

白芨花粉活力测定与花粉保存

黄春球¹, 宋天顺¹, 李明静¹, 赵东¹, 徐忠志², 杨少华²

(1. 云南植物药业有限公司, 云南 昆明 650109; 2. 云南省农业科学院 丽江高山经济植物研究所, 云南 丽江 674100)

摘要:测定了白芨花粉及其在不同贮藏温度和湿度条件下的活力。结果表明:0.5% TTC 染色法检测白芨花粉活力效果最佳;10%蔗糖+0.01%硼酸组成的液体培养基上培养得到的白芨花粉的萌发率最高;一般情况下,温度越低,花粉贮藏寿命越长,温度高增强了花粉呼吸强度,易导致花粉营养枯竭,在一定范围内,相对湿度与花粉贮藏寿命呈负相关性;温度为-20℃,湿度为60%~70%的贮藏条件下的白芨花粉的萌发率最高。

关键词:白芨;花粉;花粉活力;温度;湿度

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0182-03

白芨(*Bletilla strima* (Thunb.) Reichb. f)为兰科白芨属多年生草本植物,以干燥块茎药用。具有收敛止血、清热利湿、消肿生肌之功效^[1]。作为天然的粘胶和美容佳品,具有很好的开发和应用前景。但白芨繁殖系数较低,自然繁殖困难,使野生资源比较稀少,很大程度上制约了白芨产业的发展。而花粉在野生状态下萌发率极低是影响有性繁殖的关键因子之一。随着农业技术和育种工作的发展,花粉已作为一种新型的种质资源予以妥善保存和进一步利用^[2]。近年来对白芨的研究较多,但是对于花粉生活力及其保存的研究却是空白。现通过对白芨花粉活力测定方法进行筛选,并研究不同温度和湿度条件下白芨花粉活力的变化,以期找到适宜的测定方法和保存条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取云南植物药业有限公司团结乡白芨种植基地的种质资源。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉的采集 于晴天上午10时用毛笔蘸取当天开花散出的花粉,并用适宜试管收集。

1.2.2 白芨花粉液体培养基配比筛选 配制不同配比的液体培养基(表1),对白芨花粉在室温下进行悬液法培养24 h,于40×10倍光学显微镜下观测花粉的萌发率,3次重复,每重复观测10个视野,然后计算平均值。

表1 白芨花粉液体培养基配比

培养基	浓度/%	
	蔗糖	硼酸
I	10	0.02
II	10	0.01
III	20	0.02
IV	20	0.01

1.2.3 白芨花粉活力测定的无机酸浓度的筛选 分别用5%、10%、15%、20% 4种浓度的硝酸和硫酸来处理白芨花粉,观察其花粉管的伸长率。

1.2.4 花粉活力的测定方法 以70%酒精处理30 min的白芨花粉为对照,分别采用以下方法测定白芨花粉活力,于40×10倍光学显微镜下观测,3次重复,每重复观测10个视野,计算平均值。方法筛选:I₂-KI(0.1%)染色法参照贾文庆方法;红墨水(20%)染色法按照陈家瑞方法;TTC(0.5%)染色法,参照胡适宜方法;硝酸测定法:以浓度为15%的硝酸进行测定。液体培养萌发法:以10%蔗糖+0.01%硼酸配成液体培养基,室温培养白芨花粉24 h。

2 结果与分析

2.1 液体培养基不同配比对花粉萌发的影响

不同浓度蔗糖和硼酸组成的液体培养基对白芨花粉萌发率的影响(图1)。由图1可知,I号培养基中的花粉萌发率为74.41%,II号培养基中的花粉萌发率为76.14%,III号培养基中的花粉萌发率为69.35%,IV号培养基中的花粉萌发率为69.26%,其中II号培养基(10%蔗糖+0.01%硼酸组成的液体培养基)培养得到的白芨花粉的萌发率最高。

