萝卜小孢子不同发育时期的细胞学和花器官形态特征观察

李　丹　李锡香　沈　镝

摘　要　通过醋酸洋红染色和 DAPI荧光染色对萝卜小孢子的发育过程进行了细胞学观察,两种染色方法中,后者较前者能更清楚和全面地显示细胞的结构。通过对 4份萝卜材料不同发育时期花蕾的细胞学和形态学的观察发现,小孢子的发育时期与花器官形态特征之间存在密切的关系。各材料小孢子不同发育时期的花蕾纵径、花蕾横径、花蕾纵横比、花药长、花药宽、花瓣长和瓣药比均存在明显差异。不同萝卜材料处于单核靠边期的花器官各形态指标也存在明显差异,其中花蕾纵径、花蕾纵横比、花瓣长和瓣药比适合于作为不同材料花蕾取样适期的鉴定指标,各指标的适宜尺度:花蕾纵径在 2.991～3.510 mm之间,花蕾纵横比在 1.412～1.480之间,花瓣长在 1.889～2.561 mm之间,瓣药比在 0.923～1.057之间。此外,适合小孢子培养的花蕾的外观特征为花药被萼片包裹紧密,花瓣和花药等长或接近等长,花蕾饱满,花药浅黄色至黄色。

关键词　萝卜　小孢子发育时期　细胞学观察　形态特征

萝卜(*Raphanus sativus* L.)为十字花科萝卜属一、二年生草本植物。目前,萝卜的育种仍以常规技术为主,对于两年生萝卜而言,常规育种所需的年限较长,通常获得一个稳定的自交系需要 5～7 a,甚至更长时间,耗费大量的人力、物力。而运用游离小孢子培养技术可以在较短的时间内获得纯系,缩短育种年限,提高育种效率。

小孢子培养现已在芸薹属的近 20种蔬菜上获得成功[1-2],应用较广泛,但在十字花科的萝卜上,技术体系尚不完善,在大多数基因型中,不仅获得胚状体较困难,而且子叶胚也较难成活形成单倍体植株。Takahata等[3]对 11份萝卜材料进行了小孢子培养,其中 6份材料获得了胚状体,只有部分材料形成了再生植株。张丽[4]以 20个不同类型的萝卜品种为材料,对其游离小孢子培养技术进行了初步研究,其中只有 1份材料获得了胚状体。游离小孢子培养成功与否主要受植株的生理状态、基因型、培养方法及培养条件等因素影响,其中适宜的小孢子发育时期是培养成功的主要因素[5]。许多研究发现,小孢子的发育时期与花蕾形态指标,如花蕾长、花药长及花瓣长/花药长(瓣药比)密切相关,但不同种、不同变种、不同品种以及不同的栽培条件,其形态指标有所不同。曹鸣庆等[5]报道大白菜花蕾长 2～3 mm时小孢子处于单核中期至单核晚期的比例最大。张德双等[6]对青花菜进行研究,发现花蕾长 4.1～5.0 mm时,小孢子处于单核靠边期至双核早期。栗根义等[7]根据瓣药比这个形态指标成功地进行了大白菜小孢子培养。本试验分别通过醋酸洋红染色和荧光染色两种方法,显微观察萝卜小孢子不同发育时期,筛选萝卜小孢子观察的适宜方法,并调查不同基因型萝卜的花器官形态特征,确定适宜小孢子发育时期的花蕾形态指标,为建立高效、稳定的萝卜小孢子培养技术奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

供试材料为 4个不同类型的萝卜材料:秋白 2号、07-3、07-12和 07-16。秋白 2号为杂交种,早熟,肉质根长圆柱形,白色;07-3为自交系,肉质

李　丹,女,硕士研究生,中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京市海淀区中关村南大街 12号,100081,E-mail:wsg_dd@yahoo.com.cn

李锡香(通迅作者,E-mail:lee0612@sina.com.cn),沈镝,中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京市海淀区中关村南大街 12号,100081

收稿日期:2008-04-14;修回日期:2008-05-14

基金项目:国家科技支撑课题(2006BAD13B06)

