

枣自交及异交花粉与柱头互作特性

陈蕊红^{1*} 李坤² 张紫楠² 张思源² 何晓华³
刘汝懿¹ 曹文静¹ 张静¹

(1. 西北农林科技大学园艺学院, 园艺科学研究中心, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学林学院, 国家林业和草原局国家林业枣工程技术研究中心, 杨凌 712100; 3. 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

摘要 为了探究枣(*Ziziphus jujuba*)自交不亲和花粉与柱头相互作用的特征, 该研究比较了不同样品干燥方法对‘骏枣’(‘Junzao’)花柱样品的影响, 并对扫描电镜的加速电压及工作距离等参数进行系统优化。结果表明: 采用CO₂临界点干燥法进行骏枣花柱制备, 在扫描电镜工作距离为5.4~10.8 mm、加速电压为3.0 kV的扫描电镜优化条件下, 可获得高清晰度、高分辨率的枣柱头乳突细胞微观图像。基于优化后的扫描电镜技术体系, 该研究对‘骏枣’花柱微观结构、‘骏枣’自交(‘骏枣’×‘骏枣’)和异交(‘骏枣’×‘清涧酸枣’(‘Qingjian Suanzao’))后的花粉与柱头相互作用进行观察。结果表明, ‘骏枣’花柱为“二叉”型, 柱头表面由乳突细胞群组成, 单个乳突细胞直径为10~18 μm。‘骏枣’自交后花粉在柱头的黏附、水合、萌发和生长过程与异交后花粉在柱头生长特性无明显异常。进一步应用荧光显微镜观察发现, ‘骏枣’自交后花粉管生长至花柱通道1/2处停滞并表现出膨大和卷曲等现象, 而异交后花粉管则生长至花柱底部, 表明枣具有典型的配子体自交不亲和特性。该研究阐明了枣自交不亲和花粉与柱头识别及花粉管生长的动态特征, 对枣生殖生物学研究及指导杂交育种实践具有重要的科学价值和应用意义。

关键词 枣; 花粉; 柱头; 乳突细胞; 自交不亲和

中图分类号: Q944.44; S665.1 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2025.06.009

Characteristics of Pollen-Stigma Interaction in Self-Pollination and Cross-Pollination of *Ziziphus jujuba*

CHEN Ruihong^{1*} LI Kun² ZHANG Zinan² ZHANG Siyuan²
HE Xiaohua³ LIU Ruyi¹ CAO Wenjing¹ ZHANG Jing¹

(1. Horticultural Science Research Center, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100; 2. Jujube Engineer Technique Research Center of National Forestry and Grassland Administration, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100; 3. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100)

Abstract The aim of this study was to explore the characteristics of self-incompatible behavior between pollen and stigma during self-pollination of jujube (*Ziziphus jujuba*). The effects of different sample drying methods on jujube ‘Junzao’ flower stigma samples were compared by scanning electron microscopy (SEM), and the technical parameters of SEM acceleration voltage and sample working distance were systematically optimized respectively. The results showed that high-clarity and high-resolution microscopic images of jujube flower stigma papillae cells were obtained by using CO₂ critical point drying and optimized parameters of SEM working distance with 5.4–10.8 mm and acceleration voltage of 3.0 kV. Based on the optimized SEM system, the microstructure of jujube ‘Junzao’ stigmas and pollen-stigma interactions after self-pollination (‘Junzao’ × ‘Junzao’) and cross-pollination (‘Junzao’ × ‘Qingjian Suanzao’) were observed respectively. The results indicated that the pistil of jujube was a “bifurcate” type of pistil, the stigma surface was composed of clusters of

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31860223); 西北农林科技大学实验技术研究与实验室管理创新面上项目(SY20250204); 西北农林科技大学实验技术研究与实验室管理创新揭榜挂帅项目(SY20250101)。

第一作者简介: 陈蕊红(1975—), 女, 博士, 副教授, 主要从事枣树遗传育种研究。

* 通信作者: E-mail: chenruihong@nwfau.edu.cn。

收稿日期: 2025年6月3日。

papillae cells, the diameter of individual papillae cell was 10–18 μm . There were no significant differences in the adhesion, hydration, germination and growth of pollen on the stigma between self-pollination and cross-pollination. Further observations using fluorescence microscopy revealed that self-pollinated pollen tubes grew to 1/2 style channels and showed swelling and curling, while the cross-pollinated pollen tubes grew to the bottom of the style, indicating that jujube had a typical gametophytic self-incompatibility. This study systematically elucidated the dynamic characteristics of pollen-stigma recognition and pollen tube growth in self-incompatible jujube, which had important scientific value and application significance for understanding the reproductive characteristics of jujube and the guidance for practical hybrid breeding.

Key words *Ziziphus jujuba*; pollen; stigma; papilla cell; self-incompatibility

枣 (*Ziziphus jujuba*) 为鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属 (*Ziziphus*) 植物, 是我国传统特色经济林果树, 至今已有 3 000 多年的栽培历史^[1-2]。近年来, 中国枣产业发展迅速, 枣树栽植面积已达 150 万 hm^2 , 但枣树品种选育研究相对滞后, 究其原因主要是枣树花器官小、落花落果严重, 同时枣树存在自交不亲和 (self-incompatibility, SI) 现象^[3], 使得枣自交坐果率低, 严重影响了枣树的产量。生产中依赖赤霉素等促进单性结实, 提高枣坐果率, 但存在成本高、品质下降等问题。

