

无距虾脊兰花粉离体萌发 及储藏条件的研究

钱 鑫¹, 刘 芬², 牛晓玲³, 王彩霞¹, 田 敏^{1*}

(1 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400; 2 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 3 天目山国家自然保护区管理局, 浙江临安 311311)

摘 要:以天目山野生无距虾脊兰的花粉为材料, 采用离体萌发法研究了花粉的储藏性以及不同的培养基组分和培养条件对花粉萌发和花粉管生长的影响, 并采用联苯胺-过氧化氢法测定了其柱头的可授性, 以筛选无距虾脊兰花粉的培养方法以及储藏条件, 为其种质资源保存等研究奠定基础。结果表明: (1) 无距虾脊兰最适花粉液体培养基为 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ + $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 并且在 pH 5.5~6.0、温度 25 °C 恒温下培养 48 h, 无距虾脊兰花粉萌发率(81.71%)和花粉管生长($247.42 \mu\text{m}$)最佳。(2) 无距虾脊兰花粉在 -80 °C 中低温干燥储藏 360 d 后仍具有 48.58% 的萌发率。(3) 无距虾脊兰的柱头在开花前 5 d 内均具有可授性, 花粉块在整个花期均保持了 28.96%~81.71% 的生活力, 但柱头可授性和花粉活力均随开花后时间的延长显著降低。

关键词: 无距虾脊兰; 花粉; 生活力; 储藏性

中图分类号: Q813.1⁺1; Q944.42

文献标志码: A

in vitro Pollen Germination and Storage Conditions of *Calanthe tsoongiana*

QIAN Xin¹, LIU Fen², NIU Xiaoling³, WANG Caixia¹, TIAN Min^{1*}

(1 Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China; 2 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China; 3 Administration Bureau of Tianmu Mount National Nature Reserve, Lin'an, Zhejiang 311311, China)

Abstract: The effects of medium components and culture conditions on pollen germination and pollen tube growth of *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang in Tianmu Mountain were studied by *in vitro* culture, which was also used to investigate the pollen storage capacity. The stigma receptivity was estimated by benzidine- H_2O_2 method. The aim of present study was to screen the ideal culture methods and storage conditions for *C. tsoongiana* pollens, which would lay the foundation for the research of its germplasm resources preservation. The results showed that: (1) The optimum culture medium for pollen germination consisted of $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ and $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, in which the pollen germination percentage was nearly 81.71% and the average pollen tube length reached $247.42 \mu\text{m}$ after 48 h incubation under the optimum culture conditions involved pH 5.5~6.0 and 25 °C. (2) Germination rate of dried pollens still maintained at 48.58% after 360 d storage under -80 °C. (3) The stigma receptivity of *C. tsoongiana* could last 5 d after blooming, but the pollinarium kept a certain viability (28.96%~81.71% germination rate) during whole florescence. However, both stigma receptivity and pollen viability declined significantly with the extension of time after blooming.

收稿日期: 2013-07-27; 修改稿收到日期: 2014-01-10

基金项目: 浙江省花卉育种重大科技项目(2012C12909-10)

作者简介: 钱 鑫(1986—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事兰科植物的保护生物学研究。E-mail: qianxin090@163.com

* 通信作者: 田 敏, 博士, 副研究员, 主要从事兰科植物研究。E-mail: tmin115@163.com

Key words: *Calanthe tsoongiana*; pollen; pollen viability; storage capacity

花粉是被子植物雄配子体或者雄配子细胞的载体^[1], 具较强的遗传保守性^[2], 是研究植物生殖生物学、进化生物学、分类学以及育种工程的重要对象^[3]。具生活力的花粉到达具可授性的柱头上的有效传粉过程是植物顺利完成受精作用的必要条件, 故对花粉生活力与柱头可授性的研究是了解其有性生殖的基础。在杂交育种工作中, 花粉生活力测定与储藏性的研究是解决杂交亲本在时间与空间上的隔离进而扩大育种范围的前提, 并且花粉储藏也是保存珍稀植物种质资源一个重要途径^[4-6]。

无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang), 是一种中国特有的兰科(Orchidaceae) 虾脊兰属(*Calanthe* R. Br.) 植物, 分布于浙江、福建、江西、湖南、贵州等省区, 生长于海拔 300~1 450 m 的路边、山坡林下以及阴湿岩石上^[7-8]。花形似虾, 花色艳丽, 唇瓣无距, 蕊柱粗短, 叶色浓绿并呈倒卵状披针形, 具有较高的观赏价值与科研价值, 已被列为国家二级重点保护植物。目前对该物种的报道仅限于一些基本生物学特征^[7]、果实发育^[9]、胚珠发育及种子形成^[10]等方面, 关于其花粉生活力、储藏性以及柱头可授性的研究未见报道。本研究以野生无距虾脊兰的花粉为研究对象, 研究了不同培养基组分及培养条件对花粉萌发率和花粉管生长的影响, 并对开花后不同时间内的花粉活力与柱头可授性进行了观察分析, 以筛选适宜于其花粉活力检测的培养方法以及较适合的储藏条件, 旨在为无距虾脊兰的分类鉴定、传粉过程、杂交育种及种质资源保存等研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料采自浙江省临安市天目山自然保护区内的无距虾脊兰老殿(119°25'E, 30°21'N)野生居群。该地为亚热带季风气候类型, 年平均气温 8.8℃~14.8℃, 年降水量 1 390~1 870 mm, 相对湿度 76%~81%。