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

根近球形,绿白色;07 - 12为自交系,肉质根长筒形,绿白色;07 - 16为自交系,红樱桃萝卜。

将经过 4 ℃低温预处理 25 d的萝卜种子,于 2007年 9月 27日育苗,10月 20日定植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验温室中。采用常规田间管理措施培养母株。

1.2 方法

1.2.1 花蕾形态特征观测　在各材料的开花盛期,每天 8:30取不同大小的花蕾放于自封口塑料袋中,用冰盒带回实验室。用电子数显卡尺测量花蕾的纵径、横径和花瓣长,并记录花蕾颜色。然后用镊子剥去萼片、花瓣,取出花药,测量花药的纵径和横径,并记录花药颜色。

1.2.2 花药的细胞学观察　将各材料不同大小的花蕾用卡诺氏固定液(无水乙醇与冰醋酸为 3 *V* ∶1 *V*)于室温下固定 24 h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,分别采用两种方法染色。

醋酸洋红染色法:将 45 mL冰醋酸加入 55 mL蒸馏水中煮沸后移去火焰,立即加入 1 g洋红,迅速冷却过滤,加饱和氢氧化铁(媒染剂)水溶液数滴,直到呈黑红色,室温保存。将配制好的醋酸洋红染液滴在花药上,用镊子挤碎花药,然后盖上盖玻片,在光学显微镜 40 ×10下观察。

荧光染色法:将磷酸二氢钾 2.122 8 g用双氧水溶解在 10 mL的离心管中,然后加入 1 mol·L^{-1} EDTA 1 mL、Tritonx - 100 1 mL,再将离心管用锡纸包起来,加入 4,6-二酰胺-2-苯基吲哚(DAPI)粉末 0.01 mg,充分溶解。将配好的 DAPI染液分装到 1 mL的离心管中,在 4 ℃下避光保存。滴一小滴配好的 DAPI染液在花药上,用镊子挤碎花药,然后小心地盖上盖玻片,在荧光显微镜 40 ×10下观察。因 DAPI染液有一定的毒性,操作时要小心,最好戴上手套。DAPI是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,是常用的 DNA特异性荧光染料,只对细胞核进行染色,在紫外光激发下呈现蓝色荧光。

每份材料每一时期(不同大小)随机取 10个花蕾,3次重复,每个花蕾取 1个花药,每个花药观察 10个不同视野,通过视野中小孢子主要发育时期的细胞数与总细胞个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。

试验数据采用 SAS软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 萝卜小孢子各发育时期的细胞学特征

对不同萝卜材料小孢子发育过程进行细胞学观察,获得萝卜小孢子各发育时期的特征(图 1、2)。

①四分体时期。萝卜花粉母细胞进入减数分裂期后,绒毡层细胞排列整齐,中层呈窄带状并开始解体;小孢子母细胞陆续进入减数分裂期,第 1次减数分裂的前期很长,末期后形成一双核细胞,不形成分隔壁,第 2次减数分裂中,双核细胞同时分裂形成四核细胞,分裂完成时产生细胞壁,并分隔成由胼胝质包围的 4个细胞。

