

苹果和梨远缘杂交正常结籽率低的组织学研究

孙亮 崔萌萌 王灿磊 刘姝彤 许小茜 赵胜利 任杰 冷平*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 通过‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨和‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果2个杂交组合对苹果和梨远缘杂交正常结籽率低的现象进行了组织学研究。结果发现:‘富士’苹果花柱对‘金二十世纪’梨花粉生长的抑制作用主要发生在花粉管穿过柱头进入花柱阶段,而‘金二十世纪’梨花柱对‘嘎啦’苹果花粉生长的抑制作用则主要发生在花粉管在花柱中的生长阶段。‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨组合杂种不正常发育的表现为种子败育;‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果组合杂种不正常发育的表现为种子不饱满和畸形。苹果和梨花柱在气孔分布上存在差异。以上这些可能是导致远缘杂交授粉过程困难、结籽率低的一部分原因。

关键词 苹果; 梨; 远缘杂交; 结籽率; 花粉管; 花柱气孔

中图分类号 S 661.1; S 661.2; S 334.3

文章编号 1007-4333(2011)02-0069-06

文献标志码 A

Histological research on low seeded rate of hybridization between apple and pear

SUN Liang¹, CUI Meng-meng¹, WANG Can-lei¹, LIU Shu-tong¹,

XU Xiao-qian¹, ZHAO Sheng-li¹, REN Jie¹, LENG Ping^{1*}

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract For studying the low seeded rate of apple-pear hybridization, we hybridized apple with pear: *Malus domestica* cv. Red Fuji Spur × *Pyrus pyrifolia* cv. Gold Nijuseiki; *Pyrus pyrifolia* cv. Gold Nijuseiki × *Malus domestica* cv. Gala. Pollen germination, pollen tube growth in style and type of seed were investigated, respectively. Growth inhibition of pollen tubes in distant style is a reason for low seeded rate, while abnormal growth of hybrid seeds is another reason. The growth inhibition of Gold Nijuseiki pollen tube in Fuji style, which happens in the foreside of Fuji style, is stronger than that of Gala pollen tube in Gold Nijuseiki style in which inhibition occurs in the middle of style. This inhibition may be caused by the different structure of apple and pear styles. In Fuji × Gold Nijuseiki, the seeds growth inhibition is seed abortion, while in Gold Nijuseiki × Gala this inhibition leads to thinness seeds and abnormal seeds.

Key words apple; pear; distant hybridization; seeded rate; style stoma

远缘杂交是果树育种的一种重要方法,通过集合远缘品种的优势性状可以得到优良新品种。苹果和梨作为北方的主栽果树,在生产和研究中也经常进行远缘杂交。苹果和梨远缘杂交过程中存在着正常结籽率低的问题^[1-5]长期阻碍杂交工作的顺利进行,但针对这一问题的研究却并不多,并且现有研究多集中于一种杂交形式,横向对比。本试验以苹果和梨分别作为母本,对其正常结籽率低的问题进行

组织学研究,旨在找到2种杂交组合正常结籽率低的原因和两者的差异,以期对今后的研究和生产提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验设计2个杂交组合:‘富士’苹果(*Malus domestica* cv. Red Fuji Spur) × ‘金二十世纪’梨

收稿日期:2010-11-16

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(2009-2-06)

第一作者:孙亮,博士研究生,E-mail:sunliangdeemail@qq.com

通讯作者:冷平,教授,主要从事果树育种、果实发育分子生物学及果实采后加工研究,E-mail:pleng@cau.edu.cn

(*Pyrus pyrifolia* cv. Gold Nijuseiki)和‘金二十世纪’梨(*P. pyrifolia* cv. Gold Nijuseiki)×‘嘎啦’苹果(*Malus domestica* cv. Royal Gala)。其中‘富士’苹果选自北京市昌平区崔村果园;‘金二十世纪’梨选自中国农业大学科技园。‘嘎啦’苹果花粉取自中国农业科学院郑州果树研究所;‘金二十世纪’梨花粉取自中国农业大学科技园。

1.2 试验方法

1.2.1 授粉

杂交组合‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果于2008年4月6日在中国农业大学科技园进行授粉。杂交组合‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨于2008年4月14日在北京市昌平区崔村果园进行授粉。本试验中以‘富士’苹果为母本的组合共授粉约1800朵花,以‘金二十世纪’梨为母本的组合共授粉约800朵花(部分花脱落)。

