

甜樱桃巨红 13-38 花药发育 时期鉴定及愈伤诱导的初步研究

李晓燕 王家庆

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要: 以甜樱桃巨红 13-38 为试材, 对其花药发育时期和不同时期愈伤的诱导进行了研究. 结果表明: 小孢子母细胞越冬前已经形成, 一直持续到次年的 2~3 月份, 3 月中旬开始减数分裂, 3 月末形成四分体, 4 月初形成单核期小孢子, 4 月中旬形成成熟花粉; 花药单核期时诱导的愈伤状态最好为绿色, 较致密, 愈伤诱导率是各时期中最高的, 为 4.828%.

关键词: 组织培养; 甜樱桃; 小孢子; 愈伤诱导

中图分类号: Q813.1+2

文献标识码: A

文章编号: 1009-315X (2007) 03-0019-03

甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 组织培养的研究始于 20 世纪 80 年代, 近年来的发展很快, 较多的为叶片再生^[1-2]、离体快繁^[3-4]、体外胚培养^[5]、试管苗生根^[6]等, 而甜樱桃花药培养尚未见报道. 花药中小孢子的发育时期是花药培养中成功诱导单倍体雄核发育的关键. 只有花粉发育到一定时期对离体的刺激才最敏感. 目前国内外对甜樱桃小孢子发育时期的研究已有报道^[7-8]. 本文则对甜樱桃巨红 13-38 花药的各个发育时期进行了鉴定和愈伤诱导的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

甜樱桃巨红 13-38 (大连农科所选育的甜樱桃新品系, 辽宁师范大学重点实验室提供).

1.2 培养基及培养条件

采用 MS^[9] 基本培养基, 附加激素 2,4-D 2.0 mg/L + BA0.5 mg/L + KT0.5 mg/L; 25~26℃ 下暗培养.

1.3 材料灭菌

采集大量花蕾, 取带茎段花芽, 剥去外部鳞芽及茎段外皮, 在超净工作台上按以下步骤消毒: 75% 酒精 30 s → 升汞 5 min → 无菌水冲洗 6 次, 在解剖镜下剥出花药接种到培养基中.

1.4 花药发育时期的鉴定

从 2005 年 9 月初到 2006 年 2 月末, 每 20 d 采摘一次花芽, 2006 年 3 月到 5 月初, 每 5 d 采摘一次花芽, 用石炭酸品红压片法鉴定花药发育时期, 并选取不同发育时期的花药进行愈伤诱导的培养.

2 结果与分析

2.1 甜樱桃巨红 13-38 花药发育时期的鉴定

甜樱桃巨红 13-38 是那翁 × 黄玉杂交之后代 12-2 实生选育而成, 果肉浅黄白, 肉质较脆, 肥厚汁多, 典型的花药形态 (如图 1-A 所示). 从 2005 年 11 月末一直到 2006 年 2 月末 3 月初, 经常规压片发现了小孢子母细胞阶段一直存在, 持续了近 4 个月. 小孢子母细胞体积较大, 具有较大的细胞核, 细胞质浓且无液泡, 与张冬生^[10]描述的小孢子母细胞形态一致. 3 月中旬显微镜检查发现花粉母细胞发生第一次减数分裂, 细胞核已经分裂成两个还未分开的子细胞核 (如图 1-B 所示), 3 月 27 号左右减数分裂结束. 由于胞质分裂时的极性不同而形成四面体型的四分体, 四分体周围被一层厚的胼胝质所包围, 各小孢子之间也有胼胝质分隔 (如图 1-C 所示). 此时期的细胞较小, 细胞核居于中间 (如图 1-D 所示). 4 月 1 日压片发现胼胝体已经开始分解, 小孢子分离开来

收稿日期: 2006-12-29.

作者简介: 李晓燕 (1981-), 女, 山东威海人, 辽宁师范大学生命科学学院硕士研究生在读. 研究方向: 植物生物技术.

(如图 1-E 所示),但大多数的小孢子仍被包在胼胝质中.此时游离的小孢子大多已具有了成熟花粉粒的形态,在胼胝质中的细胞体积较小,细胞核较大,居中且无液泡(如图 1-F 所示).根据马城等^[11]对单核期细胞形态的描述,确定此时为单核期,即从四分孢子时期到小孢子第一次细胞分裂为止的这一阶段.4月5日压片发现细胞体积增大,细胞核也有增大,而且在细胞中出现许多白色小空隙(如图 1-G 所示),此时为液泡单核期.4月9日左右细胞核发生第一次有丝分裂,进入了二核期(如图 1-H 所示).4月中旬小孢子体积进一步增大,发育成成熟的花粉粒.成熟花粉粒呈圆球形或钝三角形,具三孔沟.其赤道面观为长椭圆形,极面观为三裂圆形(如图 1-I 所示).