于盛花期(3月下旬~4月上旬)晴天上午 10:00 左右, 选取当天开放的无距虾脊兰健康花序, 置于冰盒中迅速带回实验室。在体视镜(Olympus SZ61)下, 用镊子去除药帽, 用解剖针针头从黏盘处挑出花粉块。

1.2 单因素试验

花粉萌发采用液体培养法, 培养基基本成分同 B-K 试液(Brewbaker and Kwack)^[11]。在探讨每个培养基因子时, 以不加该因子作为参照, 设置不同的浓度。蔗糖设置 6 个浓度梯度: 50、100、150、200、250 和 300 g·L⁻¹; H₃BO₃、Ca(NO₃)₂·4H₂O、MgSO₄·7H₂O 和 KNO₃ 也各设置 6 个浓度梯度: 10、20、30、40、50 和 60 mg·L⁻¹ 分别进行单因子筛选。每种培养液取 5 mL 加入离心管中, 每管放入 4 个花粉块, 置 25℃ 的生化培养箱内分别暗培养 48 h 后, 用移液枪分装培养液于双凹载玻片上, 每孔 200 μL, 于生物显微镜(Olympus CX41)下镜检, 每种培养液观测 5 个玻片 10 个凹孔, 每个凹孔观察 50 个花粉粒, 统计花粉萌发率。花粉萌发以花粉管长度明显大于花粉粒直径为标准。

花粉萌发率(%)=(萌发的花粉粒数/花粉粒总数)×100%

花粉管的长度用 Image-Pro Express 6.0 软件测量, 至少选取 50 个已萌发花粉粒的花粉管, 统计并计算出平均长度。

1.3 最适培养基的筛选

在单因子实验的基础上, 选取对无距虾脊兰花粉萌发影响较大的培养基组分设计正交试验, 以确定培养基的不同组分的最佳组合。

1.4 最佳培养条件的确定

利用最佳培养基方案, 设置不同的温度(15℃、20℃、25℃、30℃和 35℃)、培养时间(12、24、36、48 和 60 h)和 pH 值(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0), 对无距虾脊兰花粉进行离体培养, 以确定其花粉萌发和花粉管生长的最适条件。

1.5 花粉储藏性的测定

采集刚绽放花朵的花粉块与适量的硅胶颗粒充分接触后装入离心管中, 分别置于 4℃、-20℃、-80℃ 的条件下储藏, 并以室温 25℃ 条件下储藏做为对照组。分别在储藏 10、30、90、150、360 d 后采用上述筛选出的最佳培养基成分与培养条件测定花粉萌发率。花粉在 -20℃ 储藏和取出时经过 0℃ 6 h 的缓冲处理, 而在 -80℃ 储藏和取出时经过 -20℃ 和 0℃ 各 6 h 的缓冲处理^[12]。在花粉储藏 360 d 后对无距虾脊兰进行人工授粉, 4 个月后统计结实率。

1.6 柱头可授性的检测

采用联苯胺-过氧化氢法^[13]检测柱头的可授性。取开花后不同天数的花朵,将其柱头浸入凹载玻片上的联苯胺-过氧化氢反应液(体积比,1%联苯胺:3%过氧化氢:水=4:11:22)中。于体视镜(Olympus SZ61)下观察柱头周围是否呈现蓝色以及产生大量气泡,根据气泡的数目来判断柱头可授性的强弱,气泡数目达到20个及以上时,其柱头可授性强;在5至20个范围时,其柱头具可授性;在5个以下,其柱头不具可授性,重复3次。

1.7 数据处理

对所测定、记录的数据,运用 PASW statistics 18.0 软件进行方差分析和多重比较,用 Origin 8.0 软件绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 不同培养基组分对无距虾脊兰花粉离体培养的影响

2.1.1 蔗糖 由图1可知,蔗糖是无距虾脊兰花粉萌发的必需条件,花粉在不含蔗糖的培养基中不能萌发。随着蔗糖浓度的增加,花粉萌发率逐渐上升,花粉管长度伸长。当浓度达到 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,花粉萌发率和花粉管长度都达到了最大值,分别为 66.21% 和 $198.11\text{ }\mu\text{m}$ 。当浓度继续增大至 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,花粉萌发率降低为 39.07% ,但花粉管长度并无显著差异($P>0.05$)。故最佳的蔗糖浓度为 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

