

萝卜花粉培养及自交育性检测

刘春香, 刘明, 赵光强, 陈爱军

(潍坊学院 生物工程学院, 山东 潍坊 261061)

摘要: 对18种固体培养基进行筛选, 得出蔗糖10%、琼脂0.5%、硼酸0.02%和蔗糖5%、琼脂0.3%、硼酸0.04%两种配方, 在温度25℃, 相对湿度大于95%, 时间在4h是培养萝卜花粉的适宜条件, 花粉萌发率达97%以上。通过自花授粉、显微镜观察及苯胺蓝染色紫外灯箱观察花柱中花粉管生长状况相结合来分析花粉在自花柱头上的育性, 对花粉活力还进行了化学染色方面的探索。结果表明:0.1%苯胺蓝染液可以准确分析花粉管能否穿越自花柱头, 从而鉴定自交亲和性, 而碘化钾染色法不适合检测萝卜花粉活力。

关键词: 萝卜; 花粉培养; 花粉活力; 花粉育性; 检测

中图分类号: S 631.103.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)04-0023-04

自交不亲和系和雄性不育系是萝卜杂交育种的重要母本材料, 潍县萝卜不仅品质优, 而且也是重要的杂交育种亲本之一, 对改善绿皮萝卜的品质具有重要价值, 无论是雄性不育系还是自交不亲和系的选育都离不开花粉活力的检测和鉴定。近年来, 国内外不少学者在辣椒^[1]、马铃薯^[2]、芜菁^[3]、荞麦^[4]等植物花粉生活力测定方面进行了研究, 多数学者认为离体萌发法是测定花粉生活力最简单、可靠的方法。然而对萝卜花粉离体培养的报道较少, 赵艳玲等^[5]对萝卜花粉进行了液体培养, 液体培养比较复杂, 因柱头为固体, 该研究旨在建立花粉固体培养体系和简单易行的花粉在柱头上萌发的检测体系, 为自交不亲和系或雄性不育系选育提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理方法

潍县萝卜花粉选自潍坊学院温室内, 取当天盛开的花朵, 于阴凉处风干花粉。萝卜田间管理同一般生产田, 花期人工自花授粉在晴天上午, 选择60株生长正常植株的健壮花枝, 去除已开的花, 进行自花授粉, 套袋隔离, 并做标记, 结籽能力调查在授粉后1个月进行。

1.2 离体萌发法检验花粉活力

利用离体萌发法测定花粉活力的配方设计如下: 固定钙离子浓度为0.15%, 蔗糖5% (配方1~6)、10% (配方7~2)、15% (配方13~18) 3个梯度, 其中培养基配方为单号的琼脂浓度为0.3%, 双号的琼脂浓度为0.5%,

配方1、2、7、8、13、14 硼酸浓度为0.02%, 配方3、4、9、10、15、16 硼酸浓度为0.04%, 配方5、6、11、12、17、18 硼酸浓度为0.06%, 共计18个配方进行初步培养, 花粉培养时间为2d, 避光。然后用筛选出的配方2、3、4、6、8、9、12、13、14、16进行再次培养。培养方法: 将花粉粒均匀敲撒在培养基上, 然后将载玻片放在垫有湿润滤纸的培养皿中。温度为25℃, 相对湿度大于95%, 避光培养4h。每一培养基选3个花粉分布均匀的视野, 计算平均萌发率。

1.3 碘-碘化钾(I₂-KI)染色测定花粉活力

为了寻找简便的活力检测方法, 并鉴定方法的可行性, 该研究进行了牵牛、月季和潍县萝卜3种植物花粉碘-碘化钾染色^[6-7], 判定方法的可应用性。

1.4 苯胺蓝染色法分析自花授粉的花粉育性

选去雄、套袋的花柱做阴性对照, 取正常异花授粉花做阳性对照, 每株处理5朵花, 依次于授粉12、24、36、48、60h后取样, 将带柱头的子房固定于卡诺液中4h, 然后保存于75%酒精中, 用6mol/L NaOH在60℃下软化至透明(约2h), 蒸馏漂洗3次, 放入0.1%苯胺蓝染液中避光染色24h^[8-9]。取出花柱, 切去柱头表面, 压片, 在黑暗条件下, 紫外灯箱内观察是否有黄绿色荧光, 如果条件允许可以在荧光显微镜下拍照。对自交结籽株与不结籽株进行自花授粉, 每株取3个花柱进行苯胺蓝染色分析, 鉴定亲和性。对固定的材料选择有代表性的进行显微观察并照相。

