

菜心花粉萌发研究初报

刘乐承, 顾金玲, 古吉祥 (长江大学园艺园林学院, 湖北荆州434025)

摘要 [目的] 为菜心的通过雄性不育系的遗传育种提供参考。[方法] 以种植于花钵中的菜心为材料, 采用TTC法测定其花粉活力; 同时将花粉分别在3种培养基上培养, 3种培养基即A₁: 15.00%蔗糖+0.01%硼酸+0.001%GA₃, A₂: 15.00%蔗糖+0.40 mmol/L CaCl₂+0.40 mmol/L H₃BO₃+1.00%琼脂, A₃: 5.00 mmol/L MES+1.00 mmol/L KCl+10.00 mmol/L CaCl₂+0.80 mmol/L MgSO₄+1.50 mmol/L 硼酸+1.00%琼脂+16.60%蔗糖+3.65%山梨醇+10.00 μg/ml 肌醇, 比较培养6 h和12 h后的花粉萌发率和花粉管长度。[结果] 试验表明, 菜心花粉活力很高, 具有活力的花粉比例平均达98.18%; A₁培养基培养效果最好, A₂次之, A₃最差; 培养12 h的花粉萌发率高于培养6 h的, 但培养12 h的花粉管长度却小于培养6 h后的。[结论] 综合分析认为, 菜心花粉在A₁培养基即15.00%蔗糖+0.01%硼酸+0.001%GA₃上培养6 h萌发效果最好。

关键词 菜心; 花粉生活力; 花粉萌发; 花粉管长度

中图分类号 S634 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)28-12151-02

Preliminary Report on the Experiment in Pollen Germination of Muck Pad-chi

LIU Le-cheng et al (Garden School of Horticulture, University of the Yangtze River, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract [Objective] The trial was to provide the reference for muck pad-choi breeding through the male sterile line. [Method] The pollen vitality including the germination rate and the length of pollen tube of muck pad-choi planted in vegetable bowl was determined with TTC determination at the same time. The plants were culture in three kinds of culture media, and three kinds of media were A₁: 15.00% sucrose + 0.01% boric acid + 0.001% GA₃; A₂: 15.00% sucrose + 0.40 mmol/L CaCl₂ + 0.40 mmol/L H₃BO₃ + 1.00% agar and A₃: 5.00 mmol/L MES + 1.00 mmol/L KCl + 10.00 mmol/L CaCl₂ + 0.80 mmol/L MgSO₄ + 1.50 mmol/L boric acid agar + 1.00% + 3.65% + 16.60% sucrose sorbitol + 10.00 μg/ml inositol, and the testing result at 6h and 12 h was compared. [Results] The result showed that muck pad-choi had high pollen vitality (average 98.18%). A₁ culture medium was best; A₂, second and A₃ was worst. The pollen germination rate of 12 h growth was higher than that of the 6 h, but the tube length of 12 h growth was less than that of 6 h. [Conclusion] The comprehensive analysis indicated that the pollen of muck pad-choi culture in A₁ medium with 15.00 percent sucrose + 0.01% boric acid + 0.001% GA₃ for 6 h was with best germination.

Key words Muck pad-choi; Pollen vitality; Pollen germination; Tube length

菜心 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis* Ten et Lee) 又称菜薹, 属十字花科芸薹属芸薹种白菜亚种, 以花薹为主食部分^[1], 风味独特, 被人们誉为“菜中之后”, 是我国南方的特产蔬菜。随着我国经济的快速发展, 人民生活水平的不断提高, 人们对色泽鲜艳、营养丰富的菜心需求量大大增加。因此, 如何提高菜心的产量和品质, 从而满足人们对菜心的需求已成为当务之急^[2]。

菜心是白菜亚种的一个变种, 白菜是典型的异花授粉作物, 品种或自交系间的一代杂种存在明显的杂种优势, 而雄性不育系是白菜杂种优势利用的理想系统^[3]。因此, 通过雄性不育系来利用菜心杂种优势是提高菜心产量、改良其品质的有效手段。植物雄性不育的发生往往与花粉发育关系密切。在花粉发育过程中, 花粉萌发是一个极其复杂的过程, 众多基因参与其中, 这些基因的行为控制着花粉发育的各个关键步骤^[4]。因此, 研究花粉的离体萌发不仅对雄配子体的生物学研究, 甚至在育种实践中都具有重要意义。但是, 迄今涉及菜心花粉萌发的少量研究中, 菜心的花粉萌发率都不高^[5-6]。笔者选取了3种培养基研究培养基对菜心花粉萌发的影响, 探讨提高菜心花粉萌发的可能性, 以期通过雄性不育系的遗传育种提供参考。

