

松花菜小孢子发育的细胞学观察

朱惠霞^{1,2}, 陶兴林^{1,2}, 刘明霞¹

(1. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃民圣农业科技有限责任公司, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以松花菜 F₁ 代杂交种为材料, 分别观察自然发育和游离培养条件下小孢子的发育过程。结果表明, 自然条件下, 四分体释放小孢子后, 单核小孢子经历 2 次分裂, 从双核期到三核期, 最后发育为成熟花粉粒, 是配子体发育途径; 在游离培养条件下, 小孢子经过热激(33 ℃)处理后, 发生均等分裂或者不均等分裂, 之后经过一系列的细胞增殖, 最终发育成为胚状体, 小孢子发育途径是从配子体向胚胎发育转换的途径。同时发现, 并不是所有发生了分裂和增殖的细胞都能形成胚状体, 只有极少数小孢子最终形成正常胚。

关键词: 松花菜; 小孢子; 细胞学观察

中图分类号: S653.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)08-0008-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.08.003

Cytological Observation on Microspore Development of the Loose-curd Cauliflower Cultivar

ZHU Huixia^{1,2}, TAO Xinglin^{1,2}, LIU Mingxia¹

(1. Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Gansu Minsheng Agricultural Science and Technology Co., Ltd, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Used the loose-curd cauliflower F₁ hybrids as study material, microspore development process of in vivo was observed under natural development and free culture conditions, respectively. The results showed that under natural conditions, after the tetrad releases microspore, the mononuclear microspore undergoes two divisions, from binuclear to trinuclear stage, and finally develops into mature pollen grains, which is the way of gametophyte development. Under the condition of free culture, microspore undergoes equal or unequal division after heat shock treatment (33 ℃). After a series of cell proliferation, microspore eventually develops into embryoid. The microspore development pathway is from gametophyte to embryo. At the same time, it was found that not all cells that divide and proliferate can form embryoids, only a few microspores eventually form normal embryos.

Key words: Loose-curd cauliflower; Microspore; Cytological observation

松花菜是十字花科甘蓝属花椰菜的一个类型, 其外形特点为花层薄蕾枝长, 花球膨大时呈松散状, 松花菜外形美观、营养丰富, 叶绿素、类胡萝卜素、可溶性糖含量均

高于普通花椰菜^[1]。食用时口感甜脆, 风味鲜美、深受消费者喜爱。目前我国松花菜种植面积已达 10 万 hm² 以上^[2], 正逐步替代传统紧实型花椰菜, 成为新的消费类型。

收稿日期: 2019-04-23

基金项目: 甘肃省农业科学院中青年创新基金(2016GAAS47)、甘肃省科技重大专项计划(17ZD2NA015-11)、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, 副研究员, 主要从事蔬菜育种研究工作。联系电话: (0931)7754992。Email: zhuhx2002@sina.com。

目前游离小孢子培养技术已普遍应用于松花菜新品种的选育过程^[3-5], 该技术纯合速度快, 可以大大缩短育种年限、丰富育种资源, 是一种快速、高效的育种途径。但游离小孢子培养技术除受材料基因型影响外, 还易受培养过程中不确定因素的影响^[6-7]。我们对松花菜小孢子培养技术和胚胎发生过程进行研究, 对游离培养过程中小孢子的发育情况进行细胞学观察, 以明确小孢子发育时期与细胞形状及花蕾长度的关系, 为进一步提高松花菜小孢子培养效率提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为甘肃省农业科学院蔬菜研究所花椰菜课题组引进的松花菜 F₁ 代杂交种雪美 65。于 2017 年 8 月 25 日育苗, 9 月 30 日定植于皋兰日光温室, 常规管理。12 月下旬植株抽薹开花, 选取健壮植株上的花蕾, 进行细胞学观察和游离小孢子培养。

1.2 方 法

1.2.1 小孢子发育过程观察 利用 DAPI(4, 6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐)荧光染色法观察小孢子发育时期。DAPI 染色液的配制参照孙继峰等^[8]的方法, 称取 5 mg 的 DAPI, 加入 5 mL ddH₂O 溶解, 配成 1 mg/mL 的母液, 用离心管分装后置于 -24 ℃ 冰箱保存。将完全溶化后的染色液用 ddH₂O 稀释成 10 μg/μL 的工作液, 选取不同大小的花蕾, 用镊子小心摘取 2~3 枚花药, 置于滴有 DAPI 染液的载玻片上, 轻轻挤压出花粉, 挑出杂质, 盖上盖玻片, 在避光条件下染色 10 min, 用 Olympus CKX53 荧光倒置显微镜进行细胞学观察, 随机观察 5 个视野。观察游离培养小孢子发育时期时, 取 1 个培养皿小孢子培养液在 1 000 r/min 条件下离心 5 min, 取 1 滴沉淀于载玻片上, 加 1 滴 DAPI 染色 10 min 后进行观察, 也可直接将培养皿置于倒置显微镜下观察。

