

大花蕙兰与国兰花粉活力及柱头可授性分析

褚 怡, 范义荣, 张韶伊, 孙玉芬, 宁惠娟

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 花粉和柱头具有较高的活力是保证杂交育种工作有效开展的关键。采用氯化三苯基四氮唑 (TTC), 碘-碘化钾 (I_2 -KI) 和醋酸洋红等 3 种染色法测定了大花蕙兰 *Cymbidium hybridum* 和国兰不同种和品种的花粉活力, 用联苯胺-过氧化氢法测定了大花蕙兰和国兰部分品种的柱头可授性并观察柱头分泌黏液情况。研究表明: 碘-碘化钾染色法和醋酸洋红染色法都不适合大花蕙兰和国兰花粉活力的测定, TTC 染色法是观察花粉活力最直观的方法。大花蕙兰与国兰的花粉活力是随着开放时间的延长, 经历从弱变强再变弱的过程, 大花蕙兰和国兰的花粉分别在开后 25~35 d 和 15~25 d 活力最佳。大花蕙兰和国兰的柱头在整个花期中都具有一定的可授性, 其中大花蕙兰在 20~40 d 内的可授性最强, 45 d 以后其柱头可授性逐渐减弱。国兰在 15~25 d 内的柱头可授性最强, 30 d 以后柱头的可授性逐渐消失。总体而言, 整个柱头可授性是随着时间的变化从弱到强再到弱的一个过程。图 2 表 2 参 19

关键词: 园艺学; 大花蕙兰; 国兰; 花粉活力; 柱头可授性

中图分类号: S682.31

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2013)06-0950-05

Pollen vitality and stigma receptivity of *Cymbidium hybridum* and Chinese orchid

CHU Yi, FAN Yirong, ZHANG Shaoyi, SUN Yufen, NING Huijuan

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To ensure effective cross-breeding work, high vitality of pollen and stigma receptivity are required. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), iodine-potassium iodide (I_2 -KI), and Carmine staining methods were used to determine pollen viability for *Cymbidium hybridum* and Chinese orchid; benzidine- H_2O_2 was utilized to determine stigma receptivity and to observe stigma mucus secretion. Results indicated that the I_2 -KI and Carmine methods were not suited to test pollen vitality while the TTC method verified to be best. Throughout flowering, the stigmas of *Cymbidium hybridum* and Chinese orchid were receptive. The stigma of *Cymbidium hybridum* reached its highest receptivity from 20 d to 40 d, after flowering, stigma receptivity gradually weakened after 45 d. For the Chinese orchid from about 15 d to 25 d, receptivity strengthened, but at 30 d, stigma receptivity gradually weakened and disappeared. Thus, the stigma receptivity process changed from weak to strong to weak. [Ch, 2 fig, 2 tab, 19 ref.]

Key words: horticulture; *Cymbidium hybridum*; Chinese orchid; pollen vitality; stigma receptivity

大花蕙兰 *Cymbidium hybridum* 是以兰科 Orchidaceae 兰属 *Cymbidium* 中一些大花型附生种为亲本经过多代杂交培育出来的优良品种群^[1]。大花蕙兰是重要的商品盆花和鲜切花之一, 花型大、色彩鲜艳、生长强健, 但是缺少国兰的幽香。国兰是指兰属植物中的一部分地生种, 主要包括春兰 *C. goeringii*, 春剑 *C. goeringii* var. *longibracteatum*, 蕙兰 *C. faberi*, 建兰 *C. ensifolium*, 墨兰 *C. sinense*, 寒兰 *C. kanran* 和莲瓣兰 *C. lianpan* 等 7 个种系^[2]。国兰不仅花型小巧、极具芳香而且叶态优美, 深受人民喜爱。利用

收稿日期: 2012-11-12; 修回日期: 2013-01-18

基金项目: 浙江省科学技术重大项目(2009C12087); 浙江省科学技术重点科技创新团队子项目(2009R50034)

作者简介: 褚怡, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: chuyi1010@126.com。通信作者: 宁惠娟, 讲师, 博士研究生, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: ninghuijuan@21cn.com