2 结果与分析

2.1 离体萌发法检验花粉活力的结果

2.1.1 初步培养花粉的萌发率和花粉管生长状况 初步培养统计了花粉的萌发率(表1)和观察花粉管生长状况(图1), 由表1、图1A、C、E、G、I、K可以看出, 蔗糖浓度

第一作者简介: 刘春香(1972-), 女, 农学博士, 副教授, 主要从事蔬菜育种与分子生物学研究工作。

基金项目: 国家星火计划资助项目(2007EA740101)。

收稿日期: 2008-11-13

为5%、10%，琼脂0.3%时，随着硼酸浓度的增大，萌发率随呈现“低-高-低”的趋势，花粉管细长；但琼脂为0.5%时花粉管粗短，随硼酸的浓度升高萌发率变化不规律，这两种现象的产生决定于硼酸和琼脂浓度。蔗糖浓度为15%时，配方13、15、17；14、16、18(图1M、O、Q、N、P、R)萌发率随着硼酸浓度的增大，均呈现由高到低的趋势，花粉管差异不明显。这种现象的产生与蔗糖、

硼酸和琼脂相互作用有关，通过比较各个配方的萌发状况认为蔗糖浓度对花粉萌发影响较大。长时间培养时，各配方萌发率普遍较高，不能确定哪个配方对花粉萌发比较有效。培养基中3个变化因子长时间相互作用，不宜寻找最佳培养条件，所以在此基础上进行了二次筛选，主要是缩短了时间。

表 1 初步培养花粉萌发率

Table 1 Pollen germination rate during the primary cultivation									
培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%	培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%	培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%	培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%	培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%
1	23	5	34	9	90	13	97	17	37
2	75.9	6	95.7	10	25	14	88.8	18	41
3	93.7	7	75	11	46	15	73.3		
4	93	8	93.5	12	79	16	81		

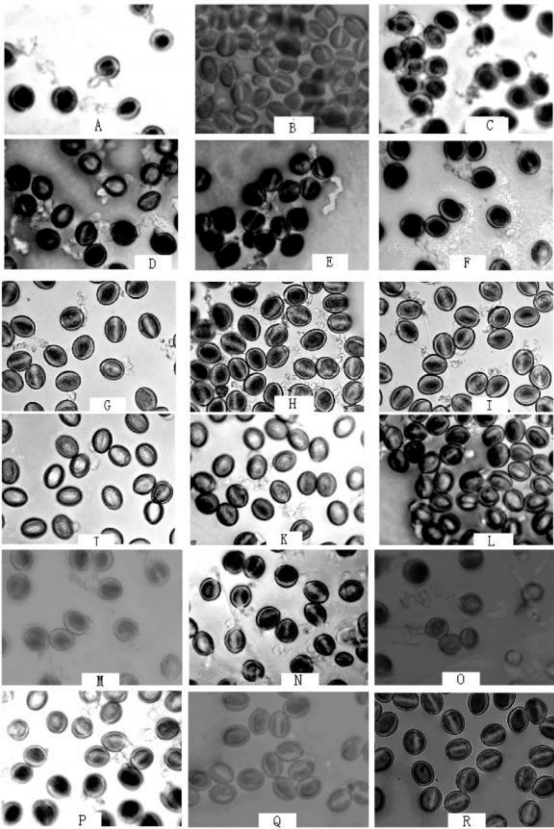


图 1 各配方下花粉萌发情况图 (×400)

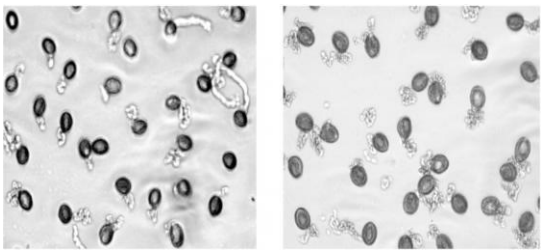
Fig. 1 Pollen germination photos under different medium(×400)
注: 图中的字母对应的培养基配方号: A: 1, B: 2, C: 3, D: 4, E: 5, F: 6, G: 7, H: 8, I: 9, J: 10, K: 11, L: 12, M: 13, N: 14, O: 15, P: 16, Q: 17, R: 18.
Note: Letters in the fig. 1 represent medium number separately: A: 1, B: 2, C: 3, D: 4, E: 5, F: 6, G: 7, H: 8, I: 9, J: 10, K: 11, L: 12, M: 13, N: 14, O: 15, P: 16, Q: 17, R: 18.

