

贺丹, 曹健康, 何松林, 等. 芍药属植物远缘杂交亲和性及其雌蕊的生理响应机制[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 822-830.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.024

## 芍药属植物远缘杂交亲和性及其雌蕊的生理响应机制

贺丹<sup>1,2</sup>, 曹健康<sup>1</sup>, 何松林<sup>2</sup>, 符真珠<sup>3</sup>, 华超<sup>1</sup>, 张明星<sup>1</sup>, 王政<sup>1</sup>

(1.河南农业大学风景园林与艺术学院, 河南 郑州 450002; 2.河南科技学院园艺园林学院, 河南 新乡 453003; 3.河南省农业科学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为探究不同芍药属植物远缘杂交的亲合性, 筛选出亲合性较好的杂交组合, 以芍药老来红(LLH)、蝶恋花(DLH)、鲁红(LH)、莲台(LT)、星光灿烂(XGCL)、遍地红(BDH)、Kansas、Venus和Peter Brand 9个品种为母本, 以牡丹凤丹白(FDB)为父本进行远缘杂交。测定授粉后不同时间(1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h)雌蕊中的保护酶[过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)]活性、胼胝质( $\beta$ -1,3-葡聚糖)含量及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性, 并对授粉后花粉粒萌发及花粉管生长情况进行荧光显微观察。结果表明, 授粉后2 h观察到花粉粒开始萌发, BDH×FDB、Kansas×FDB和Peter Brand×FDB 3个组合的花粉粒萌发相对较晚。随后在花粉管的生长过程中, 胼胝质不断沉积, 花粉管开始出现扭曲、缠绕等现象。授粉后24 h, LLH×FDB、LH×FDB和Kansas×FDB 3个组合可以观察到花粉管进入柱头, 但未进入子房。POD、SOD活性在9个组合间及同一组合授粉后不同时间表现出显著差异, 当POD、SOD活性较高时, 花粉粒萌发较快且花粉管正常生长。胼胝质含量及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性在不同组合间差异显著, 高含量的胼胝质及低活性的 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶会导致花粉管出现扭曲缠绕、肿胀等异常现象。国内的芍药品种中, LLH×FDB、LH×FDB组合的亲合性较好, BDH×FDB组合的亲合性最差; 国外的芍药品种中, Kansas×FDB组合的亲合性相对较好, Peter Brand×FDB组合的亲合性最差。

**关键词:** 芍药; 牡丹; 远缘杂交; 保护酶活性; 胼胝质;  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性

**中图分类号:** S682.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)03-0822-09

## Distant hybrid compatibility of *Paeonia* and its physiological response mechanism of pistil

HE Dan<sup>1,2</sup>, CAO Jian-kang<sup>1</sup>, HE Song-lin<sup>2</sup>, FU Zhen-zhu<sup>3</sup>, HUA Chao<sup>1</sup>, ZHANG Ming-xing<sup>1</sup>, WANG Zheng<sup>1</sup>

(1. College of Landscape Architecture and Art, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 3. Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to explore the compatibility of distant hybridization of different *Paeonia lactiflora* plants and screen out the hybrid combinations with better compatibility, *P. lactiflora* Laolaihong (LLH), Dieliahong (DLH), Luhong (LH), Liantai (LT), Xingguangcanlan (XGCL), Biandihong (BDH), Kansas, Venus and Peter Brand were used as female parents, and *P. suffruticosa* Fengdanbai (FDB) was used as male parent for distant hybridization. The activities of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), the content of callose ( $\beta$ -1,3-glucan) and the activity of  $\beta$ -1,3-glucanase were determined at different times (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h) in the pistil after pollination. The germination of pollen grains and the growth of pollen tubes after pollination were observed by fluorescence microscopy.

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(23A220001); 河南农业大学2021-2022年度“百千万”社会服务基金项目(30802210); 国家自然科学基金项目(31600568, 31870698)

作者简介: 贺丹(1983-), 女, 河南新乡人, 博士, 副教授, 主要从事园林植物育种研究。(E-mail) dandan990111@163.com

通讯作者: 何松林, (E-mail) hsl213@yeah.net

The results showed that the pollen grains began to germinate at two hours after pollination, and the pollen grains of BDH×FDB, Kansas×FDB and Peter Brand×FDB germinated relatively late. Subsequently, during the growth of the pollen tubes, the callose was continuously deposited, and the pollen tubes began to twist. At 24 h after pollination, the pollen tubes could be observed to enter the stigma but not the ovary in the three combinations of LLH×FDB, LH×FDB and Kansas×FDB. Activities of *POD* and *SOD* changed significantly in nine combinations and at different times after pollination in the same combination. When the activities of *POD* and *SOD* were higher, the pollen grains germinated faster and the pollen tubes grew normally. The callose content and  $\beta$ -1,3-glucanase activity were significantly different among different combinations. High callose content and low activity of  $\beta$ -1,3-glucanase could lead to abnormal phenomena such as distortion, winding and swelling of pollen tubes. Among domestic varieties, the combinations of LLH×FDB and LH×FDB had better affinity, and BDH×FDB combination had the worst affinity. Among foreign varieties, the combination of Kansas×FDB had relatively good affinity, and the combination of Peter Brand×FDB had the worst affinity.