自交不亲和性是显花植物通过阻止自交促进异交而进化出的一种生殖隔离机制, 主要表现为抑制花粉在柱头上的萌发、阻止花粉管侵入柱头组织, 以及阻碍花粉管顺利到达子房等^[4-5]。花粉与柱头相互作用是植物有性生殖的一个重要组成部分^[6]。植物授粉过程从花粉接触柱头开始, 依次经历黏附、水合、萌发及花粉管延伸, 最终到达胚珠完成受精^[7-8]。在植物自交不亲和系统中, 基于花粉识别特异性的遗传决定方式, 花粉与柱头的识别反应可发生在授粉过程的不同阶段, 如十字花科 (Brassicaceae) 的识别反应主要发生在花粉水合阶段^[9], 罂粟科 (Papaveraceae) 植物则在花粉萌发阶段启动不亲和反应^[10], 而车前科 (Plantaginaceae)^[11]、茄科 (Solanaceae)^[12]、蔷薇科 (Rosaceae)^[13] 等的识别过程则发生在花粉管抵达花柱道内部阶段生长受阻。前人研究^[14-15] 利用扫描电镜技术, 观察了甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 和油茶 (*Camellia oleifera*) 等物种自交不亲和系统中花粉与柱头互作的超微结构特征。然而, 在枣自交不亲和性研究中, 关于其自交不亲和类型及花粉在柱头黏附、水合、萌发等早期识别过程的研究仍较为缺乏, 限制了对枣自交不亲和机制的深入理解。

本研究比较不同干燥方法及扫描电镜工作距离、加速电压等技术参数对枣花柱样品形貌清晰度和分辨率的影响, 旨在建立适用于枣花柱样品

的扫描电镜优化技术体系。在此基础上, 进一步观察枣自交、异交花粉在柱头上的黏附、水合、萌发过程, 并结合荧光显微镜观察花粉管在花柱中的生长过程, 为深入解析枣自交不亲和性花粉与柱头识别的分子机制提供重要理论依据, 以期丰富枣生殖生物学研究资料, 同时也为枣的遗传改良和杂交育种工作奠定坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试栽培枣‘骏枣’ (*Ziziphus jujuba* ‘Junzao’) 和酸枣‘清涧酸枣’ (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa* ‘Qingjian Suanzao’) 材料, 均由西北农林科技大学清涧红枣试验站 (37°13'N, 110°9'E) 提供。

1.2 方法

1.2.1 枣花柱样品干燥方法及扫描电镜参数设置

于 2024 年 5 月中、下旬枣树的盛花期, 采集‘骏枣’柱头生长至分叉阶段 (即可授期) 的花朵, 用镊子去雄备用。

采用 3 种样品干燥方法。

自然干燥法: 取 10 朵上述去雄后的‘骏枣’花朵, 37 °C 干燥 1 周待用^[16]。

冷冻干燥法: 取 10 朵上述去雄后的‘骏枣’花朵, 以 FAA 固定液 (V(甲醛):V(冰醋酸):V(50%乙醇)=5:5:90) 进行固定^[17], 用 50%、70%、80%、90%、95% 乙醇各处理 15 min, 之后用 100% 乙醇脱水 2 次, 每次 30 min; 经乙醇梯度脱水后的骏枣花朵, 在 25%、50%、75% 叔丁醇梯度液中逐级脱乙醇各 15 min, 之后纯叔丁醇置换 30 min。将样品放入冷冻干燥仪 (VFD-21S, Hitachi, 日本) 并加入纯叔丁醇没过样品, 冷冻干燥 3 h 后待用^[17]。

CO₂ 临界点干燥法: 取 10 朵上述去雄的经 FAA 固定液固定并经乙醇梯度脱水的‘骏枣’花朵, 用乙酸异戊酯置换处理后在 CO₂ 临界点干燥仪

(K850, Quorum, 英国)中对‘骏枣’样品进行干燥。

扫描电镜参数设置:将以上3种方法干燥好的‘骏枣’花朵用导电胶粘在样品台上,应用离子溅射仪(GVC-1000, 格微, 中国)对样品进行真空喷金镀膜处理,电流设置为10 mA,溅射时间180 s。采用场发射扫描电镜(SU5000, Hitachi, 日本)并设置不同电压和不同工作距离对样品进行观察和拍照。

1.2.2 枣自交、异交花粉与柱头互作的扫描电镜观察

2024年5月中、下旬上午08:00—10:00,通过田间观察,选取盛花期待开放的‘骏枣’花蕾去雄后套袋。同时,采集直立未散开的‘骏枣’‘清涧酸枣’花蕾用镊子取下花药,在烘箱中28℃待花粉散出后,用棉签蘸取‘骏枣’或‘清涧酸枣’的花粉授粉于去雄后发育至分叉阶段的‘骏枣’柱头上,授粉后套袋。采集授粉0、3、12、24 h的枣自交(‘骏枣’×‘骏枣’)、异交(‘骏枣’×‘清涧酸枣’)的花朵至少各30朵在FAA固定液中固定^[16],4℃保存备用。