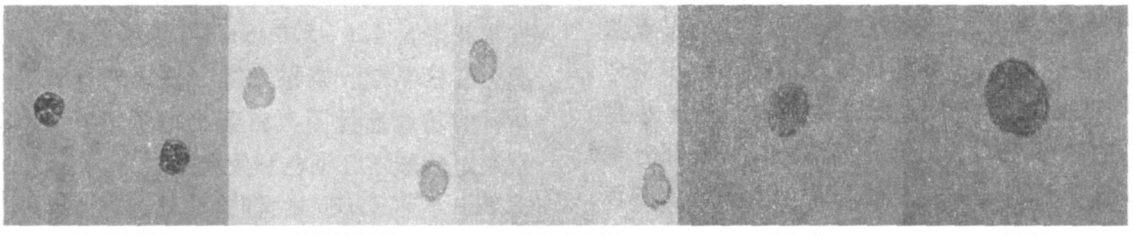

图 1　醋酸洋红染色下的萝卜小孢子发育主要时期

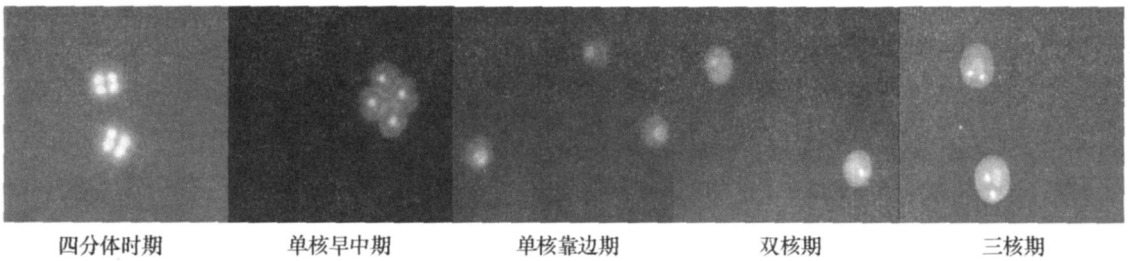

图 2　DAPI染色下的萝卜小孢子发育主要时期

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

②单核期。从四分孢子分开至小孢子第 1次细胞分裂前,四分孢子从胼胝质中分离出来,从四分体胼胝质壁释放出来的小孢子具有不规则的外形轮廓,但很快变成圆形或近圆形,形成 4个单核花粉粒。该时期的显著特点是特化的细胞壁逐渐形成,又可分为单核早中期、单核靠边期。单核早中期:小孢子从四分体中释放,核位于细胞中央,细胞体积小,花粉绒毡层细胞生长增大,细胞质液泡化程度提高。单核靠边期:大液泡开始形成,将细胞核从中心挤压到靠近细胞壁,细胞质相对不透明,细胞上出现萌发孔,花粉外壁已经形成。

③双核期。花粉细胞进行第 1次有丝分裂后,形成具有 1个营养细胞和 1个生殖细胞的双核期。由于是不均等分裂,所以形成的两个细胞大小不同,体积大的为营养细胞,核大,染色浅,周围有丰富的细胞质;体积小的为生殖细胞,核较小,染色较深,核外仅带有少量的细胞质。

④成熟花粉粒时期。双核期花粉进一步发育,生殖细胞经过 1次有丝分裂产生 2个精核。此时,花粉内可看到 3个核,即 1个营养核和 2个精核,进入三核期。三核期花粉内有大量淀粉积累,成为成熟花粉粒。

从图 1、2可以看出,在荧光显微镜下观察经 DAPI染色的小孢子发育过程及其特征要比普通光学显微镜下醋酸洋红染色清晰,细胞核界限明显,可以更清楚地观察到小孢子各发育时期的细胞核状况,DAPI染色法可使小孢子发育时期的鉴定更加准确。另外,醋酸洋红染色的三核期是在 100 × 10油镜下看到的,而在 40 ×10下看不到。从操作上来说,荧光染色具有简单、便捷的优点。

2.2 不同萝卜材料小孢子发育时期与花器官形态特征的关系

由表 1可以看出,同一材料小孢子的 4个不同发育时期的花蕾纵径、花蕾横径、花蕾纵横比、花药长、花药宽、花瓣长均存在明显差异,尤其是不同发育时期的花蕾纵径、花蕾横径、花药长、花瓣长差异更大。随着小孢子的发育成熟,花器官的各项形态指标都呈显著增长的趋势。