1.2.2 取样

取取自2个杂交组合各自授粉后2h开始,其中以‘金二十世纪’梨为母本的,分别于授粉后2、6、12、24、48、96、144和192h取样;以‘富士’苹果为母本的,分别于授粉后2、4、12、24、48、120和168h取样(由于天气原因2个杂交组合取样时间不完全相同)。每次取30朵花,剥取花柱和子房,立即用FAA固定液固定。

1.2.3 花柱压片及石蜡切片制作

花柱压片和石蜡切片的制作及观察参考文献[6-8]的方法。制作好的压片和切片使用Olympus BX51荧光显微镜进行观察并拍照。由于苹果花柱较大,先对花柱进行部分拍照,然后利用Adobe Photoshop软件进行拼接。

1.2.4 花粉管长度测量及数量统计

花粉管长度使用Olympus BX51荧光显微镜和标准物镜测微尺(长度1mm,最小单位10 μ m)进行测量。

花粉管数量统计,选取以‘富士’苹果为母本授粉后168h的花柱和以‘金二十世纪’梨为母本授粉后192h的花柱,统计自柱头向下,全长1/4、1/2、3/4处和花柱底部的花粉管数量,每个时期选取30个花柱观察。

1.2.5 花粉萌发率统计

花粉萌发率、花粉萌发培养基及统计方法参考刘珠琴^[9]等方法。花粉置于室温培养5h后用显微镜观察并拍照。花粉萌发率统计时选取5个视野进

行统计。

1.2.6 正常结籽率计算

一定数量果实正常结籽率=(一定数量果实中正常种子数/果实中胚珠数)×100%

1.2.7 数据统计

本试验所有数据均采用Excel软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 结果及结种子情况调查

本试验中,‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨组合共得到139个果实,240粒杂交种子,其中,正常饱满种子159粒,瘪种子81粒,不发育的干瘪胚珠不计入在内。平均每个果实包含1.73粒种子,其中正常种子1.14粒,正常种子所占比例为65.9%、正常结籽率为11.4%。而在同一果园随机选取的50个自然授粉的‘富士’苹果中,平均每个果实包含9.54粒种子,其中正常种子9.32粒;正常种子所占比例为97.7%、正常结籽率为93.2%。‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果组合共得到197个果实,652粒杂交种子,其中正常饱满种子123粒、不饱满种子465粒、畸形种子18粒、干瘪种子46粒,不发育的干瘪胚珠不计入在内。平均每个果实包含3.31粒种子,其中正常种子0.62粒;正常种子所占比例为18.7%、正常结籽率为6.2%。而同一个果园中50个自然授粉的‘金二十世纪’梨,平均每个果实包含种子8.64粒,其中正常种子8.40粒;正常种子所占比例为97.2%、正常结籽率为84.0%。由以上数据可以看出,远缘杂交组合的正常结籽率和正常种子比例都低于相应母本自然杂交正常结籽率和正常种子比例。由正常种子比例可以看出,‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果组合对杂种发育的抑制作用强于另一组合。

2个远缘杂交组合产生非正常种子的类型不同。‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果组合的非正常种子为发育不充分种子和畸形种子。与正常种子相比,不饱满种子种胚结构完整,但整体偏小;畸形种子是这一组合所独有的,整体呈球形、种皮表面存在着刺状突起,种胚呈球形、子叶偏小、下胚轴偏短、胚根不明显;干瘪种子很难剥取种胚。‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨组合的非正常种子为败育导致的瘪种子。败育可以分为4种情况:一种是种胚结构完整,子叶发生褐化;一种为种胚结构完整,但是子叶

