

同源四倍体青花菜花粉活力及结籽性研究

张蜀宁¹, 张 杰^{1,2}, 孙成振¹, 王建军¹

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 江苏 南京 210095; 2. 云南农业大学园艺系, 云南 昆明 650201)

摘 要: 以二、四倍体青花菜为材料, 采用 TTC 法、离体和原位萌发法研究其花粉活力, 并用正交设计法研究其结籽性。结果表明: 1) TTC 染色试验中四倍体与二倍体花粉可染率分别为 48.6% 和 60.8%, 差异显著。2) 离体萌发试验中 4X 花粉在 4 h 时萌发率最大, 达 66.45%, 4 h 后萌发率稳定; 2X 在 5h 时萌发率最大, 达 69.4%, 5 h 后萌发率稳定; 4X 花粉中有大小异常的未萌发花粉, 2X 花粉中未发现, 花粉粒大小均一。3) 花粉原位萌发试验中四倍体花粉管较短并有较多异常生长现象, 与二倍体杂交相比, 四倍体花粉萌发不整齐, 一致性较差; 四倍体杂交、自交及二倍体自交等 3 组合花粉原位萌发结果近似, 显著低于二倍体杂交组合。4) 结籽性测定试验中二倍体杂交与自交组合结籽指数显著高于四倍体杂交与自交组合, 经过选择, 四倍体自交结籽指数 2009 年比 2008 年提高 62.1%。

关键词: 青花菜; 同源四倍体; 花粉活力; 结籽指数

中图分类号: S 634.303.5 文献标识码: A

Pollen Viability and Seed Formation of Autotetraploid Broccoli

ZHANG Shu-ning¹, ZHANG Jie^{1,2}, SUN Cheng-zhen¹, WANG Jian-jun¹

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 2. Department of Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: Diploid and autotetraploid broccoli plants' pollen viabilities were studied by using TTC staining, in vitro as well as in situ germination, and their seed formation abilities by orthogonal experimentation. The results showed that: 1) the pollen TTC staining rates of the tetraploid and the diploid were 48.6% and 60.8%, respectively, which were significantly different; 2) the in vitro pollen germination rate of the autotetraploid reached a maximum of 66.45% in 4h and leveled off afterward, while that of the diploid peaked at 69.4% in 5h and then leveled off; 3) abnormalities were found on the size and germination of the autotetraploid pollen, while those were uniform for the diploid pollen; 4) the germination rate of the autotetraploid was lower than that of the diploid broccoli, the pollen tubes of the autotetraploid grew slower with more irregularities than did the diploid broccoli, the in situ germinations of the hybrid and self-bred autotetraploid, as well as, the self-bred diploid were similar, but significantly lower than the diploid hybrids; and 5) the seed formation indices of the hybrid and self-bred diploid were significantly higher than that of the autotetraploid. Through selection process, the seed formation of self-bred autotetraploid was improved by 62.1% in 2009 from 2008

Key words: broccoli; autotetraploid; pollen viability; seed formation index

人工诱导获得的同源四倍体植株在表现出倍性优势的同时, 也会伴随着一些缺陷的出现, 尤其以稃性的降低为同源四倍体利用的最大障碍^[1]。对同源四倍体稃性的研究在不结球白菜^[2]、青花菜^[3]、甘蓝^[4]、番茄^[5]、黄花菜^[6]等作物上已有报道。

花粉活力是指影响花粉萌发生长以及最终完成受精的全部潜在能力, 所含的内容较为广泛, 包括花粉内部生理生化性能、花粉萌发特性、花粉管生长、受精活力、生命力、贮藏性能、花粉寿命等, 近年国内外对花粉活力方面研究有较多报道^[7- 10],

收稿日期: 2010- 11- 02 初稿; 2011- 03- 01 修改稿
作者简介: 张蜀宁 (1956-), 男, 副教授, 研究方向: 蔬菜遗传与育种 (E-mail: snzhang@njau.edu.cn)
通讯作者: 王建军 (1956-), 男, 副教授, 研究方向: 蔬菜遗传与育种 (E-mail: wangjianjun@njau.edu.cn)
基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE201130172)

本研究以本试验室经秋水仙素诱导获得的同源四倍体青花菜 ($2n = 4x = 36$) 为材料, 通过对二、四倍体青花菜花粉活力的系统比较, 试阐述同源四倍体青花菜的结籽性, 以期四倍体青花菜的育种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