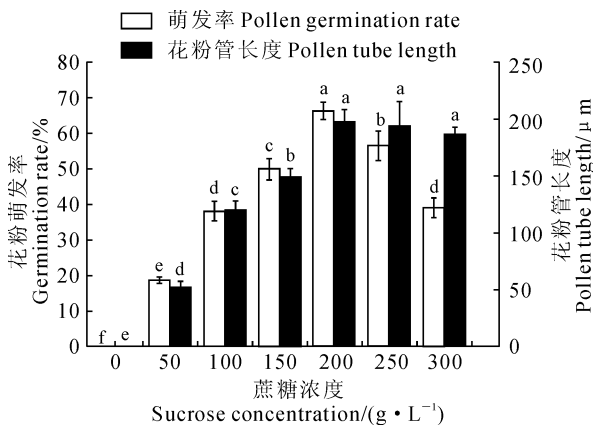


图1 蔗糖浓度对花粉萌发率及花粉管生长的影响

不同小写字母表示差异达5%显著水平;下同

Fig.1 Effect of sucrose concentration on pollen germination rate and pollen tube growth *in vitro*

The different normal letters indicate significant difference at 0.05 level. The same as below

2.1.2 硼 在一定的范围内,无距虾脊兰花粉萌发率和花粉管长度随着硼酸浓度的升高而增加,当超过一定浓度时,硼酸对花粉萌发起抑制作用(图2)。当硼酸浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时花粉萌发率和花粉管长度最大(分别为 60.01% 和 $205.66\text{ }\mu\text{m}$),是对照组(培养基中不添加硼酸)的2.69倍和1.86倍,但与浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的花粉萌发率和花粉管长度的差异并不显著($P>0.05$)。因此硼酸的最佳浓度为 $40\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.3 钙 钙对无距虾脊兰花粉萌发率与花粉管长度的影响与硼相类似,在较低的浓度范围内,钙对花粉萌发起促进作用(图3)。当钙离子浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时花粉萌发率最高,即 54.31% ,为对照组的2.01倍。而花粉管长度的最大值($201.01\text{ }\mu\text{m}$)发生在钙离子浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的时候。同样,在

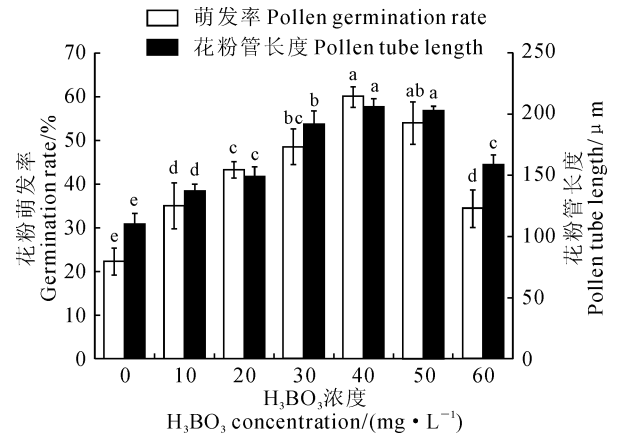


图2 硼酸浓度对花粉萌发率及花粉管生长的影响

Fig.2 Effect of H_3BO_3 concentration on pollen germination rate and pollen tube growth *in vitro*

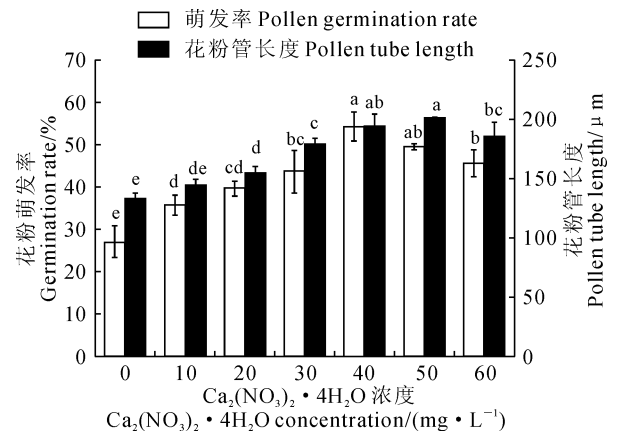


图3 钙离子浓度对花粉萌发率及花粉管生长的影响

Fig.3 Effect of Ca^{2+} concentration on pollen germination rate and pollen tube growth *in vitro*

钙离子浓度为 40 和 50 mg · L⁻¹时,花粉萌发率与花粉管长度的差异并不显著($P>0.05$)。因此无距虾脊兰花粉萌发的最适钙离子浓度也是 40~50 mg · L⁻¹。