2.2 白芨花粉活力测定的无机酸浓度的筛选

不同浓度的硫酸和硝酸对白芨花粉管伸长率的影响,见图2。

第一作者简介:黄春球(1975-),女,工程师,现从事新药开发及科研管理工作。

基金项目:云南省重点产业创新工程资助项目(2008IF007)。

收稿日期:2010-10-27

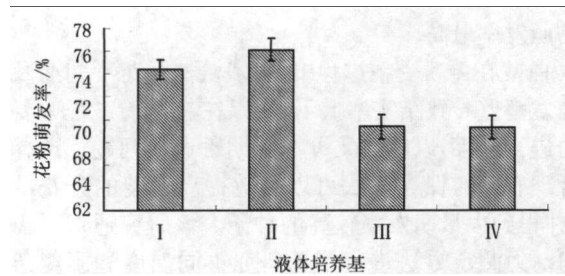


图1 不同浓度蔗糖和磷酸组成的液体培养基中白芨花粉萌发率

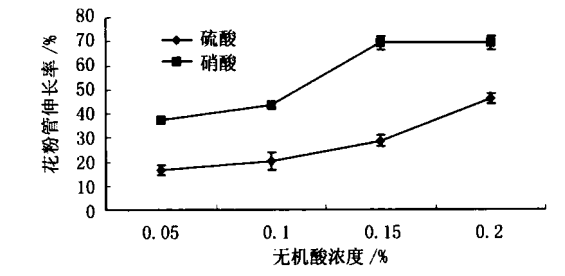


图2 不同浓度的硫酸和硝酸对花粉管伸长率的影响

由图2可知,在经无机酸处理的条件下,白芨花粉管的伸长率随着无机酸浓度的增加而增加,但经相同浓度的硝酸和硫酸处理后的白芨花粉管生长率有较大差异,相同浓度条件下经硝酸处理后的白芨花粉管的伸长

率较高,而经0.15%的硝酸处理后的白芨花粉管生长率最高。

2.3 白芨花粉活力测定方法的筛选

不同花粉活力测定方法对白芨花粉萌发率测定结果的影响,如图3所示。

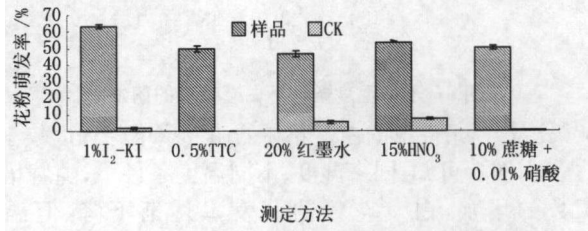


图3 不同花粉活力测定方法的白芨花粉萌发率

由图3可知,1%I₂-KI染色法测得的白芨花粉的萌发率最高,但是同时也测出CK(经处理后的花粉)有一定的萌发率;但用0.5%TTC染色虽然白芨花粉活力不是最高,但测出CK的花粉萌发率为0,从而将待测的白芨花粉与CK的花粉很好的分开,以减小误差。所以,0.5%TTC染色法处理应是最合理的白芨花粉活力的测定方法。

