

孙春青, 潘跃平, 单延博, 等. 睡莲品种墨宝自交结实率低的细胞学机理[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 890-894.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.025

睡莲品种墨宝自交结实率低的细胞学机理

孙春青, 潘跃平, 单延博, 孙国胜, 戴忠良

(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 句容 212400)

摘要: 睡莲品种墨宝(*Nymphaea Almost Black*)的自交结实率低, 为了找出其原因, 本研究以墨宝为材料, 进行细胞学研究。研究表明, 墨宝的花粉活力为 4.2%, 授粉后 12 h, 平均每个柱头上萌发的花粉量只有 27.2 粒。此外, 授粉后 5 d, 27.6% 的子房内形成了球形胚, 授粉后 15 d, 只在 14.7% 的子房内观察到胚胎, 授粉后 20 d, 在 6.4% 的子房内观察到正常胚胎。以上结果显示, 受精前的低花粉活力和柱头上花粉萌发异常以及受精后的胚胎败育是导致墨宝自交结实率低的主要原因。

关键词: 睡莲; 结实率; 花粉活力; 胚胎败育

中图分类号: S682.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0890-05

Cellular mechanisms of low self-fertility of water lily variety Almost Black

SUN Chun-qing, PAN Yue-ping, SHAN Yan-bo, SUN Guo-sheng, DAI Zhong-liang

(Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of the Ning-Zhen Hilly District, Jurong 212400, China)

Abstract: To find out the reason of low self-fertility of water lily variety Almost Black, cytological study was conducted. The results showed that the pollen viability of Almost Black was only 4.2%. Stigmatic pollen germination was 27.2 grains per stigma at 12 h after pollination. The rate of normal embryos was 27.6% at five days after pollination, 14.7% at 15 days after pollination, and 6.4% at 20 days after pollination. These results suggested that low pollen viability, low stigmatic pollen germination and post-fertilization embryos abortion may be the main factors responsible for low self-fertility of Almost Black.

Key words: water lily; seed setting rate; pollen viability; embryo abortion

睡莲属(*Nymphaea*)植物花色多样、花期长并且能够净化水体中的有害物质, 深受人们喜爱, 被广泛应用于园林水景的绿化中。在国外, 睡莲新品种的选育已开展了 100 多年, 育成了数百个优良品种, 现在大部分品种仍在中国广泛应用^[1]。近年来, 中国睡莲育种家黄国振教授致力于睡莲的品种选育并取

得丰硕成果, 选育出数十个新品种(系), 但仍满足不了市场对新品种的需求^[2]。

在睡莲杂交育种的研究中, 育种者经常遇到杂交不结实现象, 致使许多优异基因难以利用。本研究针对此问题进行了前期的相关研究, 发现母本自交结实率高的品种易结实, 而母本自交结实率低甚至自交不结实的品种杂交时往往得不到种子。因此, 杂交组合中母本的生殖特性是决定杂交是否成功的关键, 研究睡莲生殖特性对新品种的选育具有重要意义。本研究拟以自交结实率低的睡莲品种墨宝(*N. Almost Black*)为材料, 从生殖生物学角度研究睡莲自交结实率低的原因, 以期今后培育观赏

收稿日期: 2017-01-20

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(11)4005]

作者简介: 孙春青(1983-), 男, 山东莱阳人, 硕士, 助理研究员, 主要从事蔬菜花卉遗传育种研究。(E-mail) seqsunchunqing@126.com

通讯作者: 戴忠良, (E-mail) daizhongliang2008@163.com

特性优良的睡莲品种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

睡莲品种为墨宝,栽培于镇江市农业科技创新中心。

1.2 方法

1.2.1 人工授粉 2013年5月上旬至6月下旬,以生长健壮的植株为材料,选取发育良好的花蕾,人工套袋隔离。人工授粉工作选择在晴天进行,花朵开放当天进行授粉,授粉前用干净的镊子将不同套袋隔离花序成熟的雄蕊取下,并置于待授粉柱头上,套袋隔离,挂牌标记。每株授粉3个花序,其中1个花序用于1个月后统计自交结实率,2个花序用于定期取材来研究花粉在柱头(指整个柱头盘)上的萌发和胚胎发育情况。

