

萝卜小孢子发育时期与花器形态相关性分析

梁宝萍¹, 王志勇², 张晓伟², 朱峰¹, 宋全昊¹, 李航³,
王园园⁴, 董帅厅¹, 杨好慧², 苏贺楠²

(1. 驻马店市农业科学院 河南驻马店 463000; 2. 河南省农业科学院蔬菜研究所 郑州 450002; 3. 驻马店市农业对外
合作交流中心 河南驻马店 463000; 4. 驻马店市农业技术推广和植物保护检疫站 河南驻马店 463000)

摘要: 为开展萝卜游离小孢子培养, 获得单倍体, 研究分析萝卜小孢子发育时期的细胞学特征与不同材料、不同花期形态特征的相关性。以 3 个萝卜品种为试材, 采用 DAPI 荧光染色观察萝卜小孢子的发育时期, 并分析不同花期、不同材料对应的小孢子发育时期, 从而能够快速确定在不同花期的最佳选蕾方法。结果表明, 萝卜小孢子发育时期分为四分体时期、单核早期、单核晚期、二核期, 每个阶段特征明显, 单核晚期的特征是形成中央大液泡, 细胞核缩小, 靠近细胞壁。不同萝卜材料在不同的花期, 小孢子发育时期与花器的花蕾长、花药长形态指标差异极显著。最佳取蕾时期的单核靠后期花蕾纵径均值范围: 初花期 3.90~3.99 mm, 盛花期 2.90~3.52 mm, 末花期 2.12~2.32 mm; 花药长范围: 初花期 2.57~2.73 mm, 盛花期 2.26~2.43 mm, 末花期 1.77~2.29 mm; 瓣药比值在 0.97~1.11 之间; 此时期花萼绿色, 顶部展开, 花药黄绿色。可依据以上形态标记指标, 精准选取小孢子培养的花蕾, 开展游离小孢子培养, 从而为成功诱导出单倍体植株奠定基础。

关键词: 萝卜; 小孢子; 发育时期; 花期; 花器形态; 相关性分析

中图分类号: S631.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)06-187-08

Correlation analysis between microspore developmental stage and floral organ morphology in radish

Liang Baoping¹, Wang Zhiyong², Zhang Xiaowei², Zhu Feng¹, Song Quanhao¹, Li Hang³, Wang Yuanyuan⁴,
Dong Shuaiting¹, Yang Haohui², Su Henan²

(1. Zhumadian Academy of Agricultural Sciences, Zhumadian 463000, Henan, China; 2. Vegetable Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China; 3. Zhumadian Agricultural Foreign Cooperation and Exchange Center, Zhumadian 463000, Henan, China; 4. Agricultural Technology Extension, Plant Protection and Quarantine Station of Zhumadian City, Zhumadian 463000, Henan, China)

Abstract: To conduct isolated microspore culture in radish (*Raphanus sativus* L.) for haploid induction, this study investigated the cytological characteristics of radish microspore developmental stages and their correlation with morphological traits across different flowering periods and materials. DAPI fluorescence staining was employed to observe microspore developmental stages. Concurrently, the correspondence between microspore stages and floral organ morphology (bud length, anther length) across various flowering periods and materials was analyzed to establish a rapid method for optimal bud selection. The results demonstrated distinct characteristics at the tetrad, early uninucleate, late uninucleate, and binucleate stages. During the late uninucleate stage, a large central vacuole formed, with the condensed nucleus positioned adjacent to the cell wall. Significant differences existed in microspore developmental stages and corresponding floral morphological indices (bud length, anther length) among different radish materials and flowering periods. Optimal bud selection periods exhibited the following mean morphological ranges. Bud longitudinal diameter: Initial flowering stage: 3.90-3.99 mm, full flowering stage: 2.90-3.52 mm, late flowering stage: 2.12-2.32 mm; anther length: Initial flowering: 2.57-2.73 mm, full flowering: 2.26-2.43 mm, late flowering: 1.77-2.29 mm; petal-to-anther ratio is 0.97-1.11. Buds at the late uninucleate stage displayed green sepals with expanded apices and yellow-green anthers. These morphological indicators provide reliable criteria for selecting buds for isolated microspore culture, establishing a foundation for successful

收稿日期: 2025-08-20; 修回日期: 2026-01-23

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系豫北综合试验站(CARS-23-G15); 河南省科技攻关计划(252102110304); 驻马店市重大研发专项(ZMDSZDYF2025002)

作者简介: 梁宝萍, 女, 副研究员, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: liangbaoping888@163.com

通信作者: 张晓伟, 男, 研究员, 主要从事蔬菜育种研究。E-mail: xiaowei5737@163.com

haploid plant induction.

