

磨盘柿杂交种种皮异常突起形成分析

李壮¹ 扈惠灵^{1,2} 李晨夕¹ 冷平¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 河南科技学院 园林系, 河南 新乡 453003)

摘要 磨盘柿是优良的育种资源,然而与日本甜柿杂交,正常种子仅有8%左右,大部分种子败育。败育种子中80%以上由异常突起引起。异常突起于授粉后40d左右在种孔处产生,以后不断膨大,导致种孔附近的种皮腐烂、破裂,胚乳退化外漏,最终种胚死亡、种子败育。本实验旨在研究异常突起形成的原因,揭示磨盘柿杂种败育的机制,以期提高磨盘柿种质资源的利用效率。为此,从形态学、组织学上对突起种子的形成进行了研究。结果显示:1)突起产生在相邻子房室的孔隙内,一般在受粉后40d发生,并在突起处种皮腐烂变黑;2)授粉后45d,带突起的种子在突起处的胚乳细胞个体大、细胞壁薄且破裂,细胞核退化;3)在授粉后132d,带有异常突起的种子发育速度快,胚乳分裂旺盛,种子饱满;种胚分化速度快,且分化时期比正常胚提前5d以上。研究认为种子发育速度比子房室的生长过快。在胚乳和果肉的双重挤压下,种皮在2个子房室间的孔隙中突出,产生了异常突起。

关键词 磨盘柿; 异常突起种子; 子房室孔隙; 发育速度; 胚乳细胞

中图分类号 S66; S334.2

文章编号 1007-4333(2007)04-0029-06

文献标识码 A

Cause of abnormal protuberant hybrids coat of 'Mopanshi' persimmon

Li Zhuang¹, Hu Huiling^{1,2}, Li Chenxi¹, Leng Ping¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094 China;

2. Department of Horticulture, Henan Institute of Science & Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract Mopanshi was crossed as a female parent with Ze njimaru and Taishu, the Japanese nonastringent cultivar, and the resulting hybrids were studied. Only a few seeds (about 8%) were normal, but more than 90%, were abnormal. More than 80% of abnormal seeds were induced by protuberance around the hilum. Histological and morphological observations for improving germination rate and use of the germplasm resource, showed that: 1) Protuberance occurred at the aperture between two neighboring locules 40 d after pollination, frequently with black spot production. 2) The protuberant endosperm cells were characterized by large degenerate nucleus and thin, usually collapsed cell wall, 45 d after pollination. 3) Comparatively, the protuberant seed grows faster, inside which, the endosperm for seed plumpness and an embryo that develops 5 d faster than normal seed exhibits vigorous differentiation and growth, 132 d after pollination. Our primary conclusion is that the protuberance was produced in an aperture between two neighboring locules following pressure between fast growing seeds and limited space between locules.

Key words Mopanshi; abnormal protuberant seed; hole between two neighboring locule; grows faster; endosperm cells

柿起源于我国,种质资源丰富有近千个品种^[1-2],但新品种少,大部分为涩柿品种,不能自然脱涩。而甜柿可以自然脱涩,但需要较高的积温,在我国北方大部分地区不能直接栽种^[3]。因此开展甜、涩柿间的杂交育种,培育出适合北方栽种的甜柿

新品种具有重要意义。磨盘柿(*Diospyros kaki* Thunb. cv. Mopanshi)是我国北方的主栽涩柿品种,果大汁多,鲜食品质极优,无裂果和褐斑,抗寒抗旱性强,仅着生雌花,是常规杂交育种中极好的母本资源^[4]。近年本课题组以磨盘柿作母本以日本优

收稿日期: 2007-01-12

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6052013)

作者简介: 李壮, 博士研究生, E-mail: lizhuang750726@163.com; 冷平, 教授, 通讯作者, 主要从事果树生物技术育种, E-mail: leng.p@263.net

良甜柿为父本,开展杂交育种工作,期望通过两代以上的杂交选育^[5-6],培育出大果优质、抗逆性强,适合北方栽种的优良甜柿新品种。但经过数年杂交实践发现,受粉父本不同致使磨盘柿结籽率不同,中途败育比率极高,正常种子仅8%左右^[4]。大部分种子成熟后(80%以上)在种孔处带有异常突,突起处种皮发生黑化腐烂最终导致种子败育,但引起磨盘柿杂种败育的这种异常突起国外尚未见报道。另外,甜、涩柿杂交后代(至少在F₂代)中,甜柿比例较小^[5-6],需要筛选大量群体才有可能选育出优良甜柿植株。因此,解决种孔处突起导致的杂种败育问题,获得大量的可育种子是杂交育种顺利进行的保障。