1.2.2 花粉活力 于晴天上午10:00收集隔离花序的花粉,置于含有 $ME_3+100\text{ g/L PEG4000}$ 的花粉培养基上培养,培养温度为 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。培养6h后,在显微镜下观察花粉的萌发情况,以花粉管长度大于花粉直径作为花粉萌发的标准,随机观察10个视野并进行统计,重复3次。

1.2.3 花粉形态和花粉萌发 收集套袋花序成熟花粉,用2.5%戊二醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液, $\text{pH}=7.2$)固定48h以上,之后脱水、干燥、喷金,然后将固定材料置于扫描电镜下观察并拍照。

此外,分别在授粉2h、6h、12h和24h时取3个授粉花序,用镊子快速剥取柱头盘并置于2.5%戊二醛中固定48h以上,将材料置于扫描电镜下观察并拍照^[3]。

1.2.4 花粉发育 于开花前5d、10d、15d、20d和25d分别取3个不同植株的花蕾,用FAA(70%酒精:冰醋酸:甲醛溶液=90:5:5)固定,置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。材料经过一系列处理后用石蜡包埋进行组织切片,切片厚度为 $8\sim 10\text{ }\mu\text{m}$,用铁矾苏木精进行染色,在Olympus显微镜下观察并拍照。

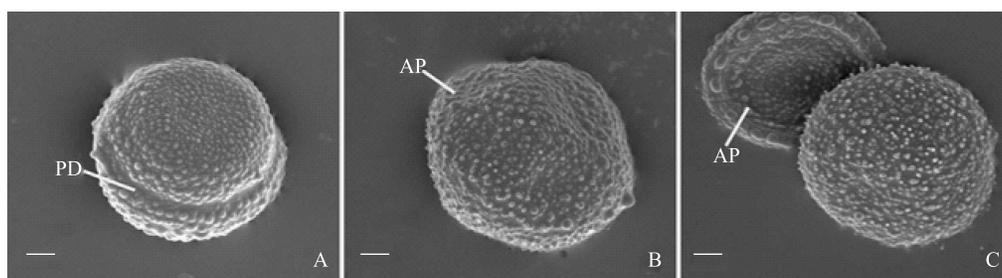
1.2.5 授粉后胚胎发育 在人工授粉后2d、5d、8d、12d、15d和20d,取2个授粉花序,用FAA进行固定,置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。利用常规石蜡制片技术进行制片,切片厚度为 $8\sim 10\text{ }\mu\text{m}$,用铁矾苏木精进行染色,在Olympus显微镜下观察并拍照。

1.2.6 数据分析 试验所得数据用SPASS V16.0统计软件进行误差和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 花粉形态和花粉活力

墨宝花粉粒呈圆形,平均直径 $30.4\text{ }\mu\text{m}$,具有环槽型萌发沟。扫描电镜结果(图1)表明,花粉粒的形态大致可以分成2类:一类为圆球形正常的花粉粒,另一类为皱缩状的异常花粉粒。墨宝正常形态的花粉粒仅占12.6%。



A:正常形态花粉;B、C:异常形态花粉。AP:形态异常的花粉;PD:萌发沟。标尺为 $6\text{ }\mu\text{m}$ 。

图1 墨宝的花粉形态

Fig.1 Pollen morphology of water lily variety Almost Black

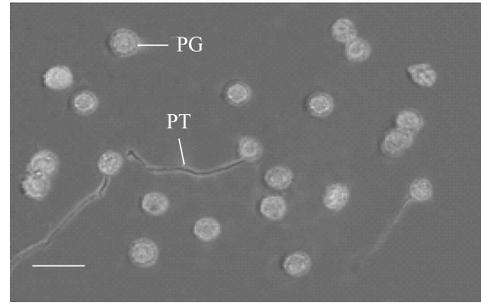
异常的花粉形态必然会影响花粉活力,测得墨宝花粉活力为4.2%(图2)。花粉活力低可能会影响自交结实率。