同源四倍体青花菜自交系 08Q-1, 08Q-8 ($2n = 4x = 36$), 二倍体青花菜 08CK-1, 08CK-2 ($2n = 2x = 18$) 由南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室提供。2008 年 9 月播种, 2009 年 3~6 月进行试验。

1.2 方 法

1.2.1 采用 TTC 染色法^[11] 测定花粉生活力, 统计 500 粒花粉的可染率。

1.2.2 采用离体萌发法测定花粉活力^[12]。收集当天开花的二、四倍体各 30 朵, 混合采集花粉。接种在 0.5% 琼脂+ 10% 蔗糖+ 0.03% 硼酸+ 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 配制培养基上, 25℃ 暗培养 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 h。镜检记数, 以花粉管长度超过花粉粒直径作为花粉萌发标准, 每处理随机取 30 个视野统计花粉粒 500 粒以上; 每处理随机取 30 个已萌发花粉粒, 测量花粉管长度, 重复 4 次^[13]。

1.2.3 花粉原位萌发及花粉管生长的观测。蕾期授粉 2X ⊙、2X × 2X、4X ⊙、4X × 4X 四个组合。经过 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48 h, 取雌蕊立即用 FAA 固定液固定。参照陶书田^[14] 及张恩慧^[15] 的方法, 从固定液中取出雌蕊, 蒸馏水冲洗 3 次, 40℃ 下 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液软化处理 15 min, 蒸馏水冲洗 1 次, 用 0.1% 苯胺蓝染色液 (1% K_3PO_4 配制) 染色, 24 h 后将雌蕊置于载片上, 加 1 滴甘油, 压片。荧光显微镜下观察柱头花粉的黏附萌发及花柱、子房内花粉管生长, 显微拍照和测数, 每个处理 10 根花柱。

1.3 结籽性测定

花期授粉、蕾期授粉的 4 个组合以及二倍体自然授粉和四倍体自然授粉共 6 个处理, 每处理 5 株。统计结角率 (角果数 × 100/ 授粉花数)、有效角果率 (有效角果数 × 100/ 角果数)、种子数 (单株)、结籽指数 (种子数/ 授粉花数)、有效结籽指数 (种子数/ 角果数) 和千粒重。调查四倍体花期自交授粉的角果数、种子数, 并计算结籽指数 (种

子数/ 角果数)。

2 结果与分析

2.1 二、四倍体花粉活力 (TTC 法) 比较

随机统计 583 粒 2X 花粉粒和 547 粒 4X 花粉粒, 其中 354 粒 2X 花粉粒呈淡红色或红色, 266 粒 4X 花粉粒显色, 可染率分别为 60.8% 和 48.6%, 2X 花粉可染率高于 4X, 且差异显著。

2.2 二、四倍体花粉离体萌发及花粉管生长比较

花粉离体培养 0.5 h 后可观察到萌发 (图 1A)。4X 花粉在 4 h 时萌发率最大, 达 66.45%, 4 h 后萌发率稳定; 2X 在 5 h 时萌发率最大, 达 69.4%, 5 h 后萌发率稳定。观察发现, 4X 花粉中有大小异常的花粉, 没有萌发; 2X 花粉粒大小均一。

2.3 二、四倍体花粉原位萌发比较

离体培养 0~4 h, 二、四倍体花粉管长度差异不明显 (图 1B); 培养 5 h 后, 4X 花粉管长度明显小于 2X; 培养 12 h 时, 4X 花粉管长达 412.8 μm, 比 2X 短 8.7%。观察发现, 4X 花粉管有许多异常生长现象 (图 2K~M), 细胞质在花粉管中分布不均匀, 细胞质积累使花粉管在中部和基部膨大或基部呈波浪状, 花粉管成球形甚至分叉, 花粉管头部弯曲变细不能继续生长。

2.3.1 柱头黏附花粉粒数目比较 二、四倍体黏附花粉粒数都随授粉后时间的延长而增加 (表 1), 花粉粒与柱头乳突细胞间的联系紧密, 花粉粒不易因雌蕊被固定、染色等操作而脱落。2X ⊙ 柱头黏附花粉粒少, 18 h 均不超过 51 粒。2X × 2X 黏附花粉粒最多, 2 h 达 50 粒, 4 h 后均在 200 粒以上。4X ⊙ 花粉粒较难黏附于柱头上, 48 h 均不超过 70 粒。4X × 4X, 花粉粒黏附好于 2X ⊙ 和 4X ⊙, 24 h 最高达 262 粒, 但不及 2X × 2X。