按照上述样品干燥方法及扫描电镜优化参数结果,对不同授粉时期的‘骏枣’自交、异交组合样品进行干燥处理。每10个样品为一组,重复3次,进行扫描电镜观察和拍照。

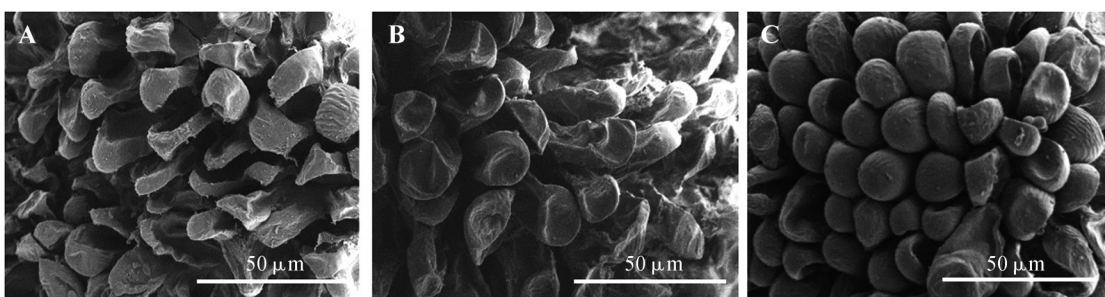
1.2.3 枣自交、异交花粉管生长荧光显微镜观察

授粉12、24 h的枣自交(‘骏枣’×‘骏枣’)或异交(‘骏枣’×‘清涧酸枣’)花朵各60朵在FAA固定液中固定后用镊子取出花柱,2 mol·L⁻¹ NaOH软化过夜,10%无水亚硫酸钠加热至透明,蒸馏水清洗2~3遍后,用1%苯胺蓝染色3 h。将体积分数65%甘油滴加到雌蕊样品中,轻轻盖上盖玻片。最后,在荧光显微镜(BX63, Olympus, 日本)下观察花粉管在花柱内的生长特性并拍照。自交、异交组合每组观察20朵,重复3次。

2 结果与分析

2.1 枣花柱扫描电镜技术参数体系优化

图1分别为自然干燥法、冷冻干燥法和CO₂临界点干燥法干燥的‘骏枣’雌蕊柱头样品。自然干燥法下,‘骏枣’柱头乳突细胞失去原有形态,表面发生严重收缩,扭曲变形,表面褶皱较为严重,不利于微观细胞结构的观察(图1A)。冷冻干燥法细胞形态基本正常,但样品形态不饱满,细胞缩水变形,细胞表面凹凸不平(图1B)。CO₂临界点干燥的‘骏枣’柱头,样品形态饱满无缩水,表面平整且细胞结构清晰,最大程度保持了样品原貌和真实结构,能够捕获近似自然状态的细胞超微结构(图1C)。因此,CO₂临界点干燥法更适合用于枣花柱头样品干燥制样。



A. 自然干燥法; B. 冷冻干燥法; C. CO₂临界点干燥法。

A. Natural air-drying method; B. Freeze-drying method; C. Carbon dioxide critical point drying method.

图1 不同制样方法对‘骏枣’柱头乳突细胞形貌的影响

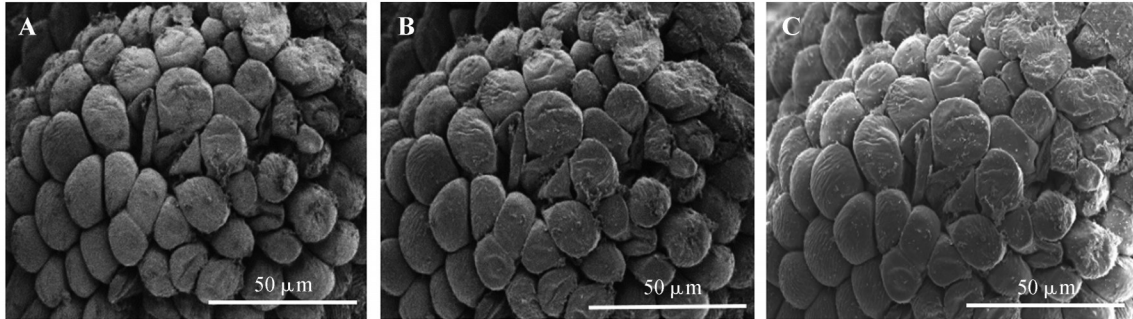
Fig.1 Effect of different sample preparation methods on the morphology of stigma papilla cells of cultivated jujube ‘Junzao’

图2为不同加速电压对枣柱头扫描电镜图像的影响,工作距离为5.5 mm,放大倍数为1 000×,加速电压为1.0 kV 低压时,‘骏枣’柱头乳突细胞表面细节清晰可见,但图像信噪比较低(图2A)。

在加速电压为3.0 kV时,获取的‘骏枣’柱头乳突细胞表面信息和1.0 kV电压基本一致,但分辨率和清晰度大幅提高,图像信噪比较高(图2B)。当加速电压为5.0 kV时,‘骏枣’柱头乳突细胞立体

感更强、分辨率更好(图2C),但表面信息和细节相对减少,同时,随着加速电压升高样品表面电荷积累增加,表面形貌清晰度受到一定影响。因此,比

较3种加速电压下‘骏枣’柱头表面形貌的变化可知,在加速电压为3.0 kV时,可获得高清晰度和高分辨率的‘骏枣’花柱乳突细胞微观图像。



A. 加速电压=1.0 kV; B. 加速电压=3.0 kV; C. 加速电压=5.0 kV。

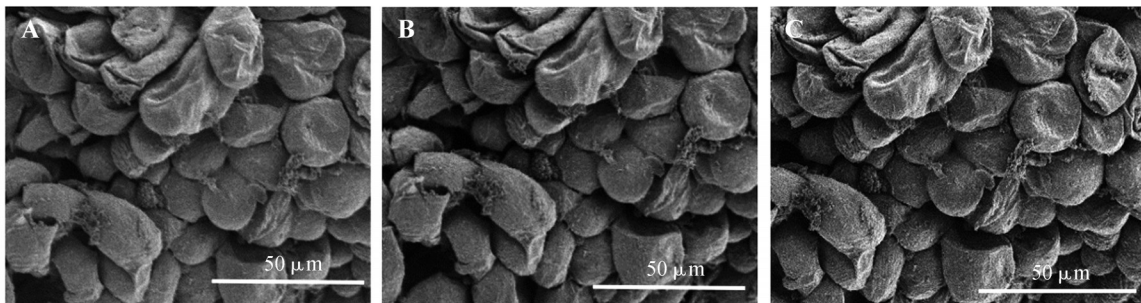
A.AV=1 kV; B.AV=3.0 kV; C.AV=5.0 kV.

