

文章编号: 1001-1498(2010)03-0430-05

麻竹花粉发育过程观察及其分期

乔桂荣^{1,2}, 蒋晶¹, 李海营¹, 陈银¹, 孙宗修², 卓仁英^{1*}

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400;

2. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006)

摘要: 以麻竹为材料, 采用醋酸洋红、碘-碘化钾压片以及石蜡切片的观察方法对麻竹花粉发育全过程进行了研究, 初步将这一过程划分为8个时期, 即小孢子母细胞形成期、小孢子母细胞减数分裂期、小孢子早期、小孢子中期、小孢子晚期、二胞花粉早期、二胞花粉晚期和成熟花粉期, 并描述了各个时期的基本特征。麻竹花粉发育过程基本正常, 小孢子母细胞减数分裂为连续型, 四分体主要为左右对称型, 也有四面体形的, 成熟的花粉为3-细胞型, 具单一萌发孔。

关键词: 麻竹; 花粉; 发育阶段; 细胞学

中图分类号: S795

文献标识码: A

Pollen Development of *Dendrocalamus latiflorus* and Its Stages

QIAO Gui-rong^{1,2}, JIANG Jing¹, LI Hai-ying¹, CHEN Yin¹, SUN Zong-xiu², ZHUO Ren-ying¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, Zhejiang, China)

Abstract: By using the techniques of aceto-carmin squash, iodine potassium iodide squash and paraffin section, an extensive and cytological observation was conducted on the pollen development of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. The results showed that the whole developmental process could be primarily divided into eight stages, i. e. microspore mother cell formation stage, microspore mother cell meiosis stage, early microspore stage, middle microspore stage, late microspore stage, early bicellular pollen stage, late bicellular pollen stage and mature pollen stage. The major characteristics of every stage are reported. It was showed that the cytokinesis of the microspore mother cells in meiosis was successive and the microspore tetrads were isobilateral or tetrahedral. The mature pollen grains were three-celled and mono-aperturate.

Key words: *Dendrocalamus latiflorus*; pollen; developmental stage; cytology

麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) 隶属禾本科 (Gramineae) 竹亚科 (Bambusoideae) 牡竹属 (*Dendrocalamus* Nees) 麻竹亚属 (Subgen. *Sinocalamus* (McClure) Hsueh et D. Z. Li), 原产中国, 自然分布于福建、台湾、广东、广西、贵州、云南等省区, 是我国华南、东南沿海地区重要的优良、速生、笋材两用大型丛生竹种之一^[1]。竹子作为无性繁殖的多年生植物, 很少开花结实, 自然条件下竹子的结实率低, 严重制

约了竹类植物的有性遗传改良, 因此, 竹类植物的改良多局限于自然界优良无性系的选育^[2]。当前对竹子开花现象已有不少报道^[3-5], 主要集中在开花原因、开花复壮等方面。

目前, 有关竹类植物的花粉发育研究相对较少, 主要集中在国内。最早的报道是1984年乔士义、廖光庐对毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 胚胎学的观察研究^[6]; 庞延军等^[7]报道了爬竹

收稿日期: 2008-11-24

作者简介: 乔桂荣 (1982—), 江苏沐阳人, 女, 研究实习员, 硕士, 主要从事林木基因工程研究。

* 通讯作者: E-mail: zhuory@gmail.com

(*Drepanostachyum microphyllum* (Hsueh et Li) Keng f.) 雄蕊发育异常的初步观察, 又对寒竹 (*Chimonobambusa marmorea* (Mitf.) Makino) 进行了胚胎学观察与研究, 认为寒竹成熟花粉粒为 2 - 细胞型^[8]; 张文燕等^[9] 对 12 种竹子的花粉形态、生活力和自然授粉进行了研究, 认为竹类植物的雄性不育和花粉败育是开花后结实率普遍低下的主要原因; 黄坚钦等^[10] 对雷竹 (*Phyllostachys praecox* C. D. Chu et C. S. Chao) 的小孢子发生和雄配子体形成进行了研究, 发现存在一些异常现象并会导致雄性不育, 认为这可能是雷竹结实率低的一个主要原因; 王曙光等^[11] 对巨龙竹 (*Dendrocalamus sinicus* Chia et J. L. Sun) 生殖器官形态结构及雌、雄配子体的发育进行了观察研究, 尚未发现发育异常。

