

石榴花芽石蜡切片制作方法的改良

陈利娜, 薛辉, 李好先, 牛娟, 张杰, 刘贝贝, 张富红, 赵弟广, 曹尚银*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州 450009)

摘要 [目的]摸索适合石榴花芽及胚珠结构观察的石蜡切片方法。[方法]以“突尼斯软籽”石榴花芽及胚珠为试材,在传统石蜡切片方法的基础上,结合石榴花芽鳞片厚、子房多室的特点,对样品处理、软化、透明、浸蜡、染色等重要制片环节进行研究。[结果]不同样品处理方式对比发现,将子房纵切4瓣进行固定,切片效果较好。软化结果表明,纱布包裹花芽浸入水中加热至沸腾30 min,有助于提高制片效果。不同染色方式对比发现,爱氏苏木精染色法更适合石榴胚珠切片观察。[结论]通过优化常规石蜡切片方法,得到了适合石榴花芽及胚珠结构观察的石蜡切片方法,该方法同样适用于与石榴花芽及胚珠结构类似的其他结构。

关键词 石榴;花芽;胚珠;石蜡切片

中图分类号 S665.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)02-0001-03

Improvements of Traditional Paraffin Section for Pomegranate Floral Bud

CHEN Li-na, XUE Hui, LI Hao-xian, CAO Shang-yin* et al (Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450009)

Abstract [Objective] To grope the suitable paraffin section method for pomegranate floral bud and ovule. [Method] The floral buds and ovules of Tunisiruanzi were used as experimental materials for paraffin sectioning to improve sample treatment. Given the character of pomegranate floral with thick bud scales and ovary of multicellular, the process of softening, clearing, waxing and staining were improved. [Result] To confirm the optimal fixation methods for different parts of ovary, we compared the different fixation methods and found that the best method is fixing after cutting the ovary into four parts using F. A. A. Softening results showed that if the floral bud was boiled for 30 minutes without stripping scales, the tissues would be complete. Paraffin section staining was performed with Ehrlich hematoxylin, which was the best material for staining for pomegranate floral bud and ovule. [Conclusion] A modified method of paraffin sectioning for pomegranate floral bud and ovule was recommended on the bases of the traditional method.

Key words Pomegranate; Floral bud; Ovule; Paraffin section

石榴(*Punica granatum* L.),为石榴科石榴属果树,在我国广泛栽培,且栽培历史悠久。石榴用途广泛、形态美观。石榴加工产品对癌症、冠状动脉心脏疾病、动脉粥样硬化、高胆固醇血症、高脂血症、高血压、传染性疾病等具有显著疗效^[1]。石榴花期长、花量大,但成花过程中发生严重的雌蕊败育,形成大量败育花,败育花的比率与坐果率呈负相关,是落花落果、坐果率低的主要原因^[2]。Wetzstein等^[3]对石榴2种不同类型花形态进行比较,发现石榴败育花的形成与其胚珠发育息息相关。因此,对石榴花芽及胚珠胚胎学进行研究尤为重要。

石蜡切片是胚胎学研究中常用的一种技术,作为一种辅助研究技术,广泛应用于植物花芽分化等研究^[4-12]。石蜡切片虽应用广泛,但传统制片方法并不完全适用于具有不同组织结构的植物或同一植物上不同部位。因此,需要根据植物的组织结构特点摸索适合的制片方法。石榴花芽鳞片厚且硬,每个石榴包含2 000多个胚珠,且其着生方位不一^[13],使得制片过程中切片和染色存在问题,利用传统石蜡切片制片效果不够理想。鉴于此,笔者以石榴花芽及胚珠为试验材料,在传统石蜡切片方法的基础上,结合石榴花芽鳞片厚及子房多室的特点,通过对固定、软化、透明、浸蜡、染色环节进行研究,探索了适合石榴花芽及胚珠石蜡切片制片的方法,以期为进一步从胚胎学角度研究石榴胚珠发育微观形态结构提供理论

依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为9年生“突尼斯软籽”石榴,以株距2 m、行距3 m栽植于中国农业科学院郑州果树研究所干果资源圃。选择新鲜完整的花芽、花蕾子房采样,于FAA固定液(90 mL 70%乙醇+5 mL冰醋酸+5 mL福尔马林)中固定24 h以上。

