

温室栽培砂糖橘花粉活力测定方法比较研究

高兴颖¹, 崔世茂¹, 付崇毅², 刘微¹, 褚义红¹, 朱山川¹

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农牧业科学院 蔬菜研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘 要:以 5 a 生枳砧砂糖橘嫁接苗为试材, 研究比较了离体萌发法、TTC 染色法、I₂-KI 染色法和 MTT 染色法对花粉活力的测定效果及其对砂糖橘有叶花和无叶花 2 种类型离体花粉活性的影响。结果表明: 砂糖橘无叶花花粉活性高于有叶花花粉活性; MTT 染色法是简单快速测定砂糖橘花粉活性的最佳方法。

关键词:砂糖橘; 花粉活力; 离体萌发法; MTT 染色法; TTC 染色法; I₂-KI 染色法

中图分类号:S 666.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)03-0039-03

砂糖橘(*Citrus reticulata* ‘Shatangju’)属芸香科柑橘属常绿小乔木或灌木, 又被称为十月桔。原产于广宁、四会等地区, 目前主要的产地有四会、广宁、云浮、清远、德庆、南盛镇等地区, 是这些地区柑橘主栽的主打品种之一。砂糖橘因其味鲜美极甜, 口感细腻, 果肉爽脆而深受人们喜爱, 所以近几年北方高寒地区结合观光农业在日光温室进行生产, 其价格也较高, 是都市城郊农业观光采摘的上选品种。

目前, 柑橘的落花落果现象极为普遍, 而温室砂糖橘的落花落果现象尤为严重。砂糖橘花量极大, 多数可达到一树千花, 且以无叶花居多, 数量是有叶花的 3 倍以上, 但砂糖橘的坐果率很低, 极大部分的无叶花都会出现落花落果的现象, 其有叶花坐果率明显高于无叶花。现以 5 a 生枳砧砂糖橘嫁接苗为试材, 研究比较了离体萌发法、TTC 染色法、I₂-KI 染色法和 MTT 染色法 4 种花粉活力测定方法对砂糖橘有叶花和无叶花 2 种类型离体花粉活性的影响, 探索有叶花和无叶花的花粉活性是否为造成有叶花和无叶花坐果率差异的原因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 5 a 生枳(*Poncirus trifoliata* Raf.)砧砂糖橘(*Citrus reticulata* ‘Shatangju’)嫁接苗为试验材料, 种植于内蒙古农业大学教学基地日光温室内。试验日光温室墙体为砖墙夹聚苯板保温墙, 跨度 7.5 m, 脊高 3.5 m,

墙体厚度为 0.6 m。盛花期期间, 在天气晴好的上午于 8:00~10:00 选取即将开放的花蕾, 按有叶花和无叶花分类取回进行花粉萌发活力试验。在室温条件下使花药开裂自然散粉, 按有叶花和无叶花分开收集储存备用。

1.2 试验方法

试验于 2012 年 4 月中下旬在内蒙古农业大学农学院设施园艺实验室内进行。

1.2.1 离体萌发法 液体培养基的配制主要参考 Brewbaker & Kwack 培养基的配方, 并略加改动^[1]。无机盐贮备液: BHO₃ 0.1 g; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.3 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g; KNO₃ 0.1 g; 蒸馏水 100 mL。花粉萌发培养基: 无机盐贮备液 1 mL, 蔗糖 1 g, 蒸馏水 9 mL, 使蔗糖完全溶解。将花粉置于盛有萌发培养基的双凹面载玻片中, 将载玻片放入保湿的培养皿中, 置于 30℃ 的培养箱中培养, 每隔 30 min 观察 1 次, 当花粉管的长度等于或超过花粉直径时视为萌发。

1.2.2 TTC 染色法 TTC 染色法的基本原理: 当 TTC 渗入细胞后, 可被呼吸代谢中的还原酶所还原, 并由无色变为红色, 以此来判断花粉的生活力^[2]。取适量花粉置于载玻片上, 加入适量 TTC 溶液, 放在 30℃ 恒温箱中 15 min, 然后在显微镜下观察, 花粉活力的强弱顺序为红色、浅红色、无色。花粉生活力 = 红色花粉粒的数目(粒)/花粉粒总数(粒) × 100%^[3]。

