

# 桃三倍体种质的花粉形态及萌发特性

王尚德, 王晓川, 刘佳梦, 蒋海月, 武文娟

(北京市农林科学院 农业综合发展研究所, 北京 100097)

**摘 要:**以同起源的二倍体为对照,采用显微测量和离体培养方法,对3份桃三倍体种质的花粉形态及萌发特性进行了观察分析。结果表明:桃三倍体种质的花粉在大小、形态等方面存在巨大差异,花粉粒径大小分布无明显的规律,横径的众数占比约为20.0%~40.0%,远低于二倍体种质的66.0%~76.0%;三倍体种质的花粉萌发率低,仅4.1%~17.5%,而二倍体的萌发率高达60.2%~75.8%;二倍体花粉萌发花粉以体积为 $(67.1 \pm 7.1) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 的正常花粉为主,而三倍体种质‘10-15-23’,‘10-15-16’萌发最多的为体积分布在 $(95.3 \pm 7.1) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 的大花粉。

**关键词:**三倍体;桃;花粉

**中图分类号:**S 662.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0080-05

倍性种质产生的配子在物种的多倍化过程中扮演着重要作用<sup>[1-3]</sup>。一方面,在自然条件下,三倍体桥是物种多倍化的主要途径<sup>[1,3]</sup>。另一方面,通过倍性间杂交培育新的多倍体品种,已成为杨树(*Populus tremula*, *P. tomentosa*)等林木<sup>[4]</sup>,马铃薯(*Solanum tuberosum*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)等作物<sup>[5]</sup>,葡萄(*Vitis vinifera*)、苹果(*Malus* spp.)、柑橘(*Citrus* spp.)等园艺植物育种<sup>[6]</sup>的重要方法之一。倍性种质的配子形态特征、萌发习性等特征是倍性种质的识别、利用的依据,是倍性研究的基础工作<sup>[7-8]</sup>。

桃(*Prunus persica*)是典型的二倍体植物,文献报道的桃倍性种质较少<sup>[9-10]</sup>,尚鲜见桃三倍体种质的花粉形态及生殖特性的研究报道。该研究拟以二倍体种质为对照,对比研究3份桃三倍体种质的花粉变异及生殖特性,评估分析桃三倍性在桃多倍体育种及进化过程中的地位和作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

所有材料均为‘90-24-1×早红珠芽变’杂交组合的子代,2009年杂交,2010年定植于北京市农林科学院农业综合发展研究所顺义高丽营基地。母本‘90-24-1’是

桃‘82-2-8’的自然授粉后代,二倍体,亲本‘82-2-8’起源于桃‘白凤×粉寿星’。父本‘早红珠芽变’是二倍体油桃(*Prunus persica* var. *nectarina*)‘早红珠’的四倍体嵌合体芽变,‘早红珠’起源于‘京玉(大久保×兴津油桃)×A369’。所有种质经过流式细胞术检测倍性。选择其中已连续开花2年的二倍体2份、三倍体3份作为研究对象,选择材料的名称及倍性见表1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 花粉收集 在大蕾期至花瓣张开前采集花蕾,撕开花萼,用解剖针将花药从花丝上剥离,收集在纸盒中,放置在25 W白炽灯下方15~20 cm处烤制12 h,花药开裂,花粉散出后,收集于干燥安培瓶中备用。

1.2.2 花粉观察与粒径测量 干花粉散布于载玻片,在Olympus BX51显微镜下进行形态观察,DP-70数据采集系统进行落射荧光拍照。逐一测量视野范围内的花粉,测微尺测纵径与横径,每份种质至少3个视野,二倍体、三倍体分别统计100粒和200粒以上。粒径测量结果手工统计,换算成百分率后,用Excel作分布柱状图。

1.2.3 萌发试验与统计 花粉接种于含10%蔗糖、0.5%琼脂的平板培养基上,置于放有吸足水分滤纸的12 mm培养皿中,25℃条件下培养3 h,统计花粉萌发率(萌发率=萌发花粉数/观察花粉总数)。每个品种观察5个以上的不同视野。以不同的接种批次为重复,每份种质重复3次。