根据张光楚的研究, 麻竹花粉发芽率为 5.4% ~ 40.4%^[12], 邢新婷等^[13]、袁金玲等^[14] 对麻竹开花的生物学特性进行了研究, 从宏观上观察了麻竹花的发育, 但迄今未见麻竹花粉发育的研究报道。麻竹花粉萌发率、结实率低是否由花粉的异常发育所导致? 本研究系统观察了麻竹花粉发育过程, 并对这一过程进行分期, 以期填补这方面研究的空白, 同时也给麻竹杂交育种提供理论上的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

麻竹开花材料选自福建永安, 2007 年 12 月将材料截干处理后, 移植至浙江富阳中国林科院亚热带林业研究所苗圃, 常规水肥管理。在 2008 年盛花期, 采集不同发育时期的花序进行观察。

1.2 研究方法

本研究采用 3 种制片方法对麻竹花粉发育过程进行观察^[15]。

(1) 小孢子母细胞减数分裂时期采用醋酸洋红染色法。将采集的新鲜花序于 Carnoy 氏液 (95% 乙醇 冰醋酸 = 3 : 1) 中固定 24 h 后, 依次换入 90%、80%、70% 乙醇溶液。从小花内挑出花药, 置于载玻片上, 加上一滴醋酸洋红染液, 用解剖针挤出花粉母细胞, 去除药壁等杂质后盖上盖玻片, 用铅笔橡皮头轻轻敲打, 吸去多余染液, 根据染色深浅用 45% 醋酸脱色或置于酒精灯火焰上烘烤, 然后于 Leica DM4000M 显微镜下观察。

(2) 小孢子及花粉发育时期采用碘 - 碘化钾染

色法。从采集的新鲜材料中挑出花药, 加一滴碘 - 碘化钾染液, 用解剖针挤出花粉细胞, 去除杂质后盖上盖玻片, 然后在显微镜下观察。

(3) 石蜡切片法: 采集的新鲜材料于 Carnoy 氏液中经抽气后固定 18 h 以上, 经过脱水 透明 透蜡 包埋 切片 粘片 溶蜡 苏木精染色 中性树胶封片后, 在显微镜下观察。

2 结果与分析

选用的麻竹材料于 3 月底开始出现开花征兆, 花期持续到 7 月。麻竹开花前小枝叶异型变小, 于小穗长出时脱落, 多枚小穗着生于小枝节结处, 小穗卵形, 含 3 ~ 10 枚颖花, 每朵小花分别具有 1 片内稃和 1 片外稃, 含花药 6 枚, 雌蕊 1 枚, 柱头 3 裂, 成熟的小穗呈紫褐色。本试验通过大量的显微观察, 并参照禾本科竹亚科以及稻 (*Oryza* spp.)、小麦 (*Triticum* spp.) 等植物花粉发育时期的研究结果^[6-10, 16-17], 将麻竹小孢子母细胞形成到花粉形成的发育过程分为 8 个时期。

2.1 小孢子母细胞形成期

小孢子母细胞来源于孢原细胞分裂所形成的初生造孢细胞, 初生造孢细胞经几次有丝分裂, 形成次生造孢细胞, 然后发育形成小孢子母细胞, 进行减数分裂。小孢子母细胞体积大, 呈多边形, 细胞核也较大, 细胞质浓厚, 没有明显的液泡, 排列比较紧密 (图 1-1)。