**Key words:** *Paeonia lactiflora*; *Paeonia suffruticosa* distant hybridization; protective enzyme activity; callose;  $\beta$ -1,3-glucanase activity

芍药 (*Paeonia lactiflora*) 与牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 同为芍药科芍药属植物,其花色艳丽、种类丰富,是中国著名的观赏花卉<sup>[1]</sup>。芍药与牡丹远缘杂交的后代具有茎挺拔、花头直立、抗性强等特点,因此人们对芍药组间育种开展了大量研究<sup>[2]</sup>。芍药组间杂交育种分为正交(芍药为母本,牡丹为父本)与反交(牡丹为母本,芍药为父本),反交用的芍药花粉需提前1年收集保存(保存温度为-20℃或-80℃),其花粉活力通常低于30%,种子萌发率不足1%,因此芍药组间杂交多采用正交方式<sup>[3]</sup>。芍药属植物远缘杂交后代虽然具有明显的杂种优势,但存在严重的杂交不亲和性,导致育种进展缓慢。

杂交不亲和性主要分为受精前障碍和受精后障碍,在芍药属植物远缘杂交的过程中,受精前障碍是发生杂交不亲和的主要原因<sup>[4]</sup>。受精前障碍主要表现为花粉-柱头无法正常识别、花粉管产生堆积的胼胝质及花粉管的异常生长<sup>[5-6]</sup>。过氧化物酶(*POD*)、超氧化物歧化酶(*SOD*)对于花粉萌发、花粉管的生长起着重要的调节作用。杨晓苓等<sup>[7]</sup>在研究百合授粉亲和性时发现,较高活性水平的 *POD*、*SOD* 在授粉后的前期有利于花粉萌发、黏附及花粉-柱头之间的识别,这一结果在芸芥<sup>[8]</sup>、甘蓝<sup>[9]</sup>中也得到了验证。胼胝质作为一种以  $\beta$ -1,3-键结合的葡聚糖,广泛存在于植物的花粉粒、花粉管、花粉母细胞,对细胞生长发育、花粉外壁形成、花粉育性及活性起着重要作用<sup>[10-12]</sup>。杜文文等<sup>[13]</sup>在对亚洲百合与铁炮百合杂交的亲和性研究中发现,杂交不亲和常常伴随胼胝质的大量积累,

阻碍花粉粒的正常萌发,造成花粉管在生长过程中无方向性、扭曲缠绕、无法伸入胚囊中,这与对君子兰<sup>[14]</sup>、美女樱<sup>[15]</sup>、高粱<sup>[16]</sup>等的研究结果一致。 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶可以催化降解胼胝质,维持体内胼胝质含量的稳定,同时对花粉的萌发及花粉管生长也起着重要作用<sup>[17-18]</sup>。

我国芍药品种资源和类型丰富,但各类型中分布的品种数却很不平衡,缺乏各色单瓣类、白色半重瓣类及复色系品种,同时中国栽培芍药以中晚花为主,缺乏早花品种。本研究以9个红色重瓣或半重瓣芍药品种为母本,以白色单瓣早花牡丹品种凤丹白为父本,通过观察不同组合中花粉在柱头上的萌发及花粉管生长情况,并结合不同组合的柱头在授粉后不同时期的保护酶(*POD*、*SOD*)活性、胼胝质含量及  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的变化,探讨不同组合的亲和性,为克服芍药属植物远缘杂交不亲和及种质创新提供理论依据,以期获得早花的白色半重瓣或复色品种,从而丰富中国芍药种质资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

2021年4月中旬在河南省优质花卉苗木基地收集牡丹凤丹白(FDB)的新鲜花粉并于4℃保存。供试母本为9个芍药品种,分别是老来红(LLH)、蝶恋花(DLH)、鲁红(LH)、莲台(LT)、星光灿烂(XGCL)、遍地红(BDH)、Kansas、Venus、Peter Brand(表1),均栽植于河南现代农业研究开发基地。于2021年4月下旬选取生长健壮、无病虫害、长势一致的母本花苞,摘除花瓣、雄蕊后用硫酸纸袋套在雌

蕊上过夜处理。

表 1 9 个芍药品种的花性状

Table 1 Flower traits of nine *Paeonia lactiflora* varieties

编号	品种	花型	花期
1	老来红	楼子台阁型或绣球型	早
2	蝶恋花	托桂型	中
3	鲁红	皇冠型	中
4	莲台	托桂型(偶有皇冠型)	中
5	星光灿烂	托桂型	中
6	遍地红	千层台阁型	晚
7	Kansas	蔷薇型	早
8	Venus	荷花型	早
9	Peter Brand	皇冠型	晚

## 1.2 取样方法

在授粉后 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 共 6 个时期选取柱头样品,每个时期设 3 次重复,取部分柱头放入 50% FAA 固定液(乙醇醋酸福尔马林混合固定液)中,于 4 °C 冰箱保存,其余柱头用液氮速冻后于 -80 °C 保存。

## 1.3 测定方法

1.3.1 花粉发育状态的荧光观察 参照 Hiratsuka 等<sup>[19]</sup>的方法并作改进,用 50% FAA 固定好柱头后,用 8 mol/L NaOH 溶液浸泡 6~8 h,以柱头整体变软为宜,然后分别用体积分数为 70%、50%、30%、10% 的乙醇和蒸馏水进行梯度复水,用蒸馏水复水时重复操作 3 次,将柱头用 0.1% 苯胺蓝染色液染色后压片。荧光观察操作参照雷家军等<sup>[20]</sup>的方法。

1.3.2 保护酶活性的测定 POD、SOD 活性的测定

参照李忠光等<sup>[21]</sup>的方法并略加改进,每个处理设 3 次生物学重复。

1.3.3 胼胝质含量的测定 胼胝质含量的测定方法参照 Plant Callose ELISA KIT 试剂盒(购自上海酶联生物科技有限公司)说明书。以标准品质量浓度作横坐标,450 nm 波长下对应  $OD_{450}$  作纵坐标绘制标准品回归曲线,按照曲线回归方程计算各样品的质量浓度,进而计算胼胝质含量。每个处理设 3 次生物学重复。

1.3.4  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的测定 测定  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的方法参照  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶( $\beta$ -1,3-GA)活性检测试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公司)说明书。用标准管吸光度( $OD_{\text{标准管}} - OD_{\text{空白管}}$ )和标准管浓度( $OD_{\text{标准管}} - OD_{\text{空白管}}$ )建立标准曲线,将  $\Delta OD$  带入公式中,计算出样本中产生的还原糖含量。每个处理设 3 次生物学重复。

