

核桃属部分种的小孢子发生及核型研究*

穆英林** 郝荣庭 吕增仁

(河北农业大学园艺系, 保定 071001)

提 要 本试验采用常规压片法, 观察了核桃属 (*Juglans* L.) 四个种花粉母细胞 (4C) 的减数分裂过程和花粉形态, 检测了两个种的花粉生活力, 分析研究了七个种的核型。结果表明, 普通核桃 (*J. regia*) 核桃楸 (*J. mandshurica* Maxim.) 和黑核桃 (*J. nigra* L.) 的 PMC 减数分裂基本正常, 但河北核桃 PMC 的减数分裂过程极不正常, 供试的七个种, 除普通核桃为 2C 核型外, 其余均为 2B 核型, 仅黑核桃一种带有随体染色体。根据核型特点把七个种分成三组, 并探讨了组间与组内种间的亲缘演化关系。作者认为, 河北核桃应作为一种独立的种, 核桃科在系统发育上可能来源于染色体基数为 8 的两种不同植物。

关键词 核桃属; 小孢子发生; 核型

关于核桃科植物的分类与演化关系已在形态学^[12,19,20]、生物化学^[8]、孢粉学^[23-26]和地理学^[9]等方面有过许多研究。但核桃属 (*Juglans* L.) 植物的细胞学研究至今还很少且多集中于减数分裂的观察和染色体数目的确定^[2,8,13,19,27], 仅有两篇关于普通核桃核型的报道^[21,28]。为了进一步了解核桃的生物学特性, 研究利用核桃属的种质资源, 探讨各种间的亲缘演化关系, 本试验于1986—1988年观察了四个种的小孢子发生过程, 分析研究了七个种的核型。

材 料 和 方 法

材料 供试材料的名称、取样地点及取样部位详见表 1。

方法 小孢子发生采用常规压片法, 丙酸洋红染色, 花粉生活力用过氧化物酶法检测, 花粉孔计数及花粉大小采用变焦的方法每种统计测量 30 粒花粉, 体细胞制片用改良压片法^[10]。染色体计数和核型分析方法基本采用国内统一标准^[6], 分析中的计算和染色体命名按 Levan^[17]的报道, 核型类别采用 Stebbins^[22]分类标准。

本文于1989年1月22日收到。

* 本研究得到云南省漾濞核桃研究站杨振帮、中国林业科学院奚声珂、北京林业果树研究所李明亮等老师的大力支持, 在此一并致谢。

** 现在河北省农业投资公司工作 (石家庄 050051)。

表 1 供试材料的名称及来源

Table 1 The name and origin of experimental materials

种 名 Taxon	采 集 地 Habitat	取 样 部 位 Sampling part
普通核桃 <i>J. regia</i>	河北涞水 Laishui, Hebei	种子根尖 root tip
核桃楸 <i>J. mandshurica</i>	河北保定 Baoding, Hebei	茎尖、雄花序 Stem tip, staminate catkin
河北核桃 <i>J. hopeiensis</i>	河北保定 Baoding, Hebei	茎尖、雄花序 Stem tip, staminate catkin
云南核桃 <i>J. sigillata</i>	云南漾濞 Yangbi, Yunnan	种子、根尖 Seed root tip
心形核桃 <i>J. cordiformis</i>	河北保定 Baoding, Hebei	茎 尖 Stem tip
吉宝核桃 <i>J. sieboldiana</i>	河北保定 Baoding, Hebei	茎 尖 Stem tip
黑核桃 <i>J. nigra</i>	北 京 Beijing	茎尖、雄花序 Stem tip, staminate catkin

结 果 与 分 析

1. 四个种的小孢子发生

PMC 的分裂时期与进程

三年的观察表明, PMC 的分裂时期因不同年分、不同树种和同一花序的不同部位而有差异。整个分裂时期持续在 3 月 30 日至 4 月 10 日之间。PMC 减数分裂开始的标志是雄花序已较明显膨大, 同石荫坪^[2]的报道一致。观察的四个种, 除河北核桃外, 其它三个种的同一小花中不同花药间的 PMC 分裂时期基本同步, 而河北核桃则有较强的不同步性。这可能是由于河北核桃的同一小花中不同花药间的发育程度不同所致。

PMC 的减数分裂过程

普通核桃、核桃楸和黑核桃 PMC 的减数分裂过程基本正常。中期 I 极面观(图版 I: 2), 可看到 16 个双价体, 表明其染色体基数是 16, 为二倍体, 但在黑核桃的中期 I 则发现有次级配对现象(图版 II: 6); 侧面观(图版 II: 7)染色体整齐地排列在赤道板上, 核桃楸的还可看到明显的纺锤体(图版 II: 4); 后期 II, 4 组染色体被拉向两极(图版 I: 4); 但发现普通核桃和核桃楸的末期 I(图版 I: 3)、末期 II(图版 I: 5)较普遍地存在微核现象, 这种现象在小孢子中也偶而发现(图版 I: 7)。