1.2.4 花粉体积 花粉在显微镜下观察,利用测微尺测量花粉的纵径与横径,二倍体统计3个视野共计100粒

**第一作者简介:**王尚德(1976-),男,硕士,副研究员,现主要从事果树学和细胞遗传学等研究工作。E-mail:shangdee@163.com.

**基金项目:**北京市农林科学院青年基金资助项目(QNJJ201306);北京市农林科学院科技创新能力建设专项资助项目(KJCX20140108);科技基础性工作专项资助项目(2013FY111700-2)。

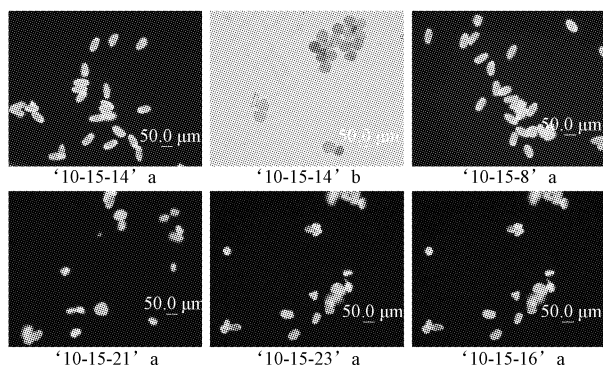
**收稿日期:**2015-02-03

以上花粉,多倍体统计 300 粒以上。用以下公式计算吸胀花粉体积: $V=1/6 \times \pi \times a^2 \times b$ ,式中, $a$  为横径, $b$  为纵径, $\pi=3.14$ ,吸胀花粉体积分布图以二倍体种质‘10-15-8’的统计结果为基础标准,以众数  $67.1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  为中值,以标准差  $7.1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  作为分级依据,在 Excel 中进行频次统计和次数分布图绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 干花粉形态、大小

二倍体种质的花粉大小、形态一致,而三倍体花粉的形态、大小存在巨大差异。从图 1 可以看出,二倍体种质‘10-15-14’和‘10-15-8’的花粉均呈规则的椭球体,沿长轴方向具三萌发沟,自发荧光强度较一致。而三倍体种质‘10-15-23’、‘10-15-16’、‘10-15-21’的花粉形状多样,除较多的椭球体外,还有大量四面体、台状、球状及不规则形状;花粉沟也 3 条、4 条等多种。自发荧光强度不一。



注:a:干花粉;b:吸胀花粉。

Note:a:dry pollen;b:swollen pollen.

图 1 桃不同种质的花粉形态

Fig. 1 Pollen shape of different peach germplasm

干花粉的纵、横径分布统计如图 2 的 A 列所示,从粒径的分布可以看出,二倍体种质的干花粉较为一致,花粉的大小呈现较明显的正态分布,且众数占比较大。‘10-15-14’和‘10-15-8’的干花粉横径众数均为  $30 \mu\text{m}$ ,占总体的百分比分别为 75.0%和 76.0%;纵径众数为  $60 \mu\text{m}$ ,占比分别为 48.0%和 47.5%。

三倍体的粒径变化较大,分布规律不明显,横径呈现较为分散的正态分布,众数占比较低,‘10-15-16’、‘10-15-23’、‘10-15-21’3 份种质的众数分别为 35、35、 $30 \mu\text{m}$ ,占比分别为 25.0%、40.0%、34.0%,明显低于二倍体的水平。干花粉纵径分布规律不明显,‘10-15-23’呈正态分布,众数  $55 \mu\text{m}$ ,占比 24.0%,‘10-15-16’和‘10-15-21’干花粉纵径分布图均出现双峰,‘10-15-16’双峰的位置分别在  $50 \mu\text{m}$  和  $65 \mu\text{m}$ ,占比分别为 18.8%和 27.1%。‘10-15-21’的双峰位置分别在  $40 \mu\text{m}$  和  $55 \mu\text{m}$ ,占比仅为 22.0%和 28.0%。

从粒径的变幅和众数占比来看,与二倍体相比,三倍体种质的花粉大小变异大。三倍体干花粉横径分散在  $20 \sim 50 \mu\text{m}$ ,种质‘10-15-16’的变幅甚至达到  $20 \sim 60 \mu\text{m}$ ,众数占比仅为 25.0%~40.0%;而二倍体种质花粉,干花粉横径变幅为  $25 \sim 40 \mu\text{m}$ ,且众数占比高达 66.0%~76.0%。

