

青花菜绿雄 60 小孢子单核靠边期与花蕾外部形态特征研究

朱惠霞, 陶兴林, 胡立敏, 刘明霞

(甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以青花菜 F₁ 代杂种绿雄 60 为材料, 研究了青花菜小孢子单核靠边期花蕾的特征。结果表明, 通过整枝可以得到发育整齐的青花菜小孢子花蕾, 当花蕾长度为 3.70~4.70 mm 时, 单核靠边期小孢子比例最高, 此时花蕾为绿色, 花药黄绿色, 花瓣/花药为 0.83~1.00。以上指标可以作为青花菜小孢子取样的参考指标。

关键词: 青花菜; 绿雄60; 花蕾长度; 小孢子; 单核靠边期

中图分类号: S635.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)06-0019-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.06.007

Studies on the Characteristic of Mid-late Uninucleate Stage of Lüxiong 60 *Brassica oleracea* L.

ZHU Huixia, TAO Xinglin, HU Limin, LIU Mingxia

(Institute of Vegetables, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Lüxiong 60 of *Brassica oleracea* L as the experimental material, the characteristics of mid-late uninucleate stage of microspore bud side is researched. The result shows that the training can get a neat microspore bud development, when the bud length is 3.70 ~ 4.70 mm, mononuclear side has the highest percentage of microspore stage, the buds of green, anthers yellow-green, petals/anther ratio is 0.83 ~ 1.00. These indicators can be a reference index of broccoli microspore sampling, provide the basis for accurate sampling.

Key words: *Brassica oleracea* L.; Lüxiong 60; Flower buds; Microspore; Mid-late uninucleate stage

近 30 年来, 我国许多单位开展了青花菜小孢子培养技术研究, 对影响小孢子出胚的主要因素如材料的基因型、花蕾取样时期、培养基成份、预处理方式等方面进行了大量研究^[1-4], 建立了小孢子培养技术体系。大量研究认为, 适合青花菜小孢子培养的适合时期是单核靠边期, 且单核靠边期小孢子占 70% 以上时, 才有可能获得成

功^[5-6]。但不同基因型的供体植株间小孢子培养最佳时期也不同, 且在大批量的小孢子培养过程中, 通过镜检进行取样则费时费力, 因此, 在培养前对花蕾的形态指标与小孢子发育时期的对应关系进行研究显得尤为重要。我们以青花菜绿雄 60 为研究材料, 在花球膨大过程中进行了 2~3 次整枝, 以期得到发育同步性一致的花蕾, 并观察

收稿日期: 2017-05-02

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1506RJZA196)、甘肃省农业科学院中青年创新基金(2016GAAS47)、农业部园艺作物生物学与种质创制西北地区科学观测试验站项目(2015-A2621-620321-G1203-066)部分内容。

作者简介: 朱惠霞(1979—), 女, 甘肃民勤人, 助理研究员, 主要从事蔬菜遗传育种工作。联系电话: (0931)7754992。E-mail: zhuhuixia@gasagr.ac.cn。

transporter genes in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(20): 6013-6021.

[23] LI S L, WANG H X, WU Y S. Antagonistic effects of zinc on cadmium in water hyacinth[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 1990, 10(2): 249-254.

[24] 陈晓婷, 王 果, 梁志超, 等. 钙镁磷肥和硅肥对

Cd、Pb、Zn 污染土壤上小白菜生长和元素吸收的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然版, 2002, 31(1): 109-112.

[25] 高柳青, 杨树杰. 硅对小麦吸收镉的影响及其生理效应[J]. 中国农学通报, 2004, 20(5): 246-246.

(本文责编: 陈 伟)

花粉的发育时期, 研究花蕾外部形态与小孢子发育时期的对应关系, 确定小孢子单核靠边期花蕾纵横径、花瓣长、花药长、花瓣/花药(PI)比值、花药颜色、花瓣颜色等一系列特征, 以期为青花菜小孢子培养精准选样提供参考依据, 旨在为青花菜小孢子培养技术体系进入规模化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为青花菜 F₁ 代杂交种绿雄 60。于 2016 年 8 月 25 日育苗, 9 月 20 日定植至日光温室, 正常田间管理, 培养植株抽薹开花, 11 月底初花期开始采集花蕾供试。

1.2 整枝方法

花球直径 8~10 cm 时第 1 次削球疏枝, 花径伸长后进行 2~3 次整枝疏花^[7], 每株保留 3~4 个主枝, 每个主枝留 3~4 个 1 级分枝, 最终只 20 个左右花序用于试验, 以自然抽薹不整枝植株上的花蕾为对照。