1.2 方法

1.2.1 常规石蜡切片法。按照陈延惠等^[14]的方法,将固定好的石榴花芽经30%、50%、70%、80%、85%、90%、95%、100%乙醇逐级脱水,每级停留30 min;脱水处理后的材料从无水乙醇转入二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)中停留30 min,再转入二甲苯中2次,每次停留30 min,进行透明处理;将石蜡与二甲苯分别按1:2、1:1、2:1比例配成混合液,将透明后的材料依次放入各混合液中浸蜡30 min,再于纯石蜡中浸蜡3次,每次停留20 min;将硬而光滑的牛皮纸折叠成纸盒,置于1块玻片上,将融化的熔点56~58℃的石蜡倒入纸盒中,先将浸蜡后的材料倒入其中,然后用烧热的镊子将材料排列整齐;切片厚度调为8~12 μm后进行切片,40℃恒温板上展片,35℃恒温箱中烘片2 d;二甲苯脱蜡20 min,随后转入二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)、无水乙醇、95%乙醇中各停留5 min;苯胺固绿染色40~50 s,95%、100%乙醇冲洗,然后转入二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)中停留1~2 min,最后二甲苯透明10 min。

1.2.2 改良后的石蜡制片法。整体试验流程与常规石蜡切片制片流程相似,包括固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片展片、

基金项目 中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2016-ZFRI-03);国家科技基础性工作专项(2012FY110100)。

作者简介 陈利娜(1991—),女,河南许昌人,硕士研究生,研究方向:果树遗传育种。*通讯作者,研究员,博士,博士生导师,从事果树遗传育种研究。

收稿日期 2016-11-08

染色、显微镜观察。但改良后的石蜡切片不对花芽鳞片进行剥除处理,而是对其进行软化处理,固定胚珠时将子房按照不同的切法进行固定,同时对透明、浸蜡、染色过程进行改良。

1.2.2.1 样品处理。石榴花蕾体积大,若将整个花蕾放入固定液无法完全固定其胚珠,采用以下 3 种方式固定石榴子房:①将子房纵切成 4 瓣进行固定;②沿石榴子房上、下两心皮接合处横切后下半部直接固定,上半部纵切 3 瓣进行固定;③直接将子房投入固定液中进行固定。

1.2.2.2 软化。花芽固定前不进行鳞片剥除,参考帅焕丽等^[15]对杏花芽石蜡制片方法的改良,对按照方式②固定后的花芽进行软化处理,同时以不作任何处理为对照,软化处理方式为将花芽用纱布包裹起来浸入水中,加热至沸腾后保持 30 min。

1.2.2.3 透明。脱水处理后的材料从无水乙醇转入二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)中停留 1 h,再转入二甲苯中 2 次,每次停留 1 h。

1.2.2.4 浸蜡。将材料从二甲苯中取出,放入石蜡-二甲苯混合液(1:2, V/V)中停留 2 h、石蜡-二甲苯混合液(1:1, V/V)中过夜(40℃恒温箱中操作),转入 56~60℃恒温箱的石蜡-二甲苯混合液(2:1, V/V)中停留 2 h,纯石蜡 3 次,每次停留 2 h。