1.2.3 I₂-KI 染色法 I₂-KI 染色法是根据淀粉遇碘变蓝的性质, 凭借蓝色的深浅程度来判断花粉粒中淀粉含量的多少, 继而确定花粉活力的强弱^[2]。称取 2 g 的 KI 溶于 10 mL 蒸馏水中, 再加入 1 g 的 I₂, 完全溶解后用蒸馏水定容至 300 mL。染色时, 取少量花粉置于载玻片上, 滴 1~2 滴 I₂-KI 染色液, 盖上盖玻片, 尽量减少气泡的存在, 5 min 后显微镜下观察, 凡是染成蓝黑色的花粉

第一作者简介:高兴颖(1987-), 女, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 研究方向为设施园艺及抗逆生理。E-mail: gaoxingyinga@163.com.

责任作者:崔世茂(1961-), 男, 山西代县人, 教授, 博士生导师, 现主要从事园艺作物抗逆生理和园艺设施及环境调控研究等工作。E-mail: cuishimao@sina.com.

基金项目:内蒙古科技厅科技推广资助项目(20110710)

收稿日期:2013-10-24

具有较强的生活力,淡蓝色次之,几乎无色的为无活力花粉。

1.2.4 MTT 染色法 MTT 染色法是根据花粉粒中脱氢酶的活性强弱来判断花粉的生活力强弱^[4]。取 0.1 g MTT,0.5 g 蔗糖用蒸馏水溶解,完全溶解后用蒸馏水定容至 100 mL。染色时取适量花粉置于载玻片上,滴 1~2 滴染色液,30 min 后在显微镜下观察,花粉变成深粉红色或表面出现不规则黑线时证明花粉有活力。

1.3 数据分析

每个处理 3 次重复,每次随机选取 10 个视野,利用

Excel 2003 进行数据处理,计算花粉萌发百分率或染色百分率,并用 SAS 9.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 有叶花和无叶花花粉离体萌发活性

在液体培养基中培养 4.5 h 后,砂糖橘的花粉开始萌发(图 1、2)。从表 1 可以看出,有叶花和无叶花的花粉萌发率分别为 25.18%、29.30%,且无叶花的花粉活性高于有叶花。经过方差分析检验,二者离体萌发率差异显著。