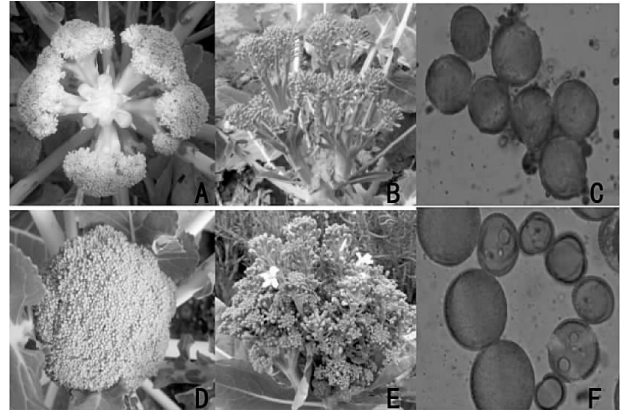
1.3 取样及观测方法

晴天 8:00~9:00 时采摘青花菜花序, 用游标卡尺测量花蕾长度, 按长度分为 5 个等级: 2.00~2.99、3.00~3.99、4.00~4.49、4.50~4.99、5.00~6.00 mm, 每个等级取 5 个花蕾, 计算平均值。先在载玻片上滴一滴醋酸洋红染液, 然后用镊子将花药从花蕾中剥出, 置于载玻片上, 轻轻挤压, 使花药中的小孢子均匀游离于染液中。去除花药壁等杂质, 盖上玻片, 制成临时压片, 显微镜下观察小孢子的细胞学特征, 随机观察 5 个视野, 统计单核靠边期小孢子所占比例, 比较整枝处理对小孢子发育同步性的影响, 确定单核靠边期至双核早期所对应的花蕾长度及其他特征。

2 结果与分析

2.1 整枝对花蕾发育同步性的影响

从结球期到开花期, 经过整枝处理的植株花序营养充足, 长势强, 发育快, 开花期提早 3~5 d, 花蕾饱满(图 1A、B)。显微观察发现, 不同长度的花蕾小孢子发育时期整齐一致(图 1C), 同一时期的小孢子能达到 60%以上, 适宜进行小孢子培养。未经整枝的花球由于营养不足, 花球抽薹较慢, 且干花较多, 花蕾瘦小(图 1C、D), 由于花球内部通透性差, 花球中间有腐烂, 显微观察发现, 花蕾小孢子发育极不同步(图 1F), 即在同一花蕾中存在各个发育时期的小孢子, 单核靠边



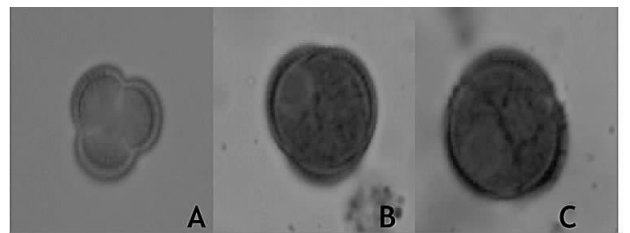
A、B、C 为整枝处理, D、E、F 为未整枝处理

图 1 整枝对小孢子发育同步性的影响

期的小孢子在 50%以下, 不适宜进行小孢子培养。

2.2 小孢子不同发育时期的形态观察

对青花菜绿雄 60 不同大小花蕾小孢子进行显微观察发现(图 2), 花蕾长 2.00 mm 以下时, 花蕾中的花粉细胞大多处于四分体时期, 随着花蕾的长大, 四分体逐渐释放形成单个小孢子。早期的小孢子, 体积较小, 花粉壁较薄, 细胞核位于中央, 形状似小梅花(图 2A), 三棱状明显; 随后小孢子体积逐渐增大, 内含物增多, 液泡增大, 颜色逐渐加深, 外形逐渐接近圆形, 细胞核位于花粉边缘(图 2B), 此时为单核靠边期, 小孢子继续发育膨大, 形成 1 大 1 小 2 个核, 较大的营养核染色较浅, 较小的生殖核染色较深, 此时为双核早期(图 2C)。若在青花菜生长过程中不进行疏枝, 则花蕾发育会出现不同步性, 严重影响小孢子的培养效果。



A 为单核早期, B 为单核靠边期, C 为双核期

图 2 小孢子发育时期

2.3 不同长度花蕾中单核靠边期小孢子所占比例

以整枝处理过的植株上不同长度的花蕾为材料, 每组选 5 个花蕾, 用游标卡尺测量长度, 显微镜下每花蕾取 5 个视野观察, 统计单核靠边期小孢子所占比例, 计算平均值。花蕾长度为 2.40~3.20 mm 时, 小孢子基本处于单核早期; 花蕾长度为 3.21~3.69 mm 时(表 1), 大多数小孢子

