

‘早籽银桂’大小孢子发育与花器形态变化

董立格^{1a,2}, 丁雨龙^{1b,1c*}

(1. 南京林业大学, a. 生物与环境学院; b. 南方现代林业协同创新中心; c. 竹类研究所, 南京 210037; 2. 南京市花卉公园管理处, 南京 210037)

摘要: 为了解桂花两性株孢子发育和花器形态的关系, 对早籽银桂(*Osmanthus fragrans* ‘Zao Zi Yin’)大小孢子发育过程和花器外部形态进行了观察。结果表明, 圆珠期花芽突然膨大时, 小孢子母细胞减数分裂启动, 至花芽顶壳期进入四分体时期, 四分体多数呈四面体型, 少数呈十字交叉型, 也有介于二者之间的排列方式; 铃梗期时小孢子发育至单核靠边期; 香眼期至盛花期形成二细胞型花粉并发育成熟; 花药长度由 0.3 mm 增加至 1 mm, 颜色由无色透明变为鲜黄色。雌蕊柱头二裂, 子房 2 室, 每室 2 胚珠, 胚珠横生, 单珠被, 薄珠心, 珠柄不明显。二细胞花粉时期, 大孢子母细胞减数分裂形成大孢子, 至盛花期胚囊发育为成熟的 8 核蓍型胚囊。雄蕊发育早于雌蕊, 花开后雌、雄蕊趋于同熟。大小孢子细胞学发育时期与花器形态建成密切相关, 根据花器形态特征可判断大小孢子发育时期。

关键词: 桂花; 孢子发育; 花器

doi: 10.11926/jtsb.3655

Development of Micro- and Mega-spores and Morphology of Floral Organ in *Osmanthus fragrans* ‘Zao Zi Yin’

DONG Li-ge^{1a,2}, DING Yu-long^{1b,1c*}

(1a. College of Biology and the Environment; 1b. Southern Modern Forestry Collaborative Innovation Center; 1c. Bamboo Research Institute, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Nanjing Flower Park Management Office, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to understand the relationship of spore development with morphology of floral organ in *Osmanthus fragrans*, the changes in morphology of floret organ during micro- and megaspores development of ‘Zao Zi Yin’ bisexual plant were observed. The results show that the meiosis of microspore mother cell started when flower bud at ball-shaped stage suddenly expanded, and it came into tetrad stage at top bract stage. Majority of microspore tetrads were tetrahedral, minority were decussate, and others between the two ways. Flower bud was at the bud-pedicel stage, microspore develop to the late uninucleate stage, and flower bud from bud-eye stage to full blooming stage, microspore form 2-celled pollen and mature, the anther length increased from 0.3 mm to 1 mm, color changed from colorless transparent to bright yellow. Pistil stigma two lobed, ovary 2 rooms, each room 2 ovules, amphitropous ovule, unitegmic, tenuinucellate, and funicle was not obvious. During two-cell pollen period, the megaspore mother cell goes on meiosis to form megaspore. To flowering stage, the 8-nuclear sac was mature with polygonum type. The development of stamen was earlier than that of pistils, they tend to mature at the same time after flowering. So, the micro- and mega-sporogenesis had high relation with morphology of floret organs. It was suggested that the micro- and mega-spore development period could be judged according to morphological characters of floral organs.

Key words: *Osmanthus fragrans*; Spore development; Floral organ

收稿日期: 2016-08-15

接受日期: 2016-11-02

基金项目: 江苏省优势学科建设工程项目(PAPD)资助

This work was supported by the Project for Priority Discipline Construction of Jiangsu Higher Education (PAPD).

作者简介: 董立格(1978~), 女, 博士研究生, 工程师。E-mail: 35444126@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: ylding@vip.163.com

桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)是木犀科(Oleaceae)木犀属(*Osmanthus*)著名的香花植物,是一种具有雄全异株繁育系统的木本植物,存在两种性别的植株:两性株(雌、雄蕊均可育)和雄株(雄蕊可育,雌蕊不育)^[1-2]。关于桂花不同品种大小孢子的发育已有一些研究^[3-6],品种间雄蕊的发育规律相似,但对两性株雌雄蕊发育的研究仅见‘籽银桂’^[3-5]。此外,以前的研究仅观察了大、小孢子的发育过程,未分析其与花器官形态变化的相关性。本文以桂花两性株品种早籽银桂(*O. fragrans* ‘Zao Zi Yin’)为材料,对桂花两性花大、小孢子发生发育的过程进行了详细研究,分析了大、小孢子发育时期与花器官形态和花期物候的相关性,为由花的外部形态变化直接判断大、小孢子的发育时期提供科学依据,为桂花花药培养、胚胎发育以及遗传育种等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验树种为桂花银桂品种群中的早籽银桂(*Osmanthus fragrans* ‘Zao Zi Yin’),花两性,雌、雄蕊均可育^[1],种植于南京林业大学校园内,树高约 4 m,冠幅 3~5 m,孤植,生长势优良。采集不同发育时期的花芽或小花为材料。

1.2 方法

2013 年 8 月初花芽进入圆珠期^[7-8],每 1~3 d 采样 1 次;从圆珠期花芽进一步膨大开始至花谢期,每 3 h 采样 1 次。采样时从树冠中上部外围不同方向选择生长良好且中等长度的当年生枝条,取自顶端向下第 2~3 节叠生芽(花序)中最上位花芽(花序小花)。小孢子发生发育过程的观察采用压片法,花芽经 1%醋酸洋红溶液或卡宝品红染色,显微观察拍照;大孢子发生发育过程的观察采用石蜡制片法,样品经 70% FAA 固定 24 h 以上,爱氏苏木精整体染色,切片厚度为 8 μm ,加拿大树胶封片,显微观察拍照^[9]。取样同时记录拍照开花物候期,以及花序、花蕾、雌雄蕊的大小、颜色等形态特征。

2 结果和分析

2.1 小孢子发生

‘早籽银桂’花一般有雄蕊 2 枚,花药四室。花

药花粉囊内的小孢子母细胞在减数分裂之前以及减数分裂前期细胞间黏性较大,压片时不易分散,显微镜下观察常为大的细胞团状态,细胞核较大,细胞质浓厚,细胞形状为不规则球形,被胼胝质包围,形态与花药壁细胞有明显差别(图 1: A),药壁表皮细胞染色浅,多呈透明状,之后表皮细胞表面形成条纹状纹饰结构;绒毡层细胞为不规则多边形,单核或双核,压片后细胞易分散开。