河北核桃的大部分花粉母细胞减数分裂过程极不正常, 表现出了典型的杂种特性。前期的终变期, 染色体很不规则, 出现有单价体(图版 I: 10); 中期 I 染色体混乱地排在纺锤体上, 明显具单价体存在(图版 I: 11); 后期 I 和后期 II 有落后染色体, 数量 1—8 个不等(图版 I: 12, 13); 末期 I 和末期 II 具微核现象(图版 I: 14); 四分体时期可看到不正常的四分体(图版 I: 15)、六分体(图版 I: 16)、七分体(图版 I: 17)和八分体(图版 I: 18); 小孢子多为畸形并具微核现象(图版 II: 1)。

四个种有一共同特点, 即在前期的一段时期内存在着双核仁现象, 其特征是在大核仁的一侧紧附一小的核仁(图版 I: 1)。这在其它植物中还未曾见报道, 分析此现象, 认为可能与染色体复制有关, 因为核仁通过合成核糖体的前体分子而与蛋白质的合成密切相

关。增加一个小核仁等于相对地增大了核仁的表面积, 有利于核糖体前体分子的贮存和运输, 从而加快蛋白质的合成。

花粉生活力与花粉形态

用过氧化物酶法测定了普通核桃和河北核桃采后20小时的花粉生活力, 结果表明, 普通核桃的花粉生活力高达90% (图版 I: 9), 而河北核桃具生活力的花粉仅有30% (图版 II: 3)。普通核桃、河北核桃、核桃楸及黑核桃的花粉形态分别见图版 I: 8、图版 II: 2, 5, 9。萌发孔数目和花粉体积见表3。

表2 四个种的花粉孔数目及花粉体积

Table 2 Pore number and pollen size of 4 species

种名 Taxon	花粉孔数变化范围 Varying range of pore number	主要花粉孔数目 Main pore number	花粉体积 (微米) Pollen diameter (μm)
普通核桃 <i>J. regia</i>	13—18	16	42
核桃楸 <i>J. mandshurica</i>	6—9	8	38
河北核桃 <i>J. hopeiensis</i>	8—12	10	40
黑核桃 <i>J. nigra</i>	16—19	17	40

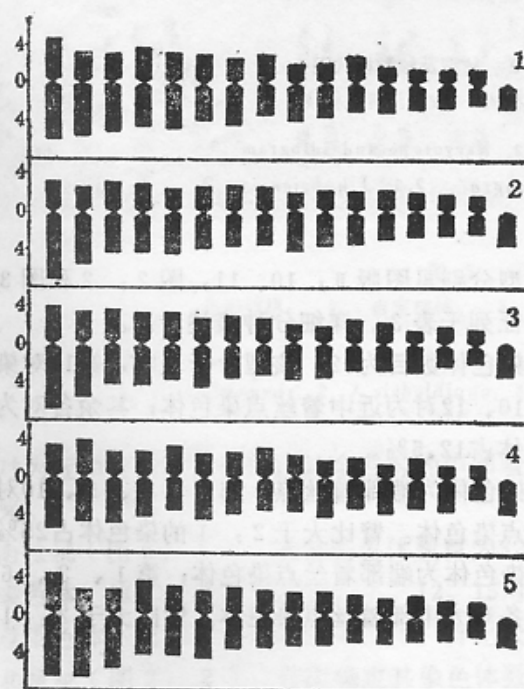


图1 核型模式图

1. 普通核桃;
2. 核桃楸;
3. 心形核桃;
4. 吉宝核桃;
5. 云南核桃

Fig. 1 Idiogram

1. *Juglans regia*;
2. *J. mandshurica*;
3. *J. cordiformis*;
4. *J. sieboldiana*;
5. *J. sigillata*