2.2 小孢子母细胞减数分裂期

花药进一步发育, 小孢子母细胞之间渐渐分离, 进入减数分裂阶段 (图版仅示个别时期)。细线期染色体呈现细丝状, 首尾不分地绕成一团, 核仁明显 (图 1-2), 然后, 同源染色体开始配对联会, 染色体逐渐变粗变短。到了中期 I, 核仁、核膜消失, 纺锤体形成, 染色体排列于赤道板上 (图 1-3)。后期 同源染色体彼此分开, 移向细胞两极 (图 1-4)。到了末期 I, 染色体到达细胞两极, 在细胞中间形成隔壁 (图 1-5), 将其分隔成二分体 (图 1-6)。染色体到达细胞两极后逐渐解旋, 核仁、核膜重新出现, 在赤道面处形成新的细胞板, 二分体分裂形成四分体细胞, 小孢子四分体主要为左右对称型 (图 1-7), 也有四面体形的 (图 1-8)。在同一个花药内, 减数分裂过程并不是完全同步的, 但一般处于相邻的时期。整个减数分裂期间的小孢子母细胞、二分体及四分体均被胼胝质壁包围。

2.3 小孢子早期

随着包围四分体的胼胝质壁的解体,四分孢子彼此分开,即进入小孢子早期。早期小孢子形状不规则,呈现圆球形、椭圆球形或卵形(图1-9),细胞壁薄,细胞质均匀,细胞核位于中央,观察不到液泡。

2.4 小孢子中期

当小孢子萌发孔出现孔阜,即进入小孢子中期。在此期间,小孢子增大,壁显著加厚,细胞核仍位于中央,胞内形成一些小液泡,小孢子均呈规则的圆球形(图1-10)。

2.5 小孢子晚期

小孢子细胞内小液泡增大增多并逐渐合并,最后形成一个大液泡。细胞质和细胞核被液泡挤压而紧贴壁上,位于萌发孔对侧(图1-11)。小孢子体积继续增大,呈圆球形。由于这一时期细胞核的位置及中央大液泡的特点,也常称之为“单核靠边期”或“单核大液泡期”。

在小孢子中期到晚期,除小孢子的细胞核由细胞中央向萌发孔对侧的定向移动外,本试验还多次观察到细胞质的“定向移动”现象:即小孢子核移至萌发孔对侧以后,在细胞核外侧聚集一股细胞质,向着萌发孔方向伸展,形成“细胞质桥”(图1-12箭头所示)。

