

杜鹃红山茶花粉活力测定方法的比较研究

徐 斌¹, 彭 莉 霞², 潘 文¹, 张 方 秋¹

(1. 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520; 2. 广东生态工程职业学院, 广东 广州 510520)

摘 要:以 4 年生嫁接的杜鹃红山茶花粉为试材, 采用 MTT 法、TTC 法和离体萌发法, 研究了不同测定方法对杜鹃红山茶花粉活力的影响。结果表明: 不同测定方法对杜鹃红山茶花粉活力测定结果影响较大, 其中, 离体萌发法是杜鹃红山茶花粉活力的最佳检测方法, 30℃ 条件下花粉萌发最适培养基为 2.5% 琼脂+100 g/L 蔗糖+10 mg/L 硼酸, 适宜统计的培养时间为 4 h, 花粉萌发率达 58.10%, Ca^{2+} 对花粉萌发起抑制作用; MTT 染色得出 92.5% 的杜鹃红山茶花粉具有活力, 明显高于离体萌发法, 而 TTC 法由于染色不清晰, 不适合用于杜鹃红山茶花粉活力检测。

关键词:杜鹃红山茶; 花粉活力; 离体萌发法; 染色法

中图分类号:S 685.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0088-03

杜鹃红山茶(*Camellia azalea*) 属山茶科山茶属常绿灌木或小乔木, 又名张氏红山茶, 野生状态的杜鹃红山茶仅在广东省阳春市鹅凰嶂省级自然保护区有零星分布, 是我国特有的原生种, 杜鹃红山茶树形优美紧凑、叶片光亮碧绿、花色艳丽密集、一年四季皆可开花, 是培育四季开花茶花品种不可多得的优良亲本, 受到越来越多茶花爱好者和茶花育种专家的关注^[1]。杂交育种作为当前培育杜鹃红山茶新品种的重要手段, 其花粉活力直接影响到有性生殖的效率与能力, 因此, 在杂交育种前对其花粉活力准确快速检测是十分重要的。目前关于杜鹃红山茶花粉活力测定的研究仅见李天菲等^[2]和严丹峰等^[3]采用体外悬滴培养法、刘玉玲等^[4]采用固体培养基发芽方法、赵鸿杰等^[5]采用染色的方法测定了杜鹃红山茶花粉活力, 但都没有系统比较不同测定方法对花粉活力的影响, 这必将影响杜鹃红山茶花粉萌发最适培养基的筛选及花粉活力的测定。该研究采用常用的 TTC 染色法、MTT 染色法和琼脂固体培养基萌发法, 探讨杜鹃红山茶花粉活力的较适测定方法, 系统筛选其花粉萌发最适萌发条件, 以期对杜鹃红山茶的杂交育种提供理论依据和参考。

第一作者简介:徐斌(1974-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 现主要从事观赏植物研究与开发利用等工作。E-mail: xubin@sinogaf.cn.

基金项目:国家“十二五”农村领域国家科技计划子研究资助项目(2012BAD01B0703-2)。

收稿日期:2015-01-22

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集广东省林业科学研究院苗圃内嫁接 4 年生的杜鹃红山茶盛花期花药, 置于硅胶中干燥, 待散粉后收集花粉, 将其充分混匀备用。

1.2 试验方法

1.2.1 TTC、MTT 染色法 参照常规的 TTC、MTT 染色方法和基本条件操作^[6-7], 其中 TTC 和 MTT 的浓度为 5 g/L, pH 7.0, 染色温度 30℃, 染色时间 20min, 用显微镜观察并拍照, 重复 3 次, 共 3 个玻片, 每个玻片随机观察 5 个视野。以花粉染色作为花粉是否有活力的判断标准, 对有活力的花粉进行统计。

1.2.2 花粉萌发法 花粉萌发培养基组分筛选: 在 2.5% 的琼脂基本培养基中分别加入不同质量浓度蔗糖(0、25、50、75、100、125、150、175、200 g/L), 研究杜鹃红山茶花粉离体萌发的最适蔗糖浓度; 在最佳蔗糖浓度条件下, 分别加入不同质量浓度氯化钙(0、10、20、30、40、50、60、70 mg/L), 研究杜鹃红山茶花粉离体萌发的最适氯化钙浓度; 在最佳蔗糖浓度条件下, 分别加入不同质量浓度硼酸(0、10、20、30、40、50、60、70 mg/L), 研究杜鹃红山茶花粉离体萌发的最适硼酸浓度; 花粉培养: 将各个处理所需的培养基组分加热、搅匀, 趁热将培养基均匀倒入直径为 10 cm 大小的培养皿中, 厚度以刚布满皿底为宜, 冷却后将新鲜花粉均匀涂布在培养基上, 将培养皿置于 30℃ 恒温箱内暗培养 4 h 后统计萌发率。