1.2.2.5 染色。对固定软化后的材料分别进行番红-固绿二重染色及爱氏苏木精染色,对比 2 种染色方式差异,对染色方法进行改良。

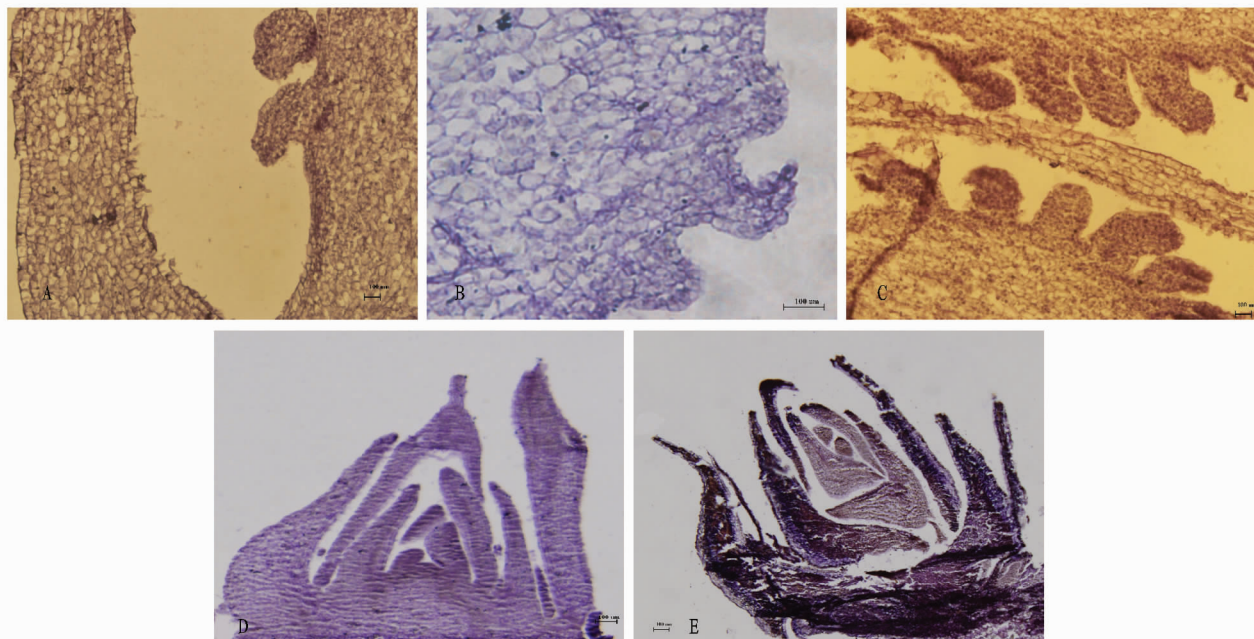
(1)番红-固绿二重染色。参照吴影^[16]乌柏花发育形态观察中染色方法,将软化后的材料番红染色 3 d,脱水(与

常规方法相同),透明与浸蜡按改良后的方法进行;包埋、切片、烘片;将烘干的切片放入二甲苯以脱去切片上的石蜡。脱蜡结束后进行番红-固绿二重染色,具体步骤:二甲苯 2 次,每次停留 20 min→二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)20 min→无水乙醇 2 min→95%乙醇 2 min→85%乙醇 2 min→固绿染液(无水乙醇配制)30 s→95%乙醇 2 min→无水乙醇 2 min→二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)2 min→二甲苯 2 次,每次停留 2 min。

(2)爱氏苏木精染色。参照崔娟^[17]甜樱桃花芽形态观察染色技术,软化后的材料脱水(与常规方法相同),透明与浸蜡按改良后的方法进行;包埋、切片、烘片;将烘干后的切片放入二甲苯以脱去切片上的石蜡。脱蜡结束后进行苏木精染色,具体步骤:二甲苯 20 min→二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)5 min→无水乙醇 5 min→95%乙醇 5 min→85%乙醇 5 min→80%乙醇 5 min→70%乙醇 5 min→50%乙醇 5 min→30%乙醇 5 min→苏木精染色,通风橱中通风 20~30 min→蒸馏水冲洗 1 min→30%乙醇 5 min→50%乙醇 5 min→70%乙醇 5 min→80%乙醇 5 min→85%乙醇 5 min→95%乙醇 5 min→无水乙醇 5 min→二甲苯-无水乙醇混合液(1:1, V/V)5 min→二甲苯 20 min。

2 结果与分析

2.1 不同固定方式及软化对浸蜡和切片的影响 图 1-A、B 样品按照方式①、②处理固定后,用改良的方法进行切片,材料浸蜡彻底,与蜡片贴合较好,胚珠结构完整,纵切效果较好,但是方式②操作复杂,且仍存在部分破损现象;图 1



注:A. 将子房纵切成 4 瓣进行固定;B. 将子房沿石榴上、下两心皮接合处横切后,下半部直接固定,上半部纵切 3 瓣进行固定;C. 直接将子房投入固定液中进行固定;D. 软化后切片效果;E. 未软化后切片效果

Note: A. Fixing after cutting the ovary into four parts; B. The bottom of carpel junction transection fixed directly, while the upper of carpel junction transection was cut into three parts before fixation; C. Fixing the ovary directly without any treatments; D. Section with softening; E. Section without softening