图2 不同加速电压对‘骏枣’柱头乳突细胞形貌的影响

Fig.2 Effect of different acceleration voltages (AV) on the morphology of stigma papilla cells of cultivated jujube ‘Junzao’

图3为‘骏枣’雌蕊柱头在加速电压3.0 kV下,变换不同工作距离对‘骏枣’柱头形貌的影响。当工作距离设定为21.2 mm时,图像分辨率较低,乳突细胞表面形貌特征不清晰且缺乏立体感(图3A)。随着工作距离逐渐减小至10.8 mm,乳突细胞的表面立体感增强,图像清晰度和分辨率也显著提高(图3B)。当工作距离进一步降低至5.4 mm时,乳

突细胞的表面形态结构清晰,具有较强立体感,图像分辨率高(图3C)。相较于加速电压的影响,工作距离对样品形貌分辨率和清晰度的影响相对较小。在本研究中,工作距离在5.4~10.8 mm范围内,均能获得清晰的样品形貌和较高的分辨率,因此,可根据放大倍数等因素选择合适的工作距离。



A. 工作距离=21.2 mm; B. 工作距离=10.8 mm; C. 工作距离=5.4 mm。

A.WD=21.2 mm; B.WD=10.8 mm; C.WD=5.4 mm.

图3 不同工作距离对‘骏枣’柱头乳突细胞形貌的影响

Fig.3 Effect of different working distances on the morphology of stigma papilla cells of cultivated jujube ‘Junzao’

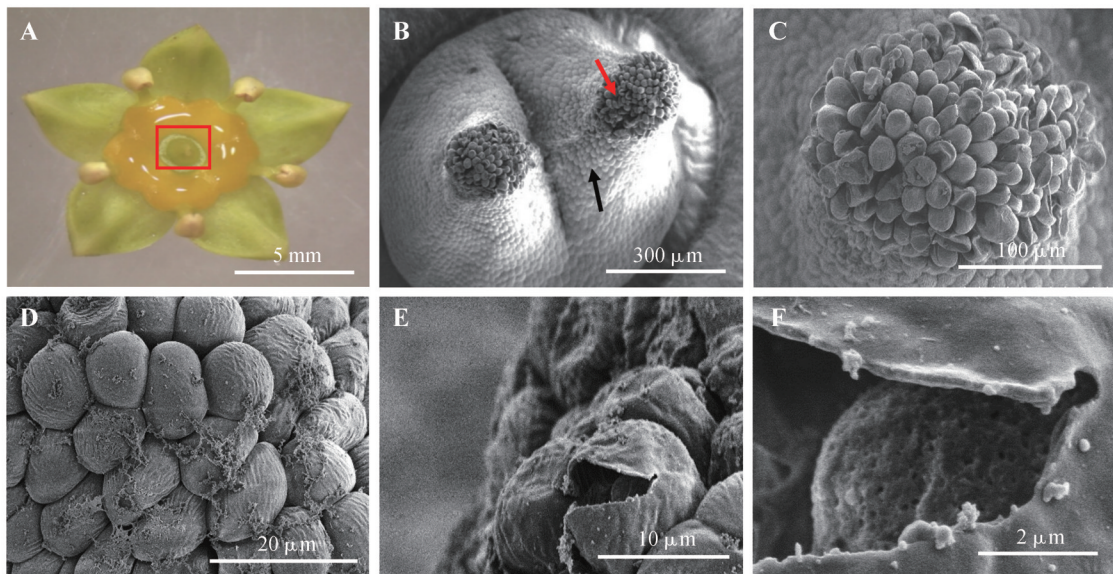
综上,通过对‘骏枣’柱头样品干燥方法、不同加速电压及工作距离的比较分析,得到适合‘骏枣’花柱最优的扫描电镜技术参数为CO₂临界点干燥法干燥样品、加速电压3.0 kV、工作距离在5.4~10.8 mm范围内,可获得高分辨率、高清晰度的枣花柱样品的微区形貌。

2.2 枣花柱及乳突细胞形态结构

花柱是枣自交不亲和反应的发生部位。在上述优化的枣柱头扫描电镜技术条件下,对‘骏枣’柱头及花柱微观形貌特征进行观察,以期为枣自交不亲和花粉-柱头识别提供形态学基础。枣花柱头具备接受花粉能力的发育时期为柱头分叉、

表面有黏液且蜜盘为桔黄色期(图4A)。扫描电镜下,‘骏枣’柱头呈“二叉型”(图4B),顶端紧密排列着由数千个乳突细胞构成的乳突细胞群,乳突细胞呈柱状,上粗下细,顶部为球状(图4C),直径与花粉粒直径相近,约为18~20 μm 。据此推算,一个枣花柱头可容纳近千个花粉粒,为花粉黏附

在柱头上提供更多位点。发育成熟的‘骏枣’柱头表面会分泌一层覆盖物,可辅助花粉黏附或水合,并可能为花粉萌发和识别提供必要的水分和营养(图4D)。乳突细胞破裂后,内部可见布满褶皱的球状内容物(图4E、4F)。



A.‘骏枣’花器官;B.图4A红色框区域放大后“二叉型”柱头微观形态;C.柱头上的乳突细胞;D.柱头乳突细胞上分泌的蛋白质;E.乳突细胞内含物;F.乳突细胞内含物局部放大图。红色框示‘骏枣’柱头。红色箭头表示枣柱头乳突细胞;黑色箭头表示枣花柱细胞。

A. Floral organs of cultivated jujube ‘Junzao’; B. The micrograph of the enlarged bifurcated type stigma within the red square area of Fig.4A; C. Morphology of the papilla cells; D. Proteins on the surface of papilla cells; E. Contents of the papilla cells; F. Enlarged view of the contents of the papilla cells. The red square indicated jujube stigma. Red arrow represented jujube stigma papilla cells; black arrow represented jujube style cells.