2.1.2 花粉二次培养的萌发状况 由于初步培养时间为2 d, 时间长, 各培养基中均有花粉萌发, 花粉管的生

长也有明显差异, 因此, 从中选取了平均萌发率大于75%的10个花粉培养基配方进行了二次培养, 4 h 后观察萌发结果(见表2), 可以看出, 在温度25℃, 相对湿度95%以上的条件下, 配方8(图2A)、和3(图2B)的萌发率高且稳定, 均达到97%以上, 说明这2个条件适合做萝卜的花粉培养。很多配方在短时间内萌发率很低, 不宜选用。

表 2 花粉二次培养萌发率

Table 2 Pollen germination rate during thd secondary cultivation					
培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%	培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%	培养基 Medium	萌发率 Gemi- nation rate/%
8	98.5	4	76.5	14	3
3	97.5	12	59.9	16	2.4
6	88.5	9	25.7		
2	78.2	13	3.4		



A (配方 8) B (配方 3)
A (medium component 8) B (medium component 3)

图 2 适宜培养基上花粉管的萌发状况(×200)

Fig. 2 Pollen germination state under proper medium(×200)

2.2 花粉化学染色结果

由图3可看出, 牵牛花粉呈深紫色, 月季花粉呈紫色, 而萝卜花粉呈淡黄色, 同花粉自身和碘液颜色, 所以通过比较得知碘液染色法不适合潍县萝卜花粉活性的鉴定, 但对月季等植物是适合的。

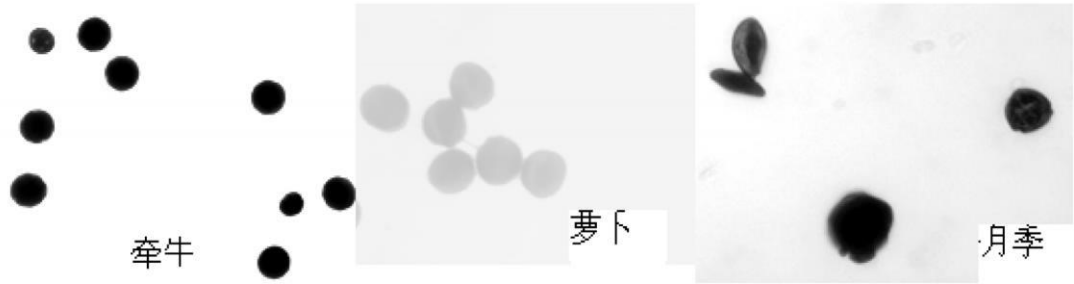


图 3 花粉经碘液染色后的镜检结果(×400)
Fig. 3 Pollen photo under microscope after iodine dyeing(×400)

2.3 通过观察花粉管荧光分析自交不亲和性

在隔离充分的前提下,可以确定自花授粉结籽的为自交亲和植株,但没有结籽不一定是自交不亲和,环境因素尤其是温室的温、湿度及授粉、套袋的人为伤害对结籽也有影响,活体自花授粉的结果是获得了 36 株结籽株,23 株未结籽株。

苯胺蓝可以诱导花粉胼胝质在紫外光下产生黄绿色荧光,通过观察发现 48 h 是花粉管充分生长和采集花柱的适宜时间,从花柱到子房都有荧光,时间短,花粉管没有充分到达底部,荧光不明显,60 h 时间又过长。对

其他待测植株的花柱都采用授粉后 48 h 进行染色分析。该试验中自交亲和植株的花柱压片在紫外灯下都有荧光,自花授粉未结籽植株的压片,有的有荧光,有 3 株无荧光。通过观察柱头花粉萌发情况,可辅助判断自交亲和性。图 4 是显微镜下柱头的图片,花粉的正常萌发状况如图 4 B,采自检测到荧光株的授粉柱头;而未检测到荧光的植株,授粉后柱头上花粉不能正常萌发,不能深入柱头,如图 4 C。通过花粉管染色观察可以准确分析花粉在自花柱头上的育性。