2.3.2 花粉粒萌发数目的比较 2X ⊙ 6 h 才有萌发, 18 h 达 15.2 粒, 花粉管短, 花粉粒周围的乳突细胞有明显的胼胝质 (表 1)。2X × 2X 花粉萌发最早, 1 h 有少数花粉萌发, 2 h 萌发数超过 30 粒 (图 1B), 6 h 后萌发数高达 237.3 粒, 并有花粉管进入花柱 (图 2D), 柱头胼胝质明显少于自交组合。四倍体自交和杂交的萌发情况相似, 杂交组合的萌发较早 (2 h), 两组合最大萌发数均不超过 40 粒, 与二倍体杂交相比, 四倍体花粉萌发不整齐, 花粉管有长有短 (图 2C)。

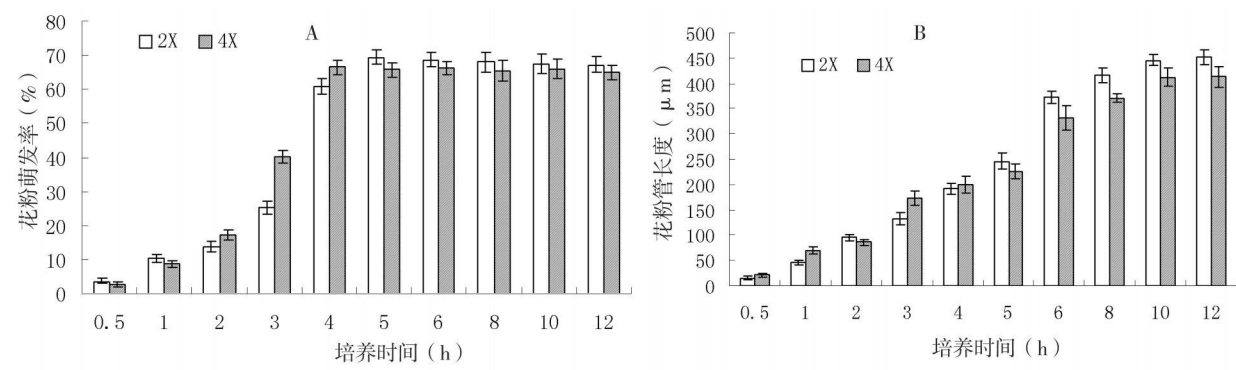


图 1 二、四倍体花粉离体萌发及花粉管生长
Fig 1 Pollen germination of diploid and autotetraploid
A. 花粉萌发率; B. 花粉管生长