表1 青花菜绿雄60不同长度花蕾形态特征

纵径/mm	横径/mm	纵横比	花瓣长/mm	花药长/mm	瓣药比值	花蕾颜色	花药颜色	单核靠边期所占比例/%
2.40	1.80	1.33	1.30	1.90	0.68	淡黄	绿	≤30
3.20	2.15	1.49	1.60	2.30	0.70	黄绿	绿	41
3.70	2.33	1.58	2.00	2.40	0.83	绿	淡绿	66
4.20	2.62	1.66	2.70	2.90	0.93	绿	黄绿	72
4.70	2.75	1.71	3.40	3.40	1.00	绿	黄绿	57
5.40	2.91	1.86	0.45	0.34	1.32	深绿	黄	≤40

处于单核中期；花蕾长度 3.70 ~ 4.70 mm 时，单核靠边期所占比例较大，其中花蕾长度 4.20 mm 时达 72%，此时适合进行小孢子培养。而花蕾长度超过 4.70 mm 时，个别花粉粒逐渐趋于椭圆形，随着长度增大，单核靠边期小孢子所占比例逐渐减少，花粉粒变为椭圆形，接近成熟。因此，取样时候可以在 4.20 mm 左右范围重点观察，力争精确取样。

2.4 花瓣与花药比值(P/I)与小孢子单核靠边期的关系

以整枝处理过的植株上的花蕾为材料，重点测定花蕾长度在 3.20 ~ 5.40 mm 的花蕾长度。用镊子轻轻拨开花蕾，取下花瓣和花药，分别用游标卡尺测定长度，每组花蕾测定 5 个花蕾，计算平均值，再显微观察对应的花药小孢子发育时期。发现 P/I 值在 0.93 时，单核靠边期小孢子所占比例最大，为 72%，最适合进行小孢子培养；大于或小于 0.93 时，所占比例逐渐下降，在 P/I 为 0.83 和 1.00 时分别为 66% 和 57%，可以进行培养。因此，在具体进行小孢子培养的试验中，合适的 P/I 值为 0.83 ~ 1.00，在此范围内可进一步精确。P/I 值受基因型影响较小，与材料花蕾本身的大小无关系，可以作为取样的可靠标准。

2.5 不同长度花蕾发育形态特征

从表 1 可以看出，在花蕾的整个发育过程中，花蕾颜色变化顺序为淡黄→黄绿→绿→深绿，花药颜色变化顺序为绿→淡绿→黄绿→黄色，花蕾颜色逐渐变深，直至成熟开放。观察不同花蕾长度下相应的花药，发现处于单核靠边期的花蕾颜色为绿色，而花药颜色是淡绿或者黄绿色，在取样时，首先可将花蕾和花药颜色作为参考标准进行粗取样，然后再通过其余指标综合判断，达到精确取样的目的。

3 结论

青花菜绿雄 60 花球经过 2 ~ 3 次疏枝和后期疏蕾后，小孢子发育整齐一致，适合进行小孢子培养研究。花蕾长度在 3.70 ~ 4.70 mm 时，单核靠边期所占比例较大，此时花蕾横径 2.33 ~ 2.75 mm，纵/横比值 1.58 ~ 1.71，花瓣长度 2.00 ~ 3.40 mm，花药长度 2.40 ~ 3.40 mm，花瓣/花药比值 0.83 ~ 1.00，花蕾绿色，花药淡绿到黄绿色。在实际操作中因材料基因型和栽培管理方式不同，花蕾大小不同，花蕾纵横径也不同，因此不能依据单一标准进行取样。但花瓣/花药比值和花药颜色可以作为取样参考标准，结合多个指标，在一定范围内取样观察，将大大减少工作量，提高取样的精确性。

参考文献：

- [1] 方淑贵, 陈文辉, 曾小玲, 等. 影响青花菜游离小孢子培养的若干因素[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(1): 51-55.
- [2] 冯 翠. 结球甘蓝和青花菜游离小孢子培养技术的优化[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [3] 孙继峰, 方智远, 袁素霞, 等. 不同温度预处理对青花菜小孢子胚胎发生的影响[J]. 园艺学报, 2015, 42(3): 563-568.
- [4] 张振超, 耿鑫鑫, 戴忠良, 等. 甘蓝类植物小孢子培养及植株再生研究[J]. 核农学报, 2013, 27(7): 929-937.
- [5] 张恩慧, 马英夏, 杨安平, 等. 甘蓝小孢子培养中花蕾长度与细胞单核期的关系[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 124-128.
- [6] 袁建民, 木万福, 杨 龙, 等. 青花菜小孢子发育时期与花器形态的相关性[J]. 中国农学通报, 2016, 32(34): 123-128.
- [7] 王 鑫, 刘 争, 张恩慧. 甘蓝花蕾小孢子发育同步性影响因素初步探讨[J]. 西北农业学报, 2015, 24(7): 113-118.

(本文责编: 郑立龙)