2.1.4 钾和镁 在实验浓度范围内,钾离子和镁离子对无距虾脊兰花粉萌发率与花粉管长度的影响均不显著($P>0.05$)。

2.2 无距虾脊兰花粉离体萌发最适培养基的筛选

在单因子实验的基础上,选择对无距虾脊兰花粉离体萌发影响较大的蔗糖、硼酸和硝酸钙采用正交实验设计,寻找 3 因子的最佳组合(表 1)。方差分析结果表明差异极显著的因子为蔗糖和硼酸($P<0.01$),硝酸钙及因素间的交互作用均不显著($P>0.05$)。利用该正交实验做进一步的平方和比较分析,结果表明,无距虾脊兰花粉萌发率平方和的最高

值的培养基组合为 200 g · L⁻¹蔗糖、50 mg · L⁻¹ H₃BO₃ 和 40 mg · L⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O,但此组合在正交实验中并未出现,表 1 中最佳组合为 20 号,即 200 g · L⁻¹蔗糖、50 mg · L⁻¹ H₃BO₃ 和 30 mg · L⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O。为了找出最佳培养基组合,增加了 200 g · L⁻¹蔗糖、50 mg · L⁻¹ H₃BO₃ 和 40 mg · L⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 这一组实验。结果表明这组培养基组合的花粉萌发率(79.08%)与 20 号培养基并没有显著差异($P>0.05$)。但是,结合考虑钙离子单因素实验的结果,无距虾脊兰花粉离体培养的最佳培养基组合为 200 g · L⁻¹蔗糖、50 mg · L⁻¹ H₃BO₃ 和 40 mg · L⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O。

2.3 培养条件对无距虾脊兰花粉离体培养的影响

2.3.1 培养时间 从图 4 可以看出,培养时间小于 48 h时,无距虾脊兰花粉萌发率与花粉管长度随着

表 1 无距虾脊兰花粉萌发的正交实验结果
Table 1 Pollen germination rate and tube length of *C. tsoongiana* in orthogonal test

编号 No.	蔗糖 Sucrose (g · L ⁻¹)	H ₃ BO ₃ (mg · L ⁻¹)	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O (mg · L ⁻¹)	萌发率 Germination percentage/%	花粉管长度 Pollen tube length/μm
1	0	0	0	0	0
2	0	20	20	0	0
3	0	30	30	0	0
4	0	40	40	0	0
5	0	50	50	0	0
6	100	0	20	32.76	123.98
7	100	20	30	41.81	146.08
8	100	30	40	56.07	167.83
9	100	40	50	59.82	173.04
10	100	50	0	49.17	135.53
11	150	0	30	58.66	176.12
12	150	20	40	61.09	178.91
13	150	30	50	63.87	188.69
14	150	40	0	65.76	179.02
15	150	50	20	65.98	167.81
16	200	0	40	52.08	176.09
17	200	20	50	63.94	181.72
18	200	30	0	61.1	183.21
19	200	40	20	72.07	207.77
20	200	50	30	78.68	226.16
21	250	0	50	42.76	150.06
22	250	20	0	47.93	165.11
23	250	30	20	55.06	178.09
24	250	40	30	65.73	182.46
25	250	50	40	66.18	186.01
MS	1 4351.06	829.88	20.94		
F	95.56 **	5.53 **	0.14		

注: ** .表示在 0.01 水平差异极显著。
Note: ** means the difference is significant at the 0.01 level.

培养时间的延长而增加。超过 48 h 时,花粉萌发率与花粉管长度有稍微增加,但与 48 h 时的差异并不显著($P>0.05$)。而且随着培养时间的增加,培养液中的微生物量也会逐渐增加,影响观察。因此,无距虾脊兰花粉离体萌发的最佳培养时间为 48 h。

2.3.2 培养温度 图 5 显示,在 15~25 ℃ 范围内,温度得升高对无距虾脊兰花粉的萌发起促进作用。25 ℃ 时,花粉萌发率与花粉管长度达到最大值。当温度高于 25 ℃ 时,无距虾脊兰花粉萌发率与花粉管长度均随着培养温度的升高而显著下降。可见温度过高和过低都会抑制花粉萌发。故无距虾脊兰花粉离体培养的最适温度为 25 ℃。

2.3.3 pH 值 培养基的 pH 值对花粉萌发同样有显著的影响,由图 6 可以看出,当 pH 值为 5.5 和 6.0 时,无距虾脊兰花粉萌发率与花粉管长度显著高

于其它处理组。当 pH 值低于 5.5 或者高于 6.0 时,无距虾脊兰花粉的萌发和花粉管的生长都受到了抑制。因此,无距虾脊兰花粉离体萌发的最佳 pH 值为 5.5~6.0。