2.4 不同贮藏条件对白芨花粉活力的影响

不同贮藏条件下的白芨花粉活力比较如表2所示。

表2 不同温度、湿度条件下的白芨花粉活力比较

温度 /℃	湿度 /%	天数/d									
		1	2	4	6	10	14	18	24	30	
25	20~30	96.93±0.75	94.37±1.82	90.13±1.14	87.15±2.78	86.95±0.96	80.61±0.31	61.03±2.30	23.41±1.34	6.18±0.46	
	40~50	96.41±0.29	96.18±0.18	95.45±0.21	94.11±0.32	89.91±0.84	89.28±0.59	62.36±0.76	19.27±1.12	12.62±0.09	
	60~70	87.35±0.57	84.71±0.35	83.53±0.73	83.26±0.67	83.23±0.78	80.57±0.47	54.18±0.96	11.77±0.94	1.43±0.29	
	≥75	64.08±1.62	18.43±0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	20~30	96.81±0.63	96.11±0.68	94.97±0.52	91.10±0.84	90.44±1.94	90.27±0.36	63.55±0.92	41.48±1.06	4.77±0.25	
	40~50	95.13±0.88	94.87±0.59	91.98±0.73	90.87±0.86	90.31±0.86	80.79±0.88	60.15±0.74	31.79±0.98	3.58±0.50	
	60~70	94.61±0.68	93.25±0.63	91.12±1.11	89.89±1.12	89.13±1.42	88.36±1.45	63.26±1.56	45.04±2.39	34.86±0.95	
	≥75	92.83±1.51	83.85±1.24	64.57±1.16	21.99±0.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
-20	20~30	95.97±0.88	93.96±1.13	92.30±0.48	87.19±0.61	86.95±1.40	81.79±0.82	61.44±1.34	20.40±0.95	14.19±1.82	
	40~50	88.56±1.22	83.55±0.94	82.87±0.29	82.02±1.09	81.8±1.33	80.83±1.18	59.69±1.07	43.21±0.97	28.18±1.81	
	60~70	91.25±0.77	89.87±0.61	88.90±0.47	83.42±0.40	83.00±0.64	81.65±0.61	78.11±1.14	72.57±1.66	49.55±1.73	
	≥75	88.85±1.13	87.72±0.61	87.42±0.78	87.19±1.85	86.32±1.34	84.25±1.05	74.42±0.68	13.68±1.86	3.62±0.36	
-80	20~30	82.36±1.13	80.39±1.29	79.84±0.57	79.58±1.18	78.42±1.33	76.56±1.12	72.64±1.53	60.40±1.84	46.16±1.42	
	40~50	88.93±1.26	86.77±1.62	86.35±0.69	80.39±1.06	54.51±1.57	47.00±1.24	33.86±1.33	1.29±0.25	0.46±0.40	
	60~70	94.53±0.97	87.79±0.24	80.66±1.25	77.67±1.85	73.18±0.52	72.91±0.59	42.23±2.14	4.79±0.55	2.40±0.54	
	≥75	93.78±1.31	85.18±1.37	64.64±1.83	44.59±2.24	7.16±0.83	1.99±0.21	1.22±0.35	0.00	0.00	

由表2可知,在任何温度、湿度条件下,随着培养天数的增加,花粉的萌发率逐渐下降。在前18d的贮藏过程中,除温度为25℃,湿度≥75%和温度为4℃,湿度≥75%的2份白芨样品花粉活力为0外,其余的白芨样品花粉活力相差不大;在第24天温度为-80℃,湿度≥75%的白芨样品花粉活力也为0;到第30天,各贮藏条件下的白芨花粉活力1.43%~49.55%。

根据表2的结果,对同一温度、不同湿度和同一湿度,不同温度条件下的白芨花粉的萌发率做了进一步的分析,如图4、5所示。

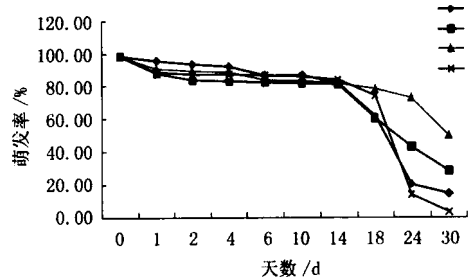


图4 不同湿度条件下白芨花粉的萌发率

由图4可知,同一温度、不同湿度条件下,随着培养天数的增加,白芨花粉的萌发率逐渐下降,但湿度为

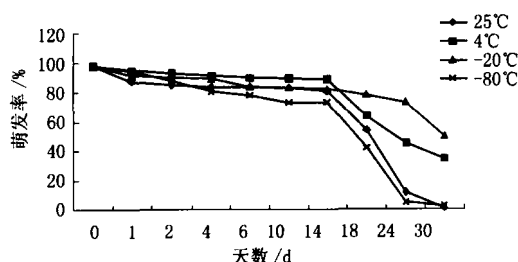


图5 不同温度条件下白芨花粉的萌发率

60%~70%条件下的白芨花粉的萌发率下降程度较小。

由图5可知,同一湿度、不同温度条件下,随着培养天数的增加,白芨花粉的萌发率逐渐下降,但温度为-20℃条件下的白芨花粉的萌发率下降程度较小。结果表明,在温度为-20℃,湿度为60%~70%的贮藏条件下的白芨花粉的萌发率最高。据表2的结果,对不同贮藏条件下的白芨花粉的萌发率做了进一步的方差分析,如表3所示。

表3 不同贮藏条件下的白芨花粉活力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F值
温度(A)	2 325.77	3	775.26	111.081**
湿度(B)	20 048.98	3	6 682.99	957.56**
交互(A×B)	10 996.20	9	1 221.80	175.06**
误差(E)	223.33	32	6.98	
总变异	33 594.29	47		