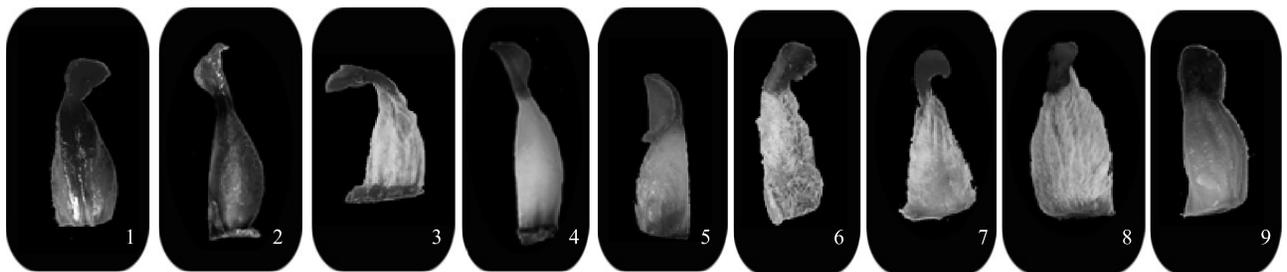
## 1.4 数据处理

用 SPSS 22.0 进行数据分析,用 Excel 2017 进行数据整理,用 Origin 2022 绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 9 个芍药品种柱头的形态特征

由图 1 可以看出,9 个芍药品种都具有完整的雌蕊结构,其中 LLH、DLH、LT、XGCL、Peter Brand 等 5 个品种的花柱、子房表面较为光滑,LLH 尤为突出。可以从 LLH、DLH 的柱头上观察到明显的分泌物,LH、BDH、Kansas 和 Venus 的花柱及子房表面覆盖 1 层茸毛,Venus 尤为明显。XGCL、Venus、Peter Brand 的柱头与花柱所呈角度较小,其余 6 个芍药品种的柱头与花柱之间所呈角度较大。



1:老来红(LLH);2:蝶恋花(DLH);3:鲁红(LH);4:莲台(LT);5:星光灿烂(XGCL);6:遍地红(BDH);7:Kansas;8:Venus;9:Peter Brand。

图 1 9 个芍药品种的雌蕊形态

Fig.1 Pistil morphology of nine *Paeonia lactiflora* varieties

## 2.2 授粉后不同组合花粉管生长情况

于授粉后 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h, 观察 9 个组合的花粉粒萌发及花粉管的生长情况。从表 2 可以看出, 除 BDH×FDB、Kansas×FDB、Peter Brand×FDB 在授粉后 2 h 内未观察到明显的花粉粒萌发外, 其余组合在授粉后 2 h 均观察到了花粉粒萌发, LLH×FDB、Venus×FDB 在授粉后 1 h 就观察到花粉粒萌发。授粉后 2 h, LLH×FDB (图 2H)、Venus×FDB (图 2E) 可以看到清晰的花粉粒及花粉管, Venus×FDB 花粉管生长迅速。授粉后 4 h, LH×FDB 花粉管的生长方向出现紊乱且产生了胼胝质 (图 2M); XGCL×FDB 中只有少数花粉粒萌发、花粉管生长, 并且出现了胼胝质堆积 (图 2J), 此时 Venus×FDB 花粉管出现扭曲。授粉后 8 h, DLH×FDB 少量花粉管出现缠绕扭曲, 部分花粉管进入柱头 (图 2C); XGCL×FDB 花粉粒大量萌发 (表 2); Kansas×FDB 有少量花粉粒萌发、花粉管生长 (图 2A)。授粉后 12 h, LH×FDB 已经有少量花粉管进入柱头, 并向子房方向延伸 (表 2); LLH×FDB 有少量花粉管向子房方向延伸 (表 2); LH×FDB 柱头表面有大量花粉管缠绕盘旋, 相互扭曲 (图 2G); XGCL×FDB 少量花粉管在柱头表面扭曲, 相互缠绕, 并停止生长 (图 2I); Kansas×FDB 花粉粒大量萌发, 少量花粉管已经进入柱头长度的 1/2 处, 继续向子房方向延伸 (图 2B); Venus×FDB 大量花粉管发生扭曲缠绕, 在柱头表面盘旋 (图 2F); Peter Brand×FDB 少数花粉粒开始萌发, 花粉管进入柱头内部 (图 2K)。授粉 24 h 后, LLH×FDB 花粉管有少量进入柱头中, 大量仍停留在柱头顶端 (图 2L); XGCL×FDB、DLH×FDB、Venus×FDB 柱头表面有大量花粉管扭曲缠绕生长 (图 2D、表 2); LH×FDB 大部分花粉管向子房方向弯曲生长 (图 2N), 但是未见花粉管进入胚珠; BDH×FDB 花粉粒开始萌发。

## 2.3 授粉后不同组合雌蕊中保护酶活性的变化

如图 3 所示, 9 个芍药品种授牡丹凤丹白花粉后雌蕊中的 *POD*、*SOD* 活性发生变化。授粉后, DLH 的 *POD*、*SOD* 活性表现为先上升后下降的趋势, 在授粉后 8 h 达到最大值; LH 的 *POD*、*SOD* 活性整体表现为“上升→下降→上升”的趋势, 在授粉后 4 h 达到 1 个较高峰值, 随后开始下降, 在授粉后 8 h 达到较低谷值, 随后恢复上升趋势; BDH 的 *POD*、*SOD* 活性在授粉后 1 h、2 h、12 h 表现出 *POD* 活性

