

柿属植物花粉形态观察及孢粉学研究

胡超琼, 王仁梓, 关长飞, 禹庆峰, 阮小凤, 杨 勇*

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要:【目的】探讨利用孢粉学区分柿属植物种及品种的可能性, 并通过聚类分析探讨其亲缘关系。【方法】利用扫描电镜观察了柿属植物(*Diospyros*) 6个种、栽培柿(*D. kaki*) 11个品种以及同时期的石榴科(*Punicaceae*)的石榴花(*Punica granatum* L.)、罂粟科(*Papaveraceae* Juss.)的虞美人(*Papaver rhoeas* L.)和秃疮花(*Dicranostigma leptopodum*), 以及紫葳科(*Bignoniaceae*)的凌霄花(*Campsis grandiflora*)共21份材料的花粉外部形态。在对花粉形态观察的基础上, 对花粉6个数量性状极轴长(P)、赤道宽(E)、条纹长、条纹宽、萌发沟长和萌发孔大小进行观测, 并进行统计与聚类分析。【结果】石榴花、秃疮花、虞美人以及凌霄花等植物的花粉外壁纹饰呈网状及瘤状突起状, 与柿属植物特殊的谷穗状条纹结构相比有明显差异。其他11个栽培柿品种的花粉外壁纹饰也形态各异, 大小不一。花蕾期的花粉粒普遍比盛开期的花粉粒大, 且条纹也比较宽。盛开期的花粉外壁条纹比较干瘪稀疏, 花蕾期的花粉外壁条纹则比较饱满紧密。此外, ‘华中雄株’、‘襄阳牛心柿’、‘禅寺丸’与‘台湾正柿’等品种均出现了巨大花粉。聚类分析表明了这17种柿属植物的亲缘关系的远近。【结论】柿属植物花粉的表面纹饰与所选的4种非柿属植物相比较有明显差别, 具有一定特异性和稳定性, 可以根据其花粉形态来辨别其是否属于柿属植物; 虽然柿属植物柿花粉形态大体比较类似, 但在花粉外壁纹饰, 花粉粒大小以及形状等方面存在一定差异, 不仅为区分柿科的6个不同的种提供参考, 也可以作为区分柿种下11个不同品种的辅助依据; 同一品种花粉采集时间不同, 其花粉形态也有所区别。此外, 在‘禅寺丸’、‘台湾正柿’等花粉中发现了巨大花粉($2n$ 配子)的存在, 对柿属植物种质创新有重要意义。

关键词: 柿属植物; 孢粉学; 花粉形态; 聚类分析

中图分类号: S665.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)09-1067-12

Pollen morphology observation and palynological studies of *Diospyros*

HU Chaoqiong, WANG Renzi, GUAN Changfei, YU Qingfeng, RUAN Xiaofeng, YANG Yong*

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: 【Objective】*Diospyros* belongs to persimmon family. China has a long history of persimmon cultivation and a rich germplasm resource with 1 058 varieties distributed throughout the country. Because of its nutrient-rich fruit, persimmons are popular. They are also beautiful ornamental trees because of their graceful appearance, beautiful foliage and colorful fruit. The pollen morphology is relatively stable and thus an important criterion for plant classification. With the use of scanning electron microscopy, palynological study has entered a new stage. In this study, experiments were conducted to explore the possibility of distinguishing the species and cultivars of *Diospyros* based on palynological characters and exploring their phylogenetic relationships with cluster analysis. 【Methods】A total of 21 materials including seven *Diospyros* species and eleven cultivars of *D. kaki* and pomegranate flowers, *dicranostigma*, corn poppy and *Campsis grandiflora* flowers were used as the materials. At anthesis, morphology of the pollen surface was observed under scanning electron microscopy (SEM). All the above persimmon materials were collected from the National Field Genebank For Persimmon and the rest materials from the campus of Northwest A & F University. Pollen morphology of *Diospyros* was

收稿日期: 2018-02-01 接受日期: 2018-06-01

基金项目: 农业部种质资源保护项目(2017NWB035); 科技部国家农作物种质资源共享服务平台(NICGR2017-50); 陕西省科技统筹特色产业创新链项目(2016KTTSNY01-06, 2016KTTSNY01-02)

作者简介: 胡超琼, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与生物技术育种。Tel: 18821636925, E-mail: 534425255@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15353590637, E-mail: yang.yong521@163.com

characterized by six quantitative traits including poleaxis length (P), equatorial width (E), stripe length, stripe width, germination length and germination pore size. The data were subject to statistical analysis and cluster analysis. 【Results】 Firstly, unlike pomegranate flowers, dicranostigma, corn poppy and *Campsis grandiflora*, the exine ornamentation of *Diospyros* was grain fringe, which is significantly different among them. The exine ornamentation of the *corn poppy* pollen was raised in a hilly shape; the pollen of *Campsis grandiflora* had a network structure; that of pomegranate was with tumor-like protuberances; dicranostigma had both tumor-like protrusions and a network structure. Secondly, the pollens of the six persimmon species could be distinguished by their ornaments. *D. glaucifolia* pollen fringes formed a short clusters in helical arrangement; *D. oleifera* pollen had stripes that were often accompanied by a ‘V’-type cross arrangement; the stripes *D. lotus* pollen were long worm-like with irregular arrangement. Pollen surface of *D. spp.* was with granule protuberances and knitting lines. The fringe *D. virginiana* pollen was in a rugged, undulated arrangement; and *D. cathayensis* pollen stripes were clustered together with perforations. Thirdly, there were also significant differences in pollen external morphology among the other eleven cultivars of *D. kaki*. For example, the fringe of ‘Xiangyangniuxinshi’ was the widest, reaching 97.35 μm , and there was a perforation. But the fringe of ‘Panxianshuishi’ was only 0.85 μm . Unlike ‘Xiangyang niuxinshi’ ‘Touh achi’ had no perforation on the pollen surface, and its surface was relatively smooth with longer stripes. Besides, the pollen grains at flower bud stage were generally larger than those at full-bloom, and the stripes were wider. Furthermore, at full-bloom stage, pollen exine stripes of *D. kaki* were relatively dry and sparse, but at bud stage they were relatively plump and tight. Moreover, ‘Huazhongxiongzu’ ‘Xiangyang niuxinshi’ ‘Zenjimar’ and ‘Taiwanzhengshi’ produced huge pollens. Giant pollen size was about 1.9 times the size of the normal pollen, accounting for 23.5% on average in the materials observed in this experiment. Cluster analysis of the 17 species of persimmon using UPGMA divided them into five categories and showed their genetic relationships. 【Conclusion】 The exine ornamentation of the pollen of *Diospyros* is significantly different from that of the four non-persimmon plants, and it is specific and stable. According to the pollen external morphology, we can determine whether the pollen belongs to *Diospyros*. Although the exine ornamentation is generally similar among *Diospyros* species, there are some differences in exine ornamentation, pollen size and shape, etc.. These differences can use not only for distinction of the six *Diospyros* species but also for distinction the 11 cultivars of *D. kaki*. Due to the different time of pollen collection, the pollen morphology may be different, and therefore the results obtained in this paper may have limitations in the application. In addition, the existence of giant pollen (2n gametes) has been found in ‘Zenjimar’ and ‘Taiwanzhengshi’, indicating that huge pollen is not ubiquitous but only presents in some varieties of *D. kaki*. Cluster analysis showed the close relationship between the 17 species of persimmon plants. The results show that palynology provides a reliable reference for classifying *Diospyros*.