大花蕙兰和国兰进行杂交育种的工作近几年已经引起不少学者的重视^[3-7]。花粉活力和柱头可授性是直接影响兰科植物杂交成功的重要因素之一。早期的兰科植物花粉活力研究主要集中在离体萌发培养基成分的筛选方面，例如蔗糖浓度的选择^[8]、植物激素以及柱头粗提物或提取液等外源添加物^[9-10]。王利民等^[11]报道了大花蕙兰杂交品种花粉的离体萌发特性；郭丽霞等^[12]对海南原生的墨兰花粉进行了离体培养萌发研究。但对于大花蕙兰和国兰的花粉活力测定及柱头的可授性则未见报道。本研究在前人研究的基础上，对大花蕙兰和国兰花粉活力与柱头可授性进行了分析，旨在为兰花杂交育种工作提供参考与借鉴。

1 材料与方法

1.1 大花蕙兰与国兰花粉采集与处理

如表 1 所示：供试验的大花蕙兰材料来自云南，品种有‘绿宝’‘Emerald’，‘光彩’‘Shine’，‘皇后’‘Princess Nobuko’，‘梦境’‘Wanderland’，‘龙袍’‘Nachi Yellow’等 5 个品种。国兰材料来自浙江、四川和云南，共选取 4 个不同的种或品种。观察记录开花时间并做好标记，对大花蕙兰设定 0，5，10，15，20，25，30，35，40，45，50，55，60 d 等 13 个开花时间，对国兰设定 0，5，10，15，20，25，30 d 等 7 个开花时间。在所设计的开花时间分别采集花粉和柱头带回实验室进行试验。

表 1 大花蕙兰与国兰试验材料

Table 1 List of *Cymbidium hybridum* and Chinese orchid test material

材料	花色	瓣形	花期/月	花径/cm	来源地
大花蕙兰‘绿宝’ <i>Cymbidium hybridum</i> ‘Emerald’	绿色		1-4	9~10	云南
大花蕙兰‘光彩’ <i>C. hybridum</i> ‘Shine’	粉紫色		1-3	8~9	云南
大花蕙兰‘皇后’ <i>C. hybridum</i> ‘Princess Nobuko’	粉紫色		1-3	9~10	云南
大花蕙兰‘梦境’ <i>C. hybridum</i> ‘Wanderland’	橙红色		12-3	7~8	云南
大花蕙兰‘龙袍’ <i>C. hybridum</i> ‘Nachi Yellow’	黄色		12-3	5~6	云南
春兰‘黄金荷’ <i>C. goeringii</i> ‘Huangjinhe’	浅绿色	荷瓣	2-3	2~3	浙江
春兰‘宋梅’ <i>C. goeringii</i> ‘Songmei’	浅绿色	梅瓣	2-3	1~2	浙江
春剑 <i>C. goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>	黄绿色	水仙瓣	2-4	2~3	四川
莲瓣兰 <i>C. lianpan</i>	浅粉色	梅瓣	3-5	2~3	云南

如图 1 所示：大花蕙兰与国兰的花粉均为 4 个花粉块，两两相连，花粉块为黄色位于合蕊柱先端的药帽之下^[13]。试验前用玻璃棒将软硬程度不同的花粉块轻轻碾压为粉末状。稍硬的花粉块可在轻压后放入少量蒸馏水，然后搅拌，花粉块则在水中分散开。

1.2 花粉生活力测定

1.2.1 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法 TTC 染色法是根据花粉粒的呼吸酶活性来判断花粉生活力，呼吸酶的活跃情况能较准确地反映花粉生活力的强弱，同时氧化还原染料能在呼吸酶的作用下着色。将不同种或品种和不同开花时间的花粉分别加入体积分数为 0.5%TTC 溶液^[14]染色，染色后在 100 倍体视镜下观察染色情况，统计花粉染色率，花粉生活力(%)=(有活力的花粉/观察花粉总数)×100。试验重复 3 次。

1.2.2 碘-碘化钾(I₂-KI)染色法 参照赵宏波等^[15]的方法配置碘-碘化钾溶液。取 9 个种或品种不同开花时间的花粉，分别加入碘-碘化钾溶液，置于 30 ℃的恒温箱中 20~30 min 后，在光学显微镜下观察花粉活力，试验重复 3 次。

1.2.3 醋酸洋红染色法 同样取 9 种或品种不同开花时间的花粉，分别加入体积分数为 45%醋酸洋红溶液^[16]，置于 25 ℃的恒温箱中 20~30 min，然后在光学显微镜下观察花粉活力，试验重复 3 次。



图 1 国兰(左)与大花蕙兰(右)花粉块形态
Figure 1 Pollen form of Chinese orchid (left) *Cymbidium hybridum* (right)

