

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.01.002

栽培因素影响甘蓝花蕾小孢子发育同步性研究^①

张孟利, 张恩慧, 许忠民, 李思蓓

西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 为提高甘蓝花蕾单核靠边期小孢子发育的同步性, 完善甘蓝游离小孢子培养技术体系, 通过对花蕾供体植株进行整枝、疏花蕾和灌水 3 个栽培因素处理, 研究其对花蕾小孢子同步发育的影响。结果表明: (1) 基因型不同, 花蕾单核靠边期小孢子比率最大值和其花蕾长度不尽相同, 比率最大值范围在 34.94%~79.38%, (2) 整枝保留 20% 到 80% 一级分枝和疏花蕾保留级分枝上 10 到 30 个花蕾, 均能提高花蕾小孢子发育的同步性, 其保留 20% 一级分枝和选留一级分枝上 10 个花蕾相比对照单核靠边期小孢子比率最大增加了 125.5% 和 196.3%, (3) 增加土壤水势能够提高花蕾小孢子发育的同步性, 在土壤水势为 -10 kPa 可使花蕾单核靠边期小孢子比率比其它灌水下的水势最大增加 12%。

关键词: 甘蓝; 整枝; 疏花蕾; 灌水; 小孢子; 发育; 同步性

中图分类号: S635.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)01-0009-06

甘蓝 *Brassica oleracea* L. var. *capitata* 为十字花科芸薹属作物, 是一种世界性蔬菜, 深受各地民众喜爱。甘蓝杂种优势极显著, 其杂种一代亲本的选育具有多种途径, 而单倍体育种是一种创制新亲本资源的重要方法, 它可以大大提高育种效率、缩短育种年限^[1-2]; 甘蓝游离小孢子培养 (Isolated microspore culture) 是单倍体育种的一个重要基础, 它是指从甘蓝的花蕾中直接分离获得游离态的、新鲜的、发育时期合适的小孢子群体, 通过培养使其脱分化, 经由胚状体或愈伤组织的诱导, 再生获得单倍体植株, 而后经过自发或诱发的染色体加倍成为正常可育的、高度纯合的双单倍体植株的过程。据前人在油菜^[3]、白菜^[4]、甘蓝^[5] 和萝卜^[6] 等作物上的研究报道, 游离小孢子发育处于单核靠边期是胚状体诱导培养的最佳时期, 并且花蕾中发育处于单核靠边期的小孢子在群体中所占比率越大, 小孢子发育的同步性越高, 其花蕾培养越有利于小孢子诱导出胚状体。据我们观察, 甘蓝花蕾中小孢子的发育同步性除受基因型决定外, 植株生长的环境条件和栽培措施也是主要影响因素。官春云^[7] 研究认为, 生长在人工气候室内的油菜植株提供的花蕾小孢子出胚率高于取自温室油菜植株上花蕾小孢子出胚率; 王鑫等^[8] 研究认为, 通过对甘蓝小孢子供体植株整枝和增施微肥等栽培技术均能显著提高花蕾小孢子发育的同步性。通过对植株形态和栽培措施的改进来提高小孢子培养效果的相关研究报道国内外甚少, 本研究拟通过对甘蓝花蕾植株灌水、整枝和疏蕾等处理, 研究其对花蕾中小孢子发育同步性的影响, 探索出一种甘蓝花蕾小孢子发育同步性较高的植株栽培技术, 旨在为甘蓝小孢子培养技术体系更加完善奠定基础。

① 收稿日期: 2016-04-25

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01); 陕西省杨凌示范区农业科技示范推广能力提升项目(20122014-TS-16)。

作者简介: 张孟利(1989-), 女, 河南鲁山人, 硕士研究生, 主要从事甘蓝育种与生物技术研究。

通信作者: 张恩慧, 教授。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料是由西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种室从国内外引进的甘蓝 6 个不同基因型杂种一代品种, 分别为 A(F1-13)、B(F1-19)、C(F1-23)、D(F1-33)、E(F1-34)和 F(F1-37)。材料于 2014 年 7 月 5 日露地育苗, 2014 年 8 月 9 日定植于大田; 叶球成熟后, 于 2014 年 12 月 2 日假植窖藏, 2015 年 3 月 8 日移栽塑料纱网大棚和花盆, 正常管理。

