

6 个月季品种的自我亲和性

刘红明^{1,3,4}, 王其刚^{2,3,4}, 张颢^{2,3,4}, 蹇洪英^{2,3,4}, 邱显钦^{2,3,4}, 唐开学^{2,3,4*}

(1. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091; 2. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205; 3. 云南省花卉育种重点实验室, 云南 昆明 650205; 4. 云南花卉技术工程研究中心, 云南 昆明 650205)

摘 要: 以云粉、云玫、蜜糖、蜜月、云艳、粉妆等 6 个月季品种为材料, 采用离体培养与活体萌发法测定花粉生活力, 统计分析田间自花授粉坐果率、平均种子数, 并对授粉后花粉原位萌发及花粉管的生长过程进行荧光显微观察。结果表明, 在活体和离体培养条件下, 每个月季品种的花粉萌发率基本一致; 云粉的离体和活体萌发率均最高, 分别为(33.34±1.70)%和(31.56±1.63)%; 蜜糖的坐果率最高, 为 60.00%, 云粉次之, 为 39.24%, 云艳最低, 未结实。6 个月季品种的平均种子数均较少, 最多的云粉仅有 11 粒。自交亲和的品种自花授粉 3 h 后花粉开始萌发, 24 h 后到达花柱中部, 48 h 后有部分花粉管进入子房; 自交不亲和的品种在授粉 24 h 后花粉管停止伸长, 花粉管末端膨大、弯曲、变形。由自交坐果率与荧光显微观察结果得出的结论一致, 云粉、云玫、蜜糖、蜜月为自交亲和品种, 云艳、粉妆为自交不亲和品种。

关 键 词: 月季; 自我亲和性; 自花授粉; 花粉生活力; 坐果率

中图分类号: S685.12 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0391-05

Self-compatibility in six new *Rosa hybrida* cultivars

LIU Hong-ming^{1,3,4}, WANG Qi-gang^{2,3,4}, ZHANG Hao^{2,3,4}, JIAN Hong-ying^{2,3,4}, QIU Xian-qin^{2,3,4}, TANG Kai-xue^{2,3,4*}

(1.College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China ; 2.Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China ; 3.Yunnan Key Laboratory for Flower Breeding, Kunming 650205, China ; 4.Yunnan Flower Research and Development Center, Kunming 650205, China)

Abstract: The self-pollinated styles in six new rose cultivars were investigated by measuring pollen viability *in vitro* and *in vivo*, observing fruit set ratio and average seed numbers and fluorescence microscopic observation of pollen germination and pollen tube growth. Results showed pollen germination rate *in vitro* were consistent with that *in vivo*. The pollen germination rate of Yunfen cultivar were (33.34±1.70)%, (31.56±1.63)% *in vitro* and *in vivo* respectively. The fruit set ratio of Mitang cultivar after self pollination was 60.0% which was the highest, followed by Yunfen cultivar which was 39.24% and Yunyan cultivar showed no fruit set. The average seed numbers of all cultivars were low with Yunfen cultivar shown the highest number which was only 11. The pollen of self-compatibility cultivars began to germinate 3 h after self-pollination and the pollen tube could grow normally. The pollen tube extended into the middle of style 24 h after self pollination and passed through the base of style 48 h after self pollination and finally entered into the ovary. But the tubes of self-incompatibility cultivars stopped growing 24 h after pollination and pollen tubes suffered from deformation before ceased to grow. The results of microscopic observation were agreeable with the fruit set ratio which suggest that Yunfen, Yunmei, Mitang and Miyue showed self-compatibility while Yunyan and Fenzhuang showed self-incompatibility.

