

孙 铭, 高丹丹, 鞠志新. 紫斑牡丹杂交授粉后胚珠的形态学观察[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 169–171.

# 紫斑牡丹杂交授粉后胚珠的形态学观察

孙 铭, 高丹丹, 鞠志新

(吉林农业科技学院植物科学学院, 吉林长春 132101)

**摘要:**选取性状优良的紫斑牡丹为母本, 与 16 个芍药属品种进行杂交, 采用徒手切片法, 对其中父本为胡红、洛阳红、红莲、芍药的 4 个杂交组合授粉后的胚珠分期进行形态学观察, 研究了正常胚珠和败育胚珠的形态学发育过程。结果表明, 结种率较高的杂交组合, 授粉后胚珠的败育率较低, 大部分胚珠能够正常发育, 胚珠的发育依次经过单核胚囊、二核胚囊、四分体至八核胚囊、合子胚、多游离核原胚、原胚细胞化、棒形胚、心形胚, 最终到达子叶形胚; 结种率较低的杂交组合, 授粉后胚珠的败育率较高, 胚珠内无胚和胚乳, 败育胚珠主要停留在原胚细胞化阶段。

**关键词:**紫斑牡丹; 杂交; 胚珠; 败育

**中图分类号:** S685.110.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)08–0169–03

紫斑牡丹 (*Paeonia suffrutic var. papavercea*) 属芍药科芍药属, 1987 年被列为国家三级保护植物, 是牡丹家族中重要的成员, 也是中国牡丹品种群的原始种之一。紫斑牡丹具有植株高大、花色艳丽、香味浓郁、抗旱耐寒、病虫害少等优良特性, 是既可观赏, 又能药用和食用的名贵花卉。它喜冷凉干燥气候, 对低温及干旱适应性强, 特别能适应北方大部分较寒冷的地区, 因此适宜推广和用来做亲本培育新品种, 但与其他牡丹品种的杂交亲和力不同<sup>[1]</sup>。本试验选取性状优良的紫斑牡丹作母本, 分别与 16 个芍药属品种进行杂交试验, 通过对授粉后的胚珠进行形态学观察, 试图找到杂交受精障碍发生的时期, 以便采取及时的措施来克服, 从而提高结实率, 进而为今后探索克服杂交不亲和性与不育性所要采取的措施提供理论指导, 为培育牡丹新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

杂交母本为紫斑牡丹实生苗, 杂交父本材料有中原牡丹品种群的赵粉、首案红、胡红、妖黄、洛阳红、二乔 6 个品种, 紫斑牡丹品种群的玉瓣绣球、早熟禾、和平莲、蓝荷、夜光杯、桃

花三转、红莲 7 个品种, 江南牡丹凤丹、混合花粉、芍药。试验材料由吉林农业科技学院牡丹基地、吉林市牡丹园、洛阳牡丹园提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 花粉采集、贮藏与生活力的测定 父本的花在露色期采回, 在室内摘下花药, 放在干燥、无阳光直射的环境下阴干 24 h。花药开裂后, 收集, 花粉装入硫酸纸袋中, 袋外注明父本品种名称、日期, 封口保存于冰箱内。在授粉前检测花粉的活力, 将花粉放在配制好的半固体培养基 (配制方法: 称 10 g 蔗糖、1 mg 硼酸、0.25 g 的琼脂与 90 ml 蒸馏水放入烧杯中, 在 100 ℃ 水浴中熔化, 加水定容至 100 mL, 冷却后备用) 上培养, 培养条件为 22 ℃, 24 h 光照培养, 每个品种设 3 次重复, OLYMPUS 显微镜 (×40) 观察并拍照, 统计萌发率。每个重复统计 3 个视野, 连续测定 3 d 直至萌发率趋于稳定<sup>[2]</sup>。萌发标准为花粉管长度大于等于花粉粒直径; 萌发率 = 萌发的花粉数/花粉总数 × 100%。

