

马铃薯花粉生活力检测方法的比较

程群^{1,2}, 吴承金^{1,2}, 戴清堂^{1,2}, 李大春^{1,2}, 王云鹏^{1,2}

(1. 中国南方马铃薯研究中心, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北省农业创新中心鄂西综合试验站, 湖北 恩施 445000)

摘要: 使用受精力检测法、染色法和花粉离体萌发法对马铃薯花粉生活力进行检测, 旨在筛选出一种或几种快速、准确、有效地检测马铃薯花粉生活力的方法。通过试验, 发现受精力检测法结合碘-碘化钾染色法、花粉离体萌发法, 能更准确地分析结实率或不结实的原因, 同时解决亲本花期不一致和远距离杂交的问题, 使育种者能更合理地选择亲本, 充分有效地利用育种材料。

关键词: 马铃薯; 花粉; 生活力; 检测方法

花粉是种子植物的雄配子体, 在有性繁育中扮演着重要角色。在高新科学技术迅速发展的今天, 马铃薯育种工作出现了花粉培养、无性系变异、原生质体诱导、体细胞杂交及转基因技术等许多新的育种方法, 但到目前为止它们也仅仅只能作为一种辅助手段应用到马铃薯育种上。杂交育种在马铃薯育种中仍然是最有效的手段。

进行马铃薯花粉生活力测定对指导马铃薯育种具有重要的理论和现实意义, 不仅适用于采取适当的方法进行花粉保存, 而且在杂交中能准确地分析结实率或不结实的原因, 从而使育种工作者在明确育种目标的前提下, 能准确地选择亲本, 充分有效地利用育种材料。

有关马铃薯花粉生活力的检测方法很多, 主要有受精力检测法, 染色法和花粉离体萌发法。其中根据原理染色法又分为醋酸洋红染色法和碘-碘化钾染色法等。每种方法都有不同的适应范围, 不同的花粉应选择不同的检测方法。

本研究用受精力检测法、染色法和花粉离体萌发法对马铃薯花粉生活力进行检测, 旨在筛选出一种或几种快速、准确、有效地检测马铃薯花粉生活力的方法。

收稿日期: 2007-10-09

基金项目: 国家948项目、国家科技支撑计划2006BAD01A06-1-12、湖北省农业科技创新基金。

作者简介: 程群(1971-), 女, 农艺师, 主要从事马铃薯遗传育种技术研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试亲本包括03HE42-32、03HE52-2、44-4、51-5、59-5-86、E62、T1806、鄂薯1号、鄂薯5号共9个。

1.2 试验设计

试验设在恩施市天池山, 海拔1200 m, 试地平坦, 壤土, 肥力中等, 播前翻耕, 人工碎土后播种。供试亲本采用整薯播种在杂交亲本试验网棚中, 每个材料种10穴。

1.3 试验方法

1.3.1 受精力检测法

亲本开花后, 每天早上8:00左右到杂交圃进行亲本间杂交。利用肉眼直接观察马铃薯花药颜色、花药饱满度, 然后对亲本材料去雄, 进行杂交。选择刚开过的花, 用左手食指和中指夹住花萼与花柄连接的地方, 用右手拇指和食指轻弹花药, 使花粉落在左手的拇指指甲上, 观察拇指指甲上落下的花粉数量。并统计杂交成功后所获浆果数和实生籽数。

1.3.2 染色法

(1) 醋酸洋红染色法

称取3 g洋红或胭脂红放入300 mL的45%冰醋酸中, 同时加铁锈钉, 加热煮沸2.5 h, 煮沸过程中用玻璃棒朝同一个方向搅拌, 以防溢出。至饱和状态时, 冷却, 将溶液用滤纸过滤, 装入棕色瓶