1.2 试验方法

1.2.1 花蕾小孢子发育同步性分析

甘蓝植株抽薹进入花期, 每天 9:00—10:00 时采摘适宜长度花蕾、编号, 摘取花蕾放入培养皿并及时放入冰盒中带回实验室。随后用游标卡尺测量花蕾长度并做记录, 将其放置在载玻片上轻压、挤出小孢子, 在倒置显微镜 400 倍下观察花蕾内的小孢子发育时期, 并随机选择 5 个视野观察并记录其小孢子发育处于单核靠边期的数目及视野内小孢子的总数目, 计算单核靠边期小孢子比率, 分析花蕾小孢子发育同步性。

1.2.2 不同基因型花蕾小孢子发育同步性的差异分析

供试的 6 个不同基因型品种材料植株抽薹开花进入初花期时, 选择每个材料相同部位的一级分枝, 在同一天相同时间内, 分别摘取每个材料的花蕾, 以花蕾的长度为 3.0 mm、3.5 mm、4.0 mm、4.5 mm、5.0 mm、5.5 mm 和 6.0 mm, 分为 7 组; 在每个材料的各组内随机选取 3 个花蕾, 分析不同基因型品种间花蕾小孢子发育同步性。

1.2.3 植株一级分枝数量对花蕾小孢子发育同步性的影响

以 B 品种为供试材料, 当植株上一级分枝完全抽出后, 选择生长健壮一致的植株进行整枝处理, 分别设一级分枝总数量保留 20%(Z1)、50%(Z2)、80%(Z3)和 100%(CK)等, 去除全部二级分枝; 当植株进入初花期、盛花期和末花期, 每处理随机选择 3 株, 从花序相同部位上选择长度 4.5 mm 花蕾, 每株 3 蕾, 重复 3 次, 在倒置显微镜下观察, 分析保留一级分枝不同数量对花蕾小孢子发育同步性的影响。

1.2.4 疏花蕾对花蕾小孢子发育同步性的影响

以 C 品种为供试材料, 选择生长健壮一致的抽薹植株仅保留一级分枝进行疏花处理, 选择由下而上第 4 枝位的一级分枝花序上花蕾, 不同花期去除花朵和长度大于 3.0 mm 花蕾, 采取选留 10 蕾(S1)、20 蕾(S2)、30 蕾(S3)和不疏花蕾(CK)处理, 每处理随机选择 3 株, 重复 3 次, 从花序上选择长度为 4.5 mm 的花蕾, 放在倒置显微镜下观察, 分析疏花蕾对花蕾小孢子发育同步性的影响。

1.2.5 灌水量对花蕾小孢子发育同步性的影响

以 A 品种为供试材料, 窖藏假植后取出植株, 选择叶球大小一致植株, 将其放置防雨塑料大棚内。采用盆栽人工控制水分方法在移栽后立即按设定灌水量灌定根水, 随后间隔 7 d 灌水 1 次进行水分处理, 设 4 个处理水平, 即土壤水势 -10 kPa(G1), 土壤水势 -25 kPa(G2), 土壤水势 -40 kPa(G3), 土壤水势 -55 kPa(G4), 3 次重复。用电子针式张力计土壤测试仪测定土壤水势, 埋设深度为陶土头中心距土表 15 cm, 每次灌水记载负压表读数, 及时补水。分别在初花期、盛花期和末花期, 采取选择由下而上第 4 枝位一级分枝花序上花蕾, 倒置显微镜下观察 4.5 mm 花蕾中单核靠边期小孢子比率, 分析不同土壤水势对花蕾小孢子发育同步性的影响。

1.2.6 数据统计与分析

单核靠边期小孢子比率(%) = 视野内单核靠边期小孢子数量 / 视野内小孢子总量 \times 100%; 采用 Excel 和 SPSS 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同基因型花蕾小孢子发育同步性的差异分析