### 2.2 花粉萌发习性

不同倍性、不同大小的花粉,在接种到培养基后,迅速吸水膨胀,呈近球体。30 min 后,逐渐有花粉管从萌发沟伸出,之后 1 h 内,随时间延长,萌发率迅速增加;2 h 后,萌发率变化趋缓;3 h 后,萌发率基本不再增加,部分花粉管前端开始破裂。

2.2.1 不同倍性种质花粉总萌发率比较 从整体萌发率来看,不同种质的花粉萌发率差异显著。由表 1 可知,二倍体种质的花粉萌发率存在显著差异,但均较高,分别为 60.2%和 75.8%。三倍体种质的花粉萌发特性差异较大,‘10-15-21’的花粉萌发率达到 17.5%,显著高于‘10-15-23’和‘10-15-16’的 4.1%、4.5%。但与二倍体种质相比,均显著低于二倍体种质花粉的萌发率。

表 1 不同倍性的桃种质的花粉萌发率统计

Table 1 Composition of germination rate of different peach ploidy germplasm

倍性 Ploidy	种质名称 Germplasm	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	均值 Mean
二倍体 Diploid	‘10-15-8’	60.8	58.8	61.02	60.2 b
	‘10-15-14’	73.8	79.1	74.49	75.8 a
三倍体 Triploid	‘10-15-23’	3.7	4.1	4.4	4.1 d
	‘10-15-16’	4.9	4.7	3.8	4.5 d
	‘10-15-21’	22.0	14.5	16.1	17.5 c

注:表中的不同字母表示花粉萌发率的差异达到 5%显著水平。

Note:Different letters show different pollen germination rate significant at 5% level.

2.2.2 不同大小的花粉萌发能力比较 以吸胀花粉的体积统计各种质的萌发花粉及未萌发花粉的分布,如图 2 的 B 列所示,从统计可以看出,不同种质的不同大小直径的花粉的萌发能力存在较大差异。二倍体种质,萌发花粉与花粉总体的体积分布规律保持一致,说明在群体中体积大小占主流的花粉萌发也最多。‘10-15-14’、‘10-15-8’,体积大小在  $(45.96 \sim 74.15) \times 10^3 \mu\text{m}^3$  间的花粉分别占 85.8%和 75.2%,而萌发贡献率分别为 65.19%和 52.93%,即大小范围内的花粉萌发比例为 76.0%和 70.4%。三倍种质,不同种质、不同大小的花粉萌发率差别很大。种质‘10-15-21’萌发花粉体积变化范围广,  $(46.0 \sim 116.5) \times 10^3 \mu\text{m}^3$  范围内的花粉均有萌发,但以  $(46.0 \sim 74.2) \times 10^3 \mu\text{m}^3$  区间的为多。对于种质‘10-15-16’、‘10-15-23’来说,花粉体积接近  $95.3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  的萌发率最高的,萌发花粉占该体积花粉的比例分别达到 21.7%和 17.3%。