高于 *SOD* 活性外, 在授粉后 4 h、8 h、24 h 表现出 *SOD* 活性高于 *POD* 活性, 且 *POD*、*SOD* 活性均表现出“下降→上升→下降”的趋势。LLH、Venus 的 *POD*、*SOD* 活性在授粉 8 h 内表现为相反变化趋势。XGCL 的 *POD*、*SOD* 活性变化趋势与 LLH 相反, XGCL 的 2 种酶活性在授粉 8 h 内的变化趋势一致, 授粉后 8 h 的变化趋势相反。LT 的 *POD*、*SOD* 活性变化趋势在授粉 8 h 前后整体相反, 推测授粉后 8 h 为重要转折时期; 授粉后 Peter Brand 的 *POD* 活性呈上升趋势, Kansas 的 *POD* 活性呈“上升→下降”的趋势, 但两者的 *SOD* 活性呈波浪状起伏变化, 且在授粉前期保持较高水平。

表 2 授牡丹凤丹白花粉后不同组合花粉管的生长情况

Table 2 Growth of pollen tubes in different combinations after pollinating the pollen of *Paeonia suffruticosa* Fengdanbai

杂交组合 (♀×♂)	授粉后不同时期花粉管的生长状态					
	1 h	2h	4 h	8 h	12 h	24 h
LLH×FDB	B	B	B	B	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>
DLH×FDB	W	B	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>
LH×FDB	W	B	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
LT×FDB	W	B	B	B	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>
XGCL×FDB	W	B	B	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
BDH×FDB	W	W	W	W	W	B
Kansas×FDB	W	W	W	B	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>
Venus×FDB	B	B	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>
Peter Brand×FDB	W	W	W	W	B	B

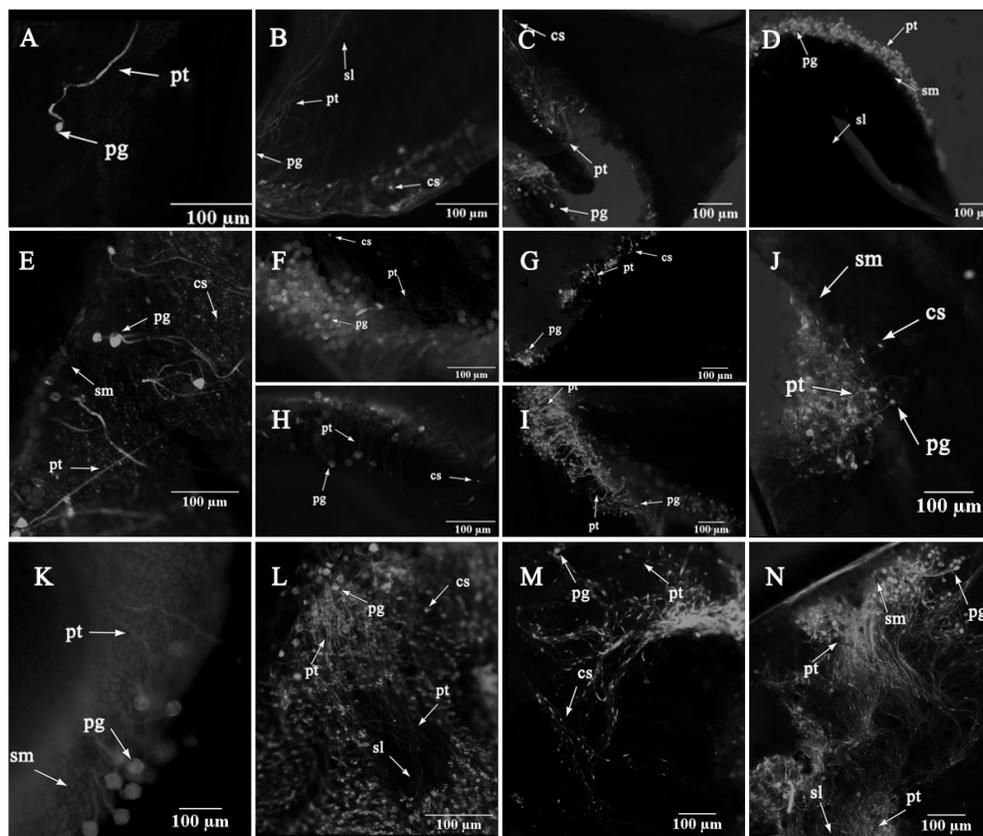
LLH: 老来红; FDB: 凤丹白 (牡丹); DLH: 蝶恋花; LH: 鲁红; LT: 莲台; XGCL: 星光灿烂; BDH: 遍地红。W: 花粉粒未萌发; B: 花粉粒少量萌发; C<sub>1</sub>: 花粉粒大量萌发 (少量花粉管在柱头表面扭曲缠绕或进入柱头); C<sub>2</sub>: 花粉粒大量萌发 (大量花粉管在柱头表面扭曲缠绕或进入柱头); D<sub>1</sub>: 少量花粉管沿着花柱延伸; D<sub>2</sub>: 大量花粉管沿着花柱延伸。

## 2.4 授粉后不同组合雌蕊中胼胝质含量及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性

如图 4 所示, 9 个芍药品种授牡丹凤丹白花粉后雌蕊中的胼胝质含量、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性发生变化。其中 LLH×FDB 的胼胝质含量、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性表现为先上升后下降的趋势, 但在授粉后 4~8 h, 胼胝质含量急剧上升, 同时  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性明显下降; LH×FDB 的胼胝质含量、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性总体表现为下降趋势; Venus×FDB 的胼胝质含量、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性总体呈波浪状起伏变化, 授粉后 4 h 内胼胝质含量急剧下降,  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性略有所升高, 随后两者处于动态平衡状态;

XGCL×FDB、Kansas×FDB 的胼胝质含量与  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的变化趋势整体相反,但 Kansas×FDB 的胼胝质含量与  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性总体呈下降趋势;DLH×FDB、BDH×FDB 的胼胝质含量、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性在授粉后 2 h 内的变化趋势一致,授粉