2.4 花粉储藏性测定

从表 2 中可以看出,无距虾脊兰花粉萌发率与储藏条件密切相关。储藏时间相同的情况下,低温下储藏的花粉萌发率高于室温下的花粉萌发率。在 25 ℃ 条件下储存 48 h 后,无距虾脊兰花粉萌发力基本丧失。在 4 ℃ 条件下储存 10 d 后,花粉萌发率迅速下降为 16.63%。-20 ℃ 和 -80 ℃ 低温条件显著降低了花粉萌发率的下降速度,在储藏 360 d 后花粉仍然可以萌发,萌发率分别为 26.61% 和 48.58%。在 30 d 的储藏时间内,-20 ℃ 和 -80 ℃ 两个储藏条件之间的花粉萌发率的差异不显著($P>0.05$)。但是储藏 90 d 后,-80 ℃ 储藏条件下的无距虾脊兰花粉萌发率显著高于 -20 ℃ 条件下的花粉萌发率($P<0.05$)。因此,-80 ℃ 的储藏效果最佳。取 -80 ℃ 储藏 360 d 后的花粉进行授粉,结实率达 88.09%。

2.5 花粉生活力与柱头可授性

无距虾脊兰的单花平均花期(9±3) d。由表 3 可以看出,开花当天的花粉萌发率最高,之后逐渐降低,开花 9 d 后花粉萌发率显著降低,但在单花花期结束时,花粉依然具有一定的生活力。无距虾脊兰柱头上分布丰富的紫色粘性物质,表面微凹。柱头可授性在开花的前 3 d 最强,从开花第 4 天起柱头可授性开始减弱,到开花第 6 天部分柱头已不具有授性,至开花第 9 天时,柱头萎蔫,变黑并失去粘性,完全丧失可授性。

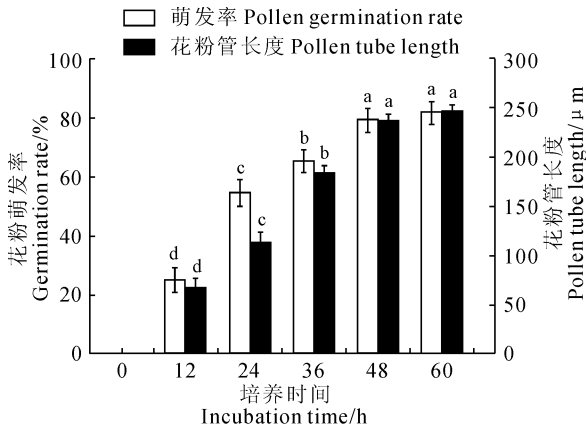


图 4 培养时间对花粉萌发率及花粉管生长的影响
Fig. 4 Effect of incubation time on pollen germination rate and pollen tube growth *in vitro*

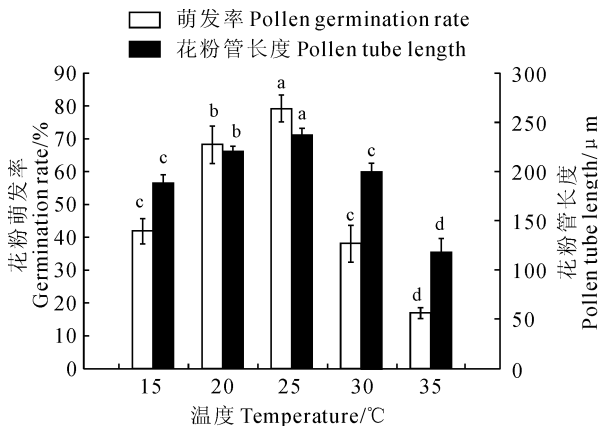


图 5 温度对花粉萌发率及花粉管生长的影响
Fig. 5 Effect of temperature on pollen germination rate and pollen tube growth *in vitro*

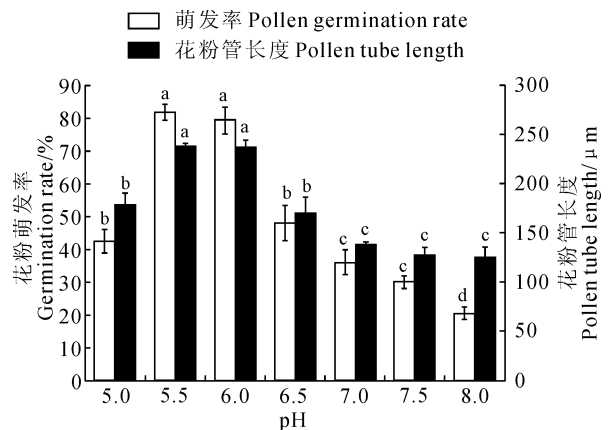


图 6 pH 值对花粉萌发率及花粉管生长的影响
Fig. 6 Effect of pH value on pollen germination rate and pollen tube growth *in vitro*

表 2 不同储藏条件下无距虾脊兰的花粉萌发率
Table 2 Pollen germination rate of *C. tsoongiana* under different storage conditions

储藏时间 Storage time/d	花粉萌发率 Germination rate/%			
	25 ℃	4 ℃	−20 ℃	−80 ℃
0	81.71±2.52a	81.71±2.52a	81.71±2.52a	81.71±2.52a
10	0.00±0.00h	16.63±1.78g	74.66±3.09b	78.36±1.33ab
30	0.00±0.00 h	0.00±0.00 h	72.91±1.98b	76.21±3.18ab
90	0.00±0.00 h	0.00±0.00 h	58.06±4.88d	65.67±4.05c
150	0.00±0.00 h	0.00±0.00 h	48.13±2.06e	57.38±2.26d
360	0.00±0.00 h	0.00±0.00 h	26.61±1.99f	48.58±2.95e

注:数据后面的不同字母代表差异达到显著水平($P<0.05$)。
Note:Different letters alongside of data indicate significant difference at 0.05 level.