Key words: Radish; Microspore; Developmental stage; Flowering period; Floral organ morphology; Correlation analysis

萝卜(*Raphanus sativus* L.)是十字花科萝卜属一、二年生草本植物。传统育种方式以常规育种为主,纯系稳定需分离 5~6 a(年),不但耗费大量的科研资源,长时间自交会出现自然衰退现象。而游离小孢子培养技术可以快速获得纯合单倍体,加倍后获得纯合且遗传稳定的双单倍体植株(DH),可以明显缩短育种年限,提高育种效率^[1]。DH系都是纯合基因,能把之前掩盖的隐性基因表达出来,扩充杂交亲本筛选的范围,提高目标性状的选择效率^[2]。

研究发现,萝卜游离小孢子培养成功受基因型、植株生长状态、小孢子发育时期、培养方法、培养条件等因素的影响,其中成功构建小孢子培养体系的关键是小孢子发育时期^[3-4]。小孢子只有在特定的发育阶段才能对外界刺激敏感,能诱导其发育为完整的绿苗植株^[5]。大多学者研究发现,单核靠边期最容易诱导小孢子胚状体^[6-8],而实际操作中常因选材时期不当会导致培养失败,因此精准鉴定小孢子发育时期尤为重要。

细胞学观察可以鉴定小孢子发育时期,若每次在接种之前剥开花蕾,镜检小孢子发育时期,十分费时费力,会影响小孢子活力。研究表明,多种蔬菜作物小孢子发育时期的花蕾纵径、花蕾横径、花药长、花瓣长与花药长比值等花蕾形态与小孢子发育时期密切相关,但不同品种(系)发育时期的形态指标有所不同^[9]。龙雯虹等^[10]研究了萝卜花蕾大小与花粉发育的间接关系,未研究花器形态与小孢子发育的直接关联;李丹等^[11]镜检了萝卜不同发育时期,以及与花器官形态的关联性,侧重不同发育时期的特征描述,未建立量化的、稳定的、可用于判断小孢子时期的形态指标,都是静态观察,没有建立形态-时期-花期的联动体系。在前人的研究基础上,通过动态观察萝卜的完整花期进程(初花期→盛花期→末花期)分析花期推进与小孢子发育阶段之间的形态标记节点,以期在不同花期从花器外观形态上判断小孢子的发育时期,揭示花器形态与小孢子发育的对应关系,从而为萝卜小孢子培养获得单倍体植株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2025年3月12日将萝卜营养器官定植于驻马店市农业科学院蔬菜研究所试验基地,常规管理,

直至抽薹。试验材料包括3个萝卜品种,L1青萝卜根为长直筒形,收尾好,水纹较多,肉色较淡;L2青萝卜根为短圆柱形,表皮光滑,皮色亮绿,口感脆甜;L3表皮灰绿,叶丛半直立,羽状裂叶,肉质根长圆柱形,收尾好,肉质翠绿,生食脆甜,耐抽薹,耐贮藏。3份材料均来自驻马店市农业科学院。

1.2 方法

1.2.1 对萝卜花器外观观测 分别在初花期(3月下旬)、盛花期(4月上旬至4月下旬)、末花期(4月下旬至5月上旬)取材。在晴好的上午采摘健壮植株的花蕾,依次取主序、第一分枝、第二分枝上的现蕾。使用游标卡尺测量花蕾的纵径、横径、花药长和宽、花瓣长,肉眼观察并记载内外部形态特征。

1.2.2 对萝卜花器的固定 对3份萝卜材料的不同大小花蕾用无水乙醇与冰醋酸(体积比3:1)在室温下固定24 h,第2天转到75%乙醇中,并存放于4℃冰箱中备用。

1.2.3 对萝卜小孢子发育时期的细胞学观察 用镊子取出花药放在载玻片中央,滴1滴无菌水,用解剖针轻轻按压出花粉粒,再在载玻片上滴1滴DAPI($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)染料,加盖压片,置于黑暗中10 min。用徕卡荧光倒置显微镜在40倍镜下观察,取4个视野,拍摄小孢子不同发育时期的照片。分别在萝卜的始花期、盛花期、末花期随机取不同大小的花蕾10个,3次重复。在不同的视野中以主要发育时期的细胞数来确定发育时期。