1 材料与方

1.1 供试材料 “油青”菜心种子由浙江大学蔬菜研究所提供。2006年8月16日, 将菜心种子播种于盛有营养土的直径为35 cm的花钵中, 在阴棚下自然发芽, 按需不定期浇水、

施肥。两叶一心时间苗, 每个花钵留2~3株。菜心开始抽薹时, 将花钵从阴棚中搬出给予光照。开花时采集刚刚开放的花朵带回实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉生活力的测定。称取0.02~0.05 g的氯化三苯基四氮唑(Triphenyl tetrazolium chloride, TTC), 溶解在10.00 mmol/L的磷酸盐缓冲溶液中。取少量花粉放在载玻片上, 在花粉上滴1~2 ml的TTC溶液, 用镊子混合后盖上玻片; 置于恒温箱中30~40 ℃约15~20 min后, 在显微镜(40倍)下观察、记录。

1.2.2 花粉萌发率和花粉管长度的测定。设3种培养基和2个观察时间, 共6个处理, 每个处理3次重复。3种培养基即A₁: 15.00%蔗糖+0.01%硼酸+0.001%GA₃^[6]; A₂: 15.00%蔗糖+0.40 mmol/L CaCl₂+0.40 mmol/L H₃BO₃+1.00%琼脂^[7]; A₃: 5.00 mmol/L MES+1.00 mmol/L KCl+10.00 mmol/L CaCl₂+0.80 mmol/L MgSO₄+1.50 mmol/L 硼酸+1.00%琼脂+16.60%蔗糖+3.65%山梨醇+10.00 μg/ml 肌醇^[8]。A₃培养基为脱钾琼脂培养基, 琼脂脱钾方法为: 将琼脂用2.00 mmol/L的HCl冲洗3~4次, 然后用重蒸水冲洗5 min, 立即放入40 ℃的烘箱中, 完全干燥后待用^[10]。2个观察时间分别是6 h(B₁)和12 h(B₂), 即培养6和12 h后分别统计花粉萌发率和花粉管长度。

培养基均用重蒸馏水配制, 加热至100 ℃后煮2 min, 然后趁热用胶头滴管将培养基点滴在载玻片上, 每个载玻片上约1.5 ml, 并使之形成一层薄薄的琼脂板; 冷却至室温后, 随机选取5朵花上开裂的花药, 仔细浸蘸将花粉粒转移到琼脂板上。敷用花粉后, 将琼脂板放在垫有湿滤纸保湿的大培养皿(直径200 mm)中, 马上转入25 ℃、相对湿度100%和光照

基金项目 湖北省教育厅项目(D200712010)。

作者简介 刘乐承(1964-), 男, 湖北洪湖人, 博士, 硕士生导师, 副教授, 从事园艺植物育种研究。

收稿日期 2008-07-21

30 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ 的小室中培养。花粉发芽以其花粉管长度超过花粉半径为标准, 每张玻片观察5个不同的视野, 计算花粉萌发率, 并随机测定10粒已萌发花粉的花粉管长度。

2 结果与分析

2.1 花粉生活力 采用TTC法测定菜心花粉的生活力, 发现绝大多数菜心花粉粒呈橘红色, 即具有生活力, 而仅有极少数花粉表现为黄褐色, 即失去了生活力。结果表明, 所用的菜心花粉具有生活力的比例均在97.4%~98.8%及以上。

2.2 不同培养基的花粉萌发率、花粉管长度比较 菜心花粉在3种培养基上均可以萌发、伸长。由表1可以看出, 不同培养基的菜心花粉萌发率差异显著, 其中以A₁的最高; 不同培养基的花粉管长度也表现出同样的规律。研究表明, 培养基A₁是该研究中菜心花粉萌发最理想的培养基。

表1 不同培养基的花粉萌发率和花粉管长度

Table 1 The germination rate and tube length of pollen on different media

培养基 Media	平均花粉萌发率 % Average germination rate of pollen	平均花粉管长度 μm Average tube length of pollen
A ₁	78.42	96.26
A ₂	53.77	75.07
A ₃	46.10	21.23

2.3 不同培养时间的花粉萌发率、花粉管长度比较 由表2可知, 菜心花粉培养12h的萌发率比培养6h的要高, 而培养12h的花粉管长度却比培养6h的要小。

表2 不同培养时间的花粉萌发率和花粉管长度

Table 2 The germination rate and tube length of pollen at different culture time

培养时间处理 Culture time treatments h	平均花粉萌发率 Average germination rate of pollen %	平均花粉管长度 Average tube length of pollen μm
B ₁	54.44	69.54
B ₂	64.42	58.83

2.4 不同处理组合的花粉萌发率、花粉管长度比较 由表3可看出, 处理组合A₁B₂, 即A₁培养基上培养菜心花粉12h可获得最高的花粉萌发率。而组合A₁B₁, 即A₁培养基上培养菜心花粉6h的花粉管长度值最大。

