

枣及酸枣小孢子不同发育时期的花器 形态与解剖特性研究

牛瑜菲, 彭建营, 李 莉
(河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要: 以枣(赞皇大枣、骏枣、苹果枣和梨枣)和酸枣为试材, 对小孢子不同发育时期的花器形态与解剖特性进行研究。结果表明, 小孢子单核晚期花蕾为黄绿色, 花药为淡黄色, 赞皇大枣花蕾横径为 2.7mm 左右, 纵径为 1.6mm 左右; 骏枣、苹果枣和梨枣花蕾横径范围为 2.0mm 左右, 纵径范围为 1.1~1.8mm; 酸枣花蕾横径为 1.9mm 左右, 纵径为 1.0mm 左右。在单倍体育种中, 可依据花器官形态判别小孢子的发育时期, 从而判别花药培养或小孢子培养的最佳取材时间。

关键词: 枣; 酸枣; 小孢子; 发育时期; 花器形态; 解剖特性

Morphology of Flower Organ and Anatomical Characteristics of Microspore Different Developmental Period in Chinese Jujube and Wild Jujube

NIU Yu-fei PENG Jian-ying LI Li
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei Baoding 071001)

Abstract Microspore developmental stage and morphology of flower organ were studied by both of anatomical characteristics and morphological methods in Chinese jujube (‘Zanhuangdazao’, ‘Junzao’, ‘Pingguozao’, ‘Lizao’) and wild jujube. The results showed that buds color of microspore late-uninucleate were yellow-green and the color of anthers were light yellow. While flower bud diameter of ‘Zanhuangdazao’ was about 2.7mm and the height was about 1.6mm. Flower bud diameters of ‘Junzao’, ‘Pingguozao’ and ‘Lizao’ were about 2.0mm and their height were between 1.1mm and 1.8mm. Flower bud diameter of wild jujube was about 1.9mm, and the height was about 1.0mm. We can judge the development stages of microspore by morphological characteristics of flower organs so as to define the standard of bud selection in correspondence with the optimal stage of anther culture or microspore culture.

Key words Chinese jujube; Wild jujube; Microspore; Development stage; Morphology of flower organ; Anatomical characteristics

枣是中国特有果树资源。目前, 枣的育种常采用实生选种、芽变选种和杂交育种等手段, 耗时费力。植物单倍体育种是一种缩短有性育种周期, 提高育种效率, 快速获得植物新品种的有效途径。单倍体育种主要是将花药中的小孢子或游离小孢子培

养成单倍体植株, 然后使其加倍成纯合二倍体, 其中小孢子培养途径效率最高。由于小孢子所处的发育时期是影响其培养成败的关键因素之一^[1], 因此, 探讨小孢子发育时期与外部形态的关系对单倍体育种有重要的实践意义。小孢子培养已在蔬菜^[2-7]和

收稿日期: 2010-02-02 修回日期: 2010-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270927); 河北省自然科学基金项目 (C2004000363 C2007000448)

作者简介: 牛瑜菲, 硕士生, 研究方向为果树遗传育种与生物技术。E-mail niuyufei1983@yahoo.com.cn

通讯作者: 彭建营, 教授, 博士, 研究方向为果树分子生物学、遗传育种和生物技术。E-mail pj@hebau.edu.cn

农作物^[8-9]中成功应用,但在枣属植物上的技术体系尚不完善,仅有关于花药培养^[10-12]和花粉减数分裂^[13-15]的相关报道。基于小孢子细胞学与花器官形态相关性研究已在草莓^[16]、加工番茄^[17]、萝卜^[18]、辣椒^[19]、黄瓜^[20]和甘蓝^[21]中均有详细报道,本研究主要是对枣和酸枣小孢子发育时期及花器官形态进行观察,旨在确定小孢子不同发育时期花器官的形态,为枣单倍体育种提供接种适期,并为建立高效、稳定的枣小孢子培养和花药培养技术体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为种植于河北农业大学农林教学实验基地正常管理的酸枣 [*Ziziphus jujuba* subsp. *spinosa* (Bunge) J.Y. Peng X.Y. Li et L.Li] 及枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 的 4 个品种: 赞皇大枣、骏枣、苹果枣和梨枣。同一品种(类型)取自 2~3 个单株。