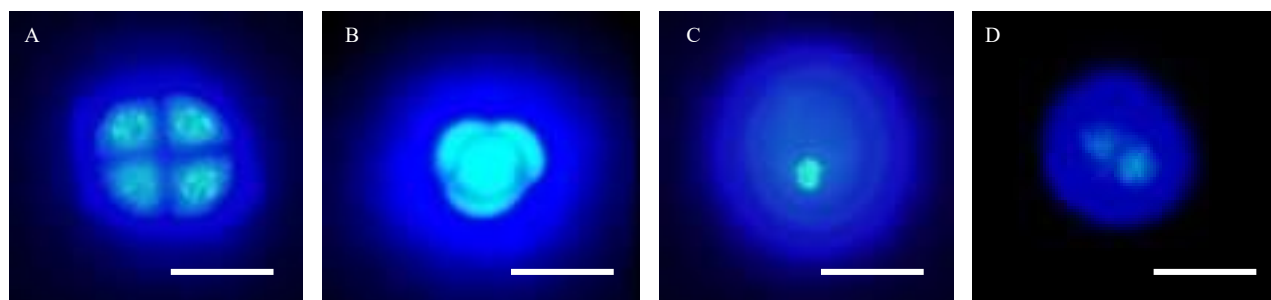
1.3 数据分析

采用SPSS软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 萝卜各发育阶段的细胞学观察

在显微镜下观察不同萝卜小孢子发育的不同时期(图1),小孢子母细胞进入减数分裂,经过两次分裂,形成四分体,并有胼胝体包围,染色后可观察到4个细胞核,进入四分体时期(图1-A)。随着发育进行,胼胝体逐渐消融,四分孢子释放出来,小孢子体积增大,细胞核体积占比较大,位于细胞中央,染色较深,形成3个萌发孔和细胞壁,此时为单核早期(图1-B)。小孢子继续发育膨大,形成中央大液泡,细胞核被挤到一边,细胞核缩小,细胞接近圆形,此时进入单核靠边期(单核晚期)(图1-C)。随着发育的继续,进行第一次有丝分裂,形成2个不



注:A.四分体时期;B.单核早期;C.单核晚期;D.二核期。标尺=10 μm。

Note: A. Tetrads stage; B. Early mononuclear stage; C. Late mononuclear stage; D. Binucleate stage. Scale bar=10 μm.

图1 萝卜小孢子不同发育阶段的细胞学特征(×40)

Fig. 1 Cytological characteristics of radish microspores at different developmental stages(×40)

均等的细胞核,大的松散,染色浅,是营养细胞;小的紧实,染色较深,是生殖细胞。此时是二核期(图1-D)。

3份萝卜材料小孢子不同发育时期对应的花蕾如图2所示。

2.2 萝卜小孢子发育时期在不同花期与花器外部形态指标的相关性

为研究萝卜小孢子发育时期与花器外部形态的相关性,对不同材料、不同花期的萝卜小孢子发育时期的花蕾纵径、横径及纵径/横径进行统计,结果如表1所示。小孢子从四分体时期到二核期的发育阶段,花蕾纵径、横径及纵径/横径均随着发育时期呈持续增长态势。

不同花期对花蕾外部形态有一定的影响,花蕾纵径、花蕾横径及纵径/横径在不同材料间整体上均表现为初花期>盛花期>末花期。同一材料、同一花期的不同小孢子发育阶段,花蕾纵径呈极显著差异,无重叠。处于同一发育时期,在不同花期的花器外部形态均存在差异,但整体规律一致稳定,花蕾纵径变化的关联性稳定。在花蕾纵径、横径及纵径/横径3个指标中,花蕾纵径在不同花期、不同发育时期、不同材料间数值完全不存在重叠,相对独立,因此花蕾纵径是选择发育时期的重要参考标准。

不同材料在不同花期的小孢子处于单核靠边期花器的外部形态指标结果(表1)显示,花蕾纵径均值范围:初花期 3.90~3.99 mm,盛花期 2.90~3.52 mm,末花期 2.12~2.32 mm;花蕾横径范围:初花期 2.08~2.80 mm,盛花期 1.99~2.09 mm,末花期 1.48~1.55 mm。同一材料不同花期,花蕾纵径、横径及纵横比值均有明显差异。其中花蕾纵径在不同花期不存在任何重叠。在不同花期,处于单核靠边期的小孢子,花器纵向与横向生长的协调性相对稳