备用。测定时, 将欲测品种的少量花粉置于载玻片上, 加一滴醋酸洋红溶液, 盖上盖玻片, 5 min 后在显微镜下观察, 有生活力花粉均被染成红色, 呈圆形而粒饱满。无生活力花粉不着色, 形状不规则, 粒瘪缩。每片观察 5 个视野, 并统计具有生活力花粉的百分率^[1]。计算公式为:

$$\text{具有生活力花粉的百分率} = \frac{\text{染上色的有效花粉数}}{\text{所有花粉数}} \times 100$$

(2) 碘-碘化钾染色法

称取 2 g 碘化钾溶解于 5~10 mL 蒸馏水中, 然后加入 1 g 固体碘, 待完全溶解后定容至 300 mL。测定时, 取少量花粉振播在载玻片上, 然后滴上一滴碘化钾溶液, 使花粉充分散开, 盖上盖玻片, 在 25 左右放置 5 min 后再在显微镜下进行观察。有活力的花粉被染成蓝色, 生活力衰弱或内含物少的花粉成黄褐色。每片观察 5 个视野, 并统计具有生活力花粉的百分率^[2]。计算公式为:

$$\text{具有生活力花粉的百分率} = \frac{\text{染上色的有效花粉数}}{\text{所有花粉数}} \times 100$$

1.3.3 花粉离体萌发法

首先配制培养液, 称取 20 g 蔗糖, 5 mg 硼酸, 加入 100 mL 水中, 放入烧杯中加热煮沸, 等其全部溶解即可。将培养液用滴管在载玻片上滴 1 滴, 然后将取样混合的花粉适量撒在培养液上, 放入培养皿中(培养皿中已倒入少量蒸馏水, 并且放入滤纸保湿), 在 20~25 恒温培养箱中培养 5 h, 取出载玻片, 在显微镜下观察花粉粒发芽情况, 每片观察 5 个视野, 并统计花粉发芽率^[3]。计算公式为:

$$\text{花粉发芽率} = \frac{\text{已发芽的花粉数}}{\text{所有花粉数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 受精力检测法

一般来说, 品种的花药瘦小, 颜色黄绿色, 弹出的花粉数量少, 甚至没有花粉, 那么它的有效花粉就更少或者没有, 这样的品种材料适宜作母本进行杂交; 品种的花药饱满, 颜色黄色或橙黄色, 弹出的花粉数量比较多, 但它的有效花粉数量要根据做父本进行杂交配制组合成功数与获取实生籽数来判定, 作父本容易配制成功且实生种籽数多, 那么它的有效花粉数就多, 花粉生活力就强, 受精力就越强; 反之, 有效花粉数就少, 花粉生活力就弱, 受精力就越弱。

观察结果显示, 59-5-86、51-5、03HE52-2、44-4 四个亲本材料花药饱满, 呈橙黄色, 弹出的花粉数量多, 03HE42-32、E62、鄂薯 1 号三个亲本材料花药也比较饱满, 呈黄色, 弹出的花粉数量中等, T1806 和鄂薯 5 号两个亲本材料弹出的花粉数量最少。从表 1 可以看出, 59-5-86、51-5 两个亲本材料作父本配制组合成功数分别达到 49 个、34 个, 获实生籽数为 33775 粒和 27325 粒, 这说明 59-5-86、51-5 它们的有效花粉数量多, 花粉的生活力强, 受精力比较强。而 44-4 虽然弹出的花粉也比较多, 但它作父本配制组合基本不成功, 这说明它的有效花粉少, 花粉的生活力弱, 受精力也就弱。

通过受精力测定法, 我们能对亲本材料的花粉生活力有大致了解, 这种花粉生活力检测方法比较可靠和精确, 但费时费力, 且只能定性测定而不能定量测定^[4]。

表 1 不同亲本材料杂交的果实和种籽形成情况

品名	作母本配制 组合数	作母本配制 组合成功数	获取浆 果数	实生种 籽数	作父本配制 组合数	作父本配制 组合成功数	获取浆 果数	实生种 籽数
03HE42-32	5	2	3	365	6	3	23	2 840
03HE52-2	5	5	36	5 570	16	14	109	15 970
44-4	12	10	103	16 620	0	0	0	0
51-5	7	5	52	3 805	42	34	220	27 325
59-5-86	10	5	58	8 175	54	49	306	33 775
E62	11	7	63	10 360	22	8	54	4 730
T1806	1	1	4	500	7	4	16	1 490
E1	5	5	29	3 690	8	7	57	8 805
E5	6	1	20	1 735	7	2	3	500