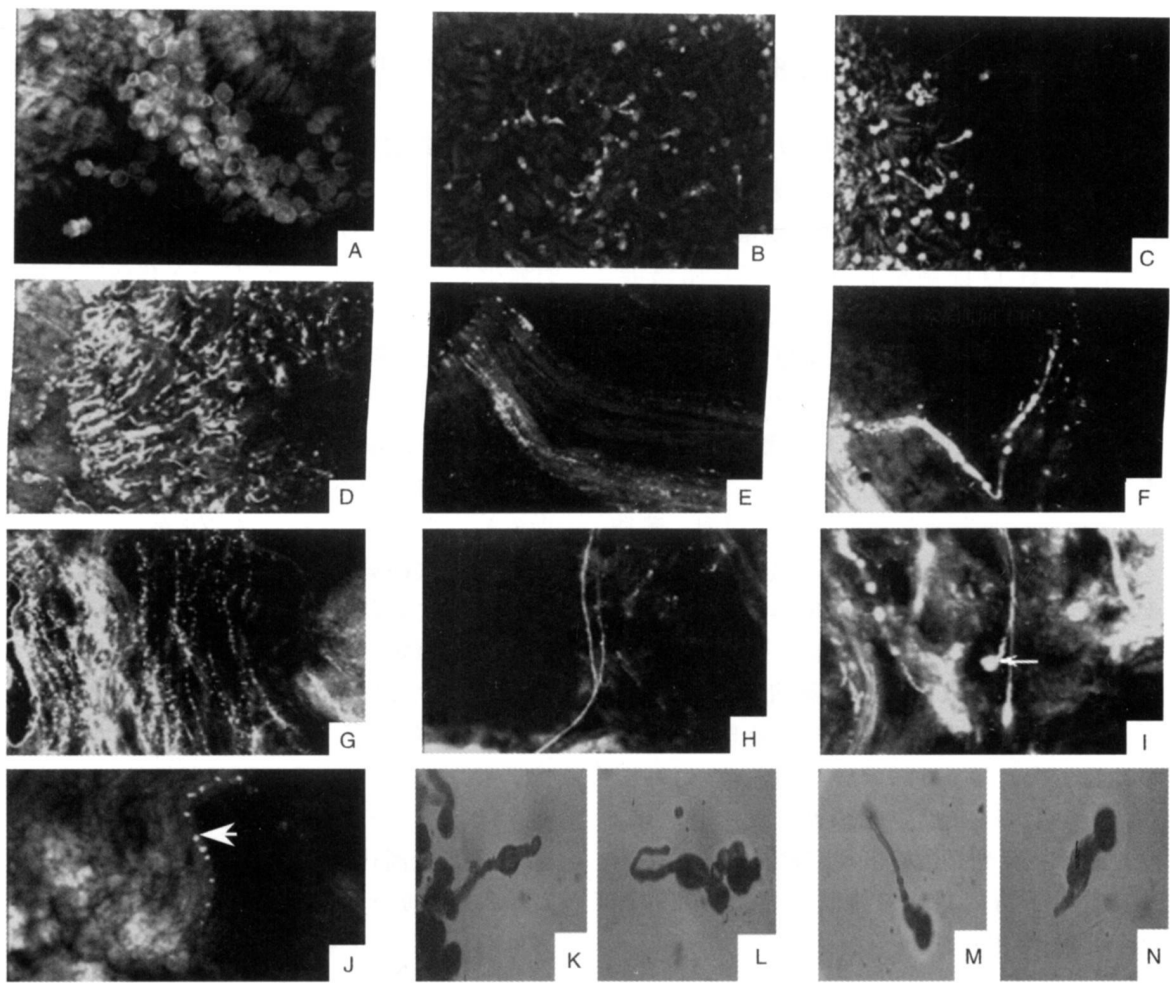


图 2 青花菜二、四倍体花粉萌发过程显微观察
Fig 2 Seed formation in different types of pollination for diploid and autotetraploid broccoli

注: A~ J: 二、四倍体花粉原位萌发, K~ N: 四倍体离体花粉萌发×200。A: 2X柱头黏附花粉粒, 未萌发(6 h); B: 2X× 2X 花粉粒萌发(2 h); C: 4X× 4X 花粉粒萌发(6 h); D: 2X× 2X 花粉粒大量萌发, 整齐(6 h); E: 4X× 花粉管进入子房(24 h); F: 4X× 4X 花粉管达到子房底部(12 h); G: 2X× 2X 大量花粉管进入子房(48 h); H: 2X(花粉管进入子房(48 h); I: 4X× 花粉管进入子房, 箭头示花粉管顶端膨大 (18 h); J: 4X× 4X 进入子房, 箭头示花粉管进入胚珠(48 h)。K: 花粉管中部膨大; L: 花粉管基部膨大, 头部弯曲变细; M: 花粉管基部波浪状; N: 花粉管膨胀成球形。A, F, I, J 放大倍数× 200, 其余为× 100。

表 1 二、四倍体不同授粉方式花粉粒柱头黏附数目、萌发数目及进入花柱和子房的花粉管数目

Table 1 Numbers of pollen grains attached to stigma, germinated pollen grains, pollen tubes in stigma and ovary in different types of pollination for diploid and autotetraploid broccoli