定。研究结果表明,花期相同时,单核靠边期各材料的花蕾纵径、横径均呈现出相似的数值范围,其中花蕾纵径表现出数值无重叠,再次验证了花蕾纵径作为判断单核靠边期关键指标的可靠性。

2.3 萝卜小孢子发育时期在不同花期与花器内部形态指标的相关性

为研究萝卜小孢子发育时期与花器内部形态的关联性,对不同材料、不同花期在不同小孢子发育时期的花药长和宽、花瓣长、瓣药比进行统计(表2)。结果显示,随着小孢子发育,花器内各项形态指标均呈不断增长的趋势,其间呈显著或极显著差异。

不同花期对花器内部指标有明显影响。在初花期,各发育时期的花药长和花瓣长相对较长,随着花期到盛花期和末花期,相同发育阶段的花药长、花瓣长、瓣药比减小。各材料之间不同花期的花药宽、花瓣长、瓣药比存在差异,但数值存在重叠。

在同一材料同一花期的小孢子不同发育阶段,花药长在各发育时期均无重叠现象。在同一材料的不同花期或小孢子不同发育时期,花药长不存在重叠,而花药宽、花瓣长和瓣药比虽有差异但存在重叠,因此花药长能区分小孢子的不同发育阶段,且关联性稳定,可作为判断小孢子发育时期的依据。

聚焦相同萝卜材料在不同花期的单核靠边期花器的内部形态特征,花药宽和花瓣长差异明显,而花药长和瓣药比差异不明显。不同花期的花药长在相同材料间波动不大,花瓣长表现为初花期长,末花期短。瓣药比反映的是花瓣长度与花药长度比例关系的动态变化,在不同发育阶段瓣药比存在差异。在单核靠边期,瓣药比为 0.97~1.11,几乎近等长。花药长在不同花期的小孢子单核靠边期的数值相对稳定且特异性强,不受花期与材料差异

L1 初花期
Early flowering stage of L1



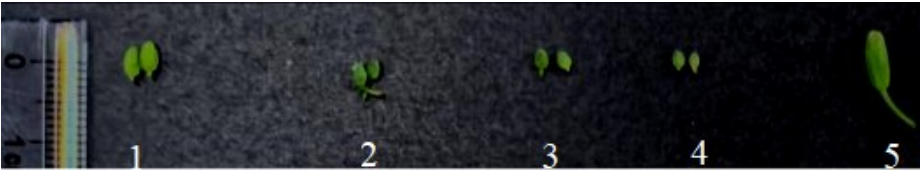
L1 盛花期
Full flowering stage of L1



L1 末花期
Late flowering stage of L1



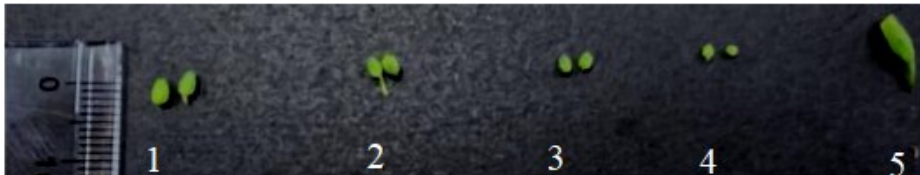
L2 初花期
Early flowering stage of L2



L2 盛花期
Full flowering stage of L2



L2 末花期
Late flowering stage of L2



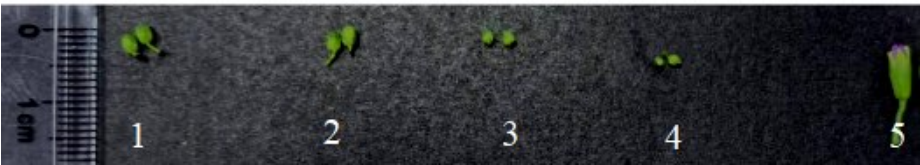
L3 初花期
Early flowering stage of L3



L3 盛花期
Full flowering stage of L3



L3 末花期
Late flowering stage of L3



注: 1. 二核期; 2. 单核晚期; 3. 单核早期; 4. 四分体时期; 5. 次日待开花蕾。

Note: 1. Binucleate stage; 2. Late mononuclear stage; 3. Early mononuclear stage; 4. Tetrads stage; 5. Bud to bloom next day.

