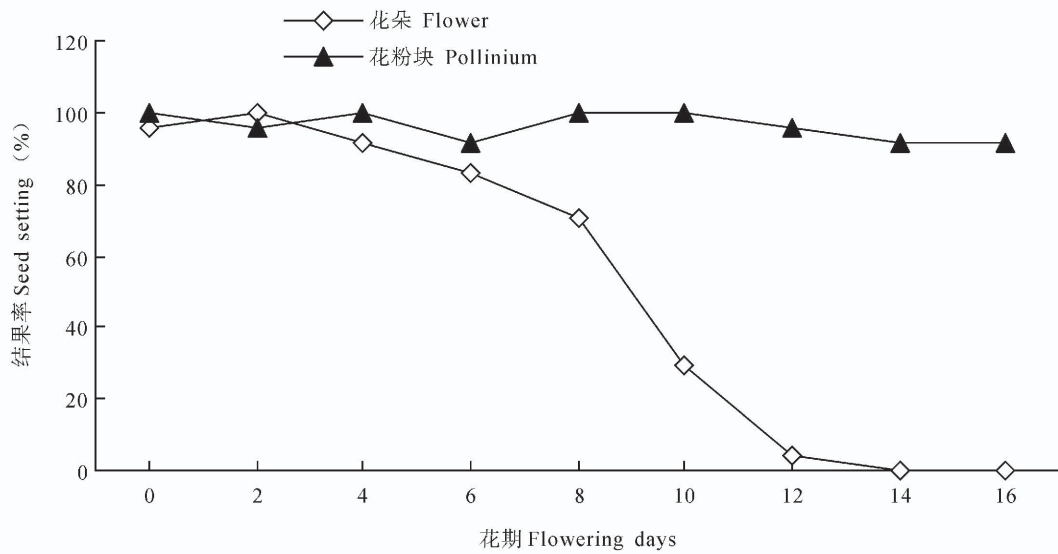


图 3 开花期花朵和花粉块的可授性
Fig. 3 Flower and pollinium receptivities of ‘Green World’ during florescence

3 结论和讨论

兰科植物的花粉外面包裹类脂膜,使得花粉粒粘连成花粉块,这减缓了花粉的萌发速度^[3],大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)花粉块在固体培养基上培养 4 d 后才开始萌发^[4],台湾金线莲(*Anoectochilus formosanus*)花粉块固体培养时,需要 48 h 才能萌发^[5]。本研究采用液体培养基,3 h 后就可以观察到花粉的萌发现象,24 h 后花粉块完全溶解在培养液中,可清晰地观察到花粉的萌发,所以使用液体培养基能够大大提高效率。

国内外关于其他兰科植物花粉萌发培养基的研究表明,添加 3% ~10% 蔗糖对花粉萌发的效果最好,而且蔗糖浓度是影响兰花花粉在人工培养基上萌发的重要而且独立的因素,蔗糖在花粉萌发过程中,除了能够为花粉提供能源外,还能起到调节渗透压的作用,但若浓度过高,则会造成原生质体脱水,反而抑制了花粉萌发^[4-8]。本研究结果也表明,蔗糖是影响杂种卡特兰花粉萌发的主要因子,当蔗糖浓度为 100 g L⁻¹时最有利于花粉的萌发。

硼能促进糖的吸收与代谢,并促进花粉管的伸长生长^[9]。Ca²⁺ 主要影响花粉萌发速度和花粉管的生长速度^[10]。本研究结果表明,杂种卡特兰花粉萌发的适宜 H₃BO₃ 浓度为 40 mg L⁻¹,CaCl₂ 浓度为 100 mg L⁻¹,H₃BO₃ 和 CaCl₂ 的浓度过高和过低,都不利于花粉管的萌发和生长。当钙和硼酸与糖共同存在时,糖起主要作用,硼酸起次要作用,钙处于附属地位,使用液体培养基:蔗糖 100 g L⁻¹ +

H₃BO₃ 40 mg L⁻¹ + CaCl₂ 150 mg L⁻¹,杂种卡特兰花粉的萌发率达到 68.7%。

有研究表明,花粉的贮藏过程中保持较低的相对湿度,能够使花粉代谢受到抑制,酶的活性减弱,呼吸作用降低,从而能够使花粉长时间的维持生活力,同时低温也是延长花粉贮藏期限的重要因子^[11]。对猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*)^[12]、地锦 (*Parthenocissus tricuspidata*)^[13]、木麻黄 (*Casuarina cunninghamiana*)^[14]、君子兰 (*Clivia miniata*)^[15]、朱顶红 (*Hippeastrum rutilum*)^[16]、芍药 (*Paeonia lactiflora*)^[17]、玫瑰 (*Rosa rugosa*)^[18] 等的研究表明,花粉的保存期限因植物种类和贮藏条件的不同而存在较大差异,同一种植物,花粉的保存温度越低,保存效果越好,而相同条件下,干燥保存的效果要优于湿润保存。芍药花粉在超低温(-196℃)保存 4 年后,花粉萌发率普遍高于冷冻(-20℃)保存和新鲜花粉,其仍然具有较高的生活力和授粉结实率^[17];猕猴桃花粉在常温条件下平均可保存 5 d,0℃ ~5℃ 干燥贮藏可保存 90 d,-15℃ ~0℃ 贮藏最多可保存 365 d^[12]。本研究结果表明,杂种卡特兰花粉在 4℃ 低温湿润贮藏,其生活力迅速下降,仅能维持 30 d 左右。但分别经 4℃ 低温干燥贮藏、-20℃ 冷冻湿润和-20℃ 冷冻干燥贮藏 720 d 后,花粉仍然具有较高的生活力,其中以-20℃ 冷冻干燥贮藏的花粉萌发率最高,高达 40.4%,显著高于其他贮藏方法,同时这 3 种方法贮藏花粉 720 d 后,人工授粉的结实率仍然高达 90% 以上。因此,在杂种