1.2.2 小孢子分离与培养 选取单核靠边期的花蕾, 用 75% 的乙醇消毒 30 s, 之后用 7% 的次氯酸钠溶液消毒 10~12 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 每次 3~5 min。将花蕾放入无菌小烧杯中, 加入适量 B5 液体培养基, 用玻璃棒轻轻挤压, 使小孢子游离到溶液中, 用 350 目孔径尼龙筛网过滤, 滤液在 1 000 r/min 条件下离心 3 次, 每次 5 min。最后 1 次离心后将沉淀悬浮于 NLN-13(pH=5.9)培养基中, 调整小孢子密度为 10 × 10⁴ 个/mL, 分装到 60 mm 无菌培养皿中, 每皿加 4 mL 悬浮液(每皿约为 4 个花蕾), 并加入 100 μL 的活性炭(1.0 g/L)。在 33 ℃ 热激培养 24~48 h 后转入 25 ℃ 恒温箱暗培养, 培养期间每天观察小孢子发育情况, 当肉眼可见胚状体时转入摇床(60 r/min)震荡培养, 约 20 d 后形成子叶型胚。

2 结果与分析

2.1 松花菜小孢子体内发育过程

观察发现, 发育初期花粉母细胞经减数分裂形成四分体(图 1-A); 然后小孢子从四分体中释放出来, 形成体积较小的单核小孢子, 此时花粉壁较薄, 细胞核位于中央, 外形呈梅花形(图 1-B)。此后, 小孢子逐渐生长, 细胞壁开始加厚, 内部形成大液泡, 细胞核靠近边缘, 为单核靠边期; 外形为不明显的三棱状(图 1-C), 此时是进行松花菜小孢子培养的适宜时期。随着花蕾的发育, 小孢子形状接近正圆, 进入双核早期, 具有 1 大 1 小 2 个细胞核。此后生殖核分裂成 2 个精核, 小孢子进入三核期(图 1-D), 较大的为营养核, 染色质松散, DAPI 染色后亮度较弱; 较小的 2 个为生殖核, 染色后亮度较高, 体积由圆形变为椭圆, 形成成熟花粉粒。在整个发育过程中, 小孢子的大小、形态以及染色深浅明显不同, 这为准确判断小孢子发育时期和精确取样提供了依据。

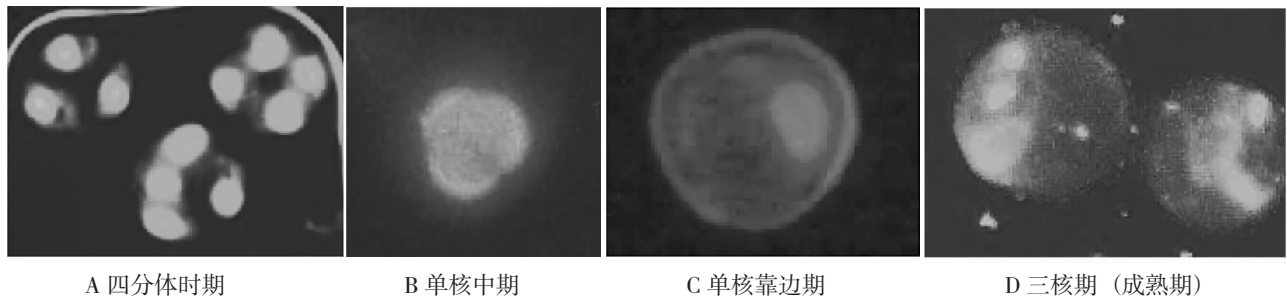


图1 松花菜小孢子自然发育过程(DAPI染色)