2.2 花粉发育过程

图3显示,睡莲花药的4个花粉囊是由药隔组

织和中间维管束连接起来的,对开花前25d的花蕾进行石蜡切片,观察到此时花粉囊内小孢子母细胞分化完成,其细胞核较大。开花前20d的花蕾内小孢子母细胞处于减数分裂阶段,减数分裂完成后进入四分体时期。开花前15d的花蕾内形成游离的

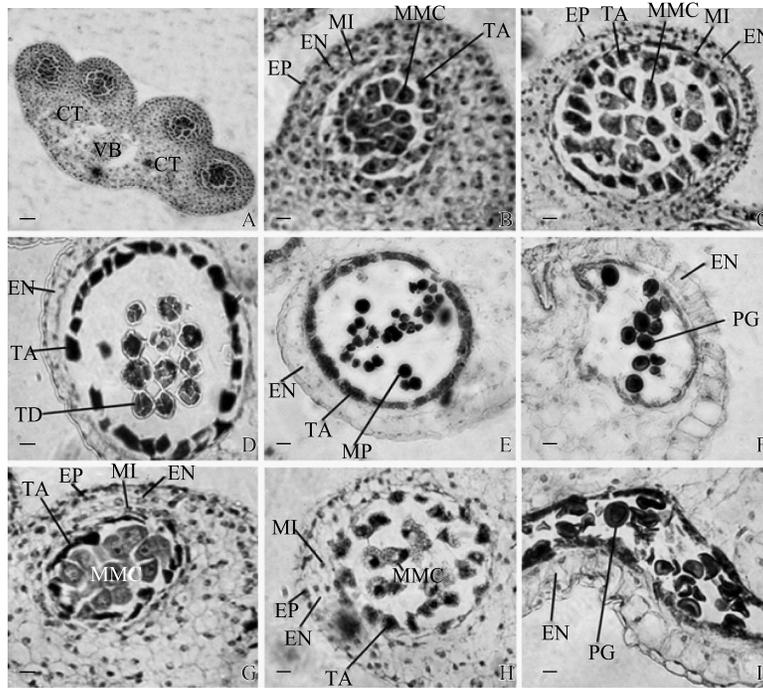
小孢子,此时其染色较深,表明其核较大且细胞质较浓,而绒毡层染色较浅,表明其细胞内含物少。开花前5 d,小孢子进行有丝分裂形成双核花粉粒,染色较深,此时绒毡层已经完全解体。此外,在小孢子母细胞减数分裂前期观察到部分花粉囊内绒毡层细胞形态结构混乱,表明此时其已开始降解。在小孢子母细胞减数分裂后期观察到大多数小孢子母细胞发育停滞且结构散乱,此时绒毡层细胞只留部分痕迹,其大部分完全降解。在花粉成熟期,部分花粉囊仅形成少量正常形态的花粉,大部分花粉皱缩或畸形。



PG: 花粉粒;PT: 花粉管。标尺为 50 μm。

图2 墨宝的花粉活力

Fig.2 Pollen viability of Almost Black



A: 花药;B: 花粉母细胞时期完整的花药;C: 减数分裂期小孢子母细胞;D: 四分体期小孢子母细胞;E: 游离的小孢子;F: 正常开裂的花药;G: 减数分裂前期花粉囊内解体的绒毡层细胞;H: 减数分裂期的异常药室;I: 异常花粉。CT: 药隔组织;EN: 药室内壁;EP: 花药表皮;MI: 花药中层;MMC: 花粉母细胞;MP: 小孢子;PG: 花粉;TA: 绒毡层;TD: 四分体;VB: 维管束。A 的标尺为 40 μm;B~I 的标尺为 10 μm。