Key words : *Rosa hybrida*; self-compatibility; self-pollinated styles; pollen viability; fruit set ratio

收稿日期: 2011-01-22

基金项目: 农业部花卉行业专项(200903020)

作者简介: 刘红明(1986—), 男, 云南宜良人, 硕士研究生, 主要从事月季育种研究; *通信作者, kxtang@hotmail.com

目前,中国授权保护的切花月季品种多由芽变选育获得,仅有部分品种通过杂交选育^[1]获得,但杂交育种将成为培育月季新品种的主要手段。将国内授权保护的品种进一步培育成新品种,掌握亲本的亲性和性状对杂交成功至关重要^[2]。自交不亲和性常见于雌雄同株的植物,是植物在长期进化过程中形成的有利于异花授粉的一种生殖隔离^[3],是高等植物中常见的一种生物学现象。目前已在油菜^[4-5]、梨^[6]、杏^[7]和烟草^[8]等多种植物上开展自交不亲和现象的研究。已有研究^[9]表明,蔷薇科植物表现S-RNase介导的配子体型自交不亲和性,即花粉管的生长抑制常发生在花柱通道内。Gudin^[10]对各种条件下月季花粉的育性、花粉和柱头的亲和性进行了研究;于晓艳等^[11]对玫瑰的自交亲和性进行了研究;王其刚等^[2]对月季云粉、云玫的花粉活力和柱头可授性进行了研究,但对于月季的亲和性目前尚不清楚。月季杂交结实率低严重影响其育种进程。月季杂交结实率低与花粉活力、花粉量、授粉时期等^[2]相关,也与目前对育种材料的亲和性状况及授粉后花粉管的生长途径缺少了解有关。笔者从形态学角度研究花粉管在花柱中的生长特性,结合田间人工授粉试验研究自育品种的亲和性,旨在为月季杂交育种提供理论依据,为进一步培育具有中国自主知识产权的月季品种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为云南省农业科学院花卉研究所培育的6个切花月季品种(表1)。

表1 6个自育切花月季品种的基本性状

Table 1 A list of *Rosa hybrida* materials

品种	花色	单花雄蕊数/枚	单花雌蕊数/枚	花朵散粉量	品种权号
云粉(YF)	浅粉	(132±9.19)c	(78±8.49)d	较多	20070004
云玫(YM)	玫红	(153±10.61)b	(154±6.36)ab	较多	20070003
云艳(YY)	粉红	(107±7.78)d	(99±9.19)c	多	20090010
粉妆(FZ)	淡粉	(187±5.66)a	(164±8.49)a	多	20090012
蜜糖(MT)	黄白	(131±9.19)c	(82±7.78)d	较多	20090011
蜜月(MY)	红	(179±10.61)a	(150±3.54)b	少	20100006 (申请号)

1.2 方 法

田间试验于2010年5月至2010年12月在云南省农业科学院花卉研究所月季育种圃进行;室内试验在云南省花卉育种重点实验室进行。

1.2.1 人工控制授粉

挑选健壮植株上待开放的花朵,挂牌标记,去雄,套袋,将摘下的花药置于20~25℃通风处阴干,散粉后于9:00—10:00进行自花授粉,套袋隔离。每个品种授粉80朵花,对其中30朵定期取材,于荧光显微镜下观察,其余的4个月后统计自交坐果率和单果种子数。

1.2.2 花粉生活力的测定

1) 用离体培养法测定。离体培养参照周家杏等^[12]的方法,并根据预试验结果对蔗糖和琼脂浓度作适当调整。基本培养基中蔗糖占20%,硼酸占0.01%,琼脂占0.5%。每培养皿取5个视野,每个品种重复3次。用Nikon SMZ800显微镜观察,用附带的照相系统拍照记录。用图像分析软件Image Pro Plus 6.0统计花粉萌发数,并测量花粉管长度(μm)。将花粉管萌发长度超过1/2花粉直径的花粉视为具有活力的萌发花粉。花粉萌发率=某视野萌发花粉数/该视野花粉总数。

2) 用活体萌发法测定。参照Mayer等^[13]的方法,人工自花授粉后10h将柱头取下,置于1%的醋酸结晶紫水溶液内染色,统计花粉粒数目。将该柱头用水漂洗后,再次统计花粉粒数目。萌发率=漂洗后花粉粒数/漂洗前花粉粒数。