由图 1 可知, 甘蓝不同基因型品种间, 在选定的 7 个花蕾长度中单核靠边期小孢子所占比率基因型相

互间均存在着显著或极显著性差异; 花蕾各长度单核靠边期小孢子比率最高值基因型, 3.0 mm 时, 为 E 品种 16.07%; 3.5 mm 时, 为 B 品种 25.48%; 4.0, 4.5, 5.5 和 6.0 mm 时, 均为 D 品种, 分别为 51.41%, 79.38%, 28.90% 和 17.38%; 5.0 mm 时, 为 C 品种 57.17%. 6 种基因型品种内小孢子发育同步性具有一个共同规律, 即: 花蕾长度在 3.0~6.0 mm 范围内, 单核靠边期小孢子比率随花蕾长度增加而增加, 当达到最大值后, 随花蕾长度增加反而减小; 其中在 4.0~5.0 mm 时, 相对单核靠边期小孢子所占比率 6 种基因型品种都较大. 不同基因型品种间, 单核靠边期小孢子比率为最大值时花蕾长度差异具有不一致性, B 品种 4.0 mm 时比率最大为 34.94%, A, D, F 品种 4.5 mm 时比率最大分别为 52.51%, 79.38% 和 61.87%, C, E 品种 5.0 mm 时比率最大分别为 57.17%, 39.78% (图 1). 由此表明, 甘蓝基因型是影响花蕾小孢子发育同步性的一个主要因素, 基因型不同小孢子发育同步性最高值时的花蕾长度也不相同.

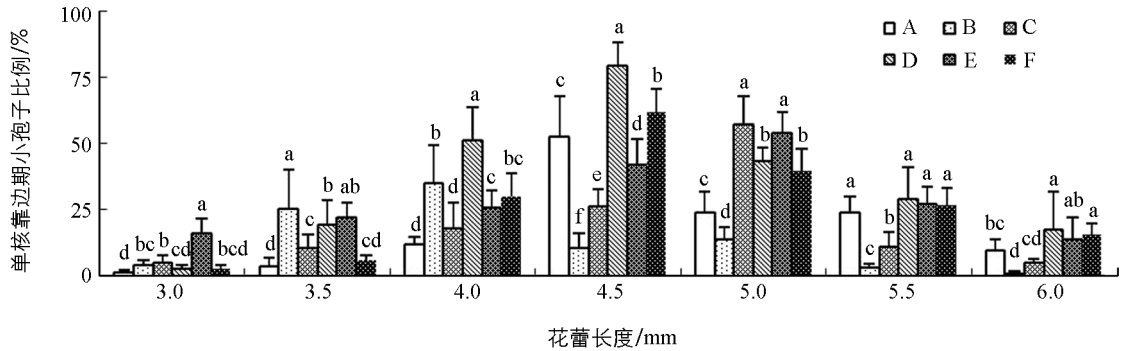


图 1 6 种基因型甘蓝不同长度花蕾单核靠边期小孢子比率值

2.2 植株一级分枝数量对花蕾小孢子发育同步性的影响

从表 1 可知, 当保留一级分枝数量达到 20% 时, 初花期、盛花期和末花期的花蕾单核靠边期小孢子比率相比对照均极显著性增加, 分别增加 58.1%, 125.5% (图 2a) 和 14.4%. 当保留一级分枝数量达到 50% 时, 相比对照均表现比率增加值, 但仅在盛花期花蕾单核靠边期小孢子比率与对照表现极显著性差异, 比 CK 增加 59.2% (图 2b). 当保留一级分枝数量达到 80% 时, 花蕾单核靠边期小孢子比率在盛花期同样表现极显著性增加, 比 CK 增加 31.6% (图 2c), 而在初花期比对照反而极显著性减少. 由图 3 可看出: 在甘蓝游离小孢子培养过程中, 整枝处理下小孢子出胚率比对照组高. 由此表明, 甘蓝抽薹植株适当去除一级分枝有利于提高花蕾单核靠边期小孢子比率和提高整个开花进程中花蕾小孢子发育的同步性.