Key words: *Diospyros*; Sporopollen; Pollen morphology; Cluster analysis

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 为柿科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros* Linn.) 植物, 是我国重要的经济林树种, 有“铁杆庄稼”之称。我国是柿属植物起源地之一, 种质资源蕴藏极为丰富, 分布区域广, 栽培历史悠久, 为柿属种质资源的起源进化、亲缘关系以及遗传多样性等研究提供丰富的研究材料^[1]。孢粉学是研究植物的孢子、花粉 (简称孢粉) 的形态、分类及其

在各个领域中应用的一门科学^[2]。1945年, 英国人海德和威廉斯创用了孢粉学这一名词^[3]。孢粉学广泛地应用于植物学、海洋学、农林科学和地质学等的研究中^[4]。花粉具有自身独特的生物性状, 带有大量遗传信息, 因为花粉的形态特征受植物基因型控制而不受外界条件影响, 具有较强的遗传保守性^[5], 是探讨植物起源、演化及亲缘关系的重要特征之一,

不仅可用于种的鉴定,还可用于品种群的划分和品种鉴定^[6]。果树品种花粉超微形态特征主要包括花粉的形状、长宽比、萌发孔的数量和大小、萌发沟间的距离等^[7],在果树系统发育研究中具有重要作用,扫描电镜是果树品种花粉超微形态学研究及果树品种鉴定和分类的主要手段^[8]。孢粉学在梨^[9]、枣^[10]、桃^[11]、猕猴桃^[12]、杏^[13]、龙眼^[14]、苹果^[15]、葡萄^[16]、银杏^[17]、樱桃^[18]等果树上都有所研究。在柿上,李天庆^[19]对柿属植物部分品种的花粉形态作了简单描述;张永芳等^[20]通过扫描电镜观察了8种柿属植物花粉,认为德阳柿花粉形态明显区别于其他材料,提出德阳柿可能是一个新种;徐莉清等^[21]对部分柿属雄性种质的花粉形态、花粉量、花粉直径、巨大花粉比率、花粉离体萌发率、花粉柱头亲和性等进行了比较研究。虽然前人对柿属花粉形态已经有所研究,但是能否利用孢粉学对柿属植物不同品种进行科学分类目前还未有明确的结论。本试验的试材除涵盖国家柿种质资源圃内保存的6个柿属种外,在柿种下又选取11个具有雄花的品种,通过扫描电镜观察对其形态进行比较分析,旨在探讨孢粉学区分柿属种及品种的可能性,并通过聚类分析探讨它们亲缘关系的远近,为柿属植物品种鉴定以及系统分类提供孢粉学依据。

1 材料和方法

1.1 试材及取样

试验所用柿材料均采自陕西杨凌国家柿种质资源圃,其中包含柿科6个种以及柿种下11个品种,包括雌雄异株的浙江柿(*D. glaucifolia* Metc.)、君迁子(*D. lotus* L.)、美洲柿(*D. virginiana* L.)、油柿(*D. oleifera* Cheng)、乌柿(*D. cathayensis* Steward.)、红花野毛柿(*D. Deyangnsis*)以及柿种(*Diospyros kaki* Thunb.)的11个资源:‘襄阳牛心柿’‘正月’‘台湾正柿’‘河西大果雄株’‘耀县五花柿’‘兴津22’‘盘县水柿’‘上虞野柿’‘藤八’‘华中雄株’‘禅寺丸’。

另外还有采自西北农林科技大学家属院以及校园内的罂粟科(Papaveraceae Juss.)的虞美人(*Papaver rhoeas* L.)、秃疮花(*Dicranostigma leptopodum*),紫葳科(Bignoniaceae)的凌霄花(*Campsis grandiflora*),石榴科(Punicaceae)的石榴花(*Punica granatum* L.)等用作外对照类群。由于这4种植物都属于草本植物,而柿科植物为木本植物,因此4种植物所

在科与柿科存在比较远的亲缘关系,可以利用它们的花粉形态特征与柿科植物进行比较与分析。

1.2 试验方法

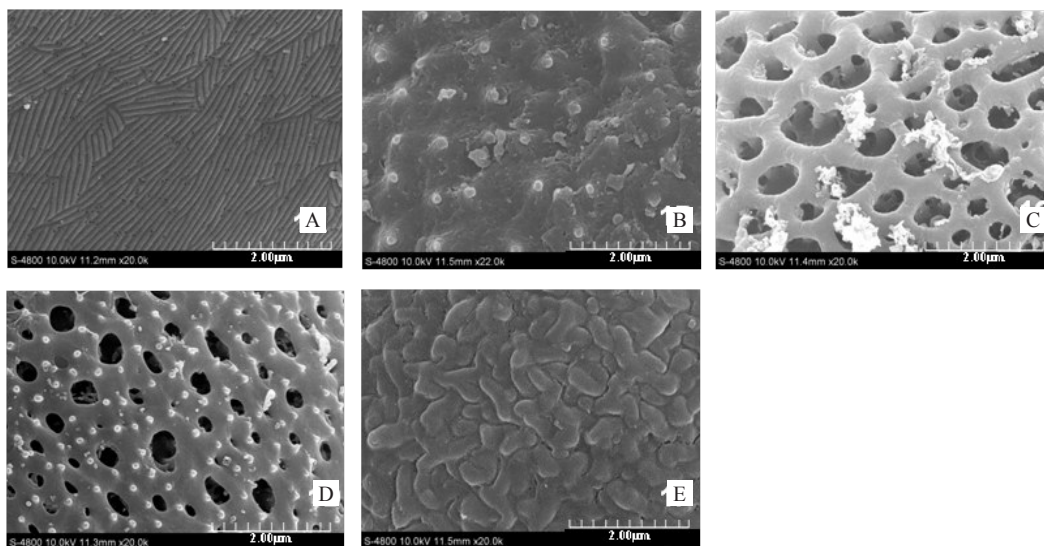
在柿属植物花期(2016年4月上旬)采集同一部位不同花期的花(花蕾期/盛花期),并用镊子剥取新鲜花朵花药,置于干净小瓶内保存。将花药带回实验室后,参照张永芳等^[20]、顾欣等^[22]处理花药的方法,将带回来的花药首先固定于4%(w)的戊二醛磷酸缓冲液中,放置于4℃固定过夜后,用pH 6.8、浓度为0.1 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液漂洗3次,每次10~15 min,后经50%(φ, 后同)、70%、85%、90%、95%和100%的乙醇梯度和醋酸异戊酯脱水,每次10~15 min,在K850型CO₂临界点干燥仪中干燥4 h。将花粉轻弹于粘有双面胶的样品托上,经E-1045型离子溅射仪喷金处理。然后在日立S-4800型场发射扫描电镜下观察花粉并进行拍摄。

随机选取30粒花粉,用Image-Pro测定极轴长(P)、赤道宽(E)、条纹长、条纹宽、萌发沟长和萌发孔大小^[20]。花粉大小以P×E值表示,花粉形状以P/E表示,其中P/E>2为超长球形,0.88<P/E<1.14为近球形^[2]。观察赤道观、极面观、花粉形状、萌发孔类型以及外壁纹饰^[23]。利用SPSS软件对定量数据进行标准化处理后,采用组类联接的聚类方法、欧氏距离和类平均法对其进行聚类分析得出树状聚类图^[20]。

2 结果与分析

2.1 花粉测量与观察结果

2.1.1 柿属植物花粉形态的特异性 柿科花粉形态有别于其他科属植物花粉。由图1可知,通过电镜扫描17种柿属植物以及凌霄花、石榴花、虞美人、秃疮花等植物在盛开花期的花粉的外壁纹饰特征,可以看出凌霄花、石榴花、虞美人、秃疮花等植物的花粉外壁纹饰与柿科植物相比具有较大差异。虞美人花粉外壁纹饰呈小丘突起状(图1-B);凌霄花花粉外壁纹饰呈网状结构(图1-C);秃疮花则既有瘤状突起又有网状结构(图1-D);石榴花则呈瘤状突起状(图1-E);而柿属植物多为谷穗状条纹组成的复杂花纹,这些花纹由长短不同、粗细有别、数量各异的谷穗状条纹状所组成,谷穗状条纹是数量众多直径约为20 nm的圆粒结构组成(图1-A)。由此可以得出柿属植物花粉外壁纹饰与其他植物有明显的区别,具有一定特异性,从而为区分柿科与其他植物提供分类依据。