表 3 无距虾脊兰的花粉活力与柱头可授性
Table 3 Pollen viability and stigma
receptivity of *C. tsoongiana*

开花天数 Days of flowering/d	花粉萌发率 Germination rate/%	柱头可授性 Stigma receptivity
1	81.71±2.52a	++
2	78.61±3.44ab	++
3	76.11±2.09ab	++
4	73.98±2.62ab	+
5	72.23±1.66bc	+
6	67.39±4.81cd	+/-
7	65.55±2.76d	+/-
8	61.02±1.69d	+/-
9	48.10±3.89e	-
10	36.03±2.78f	-
11	28.96±3.75g	-

注:数据后面的不同字母代表差异达到显著水平($P<0.05$); ++, 具有强可授性; +, 具有可授性; +/-, 部分柱头具可授性; -, 不具可授性。
Note:Different letters alongside of data indicate significant difference at 0.05 level; ++ means high stigma receptivity; +/- means some stigma have receptivity; + means normal stigma receptivity; - means no stigma receptivity.

3 讨 论

兰科植物的花粉块结构减缓了其花粉离体萌发速度^[14],故使用液体培养基可以明显提高其花粉萌发效率^[15]。蔗糖是大多数植物花粉离体培养所必需的成分,它为花粉的萌发和花粉管的生长提供了碳源,并且起到了维持培养基的花粉粒内外的渗透平衡的作用^[16]。蔗糖浓度对无距虾脊兰花粉萌发的影响较为明显,未添加蔗糖的培养基中无距虾脊兰花粉不能萌发,当浓度为 200 g · L⁻¹时,萌发率最高,浓度继续增高时,高的渗透压会造成花粉细胞壁的质壁分离,从而抑制花粉萌发^[17]。绝大多数的研究显示培养基中添加一定的蔗糖会对花粉萌发起促进作用^[6,15,17-19],但是龚双姣等^[20]发现培养基中

不添加蔗糖反而更有利于蜡梅(*Chimonanthus praecox*)花粉的萌发,其具体机制目前还不明确。硼离子能够与蔗糖结合形成络合物,使其易于通过质膜在组织中运输,进而促进蔗糖的吸收和代谢,硼离子还参与了花粉管顶端细胞壁的形成^[19,21],因而一定浓度的硼可以提高花粉的萌发率。硼离子浓度不足会阻碍花粉的萌发,而且会导致花粉管的形态异常^[22]。本实验中,促进无距虾脊兰花粉萌发的最佳硼浓度为 40~50 mg · L⁻¹,与杂种卡特兰(*Rhyncholaeliocattleya* Sung Ya Green ‘Green World’)^[15]以及扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum*)^[23]研究结果的相近。钙离子主要是在蔗糖和硼的主导作用下其辅助作用,而这种作用对启动花粉萌发和调节花粉管生长是必须的^[24]。不同植物花粉萌发的最适钙离子浓度并不相同,如无距虾脊兰为 40~50 mg · L⁻¹,远低于杂种卡特兰(100 mg · L⁻¹)^[15]和大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)(150 mg · L⁻¹)^[25]。然而,但这三个因素共同起作用时,蔗糖和硼对无距虾脊兰花粉的萌发起最主要作用,钙离子次之,因素间的交互作用也不明显,无距虾脊兰花粉离体培养的最佳液体培养基组合为 200 g · L⁻¹蔗糖 + 50 mg · L⁻¹ H₃BO₃ + 40 mg · L⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O。培养条件同样对花粉萌发有影响,如温度和 pH 值过高或者过低时也会对花粉萌发率和花粉管生长起抑制作用。与淫羊藿(*Epimedium brevicornum*)^[18]、薄壳山核桃(*Carya illinoensis*)^[26]及黄连木(*Pistacia chinensis*)^[27]一样,无距虾脊兰花粉的最适萌发温度为 25℃。因此,在野外对无距虾脊兰进行人工辅助授粉时,不宜在温度偏低的早晨以及温度过高的正午进行。