表 1 不同萝卜材料小孢子各发育时期花器官的形态指标

材料	发育时期	花蕾纵径 /mm	花蕾横径 /mm	花蕾纵横比	花药长 /mm	花药宽 /mm	花瓣长 /mm	瓣药比
07 - 12	四分体时期	1.593 dD	1.391 dD	1.188 dC	1.186 dD	0.600 bA	0.748 dD	0.631 cC
	单核早中期	2.280 cC	1.694 cC	1.345 cB	1.720 cC	0.827 abA	1.155 cC	0.663 cC
	单核靠边期	3.167 bB	2.123 bB	1.480 bAB	2.360 bB	0.949 abA	2.204 bB	0.929 bB
	双核期	3.904 aA	2.402 aA	1.632 aA	2.888 aA	1.276 aA	3.320 aA	1.159 aA
07 - 16	四分体时期	1.839 dD	1.541 dD	1.197 dD	1.124 dD	0.544 dD	0.525 dD	0.480 dD
	单核早中期	2.605 cC	2.049 cC	1.270 cC	1.823 cC	0.758 cC	1.289 cC	0.698 cC
	单核靠边期	3.510 bB	2.491 bB	1.412 bB	2.511 bB	0.871 bB	2.561 bB	1.021 bB
	双核期	4.351 aA	2.812 aA	1.548 aA	2.764 aA	0.952 aA	3.696 aA	1.340 aA
07 - 3	四分体时期	1.578 dD	1.358 dD	1.170 dC	0.957 dD	0.472 dC	0.484 dD	0.513 cC
	单核早中期	2.165 cC	1.716 cC	1.260 cC	1.475 cC	0.667 cB	0.913 cC	0.608 cC
	单核靠边期	2.991 bB	2.108 bB	1.420 bB	2.048 bB	0.831 bA	1.889 bB	0.923 bB
	双核期	3.899 aA	2.531 aA	1.540 aA	2.378 aA	0.930 aA	3.047 aA	1.283 aA
秋白 2号	四分体时期	1.637 dD	1.348 dD	1.029 cD	1.042 dD	0.465 cC	0.612 dD	0.572 dC
	单核早中期	2.223 cC	1.738 cC	1.275 cBC	1.645 cC	0.704 bB	1.190 cC	0.710 cC
	单核靠边期	3.138 bB	2.221 bB	1.420 bB	2.333 bB	0.848 aAB	2.456 bB	1.057 bB
	双核期	4.027 aA	2.526 aA	1.589 aA	2.688 aA	0.954 aA	3.476 aA	1.316 aA

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著 (α = 0.05),不同大写字母表示差异极显著 (α = 0.01),下表同。

从表 2中可以看出,供试材料处于单核靠边期的花蕾纵径在 2.991～3.510 mm之间,花蕾横径在 2.108～2.491 mm之间,花蕾的纵横比在 1.412～1.480之间,花药宽在 0.831～0.949 mm之间,花瓣与花药接近等长,花药长在 2.048～2.511 mm之间,花瓣长在 1.889～2.561 mm之间,瓣药比在 0.923～1.057之间。就单个品种而言,这些指标均可以作为确定小孢子发育适期花器官特征的参考。比较单核靠边期时不同萝卜材料花器官的各指标可以看出,材料间的花蕾纵径、花蕾横径、花药长和花瓣长差异均较大。在这些指标上,不易找到统一尺度来确定小孢子发育适期的花蕾。比较而言,小孢子发育适期的花蕾纵横比、瓣药比在不同材料间的差异相对较小。对于所有供试材料,与单核靠边期对应的花蕾纵径、花蕾纵横比、花瓣长和瓣药比的适宜尺度均不存在与其他发育时期的同类指标及其尺度的重叠,它们更适合作为不同材料取样适期的鉴定指标和

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

尺度。而就花蕾横径来说,07 - 16单核靠边期为 2. 491 mm,超出了 07 - 12双核期的 2. 402 mm;秋白 2号单核靠边期适宜的花药长为 2. 333 mm,与 07 - 3双核期的 2. 378 mm接近;秋白 2号和 07 - 3单核靠边期的适宜花药宽分别为 0. 848、0. 831 mm,与 07 - 12单核早中期的 0. 827 mm接近 (表 1)。所以,花蕾横径、花药长、花药宽不适宜作为确定不同材料单核靠边期的花蕾的通用指标。经过综合分析发现,花蕾纵径、花蕾纵横比、花瓣长和瓣药比适合于作为不同材料花蕾取样适期的鉴定指标,即花蕾纵径在 2. 991～3. 510 mm之间,花蕾纵横比在 1. 412～1. 480之间,花瓣长在 1. 889～2. 561 mm之间,瓣药比在 0. 923～1. 057之间。

由表 3可以看出,不同萝卜材料随小孢子发育时期的变化,其花器官形态的变化还表现在花蕾和花药的其他方面。适宜取材的单核靠边期的花蕾不仅要大小适宜、花药被萼片包裹紧密、花瓣和花药等长或接近等长,而且要求花蕾饱满、花药浅黄色至黄色。