1.3 柱头可授性检测

兰花接受花粉的部位在药帽下的腔内,腔内充满无色透明的分泌物,如果分泌物油光发亮,则表示是最好的授粉时间。分别将大花蕙兰开花后 0~80 d 的柱头和国兰开花后 0~40 d 的柱头剪下,放入联苯胺-过氧化氢溶液^[17]中,观察 10 min,若柱头有可授性则会使周围反应液变蓝并出现大量气泡。这是因为氧化物酶活性降解过氧化氢和氧化联苯胺。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 大花蕙兰与国兰花粉活力

研究发现:TTC 染色法的最佳观察时间是染色后 12 h。大花蕙兰与国兰的花粉活力均随着开花时间的延长,经历从弱变强再变弱的过程(图 2)。大花蕙兰在开花后 0~25 d 内花粉活力处在增长期,25~35 d 的花粉活力最佳,35 d 后花粉的活力开始变差。各品种间花粉活性有一定差异,花粉活力大小依次为‘绿宝’>‘光彩’>‘皇后’>‘梦境’>‘龙袍’。国兰在开花后 0~15 d 内花粉活力处于增长期,15~25 d 的花粉活力最佳,30 d 花粉的活力开始变差,各品种花粉活力大小依次为春兰‘黄金荷’>春兰‘宋梅’>春剑>莲瓣兰。

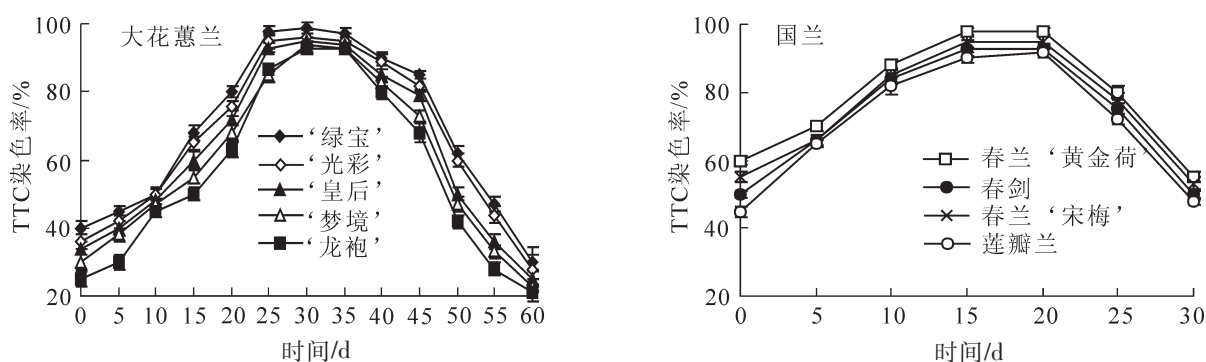


图 2 大花蕙兰(左)和国兰(右)TTC 染色法染色率率

Figure 2 *Cymbidium hybridum* (right) and Chinese orchid (left) staining rate by TTC method

用碘-碘化钾染色法染色的大花蕙兰与国兰花粉,在体视镜下(放大 100 倍)没有观察到明显的颜色变化。在低温和高温处理以及时间做相应的延长调整后进行观察,染色效果也不好。用碘-碘化钾染色后的国兰花粉比大花蕙兰的染色效果略明显。醋酸洋红染色法的染色原理是靠花粉中的脱氢辅酶而染色。当花粉失去活力时,该酶的活性仍然存在,使得测定结果偏高。采用醋酸洋红染色法所测的大花蕙兰和国兰花粉,各品种间不同天数花粉的染色率都在 90% 以上,没有差异。因此醋酸洋红法不适合大花蕙兰和国兰花粉活力的测定。

2.2 大花蕙兰与国兰柱头可授性

2.2.1 大花蕙兰柱头可授性 由表 2 可见:大花蕙兰开花后 10 d 内,柱头的过氧化物酶活性较低,且仅有少量气泡产生;15 d 后,已具有较强的过氧化物酶活性,柱头遇联苯胺-过氧化氢溶液反应产生气泡;20~40 d 内柱头产生大量气泡,可授性达到最强;45 d 后,柱头转变为褐色,气泡逐渐减少,可授性明显减弱;80 d 后,柱头为深褐色,过氧化物酶活性基本消失,柱头失去可授性。大花蕙兰不同品种间差异不大。

