

网络出版时间:2015-03-12 14:17

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.04.027

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150312.1417.027.html>

甜瓜小孢子发育时期与花器形态的关系

王薇薇^{1,2}, 羊杏平¹, 范淑英², 刘 广¹, 张 曼¹, 徐锦华¹

(1 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 2 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

【摘 要】 【目的】研究各发育时期甜瓜小孢子的细胞学特征及其与花器外观形态的关系,以期能根据花器的外观形态确定小孢子的发育阶段,为花药、小孢子培养研究提供细胞学依据。**【方法】**采集不同蕾长的饱满雄花花蕾,形态学观察后分别进行 DAPI 和醋酸洋红染色,观察小孢子发育的细胞学特征,以确定花粉的发育时期,分析各发育时期甜瓜小孢子的细胞学特征与花器外观形态的关系。**【结果】**2 种染色方法以醋酸洋红染液染色效果较佳;甜瓜小孢子发育经历四分体时期、单核早中期、单核靠边期和双核期,每个时期形态特征明显;甜瓜小孢子发育时期与花蕾的大小、花药颜色密切相关。甜瓜花蕾纵径在 2.9~3.5 mm、横径在 2.7~3.2 mm,且花瓣微露,花药呈黄色时,绝大多数的小孢子发育至单核靠边期。**【结论】**可以根据甜瓜花蕾的形态、大小和花药发育情况判断小孢子的发育时期,从而确定小孢子最佳培养时期对应的选蕾标准。

【关键词】 甜瓜;小孢子;发育时期;花器形态

【中图分类号】 S652

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)04-0108-05

Correlation between microspore development period and floral organ morphology of *Cucumis melo* L.

WANG Wei-wei^{1,2}, YANG Xing-ping¹, FAN Shu-ying², LIU Guang¹,
ZHANG Man¹, XU Jin-hua¹

(1 *Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China;*

2 *College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China*)

Abstract: 【Objective】 The cytology characteristics of melon microspore and morphology of flower organ were observed in different development periods for determining the relationship between microspore development and buds morphology, which would provide evidence for culturing of anther and microspore. **【Method】** Full male flower buds with different lengths were collected and DAPI and carmine acetate staining methods were used in cytological observation of melon microspore development to confirm the pollen development periods after morphological observation. The relationship between cytological characteristics of different development periods of melon microspore and morphology of flower organ was also analyzed. **【Result】** Carmine acetate dyeing had better dyeing effects. The development of melon microspore was divided to four stages: tetrad, early- or mid-uninucleate, late-uninucleate, and binucleate, and each stage had obvious characteristics. The microspore development period of melon was closely related with bud size and anther color. The buds were 2.9—3.5 mm in height and 2.7—3.2 mm in diameter. The petals were calyx slightly and the anthers were yellow. Most microspores could develop to the stage of late-uninucleate. **【Conclusion】** The development period of melon microspore could be determined by the form, size and an-

【收稿日期】 2013-11-11

【基金项目】 国家西甜瓜产业技术体系项目(CARS-NO. 8)

【作者简介】 王薇薇(1988—),女,江苏阜宁人,在读硕士,主要从事蔬菜育种工作。E-mail: biluoweimei@163.com

【通信作者】 羊杏平(1963—),男,江苏泰兴人,研究员,博士,主要从事西瓜甜瓜育种研究。

ther development condition of buds, and it is helpful to obtain the standard of bud selection at the best development stage of microspore.

Key words: melon; microspore; development stage; floral organ morphology

甜瓜(*Cucumis melo* L., $2n=2x=24$)别名香瓜、哈密瓜或果瓜,是葫芦科甜瓜属1年生蔓性草本植物^[1]。甜瓜原产于非洲热带沙漠地区,大约在北魏时期随着西瓜一同传到中国,明朝开始广泛种植。甜瓜含糖量高(10%~18%,甚至高达20%),果实香甜,富含矿物质(钙、磷、铁等)和维生素,与西瓜一起成为人们喜爱的夏季水果。作为一种重要的瓜类经济作物,甜瓜为世界十大重要水果之一^[2],栽培面积和产量较大。自20世纪80年代以来,我国甜瓜的栽培面积和产量一直居于世界第一^[3]。由于甜瓜是异花授粉植物,天然杂交率高,因此采用常规育种手段获得纯系具有周期长、难度大、遗传性状不稳定等缺点,而利用单倍体技术育种就可以避免这些问题,大大提高育种效率。