A. 华中雄株; B. 虞美人; C. 凌霄花; D. 秃疮花; E. 石榴花。

A. *D. kaki*; B. *Papaver rhoeas* L.; C. *Campsis grandiflora*; D. *Dicranostigma leptopodum*; E. *Punica granatum* L.

图1 柿科与其他不同科植物花粉外壁纹饰比较

Fig. 1 Comparison of pollen exine ornamentation among *Diospyros* species and other plants

2.1.2 柿属花粉共同特征 经在电镜同一距离下分别扫描观察这些在盛花期柿属植物花粉的赤道观、极面观、萌发沟、萌发孔以及外壁纹饰,我们可以得出17种柿属植物花粉均为单粒花粉,具有对称性,柿花粉整体呈近球形或扁球形,赤道观呈近圆形或椭圆形,极面观多为三裂圆形或三角圆形;赤道面有3条孔沟,延极轴方向伸向两极(如图2-E、图3-E所示)。柿花粉的萌发孔分布在极面上,呈近圆形。萌发沟两极窄中间宽,边缘明显增厚,呈裂口状,萌发沟内有拳头状突起,但也有部分品种凸起并不明显,花粉外壁纹饰随着品种不同而不同,但整体呈现条纹状、谷穗状等类型(如图2-E、图3-E所示)。按照Erdtman^[23]的NPC分类系统进行对照分析,17种柿属植物的花粉应为N₃P₄C₅类型,即赤道三孔沟类型。

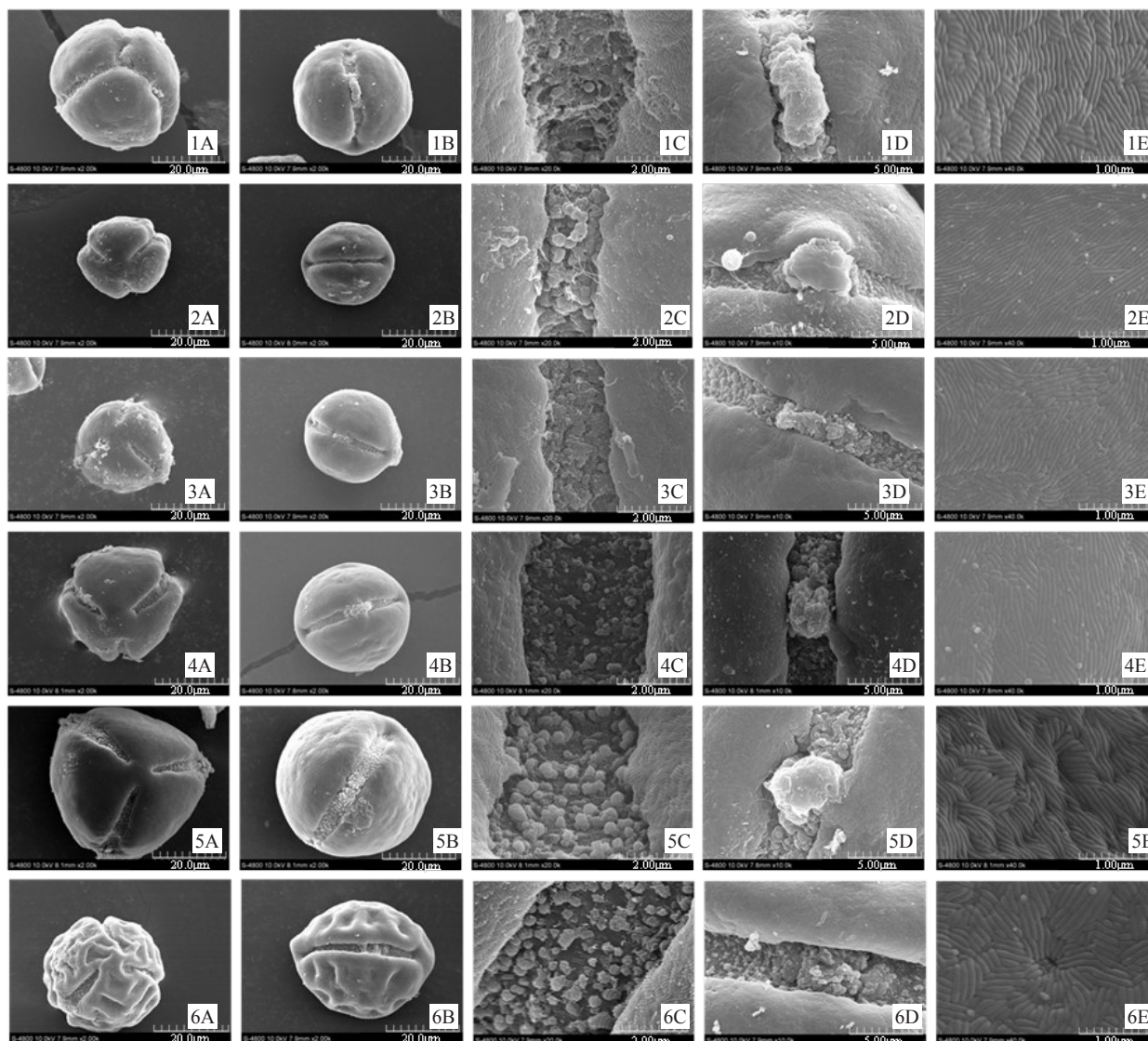
2.1.3 柿属植物花粉粒大小和形状 17种柿属植物在盛开花粉形态测量数据,从表1中可以看出它们之间花粉粒大小,极轴长、赤道轴长、条纹长、条纹宽以及萌发沟大小等超微结构的大小等数据差别较大。总体来看,花粉粒极轴长度为(26.14±0.98)~(51.96±2.61) μm,赤道轴长度为(25.24±0.97)~(49.25±1.68) μm,极轴与赤道轴之比(P/E)为(0.95±0.06)~(1.44±0.32);花粉粒大小因不同品种而异,其中最大的是‘耀县五花柿’,‘襄阳牛心柿’次之,最小的是‘油柿’;P/E值最大的是‘上虞野柿’,‘浙江柿’次之,最小的是‘美洲柿’;萌发沟最长

的是‘美洲柿’,为(41.26±1.77) μm,最短的是‘油柿’,仅有(22.18±1.86) μm;萌发孔最大的是‘华中雄株’,为(8.13±1.00) μm,最小的是‘上虞野柿’,只有(2.60±0.16) μm。

2.1.4 柿属植物花粉外壁表面纹饰 柿属植物花粉外壁纹饰均表现为条纹状且具有条嵴,嵴上分布有疏密不等的细小点状颗粒。随着种及种下品种不同,条嵴的排列、分布、稀疏以及条嵴宽窄、深浅等物理性状存在程度不同的差异。

通过对6个柿种的花粉形态观察我们发现,‘浙江柿’条纹呈短簇状螺旋排列(图2-1E);‘油柿’条纹常伴随着“V”字型交叉排列(图2-2E);‘君迁子’条纹则呈长蠕虫状不规则紧密排列(图2-3E);‘红花野毛柿’即德阳柿的条纹呈颗粒状突起、针织线状排列(图2-4E);‘美洲柿’条纹呈高低不平、起伏状排列(图2-5E);‘乌柿’花粉条纹呈簇状聚集并伴有小孔(图2-6E);其中,条纹最宽的是‘乌柿’,为(67.96±6.11) nm,最窄的是‘君迁子’,仅为(50.40±7.32) nm;条纹最长的是‘德阳柿’,为(2.96±0.61) μm,最短的是‘美洲柿’,仅有(0.73±0.42) μm。可见,这6个种的花粉外壁纹饰差异比较明显,由于种内不同类型都具有此特征,因此可以作为区分柿种的一个参考依据(图2)。

除此之外,柿种下的11个品种的花粉外壁纹饰也形态各异,大小不一(图3)。



1. 浙江柿; 2. 油柿; 3. 君迁子; 4. 红花野毛柿(德阳柿); 5. 美洲柿; 6. 乌柿。A. 极面观; B. 赤道面观; C. 萌发沟; D. 萌发孔; E. 花粉外壁纹饰。

1. *D. glaucifolia* L.; 2. *D. oleifera* Cheng; 3. *D. lotus* L.; 4. *D. Deyangensis*; 5. *D. virginiana* L.; 6. *D. cathayensis* Steward. A. Polar view; B. Equatorial view; C. Germination furrow; D. Germination hole; E. Pollen exine ornamentation.