图 1 不同样品处理及软化后切片效果对比

Fig. 1 Compare of the result of different sample processing and softening

- C 按照方式③进行处理后,用改良的石蜡切片方法进行切片,按照方式③进行处理的切片效果不佳。该样品处理方式下浸蜡不够彻底,切片时组织周围存在裂痕,组织与蜡片分离,同时胚珠一部分被纵切一部分被横切,部分胚珠破损。将花芽用纱布包裹煮沸 30 min 进行软化处理比直接固定结果表现良好,结果见图 1 - D、E。这种软化方式在一定程度上减轻了因为石榴花芽鳞片厚固定不透造成的组织破损的现象。

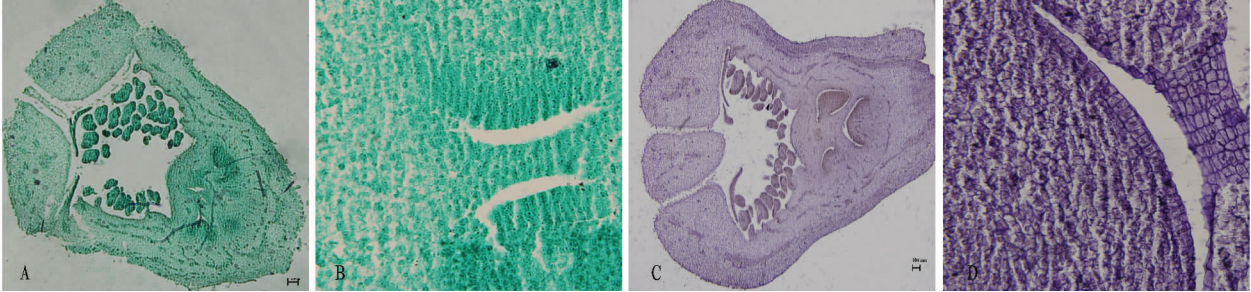
2.2 不同染色方式对制片效果的影响

2.2.1 番红 - 固绿二重染色效果。番红 - 固绿二重染色(图 2 - A)中番红染色采用整染的方式,即将花芽提前浸泡于番红中染色 72 h,然后进行脱水、包埋、切片等一系列过程。采用番红整染方式可使细胞核染色充分,细胞核清晰,

但石榴花芽整体染色效果不佳,染色后细胞轮廓不够明显(图 2 - B)。同时,番红 - 固绿二重染色耗时 73 h,较爱氏苏木精染色耗时长。

2.2.2 爱氏苏木精染色效果。爱氏苏木精染色(图 2 - C)不需要提前将组织整染,只需直接脱水、切片、染色,能很大程度上缩短染色时间,同时组织染色均匀,图片清晰。染色后细胞轮廓清晰(图 2 - D),但细胞核染色不如番红 - 固绿二重染色明显。但是在蒸馏水冲洗返蓝过程中易导致冲水过量组织脱落,结构破损或颜色变淡的情况。因此,爱氏苏木精染色方法适合石榴花芽及胚珠切片染色,但应注意染色过程中不要过度水冲洗,应严格把握染色时间。

图 2 - D 样品按照表 1 中改良后石蜡切片方法得到的图片,制片效果良好。



注: A. 番红 - 固绿染色法; B. 40 × 下观察番红 - 固绿染色下细胞轮廓; C. 爱氏苏木精染色法; D. 40 × 下观察爱氏苏木精染色下细胞轮廓
Note: A. Safranin and fast green double dyeing ; B. Cell structure observed in microscope 40 × which stained by safranin and fast green double dyeing ;
C. Ehrlich hematoxylin staining; D. Cell structure observed in microscope 40 × which stained by Ehrlich hematoxylin