2.2 染色法

2.2.1 醋酸洋红染色法

在显微镜下观察, 花粉大部分都被染成淡红色, 呈圆形而饱满, 小部分形状不规则且粒瘪缩的花粉不着色(图1)。醋酸洋红染色法染色率极高, 从表2可以看出, 染色率最低达到66.1%, 最高达89.1%。由于花粉大部分都着色, 不容易辨认, 与碘-碘化钾染色, 花粉离体萌发相比较, 结果相差较大。

表2 不同方法检测具有生活力花粉的百分率

品名	醋酸洋红染色 (%)	KI染色 (%)	发芽试验 (%)
03HE42-32	87.3	2.8	7.4
03HE52-2	89.1	1.8	5.7
44-4	73.3	9.9	1.7
51-5	70.2	2.6	8.2
59-5-86	73.4	3.8	14.1
E62	82.3	3.7	2.0
T1806	81.3	3.0	5.9
E1	79.8	4.2	13.5
E5	66.1	4.8	1.3

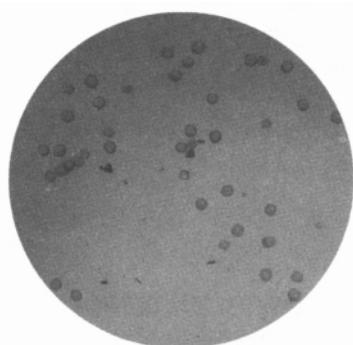


图1 醋酸洋红染色

2.2.2 碘-碘化钾染色法

上述9个亲本材料经碘-碘化钾染色后, 在显微镜下观察, 生活力强的花粉染成深蓝色, 接近黑色, 生活力较强的花粉染成蓝色, 生活力衰弱或内含物少的花粉成淡黄色, 甚至无色(图2)。由表2可以看出, 碘-碘化钾染色法的染色率远远低于醋酸洋红染色法的染色率, 最高达到9.9%, 最低只达到1.8%。但这种染色方法与花粉离体萌发的结果比较接近, 说明此方法能较为客观地反映花粉生活力, 在不能进行花粉离体萌发的情况下, 碘-碘

化钾染色法也能比较准确地检测出马铃薯花粉的生活力。

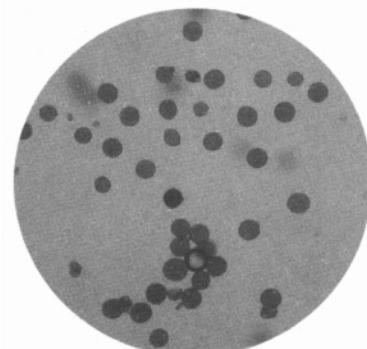


图2 I-KI染色

2.3 花粉离体萌发

以花粉在离体培养基上的萌发率来表示花粉生活力, 结果准确可靠。由表2可知, 亲本材料03HE42-32、03HE52-2、44-4、51-5、59-5-86、E62、T1806、鄂薯1号、鄂薯5号的花粉在离体萌发最适的培养基上(15%蔗糖+0.5 mg/100 mL硼酸), 花粉萌发率分别达到7.4%, 5.7%, 1.7%, 8.2%, 14.1%, 2.0%, 5.9%, 13.5%, 1.3%, 且花粉管生长良好, 便于统计(图3)。51-5、59-5-86、鄂薯1号的花粉萌发率都在8.2%以上, 说明其花粉生活力强, 鄂薯5号与44-4花粉萌发率不足2%, 也充分说明它们的花粉生活力较弱, 其他品种花粉萌发率在2.0%~7.4%之间, 说明它们的花粉生活力中等。与碘-碘化钾染色法相比较, 两者结果基本一致。花粉离体萌发法操作简便, 所需时间比染色法略长, 结果直观合理, 并可完全定量, 因此花粉离体萌发法能有效检测马铃薯花粉的生活力。