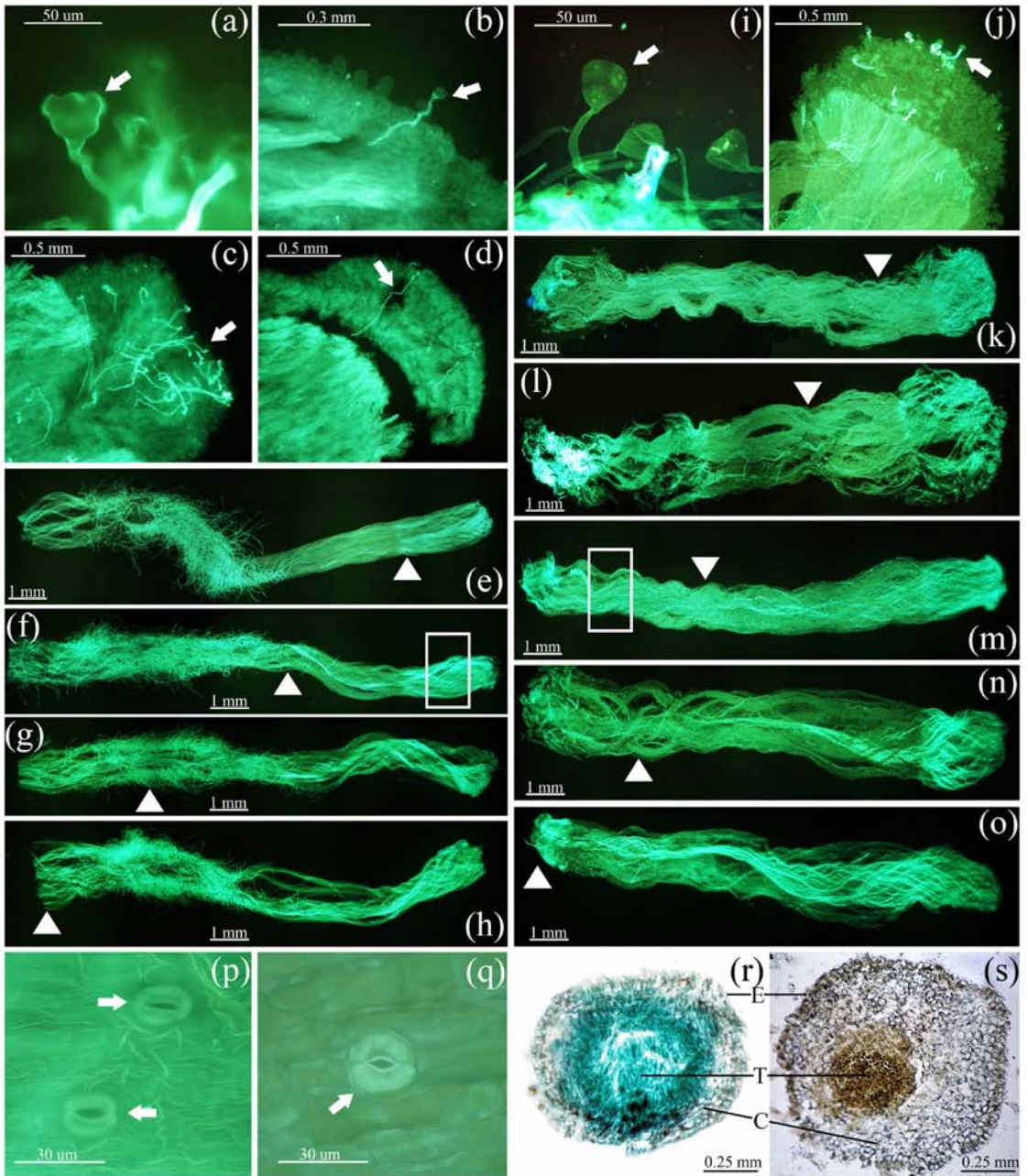
干瘪, 下胚轴褐化; 第三种情况种胚仅残存部分褐化子叶; 最后一种为种胚结构完整, 但整体褐化、偏小。

综上, 本试验中苹果和梨远缘杂交出现正常结籽率及正常种子比例低的一种可能原因是杂种的不正常发育, 并且 2 个杂交组合杂种不正常发育的程度和方式不同。此外, 由远缘杂交组合每个果实种

子数远少于相应母本自然杂交产生的种子数可以得知, 远缘杂交授粉受精可能不充分。

2.2 花粉萌发与花粉管生长情况组织学观察

由图 1(a)和(b)可以看到, ‘金二十世纪’梨的花粉于授粉后 2 h 开始在‘富士’苹果柱头萌发。萌发后花粉表面形成 3 个凸起, 并由其中一个凸起处



(a)~(h)分别为梨花粉在苹果柱头萌发及花粉管生长情况:(a)和(b)授粉后 2 h;(c)授粉后 4 h;(d)授粉后 12 h;(e)授粉后 24 h;(f)授粉后 48 h;(g)授粉后 120 h;(h)授粉后 168 h。(i)~(o)分别为苹果花粉在梨柱头萌发及花粉管生长情况:(i)和(j)授粉后 12 h;(k)授粉后 24 h;(l)授粉后 48 h;(m)授粉后 96 h;(n)授粉后 144 h;(o)授粉后 192 h。(p)苹果花柱气孔;(q)梨花柱气孔。(r)梨花柱横截面;(s)苹果花柱横截面,其中 E:表皮层;C:薄壁细胞层;T:引导组织。