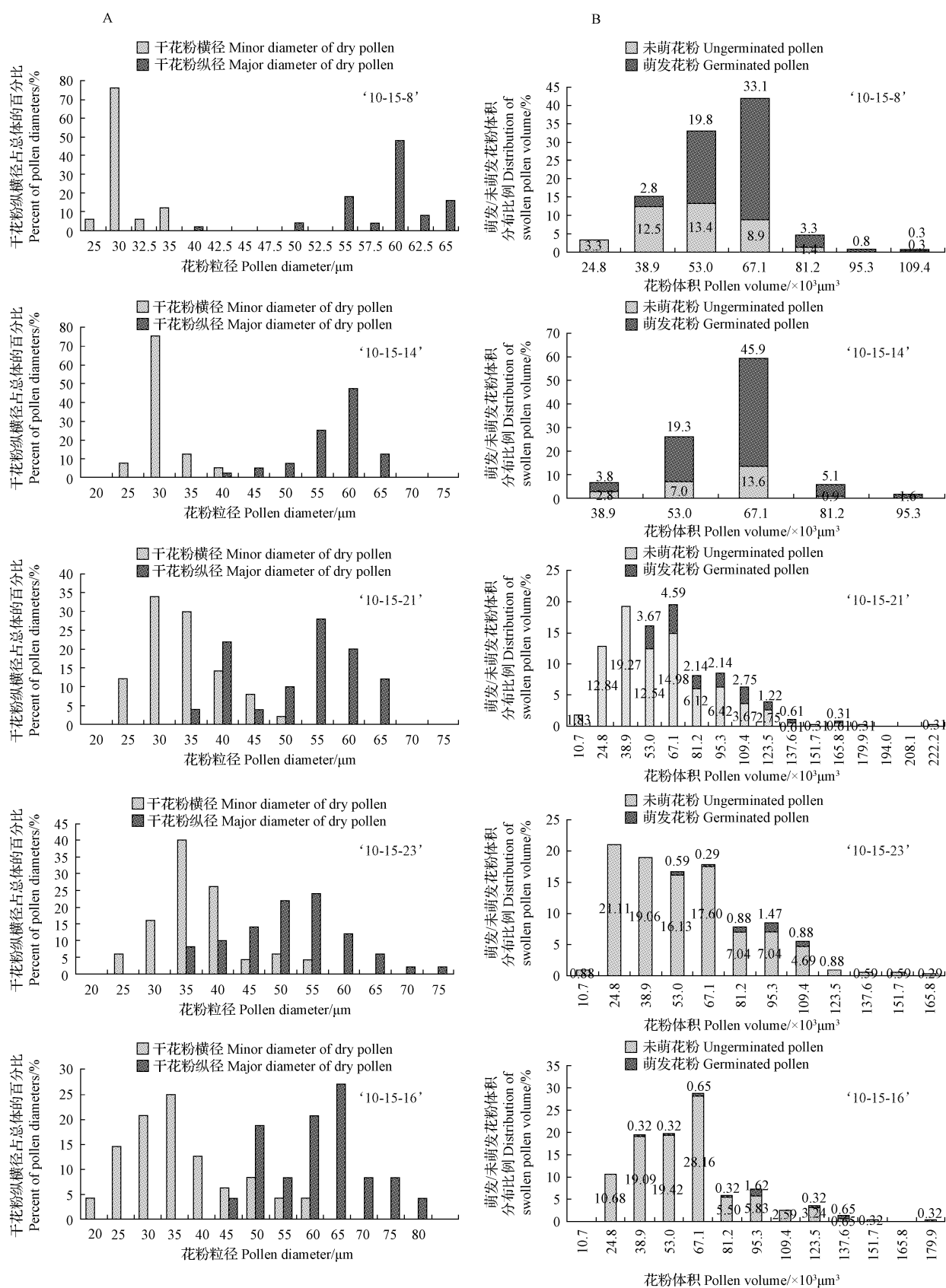


图2 桃干花粉纵、横径及萌发花粉体积分布

Fig. 2 Distribution of dry pollen diameters and swollen pollen volume



值得注意的是,无论是二倍体、还是三倍体,大粒径的花粉也有一些会萌发。二倍体种质‘10-15-14’、‘10-15-8’体积为 $(95.3 \pm 7.1) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 的大粒径花粉萌发贡献率分别为1.6%和0.8%,由于二倍体总体萌发率高,大花粉在所有萌发花粉中占的比例低,仅为2.1%和0.1%;而三倍体种质‘10-15-23’、‘10-15-21’和‘10-15-16’在此范围内的花粉萌发贡献率分别为1.5%、2.1%和1.6%,由于三倍体总体萌发率低,因而大花粉在所有萌发花粉中所占比例分别达到了36.6%、12.0%和35.6%,远高于二倍体。即与二倍体相比,三倍体种质萌发花粉中大花粉占比高。

### 3 讨论

花粉的大小与染色体数目之间存在相关性,因而,可以通过花粉粒径的大小来判断花粉的染色体数,亦可利用花粉粒径的大小来判断亲本的倍性<sup>[8,11-12]</sup>。该研究可知,桃三倍体种质花粉粒径出现了较为广泛的分布,桃三倍体花粉母细胞减数分裂会产生含不同染色体数的花粉。桃二倍体种质的花粉主要分布在 $(67.1 \pm 7.1) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 范围内,因而可以认为 $(67.1 \pm 7.1) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 范围内的花粉应为单倍体( $n=x=8$ )。桃三倍体种质的吸胀花粉,体积分布各不相同,但‘10-15-21’、‘10-15-16’2份种质在 $(67.1 \pm 7.1) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 的花粉仍占比最多,种质‘10-15-23’在该范围内的花粉也较多。因而可以认为桃三倍体种质产生的花粉,单倍性花粉占比最高。