1.2 方法

1.2.1 花蕾和花药的形态观察与测量 在自然状态下,从 2009 年 4 月 29 日至 5 月 25 日,即从枣显蕾期到蕾裂期,取树冠外围枣吊 3~6 节的一级花花蕾,每天 7:00 进行采集,将采集的花蕾放入自封口塑料袋内,用冰盒保存带回实验室,随机取 30 个花蕾用游标卡尺测量横纵径,求其平均数,并描绘相应的形态特征及花蕾的发育时期,然后在解剖镜下用镊子剥去萼片、花瓣,取出花药,观察其颜色和形态特征。

1.2.2 花蕾的细胞学观察 将花蕾用卡诺氏固定液(无水乙醇与冰醋酸体积比为 3:1)于室温下固定 24h 后,转到 70% 酒精中,置 4℃ 冰箱保存备用。将固定处理好的花蕾,用镊子小心剥去萼片、花瓣,取出花药,用蒸馏水清洗后,将花药放在载玻片上,配制好的苏木精染液滴在花药上,用镊子挤碎花药,然后盖上盖玻片,在 OLYMPUS-BH2 显微镜下观察。每份材料随机抽取花蕾数,每个花蕾取 1 个花药,每个花药观察 10 个不同视野,通过观察小孢子同一发育时期的细胞数来确定小孢子所处的发育时期,并拍摄小孢子不同发育时期的照片。

2 结果与分析

2.1 小孢子发育时期与蕾期的关系

蕾期分为 3 个时期: 显蕾期、现序期和蕾黄期; 而小孢子发育时期与蕾期密切相关。小孢子母细胞时期出现在显蕾期,从四分体时期到单核期

出现在现序期,双核期即花粉成熟出现在蕾黄期和蕾裂期。从小孢子发育时期的观察发现,苹果枣、梨枣和骏枣物候期一致,而酸枣和赞皇大枣物候期较前者晚 2d。

2.2 小孢子发育时期与花蕾外部形态的关系

枣和酸枣的小孢子发育时期与花蕾的外部形态相同。

2.2.1 花粉母细胞时期的花蕾形态 此期的花蕾为现序期,叶腋间出现绿色花蕾,被有 2 片苞片,以后膨大为圆形。

2.2.2 四分体时期的花蕾形态 此期花蕾为现序期,在顶蕾下出现侧生花蕾,即顶蕾为一级花,出现的侧蕾为二级花,以后依此类推。此期花蕾仍为绿色,一级花出现放射状的 5 条沟纹,顶洼下陷,边缘呈五角状。此期和前期为染色体核型分析的最佳取材时间。

2.2.3 单核早中期的花蕾形态 此期花蕾为绿色,比四分体时期花蕾明显增大,花蕾形态和前期的相似,花蕾表面披一层白色的绒毛。

2.2.4 单核晚期的花蕾形态 单核晚期即单核靠边期,此期花蕾开始变为黄绿色,从花蕾中部开始变黄,花蕾的五角逐渐变圆,白色绒毛开始变少,花蕾饱满并明显膨大。此期是花药和花粉培养的最佳取材时间。

2.2.5 双核期的花蕾形态 此期为蕾黄期,花蕾变黄,花蕾为带五棱状的扁圆形,此期花蕾已经不再增大,即将到蕾裂期,花粉已经成熟。

2.3 小孢子发育时期与花蕾大小的关系

如表 1 所示,酸枣、赞皇大枣、梨枣、苹果枣和骏枣,小孢子发育时期与花蕾大小有密切联系。观察结果显示,小孢子单核晚期时,赞皇大枣花蕾横径为 2.7mm 左右,纵径为 1.6mm 左右;梨枣、苹果枣和骏枣花蕾横径范围为 2.0mm 左右,纵径范围为 1.1~1.8mm;酸枣花蕾横径为 1.9mm 左右,纵径为 1.0mm 左右。除骏枣外,花粉母细胞到四分体时期,纵径生长都大于横径生长,从四分体时期到双核期横径生长大于纵径,这说明从花粉母细胞时期到四分体时期细胞纵向伸长大于横向生长,而单核期到双核期主要为横向生长。而骏枣是从母细胞时期到单核早中期,横向生长大于纵向生长,从单核早中期开始细胞纵向伸长大于横向生长。这可能存在品种间差异性。如图 1 所示,从赞皇大枣、苹果枣和酸枣同一发育时期花蕾大小的比较可以得出: 赞皇大枣 > 苹果枣 > 酸枣。表 1 所示,同一发育时期不同品种,