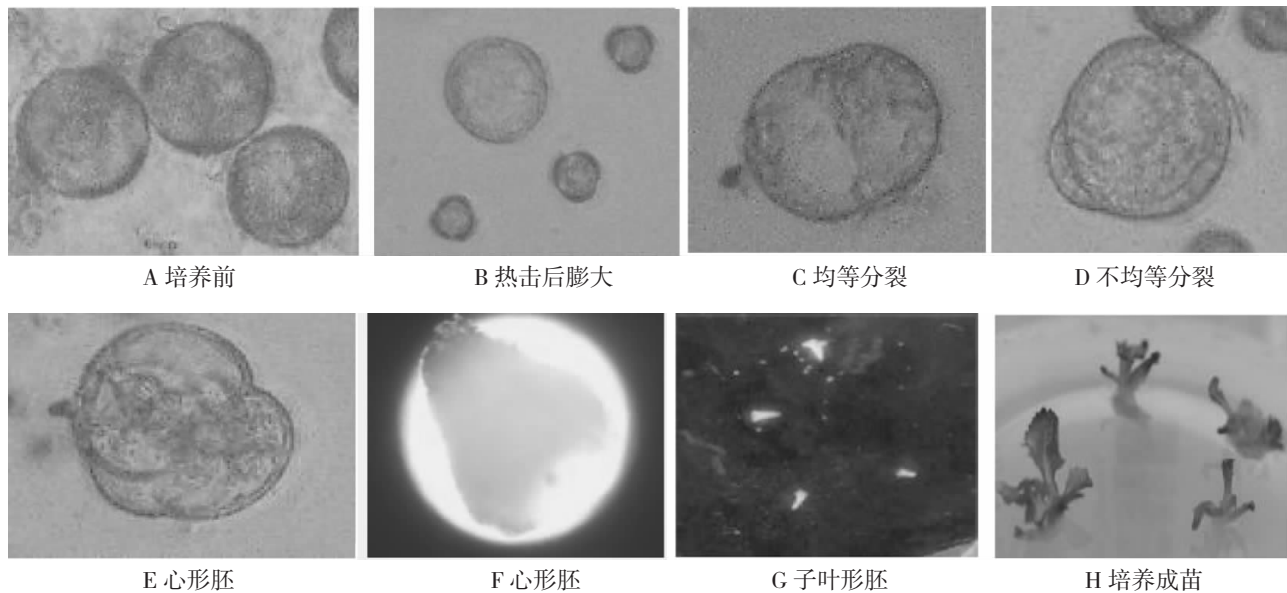


图2 松花菜游离小孢子发育过程

2.2 小孢子发育时期与花蕾大小的关系

细胞学观察发现,松花菜小孢子发育时期与花蕾长度大小的关系基本为:四分体时期 1.00~1.80 mm;单核中期 1.81~2.59 mm;单核靠边期 2.60~3.60 mm;双核期 3.61~4.20 mm;成熟期 4.21 mm 以上。在松花菜小孢子培养中,处于单核靠边期至双核早期的小孢子才具备胚状体发生能力。在本研究条件下,处于 2.90~3.80 mm 的花蕾中单核靠边期小孢子所占比例较大,在此范围内精确取样更易获得较高的出胚率。但不同品种花蕾略有差异,因此花蕾长度不能作为取样的唯一标准。

2.3 游离培养小孢子发育的细胞学观察

经显微观察发现,培养之前的新鲜小孢子发育整齐一致,大小相同,形状为不明显

三棱状或基本接近圆形(图2-A)。培养皿置于 33 ℃ 黑暗条件下热激培养 1~2 d 后,部分小孢子体积膨大,部分小孢子对热击反应不敏感,未发生膨大(图2-B)。膨大细胞在培养 2~3 d 内发生第 1 次分裂,分裂方式一般为对称分裂和不对称分裂,发生对称分裂时形成 2 个体积大小相同的细胞(图2-C);发生不对称分裂时形成 2 个体积不同的细胞(图2-D)。之后经过多次分裂和细胞增殖(图2-E)。培养 28 d 左右时出现肉眼可见白色胚状体,大多为心形胚(图2-F)。将培养皿转移到摇床上(60 r/min)培养 3~5 d 之后,发育成子叶形胚(图2-G)。将培养的子叶胚转接在 B5 固体培养基上 12~21 d 后,部分胚可直接分化成苗,部分形成愈伤组织进行再分化,分化好的小苗转入 MS 固体培养基