后 4 h 胼胝质含量的变化趋势相反;LT×FDB、Peter Brand×FDB 的胼胝质含量与  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性在授粉 8 h 内的变化趋势一致,在授粉 8 h 后两者趋势相反。



A:授粉后 8 h 的 Kansas×风丹白;B:授粉后 12 h 的 Kansas×风丹白;C:授粉后 8 h 的蝶恋花(DLH)×风丹白;D:授粉后 24 h 的星光灿烂(XGCL)×风丹白;E:授粉后 2 h 的 Venus×风丹白;F:授粉后 12 h 的 Venus×风丹白;G:授粉后 12 h 的老来红(LLH)×风丹白;H:授粉后 2 h 的 LLH×风丹白;I:授粉后 12 h 的 XGCL×风丹白;J:授粉后 4 h 的 XGCL×风丹白;K:授粉后 12 h 的 Peter Brand×风丹白;L:授粉后 24 h 的 LLH×风丹白;M:授粉后 4 h 的鲁红(LH)×风丹白;N:授粉后 24 h 的 LH×风丹白。pg:花粉粒;pt:花粉管;sm:柱头;sl:花柱;cs:胼胝质。

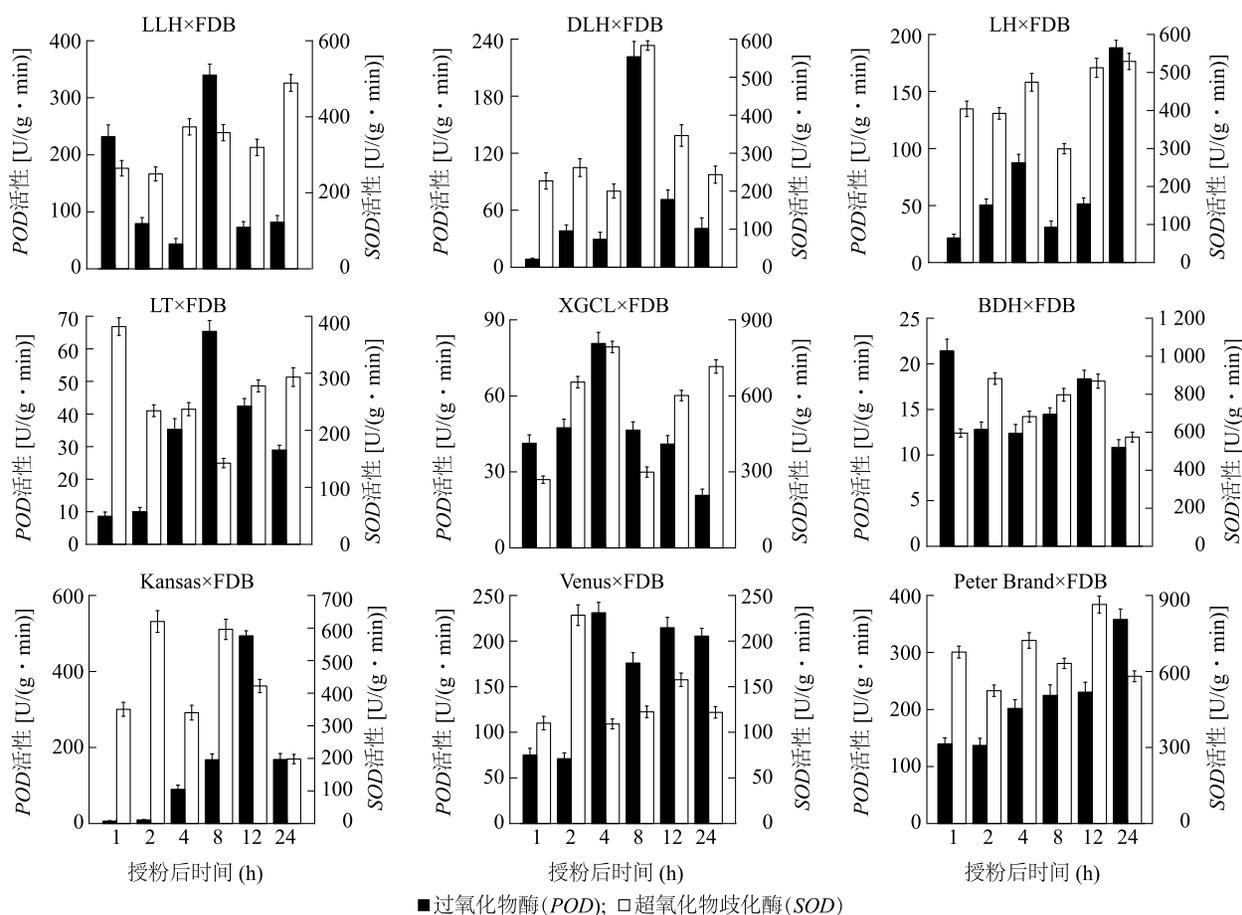
图 2 不同组合授粉后花粉管生长的荧光观察结果

Fig.2 Fluorescence observation of pollen tube growth in different combinations after pollination

### 3 讨论

在本研究中,9 个组合在授粉后均能观察到花粉粒萌发,但其花粉粒萌发、花粉管的生长情况差异明显,授粉后 2 h 内为花粉与柱头识别的重要时间段<sup>[6]</sup>。柱头的表面形态及生理特性对于花粉粒的成功附着及萌发起到重要作用<sup>[22]</sup>。柱头分泌物可为花粉粒的水合作用和萌发提供最佳渗透压,从而促进花粉粒萌发,花粉管在花柱道表面的分泌物中生长、伸长,并进入子房<sup>[23]</sup>。在本研究中,LLH×