赞皇大枣花蕾纵横径都大于其他 3 个品种, 这是因为赞皇大枣为天然三倍体, 三倍体本身具有巨大性。

表 1 枣和酸枣不同发育时期的花蕾纵横径比较
Table 1 Height and diameter comparison of flower buds at various stages of microspore development of Chinese jujube and wild jujube (mm)

种类 Material	时期 Stage	横径 Flower bud diameter	纵径 Flower bud height	横径 /纵径 Ratio of diameter to height
酸枣 Wild jujube	花粉母细胞	0.38	0.14	2.78
	四分体时期	0.93	0.85	1.10
	单核早中期	1.45	1.04	1.40
	单核晚期	1.95	1.08	1.80
	双核期	2.10	1.09	1.94
赞皇大枣 Zanhuangdazao	花粉母细胞	0.76	0.54	1.40
	四分体时期	1.42	1.41	1.01
	单核早中期	2.10	1.62	1.29
	单核晚期	2.74	1.66	1.65
	双核期	3.07	1.77	1.73

种类 Material	时期 Stage	横径 Flower bud diameter	纵径 Flower bud height	横径 /纵径 Ratio of diameter to height
苹果枣 Pingguozao	花粉母细胞	0.65	0.40	1.62
	四分体时期	1.13	1.09	1.03
	单核早中期	1.51	1.18	1.27
	单核晚期	2.08	1.22	1.70
	双核期	2.69	1.23	2.18
梨枣 Lizao	花粉母细胞	0.74	0.36	2.08
	四分体时期	1.39	1.45	0.96
	单核早中期	1.72	1.70	1.01
	单核晚期	2.06	1.80	1.14
	双核期	2.09	1.91	1.09
骏枣 Junzao	花粉母细胞	0.68	0.46	1.49
	四分体时期	1.72	1.09	1.58
	单核早中期	1.99	1.11	1.80
	单核晚期	2.02	1.14	1.78
	双核期	2.39	1.36	1.75

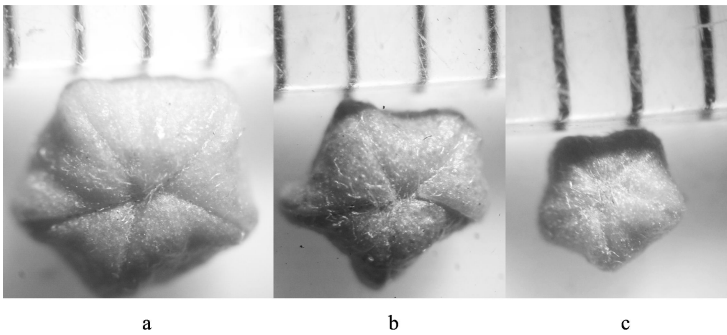


图 1 不同枣品种同一发育时期花蕾大小比较
Fig 1 Flower bud size of the same developmental stages of different Chinese jujube cultivars
a 赞皇大枣; b 苹果枣; c 酸枣
a Zanhuangdazao; b Pingguozao; c Wild jujube

2.4 小孢子发育时期与花药发育特征

枣和酸枣小孢子发育时期的花药特征相同。花药发育进程在颜色方面的变化由绿色→淡绿色→黄绿色→淡黄色→黄色。
小孢子不同发育时期的花药颜色变化特征为
花粉母细胞: 绿色, 花药极不易剥离; 四分体时期: 淡绿色, 花药不易剥离, 花药有绿色外衣包被, 外衣不易剥离, 有粘液; 单核早中期: 黄绿色, 有绿色外衣, 易分离; 单核晚期: 淡黄色, 花药易剥离, 花药有