图4 扫描电镜下‘骏枣’柱头形貌

Fig.4 The stigma morphology of cultivated jujube ‘Junzao’ observed by SEM

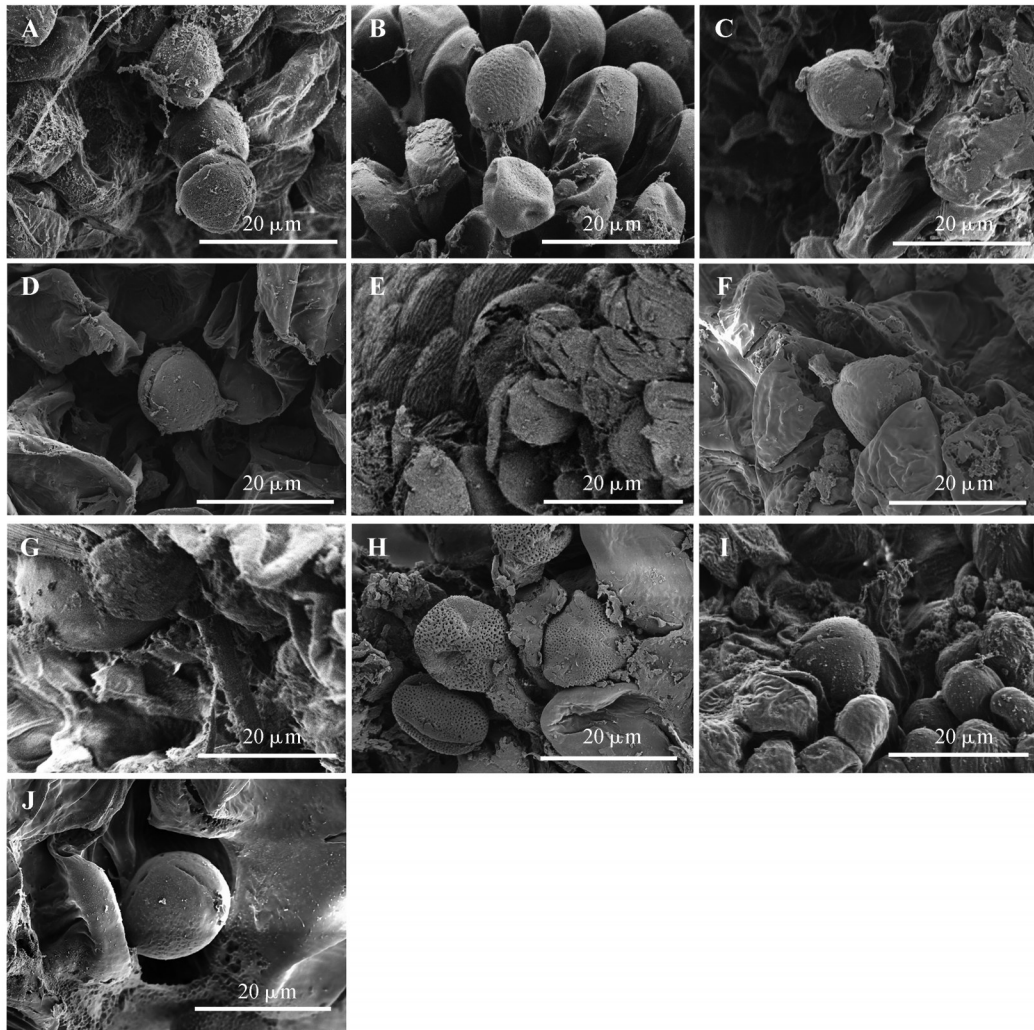
2.3 枣自交及异交花粉与柱头互作的扫描电镜观察

‘骏枣’及‘清涧酸枣’花粉粒为圆形或近圆形,具有3条狭长萌发孔沟,极面不汇合,萌发孔为三孔沟,孔沟宽窄深浅不一(图5A、5B)。扫描电镜下,枣自交0、3、12、24 h后观察花粉与柱头识别特性,以异交授粉作为对照。结果发现,枣自交或异交授粉0 h,柱头乳突细胞整体饱满无失水,可看到花粉粒黏附在乳突细胞上,并进行水合(图5C、5D)。在自交、异交授粉3 h后,可观察到水合后的花粉从萌发孔沟中萌发并生长,同时乳突细胞解体破裂。在自交、异交12 h后,可观察到花粉管生长并已伸入乳突细胞(图5E、5F),此时与之接触的乳突细胞进一步畸形、萎蔫。同时发现,当花粉粒从1个萌发沟萌发后,其他2个萌发沟自动萎缩。在自交、异交授粉24 h后,可看到萌发的花

粉管已穿过乳突细胞生长至花粉管通道(图5I、5J)。以上结果表明,枣自交不亲和及异交亲和的花粉与柱头识别相似,在柱头上均可正常地黏附、水合、萌发和生长。

2.4 枣自交、异交花粉管生长的荧光显微观察

为了进一步了解枣自交不亲和性花粉管在花柱通道的生长特性,应用荧光显微镜观察‘骏枣’自交或异交花粉管生长过程,发现在自交12 h后,花粉管生长至花柱1/3(图6A),生长速度与异交后花粉管生长速度基本一致(图6B);当授粉24 h后,自交花粉管生长至花柱中部并停止生长,生长停滞的花粉管末端荧光异常明亮,并表现出膨大和卷曲等不亲和现象(图6C),而此时异交授粉的花粉管则已抵达花柱底端(图6D)。依据以上结果可以看出,枣自交不亲和花粉与柱头的识别互作发生在花柱道内部。