1.3 项目测定

花粉萌发率: 将花粉管长度超过花粉粒直径 2 倍的花粉计为萌发花粉粒。花粉萌发率(%) = 某视野萌发

花粉数/该视野花粉总数 $\times 100\%$ 。每处理统计 5 个视野,每个视野花粉粒不少于 50 粒,3 次重复。

2 结果与分析

2.1 杜鹃红山茶花粉活力的 TTC、MTT 测定

将染液染色后的杜鹃红山茶花粉放置在 30°C 恒温箱中,20min 后观察发现,花粉粒经 TTC 染色后着色数量少,着色淡,不易分辨,重复 3 次结果都一致,检测到花粉活力为 22.9%。杜鹃红山茶花粉经 MTT 染色后,MTT 染色迅速,清晰,效果较好,检测到花粉活力达到 92.5%。

2.2 杜鹃红山茶花粉萌发活力的测定

2.2.1 不同蔗糖浓度下花粉萌发率 从图 1 可以看出,不同浓度的蔗糖对花粉萌发率有较大的影响,在无蔗糖时,杜鹃红山茶花粉萌发率较低,为 13.61%,随着蔗糖浓度的增加,花粉萌发率显著增加,当蔗糖浓度为 100 g/L 时,萌发率达到最大值 58.10%,是不加蔗糖的 4.27 倍;当浓度高于 100 g/L 时反而随着浓度增加萌发率呈下降趋势,蔗糖浓度为 200 g/L 时,杜鹃红山茶花粉萌发率降至 37.60%。

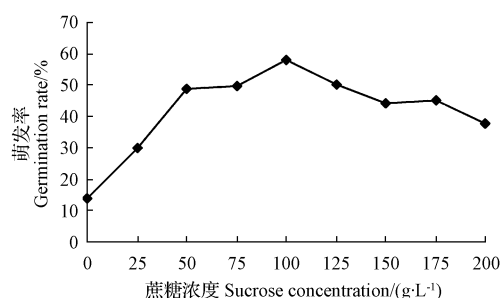


图 1 不同蔗糖浓度对杜鹃红山茶花粉萌发的影响

Fig. 1 Effect of different sucrose concentrations on *C. azalea* pollen germination rate

2.2.2 不同 Ca^{2+} 浓度下花粉萌发率 由图 2 可知,在最佳蔗糖浓度 100 g/L 的培养基中加入 CaCl_2 后,很明显抑制了杜鹃红山茶花粉的萌发,随着 Ca^{2+} 浓度的增加

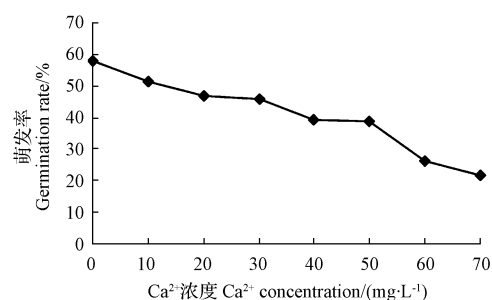


图 2 不同 Ca^{2+} 浓度对杜鹃红山茶花粉萌发的影响

Fig. 2 Effect of different Ca^{2+} concentrations on *C. azalea* pollen germination rate

花粉萌发率逐渐下降, Ca^{2+} 浓度为 70 mg/L 时,杜鹃红山茶花粉萌发率降至 21.53%,明显低于无 CaCl_2 时的 58.10%。

2.2.3 不同硼酸浓度下花粉萌发率 在最佳蔗糖浓度时,当硼酸浓度在 0~10 mg/L 范围内,杜鹃红山茶花粉萌发率随着硼酸浓度的增加而升高,在浓度为 10 mg/L 时达到最大值,萌发率为 73.19%;硼酸浓度在 10~70 mg/L 时,萌发率随硼酸浓度增加而下降,花粉萌发受到抑制。