比较核桃楸、河北核桃、普通核桃的花粉形态可以看出，三者的花粉孔数目依次增加，花粉体积也逐个增大，而河北核桃的花粉则是另两者的中间类型。

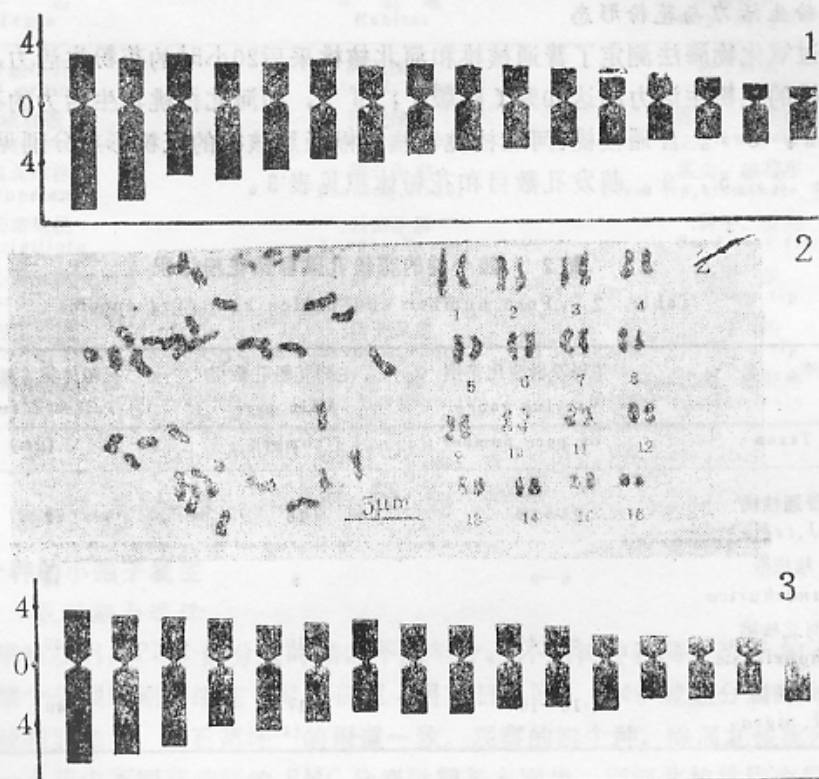


图2 核型及核型模式图

1. 黑核桃; 2,3. 河北核桃

Fig. 2 Karyotype and idiogram

1. *J. nigra*; 2,3. *J. hopeiensis*

2. 七个种的核型

七个种的染色体数目、形态及核型分别见图版Ⅱ：10、11，图2；2和图3，核型模式图见图1、图2，核型的主要特征列于表3。详细分种表述于后。

普通核桃（图版Ⅱ：10）确定染色体数目为32。核型分析表明，第16对染色体为端部着丝点染色体；第2、7、9、10、12对为近中着丝点染色体；其余各对为中部着丝点染色体。臂比大于2：1的染色体占12.5%。

核桃楸（图版Ⅱ：11）第16对染色体为端部着丝点；第1、2、5、10对为近中着丝点染色体；其余各对为中部着丝点染色体。臂比大于2：1的染色体占25%。

心形核桃（图3：1）第16对染色体为端部着丝点染色体；第1、2、6、9、10、13对为近中着丝点染色体；其余各对为中部着丝点染色体。臂比大于2：1的染色体占12.5%。