2.6 二胞花粉早期

小孢子核第1次有丝分裂,结果形成大小不等的2个细胞,即大的营养细胞和小的生殖细胞(图1-13、1-14),营养核和生殖核均为圆球形。

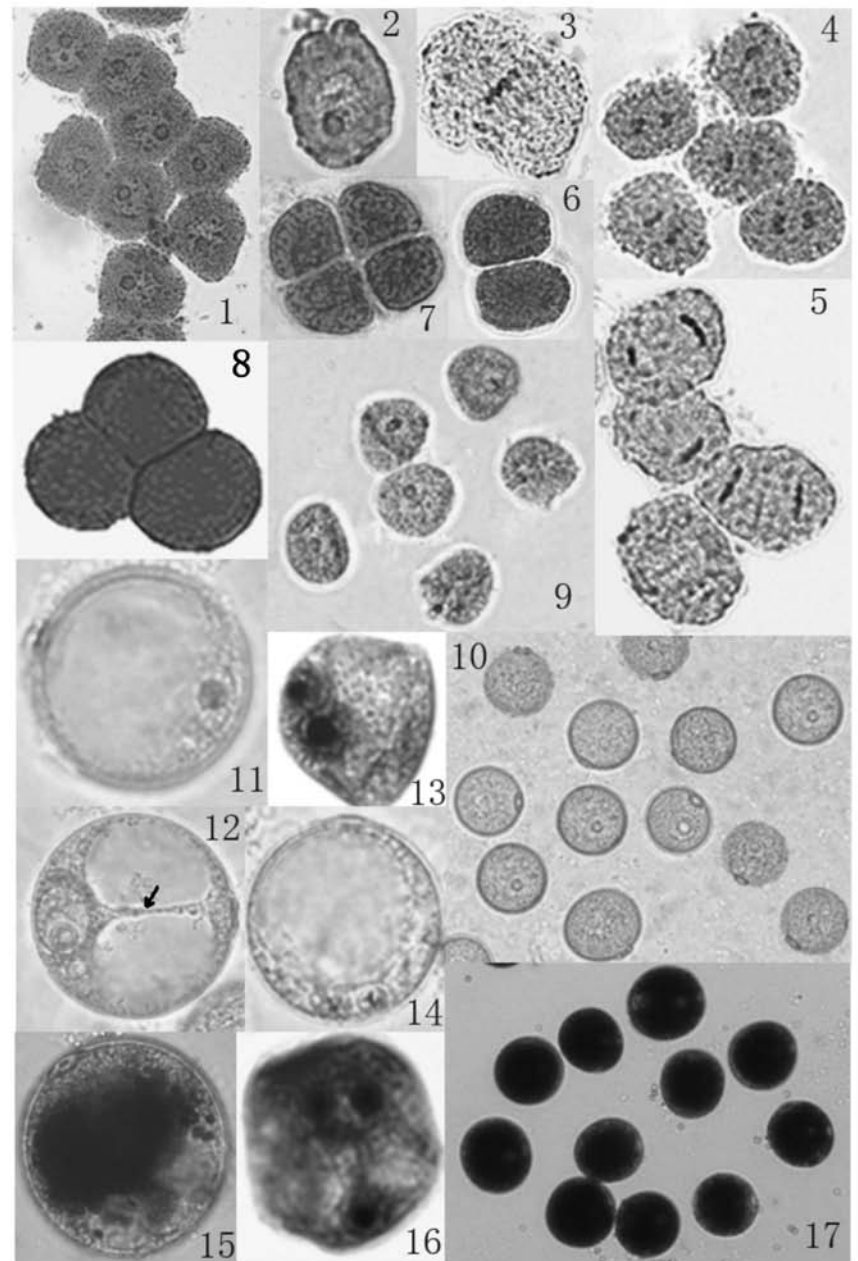
2.7 二胞花粉晚期

从花粉内开始出现淀粉粒直至生殖细胞分裂之前,为二胞花粉晚期。由于淀粉粒等物质首先在萌发孔附近积累,并在此处不断增加,液泡体积逐渐缩小,并被推至萌发孔的对侧(图1-15)。

2.8 成熟花粉期

当细胞内完全充满淀粉等贮藏物质时,花粉粒圆球形(图1-17),生殖细胞进行分裂,形成2个精细胞(图1-16)。此时由于花粉内充满了淀粉等贮藏物,其内的3个细胞核通常不容易同时观察到。至此,麻竹花粉的发育过程完成。成熟花药吐露,然后花丝伸长,花药伸长下垂,下端两侧开裂小口,花粉散出。

综上所述,将麻竹花粉发育过程的主要分期特征列于表1。



1. 小孢子母细胞 400 ×; 2. 细线期 200 ×; 3. 中期 I 400 ×; 4. 后期 I 200 ×; 5. 末期 I 200 ×; 6. 二分体 400 ×; 7. 左右对称型四分体 400 ×; 8. 四面体型四分体 400 ×; 9. 小孢子早期 200 ×; 10. 小孢子中期 400 ×; 11. 小孢子晚期 400 ×; 12. 小孢子晚期(箭头示细胞质桥) 400 ×; 13. 二胞花粉早期切片 400 ×; 14. 二胞花粉早期 400 ×; 15. 二胞花粉晚期 400 ×; 16. 成熟花粉粒切片 400 ×; 17. 成熟花粉粒 400 ×