图2 柿属植物不同种之间花粉形态比较

Fig. 2 Comparison of pollen morphology between different species of *Diospyros*

‘盘县水柿’由不超过0.85 μm 的条纹不交叉间断排列,排列方向大体一致,并伴随着穿孔的存在,但数量不多(图3-1E);‘禅寺丸’条嵴之间排列较为紧密,排列方向各异,并且表面多有凹陷出现(图3-2E);‘上虞野柿’条纹较短,排列方向不一致,穿孔数量最多,由此造成了条嵴之间间隙较大,条纹也最细(图3-3E);‘藤八’的条纹在同一方向平行排列,且条纹较长,表面较平滑,整体分布流畅整齐,无穿孔(图3-4E);‘台湾正柿’条纹也较长,整体排列方向一致但偶有交叉,条纹表面由于有颗粒状突起,所以比较粗糙,此外有较少穿孔出现,穿孔数量最少

(图3-5E);‘正月’表面平整光滑,条纹之间由于方向不一的分布而交叉形成许多闭合区域,无穿孔(图3-6E);‘兴津22’由长短粗细一致的条纹呈不同方向排列,有数量较少的穿孔穿插其中(图3-7E);‘耀县五花柿’条纹排列方向一致,条纹较长且细,由于存在较多穿孔使条纹整体呈断线状分布(图3-8E);‘华中雄株’花粉表面纹饰大体与‘耀县五花柿’相似,花粉表面也存在较多穿孔,不同的是它的穿孔存在与相邻条嵴之间的间隙中而不是存在于条嵴首尾相接之处(图3-9E);‘河西大果雄株’由长短不一,排列方向各异的较粗的条纹组成,且条嵴之间间隙

表 1 柿花粉性状测量与观察结果
Table 1 Pollen characters in *Diospyros*

种类 Species	花粉形状 Pollen shape	极轴×赤道轴 P×E/ μm	极轴/赤道轴 P/E	条纹宽 Stripe width/nm	条纹长 Stripe length/ μm	萌发沟长 Germinal furrow length/ μm	萌发孔大小 Size of aperture/ μm
德阳柿 <i>Diospyros</i> spp.	近球形 Nearly spherical	(39.05±2.59)× (36.40±4.06)	1.08±0.12	57.74±3.96	2.96±0.61	31.17±2.98	2.85±0.58
美洲柿 <i>D. virginiana</i>	近球形 Nearly spherical	(43.60±2.68)× (45.70±4.42)	0.95±0.06	61.41±6.91	0.73±0.42	41.26±1.77	5.78±0.25
君迁子 <i>D. lotus</i>	近球形 Nearly spherical	(32.66±2.41)× (31.74±2.69)	1.03±0.06	50.40±7.32	0.92±0.65	24.18±1.24	5.36±0.70
油柿 <i>D. oleifera</i>	近球形 Nearly spherical	(26.14±0.98)× (25.24±0.97)	1.03±0.05	60.46±10.49	1.78±1.47	22.18±1.86	3.68±0.39
浙江柿 <i>D. glaucifolia</i>	近球形 Nearly spherical	(28.09±2.12)× (29.42±4.93)	0.97±0.15	57.63±9.47	0.91±0.75	27.60±0.84	4.71±0.45
乌柿 <i>D. cathayensis</i>	近球形 Nearly spherical	(38.28±0.62)× (35.47±1.36)	1.08±0.04	67.96±6.11	1.04±0.25	31.09±1.57	4.25±0.57
禅寺丸 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(44.51±1.94)× (43.65±1.42)	1.02±0.02	82.68±13.62	0.64±0.35	34.59±0.20	6.67±0.45
襄阳牛心柿 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(46.88±1.80)× (44.84±2.63)	1.05±0.03	97.35±7.39	0.79±0.42	40.38±2.58	5.24±0.87
正月 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(34.65±1.84)× (32.32±5.33)	1.09±0.16	66.85±8.33	0.88±0.47	25.86±3.17	4.08±0.62
兴津22 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(37.24±7.37)× (29.69±3.49)	1.25±0.13	82.47±9.29	0.67±0.35	29.35±2.82	4.35±0.61
盘县水柿 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(38.76±5.67)× (31.22±3.41)	1.24±0.12	76.96±13.61	0.85±0.43	31.96±7.28	4.59±1.30
华中雄株 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(42.38±0.85)× (43.08±1.94)	0.99±0.04	56.87±3.41	1.02±0.79	33.22±1.85	8.13±1.00
河西大果雄株 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(30.94±4.52)× (31.06±3.29)	1.00±0.15	84.06±7.76	0.77±0.43	28.88±4.49	3.59±0.24
台湾正柿 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(33.85±4.85)× (33.18±0.82)	1.02±0.12	58.27±3.06	0.86±0.14	28.92±3.84	3.98±0.69
耀县五花柿 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(51.96±2.61)× (49.25±1.68)	1.05±0.04	82.25±5.08	2.10±0.52	43.04±3.71	5.63±0.57
藤八 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(35.02±3.03)× (33.74±4.97)	1.05±0.11	73.45±4.46	1.79±0.19	28.51±1.57	4.16±0.78
上虞野柿 <i>D. kaki</i>	近球形 Nearly spherical	(39.10±8.97)× (27.94±7.74)	1.44±0.32	76.17±9.99	0.96±0.49	33.12±4.89	2.60±0.16

较小,偶有穿孔出现(图3-10E);‘襄阳牛心柿’的条纹最宽,且存在穿孔,条纹之间间隙较小,排列方向不一致(图3-11E)。

由此认为,通过花粉外壁纹饰的不同不仅可以区分柿种资源,还可以将柿种下具有雄花的不同品种加以区分。

2.1.5 柿属植物萌发沟 所观察柿属植物花粉均具三孔沟,萌发沟两极窄中间宽,孔沟几达两端,孔沟边缘明显增厚,呈裂口状,萌发沟内有拳头状突起,在赤道处常有较大颗粒堆积成凸起,还有部分品种沟内赤道处凹入或凸起不明显。部分品种孔沟在极面有轻微的汇合现象。