本文旨在通过形态组织学研究,探讨种皮异常突起形成原因,揭示杂种败育机制。

1 材料与方法

1.1 材料

杂交母本为北京昌平区燕南果树种植园11年生磨盘柿树,父本品种为日本完全甜柿太秋和不完

全甜柿禅寺丸,种植于中国农业大学科学园柿品种资源圃温室。

1.2 方法

2006-05-28盛花期授粉,授粉后5、10、20、30、40、55和132 d(生产采收期)采收果实、剥种,统计各种类型杂种数量。

在05-28授粉当天、授粉后2、5、10、15、30、40、45、55和70 d分别采收果实30个,剥取胚珠,FAA固定常规石蜡切片,铁矾叔木精、固绿二重染色,OL YMPUS BX51显微镜拍摄,组织学观察。

2 结果与分析

2.1 磨盘柿杂种分类

调查发现,磨盘柿杂种分为发育种子和不发育种子。不发育种子授粉后10 d即停止生长,长度在0.2~0.3 cm之间,直到果实成熟种子变为深褐色,大小基本不发生变化(图1-1,左侧为授粉后10 d种子,右侧为授粉后132 d的种子)。发育的种子在成熟期主要表现为3种形态:正常种子、早期败育、带突起种子。各类型种子比例见表1。

表1 成熟期磨盘柿杂种形态

Table 1 Seed morphology of Mopanshi after fruit ripening

父本品种	果实数量	正常种子数	早期败育种子数	带突起种子数			种子数合计
				种皮完整	种皮破损	瘪种子	
禅寺丸	79	6(11.5)	3(5.8)	13(25)	11(21.2)	19(36.5)	52
太秋	64	4(6.2)	2(3.1)	23(35.4)	19(29.2)	17(26.2)	65

注:括号内为各类型种子的百分率, %。

正常种子成熟时种皮完整、光滑,无异样突起和破损。但种子并不饱满,四周略鼓,中部微有凹陷,成熟时种子长度在2.0 cm左右(图1-2a)。

早期败育发生在授粉后30 d左右(图1-3左侧为授粉后30 d的败育种子,右侧为同时期的正常种子)。首先种皮在合点处变黑,随后黑化面积不断扩大,40 d后种子的大部分变黑停止生长,长度在0.7~1.0 cm之间。成熟时胚和胚乳退化,种皮内成空腔,种子败育(图1-2e),但种皮始终保持完整。这部分种子较少不足5%。

带突起的种子占发育种子的80%以上,成熟时表型差异很大形成过程复杂。

2.2 突起种子发生时期和形态特征

依据成熟期表观形态,把带突起的种子分成3

种类型:种皮完好种子、种皮破损种子和瘪种子。

突起发生时期较为集中,一般授粉后40 d左右,种脐处产生膨大(图1-2b黑色箭头指示位置)。随着发育的进行,突起程度不断加大,最终约占整个种子体积的1/6。突起处常伴有黑化(种皮变黑,胚乳退化)现象的发生(图1-2b、c白色箭头指示位置)。相对于突起,黑化发生的时期较随机。有的在突起发生前产生,有的伴随突起一同发生,还有的在突起产生后的某一时间发生。黑化发生时期决定着种子的命运。

种子发育后期,种皮木质化致密而坚实,胚乳细胞产生次生壁而加厚,胚乳呈凝固状。如果黑化发生在这个时期,突起明显但种皮完好,仅有少量黑斑。这就是种皮完好的突起种子,其中也有一部分

种子完全没有黑斑(图 1-2b,黑色箭头指示种子的突起,白色箭头指示黑斑)。如果黑斑发生在种子发育的中期,这时种子内部四周的胚乳产生初生细胞壁而细胞化。种子成熟时大部分充满胚乳,仅在突起处黑斑发生的地方种皮破裂少量胚乳外漏,在胚乳的带动下,子叶被挤到果肉中,朝向果实的顶部,仅有胚根与种子相连。这就是前面提到的种皮破损的种子(图 1-2c,黑色箭头所指是突破种皮的子叶)。如果黑化发生在早期(授粉后 40 d 左右),随着种子