进入减数分裂期,胼胝质壁逐渐加厚,小孢子母细胞变为圆球形且彼此易分离,经历减数分裂前期、中期、后期、末期(图 1: B~E)。减数第二次分裂(图 1: F~H)形成四分体,4 个小孢子排列方式多数为四面体型(图 1: I~J),少数为十字交叉型(图 1: K~L),还有一部分排列方式为介于二者之间的不规则空间排列(图 1: M~O)。四分体形成初期,4 个小孢子形状不规则,四分体空间结构不明显(图 1: I, K);之后小孢子逐渐变圆(图 1: J, L)。整个四分体被厚厚的透明胼胝质包被,至此,胼胝质壁最为发达,形状不规则。

对同一花序中不同小花的不同花药分别压片观察,同一花药的 4 个药室发育同步或不同步(图 1: R),同一小花的 2 个花药发育几乎不同步,同一个花序中的小花发育不同步,符合聚伞花序小花发育规律,顶花比侧花先发育,可相差 1 个分裂期。此外,对单枚花药压片观察,在同一位置聚集有不同分裂相(图 1: P~Q),推测同一花粉囊内分裂有不同步现象。

2.2 雄配子体发育

收缩期小孢子已形成 3 个萌发孔(图 2: A),小孢子外壁中的基粒棒和覆盖层在单核居中期明显可见(图 2: B)。随后,小孢子体积增大,细胞质不断液泡化,但未见明显的中央大液泡,可见细胞核贴近细胞壁,即为单核靠边期(图 2: C~D),之后液泡逐渐消失,细胞质逐渐充满整个细胞;小孢子核发生不均等丝分裂形成营养细胞和生殖细胞,形成二细胞型的花粉(图 2: E~G)。

同一花序中的小花发育不同步,同一小花不同花药中花粉粒的形成也不同步,但不同步的时间差较短,因此能在盛花期几乎同时达到成熟。盛花期散粉期间,花粉囊中可见部分花粉母细胞正在进行第一次分裂,发育明显落后,即花粉二型性现象(图 2: H)。

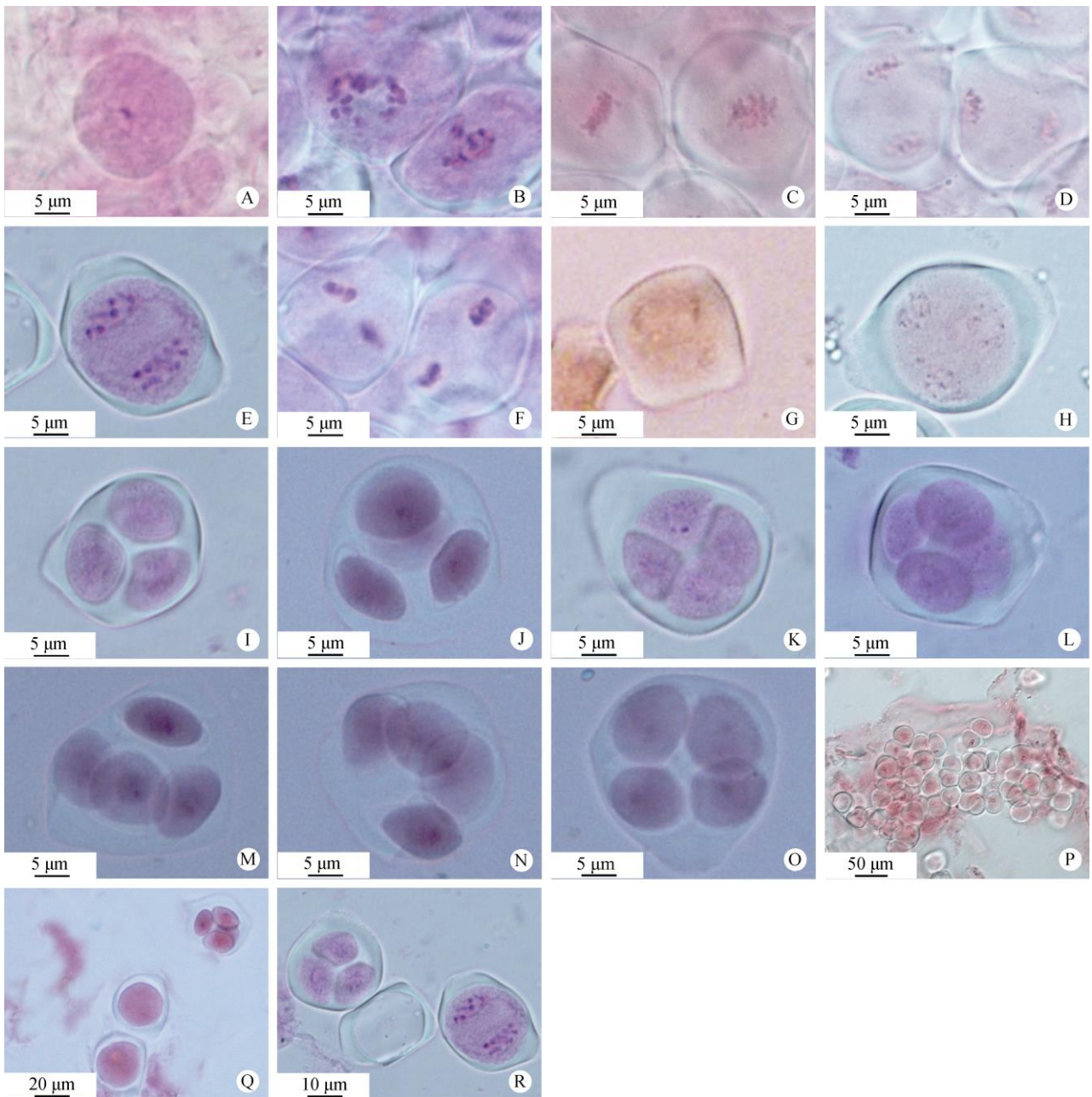


图 1 小孢子发生。A: 小孢子母细胞; B: 前期 I; C: 中期 I; D: 后期 I; E: 末期 I; F: 中期 II; G: 后期 II; H: 末期 II; I: 四面体型四分体形成初期; J: 四面体型四分体立体化; K: 十字交叉型四分体形成初期; L: 十字交叉型四分体立体化; M~O: 介于四面体型和十字交叉型之间的四分体; P: 疑似同一药室内中期 I 至后期 I 分裂相并存; Q: 疑似同一花粉囊内末期 II 与四分体并存; R: 同一花药不同花粉囊间分裂不同步。