卡特兰杂交育种过程中,如果遇到花期不遇或需要异地授粉,可以将花粉块先干燥再经 4℃ 低温冷藏处理,或者直接对花粉块进行 -20℃ 冷冻保存,均可使杂种卡特兰花粉在 1-2 年内保持较高的生活力。

在杂种卡特兰整个花期内,花粉块均能保持较高的活力,但花朵的可授性只在开花后的 0~8 d,此后其可授性迅速降低。因此,卡特兰杂交育种时,母本的授粉必须在开花后 8 d 内进行。

参考文献

- [1] 胡松华. 热带兰花 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 21-45.
- [2] The International Orchid Register. The Royal Horticultural Society Horticultural Database [DB/OL] [2011-06-01]. <http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/parentageresults.asp>
- [3] 吴应祥. 中国兰花 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 106-107.
- [4] Wang L M(王利民), Wang S Q(王四清), Wang C X(王彩霞), et al. The imitative pollen budding experimentation of *Cymbidium hybridum* [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2005, 21(4): 122-124, 161. (in Chinese)
- [5] Shiau Y J, Sagare A P, Chen U C, et al. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds [J]. Bot Bull Acad Sin, 2002, 43: 123-130.
- [6] Guo L X(郭丽霞), Mao R(莫饶). A preliminary experimentation of pollen germination on *Cymbidium sinense* (Orchidaceae) original in Hainan [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2007, 23(6): 594-597. (in Chinese)
- [7] Ling C Y(凌春英), Xiao E(肖恩), Yan D J(严冬瑾), et al. Study of pollen viability testing on *Cymbidium hybridum* and *Cymbidium sinense* and their pollen preservation [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2010, 38(5): 2312-2314. (in Chinese)
- [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] 陆时万, 徐祥生, 沈敏健. 植物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1991: 1-230.
- [10] Che D D(车代弟), Fan J P(樊金萍), Wang J G(王金刚). Study on optimization of the culture medium for oriental hybrids pollen germination [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2003, 23(2): 178-181. (in Chinese)
- [11] Wang Q L(王钦丽), Lu L D(卢龙斗), Wu X Q(吴小琴), et al. Pollen preservation and its viability test [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2002, 19(3): 365-373. (in Chinese)
- [12] Chen Y H(陈延惠), Li H T(李洪涛), Zhu D X(朱道圩), et al. A study on the viability and storage time of the pollen for *Actinidia* [J]. Acta Agri Univ Henan(河南农业大学学报), 1996, 30(2): 175-177. (in Chinese)
- [13] Wang J Z(王进忠), Yun X P(云晓鹏), Kang R Q(康荣芹), et al. A study on the viability and storage time of *Parthenocissus tricuspidata* Sieb et Zucc and *Parthenocissus quinquefolia* Planch pollen [J]. J Beijing Agri Coll(北京农学院学报), 2006, 21(1): 10-13. (in Chinese)
- [14] Wu C(武冲), Zhang Y(张勇), Zhong C L(仲崇禄), et al. Effects of storage conditions on pollen germination of *Casuarina cunninghamiana* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2010, 18(3): 316-320. (in Chinese)
- [15] Jiang C(姜闯), Wang C(王冲), Lei J J(雷家军). Determination of pollen viability and screening of storage methods in *Clivia miniata* Regel [J]. Acta Agri Boreali-Occid Sin(西北农业学报), 2010, 19(5): 157-161. (in Chinese)
- [16] Ye L(叶露), Shi Y M(史益敏). Research on pollen germination and pollen preservation characteristic of *Hippeastrum* [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Agri Sci)(上海交通大学学报: 农业科学版), 2008, 26(1): 9-12. (in Chinese)
- [17] Li B L(李秉玲), Shang X Q(尚晓倩), Liu Y(刘燕). Viability of *Paeonia lactiflora* pollen after four years of cryopreservation [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 2008, 30(6): 145-147. (in Chinese)
- [18] Wang W L(王文莉), Zhao L Y(赵兰勇), Zhu C Y(朱翠英), et al. Studies on pollen viability and its storage conditions of pingyin rose [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2009, 36(4): 593-598. (in Chinese)