图3 墨宝小孢子发育过程

Fig.3 Microspore development of Almost Black

2.3 柱头上花粉萌发情况

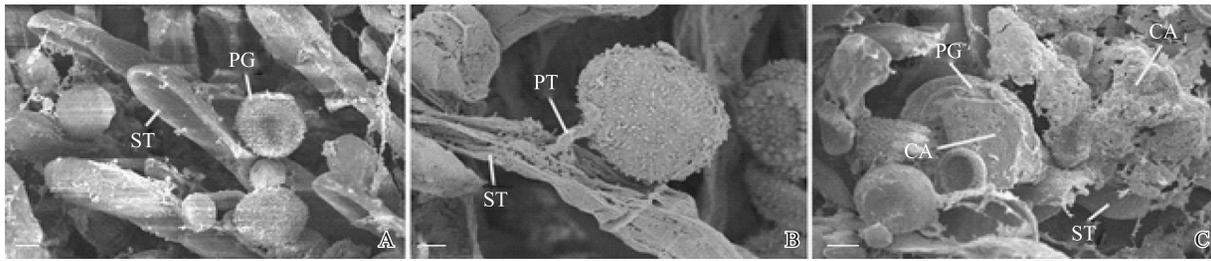
表1显示,取样时间不同,柱头上萌发的花粉粒数目差异显著。授粉后2 h,仅有1.9粒花粉在柱头上萌发,授粉后6 h,7.8粒花粉萌发,授粉后12 h,27.2粒花粉萌发,萌发的花粉数量最多,授粉12 h后,柱头上花粉萌发数量开始减少,授粉后24 h,只有18.4粒花粉萌发。此外,大部分柱头上出现了自交不亲和的现象,即授粉后在柱头表面以及花粉和花粉管周围充满大量胼胝质(图4)。

表1 授粉后花粉在柱头上的萌发情况

Table 1 Stigmatic pollen germination after pollination

授粉后时间(h)	柱头萌发的花粉数
2	1.9±0.7d
6	7.8±1.3c
12	27.2±3.3a
24	18.4±1.8b

同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。



A:授粉后 6 h 柱头上萌发的花粉;B:授粉后 12 h 柱头上萌发的花粉;C:授粉后 12 h 柱头和花粉表面的胼胝质。CA:胼胝质;PG:花粉;PT:花粉管;ST:柱头。标尺为 10 μm。

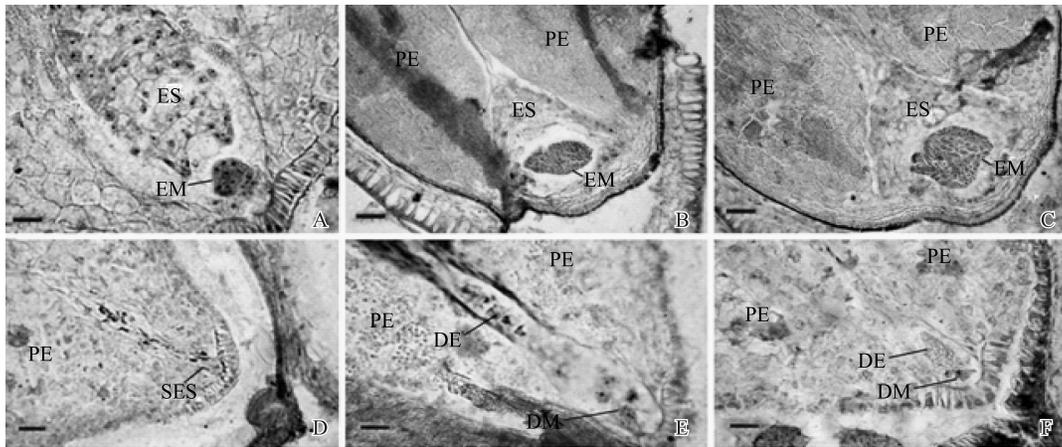
图 4 花粉在柱头上的萌发情况

Fig.4 Stigmatic pollen germination after pollination in Almost Black

2.4 授粉后胚胎发育和自交结实率

在授粉后 5 d、15 d 和 20 d 各取 200 个子房,对其进行组织切片,统计每个取样时间正常胚胎的比例。结果(表 2、图 5)表明,授粉后 5 d,27.6%的子房内形成了正常的球形胚,授粉后 15 d,只在 14.7%的子房内观察到胚胎,此时胚胎体积有所增大,呈椭圆形,内胚乳发育完成,外胚乳分裂旺盛,授