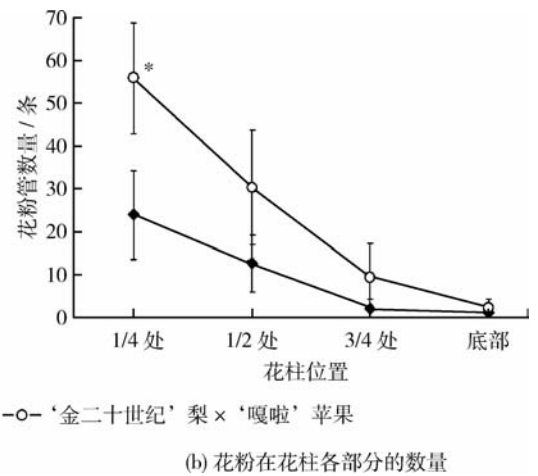
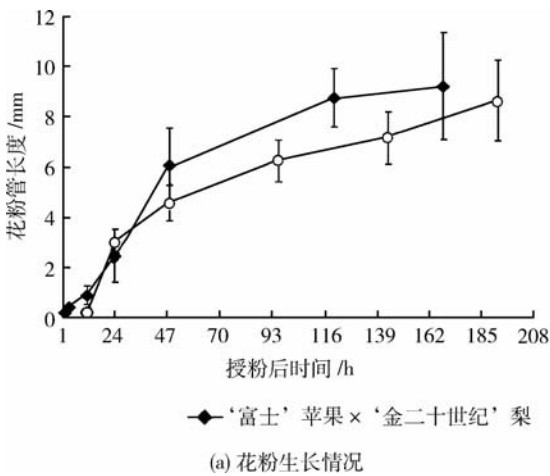
图 1 ‘富士’苹果和‘金二十世纪’梨远缘杂交花粉管生长及花柱组织学观察

Fig. 1 Histological observation of pollen tube growth in distant styles

伸出花粉管。授粉后 4 h 花粉管在乳突细胞中伸长,授粉后 12 h 穿过柱头进入花柱(图 1(c)和(d)),授粉后 24 h 花粉管生长到花柱前 1/4 处、授粉后 48 h 生长到花柱的 1/2 处、授粉后 120 h 生长到花柱的 3/4 处,最终于授粉后 168 h 生长到花柱底部(图 1(e)~(h))。‘嘎啦’苹果花粉于授粉后 12 h 开始在‘金二十世纪’梨柱头萌发(图 1(i)和(j)),萌发状况与‘金二十世纪’梨花粉相似,但是花粉粒凸起较小。‘嘎啦’苹果花粉管于授粉后 24 h 生长到花柱前 1/4 处、授粉后 48 h 生长到花柱的 1/3 处、授粉后 96 h 花粉管生长到花柱 2/3 处、授粉后 144 h 花粉管生长到花柱的 3/4 处,最终于授粉后 192 h 生长到花粉管底部(图 1(k)~(o))。由图 2(a)可以看出,‘金二十世纪’梨花粉在‘富士’苹果柱头先萌发,并且花粉管在萌发后 48 h 内生长速度较快,之后逐渐减慢;而‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果组合花粉

在萌发后 12 h 内花粉管生长速度较快,而后速度逐渐下降,但是在授粉 144 h 之后花粉管生长速度又有提高。

由图 2(b)可以看出,在相应远缘花柱中‘嘎啦’苹果花粉管数量要多于‘金二十世纪’梨花粉管数量,这种差异以花柱前 1/4 处最为显著。2 个杂交组合的花粉管数量都呈现出从柱头向花柱底部逐渐下降的趋势,下降速度以花柱的前 3/4 较快。以花柱 3/4 处统计,‘嘎啦’苹果和‘金二十世纪’梨花粉管在相应的远缘花柱中分别下降了 83.39% 和 90.87%。需要说明的是‘金二十世纪’梨花粉的离体萌发率(68.82%±7.62%)要显著高于‘嘎啦’苹果花粉的离体萌发率(26.85%±6.96%),这说明‘金二十世纪’梨花粉管进入‘富士’苹果花柱数量少是由于花柱的抑制和阻碍作用导致的而非花粉本身的原因。