2.2.2 国兰柱头可授性 国兰开花后 5 d 内,柱头的过氧化物酶活性较低,产生少量气泡;10 d 后,已具有强过氧化物酶活性,气泡逐渐增多;15~25 d 内有大量气泡产生,柱头可授性达到最强;30 d 后,柱头转变为褐色,气泡开始减少,可授性明显减弱;40 d 后,柱头为深褐色,过氧化物酶活性基本消失,柱头失去可授性。各品种间差异不大。

3 讨论

兰属植物花粉活力和柱头可授性研究在国内报道较少,仅有凌春英等^[18]采用离体培养法和 TTC 染

表 2 大花蕙兰及国兰柱头可授性检测

Table 2 *Cymbidium hybridum* and Chinese orchid stigma receptivity detection

大花蕙兰				国兰			
开花时间/d	柱头先端颜色	柱头可授性	可授性测定结果	开花时间/d	柱头先端颜色	柱头可授性	可授性测定结果
0	不变	—	少量气泡	0	不变	—	少量气泡
5	不变	+ / —	浅蓝色，少量气泡	5	不变	—	少量气泡
10	不变	+ / —	浅蓝色，少量气泡	10	微红	+ / —	浅蓝色，少量气泡
15	微红	+	浅蓝色，大量气泡	15~25	微红至深红	+++	蓝紫色，大量气泡
20~40	微红至深红	+++	蓝紫色，大量气泡	30	深红至褐色	++	蓝色，大量气泡
45	深红至褐色	++	蓝色，大量气泡	35	深红至褐色	++	蓝色，大量气泡
60	深红至褐色	—	蓝色，少量气泡	40	深褐色	—	蓝色，少量气泡
60~80	深褐色	--	蓝色，少量气泡				

说明：“--”表示柱头不具可授性；“—”表示柱头可授性弱；“+”表示柱头具有授性；“++”表示柱头具有较强可授性；“+++”表示柱头具有极强可授性；“+ / —”表示部分柱头具有可授性(有个体差异)。

色法对大花蕙兰和墨兰的花粉活力和储藏进行了研究。花粉活力受温度、花期长短等因素的影响，同时兰花花粉呈块状，在分离时比较困难，一定程度上增加了研究难度。本研究采用 3 种染色方法对大花蕙兰和国兰的花粉活力进行研究，得出 TTC 染色法是观察花粉活力最直观的方法。由于兰科植物花粉外面包裹了类脂膜，对花粉活力的保持起到了相当重要的作用^[19]，这也可能是影响碘-碘化钾和醋酸洋红染色法染色时花粉不易着色的主要原因。TTC 对于花粉活力测定结果的准确性还需进一步结合有性杂交来进行检验。

柱头可授性是花朵成熟过程中的一个重要时期，它在很大程度上影响着授粉成功率。不同植物的柱头可授期持续时间不等，花朵的开放期、柱头分泌物的有无等对它都有影响。兰科植物柱头可授期较长，花粉和柱头之间有足够的进行重复授粉。柱头的寿命还与温度有着密切关系。本研究试验材料均生长在 0~30 ℃非加温温室，所以柱头在开花后不同时间的活力还需进一步通过杂交结果来验证。

参考文献：

[1] 卢思聪, 石雷. 大花蕙兰[M]. 北京：中国农业出版社, 2005: 1 – 3.

[2] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京：金盾出版社; 1994: 75 – 77.

[3] 郑立明, 庞基良. 春兰×大花蕙兰杂种试管苗开花现象[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, **32**(3): 320 – 324.

ZHENG Liming, PANG Jiliang. In vitro flowering of cultures from a hybrid of *Cymbidium goeringii* and *C. hybridum* [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, **32**(3): 320 – 324.

[4] 周丽, 胡春根. 送春与多花兰杂种的非共生萌发与快速繁殖[J]. 北方园艺, 2009(3): 181 – 183.

ZHOU Li, HU Chungun. Asymbiotic germination and rapid propagation of hybrid of *Cymbidium cyperifolim* var. *szechuanicum* and *C. floribundum* [J]. *Northern Hortic*, 2009(3): 181 – 183.

[5] 王丰妍, 李承秀, 王长宪, 等. 大花蕙兰与春剑杂交原球茎增殖及分化研究[J]. 中国农学通报, 2009, **25**(23): 327 – 330.

WANG Fengyan, LI Chengxiu, WANG Changxian, *et al.* Study on propagation and differentiation of PLB of *Cymbidium hybridum* × *Cymbidium longibracteatum*[J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2009, **25**(23): 327 – 330.

[6] 陈瑶瑶, 张燕, 张琛, 等. 杂交兰‘韩国桃花’×蕙兰种间杂交种子无菌萌发特征研究[J]. 园艺学报, 2009, **36**(3): 441 – 446.