图 2 不同染色方式结果对比

Fig. 2 The compare of different staining methods

表 1 常规石蜡切片与改良后石蜡切片方法对比

Table 1 The comparison of traditional and improved paraffin section

方法 Method	常规石蜡切片 Traditional paraffin section	改良后石蜡切片 Improved paraffin section
样品处理 Sample handling	花芽剥除鳞片;子房直接固定	花芽不进行鳞片剥除,用纱布包裹起来浸入水中,加热至沸腾 30 min;子房沿石榴上、下两心皮接合处横切后下半部直接固定,上半部纵切 3 瓣进行固定
脱水 Dehydration	30%、50%、70%、80%、85%、90%、95%、100% 乙醇逐级脱水,每级停留 30 min	30%、50%、70%、80%、85%、90%、95%、100% 乙醇逐级脱水,每级停留 30 min
透明 Transparent	二甲苯 - 无水乙醇混合液(1:1, V/V) 30 min → 二甲苯中 2 次,每次停留 30 min	二甲苯 - 无水乙醇混合液(1:1, V/V) 1 h → 二甲苯中 2 次,每次停留 1 h
浸蜡、包埋 Waxing embedding	石蜡 - 二甲苯混合液 1:2、1:1、2:1 3 个梯度,每梯度停留 30 min → 纯石蜡 3 次,每次停留 20 min	石蜡 - 二甲苯混合液(1:2, V/V) 2 h → 石蜡 - 二甲苯混合液(1:1, V/V) 中过夜(40 °C 恒温箱) → 石蜡 - 二甲苯混合液(2:1, V/V) 中 2 h (56 ~ 60 °C 恒温箱) → 纯石蜡 3 次,每次停留 2 h
切片、展片 Sectioning flatting	厚度 8 ~ 12 μm	厚度 8 μm
染色 Staining	苯胺固绿染色	爱氏苏木精染色

3 结论与讨论

试验结果表明,利用改良后的石蜡切片方法观察石榴花芽及胚珠组织结构完整,染色效果良好,该方法同样适用于与石榴花芽及胚珠结构相似的其他材料。

石榴花芽外面包裹多层角质化的鳞片,如果不采取任何处理很难得到理想的切片效果。传统石蜡切片是剥除鳞片的办法,但石榴花芽小^[18],特别是未分化期,鳞片结合紧密。因此,剥除鳞片操作繁琐,且易破坏花芽组织结构,改良后的制片方法增加软化步骤,能够避免剥除鳞片的复杂过程,同时能够改良其浸蜡效果。该研究表明,软化后的材料在不剥

除鳞片的同时使得石蜡更容易浸入组织内部,从而获得良好的制片效果。

另一方面,石榴萼片厚,花蕾大,子房多室,每个石榴花子房包含 2 000 多个胚珠,若将石榴整个子房固定于固定液中不能很好地固定胚珠,同时浸蜡效果也不佳。选择合适的切块固定及切片方位是石榴胚珠制片成功的关键因素。通过对比发现:采用纵切成 4 瓣进行固定或沿石榴上、下两心皮接合处横切后下半部直接固定,上半部纵切 3 瓣进行固定能获得良好的胚珠纵切图片,但按照后者方式操作复杂且操
(下转第 16 页)

物质的指标,同样影响着牧草的品质。但该研究发现镁肥的施用对 NDF 和 ADF 含量无显著影响,而添加适量镁肥可提高饲用大豆可溶性糖的含量。这可能是由于镁肥的施用提高了饲用大豆的光合能力。

缺镁会导致家畜出现“低镁症”,严重的会导致家畜死亡^[22]。因此,牧草中镁元素的含量至关重要。研究结果表明,镁肥添加显著提高饲用大豆中镁元素的含量,添加适量镁肥提高钾元素的含量。但是添加过量镁肥会降低饲用大豆中钙元素的含量,这可能是由于生物量增加的“稀释作用”或者是土壤中镁元素和钙元素的竞争作用。因此,该试验结果表明,合理的镁肥施用量可提高豆科牧草的产量和品质。

参考文献

- [1] FARHAT N, ELKHOUNI A, ZORRIG W, et al. Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning[J]. *Acta physiologiae plantarum*, 2016, 38(6): 1–10.
- [2] VERBRUGGEN N, HERMANS C. Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants[J]. *Plant and soil*, 2013, 368(1/2): 87–99.
- [3] DECHEN A R, CARMELO Q A C, MONTEIRO F A, et al. Role of magnesium in food production: An overview[J]. *Crop & pasture science*, 2015, 66(12): 1213–1218.
- [4] CAKMAK I. Magnesium in crop production, food quality and human health[J]. *Plant and soil*, 2013, 368(1): 1–4.
- [5] SENBAYRAM M, GRANSEE A, WAHLE V, et al. Role of magnesium fertilisers in agriculture: Plant-soil continuum[J]. *Crop & pasture science*, 2015, 66(12): 1219–1229.
- [6] 凌丽俐, 彭良志, 王男麒, 等. 缺镁胁迫对扭角尔脐橙叶绿素荧光特性的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(1): 71–78.
- [7] 汪洪, 褚天铎, 刘新保. 缺镁与正常供镁的菜豆组织结构比较研究[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(4): 63–67.