的生长,黑斑不断扩大,突起处种皮腐烂、破裂,形成孔洞,胚乳从孔洞渗出。成熟时胚和胚乳消失殆尽,只剩下黑瘪的空壳种皮,即前面提到的瘪种子(图 1-2d)。在体式显微镜下可以明显地看到这部分种子在种皮突起处的孔洞(图 1-4,白色箭头指示位置)。

2.3 突起在子房室中发生的位置

磨盘柿的果实有 8 个子房室,在距子房室顶部 1/4 处有一个直径 0.5 cm 左右的孔隙(图 1-5 子房

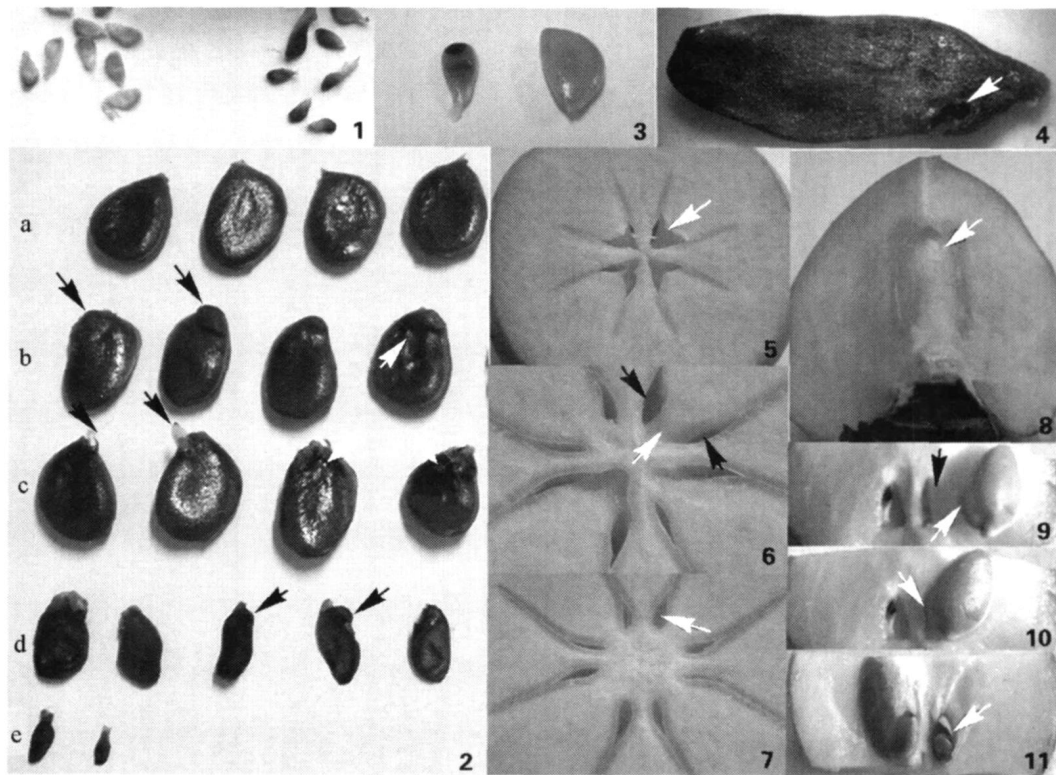


图 1 磨盘柿杂交种子及产生异常突起杂种的子房的形态观察

Fig. 1 Observation on seed and ovary with abnormal seeds of Mopanshi

1. 未发育种子,左侧为授粉后 10 d 的种子,右侧为授粉后 132 d 的种子。
2. 授粉后 132 d 的种子。a 为正常种子,b、c、d、e 为异常种子。其中 b 为种皮完整突起种子,黑箭头指示突起,白箭头处有黑斑;c 为种皮破损突起种子,黑箭头指示突破种皮的子叶,白箭头处为带黑斑的破裂种皮;d 为瘪种子,箭头指示带孔洞的突起;e 为早期败育种子。
3. 授粉后 30 d 的种子,早期败育(左)和同时期正常种子(右)。早期败育种子比正常种子小,且在种孔相对一侧有黑斑。
4. 显微镜下瘪种子即图 1~3 d 的种子。在种脐附近的种皮破损,出现 1 个孔洞,白箭头所示。
5. 授粉后 132 d 子房室顶部。在子房室的顶部,相邻的 2 个子房室由 1 个孔隙连通,白箭头指示连同相邻子房室的孔隙。
6. 授粉后 132 d 子房室中部。在子房室的中部,果肉把相邻子房室分开。黑箭头指示相邻子房室,白箭头指示分隔子房室的果肉。
7. 授粉后 132 d 子房室中下部。子房室中下部分为 8 个独立子房室,白箭头指示其中之一。
8. 授粉后 132 d 子房室纵切面。左右相邻的 2 个子房室,在顶部由白箭头指示的孔隙连通。
9. 授粉后 45 d 的子房室,黑箭头指示相邻子房室的孔隙,白箭头指示种子的突起。
10. 授粉后 45 d 的子房室,白箭头指示突起伸入孔隙的状态。
11. 授粉后 45 d 的子房室。子房室内 2 粒带有突起的种子,其中右侧种子背向页面,其突起伸出 2 个子房室间的孔隙,白箭头指示种子突起。