表 2　单核靠边期时不同萝卜材料花器官的形态指标

品种	花蕾纵径 /mm	花蕾横径 /mm	花蕾纵横比	花药长 /mm	花药宽 /mm	花瓣长 /mm	瓣药比
07 - 12	3. 167 bB	2. 123 cBC	1. 480 aA	2. 360 aA	0. 949 aA	2. 204 aA	0. 929 abAB
07 - 3	2. 991 cC	2. 108 cC	1. 420 bB	2. 048 cB	0. 831 bB	1. 889 bB	0. 923 bB
秋白 2号	3. 138 bB	2. 221 bB	1. 420 bB	2. 333 bA	0. 848 bAB	2. 456 aA	1. 057 aA
07 - 16	3. 510 aA	2. 491 aA	1. 412 bB	2. 511 aA	0. 871 bAB	2. 561 aA	1. 021 aAB

表 3　萝卜小孢子不同发育时期花器官的其他外部形态特征

小孢子发育时期	花蕾形态	花瓣颜色	花药颜色
四分体时期	花蕾很小,萼片包被着花药,花萼绿色	浅黄绿色	黄绿色
单核早中期	花蕾稍大,仍完全闭合,萼片包被着花药,花瓣短于花药,花萼绿色	浅黄绿色	浅黄色
单核靠边期	花蕾已明显变大,花药被萼片包裹紧密,花瓣和花药等长或接近等长,花萼绿色	浅绿色	浅黄色
双核期	花蕾充分膨大,萼片包被着花药,花瓣稍长于花药,花萼绿色,有少许花蕾的柱头凸出萼片	白绿色	黄色
三核期	花蕾细长,萼片包被着花药,花蕾松弛、干瘪,花瓣长于花药,但未露出萼片,花萼绿色	近乎白色	黄色

3　结论与讨论

关于小孢子发育过程的细胞学观察,通常采用的方法有醋酸洋红染色、苏木精染色等,也有少数研究者采用荧光染色法。从成本考虑,荧光染色法的成本要高于前两种方法;从安全角度上考虑,DAPI染液有一定毒性,染色过程中应小心操作;从操作的难易程度而论,荧光染色法的操作程序要比前两种方法简单、便捷、易观察;从染色效果来说,荧光染色能更清晰、直观、完整地观察到细胞核及其染色质 (体)的分布,而另两种染色方法均存在一定缺陷,染色不十分清晰,细胞内结构界限模糊,观察困难。在有条件的情况下,建议研究者使用荧光染色的方法,可以得到更加清晰、一目了然的试验结果。

十字花科蔬菜作物小孢子发育一般分为四分体时期、单核期、双核期和三核期。对于小孢子培养而言,并非任何发育时期的小孢子都适合。武剑等[8]研究表明,大白菜小孢子的发育时期对于培养的效果有明显的影响,以单核靠边期到双核初期为最佳培养时期。大白菜小孢子诱导胚发生最佳时期为单核晚期[9]。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[10]。在以往的研究和本试验中均发现,小孢子大多数处于单核晚期时容易成胚。花蕾发育时期过早,小孢子尚未形成,培养过程中由于细胞对外部环境过于敏感,游离后便大量死亡,培养成胚的可能性微乎其微;花蕾发育时期过晚,小孢子部分已经形成单核或多核花粉,且花粉中已有大量淀粉积累,此时小孢子多已失去脱分化能力,不能再向孢子体方向发展。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,所以确定与不同萝卜材料小孢子发育适期相对应的花器官外部形态指标至关重要。

在本试验中,通过对 4份萝卜材料小孢子发育不同时期的花器官外部形态特征观察发现,不同萝卜材料的小孢子处于单核靠边期的花蕾已长到适宜大小,花药被萼片包裹紧密,花蕾饱满,花药浅黄色至黄色,花蕾纵径、花蕾纵横比、花瓣长和瓣药比适合于作为不同材料花蕾取样适期的鉴定指标和尺度,即花蕾纵径在 2. 991～3. 510 mm之间,花蕾