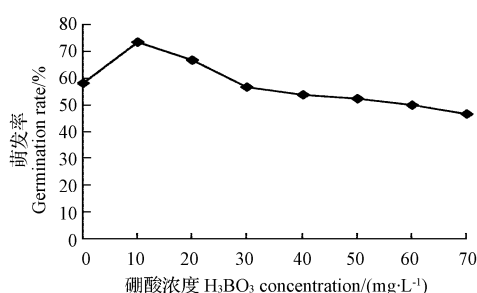


图 3 不同硼酸浓度对杜鹃红山茶花粉萌发的影响

Fig. 3 Effect of different H_3BO_3 concentrations on *C. azalea* pollen germination rate

3 讨论

杜鹃红山茶以种子繁殖为主,在自然条件下自交亲和性很低,因此对其有性生殖过程的研究具有重要的意义^[8]。花粉生活力直接关系到杂交授粉的成功率,而花粉萌发率则是衡量花粉生活力状况的主要测试指标。目前,检测花粉活力的方法主要有离体萌发法和染色法,离体萌发法有效、准确,而染色法则较为快速、简便^[9]。

蔗糖是花粉离体萌发培养基中重要的能源物质,它作为渗透物质对花粉萌发和生长过程起着重要的作用^[10]。该研究中,设置了 9 个不同梯度的蔗糖浓度,研究发现,与其它植物花粉一样^[11-13],蔗糖能促进杜鹃红山茶花粉的萌发,在无蔗糖时,杜鹃红山茶花粉萌发率较低,为 13.61%,这可能是导致在自然条件下杜鹃红山茶结实率较低的原因有关,随着蔗糖浓度的增加,花粉萌发率显著增加,当蔗糖浓度为 100 g/L 时,花粉的萌发率达到最大值 58.10%,浓度高于 100 g/L 时则抑制了杜鹃红山茶花粉的萌发。

Ca^{2+} 的动态变化对启动花粉萌发、调节花粉管伸长等环节具有重要作用^[14-15]。外源 Ca^{2+} 对花粉萌发的作用主要取决于细胞内游离的 Ca^{2+} 含量,当花粉内游离的钙较少时,补充一定的外源 Ca^{2+} ,能有效促进花粉萌发和花粉管生长,但过高的 Ca^{2+} 会造成细胞 Ca^{2+} 中毒及过高的细胞膨压,反而会抑制花粉的萌发和花粉管生长^[16]。该研究发现,杜鹃红山茶花粉在无氯化钙培养基

中萌发率高,加入外源钙则抑制了花粉的萌发,与中国水仙花粉萌发情况一致^[17],这说明杜鹃红山茶花粉内本身 Ca^{2+} 浓度可能较高,花粉萌发时不需要通过补充外源 Ca^{2+} 来促进花粉的萌发,这一结果在以前杜鹃红山茶研究中鲜见报道。

硼酸能刺激并增加花粉对糖的吸收、运转和代谢,进而形成糖硼酸复合体,增加氧气的吸收,适宜的硼酸浓度有利于花粉萌发和花粉管的生长^[18]。在试验中,硼酸对杜鹃红山茶花粉的萌发率有显著影响,最适蔗糖浓度下,杜鹃红山茶花粉萌发率随着硼酸浓度的增加而升高,当硼酸浓度为 10 mg/L 时,杜鹃红山茶花粉萌发率达到最大值。因此,杜鹃红山茶萌发的最佳培养基配方应为 2.5% 琼脂+100 g/L 蔗糖+10 mg/L 硼酸。

在检测花粉活力时,染色法最为简便快捷,但染色法测定误差相对较大。试验表明,MTT 染色法测定的花粉活力远大于离体萌发法测定的花粉萌发率,表明有活力的花粉虽然有潜在的萌发力,但不一定能萌发。TTC 法被广泛应用于检测花粉活性,用 TTC 法染色杜鹃红山茶花粉,由于着色淡、不易分辨,花粉活力测定值较低,因此杜鹃红山茶花粉活性也不适合用该方法,这在其它山茶品种、腊梅和桂花花粉活性检测中也出现类似结果^[5,19-20]。因此,需要较准确的了解花粉萌发力,采用体外萌发法更为精确。