粉后 20 d,在 6.4%子房内观察到正常胚胎,胚胎组织不断分裂呈菱形,内胚乳已经完全被胚胎吸收,而外胚乳不断增大。此外,在胚胎发育的各个时期,都可见到胚胎和胚乳发育异常的情况,即胚胎和内外胚乳组织细胞呈散乱状,细胞核已降解。授粉后 35 d,墨宝的自交结实率仅为 4.6%。



A:授粉后 5 d 胚胎;B:授粉后 15 d 胚胎;C:授粉后 20 d 胚胎;D:受精失败后的胚囊;E:授粉后 15 d 的胚胎、内胚乳和外胚乳;F:授粉后 20 d 的胚胎、内胚乳和外胚乳。DE:降解的内胚乳;DM:降解的胚胎;EM:胚胎;ES:内胚乳;PE:外胚乳;SES:皱缩的胚囊。标尺为 20 μm。

图 5 胚胎发育情况

Fig.5 Embryogenesis after pollination

表 2 授粉后各个发育阶段正常胚胎的比例

Table 2 Percentage of normal embryo at three dates after pollination

授粉后天数(d)	正常胚胎比例(%)
5	27.6±4.4a
15	14.7±3.7b
20	6.4±2.3c

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

花粉发育过程中绒毡层细胞和小孢子之间的相互协调作用非常关键^[4],因为小孢子发育过程中的营养主要来源于绒毡层细胞^[5]。有研究表明,绒毡层细胞的提前降解会影响花粉的发育^[6-7]。本研究结果表明,在小孢子母细胞减数分裂前期绒毡层细胞已经开始降解,在小孢子母细胞减数分裂后

期只留下部分痕迹,大部分完全降解。据此推断,绒毡层细胞的异常降解可能会导致小孢子在发育过程中得不到足够的营养,致使其发育停滞,最终形成异常花粉。花粉扫描电镜研究结果表明,正常形态的花粉只占12.6%,墨宝的花粉活力为4.2%,异常形态的花粉必然会导致低的花粉活力^[8-9]。因此可推断,绒毡层细胞的功能障碍(提前降解)可能是导致墨宝花粉活力偏低的主要原因,低花粉活力可能会导致较低的自交结实率。

受精后障碍对结实率也有很大影响,特别是花粉在柱头上萌发异常会降低受精的成功率,从而影响结实率^[10-12]。本研究发现,授粉后6h才有7.8粒花粉萌发,到12h时虽然萌发花粉数量达到最大,但也只有二十几粒。1个睡莲花序大约有200个胚珠,萌发的花粉数目完全不能满足受精的需求,增加了受精失败的概率,这可能是导致自交结实率低的主要原因。此外,本研究发现,大部分柱头上均出现了自交不亲和现象,即授粉后柱头表面以及花粉和花粉管周围充满大量胼胝质。授粉后,当花粉壁细胞和柱头乳突细胞不能正确识别,柱头会立即释放一种化学物质,即胼胝质,阻止花粉萌发^[13],这可能是导致墨宝授粉后柱头上花粉萌发数量较低的主要原因。