1.2.2 母本去雄、授粉 在母本花蕾开始变软时, 花药呈绿或绿黄色时, 用手轻轻地剥开花蕾去掉花瓣, 然后用镊子彻底剔除花中的雄蕊。去雄后立即套上亚硫酸纸袋, 用曲别针夹住袋口。挂上标签标明去雄套袋日期。在去雄后 2~3 d, 待母本雌蕊柱头分泌黏液而发亮时, 即可授粉。授粉于上午 10 点之前进行, 每天授粉 1 次, 连续授粉 3 d, 确保授粉成功。授粉后立即将纸袋套上, 折好封紧。授粉后在其茎秆上套上标签, 用铅笔在标签上注明杂交组合、授粉日期等。14 d 后柱头萎蔫, 已无受精的可能时, 将套袋去除, 以免妨碍果实生长<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2013–11–23

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目 (编号: 2012294)。

作者简介: 孙 铭 (1977—), 女, 吉林农安人, 硕士, 讲师, 从事观赏植物教学与研究工作。E-mail: 554659457@qq.com。

[4] 张雯丽. 中国草莓产业发展现状与前景思考[J]. 农业展望, 2012(2): 30–33.

[5] 俞庚戌, 张成义, 丁峙峰, 等. “红颊”草莓几种母本苗的育苗效果探讨[J]. 上海农业科技, 2010(4): 91–92.

[6] 周霞萍, 孔樟良, 廖益民, 等. 红颊草莓育苗技术总结[J]. 中国南方果树, 2008, 37(5): 60.

[7] 赵密珍, 王 静, 王壮伟, 等. 世界草莓产业发展现状及江浙沪草莓产业可持续发展对策[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 1–3.

[8] 周泽华, 李开江, 史 健, 等. 红颊草莓不同育苗方式技术研究[J]. 长江蔬菜, 2011(15): 53–54.

[9] 孙永涛. 不同育苗方式对草莓植物学性状的影响[J]. 上海蔬菜, 2012(6): 68–69.

[10] 郭成宝, 陈月红, 童晓利, 等. 不同基肥配比对草莓高架育苗的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 161–163.

[11] 孙永平, 郭成宝, 陈月红, 等. 草莓立体栽培模式基质配方研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(6): 140–141.

[12] 郝金魁, 张西群, 齐 新, 等. 工厂化育苗技术现状与发展对策[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 349–351.

[13] 吴建能, 裘建荣, 茅孝仁, 等. “红颊”草莓不同时期定植试验简报[J]. 上海农业科技, 2011(4): 67.

1.2.3 胚珠的形态学观察 以父本为胡红、洛阳红、红莲、芍药的 4 个杂交组合为材料,连续观察记录 4 个组合的胚珠发育情况,以最后 1 次授粉当天为 1 d,分期观察授粉后 1、4、7、15、22、29、36、45、60 d 的胚珠外观,并用徒手切片法,将其切成薄而均匀的片状,低倍镜下选取薄且透明,组织结构完整的切片。将选取的切片放在番红试剂中整染一段时间,将染色后的切片依次经过无水乙醇,无水乙醇和二甲苯的混合液,二甲苯溶液三级透明,然后移入洁净的载玻片水滴中,盖上盖玻片,在显微镜下观察,拍照<sup>[4]</sup>。

1.2.4 结实情况统计及采收 当母本果实心皮变为蟹黄色且微裂时摘下,观察统计结果数、心皮膨大和结种情况,将种

子从心皮里剥出来,去除发育不良的瘪种、空种后统计每个杂交组合的结种数,计算结种率<sup>[5-6]</sup>。

2 结果与分析

2.1 不同品种花粉的萌发率

从表 1 看出凤丹和妖黄的花粉萌发率最高,达到了 60% 以上,说明花粉具有较高的活性,其次为胡红、首案红、芍药、玉瓣绣球,萌发率 40% 以上,桃花三转的萌发率最低,为 12%,说明不同品种间的花粉活力不同,在杂交育种授粉时应根据测定的花粉活力指标采取不同的授粉方法,活力低的花粉可采取多次多量的方法来提高结种率。