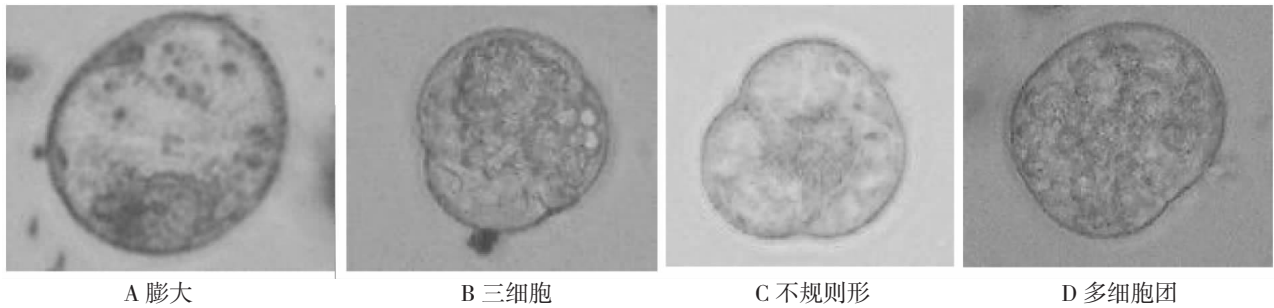


图3 松花菜游离小孢子胚胎发生过程

中，继续培养7~14 d即长成幼苗。

2.4 游离小孢子培养过程的细胞学观察

观察发现，在培养过程中，游离小孢子经过一系列的分裂和增殖过程，最终形成小孢子胚。但不是所有小孢子都能形成胚胎，部分小孢子在热击后并不发生膨大，有一些只发生体积膨大而细胞核不进行增殖(图3-A)；有一些发生分裂和增殖，在培养过程中会形成3细胞和4细胞以及多细胞团(图3-B、C、D)，但培养多日也未发育成胚状体，细胞壁不发生破裂。观察还发现，小孢子胚在培养过程的任何时候都可能停止发育，只有极少数膨大细胞最终形成胚状体。

3 小结与讨论

本研究通过DAPI荧光染色和普通光学显微观察比较了自然条件和游离培养条件下小孢子的发育过程。结果表明，自然条件下，正常花粉小孢子发育是配子体发育途径，单核小孢子进行2次减数分裂，最终形成具有3个核的成熟花粉粒。游离培养小孢子胚胎发生的途径是：小孢子在热击处理后膨大，之后发生均等分裂或不均等分裂产生2细胞，再经一系列分裂增殖过程形成胚状体。在胚胎发生过程观察中发现，有一些小孢子只发生体积膨大，细胞核不进行增殖；有一些发生增殖，在培养过程中能够形成3细胞和4细胞以及多细胞团，但细胞壁不发生破裂，最终只有极少数膨大细胞最终形成正常胚状体，这大大影响了松花菜小孢子培

养的成功率。即使发生了膨大和增殖的小孢子，在培养过程的任何时候都有可能停止发育，导致这些小孢子胚胎停止发育的原因目前还不明确，因此，松花菜小孢子培养过程中造成细胞的停止发育的原因，以及继续改善培养条件，促进小孢子胚胎的发生，提高成胚率，是今后研究的重点。

参考文献：

- [1] 顾宏辉, 赵振卿, 王建升, 等. 松花菜花球的主要营养特点分析[J]. 长江蔬菜, 2012(20): 37-39.
- [2] 单晓政, 文正华, 张小丽, 等. 华北地区温室雄性不育松花菜制种技术[J]. 长江蔬菜, 2019(1): 28-30.
- [3] 丁云花. 雄性不育松散型花椰菜新品种京松1号的选育[J]. 中国蔬菜, 2017(3): 64-66.
- [4] 赵振卿, 盛小光, 虞慧芳, 等. 松花菜浙091的选育及特征特性[J]. 浙江农业科学, 2014(2): 195-196.
- [5] 顾宏辉, 朱丹华, 杨加付, 等. 小孢子培养获得松花型花椰菜DH再生植株[J]. 农业生物技术学报, 2007(2): 301-305.
- [6] 朱惠霞, 陶兴林, 胡立敏, 等. 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[J]. 甘肃农业科技, 2017(6): 19-21.
- [7] 朱惠霞, 陶兴林, 刘明霞. 10个松花菜品种在兰州地区的引种试验初报[J]. 甘肃农业科技, 2018(12): 16-19.
- [8] 孙继峰. 温度对青花菜小孢子胚胎发生的影响及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.

(本文责编: 杨杰)