单倍体育种技术是指通过诱发单性生殖使某些品种的异质配子发育成单倍体植株,再经过染色体加倍获得纯系,之后进行品种选育的一种育种方法^[4-5]。这种技术能够缩短育种年限、提高育种效率^[6]。但自然界中,作物自发产生单倍体植株的几率极低,不过通过一些人为手段可获得单倍体,如花药或游离小孢子培养技术。迄今为止,甜瓜中没有发现自发产生的单倍体植株^[7],所以甜瓜花培技术就成为获得甜瓜单倍体植株的重要途径。在花药或游离小孢子培养过程中,影响诱导的主要因素包括基因型、小孢子发育时期、培养基、培养方法等,其中小孢子发育时期是单倍体诱导至关重要的内在因素^[8]。不同植物种类诱导愈伤组织形成或胚状体发生的适宜小孢子发育时期是不同的,并不是任何发育时期的小孢子都可以培养形成愈伤组织或胚状体,多数物种诱导胚胎发生的最佳小孢子发育时期是单核靠边期^[9-11]。董艳荣^[12]指出,甜瓜花药培养最佳时期是单核靠边期至双核期。因此小孢子最佳发育时期鉴定是花药或小孢子培养成功的关键因素和必要条件。利用显微镜染色检测的方法能够直接观察小孢子的发育时期,以往的很多研究表明,小孢子发育阶段与花器形态密切相关^[13-15],可以通过花蕾的纵横径、花药颜色、花瓣与萼片长度比值等判断小孢子的发育时期,但有关甜瓜花器外部形态与小孢子发育阶段关系的研究尚未见报道。为此,本试验通过对甜瓜小孢子发育时期的细胞学观察,研究

甜瓜小孢子各发育时期的细胞学特征以及不同发育时期与花器外观形态的相关性,以便能根据花器的外观形态确定小孢子的发育阶段,为甜瓜花药或小孢子培养提供简单易行的小孢子发育时期鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试甜瓜品种为长香玉、伊丽莎白、楚留香,3种供试材料均为厚皮甜瓜,其中长香玉和楚留香购于农友种苗有限公司,伊丽莎白购于上海惠和种业有限公司。2013-03播种于江苏省农业科学院蔬菜研究所大棚,常规管理。

1.2 试验方法

1.2.1 花蕾的形态学观察 当甜瓜进入初花期后,于晴朗天气(08:00—10:00)摘取健壮植株上不同蕾长的饱满雄花花蕾,放于冰盒中带回实验室镜检观察。观察前先测量花蕾的纵径、横径长度,观察花蕾的外部形态并描绘相应的特征。再用眼科镊子剥去萼片,取出并观察花药特征。每个发育时期观察15个花蕾,重复3次。

1.2.2 小孢子发育的细胞学观察 进行过形态学观察的花蕾花药用卡诺氏固定液(冰醋酸与无水乙醇的体积比为1:3)固定12 h或过夜,然后用1 mol/L盐酸浸泡1 h(存放在保温箱,温度40℃),之后用蒸馏水浸洗2~3次,每次10~15 min,然后装片、挤压,轻轻掀动盖玻片,沿缝隙加1滴染液。将大小相同花蕾分为2组,一组用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)荧光染液染色,荧光镜下观察;另一组用醋酸洋红染液染色,光学显微镜下观察。每次观察重复3次。

2 结果与分析

2.1 2种染液染色效果的比较

伊丽莎白小孢子各发育阶段的细胞学特征见图1。图1表明,当甜瓜花粉母细胞经减数分裂形成四分体时,用DAPI荧光染液染色效果最佳,此时细胞核在荧光下清晰可见,但不能看出细胞轮廓;单核期时,小孢子的轮廓明显,但细胞核清晰度下降;双核期时,基本看不出细胞核;随着细胞的不断发育,