* 显著性分析 $P < 0.05$

图 2 苹果和梨远缘杂交花粉在花柱中的生长及分布情况

Fig. 2 Growth and number of pollen tubes in distant styles

综上,‘富士’苹果柱头对‘金二十世纪’梨花粉萌发和伸入花柱的阻碍和抑制作用强于‘金二十世纪’梨柱头对‘嘎啦’苹果花粉的阻碍和抑制作用。而在花柱中段‘金二十世纪’梨对‘嘎啦’苹果花粉管生长的阻碍和抑制作用却强于另一组合。综合考虑花粉管萌发生长情况和每个果实中平均种子数可以推定,在整个授粉受精过程中‘富士’苹果对远缘梨花粉的阻碍作用要强于‘金二十世纪’梨对远缘苹果花粉的阻碍作用。

2.3 花柱组织学观察

通过‘富士’苹果和‘金二十世纪’梨花柱横截面

石蜡切片(图 1(r)和(s))可以看出,2 种花柱在结构上存在着较大的差异:‘金二十世纪’梨花柱为典型的梨花柱,中间引导组织在花柱中所占比例较大,并且引导组织中间细胞间隙较大;而‘富士’苹果花柱的引导组织在花柱中所占比例较小,同时引导组织细胞排列较为紧密,细胞间隙小。这一结构上的差异,与花粉管在生长中所受的机械阻力密切相关:梨花柱引导组织较大、细胞间隙较大,机械阻力相对较小,可以给远缘花粉管生长提供相对充足的生长空间;而苹果花柱引导组织细胞排列紧密、细胞间隙较小,机械阻力相对较大。梨花粉管在长期的进化中

适应了梨花柱相对较小的机械阻力,当其在机械阻力相对较大的苹果花柱中生长时可能会较为困难。这也可以从组织学水平解释本试验中苹果花粉管进入梨花柱的数量要远高于梨花花粉管进入苹果花柱数量的现象。

除此之外,我们还发现在‘富士’苹果和‘金二十世纪’梨的花柱上存在气孔,即花柱气孔(图1(p)和(q)),并且气孔在苹果和梨柱头上分布的位置不同。如图1(f)和(m)白色方框所示,‘富士’苹果花柱气孔集中于柱头向下1 mm区域,而‘金二十世纪’梨花柱气孔集中于花柱基部,即柱头向下3/4处左右。

3 讨论

本试验发现以苹果和梨分别作母本的远缘杂交组合在授粉过程和结种子情况上存在较大差异。虽然‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨组合正常种子所占比例大,但其授粉过程存在较大阻碍,使得其获得种子总数较少;而‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’苹果组合虽然授粉情况好于‘富士’苹果×‘金二十世纪’梨组合,但在种子发育过程阻碍较大,虽然得到种子数较多,但正常种子比例较低。由此可见苹果和梨远缘杂交过程中抑制作用的整体性,即阻碍作用存在于从受精到种子发育的整个阶段,不同杂交组合阻碍作用发生的时间和部位可能有所不同,但结果都是对远缘杂种的正常结籽率产生较大影响。针对2个杂交组合的不同特性,可以有针对性地采取促进措施:如对于授粉存在较大困难的‘富士’苹果×“金二十世纪”梨组合,可以采取大量授粉或其他促进授粉的措施提高正常种子数;而对于种子发育不正常的‘金二十世纪’梨×‘嘎啦’组合,采取胚挽救措施效率更高。需要说明的是,本试验中虽然‘富士’苹果作母本的组合正常结籽率相对较高,但是考虑到授粉的效率问题,可以认为以‘金二十世纪’梨作母本在生产 and 育种上效率更高。

本试验中苹果和梨远缘杂交在授粉过程中的阻碍主要体现在花粉进入远缘花柱困难和花粉管在远缘花柱中生长困难。‘富士’苹果和‘金二十世纪’梨花柱结构上存在着较大差异,这也可以部分解释为什么二者对远缘花粉管生长阻碍存在差异。与研究相对较多的苹果和梨自交不亲和现象相比,远缘杂交不亲和与其存在明显不同:苹果和梨自交不亲和授粉过程的阻碍多发生在花柱中前部,并且表现为