1.2.3 花粉管生长的荧光显微观察

参照于晓艳等^[11]和Teng等^[14]的方法进行压片观察,并对NaOH软化液浓度和软化时间作适当调整。将YF、YM、YY、FZ、MT、MY自花授粉后1、3、10、24、36、48h的花朵取下,每次取3朵,去掉花丝和花瓣,花柱连同子房用质量比为90:5:5的70%乙醇、冰醋酸、甲醛固定24h,用8mol/L的NaOH软化4h,用0.1%水溶性苯胺蓝染液(用0.1mol/L K₃PO₄溶液配制)染色4h,挑取完整的雌蕊压片,用LEICA DM6000 B荧光显微镜观察花粉管在花柱中的生长情况,并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 月季的花粉生活力

从表 2 可以看出,除 MY 外,月季花粉活体萌发率均比离体萌发率低,但差异不显著($P > 0.05$)。6 个月季品种间萌发率差异较大,YF 的离体萌发率和活体萌发率均最高,分别为(33.34±1.70)%、(31.56±1.63)% , MT 的离体和活体萌发率较高,分别为(22.18±1.24)% ,

(19.28±1.58)% ; MY 的离体萌发率最低,为(7.17±0.41)% ; YY 的活体萌发率最低,为(6.88±1.90)%。从花粉管平均长度来看,YF 的花粉管最长,为(338.78±19.72) μm ; YY 的最短,为(126.38±20.22) μm 。花粉管长度与花粉萌发率呈显著正相关($r_{\text{离体-花粉管}}=0.76, P < 0.05$; $r_{\text{活体-花粉管}}=0.80, P < 0.05$) , 自交坐果率与花粉管长度也呈显著正相关($r_{\text{坐果率-花粉管}}=0.77, P < 0.05$)。

表 2 6 个品种月季自交的花粉活力和坐果率

月季品种	授粉花数/朵	离体萌发率/%	活体萌发率/%	花粉管长度/ μm	平均种子数/粒	坐果率/%
YF	79	33.34±1.70	31.56±1.63	338.78±19.72	11	39.24
YM	43	17.52±1.56	16.18±1.51	319.06±21.16	2	23.08
YY	34	9.30±1.68	6.88±1.90	126.38±20.22	0	0.00
FZ	48	15.73±1.32	13.40±1.13	248.14±18.90	3	4.17
MT	35	22.18±1.24	19.28±1.58	322.51±21.38	10	60.00
MY	50	7.17±0.41	8.10±0.91	237.15±20.91	5	6.00

2.2 月季的自交坐果率及种子数

从表2可以看出,供试材料品种间自交坐果率的差异较大,变幅为0~60.00%,MT的坐果率最高,达60.00%;其次为YF,为39.24%;YY最低,未结实。从种子数来看,供试材料的平均种子数均较少,最多的YF也仅有11粒,其次为MT,10粒。

2.3 自交授粉后月季花柱内花粉管生长的荧光显微观察结果

经荧光显微观察,自交授粉后6个品种月季花柱内花粉管的生长情况为:授粉1 h,未见有花粉萌发(封二图1-A);授粉3 h,花粉开始萌发(封二图1-B);授粉10 h,柱头上大部分花粉都已萌发,进入花柱上端(封二图1-C);授粉24 h,大部分花粉管伸长至花柱中部(封二图1-D),不同的是YF、YM、MT、MY能继续往下生长,而YY、FZ生长缓慢,直至停止生长,且花粉管末端膨大、弯曲、变形,有大量胼胝质沉积(封二图1-G);授粉30 h,YF、YM、MT、MY大部分花粉管已接近子房(封二图1-E),而YY、FZ只有少数花粉管生长至花柱中下部,大部分已停止生长;授粉48 h,YF、YM、MT、MY有部分花粉管通过花柱基部,进入子房(封二图1-F),而YY、FZ除个别有少量花粉管能一直生长并进入子房外,其余均未观察到有进入子房的。