吉宝核桃（图3：2）第16对染色体为端部着丝点染色体；第1、3、6、10、

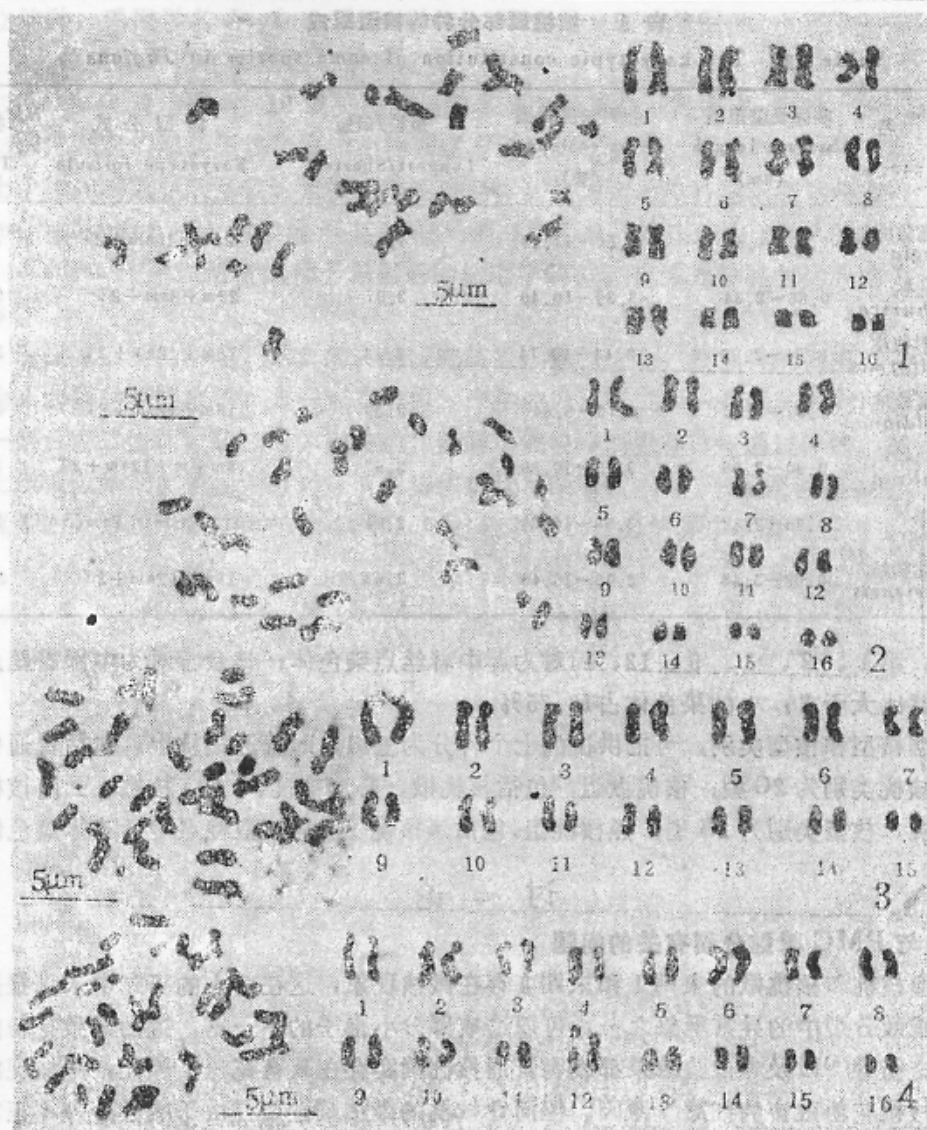


图 3

1. 心形核桃； 2. 吉宝核桃； 3. 云南核桃； 4. 黑核桃

Fig. 3

1. *J. cordiformis*; 2. *J. sieboldiana*; 3. *J. sigillata*; 4. *J. nigra*

12、14对为近中着丝点染色体；其余各对为中部着丝点染色体。臂比大于2；1的染色体占31%。

云南核桃（图3；3）确定染色体数目为32，是首次报道。第16对染色体为近端着丝点染色体；第1、2、4、5、7、12、15对为近中着丝点染色体；其余各对为中部着丝点染色体；第12对又是随体染色体。臂比大于2；1的染色体占31.25%。

河北核桃（图2；2）首次确定其染色体数目为32。第16对染色体为端部着丝点

表 3 核桃属部分种的核型组成

Table 2 The karyotypic constitution of some species in *Juglans*

种 名 Taxon	实际长度范围 Absolute length (μm)	相对长度范围 Relative length (%)	最长/最短 Longest/Shortest	核型公式 Karyotype formula	类别 Type
普通核桃 <i>J. regia</i>	1.00—4.47	2.50—11.18	4.47	20m+10sm+2T	2C
核桃楸 <i>J. mandshurica</i>	0.86—2.64	3.39—10.40	3.07	22m+8sm+2T	2B
心形核桃 <i>J. cordiformis</i>	0.84—2.63	3.43—10.74	3.13	18m+12sm+2T	2B
吉宝核桃 <i>J. sieboldiana</i>	0.80—1.90	3.70—8.84	2.39	18m+12sm+2T	2B
云南核桃 <i>J. sigillata</i>	0.80—2.86	3.05—10.89	3.57	18m+m+12sm+2T	2B
黑核桃 <i>J. nigra</i>	0.86—2.52	3.54—10.39	2.94	16m+12sm+2st+2sm(SAT)	2B
河北核桃 <i>J. hopeiensis</i>	0.98—3.46	2.96—10.46	3.53	18m+12sm+2T	2B

染色体；第1、2、3、5、12、14对为近中着丝点染色体；其余各对为中部着丝点染色体。臂比大于2:1的染色体占18.75%。

根据核型和核型类别，可把供试的七个种分为三组，即普通核桃组，包括普通核桃1种，核桃类别为2C型；核桃楸组，包括核桃楸、心形核桃、吉宝核桃、云南核桃和河北核桃，核型类别为2B型；黑核桃组，包括黑核桃1种，核型特点是具随体染色体。

讨 论

1. 与 PMC 减数分裂有关的问题

普通核桃和核桃楸的末期 I 和末期 II 存在微核现象，这在前人的研究中未见报道。微核是减数分裂中的异常现象之一，可以造成部分小孢子的不正常，进而导致花粉的败育，杨文衡等⁽⁴⁾以及本试验结果都表明普通核桃确实存在败育花粉。因此，微核现象有可能是核桃花粉败育的细胞学原因。但河北核桃的微核则主要是由于减数分裂不正常造成的，尤其是落后染色体，由于不能被正常地拉向两极，在分裂末期很容易形成小核，这样的小核使四分体时期形成许多不正常的多分体，从而造成大量花粉的畸形和败育。

胡先骕通过形态分类认为河北核桃是普通核桃和核桃楸的杂交种。花粉形态观察表明河北核桃的花粉孔数目及花粉体积均居两者的中间类型，河北核桃 PMC 减数分裂的不规则性也说明了它具有一般杂种所应有的细胞学特征。成锁占⁽³⁾利用同工酶技术也证实了河北核桃的酶谱是普通核桃和核桃楸的互补酶谱。因此，从形态学、孢粉学、细胞学以及酶学等方面基本上可以确定，河北核桃是普通核桃和核桃楸的杂交种。但是不同于核桃属内的其它杂种，如 *J. notha* (*J. sieboldiana* × *J. regia*)⁽²⁷⁾、*J. regia* × *J. nigra* 的杂种⁽¹⁶⁾ 等，它们的 PMC 减数分裂极不正常且具高度不孕性，河北核桃则有一小部分 PMC 分裂正常并能得到30%具生活力的花粉，还能结出果实，也就是说它具有自我繁衍的能力，另外，河北核桃也拥有一定的分布面积。所以，认为将其作为一