FDB、Kansas×FDB 的柱头有明显的分泌物,部分子房较为膨大,其花粉管的生长情况较好,花粉管进入柱头并沿花柱向子房方向延长。BDH×FDB、Peter Brand×FDB 2 个组合的花粉管生长缓慢,几乎未进入柱头,可能与其花期较晚或柱头分泌物较少相关<sup>[24-25]</sup>。授粉后 8 h,除 BDH×FDB、Peter Brand×FDB 之外的其他组合都可以观察到花粉粒萌发,表明大部分组合的牡丹风丹白花粉与芍药品种柱头是可以相互识别的。随着授粉时间的增加,不同组合的花粉管均出现了扭曲、缠绕以及胼胝质积累等现



LLH: 老来红; DLH: 蝶恋花; LH: 鲁红; LT: 莲台; XGCL: 星光灿烂; BDH: 遍地红; FDB: 凤丹白(牡丹)。

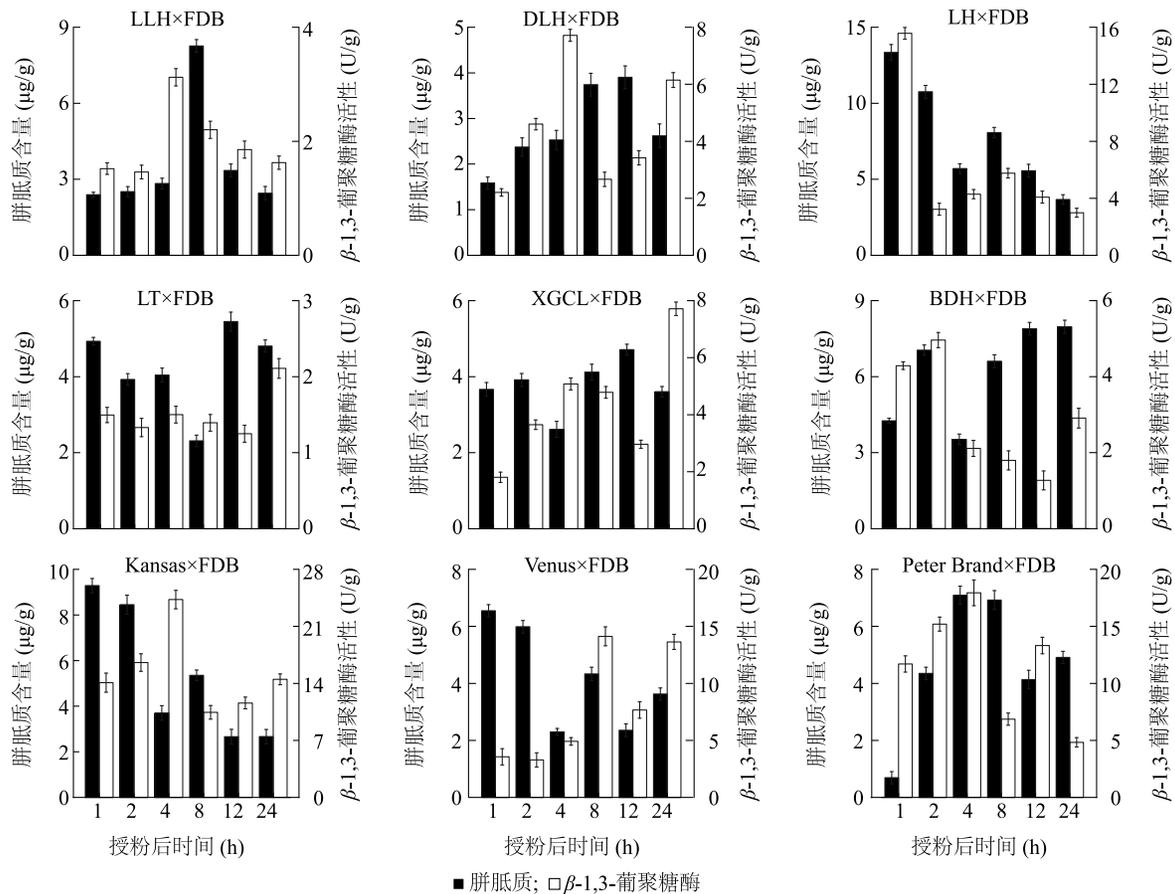
图3 9个芍药品种授牡丹凤丹白花粉后雌蕊中保护酶活性的变化

Fig.3 Changes of protective enzyme activities in pistils of nine cultivars after pollination with pollen of *Paeonia suffruticosa* Fengdanbai

象,但其花粉管的生长情况差异明显。本研究发现,芍药花的柱头形态与花粉萌发也有一定关系,LLH、LH、Kansas的柱头、花柱之间的角度较大,授粉后花粉管的生长较好且更容易伸入花柱中,可能是由于柱头与花柱之间的角度较大有利于通道细胞生长,通道细胞的分泌物含量较高可以促进花粉管生长<sup>[26]</sup>。但是,柱头的形态差异对花粉管生长的影响及其影响机制还有待进一步研究。

活性氧(ROS)作为一种小分子信号,在植物细胞生长及抗逆中发挥着重要作用,但活性氧产生过多会对细胞造成伤害,如花粉管尖端富集的ROS会介导花粉管的生长和破裂<sup>[27]</sup>。POD、SOD作为主要的抗氧化酶之一,具有清除细胞中多余自由基的重要作用,同时也可维持体内的ROS平衡及细胞膜结构<sup>[28]</sup>。当异源花粉在柱头上萌发时,会引起一系列酶反应,较高水平的POD、SOD活性可以促进花粉粒萌发及