不同物种、不同品系的三倍体种质,小孢子母细胞减数分裂产生的小孢子(或花粉)包含的染色体数目不同。Punyasingh<sup>[13]</sup>在玉米上的研究结果认为三倍体产生的花粉染色体以 $3x/2$ 为主。而在该研究中,桃三倍体种质的吸胀花粉体积分布,出现明显的左偏,说明小于单倍体( $n=x=8$ )的花粉占较高的比例,与玉米有所不同。可能的原因在于在减数分裂过程中,桃三倍体种质产生多分体比例较高,从而导致了每个小孢子中染色体数目的减少。多倍体种质减数分裂产生多分体较为常见,在小金海棠(*Malus xiaojinensis*)<sup>[14]</sup>、黄瓜(*Cucumis sativus*)<sup>[15]</sup>、拟兰芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[16]</sup>等多种植物中都有报道。

三倍体桥是多种植物多倍化的重要途径。这一途径有2个必要条件:一是三倍体能够产生 $2n$ 或其它非单倍体配子,二是三倍体产生的非单倍性配子具有活力。在该研究中,桃的三倍体种质能够产生大小不同的

花粉,其中部分花粉应为非单倍体花粉;从萌发情况来看,各种大小的花粉萌发力均有一定的比例能够萌发。且从统计结果可知,桃的三倍体种质‘10-15-16’、‘10-15-23’萌发的花粉中, $95.3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 粒径大花粉占比远高于二倍体,即三倍体种质‘10-15-16’、‘10-15-23’的花粉中,大花粉更有机会参与授粉受精,在桃的多倍体化进程中具备‘桥’的潜力。

### 参考文献

- [1] Ramsey J, Schemske D W. Pathways, mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants[J]. Annu Rev Ecol Syst, 1998, 29: 467-501.
- [2] Sarah P O. The evolutionary consequences of polyploidy[J]. Cell, 2007, 131: 452-462.
- [3] Husband B C. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations[J]. Biol J Linn Soc Lond, 2004, 82: 537-546.
- [4] 康向阳. 林木多倍体育种研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(4): 70-74.
- [5] Zeven A C. Polyploidy and domestication: the origin and survival of polyploids in cytotype mixtures/in: polyploidy biological relevance[M]. Plenum Press, New York, 1980: 385-407.
- [6] 王同坤, 张京政, 齐永顺, 等. 我国果树多倍体育种研究进展[J]. 果树学报, 2004, 21(6): 592-597.
- [7] Nico de Storme, Linda Z, Martin M, et al. Volume-based pollen size analysis: an advanced method to assess somatic and gametophytic ploidy in flowering plants[J]. Plant Reprod, 2013, DOI 10.1007/s00497-012-0209-0.
- [8] Jacob Y, Pierret V. Pollen size and ploidy level in the genus *Rosa*[J]. Acta Hort, 2000, 508: 289-292.
- [9] 李绍华. 桃树学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [10] Monet R, Bassi D. Classical genetics and breeding/the peach, botany, production and uses [M]. London, CABI, 2008: 61-84.
- [11] Jansen B, Vonbothmer R. Pollen size in *Hordeum L.* - correlation between size, ploidy level and breeding system[J]. Sex Plant Reprod, 1994, 7: 259-263.
- [12] Katsiotis A, Forsberg R A. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*[J]. Euphytica, 1995, 83: 103-108.
- [13] Punyasingh K. Chromosome numbers in crosses of diploid triploid and tetraploid maize[J]. Genetics, 1947, 32(6): 541-554.
- [14] Wang L, Han D G, Gao C, et al. Paternity and ploidy segregation of progenies derived from tetraploid *Malus xiaojinensis*[J]. Tree Genetics and Genomes, 2012, 8: 1469-1476.
- [15] Diao W P, Bao S Y, Jiang B, et al. Cytological studies on meiosis and male gametophyte development in autotetraploid cucumber[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(2): 373-376.
- [16] Lazar M S, Tholath, de Storme N, et al. A screen for the identification of male meiotic mutants based on pollen size[J]. Acta Horticulturae, 2012, 961: 503-509.