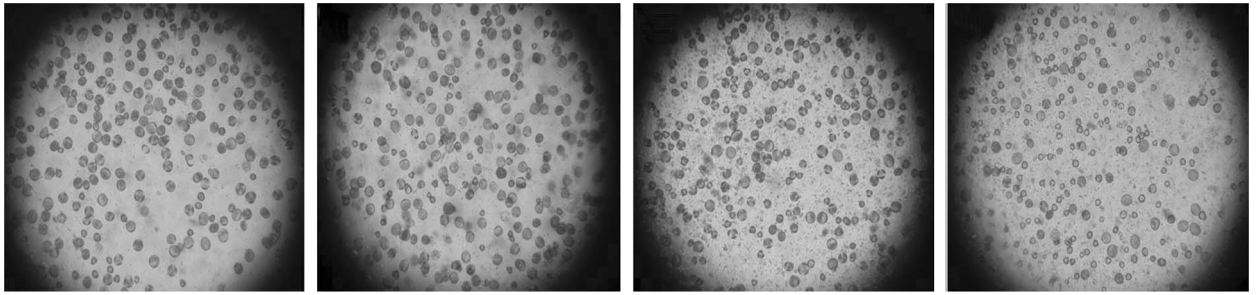
表 1 甘蓝不同数量一级分枝上花蕾单核靠边期小孢子比率结果

处理	花蕾单核靠边期小孢子平均比率/%			比 CK 增长率/%		
	初花期	盛花期	末花期	初花期	盛花期	末花期
Z1	18.5 ± 8.10aA	22.1 ± 4.55aA	11.9 ± 4.19aA	58.1	125.5	14.4
Z2	12.5 ± 4.00bB	15.6 ± 3.99bB	11.1 ± 3.06bB	6.8	59.2	6.7
Z3	6.7 ± 2.02cC	12.9 ± 2.46cC	10.6 ± 2.31bB	-42.7	31.6	1.9
CK	11.7 ± 4.9bB	9.8 ± 2.40dD	10.4 ± 2.55bB	-	-	-

注: a, b, c 表示在 $\alpha=0.05$ 时的差异显著性, A, B, C 表示在 $\alpha=0.01$ 时的差异显著性; 数据为“平均数 ± 标准误差”. 下表同.

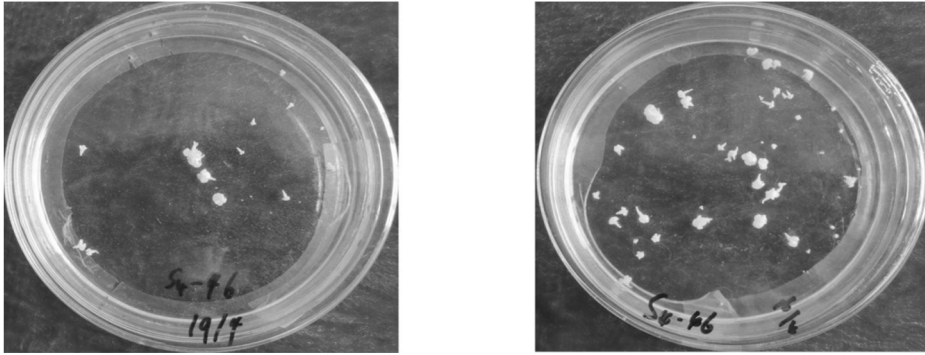
2.3 疏花蕾对植株花蕾小孢子发育同步性的影响

由表 2 可知, 甘蓝抽薹植株一级分枝上保留 10, 20 和 30 个花蕾, 在初花期、盛花期和末花期花蕾单核靠边期小孢子比率均比对照表现极显著性增加, 增加幅度为 23.7%~196.3%; 3 种疏花蕾处理中, 单核靠边期小孢子比率增加的最大值均在初花期 (图 4), 分别比 CK 增加 196.3%, 112.5% 和 51.3%; 疏花蕾处理中均以保留 10 个花蕾 (S1) 处理在 3 个花期单核靠边期小孢子比率增幅最大, 分别为 196.3%, 195.8% 和 136.6%. 由此表明, 疏花蕾处理可以有效增加花蕾小孢子发育同步性, 且疏花蕾数量与小孢子发育同步性提高呈现出量效效应, 疏花蕾数量越大, 其单核靠边期小孢子比率越大.