花粉储藏是植物杂交育种工作关键环节,选择适宜的储藏条件对保持花粉生活力极为重要^[5]。兰科植物的花粉属于二核型,具有较厚的外壁,一般比

三核型花粉更能忍耐干燥,具更长寿命^[5]。程式君^[28]曾对藏虎头兰(*Cymbidium tracyanum*)、多花兰(*C. floribundum*)、大花万带兰(*Vanda coerulea*)以及蜘蛛兰(*Arachnis clarkei*)等多种兰科植物的花粉干燥后低温存储数月后进行授粉,仍可保持很高的授粉结实率。本研究中,无距虾脊兰花粉在-20℃和-80℃条件下干燥保存360 d后仍然具有一定的萌发率和较高的授粉结实率,与大花蕙兰和墨兰(*Cymbidium sinense*)花粉的研究结果相近^[29]。这是因为低温低湿条件下,花粉的酶活性减弱,呼吸作用降低,代谢受到抑制,从而可以使花粉长时间的保持生活力^[15]。然而欧阳英等^[30]采用新鲜的密花石斛(*Dendrobium densiflorum*)花粉块在-20℃条件下储藏12 d后花粉萌发率就降至6.95%,这可能是其花粉未经过干燥处理,花粉细胞内含水量过高,在冷冻过程中容易造成冰冻伤害,从而影响了花粉活力。所以用低温干燥冷藏法来保存兰花花粉块,不仅可以解决杂交育种中花期不遇的

问题,并且还可以大大丰富了育种种质资源,为兰花育种工作开辟新的途径^[28]。

柱头可授期是花朵成熟过程中的一个非常重要时期,它在很大程度上影响开花不同阶段的传粉成功率^[31]。通过对植物柱头可授性的研究,明确雌蕊柱头的最佳授粉时期,不仅可以大大减少授粉工作量,而且还能显著提高杂交的成功率^[32]。在本实验中,无距虾脊兰的柱头可授性所持续的时间为5 d,与其它的兰科植物相比,明显短于杏黄兜兰(*Paphiopedilum armeniacum*)(25 d)^[33]、扇脉杓兰(16 d)^[23]、少花鹤顶兰(*Phaius delavayi*)(15 d)^[34]以及*Gongora quinquenervis*(14 d)^[35],但与白及(6 d)^[36]和*Spiranthes diluvialis*(5 d)^[37]相近。因此,今后对无距虾脊兰的进行杂交育种时,若是花期不遇或需异地授粉,可将父本花粉储藏于-20℃和-80℃条件下,至少可以在1年内保持一定的生活力,而母本的授粉时期则最好在开花后5 d内进行。

参考文献:

- [1] 田惠桥,朱学艺.被子植物生殖生物学[M].北京:科学出版社,2012:16.
- [2] SU X M(苏晓梅),LIU W D(刘卫东),LIU L W(柳李旺). Pollen morphology of eggplant and study on its taxonomy[J]. *Acta Bot. Bore-al. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2012,**32**(2):281-287(in Chinese).
- [3] LIU W L(刘武林). The collection, storage and viability test of pollen[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报),1985,**3**(3):8-12(in Chinese).
- [4] 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]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报),2002,**19**(3):365-373(in Chinese).
- [5] YIN J L(尹佳蕾),ZHAO H E(赵惠恩). Summary of influential factors on pollen viability and its preservation methods[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报),2005,**21**(4):110-113(in Chinese).
- [6] LI Y P(李玉萍),LUO F X(罗凤霞),WANG CH Y(王春彦),et al. Characteristics of pollen germination and storage in *Hyacinthus orientalis*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2010,**30**(12):2 484-2 489(in Chinese).
- [7] 陈心启,吉占和,郎楷永,朱光华. 中国植物志(第18卷)[M].北京:科学出版社,1997:279-281.
- [8] HU G W(胡光万),LEI L G(雷立公),LIU K M(刘克明). Some newly recorded plants from Hunan Province of China (Ⅳ)[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),2002,**22**(2):136-138(in Chinese).
- [9] LIAN J J(连静静),LI Q J(李全健),WANG C X(王彩霞),et al. Fruit growth and anatomical characteristics of *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),2012,**32**(6):707-711(in Chinese).
- [10] LIAN J J(连静静),QIAN X(钱 鑫),WANG C X(王彩霞),et al. Ovule development and seed formation of *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2013,**33**(3):494-500(in Chinese).
- [11] BREWBAKER J L, KWACK B H. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth[J]. *American Journal of Botany*,1963,**50**(9):859-865.
- [12] WANG CH W(王呈伟),ZHENG Y H(郑玉红),LI Y(李 莹),et al. Detection condition optimization of pollen viability of *Hicksii* and analysis on its suitable storage temperature[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报),2012,**21**(2):13-18(in Chinese).
- [13] DAFNI A. Pollination ecology: A practical approach[M]. New York: Oxford University Press,1992:1-57.
- [14] 吴应祥. 中国兰花. 北京:中国林业出版社,1993:106-107.
- [15] ZHENG B Q(郑宝强),WANG Y(王 雁),PENG ZH H(彭镇华),et al. Germination and preservation of *Rhyncholaeliocattleya* pollen