3 结论与讨论

切花月季不同品种(系)自交亲和程度的差异很大,云粉、云玫、蜜糖、蜜月是自交亲和品种,云艳、粉妆为自交不亲和品种,这与由自交坐果率、平均种子数和自交授粉后花柱内花粉管生长的荧光显微观察结果所得出的自交亲和性结论一致;因此,在切花月季的杂交育种中,选择自交坐果率和花粉萌发率均较高的云粉和蜜糖作为亲本,可能会有较好的育种效果。

a.花粉生活力的测定方法还有待改进。在本试验中,活体萌发与离体萌发结果基本一致,除蜜月外,活体萌发率均低于离体萌发率,这可能是由活体萌发测定法仅适合于感受性柱头所致^[15]。常用的测定植物花粉活力的染色法和离体培养法^[16-17]都只能间接地反映花粉的活力,染色法判断花粉有无活力的标准存在人为误差^[18];月季花粉离体培养法的测定结果受温度、培养基成分等多种因素的影响^[19]。前人认为花粉活体萌发法是测定花粉活力最直接可靠的方法^[20],但活体萌发法的测定结果偏低,所以该方法还有待改进。关于培养基的改进,一般认为培养基中含5%~8%的蔗糖适于大多数蔷薇属植物花粉的萌发,高于15%的蔗糖抑制花粉萌发和花粉管的伸长^[21]。Chrysothemis^[22]发现,

20%蔗糖与0.01%硼酸的培养基较适合月季花粉萌发,本试验结果和Visser^[23]的结果均与其相似。花粉萌发率受基因型的影响较大,在相同的培养基和培养条件下,不同品种的花粉萌发率差异显著,有的花粉萌发率很低,这可能是造成自交不育或败育的原因之一。关于花粉萌发的温度,一般认为25℃是适合花粉萌发的最佳温度。关于花粉在柱头上的萌发时间,前人认为月季花粉一般在授粉24 h后开始萌发,120 h后仍有萌发的^[24];在本试验中发现授粉3 h后有部分花粉开始萌发,10 h后大量花粉开始萌发,48 h后还能观察到有花粉萌发。本试验中授粉后花粉开始萌发的时间与前人的研究结果不同,这可能与授粉时的气候条件不同有关。

b. 自交授粉后花柱内花粉管生长的荧光显微观察。采用荧光显微染色法观察植物花柱中的花粉管数量和长度已应用于茶树^[25]、苹果^[26]、百合^[27]等许多植物。苯胺蓝能够与花粉管壁中的胼胝质相结合,在紫外光下呈明亮的黄绿色荧光,可有效标记出花柱中的花粉管^[28]。把授粉后经苯胺蓝染色的子房放到荧光显微镜下观察,可看到花粉在柱头上的萌发和花粉管的发育状态,以及胼胝质在柱头表面的沉积状况等,进而可判断花粉与柱头是否亲和^[29]。与普通染色法、离体培养法和石蜡切片法相比,苯胺蓝染色法在测定花粉萌发率和花柱中花粉管生活力方面具有明显优势^[18]。本试验中,自交亲和品种与自交不亲和品种在授粉24 h内的花粉管生长特性差异较小,这与王郁等^[25]在茶树中观察到的现象相似。亲和与否自授粉24 h后开始显现,具体表现为自交亲和品种花粉管能继续往下快速生长,而自交不亲和品种花粉管生长缓慢,且绝大多数花粉管最终在花柱中、上部停止生长,这与于晓艳^[11]等以玫瑰为试材的研究结果一致。试验中花柱内自花授粉的花粉管在停止生长前有弯曲、末端膨大变形等现象,这与陈迪新等^[30]对沙梨花粉管的观察结果相似。参照Audergon^[31]、吴燕等^[32]的标准(自交坐果率6%为自交亲和,否则为自交不亲和),本试验结果表明,云粉、云玫、蜜糖、蜜月为自交亲和类型;云艳、粉妆为自交不亲和类型。