图1 麻竹花粉发育全过程

3 讨论

开花结实是种子植物共有的特性,竹子也不例外。在开花前,竹株或竹丛经常出现某种反常现象,如竹笋很少甚至不出笋;叶绿素迅速降解,竹叶变为枯黄色或全部脱落,或换生短小变形的新叶,同时竹子体内糖类物质增加和氮素含量减少,出现高的碳/氮比率,这些都是预示竹子进入生殖生长阶段,花期即将来临,为选取开花材料提供了依据。竹子开花一年四季都可发生,但盛花期一般在3—7月,丛生竹较早,常在3—5月^[18]。邢新婷等^[13]所采集的麻竹在移植当年的12月下旬和次年的3月中旬分别出现一个盛花期,盛花期持续约10d左右。本研究所选取的开花材料移植后次年4月陆续开始开花,花期持续4个月之久,为研究提供了大量的试验材料。

表1 麻竹花粉发育过程分期及其主要特征

编号	时期	主要特征	起止时期	小穗特征
1	小孢子母细胞形成期	小孢子母细胞呈多边形,彼此相互紧贴,细胞核大,胞质浓厚	孢原细胞出现至小孢子母细胞减数分裂前	小穗绿色,长约0.6 cm,花药淡绿色
2	小孢子母细胞减数分裂期	小孢子母细胞椭圆球形,减数分裂为连续型,四分体为左右对称型或四面体型	小孢子母细胞减数分裂开始至四分体形成	紧实,顶部尖略带紫色,长0.8 cm左右
3	小孢子早期	小孢子近圆球形,无液泡,尚未出现萌发孔	四分孢子散开至萌发孔出现之前	饱满,顶端变钝,长0.9 cm左右
4	小孢子中期	小液泡出现,萌发孔形成,壁加厚	萌发孔明显可见至中央大液泡形成前	紫色,长1.1 cm左右,花药淡黄色
5	小孢子晚期	小孢子体积明显增大,出现中央大液泡,胞质及核贴于孢壁内侧	中央大液泡形成至小孢子核移到萌发孔对侧	顶端小花柱头伸出,小穗长1.2 cm左右
6	二胞花粉早期	小孢子有丝分裂成营养细胞和生殖细胞	小孢子进行有丝分裂至淀粉粒出现之前	上部小花柱头卷曲,小穗长1.4 cm左右,花药黄色
7	二胞花粉晚期	小孢子体积增大,淀粉开始积累,尚有液泡	淀粉粒开始积累至液泡消失之前	外稃微张,小穗蓬松,长1.5 cm左右
8	成熟花粉期	淀粉等贮藏物充满整个花粉粒,生殖细胞分裂成2个精细胞	充满淀粉等内含物至3-细胞花粉粒形成	花药露出,小穗长1.6~2.3 cm

本研究对不同发育时期的材料采用了不同的制片及染色方法。小孢子母细胞减数分裂各时期细胞形态不稳定,所以材料采集后立即用 Carnoy 氏液固定,即可保存花药;然后用醋酸洋红压片,将染色体染成深色,在显微镜下可准确识别减数分裂各时期。观察小孢子及花粉发育时期最好采集新鲜的材料,用碘-碘化钾进行染色压片,可以根据染色的变化观察到淀粉逐步累积的过程,尤其是成熟花粉,可根据染色情况判断细胞内淀粉的充实情况,从而初步判断花粉的生活力;但到了二胞花粉后期即淀粉在细胞内开始累积后,细胞核就不易观察到,很难判断成熟的花粉粒是2-细胞型还是3-细胞型,图1-16采用了石蜡制片法清楚地观测到麻竹成熟花粉粒为3-细胞型。试验也采用了石蜡切片进行小孢子和花粉发育观察,在固定的切片材料中,小孢子常表现为各种不规则的收缩,常被称为小孢子“收缩期”。王曙光等^[10]将巨龙竹小孢子发育中期称为小孢子收缩期,但目前一般认为,在自然状态下小孢子不存在收缩期,小孢子收缩是由于药剂固定引起的,尤其在单核小孢子中期及二胞花粉早期对固定处理是较敏感的^[16]。徐雪宾等^[19]以水稻新鲜花药直接用蒸馏水或醋酸洋红压片,以及用 Carnoy 氏液等固定的同一小花的不同花药的醋酸洋红压片,观察花粉形成过程,比较不同处理四分体及小孢子的形态,进一步证实所谓第一收缩期、第二收缩期均不是小孢子发育过程的自然形态与正常的发育时期。试验采用压片法进行观察时,未发现小孢子有收缩现象,而采用石蜡切片观察时,细胞均发生了严重的萎缩变形,可能与固定、脱水等步骤的操作有关,而且石蜡切片制作费时较多,所以观察花粉发育过程采用压片法更为适宜。