DAPI 荧光染液的染核效果明显下降,这可能是由于随着小孢子的进一步发育,花粉壁上的孢粉素增加,折光力太强,导致整个细胞呈蓝色。相比而言,醋酸洋红染液的染色效果较 DAPI 荧光染液染色效

果好,能将细胞质染成红色,细胞核染成深红色,细胞轮廓、细胞核清晰。另外 2 个甜瓜品种小孢子各发育阶段的细胞学特征与伊丽莎白一致。

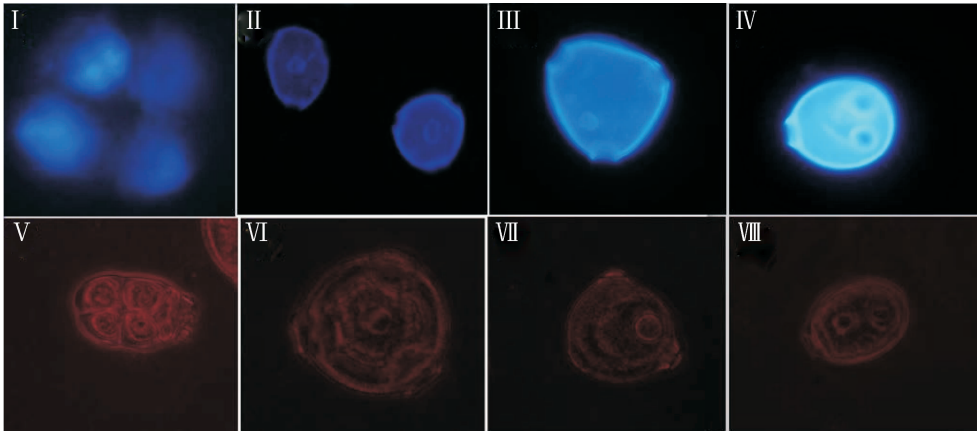


图 1 甜瓜(伊丽莎白)小孢子各发育阶段的细胞学特征(×400)

I ~ IV. DAPI 染色; V ~ VIII. 醋酸洋红染色; I, V. 四分体时期; II, VI. 单核早中期; III, VII. 单核靠边期; IV, VIII. 双核期

Fig. 1 Morphological characteristics of Elizabeth flower buds at various stages of microspore development(×400)

I — IV. Stained using DAPI; V — VIII. Stained using carmine acetate; I, V. Tetrad;

II, VI. Early- or mid-uninucleate; III, VII. Late-uninucleate; IV, VIII. Binucleate

2.2 甜瓜小孢子各发育阶段的细胞学特征

根据对 3 个甜瓜品种、不同大小花蕾小孢子发育时期的观察发现,随着花药的发育,甜瓜花粉母细胞经过减数分裂形成的四分体小孢子被一层厚的胼胝质包围着,由于胼胝质壁不易染色而成为透明壁,易于分辨(图 1-V)。随后,包裹在四分体周围的胼胝质溶解消失,小孢子从中游离出来,成为单核花粉粒,此时细胞体积小,花粉绒毡层无退化现象,也无明显液泡,而后单核花粉粒的细胞核居于细胞正中位置,即为单核早中期(图 1-VI)。随着小孢子不断从绒毡层细胞中吸取营养,细胞体积逐渐增大,花粉绒毡层开始退化,中央大液泡逐渐形成,将细胞核从中心挤压到细胞壁一侧,细胞壁上出现 3 条明显的萌发沟,花粉外壁已经形成(图 1-VII)。花粉细胞在进行第 1 次有丝分裂后,形成具有 1 个营养细胞和 1 个生殖细胞的二核花粉。营养细胞的体积大,靠近大液泡;生殖细胞体积小,贴近花粉壁。成熟的花粉粒近圆形,萌发沟外凸,但不明显(图 1-VIII)。

2.3 甜瓜小孢子发育时期与花蕾外部形态的关系

通过观察甜瓜花蕾外部形态特征可知,在刚可见花蕾时,花蕾紧贴叶腋处,整个花蕾由萼片包被,花萼未张开,萼片上着生浓密的白色绒毛,此时的花蕾干瘪。当小孢子处于四分体时期,花蕾稍增大些,