独立的种, 采用学名 *Juglans hopeiensis* Hu. 是有理论依据的。

2. 核桃科的染色体基数与系统发育

Stebbins 曾指出 $x=10$ 或更高的基数多是次级基数, 是由更低的“基数演化而来, 并推测它们起源于热带木本植物属或者已灭绝了的种。Woodworth⁽²⁷⁾ 通过对核桃科七个种的减数分裂观察认为核桃科同染色体基数为 8 的榛科植物在系统发育上有关。Hans⁽¹⁸⁾ 则认为 $x=16$ 的核桃科有可能是在白垩纪或早第三纪由 $x=8$ 的杨梅科加倍而来。Kudina⁽¹⁵⁾ 通过对核桃种子辐射后的细胞学研究, 也认为核桃科的原始染色体基数是 8。

通过本试验的研究, 结合前人的研究结果, 我们认为, 核桃科植物来源于染色体基数为 8 的两种不同植物, 是一双二倍体。产生的途径有二, 一是两种植物自然杂交, 生成一杂合古二倍体, 该二倍体因其杂合性而不能很好地生存, 便通过体细胞加倍或细胞学上未减数雌雄配子的结合形成双二倍体植物 (图 4: a); 一是两种植物的未减数配子直接结合形成双二倍体植物 (图 4: b), 这种情况在自然界中确有发生⁽¹⁴⁾。持上述观

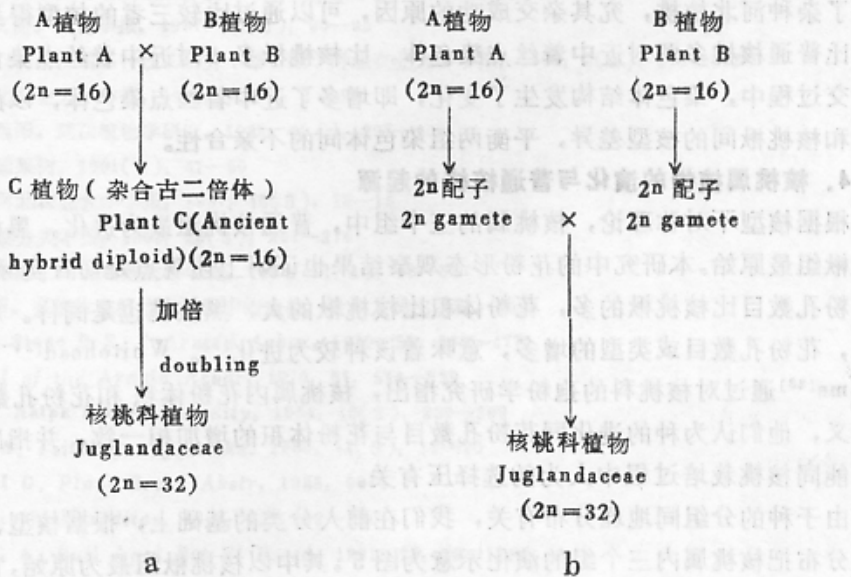


图 4 核桃科植物染色体基数变化的两种途径

Fig. 4 Two ways of the chromosome base number variation of Juglandaceae

点的理由如下: ①七个种的核型表明核桃科植物不具有同源四倍体的特点; ②减数分裂也证实了除河北核桃 (杂种) 之外, 染色体在中期均能形成正常的双价体, 而同源四倍体植物往往伴随着多价体的出现, 这就否认了核桃科是由一种植物加倍而来的可能性, 而双倍体植物一般来说减数分裂是正常的; ③在黑核桃的减数分裂中期 I 常发现有次级配对现象, 这是说明核桃科为双二倍体植物最直接的细胞学证据⁽¹⁴⁾; ④自然界中最为成功的多倍体是兼性生殖的植物, 即能够产生细胞学上有功能的减数和未减数配子体, 它们可以分别以孤雌生殖方式发育或通过有性生殖产生有生活力的种子⁽¹¹⁾, 核桃科植物正具有这一特性。

3. 七个种的核型分类与比较

前人^[12,19]主要根据形态学特征把核桃属的20余种分为4组,即普通核桃组、核桃楸组、黑核桃组和灰核桃组。本研究根据核型进行分组的结果同此基本吻合,这不但为核桃属内种的分组提供了细胞学依据,而且使之更臻深入和完善。同时,核型分组的结果也说明了核桃属内种的划分同地理分布有密切关系,如分布在北美的黑核桃组的核型同分布在东亚的核桃楸组的核型差异较大,但又不同于分布在欧、亚大陆的普通核桃组的核型。