图 2 3 份萝卜材料小孢子不同发育时期对应的花蕾

Fig. 2 Flower buds corresponding to different microspore developmental stages of three radish materials

表1 不同萝卜材料在不同花期和不同发育时期花器的外部形态特征

Table 1 External morphological characteristics of floral organs of different radish materials at different flowering stages and developmental periods

材料编号 Material number	花期 Flowering period	发育时期 Developmental stage	花蕾纵径 Bud longitudinal diameter/mm	花蕾横径 Bud transverse diameter/mm	纵横比 Longitudinal-to-transverse ratio
L1	初花期 Early flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.61±0.01 dD	1.32±0.01 dC	1.22±0.05 dD
		单核早期 Early mononuclear stage	2.47±0.11 cC	1.45±0.01 cC	1.70±0.10 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	3.97±0.09 bB	2.08±0.02 bAB	1.91±0.08 bB
		二核期 Binucleate stage	4.49±0.02 aA	2.31±0.02 aA	1.95±0.09 aA
	盛花期 Peak flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.48±0.04 dD	1.13±0.02 cC	1.31±0.08 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	2.14±0.06 cC	1.40±0.02 bB	1.53±0.03 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	3.52±0.04 bB	2.09±0.01 abAB	1.69±0.02 bA
		二核期 Binucleate stage	4.19±0.04 aA	2.21±0.04 aA	1.90±0.05 aA
	末花期 Late flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	0.93±0.05 dD	0.83±0.04 dC	1.13±0.04 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.71±0.06 cC	1.00±0.01 cB	1.71±0.13 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.32±0.08 bB	1.55±0.03 bAB	1.50±0.08 abAB
		二核期 Binucleate stage	3.15±0.19 aA	1.66±0.05 aA	1.90±0.09 aA
L2	初花期 Early flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.70±0.02 dD	1.52±0.02 dC	1.12±0.02 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	2.61±0.04 cC	1.94±0.04 cB	1.35±0.04 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	3.99±0.22 bB	2.80±0.04 bA	1.42±0.09 bB
		二核期 Binucleate stage	4.55±0.04 aA	2.66±0.04 aA	1.71±0.02 aA
	盛花期 Peak flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.44±0.01 dD	1.30±0.02 cC	1.11±0.01 dC
		单核早期 Early mononuclear stage	2.12±0.06 cC	1.51±0.05 cC	1.41±0.05 cB
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.90±0.27 bB	2.03±0.11 bB	1.44±0.05 bB
		二核期 Binucleate stage	3.93±0.05 aA	2.37±0.05 aA	1.66±0.04 aA
	末花期 Late flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	0.91±0.04 dD	0.83±0.06 dD	1.10±0.03 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.54±0.07 cC	1.23±0.06 cC	1.25±0.08 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.12±0.03 bB	1.48±0.04 bB	1.42±0.05 aA
		二核期 Binucleate stage	3.09±0.03 aA	2.02±0.07 aA	1.53±0.04 aA
L3	初花期 Early flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.51±0.06 dD	1.32±0.05 dC	1.15±0.06 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	2.09±0.04 cC	1.58±0.02 cC	1.32±0.02 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	3.90±0.37 bB	2.22±0.08 bB	1.73±0.08 aA
		二核期 Binucleate stage	4.08±0.06 aA	2.55±0.04 aA	1.62±0.05 aA
	盛花期 Peak flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.26±0.06 dD	1.13±0.05 dD	1.12±0.07 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.98±0.04 cC	1.68±0.04 cC	1.21±0.02 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	3.12±0.42 bB	1.99±0.02 bB	1.58±0.15 aA
		二核期 Binucleate stage	3.85±0.02 aA	2.44±0.04 aA	1.57±0.05 aA
	末花期 Late flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	0.92±0.01 dD	0.83±0.01 dD	1.11±0.02 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.22±0.04 cC	1.00±0.02 cC	1.22±0.01 bB
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.13±0.06 bB	1.51±0.03 bB	1.41±0.03 aA
		二核期 Binucleate stage	2.75±0.07 aA	1.83±0.03 aA	1.50±0.04 aA

注:不同小写字母表示同一品种在不同发育阶段差异显著($P<0.05$);不同大写字母表示同一品种在不同发育阶段差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference between different developmental stages of the same cultivar($P<0.05$), while different uppercase letters indicate extremely significant difference($P<0.01$). The same below.