四个花药室, 由花药壁包被, 花药光亮; 双核期: 黄色, 花药四个花药室易分离。
2.5 小孢子各发育时期的细胞学特征
本研究结果得出, 枣和酸枣的小孢子发育时期的细胞学特征一致, 以骏枣为例, 细胞学特征描述如下。
2.5.1 花粉母细胞时期 小孢子母细胞体积大, 细胞质浓厚, 没有明显的液泡, 细胞排列紧密, 不易分散 (图 2-a)。

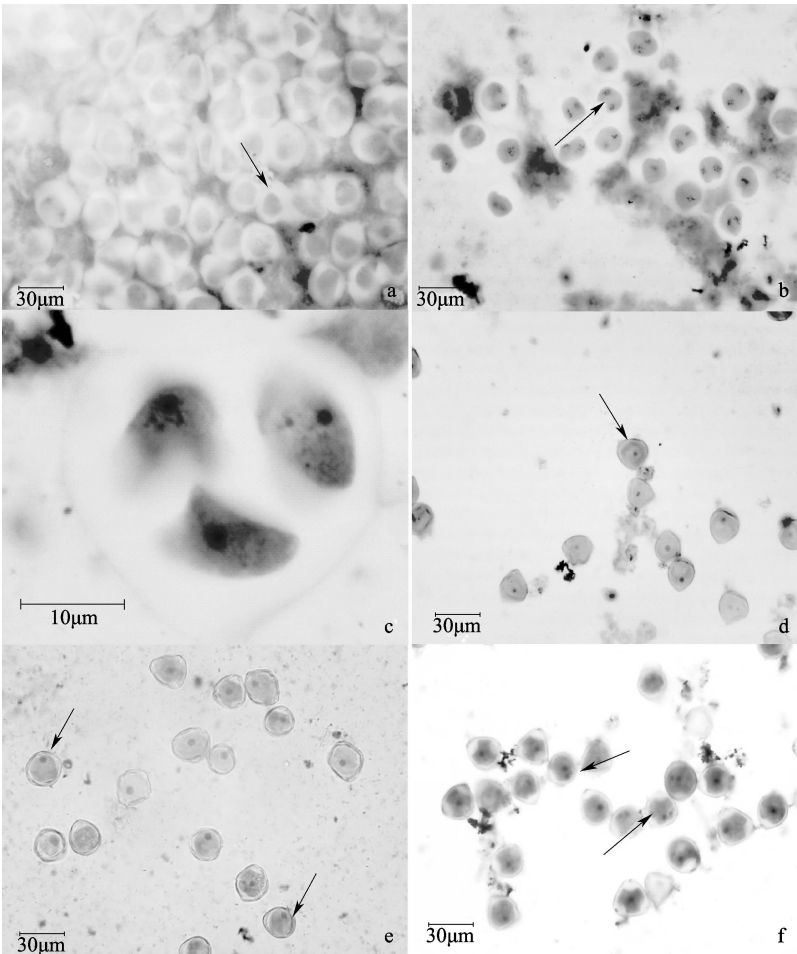


图 2 小孢子不同发育时期的细胞学观察

Fig 2 Cytological observation of microspore development at various stages

a 花粉母细胞; b 二分体时期; c 四分体时期; d 单核早中期; e 单核晚期; f 双核期
a PMC; b Dyad c Tetrad d Early or mid uninucleate; e Late uninucleate; f Binucleate

2 5 2 减数分裂二分体时期 同源染色体分开, 分别移向细胞两极, 形成两个单倍的细胞核, 这是减数第一次分裂完成, 染色体数减半 (图 2-b)。

2 5 3 四分体时期 枣和酸枣的四分体时期 4 个小孢子呈四面体形, 显微镜下只能观察到 3 个小孢子, 减数第二次分裂完成, 四个小孢子之间被胼胝质壁分隔, 分裂末期细胞核清晰可见 (图 2-c)。

2 5 4 单核早中期 小孢子从四分体中释放出来, 体积迅速增大, 进入单核期, 单核早期的小孢子呈球形, 有浓厚的细胞质和位于中央的细胞核, 早期液泡还未形成。短时期生长后, 小孢子细胞壁明显增厚, 细胞质液泡化 (图 2-d)。