处 理	授粉后时间(h)							
	1	2	4	6	8	18	24	48
2X⊙	14.6±5.2	5.9±1.7	10.6±5.2	41.8±3.5	14.9±4.3	50.0±8.2	38.8±15.7	50.6±9.7
2X×2X	10.4±5.3	50.3±10.5	238.3±27.0	268.3±17.9	321.7±39.1	235.0±14.9	305.9±35.5	319.5±26.2
4X⊙	3.7±2.5	30.8±4.9	5.5±2.6	16.3±3.7	50.2±15.6	23.2±8.5	57.5±16.2	67.4±9.5
4X×4X	10.7±3.9	32.1±9.5	12.0±5.1	22.9±6.7	23.7±8.3	48.2±7.3	262.8±20.8	150.6±12.8
2X⊙	—	—	—	7.0±2.3	5.8±2.4	15.2±4.8	8.2±4.8	10.3±3.1
2X×2X	3.1±1.4	32.5±7.2	82.8±10.9	183.2±18.9	237.3±16.0	136.7±19.2	150.2±17.3	137.1±17.2
4X⊙	—	—	5.2±2.0	13.5±5.4	22.7±9.9	30.8±10.5	30.6±10.7	30.8±10.6
4X×4X	—	2.8±1.9	7.4±3.6	13.6±3.6	16.7±8.6	39.0±9.1	26.2±6.4	36.5±8.3
2X⊙	—	—	—	5.5±1.4	2.0±0.8	7.1±2.1	5.0±1.3	3.1±1.6
2X×2X	—	—	—	45.8±10.3	66.4±8.4	62.4±11.0	130.5±18.8	70.3±15.4
4X⊙	—	—	—	2.5±1.0	7.9±3.2	14.2±1.7	20.5±5.3	13.0±3.6
4X×4X	—	—	—	2.3±1.1	3.9±1.2	3.2±4.9	16.1±6.6	17.8±5.3

注: 表中数据为平均值±标准误。

2.3.3 进入花柱及子房的花粉管数目比较 6 h 后各组合才有花粉管进入花柱或子房, 花粉管在花柱或子房内主要沿维管束附近细胞间隙生长, 所现荧光多呈虚线状, 不连贯。2X⊙大部分花粉管停留在柱头, 6~ 8 h 极少数花粉管到达花柱, 18 h 有花粉管进入子房, 24 h 可见 5 根花粉管进入到子房中下部, 48 h 进入子房的也很少 (图 2H)。2X×2X, 花粉管生长较快, 6 h 就有大量花粉管穿入花柱, 随后进入子房, 48 h 有花粉管到达子房底部 (图 2G)。四倍体两组合花粉管生长差异不明显, 进入子房的花粉管数目比 2X⊙多, 但明显少于 2X×2X, 有 10~ 20 根花粉管进入子房 (图 2E、2F) 及胚珠 (图 2J), 还有进入子房的花粉管出现顶端膨大的现象 (图 2I), 还可观察到有少数花粉粒刚萌发, 可见四倍体花粉管萌发生长一致性较差。

2.4 结实性

各处理结角率均高于 70%, 2X×2X 最高达 80.3% (表 2), 其有效角果率最高达 84.3%, 2X⊙、4X⊙和 4X×4X 3 个处理的有效角果率分别为 74.5%、70.6%和 78.0%。结籽指数: 2X×2X 为 10.3 籽·花⁻¹、12.8 籽·果⁻¹, 有效结籽指数为 15.2, 明显高于其余处理; 4X×4X 结籽指数分别为 4.4 籽·花⁻¹和 5.7 籽·果⁻¹, 有效结籽指数为 7.4, 低于二倍体组合, 高于 4X⊙。可见四倍体的结实性低于二倍体。自然授粉状态下二、四倍体结籽性均好于人工授粉处理, 二倍体结籽指数高达 15.2, 四倍体为 9.6, 二倍体也好于四倍体。

2009 年四倍体自交平均每角果种子数为 4.7 粒, 2008 年平均每角果为 2.9 粒, 2009 年比 2008 年增加了 62.1%, 结籽性明显比 2008 年提高, 可见选择对提高结籽率有效。

表 2 二、四倍体青花菜不同授粉方式结籽性

Table 2 Seed formation in different types of pollination for diploid and autotetraploid broccoli

处理	结角率 (%)	有效角果数 (个)	有效角果率 (%)	种子数 (粒)	结籽指数		有效结籽指数 (籽·有效角 ⁻¹)	千粒重 (g)
					(籽·花 ⁻¹)	(籽·果 ⁻¹)		
2X⊙	73.8	165	74.5	1657	5.5	7.5	10.0	3.1329
2X×2X	80.3	189	84.3	2874	10.3	12.8	15.2	3.1001
4X⊙	75.8	154	70.6	1066	3.7	4.9	6.9	5.2484
4X×4X	76.8	156	78.0	1148	4.4	5.7	7.4	5.3000
2X 自然	—	1886	86.3	33212	—	15.2	17.6	—
4X 自然	—	1190	84.2	13574	—	9.6	11.4	—