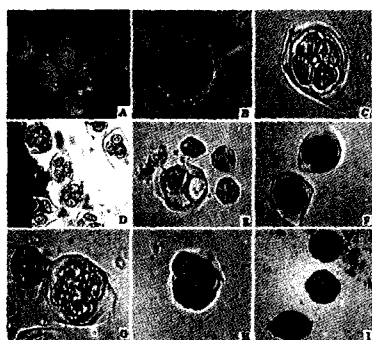


图 1 花药不同发育时期鉴定

- A. 成熟花药(100); B. 花粉母细胞(400); C. 正四面体的四分体时期(400);
D. 胼胝体包围的小孢子(400); E. 从胼胝体中释放的小孢子(400);
F. 单核期(400); G. 液泡单核期(400); H. 二核期(400); I. 成熟花粉粒(400).

注:中括号内数字为显微镜放大倍数;图片中同一显微放大倍数

下的细胞的大小不同,是由于图片所取范围大小不同所致.

2.2 花药不同发育时期的愈伤诱导

接入培养基的新鲜花药为淡黄色,整体光滑饱满(如图 2-A 所示).接入 5 d 后花药颜色开始转暗,10 d 左右出现体积膨大现象,大约 25~35 d 有愈伤出现.60 d 后统计愈伤诱导率,结果见表 1.实验中发现,甜樱桃巨红 13-38 的花药在不同发育时期诱导出的愈伤组织是不同的.在早期的花粉母细胞时期,花药愈伤诱导率为 1.149% (如图 2-A, 2-B 所示).四分体时期诱导率为 2.186%,愈伤致密(如图 2-C 所示).单核期诱导率为 4.384%,绿色,较致密,状态最好(如图 2-D 所示).二核期诱导率为 1.274% (如图 2-E 所示).花粉成熟期诱导率为 0.606%,愈伤疏松,潮湿,状态不佳(如图 2-F 所示).

表 1 培养基对甜樱桃花药愈伤的诱导

花药发育时期	花药接种数	愈伤诱导数	愈伤诱导率/%	愈伤状态
花粉母细胞	174	2	1.149	土黄色,较疏松
四分体时期	183	4	2.186	黄绿色,致密
单核期	138	6	4.348	绿色,较致密
二核期	157	2	1.274	淡黄绿色,较致密
花粉成熟期	165	1	0.606	土黄色,疏松

$$\text{愈伤诱导率} = (\text{愈伤诱导数} / \text{花药接种数}) \times 100\%$$

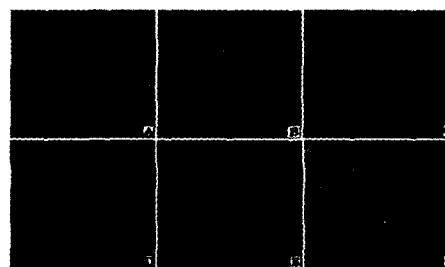


图 2 花药不同发育时期愈伤

- A. 花粉母细胞时期愈伤; B. 花粉母细胞时期愈伤; C. 四分体时期愈伤;
D. 单核期愈伤; E. 二核期愈伤; F. 成熟花粉愈伤.

3 讨论

3.1 甜樱桃巨红 13-38 花药发育时期的鉴定

本实验从 2005 年 8 月开始到 2006 年 5 月期间,利用石炭酸品红压片法研究了甜樱桃巨红 13-38 花药发育的全过程,初步鉴定了花药发育的各个时期.实验发现,甜樱桃巨红 13-38 小孢子母细胞是从 2005 年 11 月份持续到 2006 年 3 月初.这一点与姚宜轩等^[7]的观察结果一致.巨红 13-38 小孢子母细胞的第一次减数分裂发生在 3 月中旬,3 月末结束第二次减数分裂,4 月初胼胝质解体小孢子释放.观察还发现,大多数的巨红 13-38 的小孢子的单核期与二核期是在胼胝质中发生的,尽管此时有小孢子已经从胼胝质中游离,但多数小孢子仍包围在胼胝质中,在二核期后小孢子才从胼胝质中释放,经很短时间即发育为成熟的花粉粒.这与姚宜轩的研究有差异,他研究发现,甜樱桃大紫 3 月末 4 月初小孢子释放后才发育单核期、二核期.这可能是由于种间差异造成的,但其中原因还需进一步研究.