A.‘骏枣’花粉粒形态;B.‘清涧酸枣’花粉粒形态;C. 自交授粉0 h后,花粉粒黏附、水合;D. 异交授粉0 h后,花粉粒黏附、水合;E. 自交授粉3 h后,花粉粒萌发,乳突细胞萎蔫;F. 异交授粉3 h后,花粉粒萌发,乳突细胞萎蔫;G. 自交授粉12 h,花粉管生长,乳突细胞受损;H. 异交授粉12 h,花粉管生长,乳突细胞受损;I. 自交授粉24 h,花粉管生长穿过乳突细胞进入花柱;J. 异交授粉24 h,花粉管生长穿过乳突细胞进入花柱。

A. Pollen grain morphology of cultivated jujube ‘Junzao’; B. Pollen grain morphology of sour jujube ‘Qingjian Suanzao’; C. At 0 h after self-pollination, pollen grains were being in adhered and hydrated status; D. At 0 h after cross-pollination, pollen grains were being in adhered and hydrated status; E. At 3 h after self-pollination, pollen grains were germinated, and papilla cells were wilted; F. At 3 h after cross-pollination, pollen grains were germinated, and papillae cells were wilted; G. At 12 h after self-pollination, pollen tubes grew, and papillae cells were damaged; H. At 12 h after cross-pollination, pollen tubes grew, and papillae cells were damaged; I. At 24 h after self-pollination, pollen tubes grew through the papillae cells into the style; J. At 24 h after cross-pollination, pollen tubes grew through the papillae cells into the style.

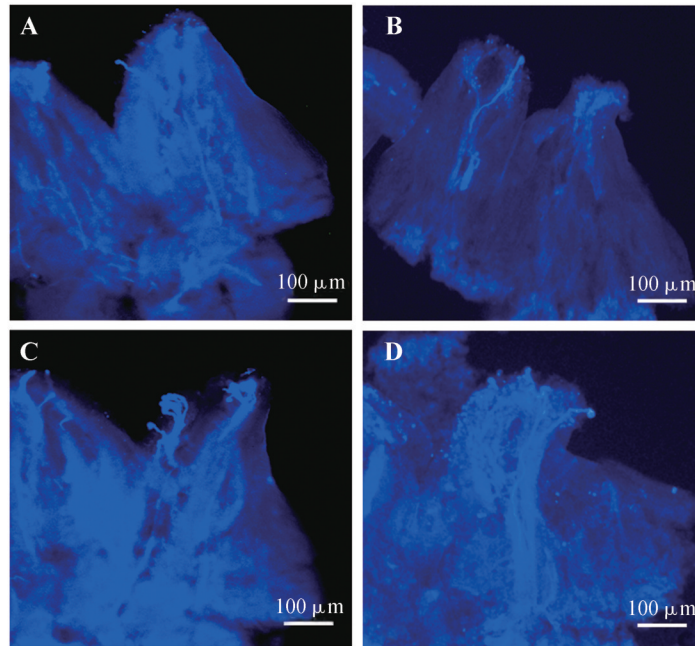
图5 枣自交及异交花粉与柱头互作

Fig.5 Pollen-stigma interaction between self-pollination and cross-pollination in jujube observed by SEM

3 讨论

样品干燥方法是影响扫描电镜图像质量的重要因素。自然干燥法是在自然温度下,样品干燥1周,比较费时,同时样品干燥时间较长会造成样品塌陷变形或微小断裂。该方法主要是通过热量和空气对流干燥样品,因此,适用于对有机溶剂敏感样品的制样,如观察植物样品中的蜡质等^[18]。

冷冻干燥法是在低真空条件下将样品快速冷冻成玻璃态样品,叔丁醇在低真空下由固相直接升华至气态,不经过液态阶段,避免了气-液相转变时表面张力对样品的损伤,以达到干燥样品的目的。但冷冻干燥过程中冷冻和脱水应力会对植物组织,尤其对幼嫩样品造成损伤变形,如本研究中枣花柱乳突细胞经冷冻干燥处理,出现形态扭曲、缩水等现象。CO₂临界点干燥法通过超临界流体使



A. 自交授粉 12 h 后,花粉管生长至花柱 1/3;B. 异交授粉 12 h 后,花粉管生长至花柱 1/3;C. 自交授粉 24 h 后,花粉管生长至花柱中部并停止生长;D. 异交授粉 24 h 后,花粉管生长至花柱底部。

A. At 12 h after self-pollination, the pollen tube elongated to 1/3 of the style; B. At 12 h after cross-pollination, the pollen tube elongated to 1/3 of the style; C. At 24 h after self-pollination, the pollen tube elongated to the middle of the style and stopped growing; D. At 24 h after cross-pollination, the pollen tube elongated to the base of the style.

图 6 枣自交、异交花粉管生长的荧光显微观察

Fig. 6 Fluorescence microscopic observation of pollen tube growth in self-pollination and cross-pollination of jujube

液态 CO₂ 直接转化为气态,避免气-液转变时的表面张力,能最大限度地减少样品收缩、皱缩,从而保持样品原始形貌,适用于幼嫩组织和易损伤样品的干燥处理。本研究中,通过对枣花柱样品 3 种干燥方法的比较发现,采用 CO₂ 临界点干燥法可清晰呈现乳突细胞的完整形态及其表面特征,为后续分析花粉与柱头互作提供了可靠的超微结构基础。

加速电压决定了电子枪发射电子的能量高低,不仅影响图像的分辨率和信噪比,还会影响样品的表面细节、荷电程度、损伤及边缘效应等。加速电压较高时,可获得更深层次的样品形貌特征,但样品荷电现象严重,容易掩盖表面形貌;而较低加速电压能够抑制荷电现象,可获得较清晰的样品表面及低衬度形貌,但图像的清晰度和分辨率会受到影响,因此,应该根据研究目的选择合适的加速电压。工作距离是指物镜末端到样品表面的距离,是影响图像质量的一个重要参数。通过对枣花柱在不同工作距离下的参数进行优化,发现电子枪工作距离对图像分辨率和清晰度影响较小,因此,在一定的工作距离范围内均可获得高质