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

纵横比在 1.412～1.480之间,花瓣长在 1.889～2.561 mm之间,瓣药比在 0.923～1.057之间。栗根义等[7]用瓣药比为 1/3～4/5的花蕾成功进行了大白菜小孢子培养。王怀名等[11]在嫩茎花椰菜花药和花粉培养中,发现花瓣达到花药长度的 1/3～1/2,花药淡绿色至淡黄色,花蕾长为 2.5～3.0 mm时单核靠边期小孢子比例较大。龙雯虹等[12]在研究中发现,3个萝卜品种花蕾的长度存在差异,但当花蕾长为 1.7～2.2 mm,直径为 1.1～1.5 mm时,76.69 %～82.94 %的小孢子处于单核期,考虑到花蕾的长度比直径差异大,建议根据花蕾的长度进行取材。比较而言,前人在萝卜等作物的小孢子培养研究中不曾采用花蕾纵横比这一指标,本试验丰富了萝卜小孢子培养的研究结果。通过上述标准进行取材,已在秋白 2号中获得了子叶胚,在 07-16中获得了球形胚。实践证明,在萝卜小孢子培养过程中,通过花蕾和花药的大小及形态特征的观察,无需制片镜检,即可快速、准确地找到不同材料小孢子发育适期的花蕾,可避免每次取样时需要制片观察确定小孢子发育时期的繁琐程序,具有方便、快捷、准确的特点,有利于提高小孢子培养的效率。

参考文献

[1] 叶雪凌. 大白菜游离小孢子胚诱导与植株再生技术研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学. 2004.

[2] 王烨. 辣椒游离小孢子培养及其显微观察:[D]. 北京:中国农业科学院研究生院. 2004.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 曹鸣庆,李岩,刘凡. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎生长的影响[J]. 华北农学报, 1993, 8(4): 1-6.

[6] 张德双,曹鸣庆,秦智伟. 影响绿菜花游离小孢子培养的因素[J]. 华北农学报, 1999, 14(1): 68-72.

[7] 栗根义,高睦枪,赵秀山. 大白菜游离小孢子培养[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 167-170.

[8] 武剑,龚义勤,柳李旺,董艳荣. 十字花科蔬菜花粉植株诱导技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(6): 747-749.

[9] Sato T, Nishio T, Hirai 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.

[10] 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.

[11] 王怀名,米克斯-瓦格纳 G,杨艳丽. 嫩茎花椰菜花药和花粉培养中的胚胎发生[J]. 华北农学报, 1992, 7(4): 61-67.

[12] 龙雯虹,许彬,杨荣萍,陈灵花,胡陈花. 萝卜花蕾大小与花粉发育关系的研究[J]. 河南农业科学, 2004(4): 54-56.

Morphological Characteristics of Flower Organ and Cytological Observation of Microspore in Different Development Stage in Radish(Raphanus Sativus **L.)**

Li Dan, Li Xixiang, Shen Di (Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract The developmental stage of microspores was observed by two different methods: acetic magenta staining and DAPI staining. It was found that the nucleolus in microspore display more clearly by DAPI staining than acetic magenta staining. The relationship between microspore developmental stage and morphological characteristics of flower buds and anthers was studied by both of cytological and morphological methods on four different radish genotypes. There were significant differences in longitudinal diameter and transverse diameter of flower buds, the ratio between longitudinal diameter and transverse diameter of flower buds, anther length, anther width, petal length, the ratio of petal length and anther length, during the developmental stages of the microspore in all four different radish genotypes. At the late-single nucleus stage, significant difference existed in all the above-mentioned index of different varieties. It indicated that the longitudinal diameter of buds, the ratio of the longitudinal diameter and the transverse diameter of flower buds, petal length and the ratio of the petal length and the anther length were suitable for the determination of sampling time for microspore culture. The appropriate longitudinal diameter of buds ranged 2.991-3.510 mm and the ratio of the longitudinal diameter and the transverse diameter of flower bud ranged 1.412-1.480, the petal length ranged 1.889-2.561 mm, the ratio between petal length and anther length ranged 0.923-1.057. In addition, it is necessary that the anthers should be covered by the sepal, the length of sepal was equal or close to the anther lenghth, and the flower bud was full, the anther showed from light yellow to yellow.

Key words Radish, Development stage of microspore, Cytological observation, Morphological characteristics

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net