相对饱满,但花蕾仍完全被萼片紧包,此时花蕾呈浅绿色,有白色绒毛;当小孢子发育至单核早中期时,花蕾中部已明显膨大,萼片张开,花萼绿色,花萼上的绒毛变稀疏,单核靠边期时,花瓣微露;当小孢子发育至双核期,花蕾充分膨大,萼片完全张开,花瓣外露,呈黄色,花瓣长于花萼,花蕾似钟形。

2.4 甜瓜小孢子发育时期与花蕾大小的关系

甜瓜小孢子的发育时期与其花蕾大小有密切关系。随着花蕾纵径、横径的增长,小孢子由四分体时期向单核期、双核期发育(图 2)。由表 1 可见,花粉母细胞处于四分体时期,花蕾的纵径在 1.4~2.0 mm,横径在 1.6~2.2 mm;发育到单核早中期时,花蕾纵径在 2.0~2.4 mm,横径在 2.1~2.5 mm;单核靠边期,纵径在 2.9~3.5 mm,横径在 2.7~3.2 mm;双核期时,纵径在 3.8~4.3 mm,横径在 3.5~3.9 mm。

2.5 甜瓜小孢子发育时期与花药发育特征的关系

小孢子的发育时期与花药发育有密切关系。甜瓜雄蕊共 5 枚,其中 4 枚两两合生,另 1 枚单生。四分体时期,花药呈黄绿色,此时花药不饱满,难以剥开;单核早中期,花药颜色略深,较之前四分体时期饱满;单核靠边期,花药颜色变黄,比较饱满,苞片易剥除;双核期,花药颜色深黄,饱满。

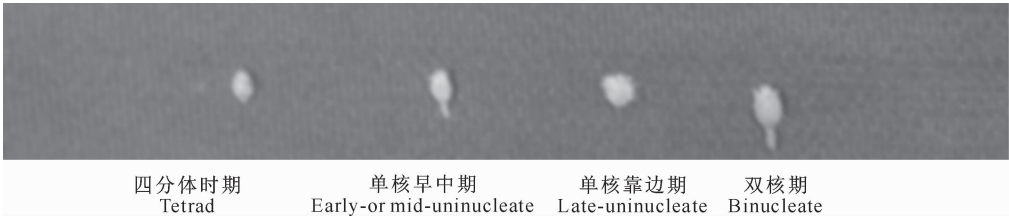


图 2 甜瓜花蕾的大小

Fig. 2 Sizes of buds of melon

表 1 不同甜瓜品种小孢子各发育时期花蕾的大小

Table 1 Sizes of the buds at various stages of microspore development of different melon varieties

品种 Cultivar	小孢子发育时期 Microspore development periods	纵径/mm Length	横径/mm Diameter
长香玉 Changxiangyu	四分体时期 Tetrads	1.4~1.7	1.6~1.9
	单核早中期 Early-or mid-uninucleate	2.0~2.3	2.1~2.3
	单核靠边期 Late-uninucleate	2.9~3.2	2.7~3.2
	双核期 Binucleate	3.8~4.2	3.5~3.7
伊丽莎白 Elizabeth	四分体时期 Tetrads	1.4~1.8	1.7~2.1
	单核早中期 Early-or mid-uninucleate	2.0~2.4	2.1~2.4
	单核靠边期 Late-uninucleate	3.0~3.3	2.9~3.1
	双核期 Binucleate	3.8~4.3	3.5~3.8
楚留香 William favor	四分体时期 Tetrads	1.6~2.0	2.0~2.2
	单核早中期 Early-or mid-uninucleate	2.1~2.4	2.3~2.5
	单核靠边期 Late-uninucleate	3.0~3.5	2.8~3.0
	双核期 Binucleate	4.0~4.2	3.6~3.9

2.6 甜瓜小孢子发育时期的不同步性

李丹等^[16]认为,百日草同一花蕾小孢子发育也存在不同步性。本试验结果显示,同一花蕾的甜瓜小孢子发育存在一定程度的渐续性(即不同步性),相同的花药内往往包含着几个发育时期的小孢子,如伊丽莎白的同一花蕾中约有 90% 的小孢子发育至单核靠边期,10% 的小孢子处于单核早中期、双核期或是发育成熟(图 3)。