## Pollen Morphology and Germination Characteristics of Peach Triploid Germplasms

WANG Shang-de, WANG Xiao-chuan, LIU Jia-shen, JIANG Hai-yue, WU Wen-juan

(Institute of Agricultural Integrated Development, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

DOI:10.11937/bfyy.201512023

# 温郁金 SCoT-PCR 反应体系的正交优化

陈 喆, 冯尚国, 王 振, 何仁锋, 姜梦莹, 王慧中

(杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江省药用植物种质改良和质量监控重点实验室, 浙江 杭州 310036)

**摘 要:**以温郁金为试材,运用  $L_{25}(5^6)$  正交设计在 5 个水平上对影响温郁金 SCoT-PCR 反应的模板 DNA、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq 酶和引物 5 个因素进行优化试验,对 PCR 结果进行极差分析。建立并优化温郁金的目标起始密码子多态性-聚合酶链式反应(SCoT-PCR)体系,以为温郁金的遗传多样性分析及分子鉴定等研究提供技术支持。结果表明:建立了温郁金 SCoT-PCR 的最佳反应体系(20  $\mu$ L):引物 0.8  $\mu$ mol/L,dNTPs 0.4 mmol/L, $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L,Taq 酶 0.5 U,模板 DNA 40 ng,且确定各因素对温郁金 SCoT-PCR 反应效果的影响大小依次为:dNTPs>Taq 酶>引物> $Mg^{2+}$ >模板 DNA,其中 dNTPs 对体系影响最大。优化的温郁金 SCoT-PCR 反应体系在多个温郁金品种遗传多样性研究中得到了验证,结果表现出良好的稳定性、重复性和多态性丰富等特点,可用于今后温郁金品种遗传多样性分析、系统发育分析、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种等研究。

**关键词:**温郁金;SCoT-PCR;体系优化;正交设计

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0084-07

温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)属姜科姜黄属多年生草本植物,主要产于浙江瑞安,是著名的浙八味之一。目前已广泛应用于临床,具有活血止痛、行气解郁、凉血、利胆退黄的功效,实际中主要用

于治疗闭、痛经、胸腹胀痛、刺痛,热病神昏,癲发狂,黄疸尿赤等症<sup>[1]</sup>。近些年研究证明,温郁金还具有调节免疫功能、抑制中枢神经、改善血液流变性、抗自由基损伤等作用<sup>[2]</sup>,同时温郁金的挥发油、姜黄素类成分具有显著的抗癌活性和保肝等作用<sup>[3]</sup>。因此研究温郁金的遗传多样性具有重要的意义,建立温郁金分子标记技术及其体系优化是分析温郁金品种遗传多样性分析、系统发育研究、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种研究等的研究基础。

诸如 RAPD<sup>[4]</sup>、ISSR<sup>[5]</sup>等分子标记在温郁金遗传多样性研究中已经有了初步应用,这些研究为温郁金资源的遗传多样性分析、分子鉴定等研究奠定了一定的基础。但是它们都是传统意义上的随机 DNA 分子标记,同时扩增非编码区域,且普遍存在重复性差等缺陷,使得这类分子标记在应用上存在误差,因而限制了它们的

**第一作者简介:**陈喆(1989-),女,硕士研究生,研究方向为药用植物系统发育。E-mail:8chenzhe@sina.com.

**责任作者:**王慧中(1962-),男,教授,博士生导师,现主要从事药用植物遗传资源等研究工作。E-mail:whz62@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31070298,30870180);浙江省科技计划资助项目(2008C12081);浙江省自然科学基金资助项目(LQ13H280006);浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室开放资助项目(201304);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(ZX13005002067);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(ZX1305002007)。

**收稿日期:**2015-03-19

**Abstract:** By microscopic measurement and *in vitro* germination, pollen morphology and germination characteristics of three triploid germplasms of peaches were observed and analysed, to contrast that of the same origin of diploid of peaches. The results showed that, for triploid, the size and shape of pollen varied between a large scale, no regular mode of the distribution of pollen grain sizes could be drawn, pollen minor diameter mode proportion of triploid ranges in 20.0%—40.0%, far lower than that of diploid, which was 66%—76%; the pollen germination rate of triploid was low, only 4.08%—17.52%, while that of diploid was up to 60.8%—75.8%. Thirdly, most of germinated pollens of diploid peaches were the ones with  $(67.1 \pm 7.1) \times 10^3 \mu m^3$  as their volume, While those of triploid '10-15-23', '10-15-16' were larger pollens in volume  $(95.3 \pm 7.1) \times 10^3 \mu m^3$ .

**Keywords:** triploid; peach; pollen