Fig. 1 Microsporogenesis. A: Microspore mother cell; B: Prophase of meiosis I; C: Metaphase I; D: Anaphase I; E: Telophase I; F: Metaphase II; G: Anaphase II; H: Telophase II; I: Tetrahedral tetrad at early formation stage; J: Stereo-structure of tetrahedral tetrad; K: Decussate tetrad at early formation stage; L: Stereo-structure of decussate tetrad; M~O: Tetrad arranged from tetrahedral to decussate; P: Suspect metaphase I and anaphase I coexist in the same pollen sac; Q: Suspect telophase II and tetrahedral tetrad coexist in the same pollen sac; R: Asynchronous meiosis phenomena among different pollen sac in the same anther.

2.3 大孢子发生

桂花两性花小花具雌蕊 1 枚, 柱头头状, 二裂, 具明显乳突, 子房由 2 心皮组成, 合生, 二室, 每

室有 2 胚珠, 中轴胎座(图 3: A, U); 胚珠发育过程中保持特定形态, 没有明显弯曲, 为横生胚珠, 珠柄不明显, 几乎贴生于胎座上(图 3: A)。胚珠发育

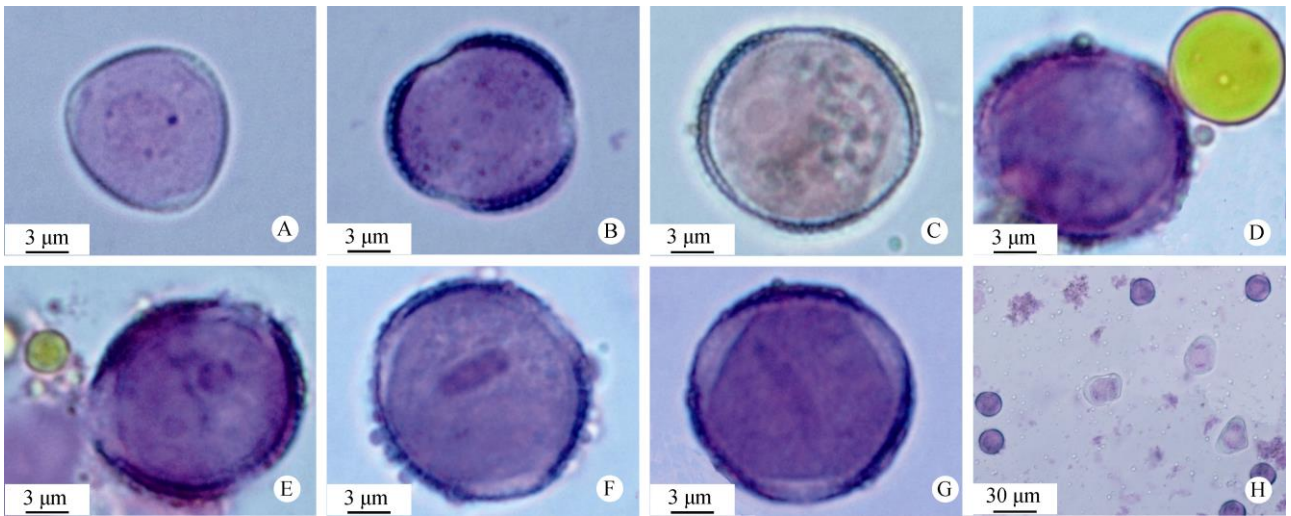


图 2 雄配子体发育。A: 收缩期小孢子; B: 居中期小孢子; C~D: 单核靠边期; E: 二细胞花粉, 生殖细胞为圆球形; F~G: 生殖细胞逐渐变形为纺锤形, 花粉粒成熟; H: 花粉二型性。

Fig. 2 Development of male gametophytes. A: Systolic microspore; B: Middle microspore; C~D: Late uninucleate stage; E: Two-cell pollen, generative cell round; F~G: Generative cell deform gradually to spindle, pollen mature; H: Pollen dimorphism.

成熟后, 可见珠心、珠孔、合点和珠被, 单珠被, 薄珠心。

雌蕊孢原细胞位于珠孔端珠心表皮下第一层细胞, 孢原细胞直接发育为大孢子母细胞。在珠心发育的同时, 珠被发育并逐渐包围珠心, 单珠被自珠心基部发生, 顶端有 1 珠孔。大孢子母细胞进行减数分裂(图 3: B~D), 在胚囊内成一字型排列(图 3: E~F)或并列的二分体(图 3: G), 以及一字型排列或近一字型排列的四分体(图 3: H~I)。合点端的大孢子发育为功能大孢子, 其余 3 个逐渐退化(图 3: J~L)。

2.4 雌配子体发育

胚囊发育类型为典型的八核蓼型胚囊。功能大孢子伸长膨大, 发育为单核胚囊(图 3: M), 经过 3 次有丝分裂分别形成二核胚囊(图 3: N)、四核胚囊(图 3: O)和八核蓼型胚囊(图 3: P), 即 3 个反足细胞、2 个极核构成中央极核、2 个助细胞和 1 个卵细胞(图 3: Q)。整个分裂过程中, 胚囊逐渐拉长, 并完成双受精作用(图 3: S~T)。

同一子房内二室四胚珠的大孢子发生发育基本同步。桂花两性花雌蕊 1 个子房内 4 胚珠只有 1 个能发育为种子, 但大孢子发育过程中暂不能确定有败育倾向的胚珠。卵细胞一般为圆形, 但也发现有变形的卵细胞(图 3: R), 可能会成为败育胚珠; 苏