横切面和 1-8 子房纵切面的白色箭头所指位置)。孔隙把相邻的子房室连通在一起,孔隙以下的果肉又重新把子房室隔离开(图 1-6,黑色箭头指示相联通的子房室,白色箭头指示隔开子房室的果肉),形成 8 个独立的小室(图 1-7 为 8 个子房室之一)。这个孔隙的大小和种子的突起大小相当(图 1-9,黑色箭头指示子房室间的孔隙,白色箭头指示突起),种子的突起就发生在这个孔隙处,通过孔隙突出子房室(图 1-10 白色箭头指示突起伸入孔隙的生长状态;图 1-11,箭头指示背向页面一侧种子,其突起伸出孔隙)。

磨盘柿中的 8 个子房室被 4 个孔隙相连。相对于种子,有的孔隙在左面,有的在右面。相应的,突

起的方向也有的向右有的向左(图 1-2 中的突起种子)。观察发现,在调查的 243 个突起种子中,突起向右倾斜的 128 个,向左倾斜的 115 个,向左和向右的数量基本相当,说明突起的发生并没有子房室的偏好性。

2.4 突起种子组织学观察

为了进一步研究突起种子的形成机制,制作石蜡切片进行组织学观察。授粉后 30 d,多数种胚发育到球形原胚期,无异常现象发生。授粉后 45 d,突起种子的胚发育速度明显快于正常种子。正常种子胚发育到球形期(图 2-1 箭头指示球形胚),种皮完整突起种子的胚已经过球形期、心形期发育到鱼雷期,比正常种子发育快 5 d 以上(图 2-2 黑色箭头指

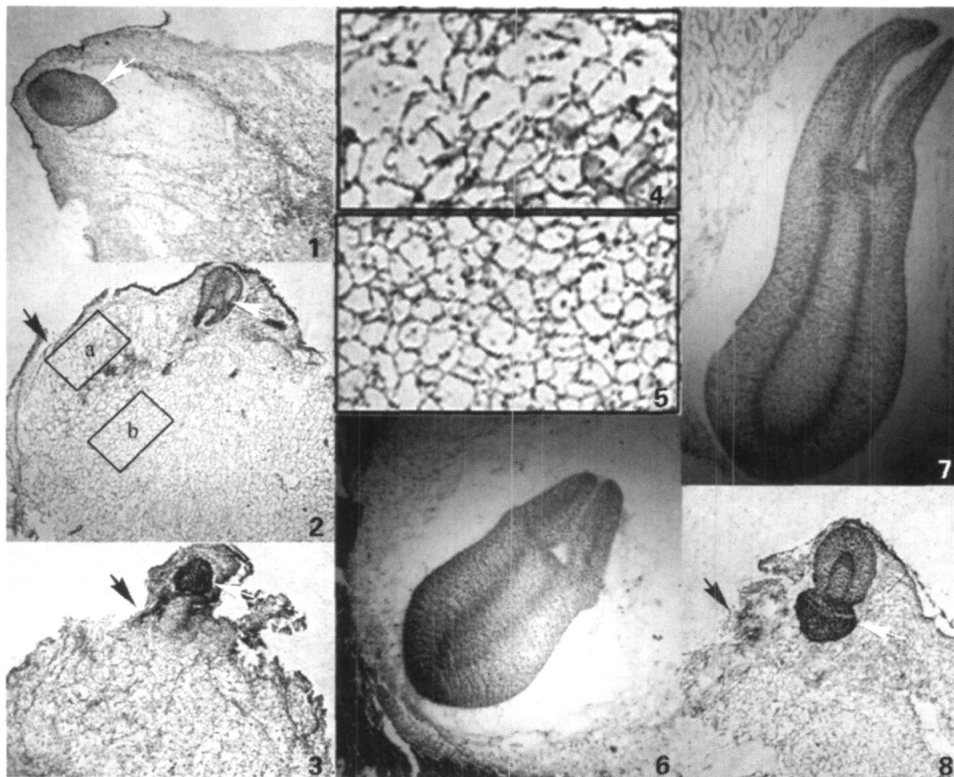


图 2 磨盘柿正常杂种和带异常突起杂种种胚组织学观察

Fig. 2 Histological observation on embryo of normal and abnormal hybrids of Mopanshi