的影响,能稳定反映出该发育阶段的特征。比较而言,花瓣长虽在单核靠边期有明显变化,但易受花期的影响,难以作为单一稳定的判断依据。单核靠边期在初花期的花药长为 2.57~2.73 mm,盛花期为

2.26~2.43 mm,末花期为 1.77~2.29 mm。

由表 3 可知,萝卜的发育时期不同,肉眼可观察到花器内外的形态特征也随之变化。选择单核靠边期萝卜材料时,不仅要选择合适的花蕾大小,

表 2 不同萝卜材料在不同花期和不同发育时期花器的内部形态指标差异

Table 2 Internal morphological indicators difference of floral organs in different radish materials across flowering periods and developmental stages

材料编号 Material numbe	花期 Flowering period	发育时期 Developmental stage	花药长 Anther length/mm	花药宽 Anther width/mm	花瓣长 Petal length/mm	瓣药比 Petal-to-anther ratio
L1	初花期 Early flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.18±0.01 dD	0.58±0.01 cC	0.74±0.01 dD	0.62±0.01 dD
		单核早期 Early mononuclear stage	1.62±0.03 cC	0.81±0.01 bB	1.21±0.01 cC	0.75±0.02 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.57±0.05 bB	0.84±0.01 bB	2.66±0.05 bB	1.04±0.01 bB
		二核期 Binucleate stage	2.87±0.04 aA	1.05±0.04 aA	4.18±0.09 aA	1.46±0.02 aA
	盛花期 Peak flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.07±0.04 dD	0.53±0.02 cC	0.56±0.00 dD	0.58±0.02 dD
		单核早期 Early mononuclear stage	1.44±0.02 cC	0.88±0.02 bB	0.96±0.00 cC	0.66±0.01 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.43±0.06 bB	0.90±0.02 bB	2.54±0.01 bB	1.05±0.02 bB
		二核期 Binucleate stage	2.84±0.05 aA	1.33±0.07 aA	3.63±0.05 aA	1.41±0.01 aA
	末花期 Late flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	0.75±0.01 dD	0.43±0.01 dD	0.45±0.02 dC	0.60±0.02 dD
		单核早期 Early mononuclear stage	1.00±0.02 cC	0.73±0.01 bcBC	0.81±0.03 cC	0.81±0.04 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.29±0.06 bB	0.75±0.01 bB	2.28±0.14 bB	1.00±0.04 bB
		二核期 Binucleate stage	2.46±0.01 aA	0.87±0.03 aA	3.06±0.08 aA	1.25±0.03 aA
L2	初花期 Early flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.20±0.01 dD	0.60±0.02 cC	0.83±0.02 dD	0.55±0.02 dC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.73±0.05 cC	0.78±0.02 bB	1.32±0.02 cC	0.77±0.03 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.73±0.03 bB	0.90±0.03 aA	2.80±0.06 bB	1.02±0.01 bB
		二核期 Binucleate stage	2.91±0.00 aA	0.96±0.03 aA	3.91±0.01 aA	1.34±0.00 aA
	盛花期 Peak flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.07±0.00 dD	0.53±0.03 dB	0.74±0.03 dD	0.70±0.03 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.57±0.04 cC	0.73±0.02 cB	1.11±0.02 cC	0.71±0.03 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.26±0.09 bB	0.84±0.01 bA	2.53±0.02 bB	1.10±0.03 bB
		二核期 Binucleate stage	2.80±0.19 aA	0.96±0.03 aA	3.94±0.04 aA	1.27±0.05 aA
	末花期 Late flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	0.72±0.04 dD	0.42±0.03 dC	0.42±0.01 dD	0.58±0.01 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.13±0.02 cC	0.58±0.01 cB	0.72±0.01 cC	0.64±0.01 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	1.91±0.05 bB	0.84±0.01 bA	1.88±0.06 bB	0.98±0.01 bB
		二核期 Binucleate stage	2.44±0.13 aA	0.92±0.01 aA	3.09±0.04 aA	1.27±0.08 aA
L3	初花期 Early flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.10±0.04 dD	0.47±0.02 dC	0.73±0.04 dC	0.66±0.02 cC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.41±0.04 cC	0.61±0.03 cB	1.08±0.08 cC	0.77±0.07 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.63±0.04 bB	0.90±0.02 bA	2.91±0.17 bB	1.11±0.06 bB
		二核期 Binucleate stage	3.16±0.10 aA	0.98±0.02 aA	4.04±0.09 aA	1.28±0.02 aA
	盛花期 Peak flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	1.07±0.03 dD	0.60±0.03 cC	0.65±0.02 dD	0.61±0.04 dC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.57±0.03 cC	0.66±0.03 cB	1.19±0.04 cC	0.76±0.03 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	2.26±0.08 bB	0.98±0.04 aA	2.29±0.04 bB	1.02±0.04 bB
		二核期 Binucleate stage	2.80±0.12 aA	1.07±0.06 aA	3.55±0.05 aA	1.27±0.05 aA
	末花期 Late flowering stage	四分体时期 Tetrad stage	0.85±0.02 dD	0.43±0.01 dD	0.49±0.01 dD	0.58±0.02 dC
		单核早期 Early mononuclear stage	1.06±0.03 cC	0.55±0.01 cC	0.72±0.01 cC	0.68±0.03 cC
		单核晚期 Late mononuclear stage	1.77±0.02 bB	0.64±0.01 bB	1.72±0.02 bB	0.97±0.01 bB
		二核期 Binucleate stage	2.22±0.05 aA	0.84±0.01 aA	2.63±0.02 aA	1.19±0.02 aA