本文从细胞的显微结构上,对麻竹花粉发育过程进行了观察。从小孢子母细胞形成到成熟的花粉粒,将其分为8个时期。麻竹花粉的发育过程与竹亚科其他竹种以及禾本科稻、麦等禾亚科植物基本相似。麻竹小孢子母细胞减数分裂为连续型,四分体主要为左右对称型,也有四面体形的,成熟的花粉为3-细胞型,具单一萌发孔。在单核晚期的小孢子内,本试验观察到胞质定向移动,类似的现象在水稻和小麦中曾有过报道^[16-17],但在其他竹类研究中未见有报道。细胞质的这种定向移动推测与即将发生的小孢子第1次有丝分裂的胞质分配有关。麻竹同一小穗上各朵小花发育时期不一致,一般是顶端的小花先发育,基部的小花发育迟缓甚至出现败育;同一小花、同一花药内的小孢子发育基本同步或处于相邻发育阶段。

散粉前的成熟花粉粒可能是3-细胞的,也可能是2-细胞的。前者生殖细胞在花粉粒里完成分裂和形成精子,而后者生殖细胞的有丝分裂过程延续时间较长,在花粉萌发后继续在花粉管中完成分裂和形成精子。2种类型的花粉常常是整个属或整个科的特性,也有部分科属甚至是一种植物中包含有2种类型,并认为所有系统发育原始的种是2-细胞型^[20]。与麻竹同属的巨龙竹和寒竹属的寒竹成熟花粉粒为2-细胞型,而刚竹属(*Phyllostachys* Sieb. et Zucc.)的毛竹和雷竹与麻竹的成熟花粉粒同为3-细胞型。

通过本试验的观察研究,麻竹花粉发育过程基本正常,黑染花粉比例达99%,但麻竹在自然条件下的开花结实率非常低。王曙光等^[11]观察到巨龙竹雄配子体发育过程中未出现异常,新鲜花粉的萌发率高达92.2%,但其自然结实率很低,认为是巨

龙竹小穗发育雌雄异熟, 有性生殖时期能够正常受精结实的机会非常有限所致^[10]。在本试验中, 明显观察到在麻竹小孢子单核晚期雌蕊柱头就开始伸出, 发育成熟先于雄蕊。另外, 外界环境对花粉质量有密切的关系, 根据张光楚的研究, 麻竹花粉发芽率为 5.4% ~ 40.4%, 且在半小时内花粉若遇到阳光直射、空气干燥或水滴存在基本就失去发芽能力^[12]。乔士义等^[6]人工培养下的毛竹新鲜花粉发芽率为 32.6%, 而花粉在柱头上的萌发比人工培养的更快。因此, 花粉萌发率可能受实验方法和实验条件的影响, 而且在不同的花期受季节的影响花粉生活力也会有所不同。