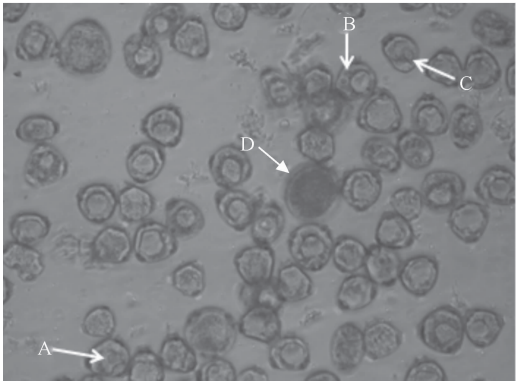


图 3 甜瓜(伊丽莎白)小孢子发育时期的不同步性(×400)

A. 单核早中期小孢子;B. 单核靠边期小孢子;
C. 双核期小孢子;D. 成熟小孢子

Fig. 3 Asynchronism of microspore development in Elizabeth (×400)

A. Early-or mid-uninucleate microspore;B. Late-uninucleate microspore;C. Binucleate microspore;D. Mature microspore

3 讨论与结论

选择最佳的花粉发育时期对花药和小孢子培养至关重要。本试验对不同发育时期甜瓜小孢子进行染色鉴定,观察分析了不同发育时期甜瓜小孢子的细胞学形态特征及其与花蕾外观形态的关系。本试验分别采用醋酸洋红染料和 DAPI 荧光染色液进行染色,观察甜瓜小孢子的发育时期,结果发现 2 种染液的染色效果都不是很好,DAPI 染液在四分体时期和单核早中期染色效果很好,细胞核与细胞质区分明显,但是随着小孢子进一步发育增大,小孢子壁逐渐变厚,小孢子外壁致密的孢粉素折光力增强,导致荧光下整个细胞都呈亮蓝色,很难明显观察到细胞核,从而影响 DAPI 荧光染液的染色效果。而经醋酸洋红染液染色后,小孢子各发育时期的染色效果并没有随着小孢子的发育增大而变差,可以使细胞核染色较深,细胞质染色较浅,易于区分。

本研究观察到甜瓜花粉小孢子发育经历四分体时期、单核期、双核期,各个时期都有明显特征,并且小孢子各发育时期与花蕾的外部形态、花药外观关系密切。因此可以根据花蕾的形态、大小和花药的发育情况来判断甜瓜小孢子的发育时期。甜瓜最适花药培养的时期是单核靠边期至双核期^[12],但是成功诱导甜瓜小孢子的例子国内外尚未见报道,甜瓜

小孢子培养时花粉小孢子最易诱导胚状体发生的最佳时期尚不明确。根据前人在其他物种上的研究可知,处于单核靠边期的花粉小孢子易于诱导胚状体发生^[11]。本试验通过对 3 个不同甜瓜品种进行比较观察,得出甜瓜品种的花蕾纵径为 2.9~3.5 mm,横径为 2.7~3.2 mm,花蕾膨大,萼片张开,花瓣微露,花药饱满呈黄色,此时绝大多数的小孢子发育至单核靠边期。依据该试验结果进行甜瓜花药或小孢子培养,可以直接根据花蕾的形态、大小和花药的发育情况来判断甜瓜小孢子的发育时期,从而在实际操作中可以实现田间直接取材,免去制片观察等一系列繁琐工作。

[参考文献]

[1] 卢雪志,高淑兰,张洪顺.甜瓜病害发生与综合防治措施[J].吉林蔬菜,2008(6):41-42.
Lu X Z,Gao S L,Zhang H S. Occurrence and integrated control of diseases of melon [J]. Jilin Vegetables,2008(6):41-42. (in Chinese)

[2] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Yearbook production [M]. Roma:[s. n.],1992:253-254.