木精染色的切片中胚囊内有未染色的胚珠, 可能为败育胚珠。

在胚囊发育过程中, 在子房室与胚珠之间的空隙常可见异常结构, 染色极深, 近长椭圆形, 外周组织致密, 不可辨细胞结构, 内部具细胞结构(图 3: V)。子房室内有此异常结构的, 胚珠在胚囊发育前期未见受影响, 但受精后的发育尚待进一步观察。此结构疑似为病理性结构, 其来源、自身的发育、以及对胚珠发育的影响尚待研究。

2.5 不同花期物候的花器管形态

两性花雌雄配子体发育过程中, 花器官的形态、大小、颜色等均发生有规律的变化。小花圆珠期呈嫩绿色, 花部可见雄蕊, 花药长度仅约 0.3 mm, 呈白色晶莹透明状; 雌蕊柱头嫩白色, 较小, 尚未形成二裂状, 子房白绿色(图 4: A~B)。顶壳期前, 花芽进一步膨大, 小花由嫩绿色向乳白色转变; 花药长度约 0.6 mm, 仍呈白色晶莹透明状; 雌蕊柱头尚未成熟, 逐渐发育成二裂状锥形(图 4: C~D)。小花顶壳期呈乳白色; 花药长度为 0.8 mm 左右, 药室部分变为黄白色; 雌蕊外部形态变化不大(图 4: E~F)。桉梗至香眼期, 花药体积稍微增大, 黄色渐深(图 4: G~H); 雌蕊柱头正面呈二裂状, 侧面呈三角锥状, 表面湿润, 晶莹剔透; 子房嫩绿色, 体积也逐渐增大(图 4: I)。初花期, 花药呈鲜黄色, 长度

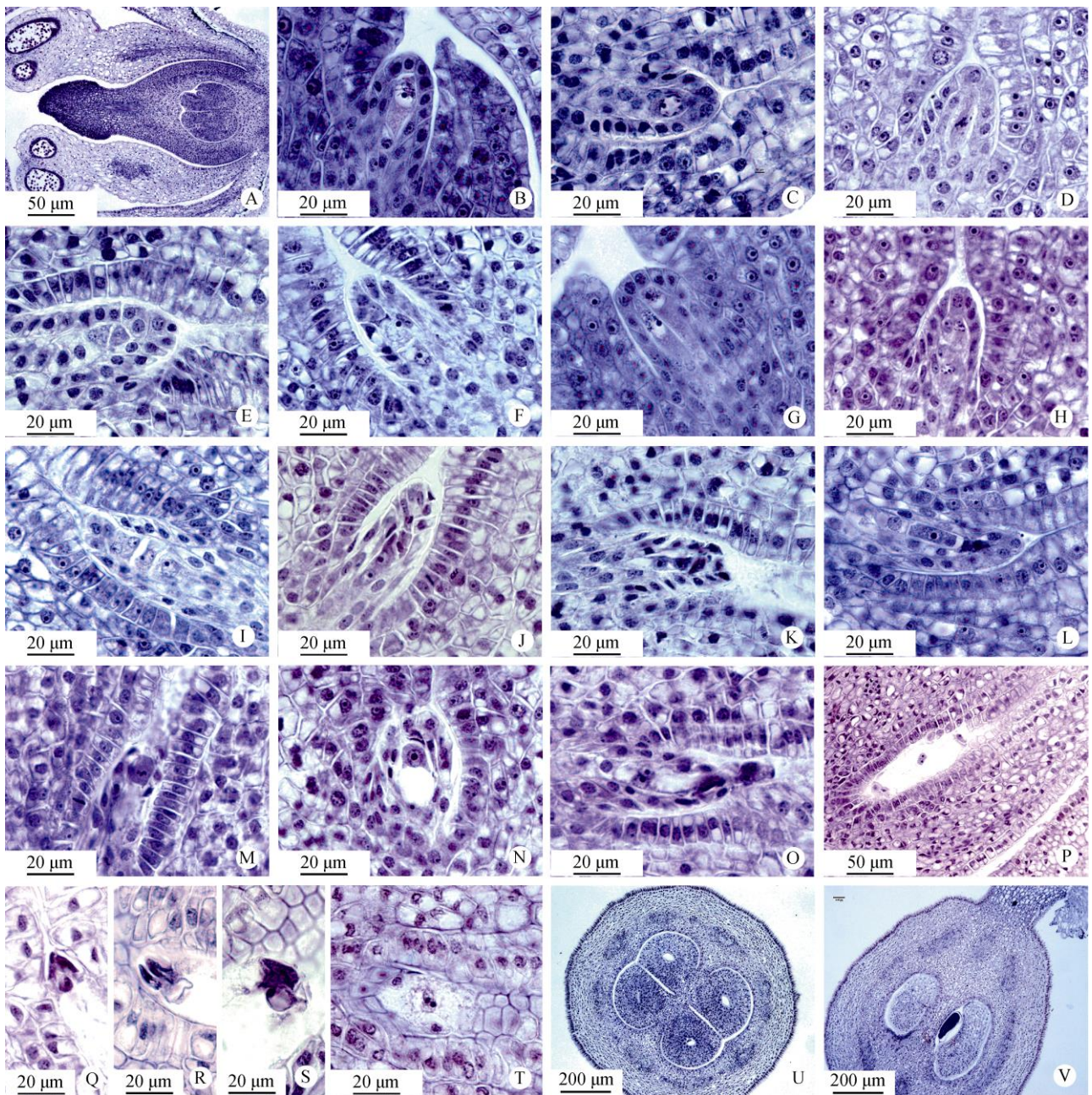


图3 大孢子发生和雌配子体发育。A: 大孢子母细胞时期小花纵切, 示横生胚珠; B~C: 大孢子母细胞分裂前期; D: 大孢子母细胞分裂中期; E~G: 大孢子二分体; H~I: 大孢子四分体; J~K: 珠孔端四分孢子开始解体; L: 功能大孢子; M: 功能大孢子有丝分裂; N: 二核胚囊(另一核未切全); O: 四核胚囊; P: 八核成熟胚囊; Q: 卵器; R: 卵细胞畸形; S: 受精卵; T: 两个极核的融合; U: 子房横切, 示4个胚珠, 4个胚囊; V: 异常结构。

Fig. 3 Megasporogenesis and development of female gametophyte. A: Vertical section of floret at megaspore mother cell stage, showing hemitropous ovule; B-C: Prophase of megaspore mother cell; D: Metaphase of megaspore mother cell; E-G: Dyad of megaspore; H-I: Tetrad of megaspore; J-K: Tetrad megaspore at micropylar end began to disintegrate; L: Functional megaspore; M: Mitosis of functional megaspore; N: Two-nucleus embryo sac; O: Four-nucleus embryo sac; P: Eight-nucleus mature embryo sac; Q: Egg apparatus; R: Abnormal egg cell; S: Zygote; T: Fusion of two polar nuclei; U: Transection of ovary, showing 4 ovules, 4 embryo sacs; V: Abnormal structure in embryo sac.