花粉管生长<sup>[6-7]</sup>。在本研究中,授粉后4 h内(花粉黏附、萌发、花粉管开始生长的时期),结合花粉管的荧光观察结果发现,在BDH、Kansas、Peter Brand的柱头中没有观察到花粉萌发,推测与BDH、Kansas雌蕊中过高的SOD活性及过低的POD活性有关,2种酶活性的不平衡打破了雌蕊中产生和清除 $H_2O_2$ 的平衡,导致 $H_2O_2$ 过度积累,引起细胞内大分子氧化损伤,进而影响花粉的萌发<sup>[29]</sup>。在授粉后4~8 h(花粉管生长时期),LLH、DLH、XGCL、LH和Kansas的POD、SOD活性总体维持在较高的水平,此时观察到花粉粒大量萌发且发现少量花粉管快速生长,而此时BDH的POD活性依旧较低,同时没有观察到明显的花粉管,推测在花粉管生长时期POD起到重要的调控作用。此外,POD还作为一种细胞壁酶,参与细胞壁结构蛋白、果胶的交联反应,进而影响细胞的生长速度<sup>[30]</sup>。在授粉后8 h,LLH、LH、Kansas、Venus的POD、SOD



LLH:老来红;DLH:蝶恋花;LH:鲁红;LT:莲台;XGCL:星光灿烂;BDH:遍地红;FDB:凤丹白(牡丹)。

图4 9个芍药品种授牡丹凤丹白花粉后雌蕊中胼胝质含量及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的变化

Fig.4 Changes of callose content and  $\beta$ -1,3-glucanase activity in pistils of nine cultivars after pollination with pollen of *Paeonia suffruticosa* Fengdanbai

活性虽有所起伏,但依旧保持较高水平,花粉管生长相对更快速,发生折叠缠绕的概率更低,表明较高的 *POD*、*SOD* 活性对于花粉管的正常生长起到促进作用,这与刘遵春等<sup>[31-32]</sup>的研究结果一致。在整个观测期内, Peter Brand 虽具有较高的 *POD*、*SOD* 活性,但其花粉粒萌发较晚,花粉管生长迟缓,可能与其品种特性有关,具体调控机制仍需进一步研究。

胼胝质在植物的生殖发育过程中起着重要作用,在花粉外壁形成、保持花粉育性方面不可或缺<sup>[12]</sup>。高含量的胼胝质会导致花粉管出现生长缓慢、扭曲缠绕、生长无方向性等现象<sup>[33]</sup>。 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶可以将胼胝质催化降解成寡糖,在植物的花粉管形成与生长、细胞壁的形成中发挥着重要作用<sup>[16,34]</sup>。在本研究中, LLH×FDB、DLH×FDB、LH×FDB、BDH×FDB、XGCL×FDB、Venus×FDB 的花粉粒萌发较快,其中 LH×FDB、Venus×FDB 花粉粒萌发时

的胼胝质含量均处于较高水平,可能是在花粉粒萌发初期需要较多胼胝质来形成花粉壁等<sup>[35]</sup>。通过对不同时期胼胝质含量及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的分析,并结合对应时期的花粉管生长情况,发现授粉后 LH 的胼胝质含量与 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性处于较高水平时,花粉粒的萌发及花粉管生长均正常,这可能是由于 LH 的柱头具有较强的调节能力,随着胼胝质含量升高, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性也相应升高,从而降解过多的胼胝质,使其含量处于适合花粉粒萌发及花粉管伸长的范围,维持花粉管的正常生长。研究还发现,胼胝质含量与 $\beta$ -1,3-葡萄糖酶活性在不同品种中的变化趋势存在差异,如在 LH 中两者的变化趋势几乎一致,可能由于该品种的自我调节能力较强,可以快速调控胼胝质含量与 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的平衡,使其适合花粉粒的萌发、花粉管的生长。授粉后 Peter Brand 中 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的

降低及胼胝质含量的快速升高使得胼胝质在花粉管中大量堆积。研究还发现,授粉 8 h 后,具有较高胼胝质含量及较低  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性组合的花粉管生长迟缓、扭曲缠绕,如 BDH $\times$ FDB、Peter Brand $\times$ FDB。对于授粉后花粉管生长较为正常的品种(如 LLH、LH)而言,其胼胝质含量及  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性较低且处于相对平衡状态,表明花粉管的正常生长需要较低的胼胝质含量与较低的  $\beta$ -1,3-葡萄糖酶活性,且两者应处于动态平衡状态。另外,胼胝质含量与  $\beta$ -1,3-葡萄糖酶活性在个别时期呈不规律的关系,这表明植物体内胼胝质含量不是由单一因素调控,可能由基因、激素等多种因素共同调节<sup>[12,36]</sup>。

本研究通过对 9 个组合不同授粉后时间雌蕊中酶(*POD*、*SOD*)活性、胼胝质含量以及  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的测定,结合对应时间花粉管的生长情况进行分析,发现授粉后前期较高的 *POD*、*SOD* 活性及后期较低水平且维持动态平衡状态的胼胝质含量与  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性是保证花粉粒萌发和花粉管正常生长的重要条件,但其他因素(如基因)对亲和性的影响需进一步研究。本研究发现,国内 6 个芍药品种中,LLH $\times$ FDB、LH $\times$ FDB 组合的亲和性较好,BDH $\times$ FDB 组合的亲和性最差;国外 3 个芍药品种中,Kansas $\times$ FDB 组合的亲和性相对较好,Peter Brand $\times$ FDB 组合的亲和性最差。