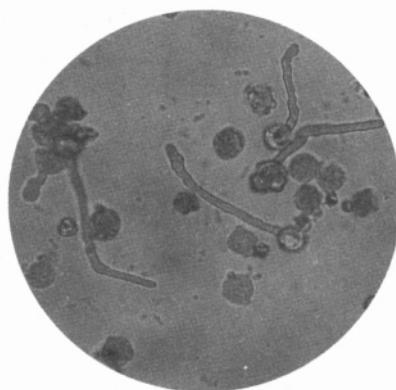


图3 花粉离体萌发

马铃薯组培苗低成本高效生产技术试验

李春华, 王菊英, 和 忠, 王绍林

(丽江市农业科学研究所, 云南 丽江 674100)

摘要: 研究了与马铃薯组培苗生产效率有关的培养基配制、培养瓶规格、接种方法及苗数、炼苗周期等因素对生产成本的影响, 提出了高效组培苗生产技术, 使马铃薯组培苗生产成本降低 55.6%, 移栽成活率提高 5.6%, 该技术可运用于马铃薯组培苗规模化、工厂化生产。

关键词: 马铃薯; 组织培养; 低成本; 高效; 快繁

马铃薯是用块茎种植的无性繁殖作物, 在生长期间容易被病虫害侵染造成病毒性退化, 导致不能高产, 用马铃薯茎尖脱毒技术生产繁殖出脱毒种薯比一般自然留种能增产 50%, 有的甚至能增产一倍以上^[1], 然而目前脱毒种薯价格均偏高, 生产者承受不了高昂的种薯费用, 脱毒种薯推广受到一定

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 云南省马铃薯产业关键技术研究 2006NG08。

作者简介: 李春华(1978-), 男, 农艺师, 主要从事植物的脱毒、组培快繁等工作。

程度限制, 只有降低种薯生产成本, 才能满足市场要求。在脱毒原种生产环节中, 组培苗生产成本所占比例最高, 占生产成本 60%~80%, 而在组培苗生产环节中, 劳动力成本所占比例是最高的, 占生产成本 70%左右。谢庆华等^[2]、牛爱国等^[3]和张宇宏等^[4]对培养基进行了研究, 王一航等^[5]和赵佐敏等^[6]对培养条件进行了研究, 提出了降低组培苗成本的方法。本文主要从劳动力方面出发, 研究了与生产效率有关的各个因素对组培苗生产的影响, 为降低成本提供科学依据。

3 讨 论

本试验除醋酸洋红染色法染色率比较高以外, 受精力检测法与碘-碘化钾染色法、花粉离体萌发法结果基本一致。受精力检测法根据结实情况判断花粉生活力, 比较可靠和精确, 但费时费力, 并且只能定性而不能定量。利用染色法检测花粉生活力具有快速简便的优点, 但受花粉自身的特性的影响较大, 不同的染色法只适合某些植物花粉的检测。醋酸洋红染色法染色率高可能是由于醋酸洋红染色剂使未成熟、败育和衰老的马铃薯花粉着色, 而这些花粉粒并不一定具有受精能力, 致使花粉的生活力测定值往往偏高。而碘-碘化钾染色法的染色率与花粉离体萌发的萌发率比较接近, 操作简单。碘-碘化钾染色法更能准确地检测马铃薯花粉的生活力。花粉离体萌发法根据花粉萌发率和花粉管生长状况真实地反映花粉的生活力状况, 可以了解马

铃薯与结实和种籽形成的相关性, 此方法快速、简便、合理。因此在马铃薯花粉生活力的检测方法中, 受精力检测法结合碘-碘化钾染色法、花粉离体萌发法, 能更准确地分析结实率或不结实的原因, 同时解决亲本花期不一致和远距离杂交的问题, 使育种者能更合理地选择亲本, 充分有效地利用育种材料。

[参 考 文 献]

- [1] 于晓英. 刮叶菊花粉生活力测定 [J]. 湖南农业大学学报, 2005 (2): 41-45.
- [2] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 菊属植物花粉生活力检测方法的比较 [J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(4): 406-409.
- [3] 孙慧生. 马铃薯育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [4] 王钦丽, 卢龙斗, 吴小琴, 等. 花粉的保存及其生活力测定 [J]. 植物学通报, 2002, 19(19): 370-371.