达最大, 为 1 mm 左右, 部分花药内花粉粒成熟, 花药纵裂, 少量花粉粒散出, 粘附在花瓣和柱头上(图 4: J~K); 可见同一小花内两雄蕊花药开裂不同

步现象(图 4: L)。两性花植株的雌蕊柱头等高或稍高于雄蕊, 柱头成熟, 等待授粉, 或已粘附有少量花粉。盛花期, 花粉大量散出, 开裂处粘满黄色花

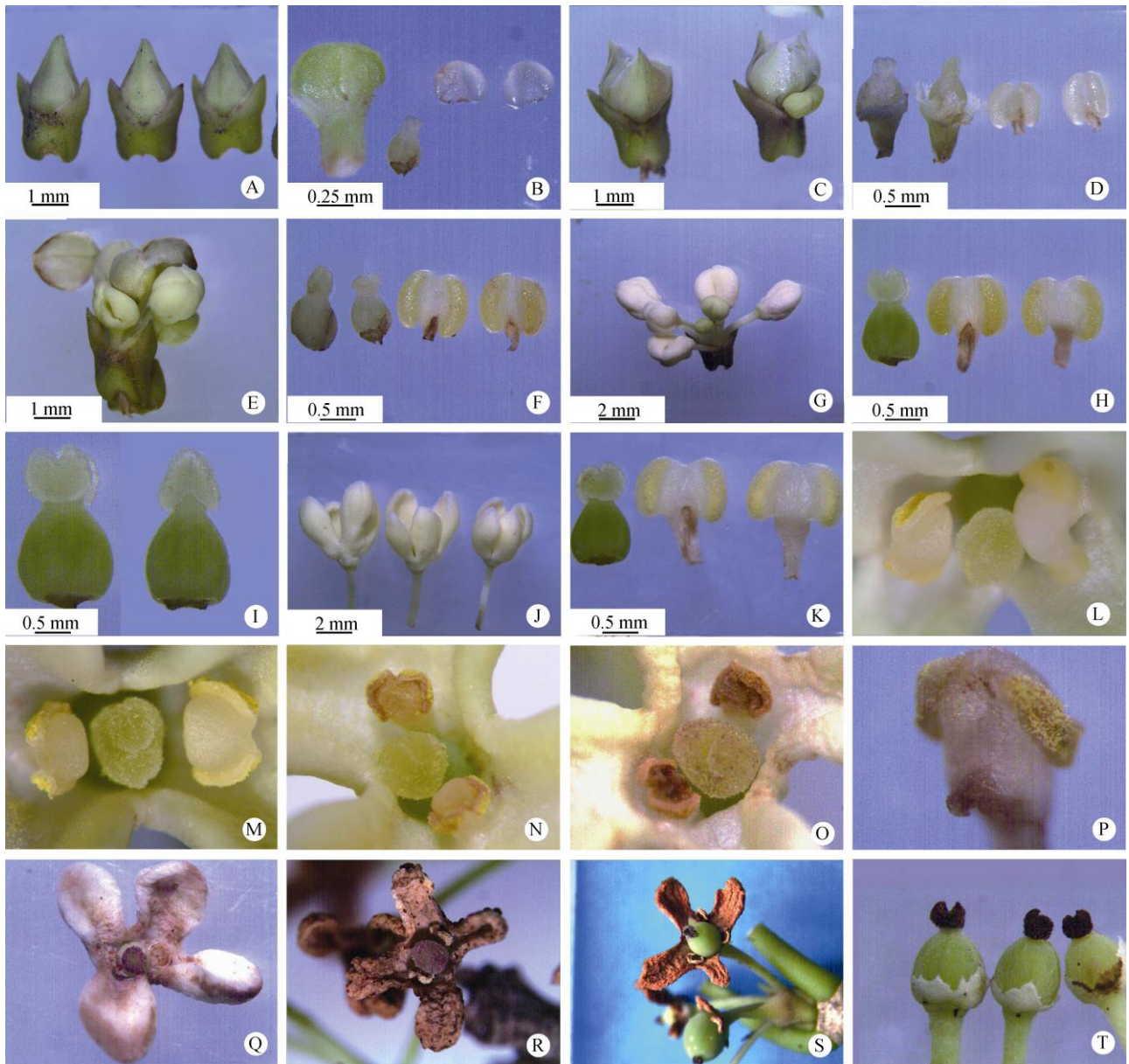


图 4 雌雄蕊发育过程中花器官形态的变化。A: 圆珠期花芽; B: 圆珠期花芽内的小花、雌蕊、雄蕊; C: 圆珠期花芽膨大; D: C 图放大, 示雌雄蕊; E: 顶壳期花芽; F: E 图放大, 示雌雄蕊; G: 铃梗期花序及小花; H: G 图放大, 示雌雄蕊; I: 雌蕊柱头的正面和侧面; J: 初花期小花; K: J 图放大, 示雌雄蕊; L: 初花期同一小花两雄蕊花药开裂不同步现象; M: 盛花期的雌雄蕊; N: 盛花末期的雌雄蕊; O~Q: 花谢期的花器; R~S: 部分花瓣干枯暂不脱落; T: 果实, 花萼宿存。

Fig. 4 Changes in morphology of floral organs during pistil and stamen development. A: Flower bud at ball-shaped stage; B: Floret, pistil and stamens in flower bud at ball-shaped stage; C: Expansion of flower bud at ball-shaped stage; D: Enlargement of Figure C, showing pistil and stamens; E: Flower bud at top bracts stage; F: Enlargement of Figure E, showing pistil and stamens; G: Inflorescence and flower at bud-pedicle stage; H: Enlargement of Figure G, showing pistil and stamens; I: Front and side view of stigma; J: Floret at primary blooming stage; K: Enlargement of Figure J, showing pistil and stamens; L: Two anther in the same floret dehiscence not synchronized at primary blooming stage; M: Pistil and stamen at full blooming stage; N: Pistil and stamen at late-full blooming stage; O-Q: Petals, pistil and stamen at flower fading stage; R-T: Some petals withered not fall off; 20: Fruits, calyx persistent.