量图像。

观察授粉过程发现,部分花粉粒会落到花柱表皮细胞上,初始阶段(0 h)花粉粒形态饱满,无失水(附图 1A,见本刊网站补充材料)。3 h 后花粉粒水合、萌发(附图 1B、1C),但 12 h 后花粉开始皱缩,水合的花粉管开始萎缩(附图 1D),24 h 后花粉粒进一步萎缩畸形,失去活力(附图 1E、1F)。这一系列观察结果表明,柱头乳突细胞作为特化组织,是花粉粒萌发的必需场所。当花粉粒落在非乳突细胞(如花柱表皮细胞)表面时,由于缺乏必要的花粉与柱头互作机制,无法建立有效的物质交换和信号传导途径,最终导致花粉管生长受阻并逐渐失活。前人研究^[19]发现,授粉后柱头乳突细胞的活性氧(ROS)水平明显下降,并证实了 ROS 水平的下降可促进花粉水合。同时,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现,落在柱头上的花粉通过花粉外被蛋白的 B 类小肽(POLLEN COAT PROTEIN B-class peptides, PCP-Bs)发出信号,与位于柱头顶端乳突细胞质膜上的受体激酶复合体直接相互作用,通过柱头的应答机制调控花粉水合作用^[20]。前人研究^[21]表明,自花花粉通过

FERONIA受体激酶信号通路,激活柱头乳突细胞产生ROS,从而阻止自花花粉的萌发与生长。本研究发现,当花粉粒附着于花柱乳突细胞表面,在自交授粉3、12、24 h后,与花粉直接接触的乳突细胞开始萎缩、破裂,最终解体。这一现象提示,花粉与柱头乳突细胞的直接物理接触可能是启动花粉管生长的关键前提条件。乳突细胞及其表面覆盖的分泌物可能为花粉的识别和萌发提供营养和信号物质,表面的特殊附着物可能含有参与识别反应的关键信号分子或酶类,但具体成分尚需进一步解析。

基于花粉识别特异性的遗传决定方式,自交不亲和性可分为孢子体(sporophytic self-incompatibility, SSI)与配子体(gametophytic self-incompatibility, GSI)自交不亲和性2类。孢子体自交不亲和的特征是花粉落在自身柱头上无法正常萌发,无法成功进入柱头。相比之下,配子体自交不亲和则表现为自花授粉或相同S基因型的异花花粉落在雌蕊柱头上花粉管生长受到抑制,难以伸长至胚珠,无法完成受精过程^[22]。本研究应用扫描电镜结合荧光显微镜对枣自花授粉后花粉与柱头相互识别及花粉管在花柱通道内的生长行为观察发现,‘骏枣’自花授粉后花粉能正常黏附、水合、萌发,而当花粉管进入花柱1/2处后生长被抑制,表明枣自交不亲和花粉与柱头识别发生在花柱内部,为配子体自交不亲和类型,研究结果与前人^[23]用荧光显微镜观察枣自交不亲和花粉管生长的结论一致。

配子体自交不亲和由S位点(S-locus)控制,即柱头特异表达*S-RNase*基因和花粉特异表达*SFB/SLF*基因^[24-25],其相互识别作用决定了花粉授粉过程中的亲和性。笔者前期在‘骏枣’基因组中鉴定到1个*S-RNase*基因^[26],*S-RNase*作为雌蕊自交不亲和决定因子具有核糖核酸酶活性,目前,普遍认为在配子体自交不亲和的授粉过程中,花粉管内部柱头中的*S-RNase*降解花粉管RNA,从而抑制自身花粉管的生长,导致自交不亲和^[27-28]。本研究获得的枣自交及异交后花粉与柱头相互作用的微观特性观察结果,为后续的枣自交不亲和分子机制研究提供了重要的形态学基础。后续可进一步通过分析自交、异交花粉-柱头相互作用的柱头ROS水平,以及自交、异交不同授粉时期花柱组织的转录组,解析花柱中相关基因表达、信号转导途径及花粉管生长的调控机制,以期深入揭示枣自交不

亲和花粉-柱头相互识别的分子机制。

4 结论

本研究采用CO₂临界点干燥法进行样品制备,以加速电压3.0 kV及工作距离5.4~10.8 mm为枣花柱柱头的最优扫描电镜技术参数。在此优化条件下,通过扫描电镜结合荧光显微镜观察枣花柱头微观结构及授粉后花粉与柱头微观识别过程,结果表明:自交不亲和花粉粒可在柱头进行黏附、水合、萌发和生长,但当花粉管生长到达花柱通道1/2处时,生长停滞,表现为配子体自交不亲和性特征。同时发现,与花粉接触的柱头乳突细胞破裂降解,表明乳突细胞可能为花粉水合和萌发等提供能量和信号物质。以上研究结果对于理解枣树自交不亲和生殖特性及指导杂交育种具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 曲泽洲,王永蕙.中国果树志:枣卷[M].北京:中国林业出版社,1993.
QU Z Z, WANG Y H. Chinese fruit trees record: Chinese jujube[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1993.
- [2] LIU M J, WANG J R, WANG L L, *et al.* The historical and current research progress on jujube: a superfruit for the future[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 119.
- [3] ASATRYAN A, TEL-ZUR N. Pollen tube growth and self-incompatibility in three *Ziziphus* species (Rhamnaceae)[J]. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 2013, 208(5/6): 390-399.
- [4] NETTANCOURT D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants[M]. New York: Springer, 2001.
- [5] ZHANG D Y, LI Y Y, ZHAO X W, *et al.* Molecular insights into self-incompatibility systems: from evolution to breeding[J]. Plant Communications, 2024, 5(2): 100719.
- [6] HATER F, NAKEL T, GROB-HARDT R. Reproductive multitasking: the female gametophyte[J]. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71: 517-546.
- [7] HESLOP-HARRISON J. Incompatibility and the pollen-stigma interaction[J]. Annual Review of Plant Biology, 1975, 26: 403-425.
- [8] HESLOP-HARRISON Y. The pollen-stigma interaction: pollen-tube penetration in *Crocus* [J]. Annals of Botany, 1977, 41(5): 913-922.
- [9] GUO L, HUANG Z Y, CHEN X Y, *et al.* SD-RLK28 positively regulates pollen hydration on stigmas as a PCP-B β receptor in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Integrative