(上接第3页)

作过程中易破损胚珠结构。

传统石榴花芽制片方法采用苯胺番红整染后固绿复染^[19], 苯胺具有高毒性, 该研究采用改良后的石蜡切片方法, 避免使用苯胺, 同时改良染色效果, 缩短染色时间。对比番红-固绿二重染色及爱氏苏木精2种染色方法发现, 爱氏苏木精染色更适合石榴花芽染色, 但一方面需注意溶液配制的注意事项^[20], 另一方面要注意染色过程中水冲洗的程度及操作时间的把握。

制片结果中经常出现组织图片中带有黑色斑点现象, 有可能是载玻片或盖玻片上带有灰尘造成的。为避免灰尘影响制片效果, 应注意清洗盖玻片和载玻片。载玻片清洗: 1%~2%盐酸酒精(95%乙醇配制)浸泡6~12 h, 0.1%~0.2%氨酒精(80%乙醇配制)浸泡1 h; 盖玻片利用95%乙醇清洗12~24 h。

参考文献

- [1] SILVA J A T D, RANA T S, NARZARY D, et al. Pomegranate biology and biotechnology: A review[J]. *Scientia horticulturae*, 2013, 160: 85–107.
- [2] HOLLAND D, HATIB K, BAR-YA' AKOV I. Pomegranate: Botany, horticulture, breeding[J]. *Horticultural reviews*, 2009, 35(2): 127–191.
- [3] WEITZSTEIN H Y, RAVID N, WILKINS E. A morphological and histological characterization of bisexual and male flower types in pomegranate[J]. *Journal of the american society for horticultural science*, 2011, 136(2): 83–92.
- [4] CHUTINANTHAKUN T, SEKOZAWA Y, SUGAYA S, et al. Effect of bending and the joint tree training system on the expression levels of GA3- and GA2-oxidases during flower bud development in 'Kiyo' Japanese plum[J]. *Scientia horticulturae*, 2015, 193: 308–315.
- [5] 何见, 蒋丽娟, 李昌珠, 等. 光皮树花芽分化的形态和解剖特征观察[J]. *植物资源与环境学报*, 2009, 18(2): 57–61.

- [8] NEUHAUS C, GEILFUS C-M, MÜHLING K-H. Increasing root and leaf growth and yield in Mg-deficient faba beans (*Vicia faba*) by MgSO₄ foliar fertilization[J]. *Journal of plant nutrition and soil science*, 2014, 177(5): 741–747.
- [9] HUBER D M, JONES J B. The role of magnesium in plant disease[J]. *Plant and soil*, 2013, 368(1/2): 73–85.
- [10] MENGUTAY M, CEYLAN Y, KUTMAN U B, et al. Adequate magnesium nutrition mitigates adverse effects of heat stress on maize and wheat[J]. *Plant and soil*, 2013, 368(1/2): 57–72.
- [11] CAKMAK I, ENGELER C H, MARSCHNER H. Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency[J]. *Journal of experimental botany*, 1994, 45(9): 1245–1250.
- [12] HERMANS C, BOURGIS F, FAUCHER M, et al. Magnesium deficiency in sugar beets alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves[J]. *Planta*, 2005, 220(4): 541–549.
- [13] GUO W L, NAZIM H, LIANG Z S, et al. Magnesium deficiency in plants: An urgent realistic problem[J]. *The crop journal*, 2016, 4(2): 83–91.
- [14] 白由路, 金继运, 杨俐苹. 我国土壤有效镁含量及分布状况与含镁肥料的应用前景研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2004(2): 3–5.
- [15] 徐明岗. 镁肥南方红壤不可缺[J]. *农村实用技术*, 2005(7): 34.
- [16] 吴英. 镁在大豆营养中的作用[J]. *大豆科学*, 1998(2): 162–165.
- [17] 黄鸡翔, 陈福兴, 徐明岗, 等. 红壤地区土壤镁素状况及镁肥施用技术的研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2000(5): 19–23.
- [18] CEYLAN Y, KUTMAN U B, MENGUTAY M, et al. Magnesium applications to growth medium and foliage affect the starch distribution, increase the grain size and improve the seed germination in wheat[J]. *Plant and soil*, 2016, 406(1): 1–12.
- [19] YEMM E W, WILLIS A J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone[J]. *Biochemical journal*, 1954, 57(3): 508–514.
- [20] 郎漫, 刘元英, 彭显龙, 等. 不同氮肥用量下镁对大豆碳氮代谢的影响[J]. *大豆科学*, 2006, 25(1): 48–52.
- [21] KISS S A, STEFANOVITS – BANYAI, AKÁCS-HAJÓS M. Magnesium-content of *Rhizobium nodules* in different plants: The importance of magnesium in nitrogen – fixation of nodules[J]. *Journal of the american college of nutrition*, 2004, 23(6): 751–753.
- [22] MAYLAND H F, GRUNES D L. Soil – climate – plant relationships in the etiology of grass tetany[J]. *ASA special publication, grass tetany*, 1979, 35: 123–175.