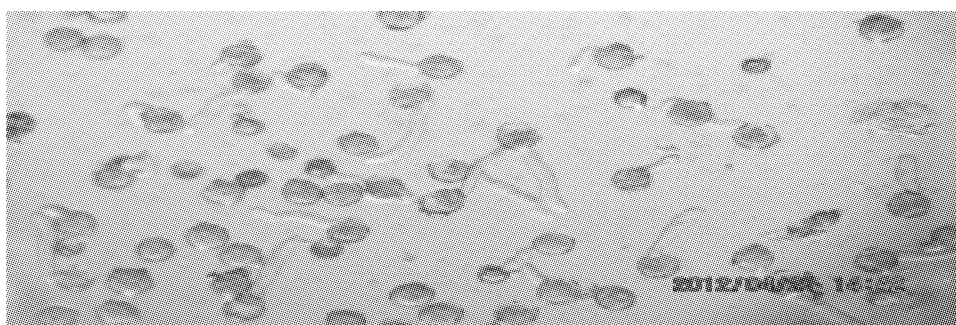


图 1 无叶花花粉离体萌发

Fig. 1 *In vitro* germination of non-leaf flower pollen

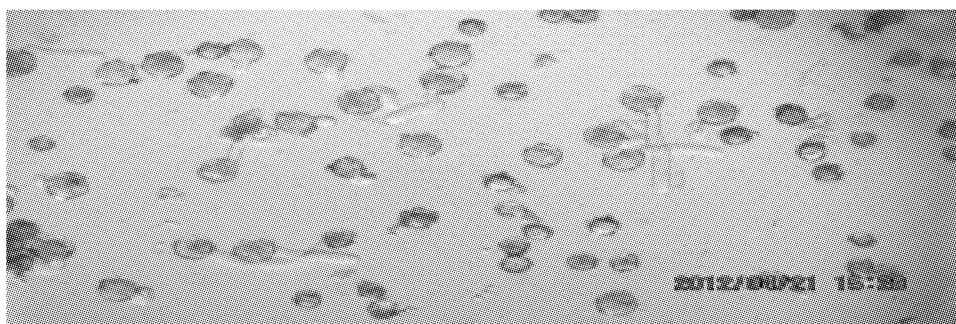


图 2 有叶花花粉离体萌发

Fig. 2 *In vitro* germination of the flower with leaves pollen

2.2 TTC 法

关于 TTC 染色法的相关报道较多,郭军洋等^[5]、孙德权^[6]、赵统利等^[7]研究表明,TTC 已使用于测定黄瓜、番木瓜、百合等花粉的活性。但此染色法染色后颜色差异小,不便观察,不易统计(表 2)。该试验中砂糖橘花粉经 TTC 染色后,无论是砂糖橘的有叶花还是无叶花均只有极少数可被染色,因此,该方法不适合测定砂糖橘的花粉活性。

表 1 砂糖橘花粉离体萌发率

Table 1 *In vitro* germination rate of pollen of *Citrus reticulata* 'Shatangju'

砂糖橘花型 Type of flower	花粉离体萌发率 Pollen germination rate/ % 平均数 Average	5%差异 $F_{0.05}$
有叶花 The flower with leaves	25.18	a
无叶花 Non-leaf flower	29.30	b

表 2 砂糖橘花粉 TTC 染色法染色百分率

Table 2 The percentage of TTC staining method on pollen of *Citrus reticulata* 'Shatangju'

砂糖橘花型 Type of flower	TTC 染色率 The percentage of TTC 平均数 Average/ %	5%差异 $F_{0.05}$
有叶花 The flower with leaves	4.87	a
无叶花 Non-leaf flower	6.54	b

2.3 I₂-KI 染色法

I₂-KI 染色法是利用淀粉遇碘变蓝的性质来判断花粉活性高低的,即只要花粉中含淀粉无论有无活性都能染色,所以此法的花粉染色百分率远远高于实际花粉活性,肖金平等^[8]研究认为,I₂-KI 染色法适用于柑橘的花粉活性测定。经过染色,砂糖橘的有叶花和无叶花的染色百分率均在 80%以上,远远高于离体培养花粉的萌发

率,但完全被染成蓝黑的花粉百分率无叶花高于有叶花,其结果与离体培养的总趋势相似(表 3)。说明砂糖橘无叶花花粉活力高于有叶花花粉活力。

表 3 砂糖橘花粉 I₂-KI 染色法染色百分率

Table 3 The percentage of I₂-KI staining method on pollen of *Citrus reticulata* 'Shatangju'

砂糖橘花型 Type of flower	I ₂ -KI 染色率 The percentage of I ₂ -KI 平均数 Average	5%差异 F _{0.05}
有叶花 The flower with leaves	80.23	a
无叶花 Non-leaf flower	85.61	b

2.4 MTT 染色法

从表 4 可以看出,经 MTT 染色后,砂糖橘无叶花花粉可被染色的达到 84.98%,其中活性极强的为 13.69%;有叶花花粉可被染色的达到 74.02%,其中活性极强的为 12.63%。结果表明,砂糖橘 MTT 染色法染色后其染色百分率偏高于离体萌发百分率,除与花粉粒中自身脱氢酶的活性差异有关外,还可能与染色标准主观判断有关,该结果与姜雪婷等^[9]对梨花粉活力的测定结果以及张超仪等^[10]对杜鹃花属植物花粉活力的测定结果相同。虽然染色百分率偏高,但其结果同样表明砂糖橘无叶花的花粉活性高于有叶花。相较于 TTC 染色法、I₂-KI 染色法而言,MTT 染色法是适合测定砂糖橘花粉活力的较好的方法。