a. Z1花蕾单核靠边期小孢子比率 b. Z2花蕾单核靠边期小孢子比率 c. Z3花蕾单核靠边期小孢子比率 d. CK花蕾单核靠边期小孢子比率

图 2 甘蓝盛花期时不同数量一级分枝处理花蕾小孢子发育同步性观察表现



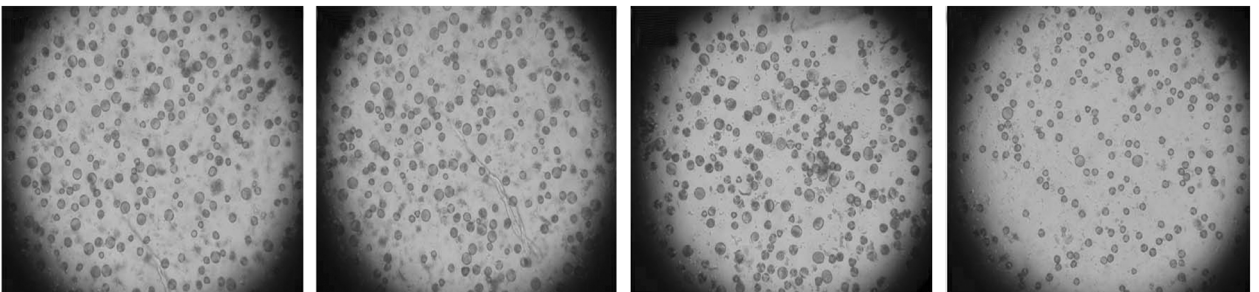
CK: 对照

ZZ: 整枝处理(保留20%的一级分枝)

图 3 整枝处理对甘蓝游离小孢子培养出胚的影响

表 2 甘蓝不同疏花蕾量下花蕾单核靠边期小孢子比率结果

处理	花蕾单核靠边期小孢子平均比率/%			比 CK 增长率/%		
	初花期	盛花期	末花期	初花期	盛花期	末花期
S1	23.7±2.79aA	34.9±2.33aA	23.9±1.50aA	196.3	195.8	136.6
S2	17.0±2.67bB	15.9±2.34bA	17.2±1.73bB	112.5	34.7	70.3
S3	12.1±2.36cC	15.9±1.74bA	12.5±2.51cC	51.3	34.7	23.7
CK	8.0±1.85dD	11.8±1.89bA	10.1±1.38dD			