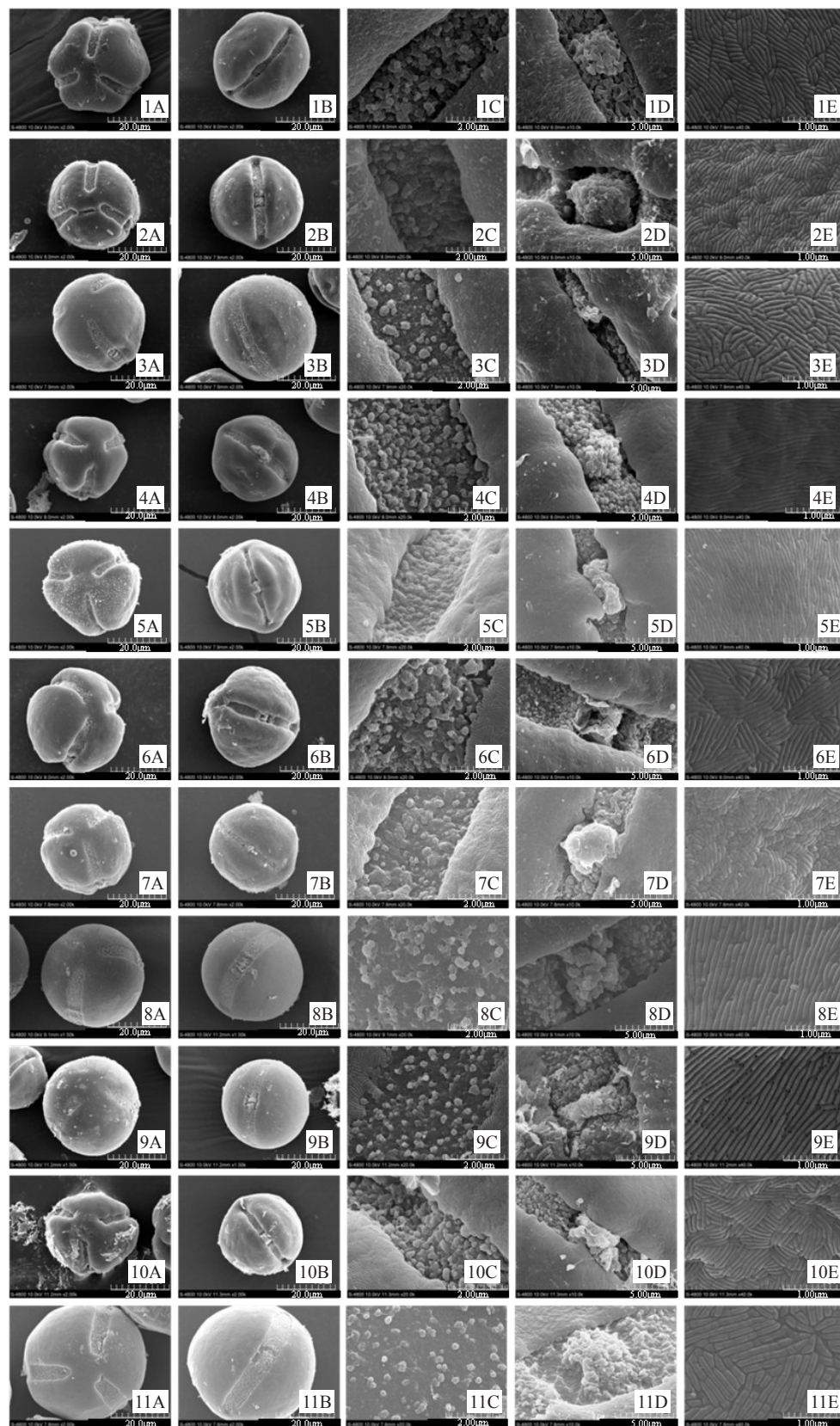
2.2 不同柿属植物花粉形态特征数量性状的聚类分析

根据极轴长、赤道轴长、极轴长/赤道轴长(P/E)、条脊宽、条脊长、萌发沟长以及萌发孔大小的数量性状,对17种柿属植物品种间采用类平均法(UP-GMA)进行聚类分析,结果如图4所示。在欧式距离为7.5处可以将它们分成5类。

第Ⅰ类为君迁子、‘油柿’、‘浙江柿’、‘禅寺丸’、‘台湾正柿’、‘藤八’,它们的萌发沟最短;第Ⅱ类为‘乌柿’、‘兴津22’、‘盘县水柿’、‘上虞野柿’、‘正月(安芸津)’、‘河西大果雄株’;第Ⅲ类是‘红花野毛柿’(德阳柿),它的条纹最长;第Ⅳ类为‘襄阳牛心柿’、‘华中雄株’、‘耀县五花柿’,它们的花粉最大,萌发沟最长;第Ⅴ类为‘美洲柿’,它的萌发沟最长(图4)。

2.3 部分柿属植物存在巨大花粉(2n配子)

在电镜扫描观察中,‘华中雄株’、‘襄阳牛心柿’



1. 盘县水柿; 2. 禅寺丸; 3. 上虞野柿; 4. 藤八; 5. 台湾正柿; 6. 正月(安芸津); 7. 兴津 22; 8. 耀县五花柿; 9. 华中雄株; 10. 河西大果雄株; 11. 襄阳牛心柿。A. 极面观; B. 赤道面观; C. 萌发沟; D. 萌发孔; E. 花粉外壁纹饰。

1. Panxianshuishi; 2. Zenjimarui; 3. Shangyuyeshi; 4. Touhachi; 5. Taiwanzhengshi; 6. Shougatsu; 7. Okitsu 22; 8. Yaoxianwuhuashi; 9. Hua-zhongxiongzhuzhu; 10. Hexidaguo-xiongzhuzhu; 11. Xiangyangniuxinshi. A. Polar view; B. Equatorial view; C. Germination furrow; D. Germination hole; E. Pollen exine ornamentation.

图3 柿属植物不同品种之间花粉形态比较

Fig. 3 Comparison of pollen morphology between different cultivars of *D. kaki*

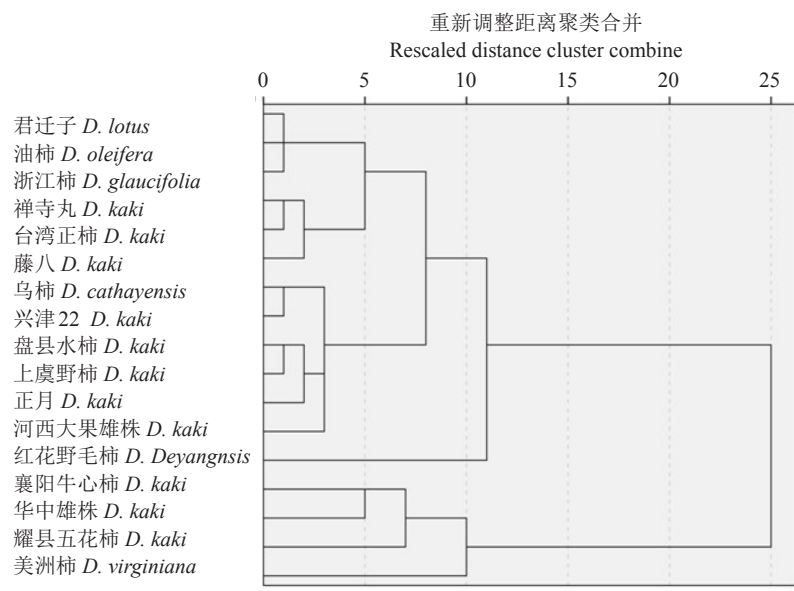


图 4 柿花粉性状树状聚类分析

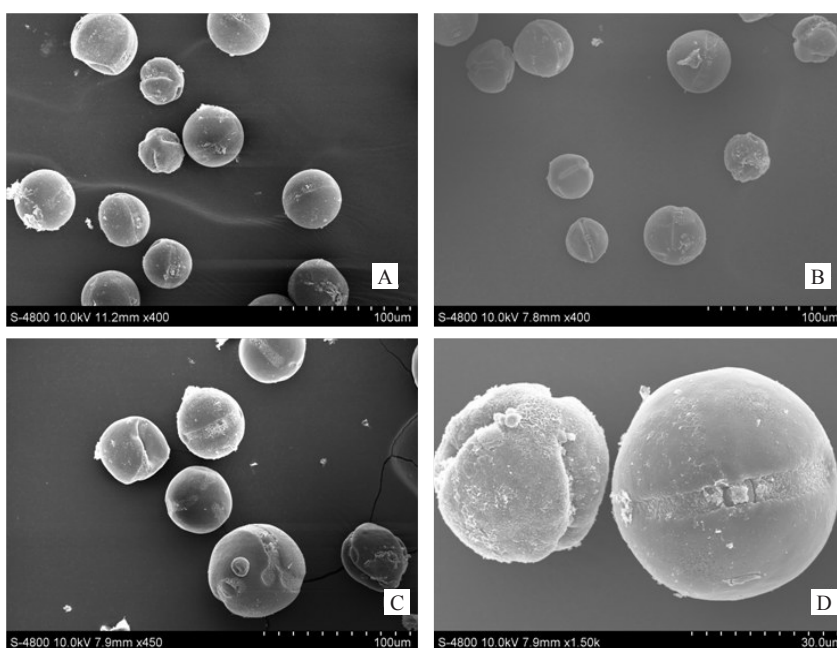
Fig. 4 Dendrogram of *Diospyros* based on pollen characteristics

‘禅寺丸’与‘台湾正柿’均出现了巨大花粉($2n$ 配子)(大小约为普通花粉大小的 1.9 倍),平均占到本次试验所观察材料的 23.5%。张青林^[24]在‘雄株 6 号’‘禅寺丸’‘台湾正柿’等雄性种质中也曾发现过巨大花粉,并检测了它们的存在比例。这说明巨大花粉不是普遍存在的,只特异存在于在柿(*D. kaki* Thunb.)的个别品种中(图 5)。