受精后胚胎败育常常导致植物的结实率较低^[14-16]。本研究通过大量组织切片,发现在胚胎发育的各个时期都可以见到胚胎和胚乳发育异常的情况,即胚胎和内外胚乳组织细胞呈散乱状,细胞核已降解。由此可知,墨宝自交后有一定数量的胚珠完成了受精作用,能够形成正常胚胎,但是在胚胎发育过程中出现了败育情况。胚胎败育的具体原因有待进一步研究,根据以前的研究结果推断,可能是幼胚和胚乳发育不协调造成的,因为胚乳在幼胚的发育过程中提供营养^[17]。因此,受精后胚胎败育也是导致墨宝自交结实率低的一个原因。

总之,本研究对睡莲品种墨宝的生殖生物学特性进行了系统研究,结果表明,受精前的低花粉活力和柱头上花粉萌发异常以及受精后的胚胎败育是导致墨宝自交结实率低的主要原因。

参考文献:

[1] 黄国振,邓惠勤,李祖修,等. 睡莲[M]. 北京:中国林业出版社,2009.

- [2] 李淑娟,陶连兵. 柔毛齿叶睡莲×埃及白睡莲新品种选育[J]. 西北林学院学报,2008,23(5):95-98.
- [3] 王钦丽,卢龙斗,吴小琴,等. 花粉的保存及其生活力测定[J]. 植物学通报,2002,19(3):365-373.
- [4] HUANG Z H, ZHU J M, MU X J, et al. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis* [J]. Annals of Botany, 2004, 93: 295-301.
- [5] ENGELKE T, HULSMANN S, TATLIOGLU T. A comparative study of microsporogenesis and anther wall development in different types of genic and cytoplasmic male sterilities in chives [J]. Plant Breeding, 2002, 121: 254-258.
- [6] PAPINI A, MOSTI S, BRIGHIGNA L. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms [J]. Protoplasma, 1999, 207: 213-221.
- [7] MERIC C, DANE F, OLGUN G. Histological aspects of anther wall in male fertile and cytoplasmic male sterile *Helianthus annuus* L. (Sunflower) [J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2004, 3(2): 145-150.
- [8] SHI S, DING D, MEI S, et al. A comparative light and electron microscopic analysis of microspore and tapetum development in fertile and cytoplasmic male sterile radish [J]. Protoplasma, 2010, 241: 37-49.
- [9] ČALIĆ D, DEVRNJA N, KOSTIĆ I, et al. Pollen morphology, viability, and germination of *Prunus domestica* cv. Požegača [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 115: 118-122.
- [10] PIPINO L, VAN LABEKE M C, MANSUINO A, et al. Pollen morphology as fertility predictor in hybrid tea roses [J]. Euphytica, 2011, 178: 203-214.
- [11] 李守丽,石雷,张金政. 大百合与百合属间授粉后花粉管生长发育的观察[J]. 园艺学报,2006,33(6):1259-1262.
- [12] LEE C B, PAGE L E, MCCLURE B A, et al. Post-pollination hybridization barriers in *Nicotiana* section *Alatae* [J]. Sexual Plant Reproduction, 2008, 21(3): 183-195.
- [13] SPIELMAN M, SCOTT R J. Polyspermy barriers in plants: from preventing to promoting fertilization [J]. Sexual Plant Reproduction, 2008, 21(1): 53-65.
- [14] KNOX R B, WILLING R R, ASHFORD A E. Role of pollen-wall proteins as recognition substances in interspecific hybridization in poplars [J]. Nature, 1972, 237: 381-383.
- [15] 孙春青,陈发棣,房伟民,等. 甘菊与栽培菊‘金陵黄玉’种间杂交失败的原因[J]. 园艺学报,2009,36(9):1333-1338.
- [16] CLARKE H J, WILSON J G, KUO I, et al. Embryo rescue and plant regeneration in vitro of selfed chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild annual relatives [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 85(2): 197-204.
- [17] DENG Y M, TENG N J, CHEN S M, et al. Reproductive barriers in the intergeneric hybridization between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *Ajania przewalskii* Poljak. (Asteraceae) [J]. Euphytica, 2010, 174(1): 41-50.

(责任编辑:王妮)