a. S1花蕾单核靠边期小孢子比率 b. S2花蕾单核靠边期小孢子比率 c. S3花蕾单核靠边期小孢子比率 d. CK花蕾单核靠边期小孢子比率

图 4 甘蓝在初花期时不同疏花蕾处理下花蕾小孢子发育同步性观察表现

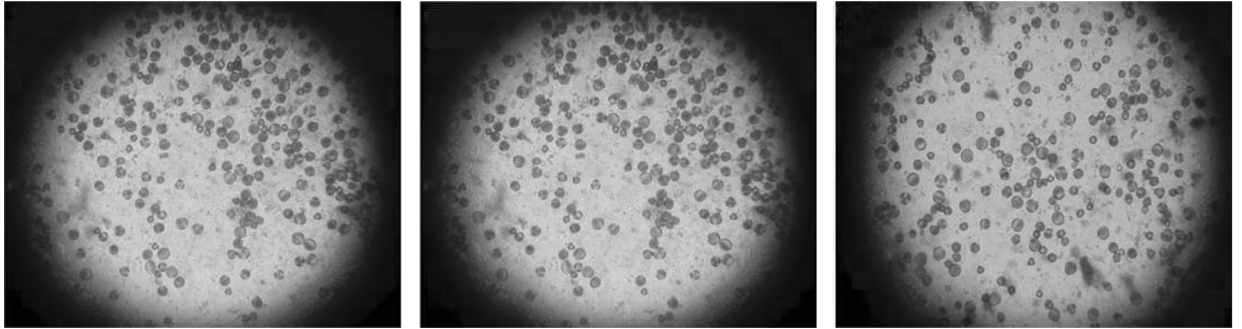
2.4 灌水对供体植株花蕾小孢子发育同步性的影响

从表 3 可见,不同土壤水势显著影响甘蓝花蕾中小孢子发育程度,初花期、盛花期和末花期均以处理土壤水势为 -10 kPa 下单核靠边期小孢子比率最高,分别达到 61.2% 、 61.3% 和 59.1% (图 5);不同土壤水势影响效果比较,土壤水势为 -55 kPa 、 -40 kPa 和 -25 kPa 处理单核靠边期小孢子比率值相互间不存在显著差异性,但均与土壤水势为 -10 kPa 处理存在极显著性差异,最大可增加到 12% .不同土壤水势在不同花期影响效果比较,单核靠边期小孢子比率均以初花期时最小,末花期最大.由此得出,土壤水势影响花蕾小孢子发育同步性,在一定土壤水势范围内,单核靠边期小孢子比率随着土壤水势的增加而增加,其

中, 土壤水势为 -10 kPa 的灌水量影响效果最好.

表 3 不同土壤水势下甘蓝花蕾单核靠边期小孢子比率结果

处理	花蕾单核靠边期小孢子平均比率/%				
	初花期	盛花期	末花期	平均值	比 G1 增长量/%
G4	61.2±7.82aA	61.3±6.01aA	59.1±3.12aA	60.5	12.0
G3	52.2±5.70bB	55.5±5.12bB	57.3±3.79bAB	55.0	2.6
G2	51.7±7.11bB	54.6±4.13bB	55.0±3.90bcB	53.7	0.1
G1	51.3±4.36bB	53.2±8.38bB	54.2±4.15cB	53.6	



a. 初花期花蕾单核靠边期小孢子比率

b. 盛花期花蕾单核靠边期小孢子比率

c. 末花期花蕾单核靠边期小孢子比率

图 5 甘蓝在土壤水势 -10 kPa 下不同花期时花蕾小孢子发育同步性观察表现

3 讨 论

生物的性状是由基因型和环境因子共同作用的结果, 基因型是决定生物性状的内在因素. 本研究通过观察比较 6 个基因型甘蓝品种花蕾单核靠边期小孢子比率, 认为甘蓝品种不同基因型花蕾长度的相同性表现花蕾单核靠边期小孢子发育的差异性; 甘蓝花蕾中小孢子发育同步性是由基因型决定的, 单核靠边期小孢子比率最高时不同基因型间比率值不相同, 且花蕾长度具有差异; B 品种比率最高值为 34.94% 时花蕾长度达 4.0 mm, A, D, F 品种比率最高值分别为 52.51%, 79.38% 和 61.87% 时花蕾长度均达 4.5 mm, C 和 E 品种比率最高值分别为 57.17% 和 54.17% 时花蕾长度均达 5.0 mm; 研究得出甘蓝不同基因型品种间花蕾小孢子同步发育具有不一致性, 要获得高胚状体诱导率的小孢子培养技术, 首要条件是针对基因型先找到单核靠边期小孢子比率最大值时的最适花蕾长度.

环境因子是决定生物性状的外在因素, 通过优化植物生长的环境条件, 可以改变植物的某些性状或使基因性状得以充分表达. 甘蓝花蕾小孢子发育同步性虽然由基因决定, 但花蕾供体植株的生长条件和营养状况在一定程度上也影响着小孢子的发育程度. 本研究通过减少甘蓝抽薹植株上一级分枝的数量和疏花蕾调整植株自身营养分配^[9], 促进植株上单花蕾的生殖发育, 使花蕾中小孢子发育的同步性得到了大幅度提高. 研究认为保留 20% 到 80% 一级分枝的数量或保留一级分枝上 10 到 30 个花蕾, 均在不同程度上能提高花蕾中小孢子发育的同步性; 本研究认为花蕾中单核靠边期小孢子比率相比对照在盛花期提高最大值为保留 20% 一级分枝达 125.5% 和疏花选留 10 个花蕾达 196.3%. 分析其原因主要是整枝和疏花蕾是将植株有限营养集中供应给一定数量的花蕾, 使其花蕾小孢子有更充分营养进行同步性生殖发育.