c. 花粉萌发率与自交坐果率的相关性。月季花粉萌发率是影响月季杂交结实率的关键因素,其花粉

的萌发率基本与杂交结实率呈正相关^[33]。本试验中月季自交也存在着花粉萌发率与自交坐果率呈正相关的情况。花粉萌发率并不代表花粉的实际萌发能力。本试验中,花粉萌发率并不是很高的蜜糖品种,却获得了高达60%的坐果率。在Gudin^[10]的研究中也出现过相似的情况。本试验中,花粉管长度与自交坐果率呈显著的正相关,花粉管长度比花粉萌发率更能说明花粉的实际萌发能力,在花粉萌发率较低的情况下,如果其花粉管较长的话,也有可能获得较高的结实率,如萌发率最低的蜜月的花粉管较长,也获得了6%的坐果率。在杂交育种中综合考察花粉萌发率和花粉管长度可提高杂交育种效率。

d. 月季自交不亲和性的原因和机理。蔷薇科植物自交不亲和性是由存在于花柱内具有核糖核酸活性的S-基因产物S-RNase决定的,该酶分解了花粉管RNA,从而抑制了自花花粉管的生长^[34],但并不是只要有S-RNase存在的植物就表现出自交不亲和性,而是要S-RNase达到一定量时才能对自体花粉管产生抑制作用^[35],使自体花粉管不能正常生长到子房,从而无法完成受精、结实过程。本试验结果表明,蔷薇科植物月季表现出S-RNase介导的配子体型自交不亲和性,月季繁育过程中花粉管的生长抑制是发生在花柱通道的中、上部,其自交不亲和性是花柱不亲和因子与花粉不亲和因子相互作用的结果;自交亲和品种是来源于S基因的突变或其他自交亲和品种的基因浸透^[36]。本试验中,自交不亲和品种中有少量花粉管能伸入子房,却不能结实,这可能与受精后不育有关,是否存在着受精后胚胎败育还有待研究。生物体上每一个性状的表现都是基因与环境互作的结果,自交亲和反应也不例外,不但取决于父母本的遗传特性,还与花粉的生活力,授粉数量,日最高、最低温度和最高、最低相对湿度有关^[37],其具体机制还有待研究。

参考文献:

- [1] 刘小莉,刘飞虎.花卉育种技术研究进展[J].亚热带植物科学,2003,32(2):64-68.
- [2] 王其刚,张颢,蹇洪英,等.月季‘云粉’、‘云玫’的花粉活力和柱头可授性研究[J].江西农业大学学报,2010,32(3):458-461.
- [3] 吴华清,张绍铃,王洪涛,等.高等植物自花花粉的