巨大花粉的出现不仅有利于我们进一步研究品种间的差异,也为未来柿多倍体育种提供一定科学依据。

2.4 同一样品不同花期其花粉形态也存在差异

分别取‘襄阳牛心柿’和‘禅寺丸’在花蕾期和盛开期的花粉在电镜下扫描并进行观察与比较,发现花蕾期的花粉粒与盛开期的在花粉粒大小、条纹宽



A. 华中雄株; B. 襄阳牛心柿; C. 禅寺丸; D. 台湾正柿。

A. Huazhongxiongzhuzhu; B. Xiangyangniuxinshi; C. Zenjimaruru; D. Taiwanzhengshi.

图 5 个别柿属植物中发现的巨大花粉

Fig. 5 The giant pollen found in the individual persimmon plants

窄方面差异显著(图6), 盛开期的花粉表面条嵴之间普遍呈现较大间隙, 且表面较为光滑平整; 而花蕾

期的花粉表面条嵴之间则较为紧密, 且花粉表面较为粗糙(图7)。

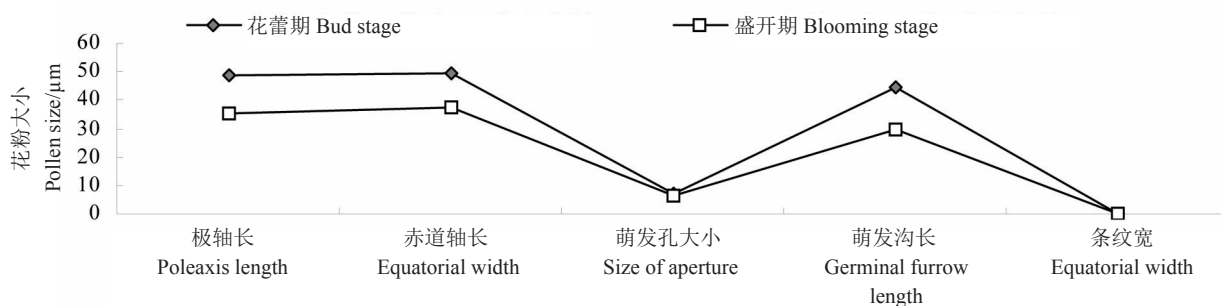
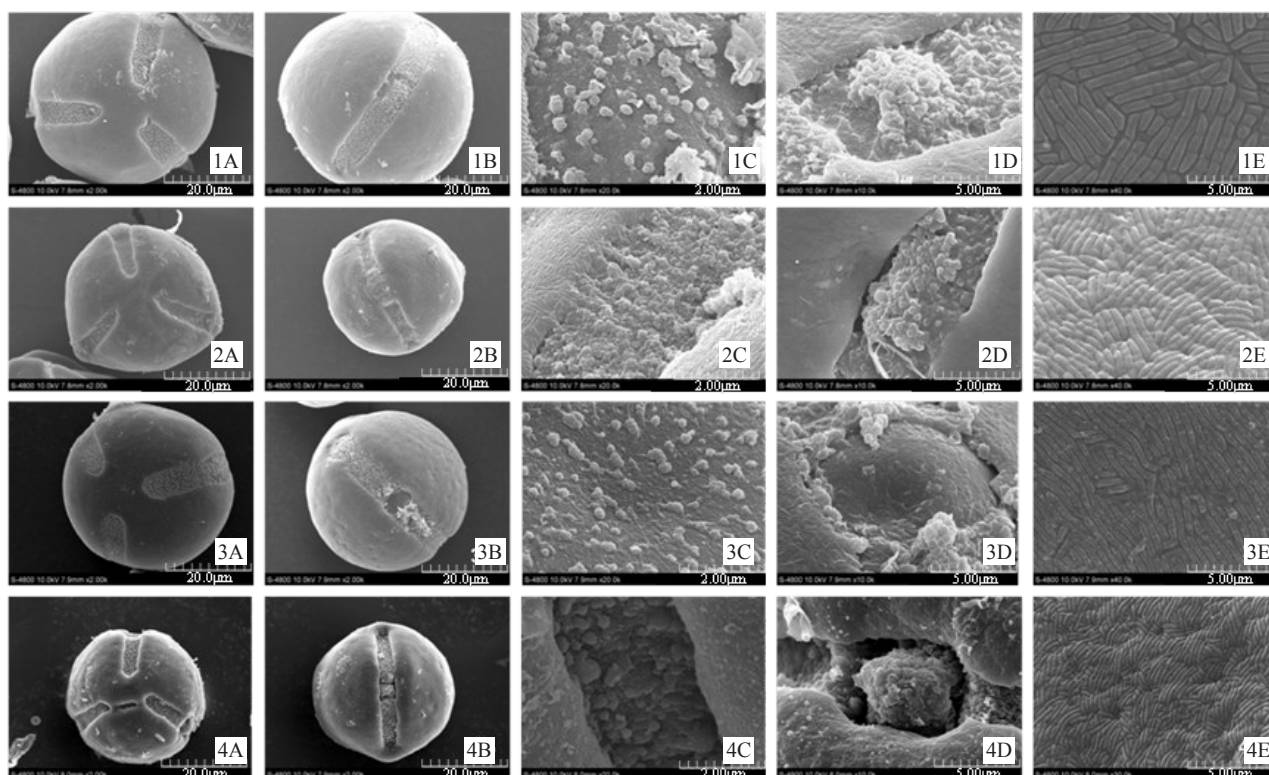


图6 ‘襄阳牛心柿’与‘禅寺丸’花粉在花蕾期与盛开期不同性状比较

Fig. 6 Comparison of different characteristics of pollen in bud stage and full-bloom stage in *D. kaki*



1. 襄阳牛心柿花蕾期的花粉; 2. 襄阳牛心柿盛开期的花粉; 3. 禅寺丸花蕾期的花粉形态; 4. 禅寺丸盛开期的花粉形态。A. 极面观; B. 赤道面观; C. 萌发沟; D. 萌发孔; E. 表面纹饰。

1, 3. Pollen of bud stage in *D. kaki*; 2, 4. Blooming pollen in *D. kaki*. A. Polar view; B. Equatorial view; C. Germinal furrow; D. Germinal hole; E. Pollen exine ornamentation.

图7 柿属植物花粉采集时期不同花粉形态

Fig. 7 Morphology of pollen in different periods in *Diospyros*

3 讨论

3.1 柿属植物花粉形态对其分类及鉴别具有重要意义

我国柿属植物资源丰富, 花粉粒的形状、大小和纹饰等特征具有遗传性, 柿属植物花粉表面纹饰有

明显的特点, 特别是花粉表面的纹饰最具代表性, 可与其他植物区分。

笔者通过观察发现, 凌霄花、石榴花、虞美人、秃疮花等植物花粉外壁纹饰分别呈网状及瘤状突起状, 明显不同于柿属植物特殊的条纹状结构, 因此可以将柿属花粉形态尤其是花粉外壁纹饰作为判别柿

种的一个依据。

通过对6个不同种的柿属植物花粉形态观察发现,柿属植物不同种间花粉大小、极面大小,发芽沟宽窄、长短和花纹,花粉粒表面纹饰等等方面存在一定差异,可以将这6个种分别开来,这说明柿属植物种内有较丰富的遗传多样性,这与张永芳等^[20]研究结果相一致。同时笔者发现‘乌柿’花粉表面纹饰不同于别的柿种,呈现较多的褶皱。Walker等^[25]认为,被子植物纹饰演化的趋势是:表面光滑→表面具小穴、小沟状雕纹→表面棒状、鼓锤状、刺状→表面皱波状、网状、条纹状,推测这可能与乌柿这一品种花粉表面纹饰演化进程与其他柿种相比较为原始有关。