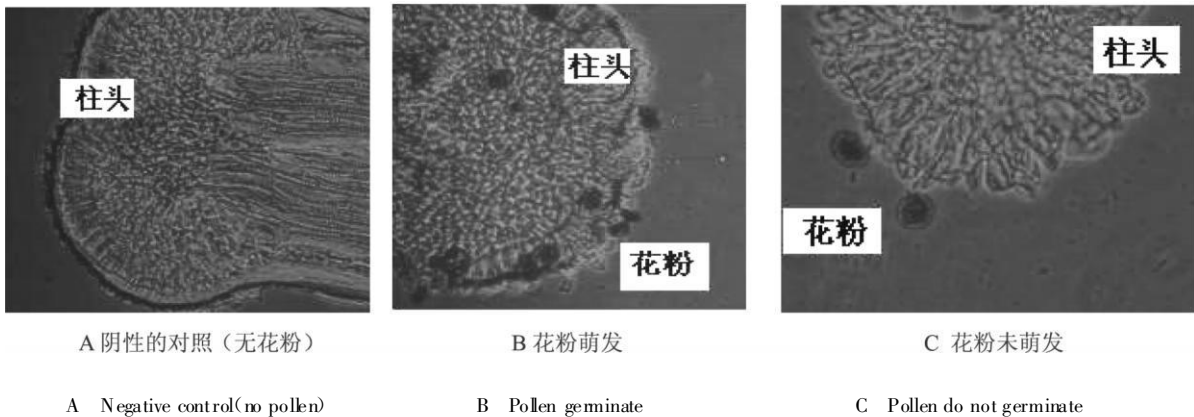


图 4 显微镜下观察柱头纵切面(×200)
Fig.4 Chapter slice cutting from the upside under microscope(×200)

3 讨论

3.1 离体萌发法检验花粉活力

该试验认为离体萌发测定法较适宜检测潍县萝卜花粉活力。通过二次培养 筛选出了离体萌发测定花粉活力的有效培养基配方 8 和 3 这 2 种配方与赵艳玲^[9]等对萝卜花粉培养建立的液体萌发体系有较大差异,这可能是由于固体与液体 2 种体系所创造的环境有较大差别,试验认为检验花粉活力用固体培养基更佳,因为这种环境更接近植物柱头表面的环境,且通气性好。

通过结果分析可知,蔗糖、硼酸和琼脂对潍县萝卜花粉萌发有交互影响,但也存在三者的最适浓度,即蔗

糖浓度为 10%, 硼酸浓度为 0.02%, 琼脂浓度为 0.05%, 此时,花粉萌发率达到为 98.5%。高浓度蔗糖对花粉萌发有强烈的抑制作用,萌发率急剧下降,甚至降到2.4%。这可能由于培养基的渗透压造成的,而渗透压通过控制花粉的水势而直接影响到花粉的活性,当蔗糖浓度过低时,即低渗条件下,花粉粒易吸水膨胀,破损率显著提高;适当提高硼酸的浓度可改善渗透压,如配方 3,在低糖浓度下,提高硼酸浓度到 0.04%时也可以达到 97.5%的萌发率。而当蔗糖浓度过高时,花粉粒皱缩失水,萌发率显著降低。

硼酸对花粉的萌发有促进作用,但需求量较少。当

其浓度过高时反而抑制了花粉的萌发。硼酸可增加氧的吸收以及促进糖的吸收和代谢,利于果胶的合成,因而促进花粉的萌发,但当细胞内硼元素含量过高时,就会影响细胞的缓冲体系,一旦新陈代谢发生紊乱,细胞也就逐渐失活^[10]。

琼脂具有通气保水作用,其本身不能被利用,这些优点使其可以很好地充当植物的生长介质,不同的琼脂浓度对花粉的生长状况也有很大的差异^[11],琼脂浓度大,花粉管生长短粗;浓度小,花粉管生长细长。过高、过低的浓度对通气性和花粉管伸展状况都有影响,0.3%~0.5%比较适宜花粉萌发。