- 识别与拒绝[J].西北植物学报,2005,25(3):593-606.
- [4] 郑卓,李健,官春云,等.新疆野生油菜与甘蓝型油菜属间杂交亲和性及杂种分子鉴定[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2006,32(5):465-468.
- [5] 刘忠松,官春云.油菜自交不亲和性杂种优势利用的遗传基础探讨[J].湖南农业大学学报:自然科学版,1996,22(3):236-238.
- [6] 徐义流,张绍铃.梨配子体型自交不亲和性及其分子机理[J].果树学报,2003,20(1):59-63.
- [7] 冯建荣,陈学森,孔宁,等.杏(*Prunus armeniaca*)自交不亲和强度及其授粉受精相关特性[J].果树学报,2006,23(5):690-694.
- [8] 颜合洪,陈灿,金小马,等.红花烟草杂交和自交结实率的观察[J].湖南农业大学学报:自然科学版,1998,24(6):442-444.
- [9] Sassa H, Nishio T, Koyama Y, et al. Self incompatibility(S) alleles of the rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily[J]. Mol Gen Genet, 1996, 250: 547-557.
- [10] Gudín Serge. Rose breeding technologies[J]. Acta Hort, 2001, 547: 23-26.
- [11] 于晓艳,赵兰勇,丰震,等.22份国产玫瑰资源的自交亲和性[J].中国农业科学,2009,42(9):3236-3242.
- [12] 周家杏,曾丽,陶懿伟,等.微型月季花粉生活力测定方法的研究[J].上海交通大学学报:农业科学版,2007,25(6):574-577.
- [13] Mayer E, Gottsberger G. Pollen viability in the *Genus silene*(Caryophyllaceae) and its evaluation by means of different test procedures[J]. Flora, 2000, 195: 349-353.
- [14] Teng N J, Chen T, Jin B, et al. Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis* (Poaceae)[J]. Flora, 2006, 201: 658-667.
- [15] 左丹丹,明军,刘春,等.植物花粉生活力检测技术进展[J].安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745.
- [16] Gibbon B C, Kovar D R, Staiger C J. Latrunculin b has different effects on pollen germination and tube growth [J]. The Plant Cell, 1999, 11(12): 2349-2363.
- [17] Jahnen W, Lush W M, Adrienne E C. Inhibition of *in vitro* pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana glauca*[J]. The Plant Cell, 1989, 1(5): 501-510.
- [18] 于艳杰,吴李君,吴跃进,等.陆地棉花花粉粒萌发和花粉管生长特性[J].自然科学进展,2007,17(9): 1299-1303.
- [19] Ma L G, Xu X, Cui S, et al. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth[J]. The Plant Cell, 1999, 11(7): 1351-1364.
- [20] 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.
- [21] 王岚岚,游捷,俞红强.月季花粉离体萌发液体培养基组分的优化[J].河北农业大学学报,2008,31(3): 42-45.
- [22] Chrysothemis I Voyiatzi. An assessment of the *in vitro* germination capacity of pollen grains of five tea hybrid rose cultivars[J]. Euphytica, 1995, 83: 199-204.
- [23] Visser T, Vries D P, Welles G W H, et al. Hybrid tea rose pollen I: Germination and storage[J]. Euphytica, 1977, 26: 721-728.
- [24] 柴菲.月季杂交育种技术初探及部分现代月季品种性状综合评价[D].北京:中国农业大学农学与生物技术学院,2007.
- [25] 王郁,江昌俊,张和禹.茶树自交花粉管在活体花柱中的不亲和性观察[J].茶叶科学,2008,28(6): 429-435.
- [26] 王浩,刘国成.寒富苹果授粉花柱的荧光显微观察与自交亲和性分析[J].果树学报,2008,25(2):162-165.
- [27] 王文和,王树栋,赵祥云,等.百合远缘杂交花粉萌发及花粉管生长过程观察[J].西北植物学报,2007,27(9):1790-1794.
- [28] 王春雷,张绍铃.荧光标记在植物花粉管构造及生长特性研究中的应用[J].西北植物学报,2007,27(2): 407-413.
- [29] 陈学森.植物育种学试验[M].北京:高等教育出版社,2004.
- [30] 陈迪新,张绍铃,陶书田.沙梨花粉原位萌发与花粉管生长特性[J].南京农业大学学报,2004,27(3): 34-37.
- [31] Audergon J M, Guerriero R, Monteleone P, et al. Contribution to the study of inheritance of the character self incompatibility in apricot[J]. Acta Hort, 1999, 488: 275-279.
- [32] 吴燕,陈学森,冯建荣,等.杏杂种一代群体 S 基因的遗传研究[J].园艺学报,2005,32(3):397-402.
- [33] 张颢,唐开学,李树发,等.切花月季杂交结实性研究[J].西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(3): 442-446.
- [34] McCbbin B A, Kao T H. Molecular recognition and response in pollen-pistil interactions[J]. Annual Review of Cell and Development Biology, 2000, 16: 333-364.
- [35] Hiratsuka S, Zhang S L, Nakagawa E, et al. Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S protein in the Japanese pear[J]. Sexual Plant Reproduction, 2001, 13: 209-215.
- [36] 陈晓流,束怀瑞,陈学森.核果类果树自交不亲和性研究进展[J].植物学通报,2004,21(6):755-764.
- [37] de Vries D P, Dubois L A M. Developments in breeding for horizontal and vertical fungus resistance in roses [J]. Acta Hort, 2001, 552: 103-112.

责任编辑:王赛群