另外11个柿种下的不同品种在花粉的赤道、极面大小和形状、萌发沟宽窄、长短、和花粉粒表面纹饰方面也差异明显,表明柿种内有较为丰富的遗传多样性,花粉形态特征具有潜在的品种分类价值,通过柿属花粉形态不仅可以作为区分柿种的依据,也可以作为柿属植物品种分类的参考和鉴定的辅助工具。这与王延秀等^[26]、刘伟等^[27]在海棠、木瓜植物上的得出的结论相一致。

不同柿种大多由于雌雄同株具有雄花,因此可利用观察其花粉形态特征对其进行鉴定。而柿种内品种只有一部分具有雄花,所以利用花粉形态观察只可用于鉴定具备雄花的柿品种,对于柿种内仅着生雌花的品种则无法利用花粉形态对其进行鉴别。此外,由于柿有单性结实能力,在长期自然与人工选择过程中,留下来的栽培品种多数是没有雄花的。因此,仅仅依靠花粉形态很难对柿属植物品种进行大量的分类和鉴定,只有综合运用形态学、孢粉学、分子生物学等手段,才能得到科学的结论。

观察还发现,同一品种花粉采集时间不同,其花粉形态也不尽相同。通过比较发现‘襄阳牛心柿’和‘禅寺丸’花蕾期的花粉粒普遍比盛开期的花粉粒大,且条纹也比较宽。此外,盛开期的花粉外壁条纹比较干瘪稀疏,花蕾期的花粉外壁条纹则比较饱满紧密。根据刘师等^[28]对牡丹不同花期差异的生理机制研究表明,花朵开放过程中可溶性糖含量以及含水量是影响牡丹花期的重要生理因素,推测这可能是花粉粒在花朵开放过程中水分及可溶性糖等生理指标发生变化所致。

3.2 柿属植物花粉形态特征与亲缘关系

通过对17种柿属资源的聚类分析表明,君迁子

(*D. lotus* L.)、浙江柿(*D. glaucifolia* L.)、油柿(*D. oleifera* Cheng.)聚在了一起,它们的花粉粒都比较小,而且它们都是二倍体,表明它们有较近的亲缘关系。而Choi^[29]的研究同样表明这3个二倍体种间的亲缘关系较近。红花野毛柿(*D. deyangnsis*)由于是四倍体而与其他柿属植物亲缘关系则较远,这与张永芳等^[20]得出的结论:‘红花野毛柿’(德阳柿)可能为一个新种的结论相一致。‘禅寺丸’与‘藤八’亲缘关系较近,可能与它们的花粉表面都不存在穿孔且它们都为不完全甜柿(PVNA)有关。‘乌柿’与‘兴津22’‘盘县水柿’‘上虞野柿’‘正月’以及‘河西大果雄株’分为了一类,可能是因为它们都为六倍体而除了‘正月’以外的其他品种都存在穿孔有关;‘襄阳牛心柿’‘华中雄株’和‘耀县五花柿’亲缘关系较近,它们也都具有穿孔,且穿孔数量较多,花粉粒也比较大。虽然‘美洲柿’与柿都是六倍体却单独分为一类,可能由于它们具有不同的祖先所致^[29]。应用SRAP、IRAP和REMAP分子标记进行UPGMA聚类分析均表明美洲柿与柿亲缘关系较远^[30-31]。Hu等^[32]通过检测7种柿属植物线粒体DNA多态性并进行聚类分析,也得出了柿与美洲柿亲缘关系较远的研究结果。由此可以得出柿属植物花粉形态对柿属植物亲缘关系远近的鉴定有一定的积极意义。

3.3 巨大花粉对柿属资源雄性种质的意义

我国虽然柿属资源较为丰富,但是柿属雄性资源及其生物学信息却很少,在国家柿资源圃收集的560余份柿属种质中,开雄花的仅有22种^[33]。谷晓峰等^[34]曾指出柿品种可产生巨大花粉,经小孢子母细胞减数分裂观察证明为 $2n$ 花粉。本次试验在17种雄性种质资源的4种即‘华中雄柿’‘襄阳牛心柿’‘台湾正柿’和‘禅寺丸’中均发现了巨大花粉($2n$ 花粉)。由于Sugiura等^[35]等利用‘禅寺丸’(PVNA) $2n$ 花粉与‘次郎’(PCNA)杂交,成功获得九倍体新种质。未减数配子在植物多倍体育种中具有重要价值^[36]。张青林等^[24]在部分柿属雄性种质中也发现存在一定比例的巨大花粉,指出其为开拓甜柿育种亲本提供了新的试材。所以巨大花粉($2n$ 配子)的存在可能对柿属植物雄性种质创新及多倍体育种有重大意义。这些存在于‘华中雄柿’‘襄阳牛心柿’‘台湾正柿’和‘禅寺丸’中的巨大花粉约为它们正常花粉的1.9倍,关于其成因和更多作用有待进一步研究。

参考文献 References:

- [1] 梁晋军. 柿及其近缘种亲缘关系及柿品种遗传多样性的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2015.
LIANG Jinjun. Study on relationship of *Diospyros kaki* and its related species and genetic diversity of *D. kaki* [D]. Beijing: Academy of Forestry Sciences(China),2015.
- [2] 王开发,王宪曾. 孢粉学概论[M]. 北京:北京大学出版社,1983:57-59.
WANG Kaifa, WANG Xianzeng. Introduction of palynology[M]. Beijing: Peking University Press, 1983:57-59.
- [3] 王伟铭. 中国孢粉学的研究进展与展望[J]. 古生物学报, 2009,48(3): 338-346.
WANG Weiming. Progress and prospect of studies on palynology in China[J]. Acta Palaeontologica Sinica, 2009, 48(3): 338-346.
- [4] 包劲松,李载龙.孢粉学在果树上的应用[J]. 浙江柑桔, 1996(6): 22-23.
BAO Jinsong, LI Zailong. Application of palynology to fruit trees[J]. Zhejiang Citrus, 1996(6): 22-23.
- [5] 杨向晖,吴颖欣,林顺权. 6种枇杷属植物花粉形态扫描电镜观察[J]. 果树学报,2009,26(4): 572-576.
YANG Xianghui, WU Yingxin, LIN Shunquan. SEM observation on the pollen morphology of six *Eriobotrya* plants[J]. Journal of Fruit Science, 2009, 26(4): 572-576.
- [6] 汪祖华,周建涛.桃种质的亲缘演化关系研究--花粉形态分析[J]. 园艺学报,1990,17(3): 161-168.
WANG Zuhua, ZHOU Jiantao. Research on the relationship between the genetic evolution of peach germplasm[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1990, 17(3): 161-168.
- [7] 甘玲,汤浩茹,董晓莉. 梨种类和品种鉴定研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(5): 302-307.
GAN Ling, TANG Haoru, DONG Xiaoli. An overview on identification of pear species and cultivars[J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2006, 22(5): 302-307.
- [8] 陈学森,郭延奎,罗新书. 扫描电镜不同制样方法对几种落叶果树花粉形态的影响[J]. 果树科学,1992,9(4): 198-202.
CHEN Xuesen, GUO Yankui, LUO Xinshu. Effect of different preparation methods of SEM on pollen morphology of several deciduous fruit trees[J]. Journal of Fruit Science, 1992, 9(4): 198-202.
- [9] 张演义,张全军,徐颖洁,钟必凤,任国慧,王晨. 10个农家品种梨花粉形态扫描电镜观察[J]. 西南农业学报,2014,27(5): 2119-2123.
ZHANG Yanyi, ZHANG Quanjun, XU Yingjie, ZHONG Bifeng, REN Guohui, WANG Chen. SEM observation on pollen morphology of 10 local pear cultivars[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(5): 2119-2123.
- [10] 张俊娥,吴国良. 6个枣品种花粉形态的观察[J]. 河南农业大学学报,2010,44(4): 408-410.
ZHANG June, WU Guoliang. Observation on pollen morphology of six varieties of date (*Z. jujube* Mill.)[J]. Journal of Henan Agriculture University, 2010, 44(4): 408-410.
- [11] 刘伟,董晓民,李桂祥,张安宁. 三个桃品种及其芽变品种(系)的花粉粒形态研究[J]. 山东农业科学,2017,49(10): 41-45.
LIU Wei, DONG Xiaomin, LI Guixiang, ZHANG Anning. Study on pollen grain morphology of three peach varieties and their bud mutation varieties (strains)[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2017, 49(10): 41-45.
- [12] 祝晨霖,徐国钧,徐珞珊,李萍. 猕猴桃属12种植物花粉形态研究[J]. 中国药科大学学报,1995,26(3): 139-143.
ZHU Chenchen, XU Guojun, XU Luoshan, LI Ping. Studies on the pollen morphology of twelve species of *Actinidia* [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1995, 26(3): 139-143.
- [13] 王玉柱,潘季淑,孟新法. 杏种质孢粉学的研究[J]. 华北农学报,1998,13(4): 131-136.
WANG Yuzhu, PAN Jishu, MENG Xinfu. A study on palynology of apricot germplasm[J]. Acta Agriculture Boreali-Sinica, 1998, 13(4): 131-136.
- [14] 韦仲新,徐廷志. 国产山龙眼科花粉形态及外壁超微结构的研究[J]. 云南植物研究,1993,15(3): 269-274.
WEI Zhongxin, XU Tingzhi. Pollen morphology and wall ultra-structure of Proteaceae in China[J]. Acta Botanica Yunnanica, 1993, 15(3): 269-274.
- [15] 王大江,王昆,高源,刘立军,龚欣. 苹果地方品种花粉形态分类及聚类研究[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(1): 84-91.
WANG Dajiang, WANG Kun, GAO Yuan, LIU Lijun, GONG Xin. Study on the pollen morphology, taxonomy and clustering of the local varieties of apples[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(1): 84-91.
- [16] 牛立新,张延龙. 中国野生葡萄花粉形态学研究[J]. 园艺学报,2000,27(5): 361-363.
NIU Lixin, ZHANG Yanlong. The study on pollen morphology of the wild *Vitis* varieties in China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(5): 361-363.
- [17] 王国霞,曹福亮,方炎明. 古银杏雄株花粉超微形态特征类型[J]. 浙江林学院学报,2010,27(3): 474-477.
WANG Guoxia, CAO Fuliang, FANG Yanming. Pollen morphology of ancient *Ginkgo biloba*[J]. Journal of Zhejiang Forestry College, 2010, 27(3): 474-477.
- [18] 魏国芹,李芳东,孙玉刚,孙杨,杨兴华. 甜樱桃20个品种花粉粒形态扫描电镜观察[J]. 果树学报,2014,31(增刊1): 41-47.
WEI Guojin, LI Fangdong, SUN Yugang, SUN Yang, YANG Xinghua. Observation of pollen grains of twenty sweet cherry cultivars with scanning electron microscope[J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(Suppl. 1): 41-47.
- [19] 李天庆. 中国木本植物花粉电镜扫描图志[M]. 北京:科学出版社,2011.
LI Tiangqing. Pollen flora of China woody plants by SEM[M]. Beijing: Science Press, 2011.