对花粉萌发和花粉管生长的强烈抑制,并最终导致花粉管畸形和生长停止^[10-12]。而远缘杂交中我们没有发现明显的花粉萌发抑制和花粉管畸形,并且,虽然花粉管生长受到抑制,但总会有花粉管生长到花柱底部,这说明远缘杂交在授粉过程中的抑制作用较自交不亲和要弱。同时,在苹果和梨自交不亲和研究中有S-RNase理论,认为花柱会抑制含有相同等位基因花粉的萌发和生长。本试验中富士苹果基因型为 S_1S_9 ^[13]、‘嘎啦’苹果为 S_2S_5 ^[14],‘金二十世纪’梨为 S_2S_4 ^[15],同时苹果和梨中的S-RNase功能具有一定的相似性^[16]。但是,本试验中富士苹果花柱对‘金二十世纪’梨花粉的阻碍作用却强于‘金二十世纪’梨花柱对‘嘎啦’苹果花粉的阻碍作用。这说明,苹果和梨远缘杂交授粉过程中的抑制作用机制与苹果和梨属内自交不亲和的机制不完全相同,而其机理有待于进一步研究。此外,本试验第一次提出了苹果和梨的花柱气孔,花柱气孔分布的不同可能会导致花柱不同部位活跃程度以及气体成分的不同,进而影响远缘花粉管生长,而有关这一结构在花柱上的具体作用及其对授粉的确切影响也有待于进一步研究。

4 结论

苹果和梨远缘杂交过程中存在着正常结籽率低的现象,这种现象是由从授粉受精到种子发育过程中母本对远缘花粉萌发生长及远缘杂种生长发育的阻碍抑制作用造成的。这种阻碍与抑制作用是进化的结果,有助于保持物种的特异性,同时这种阻碍与抑制作用又存在整体性,可能发生于从开花到受粉受精再到种子发育的各各阶段,但其最终作用都是阻碍正常远缘杂交种子的产生。并且这种阻碍作用在苹果和梨2个物种间表现可能不同,了解这种阻碍与抑制作用在特定物种中的特点,有助于有针对性的克服这一困难,获得正常的苹果和梨远缘杂种。

致谢 在此感谢中国农业科学院郑州果树研究所阎振立、张顺妮和张恒涛三位老师在花粉采集工作中对本试验的大力帮助。

参 考 文 献

- [1] Crane M B, Marks E. Pear-apple hybrids[J]. Nature, 1952, 170:10-17

- [2] Brown A G. Proceedings of eucarpia fruit section symposium [M]. Paris: Tree Fruit Breeding France, 1979
- [3] 尹恩洁, 卞小庄, 杨玉梅. 苹果和白梨的属间杂交研究[J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 1993, 16(4): 329-332
- [4] 项秉钧. 克服苹果与梨属间杂种不育性的研究[J]. 果树科学, 1994, 11(3): 175-177
- [5] 孙亮, 冷平. 苹果和梨属间杂交及其幼胚挽救研究[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(2): 25-29
- [6] Sogo A, Tobe H. Intermittent pollen-tube growth in pistils of alders (*Alnus*) [J]. PNAS, 2005, 102: 8770-8775
- [7] 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
- [8] 李壮, 扈惠灵, 曹永庆, 等. 磨盘柿与甜柿杂交低结籽率的组织学研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 637-642
- [9] 刘珠琴, 张绍铃, 徐国华, 等. 梨花柱 S-RNase 对花粉管超微结构的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1357-1361
- [10] 陈迪新, 张绍铃. 梨不同花龄自花与异花授粉的花柱内花粉管生长及坐果率的比较[J]. 果树学报, 2007, 24(5): 575-579
- [11] 李天忠, 奥野智旦. 苹果自花授粉的花粉管结构变化及 S-RNase 定位[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 295-297
- [12] Liu Z Q, Xu G H, Zhang S L. *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro [J]. Protoplasma, 2007, 232: 61-67
- [13] Broothaerts W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 703-714
- [14] Shogo M, Sadao K, Kentaro K, et al. S-genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of 'Megumi' [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 1999, 68(2): 236-241
- [15] Takeshi T, Kazuma O, Carlos C, et al. Sequence of the S9-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S1- to S9-allele in Japanese pear [J]. Euphytica, 2004, 135: 157-167
- [16] Sassa H, Mase N, Hirano H. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 201-205

(责任编辑: 王燕华)