3 讨 论

本研究中二倍体青花菜自交，花粉萌发很少，表现出一定的自交不亲和性，证明抑制区主要在柱头，这与在甘蓝^[16]和白菜^[17]上的研究结果一致。而四倍体花粉黏合程度好于二倍体自交，并且柱头胼胝质反应不明显，这说明四倍体花粉萌发率低与二倍体自交不亲和机理不尽相同。四倍体青花菜与二倍体杂交相比，授粉后花粉黏合时间推迟，花粉在柱头上萌发缓慢且不整齐，另外花粉管进入子房后还出现顶端膨大等异常现象，可见四倍体花粉萌发率低，花粉管生长缓慢且一致性差是四倍体受精率低结实率低的一个原因；较二倍体自交而言，两者花粉萌发率都很低，但四倍体青花菜有效结籽数却远远低于二倍体自交组合，推测四倍体结实性差的主要原因不在于花粉萌发率的高低，而在于双受精及胚胎发育过程，这与李俊星^[3]的观点相同。

结实率低是同源四倍体植物利用的最大障碍。本研究四倍体青花菜 2009 年自交结籽指数比 2008 年提高了 62.1%，这说明通过多代选择驯化处理可以提高同源四倍体青花菜的结籽率，这为选育同源四倍体青花菜优良品种提供了育种基础。

参考文献:

[1] 梁毅, 谭素英, 黄贞光. 同源四倍体植物低稔性研究概况 [J]. 北京农业科学, 1998, 16 (3): 21– 27.

[2] 胡金良, 徐汉卿, 刘惠吉, 等. 二倍体和四倍体小白菜的胚胎学研究 [J]. 南京农业大学学报, 1996, 19 (4): 1– 4.

[3] 李俊星, 张蜀宁, 赵冬, 等. 四倍体青花菜低稔性胚胎学研究 [J]. 西北植物学报, 2009, 29 (11): 2228– 2231.

[4] 轩淑欣, 张成合, 申书兴, 等. 甘蓝自交不亲和系同源四倍体的获得及其亲和性 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13 (2):

258– 259.

[5] 邹道谦, 申书兴. 四倍体番茄低稔性胚胎学研究 [J]. 华北农学报, 1990, 5 (1): 10– 16.

[6] 李爱华, 何立珍. 同源四倍体黄花菜减数分裂行为及其育性的探讨 [J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24 (1): 14– 17.

[7] KAKANIV G, REDDY K R, KONTI S, et al. Differences *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature [J]. Annals of Botany, 2005, 96 (6): 59– 67.

[8] JAYAPRAKASH P, SARLA N. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Mills p pollen *in vitro* [J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 357 (52): 851– 855.

[9] WANG Q L, LU L D, WU X Q, et al. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri* [J]. Tree Physiology, 2003, 152 (23): 345– 351.

[10] 刘自刚, 呼天明, 杨亚丽, 等. 桔梗开花期花粉活力变化对其结实能力的影响 [J]. 西北植物学报, 2010, 30 (7): 1371 – 1375.

[11] 刘林德, 张洪军, 祝宁, 等. 刺五加花粉活力和柱头可授性的研究 [J]. 植物研究, 2001, 21 (3): 375– 380.

[12] 刘继红. 澳洲指橘与粗柠檬体细胞杂种倍性 FCM 分析及其花粉活力检测 [J]. 果树学报, 2003, 20 (4): 251– 255.

[13] 张绍铃, 梅正敏, 陈迪新. 果梅花粉离体萌发及花粉管生长影响因子的研究 [J]. 中国农学通报, 2003, 19 (2): 21– 25.

[14] 陶书田, 张绍铃, 陈迪新, 等. 果梅花粉原位萌发及花粉管生长特性的研究 [J]. 果树学报, 2004, 21 (4): 338– 340.

[15] 张恩慧. 用荧光显微法测定甘蓝的自交不亲和性 [J]. 陕西农业科学, 1989, (1): 67.

[16] 周庆红, 曲雪艳, 李成琼. 甘蓝自交不亲和系柱头和花粉粒不亲和互作的电镜扫描研究 [J]. 中国农学通报, 2006, 22 (4): 302– 306.

[17] 杨继涛. 芸薹属植物自交不亲和性研究进展 [J]. 陕西农业科学, 2008, (3): 115– 121.

(责任编辑: 刘新永)