1. 授粉后 45 d 正常种子的球形胚(×100)。
2. 授粉后 45 d 种皮完整的突起种子(×100),黑色箭头指示种子突起,白色箭头指示鱼雷形胚,种胚无异常,但发育进程提前。
3. 授粉后 45 d 种皮破损的突起种子胚(×100),黑色箭头指示种皮破损处,白色箭头指示早期球形胚,种胚无异常,但发育延迟。
4. 为图 2-13 的 a 处黑框放大(×200),突起处胚乳细胞。此处细胞体积大,细胞壁破裂,细胞核退化。
5. 为图 2-13 的 b 处黑框放大(×200),种子正常部位的胚乳细胞。细胞体积小而密,细胞壁厚,能看到细胞核。
6. 授粉后 55 d 正常种子,子叶形胚早期(×200)。
7. 授粉后 55 d 突起种子,子叶形胚中期(×200)。
8. 授粉后 45 d 发现的异常胚,黑色箭头指示在突起处破损的种皮,白色箭头指示异常的蘑菇状膨大(×100)。

示种子的突起部分,白色箭头指示鱼雷形胚)。但种皮破损的种胚发育速度慢,授粉后45 d时刚刚到达球形胚的早期(图2-3白色箭头指示早期球形胚)。这可能是由于种皮破损,种子内胚乳及供胚生长的物质外漏,影响了胚的正常生长(图2-3黑色箭头指示种皮破损位置)。同一种子内,突起处的胚乳细胞与相邻部位的胚乳细胞有明显差别。突起处胚乳细胞体积大,细胞壁薄且部分破裂,细胞核退化(图2-4)。非突起处细胞小而密,细胞壁完整,细胞核明显(图2-5)。授粉后55 d,正常种子的胚粗而短,发育到子叶形胚早期(图2-6)。突起种子的胚发育到子叶形中期,细而长(图2-7),发育进程相对提前。

另外,在授粉后45 d的突起种子中,还发现种胚的子叶处有蘑菇状异常膨大现象发生,膨大处细胞分裂旺盛、密集,细胞质浓(图2-8,黑色箭头指示种皮破损的突起处,白色箭头指示种胚蘑菇状膨大)。

3 讨论

1) 日本学者把柿败育种子(*poorly-filled imperfect seeds*)分成2类:小而薄的S型种子(*thinner seeds of small size*)和长而薄的L型种子(*full-sized thinner seeds*)。L型种子的长宽和正常种子大致相当,但质量和厚度仅为正常种子的30%~80%,S型种子长度小于13 mm,质量比L型种子轻,盛花期后6周出现异常种胚和败育的胚乳^[7-9],认为胚乳的退化导致了种子的败育和生理落果。

与正常种子相比,带突起的种子生长分裂旺盛,器官或组织分化明显提前。从种子形态来看,带突起的种子充实饱满,中部略鼓,胚乳分裂旺盛。而正常种子扁平,中部微凹陷。从种胚的分化来看,带突起种子的种胚生长分化快,比正常种胚提早5 d以上,个别种胚还发生分裂旺盛的极端情况-蘑菇状异常膨大。可见,异常的发育速度和磨盘柿种皮异常突起的产生有重要关系。

授粉初期,种子的生长速度虽较快,但种子的体积基数很小,子房室的空间足以容纳种子,无异常现象。授粉后45 d左右,种子正处于对数生长的中期^[9],生长迅速,种子体积基数大,体积增加量大,种子生长速度超过了子房室的生长速度,种子体积大于子房室的空间。这时,种皮受到胚乳和果肉的

双重压力。随着发育的进行这种压力不断增大,当达到一定程度时,子房室已经不能容纳整个种子,而相邻子房室间的孔隙为种子的进一步生长提供了空间。这样,种皮在胚乳和果肉的双重挤压下,从子房室间的孔隙中突出,产生了异常突起。而正常种子发育速度适中,种子扁平,大小与子房室容积协调一致,不存在空间不足的问题。由此可见,带突起种子异常快速的发育速度和子房室空间的不足是种子异常突起产生的原因。