粉粒, 花药室逐渐蔫瘪, 药隔成为花药的主要部分; 柱头粘满花粉粒, 部分柱头局部开始变为褐色(图

4: M)。盛花末期, 药隔也变褐蔫瘪; 雌蕊柱头乳突细胞萎蔫并逐渐变为褐色; 花瓣失水萎蔫(图 4: N)。

桂花散粉持续时间较长, 花谢期, 整个花药蔫瘪干枯, 但仍可见花药开裂处粘附少量花粉粒(图 4: O~P); 雌蕊柱头变褐变黑(图 4: Q), 子房继续发育, 花萼宿存(图 4: R~T)。

桂花两性花同一朵小花中雌、雄蕊发育不同步, 雄蕊先发育, 雌蕊发育相对迟缓; 雄花

花粉即将成熟时, 雌蕊大孢子母细胞才开始进行减数分裂, 但雌蕊柱头已成熟, 可以接受授粉; 同时雌蕊后期的发育速度加快, 至花粉落在柱头并萌发长出花粉管深入胚囊时, 胚囊即已发育成熟, 因此可以顺利完成受精, 并最终结实(表 1)。

表 1 桂花两性花雌雄配子体发育与花期物候及花器官形态的关系

Table 1 Relationship between the development of male and female gametophytes of *Osmanthus fragrans* bisexual flower and flowering phenology

花期物候 Flowering phenology	雄蕊发育阶段 Development stage of stamen	雌蕊发育阶段 Development stage of pistil
花芽萌发期 Flower bud bursting stage	次生孢子母细胞发育成小孢子母细胞 Secondary spore mother cell develops into microspore mother cell	胚珠原基 Ovule primordia
圆珠期 Ball-shaped stage		胚珠分化期 Ovule differentiation stage
圆珠期(花芽突然膨大) Ball-shaped stage (flower bud expand suddenly)	小孢子母细胞减数分裂 Meiosis of microspore mother cell	孢原细胞-大孢子母细胞 Sporogonium cell-megaspore mother cell
圆珠期(花芽继续膨大) Ball-shaped stage (Flower bud expand)	四分体 Tetrad	大孢子母细胞 Megaspore mother cell
顶壳期 Top bracts stage	小孢子收缩期 Systole of microspore	
铃梗期 Bud-pedicel stage	单核靠边期小孢子 Late uninucleate stage of microspore	
香眼期 Bud-eye stage	二细胞花粉, 生殖细胞呈圆形, 贴壁或游离状态 Two-cell pollen, germ cell round, adherence cell wall or free	大孢子母细胞减数分裂 Meiosis of megaspore mother cell
初花期 Primary blooming stage	部分花粉成熟, 生殖细胞纺锤形 Part of pollen mature, reproductive cell is spindle shaped	大孢子四分体、二核、四核胚囊 Megaspore tetrad, two nuclear, four nuclear embryo sac
盛花初期 Early-full blooming stage	散粉 Loose pollen	四核胚囊、八核胚囊 Four nuclear embryo sac, eight nuclear embryo sac
盛花期 Full blooming stage		八核胚囊成熟 Eight nuclear embryo sac mature
盛花末期 Late full blooming stage		
花谢期 Flower fading stage		受精 Fertilization
花事終了 End of flowering	—	果实发育 Fruit development

3 讨论

3.1 雄配子体的发育

减数分裂的同步性 桂花为聚伞花序, 花序小花雄蕊的发育顺序与花序的发育顺序相符, 具有不同步性^[3-6]; 同一小花雄蕊、同一雄蕊不同药室小孢子发育也具有不同步性; 同一药室的小孢子母细胞减数分裂基本同步, 但在‘晚银桂’中同一药室也有不同步现象存在^[6]。‘早籽银桂’单枚花药的同一位置聚集有不同分裂相的小孢子, 认为‘早籽银桂’同一药室小孢子母细胞减数分裂也具有不同步性, 其原因有待进一步研究。

小孢子四分体类型 木犀科植物小孢子四分体多为四面体型, 少数为左右对称型, 还未见十字交叉型^[10-13]。‘早籽银桂’小孢子四分体的形成有

一个逐渐立体化变为球形的过程, 这在以往的研究中未提到过, 其发育过程有待进一步观察; 四分体类型有四面体型和十字交叉型, 与‘晚银桂’的观察结果一致^[6], 除这两种类型之外, 还发现有介于二者之间的排列方式, 这些排列方式的存在, 可能是正在发育进行中, 也可能是由于减数分裂过程中纺锤体的排列错位而导致。

3.2 雌配子体的发育特征

‘早籽银桂’子房上位, 中轴胎座, 胚珠多数, 单株被, 薄珠心, 具珠被绒毡层, 单孢原直接发育为大孢子母细胞, 胚囊发育为蓼型等胚胎学特征与‘早籽银桂’一致, 与木犀科水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)、女贞(*Ligustrum lucidum*)、连翘(*Forsythia suspense*)、茉莉花(*Jasminum sambac*)、暴马丁香(*Syringa*

reticulata var. *mandshurica*)等的研究结果一致^[10,14-17]。而‘早籽银桂’胚珠为横生而非倒生,且珠柄不明显,这与张宏伟^[18]和李稚等^[19]观察的胚珠形态一致,而‘籽银桂’的胚珠为倒生型^[3-4],经查阅文献,我们认为这是误判。木犀科植物中除茉莉花为弯生胚珠外,胚珠类型多为倒生或直生,尚未见横生胚珠,这为木犀科系统发育学研究补充了资料^[10,14-17]。