核型不对称理论最早由 Levitzky^[18] (1931) 提出, Stebbins^[22] 丰富并发展了这一理论。核桃楸组内,各种的核型虽同属2B型,但各核型之间仍存在一定的差异(表2),主要表现在原产日本的心形核桃和吉宝核桃同核桃楸间的不同,前两者比核桃楸都多两对近中部着丝点染色体,而吉宝核桃臂比大于2:1的染色体所占的比率(31%)又多于心形核桃(12.5%),所以,这三个种中,吉宝核桃最为进化,其次为心形核桃,核桃楸最原始。

核型相同或相类似的种间容易杂交,但在核型差异较大的普通核桃和核桃楸之间却产生了杂种河北核桃,究其杂交成功的原因,可以通过比较三者的核型得到解释,河北核桃比普通核桃多两对近中着丝点染色体,比核桃楸多4对近中着丝点染色体,这表明在杂交过程中,染色体结构发生了变化,即增多了近中着丝点染色体,以此来消除普通核桃和核桃楸间的核型差异,平衡两组染色体间的不亲和性。

4. 核桃属植物的演化与普通核桃的起源

根据核型不对称理论,核桃属的三个组中,普通核桃组最为进化,黑核桃组其次,核桃楸组最原始。本研究中的花粉形态观察结果也证明上述观点是切合实际的,普通核桃的花粉孔数目比核桃楸的多,花粉体积比核桃楸的大,黑核桃也是同样。从孢粉学角度来看,花粉孔数目或类型的增多,意味着该种较为进化^[1]。Whitehead^[24-26]和 Stone、Broome^[23]通过对核桃科的孢粉学研究指出,核桃属内花粉体积和花粉孔数目具有分类学意义,他们认为种的进化同花粉孔数目与花粉体积的增加相一致,并指出体积的增加有可能同核桃栽培过程中人为的选择压有关。

由于种的分组同地理分布有关,我们在前人分类的基础上,根据核型、花粉形态和地理分布把核桃属内三个组的演化示意为图5。其中以核桃楸组最为原始,它由枫杨属演化而来,然后由于地理环境等因素的影响,分两路路线演化,一条沿黑核桃组进行,局

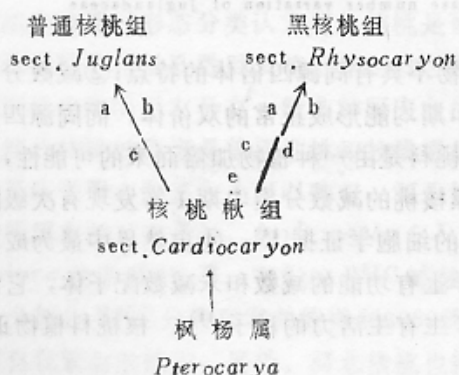


图5 核桃属内三个组的演化关系示意图

- 核型不对称性增加;
- 花粉孔数目增加;
- 花粉粒体积增加;
- 具随体染色体;
- 地理分化。

Fig. 5 The evolutionary relationship of the three sections in *Juglans*

- increase in karyotype asymmetry
- increase in pore number
- increase in pollen size;
- with SAT-chromosome;
- geographic differentiation.

限于北美一带并形成了不同的种群^[23]; 另一组路线则沿普通核桃进行, 广泛分布于欧亚大陆。

近年来, 我国一些学者^[5,7,9]通过考古、资源调查并根据古籍史书记载和核桃栽培历史及分布推断, 我国应为普通核桃的原产地之一。本试验从核型和花粉形态上进一步为这一观点提供了更为充分的依据。一个新种的形成, 往往发生于其原生种的分布中心或边缘地带。从种间演化关系来看, 普通核桃系由核桃楸组进化而来, 而核桃楸组原产东亚地区并一直繁衍至今, 这已无异议, 因此, 普通核桃极有可能在核桃楸组植物的分布中心或边缘地带——中国分化而成。当然, 探讨种间的演化关系是很困难的, 还需做进一步的工作。