- [6] BELLO M A, ÁLVAREZ I, TORICES R, et al. Floral development and evolution of capitulum structure in *Anacyclus* (Anthemideae, Asteraceae)[J]. *Annals of botany*, 2013, 112(8): 1597–1612.
- [7] 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 *Osmantus fragrans* L. and implications for the evolution to androdioecy[J]. *Plant systematics and evolution*, 2014, 300(5): 843–849.
- [8] 韦莉, 彭方仁, 王世博, 等. 蝴蝶兰 ‘V31’ 花芽分化的形态观察及几种代谢产物含量的变化[J]. *园艺学报*, 2010, 37(8): 1303–1310.
- [9] JIANG Y L, LIAO Y Y, LIN M T, et al. Bud development in response to night-breaking treatment in the noninductive period in red pitaya (*Hylocereus* sp.)[J]. *HortScience*, 2016, 51(6): 690–696.
- [10] CEVRIYE M, BARUT E, IPEAK A. Variation in flower bud differentiation and progression of floral organs with respect to crop load in olive[J]. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj-napoca*, 2013, 41(1): 79–85.
- [11] FAN Z Q, LI J Y, LI X L, et al. Genome-wide transcriptome profiling provides insights into floral bud development of summer-flowering *Camellia azalea*[J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 9729.
- [12] 赵长竹, 姜建福, 张慧琴, 等. 甜樱桃花芽分化后期特征观察[J]. *果树学报*, 2012, 29(1): 42–48.
- [13] WEITZSTEIN H Y, YI W, PORTER J A, et al. Flower position and size impact ovule number per flower, fruitset, and fruit size in pomegranate[J]. *Journal of the american society for horticultural science*, 2013, 138(3): 159–166.
- [14] 陈延惠, 胡青霞, 宋尚伟, 等. 河阴铁皮石榴春季花芽形态分化特点初步研究[C]//第五届全国干果生产、科研进展学术研讨会论文集. 北京: 中国园艺学会干果分会, 2007: 247–251.
- [15] 帅焕丽, 杨述熙, 魏安智, 等. 杏花芽石蜡切片方法的改良[J]. *果树学报*, 2011, 28(3): 536–539.
- [16] 吴影. 乌柏花芽转录组测序分析及花发育调控机制研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2015.
- [17] 崔娟. 影响南京地区甜樱桃坐果的关键时期及其机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [18] RAJAEI H, YAZDANPANAH P. Buds and leaves in pomegranate (*Punica granatum* L.): Phenology in relation to structure and development[J]. *Flora-morphology, distribution, functional ecology of plants*, 2015, 214: 61–69.
- [19] 蔡永立, 朱立武, 卢心固, 等. 粉皮石榴花芽分化研究[J]. *园艺学报*, 1993, 20(1): 23–26.
- [20] 李和平. 植物显微技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.