而且要观察花蕾的外部特征：花萼绿色，顶部展开，花药黄绿色。

3 讨论与结论

萝卜小孢子发育阶段分为四分体时期、单核早期、单核晚期、二核期。离体培养的关键是能精准快速判断小孢子发育时期。本试验能清楚

地判断小孢子的发育时期，观察到细胞核所处位置 and 大小，与其他作物如菜心^[9]、番茄^[12]、红花^[13]、小白菜^[8]上观察到的小孢子发育时期的研究结果类似。

十字花科作物成功培养小孢子的诸多因素中，小孢子发育时期是重要因素^[9]，花器与发育阶段有一定的关联性^[14]，白菜型油菜^[15]、结球甘蓝^[16]、萝卜^[17]

表 3 萝卜花器不同发育时期的形态特征

Table 3 Morphological characteristics of floral organs at different developmental stages in radish

小孢子发育时期 Microspore developmental stage	花蕾外部特征 External characteristics of flower buds	花蕾内部特征 Internal characteristics of flower buds
四分体时期 Tetrad stage	花蕾体积极小,完全包裹内部结构 The flower buds are extremely small; sepals are light green and fully enclose the internal structure	花药浅绿色 Anther is light green
单核早期 Early mononuclear stage	花蕾偏小,仍紧密包裹 The flower buds are small; sepals remain light green and still wrap tightly around the interior	花药浅绿色 Anther is light green
单核晚期 Late mononuclear stage	花蕾体积稍增大,顶部花萼呈轻微展开状态 The flower buds are slightly larger; the top of the sepals begins to show a slightly unfolded state	花药黄绿色 Anther is yellow-green
二核期 Binucleate stage	花蕾较大,顶部花冠打开 The flower buds are significantly larger; the top of the corolla has partially opened	花药黄色 Anther is yellow

小孢子处于单核靠边期诱导效率最高,因此鉴定萝卜游离小孢子单核靠边期尤为重要。

笔者研究 3 份萝卜材料不同花期的不同小孢子发育时期,又再次聚焦萝卜单核靠边期花器内外性状指标,结果表明,判断单核靠边期的重要形态量化指标为花蕾纵径和花药长。李丹等^[1]对 4 份萝卜材料研究发现,小孢子的发育时期与花器官形态特征之间存在相关性,花蕾纵径、花蕾纵横比、花瓣长及瓣药比可作为不同材料花蕾取样的鉴定指标,与本研究结果的花蕾纵径有一致性,其他结果与本研究结果不一致。这可能是本研究增加了不同花期的处理,在时间形态标记上存在差异,研究结果较为系统,造成了结果的不一致。本研究判断小孢子单核靠边期的形态指标是:初花期花蕾纵径 3.90~3.99 mm,盛花期 2.90~3.52 mm,末花期 2.12~2.32 mm;花药长的范围初花期 2.57~2.73 mm,盛花期 2.26~2.43 mm,末花期 1.77~2.29 mm。瓣药比介于 0.97~1.11 之间,几乎近等长。李丹等^[1]研究表明,单核靠边期的鉴定指标为花蕾纵径范围 2.99~3.51 mm,瓣药比在 0.92~1.06,与本研究的盛花期相关指标高度吻合,说明这些指标在不同材料中具有一定的稳定性,可以作为鉴定指标。