参 考 文 献

- 中国科学院孢粉组译. 孢粉学手册, 科学出版社, 1978
- 石荫坪等. 果树小孢母细胞减数分裂的时期与形态标志. 山东农学院学报, 1981(1): 9—17
- 成锁占, 杨文衡. 园艺学报, 1987; 14(2): 90—95
- 杨文衡等. 核桃授粉结实特性的研究(第一报)河北农业大学学报, 1963; 2(2): 117—122
- 杨文衡. 河北农业大学学报, 1981; 7(2): 1—9
- 李懋学, 陈瑞阳. 武汉植物学研究, 1985; 4(4): 297—302
- 郝荣庭. 中国果树, 1981(4): 47—50
- 郭振怀等. 河北农业大学学报, 1987; 10(3): 10—15
- 路安民. 植物分类学报, 1982; 20(3): 257—274
- 穆英林, 郝荣庭. 河北农业大学学报, 1988; 11(4): 48—55
- W. H. 路易斯. 多倍体在植物和动物中的地位, 贵州人民出版社, 1984
- Cord L F, Stone D E. *J Arnold Arbor*, 1970; 51: 463—477
- Has A S. *J of the Arnold Arbor*, 1970; 51: 534—539
- Kompanna, Ralph Riley. *Heredity*, 1964; 19(2): 289—299
- Kudina G A. *Tsitologia igenetika*, 1980; 14(5): 18—20
- Komanich I G. *Plant Breed Abstr*, 1985; 9941
- Levan A et al. *Hereditas*, 1964; 52: 202—220
- Levitsky G A. *Bull Appl Bot Pl Breed*, 1931; 27: 19—174
- Manning W E. *Ann Misseuri Bot Garden*, 1978; 65: 1057—1087
- Miller R B. *Bot Gaz*, 1976; 137: 368—377
- Pogosyyan A I, Kartelev V G. *Plant Breed Abstr*, 1976; 10543
- Stebbins G L. *Chromosomal evolution in higher plant*, Edward Arnold, London, 1971
- Stone D E, Broome C R. *World Pollen and Spore Flora*, 1975; 4: 1—35
- Whitehead D R. *J of the Arnold Arbor*, 1963; 44: 101—110
- Whitehead D R. *J of the Arnold Arbor*, 1965; 46: 368—410
- Whitehead D R. *Evolution*, 1969; 23: 28—35
- Woodwarth R H. *Am J of Bot*, 1930; 17: 863—868
- Zakhar'eva O I. *Plant Breed Abstr*, 1985; 2903

MICROSPOROGENESIS OBSERVATION AND KARYOTYPE ANALYSIS OF SOME SPECIES IN GENUS JUGLANS L.