参考文献

- [1] 高继银,Clifford R P,杜跃强.山茶属植物主要原种彩色图集[M].杭州:浙江科学技术出版社,2005:34-35.
- [2] 李天菲,林田,徐碧玉,等.杜鹃红山茶花粉萌发力及贮藏耐性的研究[J].生物技术通报,2008(增刊):239-243.
- [3] 严丹峰,李建光,许宇山,等.杜鹃红山茶花粉活力与柱头可授性研究[J].北方园艺,2013(2):71-73.
- [4] 刘玉玲,潘文,张方秋,等.杜鹃红山茶花粉保存及其生活力测定[J].

广东林业科技,2010,26(2):1-6.

- [5] 赵鸿杰,乔龙巴图,殷爱华,等.3种山属植物花粉活力测定方法的比较[J].中南林业科技大学学报,2010,30(3):105-107.
- [6] 左丹丹,明军,刘春,等.植物花粉生活力检测技术进展[J].安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745.
- [7] 张超仪,耿兴敏.六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J].植物科学学报,2012,30(1):92-99.
- [8] 罗晓莹.杜鹃红山茶保护生物学研究[D].广州:华南农业大学,2006.
- [9] 汤红明,徐冬青,徐根娣,等.植物花粉萌发的研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(24):6436-6438.
- [10] 朱展望,张改生,牛娜.小麦花粉的离体萌发研究[J].麦类作物学报,2007,27(1):12-15.
- [11] 白天,解瑞佳,李世峰,等.糖、硼、钙对大喇叭杜鹃四合花粉萌发的影响[J].上海交通大学学报(农业科学版),2013,31(6):48-54.
- [12] 刘赢男,周丹,刘伟,等.不同培养基及贮藏条件对山梅花属植物花粉生活力的影响[J].东北林业大学学报,2011,39(12):47-49.
- [13] 车代弟,樊金萍,王金刚.东方百合花粉萌发培养基组分的优化[J].植物研究,2003,23(2):178-181.
- [14] Tian H Q,Zhang Z,Russell S D. Isolation of the male germ unit organization and function in tobacco(*Nicotiana tabacum* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1998,18(12):143-147.
- [15] 贾文庆,刘宇,陈韵,等. Ca^{2+} 与葱兰花粉萌发和花粉管生长的关系[J].西北林学院学报,2007,22(4):98-99.
- [16] Malho R,Read N D,Trewavas A J,et al. Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation[J]. The Plant Cell,1995,7(8):1173-1184.
- [17] 罗凤霞,周威,杨春起,等.水仙花粉离体萌发温度和培养液研究[J].辽宁林业科技,2007(5):13-16.
- [18] Graaf B H,Derksen J W,Marianic. Pollen and pistil in the programic phase[J]. Sex Plant Report,2001,14:41-55.
- [19] 周莉花,郝日明,赵宏波.蜡梅花粉活力检测方法筛选及保存时间观察[J].浙江林学院学报,2006,23(3):270-274.
- [20] 杨秀莲,向其柏.桂花花粉活力测定与‘晚籽银’桂柱头可授性分析[J].林业科技开发,2007,21(3):22-25.

Comparative Study on Methods for Testing Pollen Viability of *Camellia azalea*

XU Bin¹, PENG Lixia², PAN Wen¹, ZHANG Fangqiu¹

(1. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520; 2. Guangdong Eco-engineering Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520)

Abstract: Taking 4-year-old grafted *Camellia azalea* as test material, effects of different methods on the viability of pollens collected from *Camellia azalea* were investigated, using the MTT staining method, TTC staining method and pollen germination *in vitro* method. The results showed that the viability of pollens was associated with the testing method, the pollen germination *in vitro* was the optimum method to determine pollen viability of *C. azalea*. The pollen germinating rate reached the highest on the media supplemented with 2.5% agar, 100 g/L sucrose and 10 mg/L boric acid under 30°C after 4 hours. However, adding the Ca^{2+} on the media would prevent the pollen germinating. 92.5% pollen had viability in MTT solution, significantly higher than by pollen germination *in vitro*. TTC staining method was unsuited for detection the pollen viability of *C. azalea*, for its dying unclearly and lower viability rate.

Keywords: *Camellia azalea*; pollen viability; pollen germination *in vitro*; coloration