2 5 5 单核晚期 随着液泡逐渐形成和体积的增大, 细胞核从细胞中央移到细胞边缘, 此期花粉萌发沟正在形成, 小孢子细胞壁有的出现凸起 (图 2-e)。此时观察到赞皇大枣有二孔、三孔和四孔花粉, 如图 3 所示。

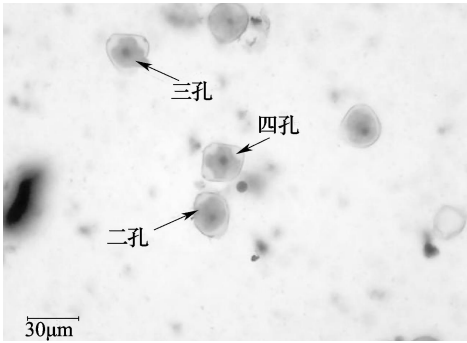


图 3 赞皇大枣的二孔、三孔和四孔的花粉粒

Fig 3 Two aperture, three aperture and four aperture pollen grains of Zanthoxylum armatum

2 5 6 双核期 小孢子贴着细胞壁的位置发生有丝分裂, 形成两个核, 其中贴近花粉壁的形成生殖核; 另一个向着液泡的方向, 形成营养核。此期能明

显看到小孢子的两个核,之后继续观察花粉,花粉始终是两核花粉,未见到三核花粉,此期花粉已成熟(图 2-f)。

3 讨论

小孢子的各发育时期与蕾期、花器官外部形态特征及花蕾纵横径关系密切,对于小孢子培养而言,并非任何发育时期的小孢子都适合。Takahata 等^[22]对萝卜进行了小孢子培养,其中部分只获得了胚状体,部分材料形成了再生植株。Sato 等^[23]认为大白菜小孢子诱导胚发生最佳时期为单核晚期。汤青林等^[24]在甘蓝型油菜小孢子培养中,以单核靠边期的花粉培养效果最佳。武晓红^[12]研究认为枣花药培养,一般选绿色到黄绿色的花蕾,而在本研究中单核晚期的花蕾多为黄绿色。在以往研究中均发现,小孢子处于单核晚期时容易成胚。早期的小孢子,在培养过程会大量死亡,不容易成胚;而小孢子在形成成熟花粉时,细胞内积累了大量淀粉,并失去了脱分化的能力,向配子体途径发展,这两种情况均不易成胚。可见,取材时期对于小孢子培养成功与否起着决定性的作用。但是,在大规模的小孢子培养过程中,通过显微镜观察每一个花蕾的小孢子发育时期是困难的,因此,确定枣属植物小孢子发育时期与其对应的花器官外部形态至关重要。本文以一级花为材料,观察到小孢子发育不同时期对应的花器官的大小、颜色等形态特征,可以通过肉眼观察直接取材,为单倍体育种找到最佳取材时间。枣和酸枣为二歧聚伞花序,最多有 6 级花,对其他级的花可参照一级花为标准进行取材,延长取材时间,缩短单倍体育种时间。

小孢子发育一般分为四分体时期、单核期、双核期和三核期。在本研究中,从花粉母细胞时期至花粉成熟期,都未观察到三核期的小孢子,说明枣和酸枣的小孢子发育时期分为母细胞时期、四分体时期、单核中早期、单核晚期和双核期。枣和酸枣的花粉属二核型。