由表3可知, $F_{0.05}(3,32)=2.90$, $F_{0.01}(3,32)=4.48$, $F(A)=111.081>F_{0.01}$,所以 $P<0.01$,差异极显著。结果表明,温度对白芨花粉的萌发率有极显著影响。 $F_{0.05}(3,32)=2.90$, $F_{0.01}(3,32)=4.48$, $F(B)=957.558>F_{0.01}$,所以 $P<0.01$,差异极显著。结果表明湿度对白芨花粉的萌发率有极显著影响。 $F_{0.05}(9,32)=2.19$, $F_{0.01}(9,32)=3.02$, $F(A\times B)=175.063>F_{0.01}$,所以 $P<0.01$,差异极显著。说明温度与湿度交互对白芨花粉的萌发率有极显著影响。

3 结论与讨论

该试验结果表明,0.5%TTC染色法检测白芨花粉活力效果最佳;10%蔗糖+0.01%硼酸组成的液体培养基上培养得到的白芨花粉的萌发率最高;温度为-20℃,湿度为60%~70%的贮藏条件下的白芨花

粉的萌发率最高。

白芨在传粉受精过程中,很多植株开花不同期及花粉萌发率差导致结实率低下,所以在栽培的过程中要对花粉进行保存,以解决父母本花期不遇的问题。选择一个合理有效的保存方法可以有效提高白芨的开花结实率,并得到大量萌发率较高的种子。该研究通过对白芨花粉活力测定方法进行筛选研究不同温度和湿度条件下白芨花粉活力的变化,为找出适宜的测定方法和保存条件做了有益的探索。

1%I₂-KI染色法测得的白芨花粉的成活率最高,但是同时也测出CK(经处理后无生活率的花粉)有一定的萌发率,此与实际情况有差异;但用0.5%TTC染色法检测出的白芨花粉活力虽然不是最高,但测出CK的花粉生活率为0,从而能将待测的花粉与CK很好分开,以减小误差。所以,0.5%TTC染色法处理应是最合理的白芨花粉活力的测定方法。

贮藏温度和湿度对植物花粉的萌发率有较大的影响。在37~38℃高温条件下,花粉离开花药后,大约20 min就丧失了生活力,但在28~31℃时,各供试品种的花粉寿命都能延长,1 h后还有10%左右的萌发率,这一结果表明,温度与花粉贮藏寿命呈负相关,在一定范围内,温度越低,花粉贮藏寿命越长,温度高增强了花粉呼吸强度,易导致花粉营养枯竭。此外,在一定范围内,相对湿度与花粉贮藏寿命呈负相关性,其原因可能是相对湿度低可使花粉代谢受到抑制,使酶活性减弱,降低呼吸作用,从而使花粉贮藏寿命延长,但极干燥的条件也不利于花粉保存,大多数植物的花粉最适贮藏湿度都在60%以下。

参考文献

- [1] 药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 84.
- [2] 余朝秀, 李枝林, 王玉英. 野生白芨组培快繁研究[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(5): 601-604.
- [3] 胡晋. 花粉的保存和生活力测定[J]. 种子, 1992(6): 35-37, 41.
- [4] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第4册)[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 444.
- [5] 王少先. 4种检验方法在辣椒花粉生活力检验上的应用效果[J]. 河南农业科学, 1998(2): 25-26.

Determination of Pollen Vitality and Preserved Method in *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f

HUANG Chun-qiu¹, SONG Tian-shun¹, LI Ming-jing¹, ZHAO Dong¹, XU Zhong-zhi², YANG Shao-hua²

(1. Yunnan Plant Pharmaceutical Company Limited, Kunming, Yunnan 650109; 2. Lijiang Institute of Aipine Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Lijiang, Yunnan 674100)

Abstract: Determination of pollen vitality and under different temperatures and humidity storage conditions of preserved in *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. The results showed that detection the pollen vitality of best method was 0.5% TTC; pollen germination rate concentrations of the best medium was 10% sucrose acid + 0.01% boric acid in *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f; under normal circumstances, lower temperature the longer the life expectancy of pollen storage; In a certain range, relative humidity and pollen storage life of a negative correlation; temperature of -20℃, humidity was 60% to 70% of the storage conditions of the highest pollen germination rate of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f; pollen; pollen vitality; temperature; humidity