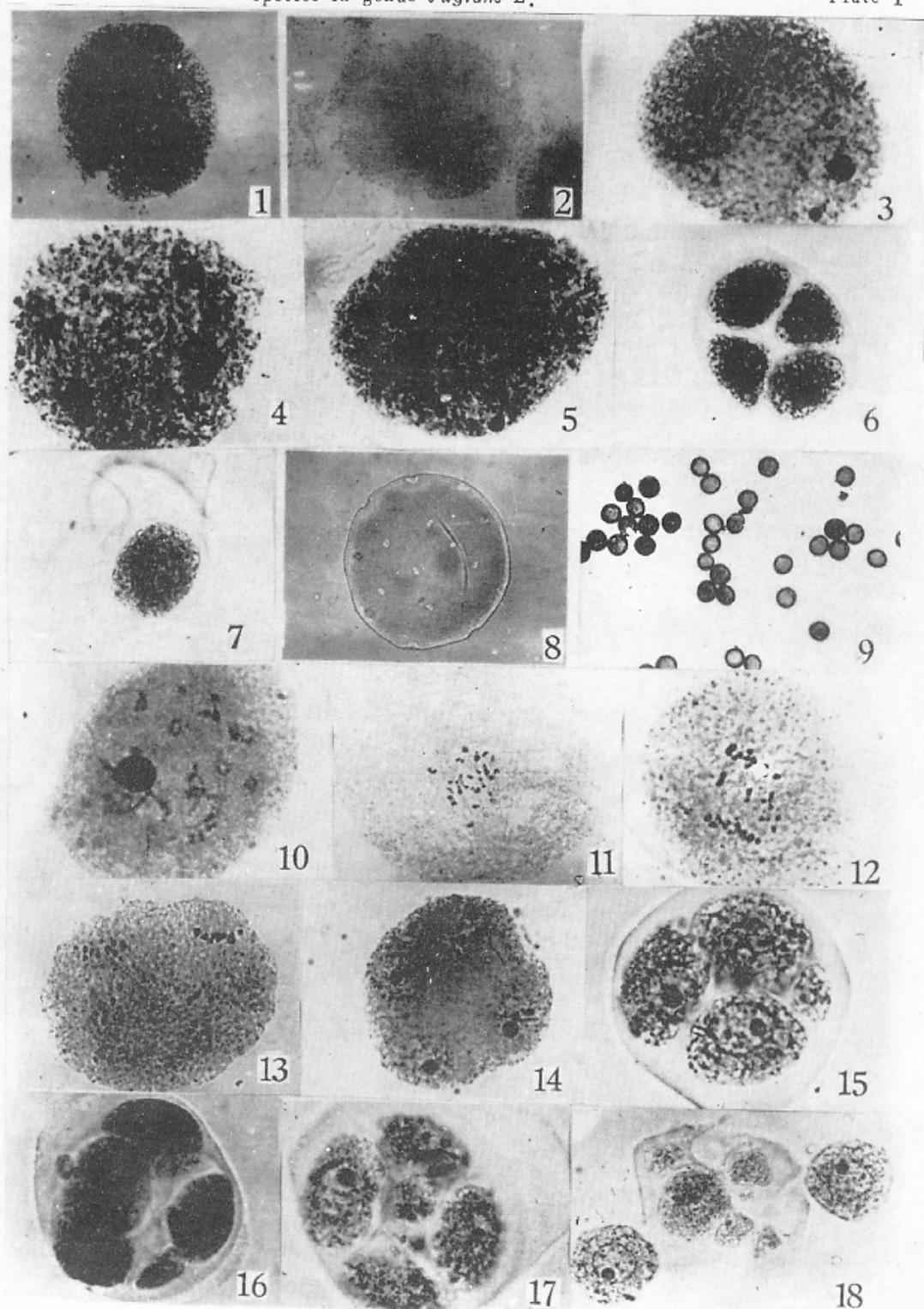
Mu Yinglin, Xi Rongting, Lü Zengren

(Department of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

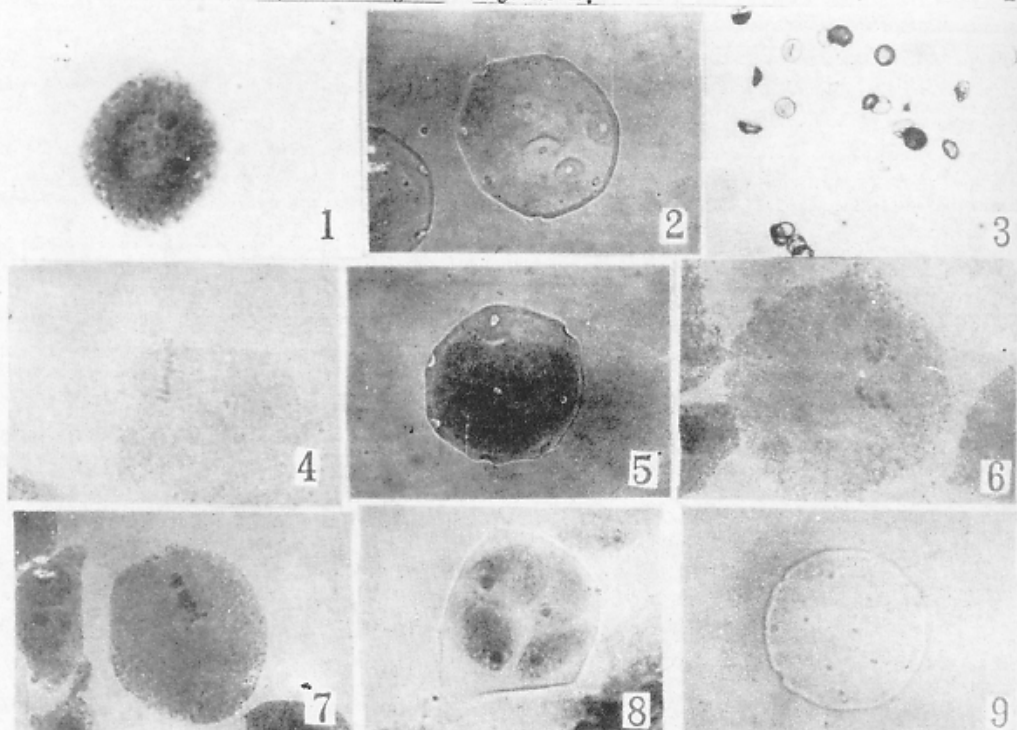
Abstract The PMC (pollen mother cell) meiosis process and pollen morphology of 4 species were observed and the pollen living activity of two species was measured. It was discovered that the PMC meiosis process of *J. regia*, *J. mandshurica* and *J. nigra* were basically normal, but that of *J. hopeiensis* was very irregular, i.e. univalent, lagging chromosome, micronucleolus and polyspory. The karyotypes of 7 species were analysed. They are as follows: *J. regia*: $2n = 2x = 32 = 20m + 10sm + 2T$; *J. mandshurica*: $2n = 2x = 32 = 22m + 8sm + 2T$; *J. hopeiensis*: $2n = 2x = 32 = 18m + 12sm + 2T$; *J. cordiformis*: $2n = 2x = 32 = 18m + 12sm + 2T$; *J. sieboldiana*: $2n = 2x = 32 = 18m + 12sm + 2T$; *J. sigillata*: $2n = 2x = 32 = 24m + 6sm + 2T$; and *J. nigra*: $2n = 2x = 32 = 16m + 12sm + 2st + 2sm(SAT)$.

According to the karyotype and pollen characters, 7 species tested were divided into 3 sections, and they are sect. *Juglans*, sect. *Cardiocaryon* and sect. *Rhysocaryon*. The evolutionary relationships among the sections and the species in one section were approached. The author considered that *J. hopeiensis* should be regarded as an independence species and the Juglandaceae was probably derived from two different plants with $x = 8$ in phylogeny, and supported the view that China should be one of the original places of *J. regia*.

Key words *Juglans*, Microsporogenesis, Karyotype



1-9. 普通核桃 *J. regia*; 10-18. 河北核桃 *J. hopeiensis*



1-3.河北核桃 *J. hopeiensis*; 4,5,11.核桃楸 *J. mandshurica*;

6-9.黑核桃 *J. nigra*; 10.普通核桃 *J. regia*