前人在竹子花粉发育研究中的用词和术语不够统一。如有“单核花粉粒”、“二核花粉粒”、“二胞花粉”、“三核花粉粒”等不同用语, 造成一些混乱。花粉发育包括小孢子发生与雄配子发生两大阶段。虽然小孢子从四分体释放后即可称之为花粉, 但花粉一词更多用于指 2 - 细胞或 3 - 细胞时期的雄配子体, 以与小孢子区别。从小孢子发育至成熟的雄配子体发生 2 次分裂, 第 1 次小孢子核有丝分裂成 2 个子核, 即生殖核和营养核, 接着发生胞质分裂, 在两核中间出现一个弧形的细胞板, 分割成 2 个细胞, 营养细胞和生殖细胞只被 2 层质膜分隔。生殖细胞核的分裂也是正常的有丝分裂, 从生殖细胞形成的 2 个精子, 无论是在花粉粒中或是在花粉管中, 它们都是细胞的结构。因为精细胞体积小, 仅被质膜包围, 细胞质稀少, 在光学显微镜下通常不易分辨^[20], 所以小孢子时期应该是指小孢子形成到小孢子核第 1 次分裂之前, 之后形成二胞花粉以及三胞花粉。

参考文献:

- [1] 朱石麟, 马乃训, 傅懋毅. 竹类植物图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994
- [2] 张光楚, 王裕霞. 竹子育种工作现状及前景[J]. 竹子研究汇

- 刊, 1998, 17(1): 6 - 9
- [3] 邱尔发, 郑郁善, 红伟. 开花和未开花山地麻竹叶片性状比较[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(2): 105 - 108
- [4] 林树燕, 毛高喜. 竹子开花习性和开花竹林的更新[J]. 林业科技, 2007, 32(5): 23 - 25
- [5] Nadgouda R S, John C K, Mascarenhas A F. Floral biology and breeding behavior in the bamboo *Dendrocalamus strictus* Nees[J]. Tree Physiology, 1993, 13: 401 - 408
- [6] 乔士义, 廖光庐. 毛竹的胚胎发育观察[J]. 竹类研究, 1984, 3(1): 15 - 23
- [7] 庞延军, 喻富根, 胡成华, 等. 爬竹雄蕊发育异常的初步观察[J]. 竹子研究汇刊, 1994, 13(4): 42 - 46
- [8] 胡成华, 喻富根, 庞延军. 寒竹胚胎学观察与研究[J]. 竹子研究汇刊, 1994, 13(4): 6 - 11
- [9] 张文燕, 马乃训, 陈红星. 竹类花粉形态及萌发试验[J]. 林业科学研究, 1989, 2(1): 67 - 70
- [10] 黄坚钦, 黄华宏, 何福基, 等. 雷竹的小孢子发生和雄配子体形成[J]. 竹子研究汇刊, 1999, 18(3): 55 - 58
- [11] 王曙光, 普晓兰, 丁雨龙. 巨龙竹生殖器官形态结构及雌、雄配子体的发育[J]. 植物研究, 2006, 26(3): 270 - 274
- [12] Zhang G C. A manual of bamboo hybridization[M]. Leiden, The Netherlands: VSP, 2002
- [13] 邢新婷, 傅懋毅, 肖贤坦. 麻竹开花生物学特性观察及控制授粉的初步研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(6): 103 - 107
- [14] 袁金玲, 傅懋毅, 庄金坤, 等. 几个丛生竹开花授粉特性及麻竹苗期初步选择[J]. 竹子研究汇刊, 2005, 24(3): 9 - 13
- [15] 李正理. 植物组织制片学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1996
- [16] 冯九焕, 卢永根, 刘向东, 等. 水稻花粉发育过程及其分期[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(1): 21 - 28
- [17] 陆文梁, 郭仲琛. 小麦小孢子发生和花粉发育的细胞学观察[J]. 植物学报, 1984, 26(1): 28 - 33
- [18] 周芳纯. 竹林培育和利用[M]. 南京: 南京林业大学《竹类研究》编委会, 1998
- [19] 徐雪宾, Vergara B S, Visperas R M, 等. 对水稻“小孢子收缩期”的进一步观察[J]. 华南农业大学学报, 1987, 8(1): 19 - 24
- [20] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982