#### 参考文献:

- [1] 贺丹,谢栋博,张俊蕊,等. 利用 iTRAQ 技术和转录组筛选芍药属远缘杂交不亲和基因[J]. 中国农业科学, 2020, 53(6): 1234-1246.
- [2] 杨柳慧,张建军,王琪,等. 5 个芍药属伊藤杂种的倍性鉴定及核型分析[J]. 植物研究, 2017, 37(4): 535-541.
- [3] DU G C, XU J G, GAO C G, et al. Effect of low storage temperature on pollen viability of fifteen herbaceous peonies[J]. Biotechnology Reports, 2019, 21(3): e00309.
- [4] KAORU T, KENJI O, TAKAHIRO K, et al. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding[J]. Breeding Science, 2016, 66(3): 333-349.
- [5] HE D, LOU X Y, HE S L, et al. Isobaric tags for relative and absolute quantitation-based quantitative proteomics analysis provides novel insights into the mechanism of cross-incompatibility between tree peony and herbaceous peony[J]. Functional Plant Biology, 2019, 46(5): 417-427.
- [6] 贺丹,解梦珺,吕博雅,等. 牡丹与芍药的授粉亲和性表现及其生理机制分析[J]. 西北农林科技大学报(自然科学版), 2017, 45(10): 129-136.
- [7] 杨晓苓,杨利平,尚爱芹,等. 百合授粉亲和性与雌蕊中保护酶和激素的关系[J]. 园艺学报, 2009, 36(6): 855-860.
- [8] 王保成,孙万仓,范惠玲,等. 芸芥自交亲和系与自交不亲和系 *SOD*、*POD* 和 *CAT* 酶活性[J]. 中国油料作物学报, 2006(2): 162-165,171.
- [9] 吴能表,徐光德,唐于婷,等. 自交不亲和甘蓝的花粉萌发与花柱内保护酶活性变化[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2004(5): 848-851.
- [10] NEDUKHA O M. Callose: localization, functions, and synthesis in plant cells[J]. Cytology and Genetics, 2015, 49(1): 49-57.
- [11] WANG X Q, WU Z, WANG L Q, et al. Cytological and molecular characteristics of pollen abortion in *Lily* with dysplastic tapetum[J]. Horticultural Plant Journal, 2019, 5(6): 281-294.
- [12] 张庆雯,王兆昊,祁静静,等. 植物胼胝质合成酶研究进展[J]. 园艺学报, 2021, 48(4): 661-675.
- [13] 杜文文,王祥宁,吴丽芳,等. 亚洲百合和铁炮百合正反杂交亲和程度的差异性分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(23): 4854-4861.
- [14] 王冲,雷家军,姜闯,等. 君子兰种间杂交及自交亲和性[J]. 中国农业科学, 2011, 44(18): 3822-3829.
- [15] 孙晓梅,尚德郁,杨宏光,等. 细叶美女樱和美女樱种间杂交亲和性的研究[J]. 北方园艺, 2007(12): 101-102.
- [16] 张慧. 铝诱导甜高粱根尖胼胝质积累机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [17] MEIKLE P J, BONIG I, HOOGENRAAD N J, et al. The location of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody[J]. Planta, 1991, 185(1): 1-8.
- [18] 万凌琳. 水稻  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶基因 *Osg1* 的功能研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2010.
- [19] HIRATSUKA S, ZHANG S L, NAKAGAKA E, et al. Selective inhibition of the growth or incompatible pollen tubes by S-protein in the Japanese pear[J]. Sexual Plant Reproduction, 2001, 13(4): 209-215.
- [20] 雷家军,吴超. 卷丹与亚洲百合种间杂交花粉管生长的荧光观察[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(4): 117-120.
- [21] 李忠光,李江鸿,杜朝昆,等. 在单一提取系统中同时测定五种植物抗氧化酶[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2002(6): 44-48.
- [22] 李晶,金樑,邓志刚,等. 被子植物花粉和雌蕊互作的分子基础[J]. 草业科学, 2014, 31(1): 161-167.
- [23] LAU J Y Y, PANG C C, RAMSDEN L, et al. Stigmatic exudate in the Annonaceae: pollinator reward, pollen germination medium or extragynoecial compitum[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(12): 881-894.
- [24] 白雪,刘占德,李建军,等. 猕猴桃花后不同天教授粉效果研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(7): 166-168.
- [25] 郭玉洁,杨会娟,曹宇,等. 山丹与几种百合的杂交及花粉管生长荧光观察[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(14): 116-120.
- [26] 刘宁. 花柱和柱头的结构[J]. 生物学通报, 1998(4): 17-

- 19.
- [27] FENG H Q, LIU C, FU R, et al. LORELEI-LIKE GPI-ANCHORED PROTEINS 2/3 regulate pollen tube growth as chaperones and coreceptors for ANXUR/BUPS receptor kinases in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(12): 1612-1623.
- [28] 谢晓红. 植物抗氧化酶系统研究进展[J]. *化工管理*, 2015(32): 99-100.
- [29] 宋喜贵, 余小平. 植物体内过氧化氢的产生及其生理作用[J]. *连云港师范高等专科学校学报*, 2010, 27(4): 99-103.
- [30] 郭云, 支崇远, 赵宇中. 显花植物受精早期阶段的酶作用[J]. *种子*, 2007(2): 45-48.
- [31] 刘遵春, 包东娥, 扈惠灵. 金光杏梅自交不亲和性的生理机制[J]. *河南科技学院学报(自然科学版)*, 2017, 45(1): 10-13.
- [32] 张雪梅, 李保国, 赵志磊, 等. 苹果自花授粉花粉管生长和花柱保护酶活性与内源激素含量的关系[J]. *林业科学*, 2009, 45(11): 20-25.
- [33] 律春燕, 王雁, 朱向涛, 等. 黄牡丹与芍药组间杂交花粉与柱头识别的解剖学研究[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(10): 1988-1994.
- [34] ZAVALIEV R, UEKI S, EPEL B L, et al. Biology of callose ( $\beta$ -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata[J]. *Protoplasma*, 2011, 248(1): 117-130.
- [35] 崔海芳, 张凡, 尹俊龙, 等. 胼胝质沉积与花粉发育[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2017, 32(3): 551-557.
- [36] 刘林秀, 曾海涛, 徐皓, 等. 几种植物激素对4种山茶属植物花粉萌发及花粉管生长的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2021, 43(4): 700-707.

(责任编辑:徐艳)