[3] 马跃.我国西瓜甜瓜生产回顾与展望[J].中国蔬菜,2000(8):4-7.
Ma Y. Review and prospect of production on watermelon and melon in our country [J]. Chinese Vegetable,2000(8):4-7. (in Chinese)

[4] 赵永钦,吴新新,李蔚,等.禾本科牧草和草坪草雄核发育与单倍体育种研究进展[J].植物学报,2012,47(1):87-99.
Zhao Y Q,Wu X X,Li W,et al. Research progress in androgenesis and haploid breeding of gramineous forage and turfgrass [J]. Chinese Bulletin of Botany,2012,47(1):87-99. (in Chinese)

[5] Lotfi M,Alan A R,Henning M J,et al. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance [J]. Plant Cell Reports,2003,21(11):1121-1128.

[6] 葛胜娟.水稻花药培养及其在遗传育种上的应用[J].种子,2013,32(8):45-50.
Ge S J. Rice anther culture and its application to genetics and breeding [J]. Seed,2013,32(8):45-50. (in Chinese)

[7] Savin F,Decomble V,Le Couviour M,et al. The X-ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon *Cucumis melon* L seeds and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen [J]. Cucurbit Genet Coop Rpt,1988,11:39-42.

[8] 张正海,毛胜利,王立浩,等.辣椒单倍体离体诱导及育种应用[J].园艺学报,2012,39(9):1715-1726.
Zhang Z H,Mao S L,Wang L H,et al. *In vitro* haploid produc-

tion and application to pepper breeding [J]. Acta Horticulturae Sinica,2012,39(9):1715-1726. (in Chinese)

[9] 曹鸣庆,李岩,蒋涛,等.大白菜和小白菜游离小孢子培养试验简报[J].华北农学报,1992,7(2):119-120.
Cao M Q,Li Y,Jiang T,et al. Brief report on isolated microspore culture experiments in two Chinese cabbages [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,1992,7(2):119-120. (in Chinese)

[10] 刘雪平,刘志文,涂金星,等.甘蓝型油菜小孢子培养技术的几项改进[J].遗传学报,2003,25(4):433-436.
Liu X P,Liu Z W,Tu J X. Improvement of microspores culture techniques in *Brassica napus* L [J]. Hereditas,2003,25(4):433-436. (in Chinese)

[11] 詹艳,陈劲枫,Ahmed Abbas Malik. 黄瓜游离小孢子培养诱导成胚和植株再生[J].园艺学报,2009,36(2):221-226.
Zhan Y,Chen J F,Ahmed Abbas Malik. Embryoid induction and plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L) through microspore culture [J]. Acta Horticulturae Sinica,2009,36(2):221-226. (in Chinese)

[12] 董艳荣.甜瓜花药再生体系的基础研究[D].南京:南京农业大学,2002.
Dong Y R. Basic research on anther regeneration system of melon [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2002. (in Chinese)

[13] 王朝阳,程永安,张恩慧,等.西葫芦花蕾纵横径长度与小孢子发育关系研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(5):92-98.
Wang Z Y,Cheng Y A,Zhang E H,et al. Studies on the relationship between bud size and microspore periods in squash [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2012,40(5):92-98. (in Chinese)

[14] 林宗铿,张天翔,杨俊杰,等.白芦笋小孢子发育时期与花器形态相关性研究[J].中国农学通报,2011,27(28):200-204.
Lin Z K,Zhang T X,Yang J J,et al. Correlation of microspore development period and the flower organ morphology of white asparagus [J]. Chinese Agriculture Science Bulletin,2011,27(28):200-204. (in Chinese)

[15] 李允菲,王仁涛,袁存权,等.红槐花花药培养最适取材时期及选蕾标准[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2013,41(8):65-71.
Li Y F,Wang R T,Yuan C Q,et al. Optimal anther culture period and flower bud selecting standard for *Robinia pseud-acacia* var. *decaisneana* (Carr.) Voss [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2013,41(8):65-71. (in Chinese)

[16] 李丹,张玉静,宋雪娇,等.百日草小孢子发育时期与花器形态的相关性[J].安徽农业科学,2011,39(34):20954-20956.
Li D,Zhang Y J,Song X J,et al. Correlation between microspore development period and floral organ morphology of *Zinnia elegans* [J]. Journal of Anhui Agriculture,2011,39(34):20954-20956. (in Chinese)