2) 磨盘柿具有极高的抗寒、抗旱性,且品质上乘,恰好弥补了甜柿品种的主要缺点,是柿育种中的优良种质资源,但高败育率影响了磨盘柿种质资源的高效利用。由于败育主要由种脐处的异常突起产生,因此研究带突起的异常种子形成的因素,就可以利用栽培化控或遗传改良等方法降低或消除突起种子的产生,减少败育种子,提高正常可育种子的比例,促进磨盘柿这一优良种质资源在柿育种中的广泛高效应用,以至于培育出综合性状优良的新品种。

3) 通过柿九倍体育种有望选育出无核柿新品种^[10-11]。陈绪中等对‘罗田甜柿’($2n=6x=90$)的九倍体胚乳进行了培养,虽然未得到九倍体,但意外地获得了十二倍体植株。利用该十二倍体与六倍体进行杂交,有望培育出无核的九倍体甜柿^[11]。通过 $2n$ 配子与正常的六倍体植株杂交,是获得柿九倍体植株的另一种方法。罗正荣等对禅寺丸 $2n$ 花粉进行了系统研究,阐明了 $2n$ 花粉的形成机制、提高 $2n$ 花粉比例的诱导方法以及 $2n$ 花粉高效分离体系的建立,为获得九倍体奠定了基础^[10-14]。Sugiura等利用‘禅寺丸’ $2n$ 花粉给‘次郎’授粉,在球形胚期通过离体挽救获得了九倍体植株^[15]。磨盘柿杂种败育是由异常突起引起,如果能深入的研究突起的形态、生理生化及分子形成机理,揭示杂种败育原因。就可以用遗传改良甚至借助生物技术的方法,人工创造带有败育种子的柿果实,改良现有品种创造无核柿新品种。

参 考 文 献

- [1] 杨勇,阮小凤,王仁梓,等. 柿种质资源及育种研究进展[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(2): 133-137
- [2] 李高潮,杨勇,王仁梓. 中国原产柿品种资源[J]. 中国种业, 2006(4): 52-53

- [3] 罗正荣,蔡礼鸿,胡春根. 柿属植物种质资源及其利用研究现状[J]. 华中农业大学学报,1996,15(4):381-388
- [4] 惠灵,冷平,高琪洁. 磨盘柿杂种败育特性的研究[J]. 果树学报,2006,23(1):13-16
- [5] Shinya K, Keizo Y, Akira S, et al. Identification of molecular markers linked to the trait of natural astringency loss of japanese persimmon (*Diospyros kaki*) fruit[J]. J Amer Soc Hort Sci,2001,126(1):51-55
- [6] Keizo Y, Akira S, Akihiko S, et al. Molecular marker for selecting pollination-constant non-astringent (PCNA) type persimmon at the juvenile stage[J]. Acta Hort, 2003, 22: 189-203
- [7] Hasegawa K, Murata M, Kitajuma A. Studies on the cause of the occurrence of poorly-filled imperfect seed in persimmon cv. Maekawa-jiro[J]. Acta Hort,1996,436:375-394
- [8] Hasegawa K, Kikuchi Y, Kitajuma A. Fruit set and seed abortion in persimmon cvs. tonewase and maekawa-jiro [J]. Acta Hort,2003, 601: 89-92
- [9] 扈惠灵,冷平. 柿生殖生物学研究评述[J]. 中国农业科学,2006,39(12):2557-2562
- [10] 谷晓峰,罗正荣. 柿品种禅寺丸的花粉染色体加倍研究[J]. 中国农业科学,2003,36(4):426-428
- [11] 陈绪中,罗正荣. '罗田甜柿'胚乳培养获得十二倍体再生植株[J]. 园艺学报,2004,31(5):589-592
- [12] 谷晓峰,唐仙英,罗正荣. 柿品种'禅寺丸'未减数花粉分离体系的建立[J]. 果树学报,2001,18(1):32-34
- [13] 唐仙英,罗正荣. 甜柿 $2n$ 花粉形成的细胞学机理研究[J]. 中国农业科学,2002,35(5):585-588
- [14] 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
- [15] Sugiura A. Production of nonaploid ($2n=9x$) Japanese persimmons (*Diospyros kaki*) by pollination with unreduced ($2n=6X$) pollen and embryo rescue culture[J]. J Amer Soc Hort Sci,2000,125(5):609-614