- [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 2012, **20**(1): 13—18 (in Chinese).
- [16] HUANG J X (黄家兴), WU J (吴杰), AN J D (安建东), *et al.* Factors influencing pollen germination and tube growth of *Prunus armeniaca* L. *in vitro* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2008, **28**(1): 52—58 (in Chinese).
- [17] CHEN H M (陈和明), YIN G T (尹光天), HU ZH S (胡哲森), *et al.* Germination and low-temperature storage of *Daemonorops margaritae* pollens [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2006, **26**(7): 1 395—1 400 (in Chinese).
- [18] QUAN Q M (权秋梅), LI Y X (黎云祥), WU CH M (吴春梅), *et al.* Pollen germination and growth of *Epimedium brevicornum* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2007, **27**(10): 2 002—2 008 (in Chinese).
- [19] DU J H (杜纪红), YE ZH W (叶正文), SU M SH (苏明申), *et al.* Characteristics of pollen germination and pollen tube growth of peach *in vitro* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(1): 64—71 (in Chinese).
- [20] GONG SH J (龚双姣), MA T W (马陶武), LIU Q (刘强). Effects of culture medium composition and culture condition on pollen germination and pollen tube growth of *Chimonanthus praecox* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(6): 1 254—1 260 (in Chinese).
- [21] FEIJÓ J A, MALHÓ R, OBERMEYER G. Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth [J]. *Protoplasma*, 1995, **187**(1—4): 155—167.
- [22] WANG Q, LU L, WU X, LI Y, LIN J. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri* [J]. *Tree Physiology*, 2003, **23**(5): 345—351.
- [23] LIU F (刘芬), LI Q J (李全健), WANG C X (王彩霞), *et al.* Floral characteristics and breeding systems of an endangered species *Cypripedium japonicum* [J]. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 2013, **49**(1): 53—60 (in Chinese).
- [24] GUO G M (郭光明), ZHANG F S (张福锁), SHANG ZH L (尚忠林), *et al.* Effects of boron on cytosolic Ca^{2+} in germinating pollen grain cells of *Lilium davidii* Dutchartre [J]. *Journal of China Agricultural University* (中国农业大学学报), 2002, **7**(5): 32—37 (in Chinese).
- [25] 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]. *Chinese Agriculture Science Bulletin* (中国农学通报), 2005, **21**(4): 122—124 (in Chinese).
- [26] ZHANG R (张瑞), LI Y (李洋), LIANG Y W (梁有旺), *et al.* *In vitro* pollen germination and tube growth characteristics on Pecan (*Carya illinoensis*) [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(9): 1 916—1 922 (in Chinese).
- [27] LI X X (李旭新), ZHANG Y Q (张艳青), FENG X B (冯献宾), *et al.* *In vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia chinensis* Bunge [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(5): 867—873 (in Chinese).
- [28] CHENG SH J (程式君). Preservation method of orchid pollinarium [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 1984, **11**(4): 279—280 (in Chinese).
- [29] LING CH 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]. *Journal of Anhui Agriculture Science* (安徽农业科学), 2010, **38**(5): 2 312—2 314 (in Chinese).
- [30] OUYANG Y (欧阳英), LI B L (李秉玲), LIU Y (刘燕). Preservation of *Dendrobium densiflorum* pollen [J]. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), 2010, **32**(6): 151—154 (in Chinese).
- [31] LIU L D (刘林德), ZHANG P (张萍), ZHANG L (张丽), *et al.* Pollen viability, stigma receptivity and pollinators of *Weigela florida* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2004, **24**(8): 1 431—1 434 (in Chinese).
- [32] LI Y H (李艳华), KANG X Y (康向阳). Stigma receptivity and its detection methods of white poplars [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2007, **27**(5): 859—863 (in Chinese).
- [33] LIU K W (刘可为), LIU ZH J (刘仲健), LEI S P (雷嗣鹏), *et al.* Study on pollination in *Paphiopedilum armeniacum* [J]. *Shenzhen Science and Technology* (深圳特区科技), 2005, 00: 271—183 (in Chinese).
- [34] HUANG B Q (黄宝强), KOU Y (寇勇), AN D J (安德军). Pollination success of *Phaius delavayi* in Huanglong Valley, Sichuan [J]. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2012, **32**(21): 6 795—6 802 (in Chinese).
- [35] MARTINI P, SCHLINDWEIN C, MONTENEGRO A. Pollination, flower longevity, and leproductive biology of *Gongora quinquenervis* Ruiz and Pavón (Orchidaceae) in an Atlantic forest fragment of Pernambuco, Brazil [J]. *Plant Biology*, 2003, **5**(5): 495—503.
- [36] WANG C X (王彩霞), TIAN M (田敏), LI Q J (李全健), *et al.* Floral syndrome and breeding system of *Bletilla striata* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2012, **39**(6): 1 159—1 166 (in Chinese).
- [37] SIPES S D, TEPEDINO V J. Reproductive biology of the rare orchid, *Spiranthes diluvialis*: breeding system, pollination, and implications for conservation [J]. *Conservation Biology*, 1995, **9**(4): 929—938.