3.2 化学染色法

前人没有进行过潍县萝卜花粉活力的化学染色测定,该试验尝试了 I₂-KI 染色法对潍县萝卜花粉活力的测定方法,结果表明 I₂-KI 染色法不适合潍县萝卜花粉活力的测定,这可能是因为萝卜花粉属于脂肪质花粉^[12],淀粉含量太少,染色太浅,所以如果采用化学染色应考虑其他试剂。

3.3 苯胺蓝染色分析花粉育性

利用苯胺蓝染色观察雌蕊中花粉管生长的方法对萝卜是有效的。萝卜的自交不亲和属于孢子体不亲和^[13],即花粉在柱头上不能萌发或萌发异常,该试验在黑暗条件下,用紫外灯激发荧光,观察到去柱头花柱通体发荧光,此荧光来自花粉管上的胼胝质。此方法操作简便,即便没有精密的荧光显微镜也能观察,但应避免光线的干扰和保持灯箱台面的清洁,并设阴性、阳性对

照和 2 次以上的重复,以确保试验的准确性。

参考文献

- [1] 张子学,唐芳,孙峰.辣椒花粉的生活力与贮藏方法研究[J].安徽技术师范学院学报,2001,15(3):4-6.
- [2] 张峰,王玉萍,王蒂.马铃薯花粉的离体萌发[J].中国马铃薯,2001,15(6):326-328.
- [3] Sato S, Katoh N, Iwai S, et al. Establishment of reliable methods of in vitro pollen germination and pollen preservation of *B. rassaica* rapa(syn. *B. campestris*)[J]. *Euphytica*, 1998, 103(1): 29-33.
- [4] Adhikar K N, Campbell C G. In vitro germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen[J]. *Euphytica*, 1998, 102(1): 87-92.
- [5] 赵艳玲,龚义勤,柳李旺,等.萝卜离体花粉萌发与花粉管生长影响因素研究[J].江苏农业科学,2007(1):88-90.
- [6] 王钦丽,熊涛.花粉生活力的测定[J].植物杂志,2002(5):28-29.
- [7] 张子学,孙峰.辣椒花粉生活力最佳测定方法的筛选[J].种子,2002(1):32-33.
- [8] 武军艳,孙万仓.利用花粉柱头的相互作用鉴定 5 个十字花科油用植物的自交亲和性[J].西北农业学报,2006,15(5):61-64.
- [9] 王爱云,李桐,胡大有.诸葛菜与芸薹属间花粉与柱头相互作用的研究[J].湖南农业大学学报,2006,32(3):232-236.
- [10] 蒋桂华,谢鸣,方丽,等.硼、钙和农药对草莓花粉萌发和花粉管生长的影响[J].果树学报,2007,24(2):234-236.
- [11] 周耀辉,黄启尧.用培养法测定甘蔗花粉生活力[J].甘蔗,1994(1):10-12.
- [12] 王少先.4 种检验方法在辣椒花粉生活力检验上的应用效果[J].河南农业科学,1998(12):24-26.
- [13] 赵天荣,龚义勤,柳李旺,等.萝卜自交不亲和特性的荧光快速鉴定[J].南京农业大学学报,2007,30(4):30-34.

Pollen *in vitro* Culture and Viability Detection of Self-pollen on Radish

LIU Chun-xiang, LIU Ming, ZHAO Guang-qiang, CHEN Ai-jun

(Bio-Engineering Department of Weifang University, Weifang, Shandong 261061, China)

Abstract: The two optimum pollen solid culture medium of radish were selected from 18 medium, under the condition of relative humidity above 95%, at 25℃, 4 hours growing time. One was sucrose 10%, agar 0.5%, and boric acid 0.02%, the other was sucrose 5%, agar 0.3%, and boric acid 0.04%, the pollen germination rate were more than 97% under these conditions. This study analyzed pollen fertility by combining self-pollination with observing the tube growth state in the stylous under microscope and under UV light by 0.1% aniline blue to tests the viability of the radish pollen by staining. Chemical staining method was tried to detect pollen viability, too. The result showed that 0.1% aniline blue staining can detect whether self-pollen tube can pass through their chapter for self-incompatibility analysis, and potassium iodide was not fit for radish pollen viability detection.

Key words: Radish; Culture; Pollen viability; Pollen fertility; Detection