CHEN Yaoyao, ZHANG Yan, ZHANG Chen, *et al.* A study on aseptic seed germination of interspecific hybrid between *Cymbidium hybrida* × *C. sinense* and *C. faberi* [J]. *Acta Horti Sin*, 2009, **36**(3): 441 – 446.

[7] 朱根发, 陈明莉, 罗智伟, 等. 墨兰与大花蕙兰种间杂种原球茎的诱导及增殖研究[J]. 园艺学报, 2004, **31**(5): 688 – 690.

ZHU Genfa, CHEN Mingli, LUO Zhiwei, *et al.* Induction and propagation of hybrid protocorm like-body of crosses between *Cymbidium sinense* and *Cymbidium hybridum*[J]. *Acta Horti Sin*, 2004, **31**(5): 688 – 690.

- [8] PRITCHARD H W, PRENDERGAST F G. Factors influencing the germination and storage characteristics orchid pollen[G]//PRITCHARD H W. *Modern Method in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- [9] SANFORD W W, BONANOS S, XANIHAKES A. A preliminary study of orchid pollen germination and the chromatographic isolation of a stimulant from columns[J]. *Phytochemistry*, 1963, **3**(6): 671 – 676.
- [10] ANANTHAKALASELVI A, KRISHNASAMY V, VIJAYA J. Stigma receptivity and pollen viability studies in hybrid pearl millet KM2 [J]. *Madras Agric J*, 2000, **86**(10/12): 603 – 605.
- [11] 王利民, 王四清, 王彩霞, 等. 大花蕙兰花粉离体萌发试验初报[J]. 中国农学通报, 2005, **21**(4): 122 – 124. WANG Limin, WANG Siqing, WANG Caixia, *et al.* The imitative pollen budding experiment of *Cymbidium hybridum* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2005, **21**(4): 122 – 124.
- [12] 郭丽霞, 莫饶. 海南原生墨兰花粉萌发试验初报[J]. 中国农学通报, 2007, **23**(6): 594 – 597. GUO Lixia, MO Rao. The imitative pollen budding experiment of Hainan origin *C. sinense* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, **23**(6): 594 – 597.
- [13] 王利民. 大花蕙兰杂交育种研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007. WANG Limin. *Studies on Cross Breeding of Cymbidium hybridum*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2007.
- [14] 郭庆, 王德斌, 王定康, 等. 海风藤花粉活力的测定方法比较[J]. 昆明学院学报, 2009, **31**(3): 65. GUO Qing, WANG Debin, WANG Dingkang, *et al.* Comparative study of the testing method on the pollen viability in *Marsdenia officinalis* Tsiang et P.T.Li [J]. *J Kunming Univ*, 2009, **31**(3): 65.
- [15] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 菊属植物花粉生活力检测方法的比较[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23**(4): 407. ZHAO Hongbo, CHEN Fadi, FANG Weimin. Comparative study of the testing method on the pollen viability in *Dendranthema* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23**(4): 407.
- [16] 胡适宜. 植物学实验方法(一)花粉生活力的测定[J]. 植物学通报, 1993, **10**(2): 60 – 62. HU Shiyi. Experimental methods in plant embryology (I) determination of pollen viability [J]. *Chin Bull Bot*, 1993, **10**(2): 60 – 62.
- [17] 刘林德, 张萍, 张丽, 等. 锦带花的花粉活力、柱头可授性及传粉者的观察[J]. 西北植物学报, 2004, **24**(8): 1432. LIU Linde, ZHANG Ping, ZHANG Li, *et al.* Pollen viability, stigma receptivity and pollinators of *Weigela florida* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2004, **24**(8): 1432.
- [18] 凌春英, 肖恩, 严冬瑾, 等. 大花蕙兰和墨兰花粉活力测定及贮藏研究[J]. 安徽农业科学, 2010, **38**(5): 2312 – 2314. LING Chunying, XIAO En, YAN Dongjin, *et al.* Study of pollen viability testing on *Cymbidium hybridum* and *Cymbidium sinense* and their pollen preservation[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, **38**(5): 2312 – 2314.
- [19] 程式君. 兰花花粉块生命力保存的方法[J]. 园艺学报, 1984, **11**(4): 279 – 280. CHENG Shijun. The study on keeping freshness of orchid pollinia [J]. *Acta Horti Sin*, 1984, **11**(4): 279 – 280.