- [20] 张永芳,胡超琼,杨勇,朱仁胜,郭静,王仁梓. 柿属8种植物花粉形态观察[J]. 园艺学报,2016,43(6): 1167-1174.
ZHANG Yongfang, HU Chaoqiong, YANG Yong, ZHU Ren-sheng, GUO Jing, WANG Renzi. Pollen Morphology observation of eight resources in *Diospyros*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(6): 1167-1174.
- [21] 徐莉清. 部分中国原产柿属雄性种质的生物学特性及其新种质创制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
XU Liqing. Studies on the biological characters and new germplasm creation of some staminate germplasm in *Diospyros* L. native to China[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [22] 顾欣,张延龙,牛立新. 中国西部四省15种野生百合花粉形态研究[J]. 园艺学报,2013,40(7): 1389-1398.
GU Xin, ZHANG Yanlong, NIU Lixin. Pollen morphology observation of 15 wild lilies from four provinces in western China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(7): 1389-1398.
- [23] 埃尔特曼. 孢粉学手册[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 10-60.
ERDTMAN G. Handbook of palynology[M]. Beijing: Science Press, 1978: 10-60.
- [24] 张青林,罗正荣. 部分柿属雄性种质巨大花粉、花粉离体及其在罗田甜柿柱头上的萌发率[J]. 果树学报,2006,23(2): 293-296.
ZHANG Qinglin, LUO Zhengrong. Observation of giant pollen germination ability *in vitro* of some *Diospyros* spp. and their pollen germination on the stigma of *Diospyros kaki* cv. Luotian-shi[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(2): 293-296.
- [25] WALKER J W. 原始被子植物花粉外壁进化的意义[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
WALKER J W. The significance of evolution of the pollen ex-tine in primitive angiosperm[M]. Beijing: Science Press, 1980.
- [26] 王延秀,陈伯鸿,王淑华,胡紫璟,党兆霞,魏晓燕. 11个观赏海棠品种花粉形态扫描电镜观察[J]. 植物研究,2014,34(6): 751-757.
WANG Yanxiu, CHEN Baihong, WANG Shuhua, HU Zijong, DANG Zhaoxia, WEI Xiaoyan. SEM observation on pollen morphology of eleven ornamental crabapple varieties[J]. Bulletin of Botanical Research, 2014, 34(6): 751-757.
- [27] 刘伟,魏莹莹,周洁,王晓,耿岩玲,刘建华,李圣波. 不同木瓜种质资源花期生物学性状及孢粉学研究[J]. 中药材,2015,38(6): 1126-1130.
LIU Wei, WEI Yingying, ZHOU Jie, WANG Xiao, GENG Yanling, LIU Jianhua, LI Shengbo. Biological characteristics and pollen morphology of different chaenomeles species in flowering stage[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(6): 1126-1130.
- [28] 刘帅,丰震,徐艳,张红磊. 牡丹不同品种花期差异的生理机理研究[J]. 北方园艺,2012(3): 67-71.
LIU Shuai, FENG Zhen, XU Yan, ZHANG Honglei. Physiological differences in the mechanism of flowering of different varieties of peony [J]. Northern Horticulture, 2012(3): 67-71.
- [29] CHOI Y A. Physical mapping of 45S rDNA by fluorescent *in situ* hybridization in persimmon (*Diospyros kaki*) and its wild relatives[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2003, 78(2): 265-271.
- [30] GUO D L, LUO Z R. Genetic Relationships of some PCNA Persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis[J]. Genetic Resources & Crop Evolution, 2006, 53(8): 1597-1603.
- [31] GUO D, ZHANG H, LUO Z. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis[J]. Plant Science, 2006, 170(3): 528-533.
- [32] HU D, LUO Z. Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp. [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 109(3): 275-281.
- [33] 李高潮,王仁梓,杨勇. 柿种植物雄性种质资源[J]. 果树学报, 1996, 13(3): 199-200.
LI Gaochao, WANG Renzi, YANG Yong. Male germplasm resources of persimmon[J]. Journal of Fruit Science, 1996, 13(3): 199-200.
- [34] 谷晓峰,罗正荣. ‘禅寺丸’甜柿 2n 花粉形成机制的研究[J]. 园艺学报,2003,30(2): 135-140.
GU Xiaofeng, LUO Zhengrong. Studies on ‘Zenjimaruru’ persimmon 2n pollen formation mechanism[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(2): 135-140.
- [35] SUGIURA A, OHKUMA T, CHOI Y A, TAMURA M. Production of nonaploid (2n = 9x) Japanese persimmons (*Diospyros kaki*) by pollination with unreduced (2n = 6x) pollen and embryo rescue culture[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2000, 125(5): 609-614.
- [36] 唐仙英,罗正荣,蔡礼鸿. 植物未减数配子及其应用研究进展[J]. 植物科学学报,1999,17(Z1): 1-7.
TANG Xianying, LUO Zhengrong, CAI Lihong. Current research on unreduced gamete formation and its utilization in plant breeding[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1999, 17(Z1): 1-7.