表 1 父本花粉萌发率

父本	重复	总花粉数量 (粒)	发芽数量 (粒)	萌发率 (%)	平均萌发率 (%)	父本	重复	总花粉数量 (粒)	发芽数量 (粒)	萌发率 (%)	平均萌发率 (%)
胡红	I	60	31	50	49	蓝荷	I	34	10	29	38
	II	50	24	48			II	45	22	49	
	III	52	26	50			III	36	13	36	
二乔	I	33	10	30	30	和平莲	I	77	34	44	37
	II	30	8	27			II	64	25	39	
	III	35	12	34			III	54	15	28	
妖黄	I	50	31	62	60	夜光杯	I	66	21	32	29
	II	45	27	60			II	54	13	24	
	III	48	28	58			III	60	18	30	
首案红	I	76	38	50	49	桃花三转	I	45	5	11	12
	II	74	35	47			II	35	3	9	
	III	43	21	49			III	46	7	15	
洛阳红	I	31	13	42	35	红莲	I	44	16	36	35
	II	34	14	41			II	34	12	35	
	III	23	5	22			III	40	13	33	
赵粉	I	66	27	41	36	凤丹	I	50	31	62	62
	II	54	14	26			II	45	27	60	
	III	34	14	41			III	48	30	63	
玉瓣绣球	I	33	12	36	42	混合花粉	I	76	34	45	43
	II	35	13	37			II	75	30	40	
	III	45	24	53			III	66	30	45	
早熟禾	I	33	10	30	24	芍药	I	66	30	45	57
	II	45	5	11			II	74	45	61	
	III	40	12	30			III	70	46	66	

2.2 胚珠发育的形态

以父本为胡红、洛阳红、红莲、芍药的 4 个杂交组合为材料,分别于授粉后 1、4、7、15、22、29、36、45、60 d,剖开子房,观察胚珠发育情况。

2.2.1 胚珠正常发育的形态学观察 从表 2 看出,正常胚珠的发育从授粉后开始逐渐长大,胚和胚乳逐渐形成,最终发育成完整的种子。胚珠内胚的发育依次经过单核胚囊、二核胚囊、四分体至八核胚囊、合子胚、多游离核原胚、原胚细胞化、棒形胚、心形胚、最终到子叶形胚。

2.2.2 胚珠败育的形态 从表 3 看出:一部分败育的胚珠在授粉后第 7 d 左右开始皱缩,29 d 左右完全皱缩;一部分胚珠正常膨大,但内部中空,胚和胚乳在发育过程中退化,败育的胚珠最终停留在原胚细胞化阶段。

2.3 以紫斑牡丹为母本的杂交组合结种率

以紫斑牡丹为母本时,运用常规的授粉方法对母本紫斑

牡丹与所选的 16 个父本品种进行品种间杂交。

从表 4 看出:以紫斑牡丹实生苗为母本,授粉花数为 73 朵,共结种 551 粒,平均结种率达 7.54 粒/朵。结实率最高的组合为紫斑牡丹实生苗 × 胡红,平均结种率高达 15.20 粒/朵,最低的组合为紫斑牡丹实生苗 × 芍药,为 0 粒/朵。结种率高的杂交组合,种子的败育率较低,大部分胚珠能正常发育完全;结种率低的杂交组合,种子败育率较高,大部分胚珠在发育过程中早已败育,表现为种子畸形或内部中空,无胚和胚乳。紫斑牡丹与芍药的结种率为 0,说明它们杂交不亲和,存在远缘杂交障碍。

3 讨论

研究结果表明,相较于正常发育的胚珠,一部分败育的胚珠从第 7 d 就开始皱缩,胚和胚乳在发育过程中逐渐退化,到 29 d 左右基本上就完全皱缩了,还有一部分败育的胚珠在发

表 2 不同时期胚珠正常发育的形态学观察结果

授粉后 时间(d)	形态特征			发育时期
	长(cm)	宽(cm)	外部形态和内部切片观察	
1	0.2	0.1	胚囊内有 10~12 个胚珠,较小,白色	单核胚囊
4	0.3	0.2	胚囊中在珠孔端附近开始出现 5~8 个胚乳游离核	大孢子母细胞、二核胚囊
7	0.3	0.2	细胞进行有丝分裂	四分体、二核、四核、八核胚囊
15	0.4	0.3	合子分裂后形成大小不等的两个核	合子胚
22	0.5	0.3	胚珠体积增大,开始变硬,内部部分充满	多游离核原胚
29	0.5	0.3	原胚游离核之间开始形成细胞板,进入原胚细胞化阶段	原胚细胞化
36	0.6	0.4	部分原胚周缘细胞质中出现小液泡	棒形胚
45	0.7	0.5	胚珠体积增大,白色,表面有黏液	心形胚
60	0.8	0.6	胚珠内部部分充满,形成表面光滑、饱满、黄白色种子,切开种子内部,具完全的胚乳和胚。	子叶形胚