笔者在本研究中发现,萝卜初花期、盛花期、末花期的单核靠边期花器形态指标存在动态变化,这种动态变化可能与植株生育周期中营养分配或激素水平变化有关。曾爱松等^[18]研究结球甘蓝在初花期、盛花期、末花期游离小孢子出胚率,发现易出胚的材料对花期不敏感,而对于难出胚的材料取材时期在初花期和盛花期中期容易出胚。进一步提示在萝卜小孢子培养中,材料诱导难度较高的,可

优先选择初花期至盛花期的花蕾,末花期花器形态指标明显减小,可能与小孢子活力下降有关。生产中应避免在末花期取样,以防诱导效率降低,诱导难度低的材料可以取整个花期的材料,结合形态指标精准取样。这种花期-材料特性-形态指标的多维关联,为精准化取样提供了理论支撑。

在利用不同遗传背景和不同花期材料创制单倍体时,应选择量化指标(花蕾纵径、花药长、瓣药比)与质性特征(花萼颜色、形态、花药颜色)相结合的策略。小孢子发育的时间刻度与细胞生理学相结合筛选出合适的时期,有效地弥补了因遗传背景或环境因素引起的波动,重要的质性特征可作为有效补充,能更精准地筛选单核靠边期材料。

综上所述,笔者从材料特性-花期-形态指标构建取材的动态体系,为不同遗传背景和不同发育阶段的材料提供了差异化取样的依据,有助于在生产中因地制宜差异化取样,形成了一套高效、非破坏性的且快速的判断方法,为构建小孢子培养技术体系奠定了基础。后期应结合分子生物学手段解析小孢子发育协同变化的网络调控因素,进一步探索小孢子发育的相关性及其发育方向,从而提高小孢子单倍体植株诱导率。

参考文献

[1] 庞强强,周曼,蔡兴来,等.菜心小孢子胚再生体系优化及植株倍性鉴定[J].分子植物育种,2021,19(14):4745-4751.

[2] 陈劲枫.植物组织培养与生物技术[M].北京:科学出版社,2018.

[3] 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发生的影响[J].华北农学报,1993,8(4):1-6.

[4] 张琨,殷丽丽,韩志平,等.黄花菜小孢子发育时期与花器官形

- 态的关系[J].沈阳农业大学学报,2020,51(4):482-487.
- [5] 杨博智,周书栋,张祖姣,等.辣椒小孢子发育时期与花器官形态特征相关性分析[J].湖南农业科学,2013(3):1-3.
- [6] 张孟利,张恩慧,许忠民,等.栽培因素影响甘蓝花蕾小孢子发育同步性研究[J].西南大学学报(自然科学版),2018,40(1):9-14.
- [7] 王娜,贾凯,妥秀兰,等.芜菁小孢子培养及其胚状体离体发育过程[J].西北农业学报,2016,25(9):1392-1398.
- [8] 杨延红,姜倩倩,马俊艳,等.小白菜小孢子发育与花器官形态相关性[J].西北农业学报,2020,29(7):1028-1034.
- [9] 庞强强,李德明,周曼,等.菜心小孢子发育时期与花器官形态的相关性[J].热带作物学报,2019,40(1):54-60.
- [10] 龙雯虹,许彬,杨荣萍,等.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):54-58.
- [11] 李丹,李锡香,沈镡.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[J].中国蔬菜,2008(10):11-15.
- [12] 高慧,李昂,陈双越,等.番茄花粉发育时期与花蕾大小关系的研究[J].延边大学农学学报,2016,38(4):346-350.
- [13] 许兰杰,梁慧珍,余永亮,等.红花花器官形态与小孢子发育时期的关系研究[J].河南农业科学,2021,50(11):55-61.
- [14] 喇燕菲,黄展文,刘可丹,等.四季金花茶小孢子发育及花器官形态的相关性分析[J].分子植物育种,2024,22(17):5787-5794.
- [15] 星晓蓉.白菜型油菜小孢子培养成胚率及植株再生的影响因素[J].西北农业学报,2011,20(7):94-97.
- [16] 苏贺楠,韩风庆,杨丽梅,等.结球甘蓝小孢子培养条件优化及高代自交系胚状体诱导研究[J].中国蔬菜,2018(4):30-36.
- [17] 张丽,王庆彪,郑鹏婧,等.萝卜小孢子培养再生植株及其性状表现[J].西北农业学报,2016,25(9):1386-1391.
- [18] 曾爱松,冯翠,高兵,等.结球甘蓝小孢子培养技术体系的优化研究[J].华北农学报,2010,25(增刊2):40-44.