通常桂花子房内的 4 个胚珠只有 1 个能受精并继续发育,其余的退化。‘早籽银桂’雌配子体发育过程中偶见疑似胚珠败育现象,但尚不能确定其在之后的发育中会否逐渐衰退。桂花受精作用及胚胎发育的研究认为,退化胚囊是成熟胚囊未经受精而自行退化的结果,也有少部分胚珠中无胚囊分化或胚囊发育不完全而最终退化的^[20]。

3.3 雌雄配子体发育规律及其与花器官形态变化的相关性

桂花雄株与两性株小孢子发育均可产生可育花粉粒,发育规律基本相似,尚未见明显区别^[6]。两性株雌雄配子体的发育进程相互协调,虽然小孢子先于大孢子发育,但大孢子后期发育加快,至花粉管深入胚囊释放精子时,胚囊发育成熟,顺利完成双受精并结实。可见,雌、雄配子发生及二者成熟所需的时间不同,调节了两性发育的步伐,达到了两性的协调,适于自花传粉^[21]。雄全异株繁育系统是比较罕见的繁育系统,对野生桂花的研究表明,桂花的繁育系统应属功能性的雄全异株,其种群中的雄性植株仅具雄性功能,两性株同时具有雄性和雌性功能^[2]。对桂花品种花芽分化的研究表明两性株和雄株的花芽分化规律是基本一致的^[22-25],但雄株心皮分化晚期雄花两片心皮不愈合,保持叶状结构,形成不育雌蕊;雄性植株的花粉粒可育,作为父本进行杂交后母本正常结实^[18-19],因此,雄性植株仅具雄性功能。据此认为桂花为功能性雄全异株,与对野生桂花繁育系统的研究结果相一致^[2]。

桂花两性花大小孢子发育过程与花器官外部形态之间有着相对稳定的关系:花芽在圆珠期至顶壳期的花药长度从 0.3 mm 增大到 0.7 mm,此时完成小孢子减数分裂,形成四分小孢子;顶壳期至盛花期约由 0.7 mm 增大到 1 mm,颜色由白色晶莹透明状变为鲜黄色,花粉发育成熟并散粉;若以花药培养中小孢子单核靠边期为最佳培养时期,取样应在铃梗期,花梗由青变黄,花药淡黄色,长度约

0.8 mm^[26],而花粉二型性使得在花药培养取材时花药的成熟度上可以有一定的差别幅度^[20]。雌蕊柱头逐渐发育成形,正面呈二裂状,侧面呈三角锥状,表面湿润透明;盛花期花粉成熟后胚囊发育为成熟八核胚囊,随后授粉逐渐变为褐色并失水萎蔫。因此可根据花期物候中花芽或花序小花花蕾、雌雄蕊的形态等即时判断其内部雌雄配子的主要发育阶段,从而为桂花花药培养、单倍体育种等研究奠定基础。

参考文献

- [1] XIANG Q B, LIU Y L. An Illustrated Monograph of the Sweet Osmanthus Cultivars in China [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2008: 17-30,186.
向其柏,刘玉莲.中国桂花品种图志[M].杭州:浙江科学技术出版社,2008:17-30,186.
- [2] HAO R M, ZHAO H B, WANG J H, et al. Observation and study on breeding system of wild *Osmanthus fragrans* [J]. J Plant Resour Environ, 2011, 20(1): 17-24. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2011.01.003.
郝日明,赵宏波,王金虎,等.野生桂花繁育系统的观察和研究[J].植物资源与环境学报,2011,20(1):17-24. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2011.01.003.
- [3] SHANG F D. A study on the biology of *Osmanthus fragrans* Lour. [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2004: 26-30.
尚富德.桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)生物学研究[D].南京:南京林业大学,2004:26-30.
- [4] DONG M F, YUAN W J, SHANG F D. Developments of male and female gametophytes of ‘Ziyingui’, an *Osmanthus fragrans* variety [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin, 2005, 25(4): 770-775. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2005.04.024.
董美芳,袁王俊,尚富德.籽银桂雌雄配子体的发育研究[J].西北植物学报,2005,25(4):770-775. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2005.04.024.
- [5] LI J. Study on the flower bud differentiation of *Osmanthus fragrans* Lour. [D]. Kaifeng: Henan University, 2007: 12-20.
李瑾.桂花花芽分化的研究[D].开封:河南大学,2007:12-20.
- [6] DONG L G, DING Y L, WANG X R, et al. The microsporogenesis and the development of male gametophyte in *Osmanthus fragrans* ‘Wanyingui’ [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2015, 39(4): 44-50. doi: 10.