表3 不同处理组合的花粉萌发率和花粉管长度

Table 3 The germination rate and tube length of pollen in different treatment combinations

处理组合 Treatment combination	平均花粉萌发率 Average germination rate of pollen %	平均花粉管长度 Average tube length of pollen μm
A ₁ B ₁	70.67	103.69
A ₁ B ₂	86.18	88.82
A ₂ B ₁	52.26	82.33
A ₂ B ₂	55.27	67.82
A ₃ B ₁	40.38	22.60
A ₃ B ₂	51.81	19.85

3 结论与讨论

该研究中, A₁培养基的花粉萌发率可达86.18%, 而余小林的结果为25.70%^[8], 材料、培养基都相同, 但花粉萌发率

差异却很大, 除了可能与培养时间(余小林的培养时间是4h)不同有关外, 是否与研究季节以及植株生长状况对花粉发育状况的影响有关, 需要进一步证实。A₁培养基的花粉萌发率和花粉管长度都最大, 是否是由于添加了赤霉素, 其机理如何, 还需要进一步深入研究。

A₂培养基培养6h后的平均花粉萌发率为52.26%, 这一结果与刘乐承等的研究材料、培养基和培养时间完全相同, 结果也接近, 可能在A₂培养基上培养菜心花粉的萌发率只能达到这个水平^[7]。

A₃培养基为脱钾琼脂培养基, 其目的是为了在培养基中准确加入K⁺, 该培养基上拟南芥的花粉萌发高达80.00%^[10], 但该培养基是笔者的研究中菜心花粉萌发及花粉管伸长的效果最差的, 其花粉萌发率只有40.38%, 花粉管长度为19.85 μm , 其原因有待进一步研究。

花粉生活力受自身遗传和外界因素的影响^[9]。从理论上说, 具有生活力的花粉就应该能萌发, 而事实上包括笔者的研究在内的许多研究中, 花粉萌发率与具有生活力的花粉比例之间总有一定的差异。这种差异, 很大程度上可能是所采用的培养基不适合或不完全适合所造成的, 笔者的研究中, 同一花粉在不同培养基上萌发率的不同即为证明。另外, 花粉个体间的生活力不尽相同也可能是造成这种差异的一个因素, 因为生活力强的花粉可能在较短的时间内就能萌发, 生活力弱的需要较长或很长时间才能萌发, 而无生活力或生活力极小的则可能无法萌发, 该研究中培养12h的花粉萌发率比培养6h的要高, 也许正说明了这点。

该研究中培养6h的平均花粉管长度比培养12h的长, 可能是因为生活力强的花粉萌发后伸长较快, 而生活力较弱的则伸长较慢, 所以培养6h后生活力较弱的花粉的萌发, 尽管可使平均花粉萌发率增加, 但平均花粉管长度却变小了。

该研究表明, 3种培养基上菜心花粉均可以萌发, 花粉管也可以正常伸长; 培养效果最好的是A₁培养基, A₂次之, A₃最差; 培养12h的花粉萌发率高于培养6h的, 但培养12h的花粉管长度却小于培养6h的。综合分析发现, 该研究中15.00%蔗糖+0.01%硼酸+0.001%GA₃培养基培养6h后菜心花粉萌发及花粉管伸长效果最好。

参考文献

- [1] 马三梅, 王永飞. 菜心育种的研究进展[J]. 北方园艺, 2006(3): 40-41.
- [2] 杨暹, 郭巨先, 刘玉涛. 华南特产蔬菜菜心的营养成分及营养评价[J]. 食品科技, 2002(9): 74-76.
- [3] 张衍荣. 菜心育种现状与展望[J]. 广东农业科学, 1997(3): 15-17.
- [4] 唐文武, 吴秀兰, 李桂花, 等. 菜心杂种优势利用的现状与展望[J]. 江西农业学报, 2005, 17(2): 73-76.
- [5] 孙日飞, 方智远, 张淑江, 等. 萝卜胞质大白菜雄性不育系的生化分析[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 187-192.
- [6] 黄鹂, 曹家树, 张强. 十字花科植物发育相关基因的研究[J]. 自然科学进展, 2005, 15(8): 907-916.
- [7] 刘乐承, 向玉, 曹家树. RNA沉默对B₂ME3基因对菜薹花粉发育的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 125-130.
- [8] 余小林. 白菜雄性不育相关基因CYP86MF的功能验证及其人工不育系的创建[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [9] CARPENIER J L, FLOENSES E, SNLSTAD DP, et al. Preferential expression of an α -Tubulin gene of Arabidopsis in pollen[J]. Plant Cell, 1992, 4: 557-571.
- [10] FAN L M, WANG Y F, WANG H, et al. In vitro Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts[J]. J Experimental Botany, 2001, 52: 1603-1614.