水分是决定植株健壮生长的主要栽培因素之一, 植株体内的含水量决定着光合产物的制造量同时也影响着营养物质的运输. 刘建福等^[10]研究表明, 水分胁迫可直接影响澳洲坚果减数分裂期胚珠和花粉的发育; Shahram 等^[11]研究表明, 土壤水分胁迫影响小麦生殖发育和花粉的形成. 本研究认为, 在甘蓝植株抽薹显蕾期, 适当增加土壤含水量能够提高花蕾小孢子发育的同步性, 在单株间隔 7 天浇灌水使土壤水势为 -10 kPa 时可使花蕾单核靠边期小孢子比率达到 59.1%~61.3%. 由此说明, 甘蓝适当增加土壤水势可提高植株生殖发育, 这与人^[9-12]在水分与促进植物生殖发育方面的研究结果基本相同. 分析其原因主要是适宜的水分条件促进植株营养体生长健壮, 光合产物积累更多, 提供生殖发育营养物质更为充足, 进而能够促进花蕾小孢子均衡发育.

参考文献:

- [1] 杨丽梅, 方智远, 刘玉梅, 等. 利用小孢子培养选育甘蓝自交系 [J]. 中国蔬菜, 2003(6): 31—32.
- [2] 梅德圣, 李云昌, 胡 琼, 等. 油菜小孢子培养技术体系研究 [J]. 农业生物技术科学, 2005, 21(12): 72—76.
- [3] 赵志刚. 芥菜型油菜、白菜型油菜种间杂种的小孢子培养 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 80—82.
- [4] 申书兴, 赵前程, 刘世雄, 等. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定 [J]. 园艺学报, 1999, 26(4): 232—237.
- [5] 杨安平, 张恩慧, 王莎莎, 等. 甘蓝类蔬菜小孢子培养研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(7): 332—335.
- [6] 张 丽. 萝卜游离小孢子培养技术初探 [J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 676—678.
- [7] 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究: I. 供体植株和小孢子密度对小孢子培养的影响 [J]. 作物学报, 1995, 21(6): 665—670.
- [8] 王 鑫, 刘 争, 张恩慧, 等. 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.
- [9] 钱婷婷, 郭新宇. 果菜类蔬菜作物同化产物分配影响因素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 211—216.
- [10] 刘建福, 陈李林, 汤青林, 等. 不同土壤水分胁迫对澳洲坚果花期生长的影响 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(6): 735—739.
- [11] SHAHRAM M, SADATINEJAD J, SHIRAN B. Which One is Responsible or Apical Sterility in Wheat Under Water-Stress Conditions, Ovule or Pollen Aborting [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2006, 9(15): 2808—2811.
- [12] GOMES F, CARR M K V, SQUIRE G R. Effects of Water Availability and Vine Harvesting Frequency on the Productivity of Sweet Potato in Southern Mozambique. IV. Radiation Interception, Dry Matter Production and Partitioning [J]. Expl Agric, 2005, 41(1): 93—108.

The Effects of Planting Factors on the Development Synchronicity of Microspores in *Brassica oleracea* Buds

ZHANG Meng-li, ZHANG En-hui, XU Zhong-min, LI Si-bei

School of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China

Abstract: In order to increase the development synchronicity of the cabbage buds at microspore telophase I and improve the system of the cabbage isolated microspore culture technique, we set three cultivation treatments to the flower bud donor, i. e. pruning, bud thinning and irrigation, and investigated their effects on the development synchronicity of the bud microspores. The results showed that the maximum ratios of bud microspore at telophase I and bud length differed with the genotypes, the maximum ratio ranging from 34.94% to 79.38%; that retention of 20% to 80% primary branches in pruning or reservation of 10 to 30 buds on the primary branches helped to improve the development synchronicity of the bud microspores, increasing the ratio of bud microspore at telophase I by 125.5% and 196.3%, respectively, under the treatment of retaining 20% primary branches and 10 buds on them; and that increasing soil water potential could improve the development synchronicity of the bud microspores, the ratio of bud microspore at telophase I with soil water potential of -10 Kpa being 12% greater than under other different irrigation conditions.

Key words: cabbage; pruning; flower bud thinning; irrigation; microspore; development; synchronicity