- 3969/j.issn.1000-2006.2015.04.008.
- 董立格, 丁雨龙, 王贤荣, 等. ‘晚银桂’的小孢子发生和雄配子体发育 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(4): 44-50. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2015.04.008.
- [7] YANG K M. China Osmanthus Anthology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2005: 20-22.
- 杨康民. 中国桂花集成 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 20-22.
- [8] DONG L G, WANG X R, DING Y L. Study on the *Osmanthus fragrans* blooming season phenology [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2014, 38(S1): 51-56. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2014.S1.011.
- 董立格, 王贤荣, 丁雨龙. 桂花花期物候研究 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(S1): 51-56. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2014.S1.011.
- [9] LI H P. Plant Microtechnique [M]. Beijing: Science Press, 2009: 9-39.
- 李和平. 植物显微技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 9-39.
- [10] ZHAN Y G, YIN L H, LIU X M, et al. Development of macrospore and microspore, male and female gametophytes of *Fraxinus mandshurica* Rupr. and its phylogenetic significance [J]. J Beijing For Univ, 2005, 27(5): 42-47. doi: 10.3321/j.issn:1000-1522.2005.05.007.
- 詹亚光, 尹立辉, 刘雪梅, 等. 水曲柳大小孢子发生、雌雄配子体发育及其系统学意义 [J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(5): 42-47. doi: 10.3321/j.issn:1000-1522.2005.05.007.
- [11] GUO F G. Microsporogenesis and the formation of male gametophyte of *Ligustrum lucidum* Ait. [J]. J Yunnan Agri Univ, 1992, 7(2): 71-75.
- 郭凤根. 女贞的小孢子发生和雄配子体形成 [J]. 云南农业大学学报, 1992, 7(2): 71-75.
- [12] CHEN X H, JIANG S, XU K, et al. Microsporogenesis and the formation of male gametophytes in *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl [J]. Acta Sci Nat Univ Nankai, 2007, 40(2): 79-82.
- 陈旭辉, 江莎, 许珂, 等. 连翘的小孢子发生与雄配子体形成 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 2007, 40(2): 79-82.
- [13] ZENG Z, DONG L J, YANG Y, et al. Studies on embryology of *Jasminum sambac* (L.) Aiton.: I. Microsporogenesis and development of male gametophyte [J]. Tea Commun, 2002(1): 14-17. doi: 10.3969/j.issn.1009-525X.2002.01.012.
- 曾贞, 董利娟, 杨阳, 等. 茉莉花胚胎学研究: I. 小孢子发生与雄配子体发育 [J]. 茶叶通讯, 2002(1): 14-17. doi: 10.3969/j.issn.1009-525X.2002.01.012.
- [14] GUO F G. The embryology of *Ligustrum lucidum* Ait. and its bearing on the systematic position of Oleaceae [J]. J Yunnan Agri Univ, 1993, 8(4): 312-316.
- 郭凤根. 女贞的胚胎学及其在木犀科中的系统地位 [J]. 云南农业大学学报, 1993, 8(4): 312-316.
- [15] LIU H X, REN S F, ZHANG C H, et al. Observation of pollination and fertilization process in *Forsythia suspense* [J]. Sci Silv Sin, 2010, 46(9): 45-49. doi: 10.11707/j.1001-7488.20100908.
- 刘红霞, 任士福, 张成合, 等. 连翘授粉受精过程的观察 [J]. 林业科学, 2010, 46(9): 45-49. doi: 10.11707/j.1001-7488.20100908.
- [16] ZENG Z, DONG L J, YANG Y, et al. Studies on embryology of *Jasminum sambac* (L.) Aiton.: I. Megasporogenesis and development of female gametophyte [J]. Tea Commun, 2002(4): 17-19.
- 曾贞, 董利娟, 杨阳, 等. 茉莉花胚胎学研究: II. 大孢子发生与雌配子体发育 [J]. 茶叶通讯, 2002(4): 17-19.
- [17] ZHANG Q Y, ZHENG B J. Studies on megasporogenesis and the development of female gametophyte in *Syringa reticulata* var. *mandshurica* [J]. J Jiamusi Univ Nat Sci, 2008, 26(3): 425-427. doi: 10.3969/j.issn.1008-1402.2008.03.049.
- 张秋艳, 郑宝江. 暴马丁香大孢子发生及雌配子体发育的研究 [J]. 佳木斯大学学报(自然科学版), 2008, 26(3): 425-427. doi: 10.3969/j.issn.1008-1402.2008.03.049.
- [18] ZHANG H W. Pollination biology of *Osmanthus fragrans* Lour. [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013: 26-30, 51-52.
- 张洪伟. 桂花传粉生物学研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2013: 26-30, 51-52.
- [19] LI Z, CHEN J, ZHANG H W, et al. Study on pollen cryopreservation and pollen germination processes of different cultivars of *Osmanthus fragrans* [J]. J Gansu Agri Univ, 2014, 49(1): 99-104, 110. doi: 10.3969/j.issn.1003-4315.2014.01.018.
- 李稚, 陈洁, 张洪伟, 等. 桂花花粉超低温保存和花粉管萌发研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 2014, 49(1): 99-104, 110. doi: 10.3969/j.issn.1003-4315.2014.01.018.
- [20] YANG Q J, HUANG Y W, LI H P. Studies on double fertilization in *Osmanthus fragrans* [J]. J Huazhong Agri Univ, 2001, 20(4): 382-390. doi: 10.3321/j.issn:1000-2421.2001.04.024.
- 杨琴军, 黄燕文, 李和平. 桂花受精作用的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 382-390. doi: 10.3321/j.issn:1000-2421.2001.04.024.

- [21] HU S Y. Reproductive Biology of Angiosperms [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 29–69.
胡适宜. 被子植物生殖生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 29–69.
- [22] WANG C Y, GAO L P, LU D F, et al. A study on morphological differentiation of flower bud of *Osmanthus fragrans* ‘Houban Jingui’ [J]. Acta Hort Sin, 2002, 29(1): 52–56. doi: 10.3321/j.issn:0513-353X.2002.01.012.
王彩云, 高莉萍, 鲁涤非, 等. ‘厚瓣金桂’桂花花芽形态分化的研究 [J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 52–56. doi: 10.3321/j.issn:0513-353X.2002.01.012.
- [23] CAO J Y. The study on the qualification of floral formation and development of floral organs of *Osmanthus fragrans* [D]. Ji’nan: Shandong University, 2008: 21–44.
曹际云. 桂花不同栽培变种的成花条件及花器官发育的形态解剖学研究 [D]. 济南: 山东大学, 2008: 21–44.
- [24] LI J, DONG M F, SHANG F D. Study on the flower bud differentiation of *Osmanthus fragrans* ‘Dangui’ and *O. fragrans* ‘Ziyingui’ [J]. Chin Bull Bot, 2007, 24(5): 620–623. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2007.05.009.
李瑾, 董美芳, 尚富德. 丹桂和籽银桂花芽分化的研究 [J]. 植物学通报, 2007, 24(5): 620–623. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2007.05.009.
- [25] XU Y C, ZHOU L H, HU S Q, et al. The differentiation and development of pistils of hermaphrodites and pistillodes of males in androdioecious *Osmanthus fragrans* L. and implications for the evolution to androdioecy [J]. Plant Syst Evol, 2014, 300(5): 843–849. doi: 10.1007/s00606-013-0923-6.
- [26] LI Y F, SUN Y H, LI Y. Haploid breeding and its application to forest tree breeding [J]. World For Res, 2016, 29(1): 41–46. doi: 10.13348/j.cnki.sjlyyj.2016.0003.y.
李允菲, 孙宇涵, 李云. 植物单倍体育种及其在林木育种中的应用 [J]. 世界林业研究, 2016, 29(1): 41–46. doi: 10.13348/j.cnki.sjlyyj.2016.0003.y.