- Plant Biology, 2023, 65(10):2395-2406.
- [10] 刘珠琴. 罂粟科植物自交不亲和反应中信号转导的研究进展[J]. 生命科学研究, 2010, 14(2):172-176.
LIU Z Q. Advances in signal transduction during self-incompatibility response of Papaveraceae[J]. Life Science Research, 2010, 14(2):172-176.
- [11] XUE Y B, ZHANG Y J, YANG Q Y, *et al.* Genetic features of a pollen-part mutation suggest an inhibitory role for the *Antirrhinum* pollen self-incompatibility determinant[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(5):499-509.
- [12] LI J H, ZHANG Y, SONG Y Z, *et al.* Electrostatic potentials of the *S*-locus F-box proteins contribute to the pollen *S* specificity in self-incompatibility in *Petunia hybrida*[J]. The Plant Journal, 2017, 89(1):45-57.
- [13] 何敏, 谷超, 吴巨友, 等. 果树自交不亲和和机制研究进展[J]. 园艺学报, 2021, 48(4):759-777.
HE M, GU C, WU J Y, *et al.* Recent advances on self-incompatibility mechanism in fruit trees[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(4):759-777.
- [14] 王婧瑜, 杨雯昕, 边靓, 等. 强冬性白菜型油菜自交亲和和系主要特征特性分析[J]. 中国油料作物学报, 2025, 47(2):289-301.
WANG J Y, YANG W X, BIAN L, *et al.* Characterization of the main feature in self-compatibility strong winter rapeseed (*Brassica rapa* L.) [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2025, 47(2):289-301.
- [15] 高超, 杨瑞, 郭其强, 等. 油茶柱头和花柱的显微与超微结构特征[J]. 林业科学研究, 2019, 32(1):1-7.
GAO C, YANG R, GUO Q Q, *et al.* Microstructure and ultrastructure characteristics of stigma and style of *Camellia oleifera*[J]. Forest Research, 2019, 32(1):1-7.
- [16] 肖媛, 刘伟, 汪艳, 等. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法[J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(5):45-53.
XIAO Y, LIU W, WANG Y, *et al.* Drying methods of biological sample preparation for scanning electron microscope[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2013, 32(5):45-53.
- [17] 贾维宸, 王宇, 董鹏媛, 等. 植物花粉与雌蕊结合方式的扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 2025, 44(2):219-227.
JIA W C, WANG Y, DONG P Y, *et al.* Scanning electron microscope observation on the binding mode of plant pollen and pistil[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2025, 44(2):219-227.
- [18] 徐国辉, 张明军, 王贺新, 等. 中国野生朝鲜越桔枝条蜡质组分及微观结构分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(16):5454-5462.
XU G H, ZHANG M J, WANG H X, *et al.* Analysis of wax components and microstructure in *Vaccinium koreanum* Nakai of China[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(16):5454-5462.
- [19] LIU C, SHEN L P, XIAO Y, *et al.* Pollen PCP-B peptides unlock a stigma peptide-receptor kinase gating mechanism for pollination [J]. Science, 2021, 372(6538):171-175.
- [20] WANG L D, CLARKE L A, EASON R J, *et al.* PCP-B class pollen coat proteins are key regulators of the hydration checkpoint in *Arabidopsis thaliana* pollen-stigma interactions[J]. New Phytologist, 2017, 213(2):764-777.
- [21] ZHANG L L, HUANG J B, SU S Q, *et al.* FERONIA receptor kinase-regulated reactive oxygen species mediate self-incompatibility in *Brassica rapa* [J]. Current Biology, 2021, 31(14):3004-3016.
- [22] FUJII S, KUBO K I, TAKAYAMA S. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility [J]. Nature Plants, 2016, 2(9):16130.
- [23] 侯思皓, 张钟, 李一荷, 等. 枣自交与异交花粉管生长行为及早期胚胎发育研究[J]. 果树学报, 2019, 36(11):1515-1523.
HOU S H, ZHANG Z, LI Y H, *et al.* Observation of pollen tubes behavior and early embryogenesis following self and cross-pollination in Chinese jujube [J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(11):1515-1523.
- [24] ENTANI T, IWANO M, SHIBA H, *et al.* Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity[J]. Genes to Cells, 2003, 8(3):203-213.
- [25] USHIJIMA K, YAMANE H, WATARI A, *et al.* The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*[J]. The Plant Journal, 2004, 39(4):573-586.
- [26] CHEN R H, CHEN G L, HUANG J. Shot-gun proteome and transcriptome mapping of the jujube floral organ and identification of a pollen-specific *S*-locus F-box gene[J]. PeerJ, 2017, 5:e3588.
- [27] KUBO K I, PAAPE T, HATAKEYAMA M, *et al.* Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of *S*-RNase-based self-incompatibility in *Petunia* [J]. Nature Plants, 2015, 1:14005.
- [28] AKAGI T, HENRY I M, MORIMOTO T, *et al.* Insights into the *Prunus*-specific *S*-RNase-based self-incompatibility system from a genome-wide analysis of the evolutionary radiation of *S* locus-related F-box genes[J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(6):1281-1294.