表 3 不同时期胚珠败育形态学观察结果

授粉后 时间(d)	形态特征			发育时期
	长(cm)	宽(cm)	外部形态和内部切片观察	
1	0.1	0.1	胚囊内有 10~12 个胚珠,胚珠较小,白色	孢原细胞、大孢子母细胞
4	0.2	0.1	同一心皮内胚珠大小出现明显差异	大孢子母细胞、二核胚囊
7	0.3	0.2	胚珠外表变红,开始出现皱缩	四分体、二核、四核、八核胚囊
15	0.4	0.3	少数胚珠开始皱缩,外珠被停止生长,发生萎缩内陷	合子胚
22	0.2	0.1	胚珠内陷加深,外表为红色	多游离核原胚
29	0.1	0.1	胚珠基本全部皱缩,整个胚珠退化只剩下表皮及内珠被的 1~2 列完整细胞	游离原胚细胞化
36	0.6	0.4	胚珠正常膨大,但内部逐渐退化	游离原胚细胞化
45	0.5	0.4	胚珠正常膨大,但内部逐渐退化	原胚细胞化
60	0.8	0.6	胚珠内部真空,没有胚乳和胚,只剩下外珠被和种皮	原胚细胞化

表 4 以紫斑牡丹为母本杂交结种的统计

杂交组合	授粉花数 (朵)	结种总数 (粒)	单花结种量 (粒/朵)
紫斑牡丹实生苗×胡红	5	76	15.20
紫斑实生苗×二乔	4	55	13.75
紫斑牡丹实生苗×妖黄	5	73	14.60
紫斑牡丹实生苗×赵粉	5	25	5.00
紫斑牡丹实生苗×首案红	4	36	9.00
紫斑牡丹实生苗×洛阳红	4	38	9.50
紫斑牡丹实生苗×玉瓣绣球	4	8	2.00
紫斑牡丹实生苗×早熟禾	4	44	11.00
紫斑牡丹实生苗×和平莲	5	46	9.20
紫斑牡丹实生苗×蓝荷	5	16	3.20
紫斑牡丹实生苗×夜光杯	4	12	3.00
紫斑牡丹实生苗×桃花三转	4	12	3.00
紫斑牡丹实生苗×红莲	5	32	6.40
紫斑牡丹实生苗×混合花粉	5	38	7.60
紫斑牡丹实生苗×凤丹	5	40	8.00
紫斑牡丹实生苗×芍药	5	0	0
总计	5	551	7.54

育的过程中虽没有皱缩,但发育的过程中不能形成完整的胚和胚乳,最终停留在原胚细胞化阶段。结合杂交结种率可以

看出,结种率高的杂交组合,授粉后胚珠败育率低,大部分胚珠发育完好,而结种率低的杂交组合,授粉后存在较多的胚败育或无胚形成的情况。

通过对胚珠的形态学观察及结种率的统计,推测紫斑牡丹与其他品种杂交结实率低的原因可能是受精障碍,绝大多数胚珠都没有完成受精就很快败育,极少数胚珠可能受精不正常或受精后发育一段时间败育,建议在今后的杂交育种中应采取各种措施克服受精障碍,以获得杂交后代。

参考文献:

[1]成仿云. 美国牡丹芍药协会与美国牡丹芍药的发展[J]. 西北师范大学学报:自然科学版,1997,33(1):110-115.  
[2]何桂梅. 牡丹远缘杂交育种及其胚培养与体细胞胚发生的研究[D]. 北京:北京林业大学,2006.  
[3]成仿云,李嘉珏,陈德忠. 中国野生牡丹自然繁殖特性研究[J]. 园艺学报,1997,24(2):77-81.  
[4]郝青,刘政安,舒庆艳,等. 中国首例芍药牡丹远缘杂交种的发现及鉴定[J]. 园艺学报,2008,35(6):853-858.  
[5]胡适宜,朱激. 高等植物受精作用中雄性核和雌性核的融合[J]. 植物学报,1979,21(1):1-10.  
[6]郝捷,刘胜. 紫斑牡丹栽培品种小孢子发育过程的细胞遗传学研究[J]. 生物学杂志,2000,17(3):16-18.