表 4 砂糖橘花粉 MTT 染色法染色率

Table 4 The percentage of MTT staining method on pollen of *Citrus reticulata* 'Shatangju'

砂糖橘花型 Type of flower	MTT 染色率 The percentage of MTT/%	
	可被染色 The percentage of pollen can be dyed	活性极强 The percentage of pollen with high activity
有叶花 The flower with leaves	74.02a	12.63a
无叶花 Non-leaf flower	84.98b	13.69b

3 讨论与结论

该试验结果表明,砂糖橘无叶花的花粉活性高于有叶花的活性,说明花粉无叶花的坐果率低于有叶花不是由于花粉活性低造成的,可能是由于子房质量造成的。

3 种染色方法中,TTC 染色法的砂糖橘花粉基本不能被染色,所以 TTC 染色法不适合进行砂糖橘的花粉染色百分率的测定。I₂-KI 染色法染色的实质是淀粉遇碘变蓝,即只要花粉中含淀粉无论有无活性都能染色,所以此法的花粉染色百分率远远高于实际花粉活性,但其统计数据表明无叶花花粉的染色百分率高于有叶花,与花粉离体萌发结果相符。MTT 染色法相较于其它 2 种方法而言是更适合测定砂糖橘的花粉活性的简单易行的方法。

参考文献

- [1] 赵元杰,蒋建雄,刘明稀,等. 芒(*Miscanthus sinensis* Anderss)花粉生活力测定方法比较[J]. 中国农业通报,2009,25(24):147-150.
- [2] 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.
- [3] 杨成利,刘庆华,王奎玲,等. 耐冬山茶(*Camellia japonica*)花粉活力测定及人工授粉研究[J]. 江西农业学报,2009(8):138-141.
- [4] 姬慧娟,尹林克,严成,等. 多枝怪柳的开花动态及花粉活力和柱头可育性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2009,37(5):114-118.
- [5] 郭军洋,陈龙正. 黄瓜现采花粉生活力最佳染色法的筛选[J]. 广州农业科学,2004(6):48-49.
- [6] 孙德权. 番木瓜花粉生活力及其贮藏性研究[J]. 福建果树,2005,113(2):4-5.
- [7] 赵统利,周翔,朱朋波,等. 百合花粉生活力测定方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2006(5):88-89.
- [8] 肖金平,陈力耕,叶伟其,等. “丽槿 2 号”无核柑桔花粉育性及超微结构观察[J]. 浙江林业科技,2006,26(1):36-38.
- [9] 姜雪婷,杜玉虎,张绍铃,等. 梨 43 个品种花粉活力及 4 种测定方法的比较[J]. 果树学报,2006,23(2):178-181.
- [10] 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.

Comparison Study on Pollen Viability Determining Methods of *Citrus reticulata* 'Shatangju' in Solar Greenhouse

GAO Xing-ying¹, CUI Shi-mao¹, FU Chong-yi², LIU Wei¹, CHU Yi-hong¹, ZHU Shan-chuan¹

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019; 2. Vegetable Institute, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Hohhot, Inner Mongolia 010031)

Abstract: Taking grafted seedlings of *Citrus reticulata* 'Shatangju' on rootstock of trifoliate orange as material, the determination effects of I₂-KI, TTC, MTT and *in vitro* pollen germination method were compared and their effect on *in vitro* activity of pollen between the different types of flower (the flower with leaves and non-leaf flower) of *Citrus reticulata* 'Shatangju' were studied. The results indicated that the pollen of *Citrus reticulata* 'Shatangju' viability of non-leaf flower was higher than the pollen viability of flower with leaves. MTT staining method was the optimum and rapid staining method to determine pollen viability of *Citrus reticulata* 'Shatangju'.

Key words: *Citrus reticulata* 'Shatangju'; pollen viability; *in vitro* pollen germination method; MTT staining method; TTC staining method; I₂-KI staining method