前人对赞皇大枣的研究认为,其花粉母细胞减数分裂异常^[13-15, 25-26]。本试验结果显示,赞皇大枣小孢子发育过程中,出现了二孔沟和四孔沟花粉,这可能与花粉母细胞减数分裂异常及 $2n$ 花粉的形成有关,赞皇大枣的花粉母细胞减数分裂过程及孔沟类型与花粉倍性的关系有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chuong P V, Deskuriers C, Kott L S et al Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus* [J]. *Can J Bot* 1988, 66: 1653-1657
- [2] 姚秋菊, 蒋武生, 原玉香, 等. 游离小孢子培养育成早熟大白菜新品种‘豫新 58’ [J]. *园艺学报*, 2008, 35 (6): 929
- [3] 蒋武生, 原玉香, 张晓伟, 等. 小白菜游离小孢子培养及其再生植株 [J]. *河南农业大学学报*, 2005, 39 (4): 398-401
- [4] 连勇, 刘富中, 陈钮辉, 等. 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株 [J]. *园艺学报*, 2004, 31 (2): 233-235
- [5] 张晓伟, 姚秋菊, 蒋武生, 等. 利用游离小孢子培养技术育成甘蓝新品种‘豫生 4 号’ [J]. *园艺学报*, 2008, 35 (7): 1090
- [6] 王涛涛, 李汉霞, 张继红, 等. 红菜薹游离小孢子培养与植株再生 [J]. *武汉植物学研究*, 2004, 22 (6): 569-571
- [7] Laurie B, Stephen Y, Bin H. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *Oleifera* [J]. *Plant Cell Reports* 1992, 11: 215-218
- [8] Hu T, Kasha K J. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture [J]. *Plant Cell Reports* 1997, 16: 520-525
- [9] Pescitelli S M, Petolino J F M. Microspore development in cultured maize anthers [J]. *Plant Cell Reports* 1988, 7: 441-444
- [10] Oh S D, Ko J A. Effect of low temperature pretreatment and plant growth regulators on anther differentiation and callus formation in vitro anther culture of Chinese jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) [C]. Chonbuk National University symposium (Natural Science), 1991, 33: 247-256
- [11] 王震星, 张磊. 枣花药培养再生植株及其染色体倍性研究 [J]. *北方果树*, 1998 (2): 5-6, 24
- [12] 武晓红. 枣花药再生植株及单倍体的获得 [D]. 保定: 河北农业大学, 2008
- [13] 闫桂军. 枣细胞学研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 1984
- [14] 曲泽洲, 王永惠, 吕增仁, 等. 枣和酸枣染色体数目研究 [J]. *园艺学报*, 1986, 13 (4): 232-236
- [15] 许晓光, 陈龙, 彭建营. 酸枣和赞皇大枣花粉母细胞减数分裂的观察 [J]. *园艺学报*, 2009, 36 (8): 1127-1133
- [16] 蒋迪军, 牛建新, 刘红. 草莓小孢子细胞学发育时期与花器形态相关性研究 [J]. *石河子大学学报 (自然科学版)*, 1997, 1 (4): 275-280
- [17] 辛建华, 张永华, 苑育文. 加工番茄小孢子发育时期与花器形态相关性研究 [J]. *北方园艺*, 2007 (5): 15-17
- [18] 李丹, 李锡香, 沈锦. 萝卜小孢子不同发育时期的细胞学和花器形态特征观察 [J]. *中国蔬菜*, 2008 (10): 11-15
- [19] 张菊平, 巩振辉, 刘珂珂, 等. 辣椒小孢子发育时期与花器形态的相关性 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2007, 35 (3): 153-158
- [20] 谢森, 秦丽颖, 潘俊松, 等. 黄瓜花器形态发生、小孢子发育与花药培养 [J]. *西北植物学报*, 2005, 25 (6): 1096-1100
- [21] 王莎莎. 甘蓝小孢子发育观察与小孢子培养中高出胚率的诱导技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008
- [22] Takahata Y, Komatsu H, Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis [J]. *Plant Cell Reports* 1996, 16: 163-166
- [23] Sato T, Nishio T, Hiram M. Culture conditions for the initiation of embryogenesis from isolated microspore in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) [G]. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables Ornamental Plants and Tea Series A*, 1989, 3: 55-65
- [24] 汤青林, 宋明, 张钟灵. 甘蓝类蔬菜游离小孢子培养研究进展 [J]. *西南农业学报*, 2000, 13 (3): 98-103
- [25] 彭建营, 刘平, 周俊义, 等. ‘赞皇大枣’不同株系的染色体数及其核型分析 [J]. *园艺学报*, 2005, 32 (5): 798-801
- [26] 韩斌, 李敬蕊, 徐志波, 等. 枣不同品种开花结实及花粉发芽特性研究 [J]. *中国农学通报*, 2008, 24 (8): 167-170