甜樱桃是蔷薇科(Rosaceae)李属植物.蔷薇科植物的花粉是二胞型花粉,即在花粉成熟时期,植物的生殖核停留在分裂前期或前中期,直到传粉后,在生长的花粉管中进行第二次分裂,形成两个雄配子.而从图 1-H 中我们可以看到,3 个细

2007年第3期(总第38期)
5月15日出版

李晓燕,等:甜樱桃巨红13-38花药发育时期鉴定及愈伤诱导的初步研究

胞中,最上边的细胞中有3个核,另外两个细胞中为2个核. rewaker^[12]曾研究了大约2 000种植物,其中265个科中179个科是二胞型花粉,54个科是三胞型,另有32个科是两种类型都有的.他认为二胞型和三胞型兼有的植物是很少的,而且两种类型兼有的同一种植物中的花粉类型也不是一成不变的.所以认为二胞型花粉植物中可能由于某种诱因会有三胞型花粉的发生,反过来三胞型花粉植物中也会发生二胞型花粉.本实验中观察到了液泡单核期,但没有对单核期进行细分,因为单核期主要是液泡形成的时期,光学显微镜下只能看到有白色缝隙,很难辨别出胞质和胞核.

3.2 花药不同发育时期的愈伤诱导

在花药培养早期的研究中发现,并不是任何发育时期的花粉都可以培养形成愈伤组织或胚状体.从花粉母细胞时期到二核期诱导的愈伤组织诱导率是由低到高再到低,其中单核期诱导的愈伤状态最佳,诱导率最高,较适合离体培养;成熟花粉虽然也能诱导出愈伤,但状态差,诱导率低,说明成熟花粉不适合离体培养.

花药是季节性材料,较不容易获得,本试验初步鉴定了甜樱桃巨红13-38的花药发育的各个时期及愈伤诱导,以期对甜樱桃花药培养和育种的深入研究提供参考.

参考文献:

[1] Bhagwat B and David L W. In vitro shoot regeneration from

leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart' [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, (78): 173 - 181.

[2] 孙清荣,李 勃,张力思,等.甜樱桃品种吉列玛叶片再生不定梢研究[J].落叶果树,2001,(1):10-11.

[3] 侯修胜.莫利甜樱桃试管快繁技术研究[J].落叶果树,2002,(5):5-6.

[4] 代红艳,张志宏,高秀岩,等.甜樱桃品种微繁体系的建立及优化[J].果树学报,2004,21(3):216-219.

[5] 王爱华,戴洪义,于士梅.甜樱桃胚培养研究[J].莱阳农学院学报,2003,20(3):162-164.

[6] 袁小环,彭向永,李 青,等.甜樱桃组培苗的生根研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(4):71-78.

[7] 姚宜轩,张长胜,许 方.甜樱桃小孢子和绒毡层的发育[J].莱阳农学院学报,1992,9(3):170-175.

[8] Pacini E. Pollen tapetum and another development in two cultivars of sweet cherry (*Prunus avium*) [J]. *Phytomorphology*, 1986, 36(3/4): 197 - 210.

[9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962, (15): 473 - 479.

[10] 张冬生.植物体细胞遗传学[M].上海:复旦大学出版社,1989.

[11] 马 城,桂耀林.植物组织培养[M].北京:科学出版社,1985.

[12] Brewbaker J L. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms [J]. *American Journal of Botany*, 1967, (54): 1069 - 1083.

Preliminary Study on the Identification of Microspore in Different Stages and Callus Introduction of *Prunus avium* L JuHong13-38

LI Xiao-yan WANG Jia-qing

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian Liaoning 116029, China)

Abstract: JuHong13-38 (*Prunus avium* L), as the material, was studied for the identification of microspore in different development stages and callus introduction. The results are as follows: the microsporocytes of *Prunus avium* L JuHong13-38 formed before the winter and persisted to February and March of the next year. By the mid March, microsporocytes started their meiosis process and resulted in microspore tetrads in the end of March. Uninucleate pollen grains formed in early April and changed into mature pollen in the mid April. The callus in Uninucleate of sweet cherry JuHong 13-38 was grassy and compact. The highest callus introduction happened in uninucleate stage and introduction frequency was 4.828%.

Key words: tissue culture; *Prunus avium* L; microspore; callus introduction

(责任编辑 邹永红)