

# 地锦和五叶地锦种间杂交不亲和性初步研究

付彦荣<sup>1</sup>, 孙振元<sup>2</sup>, 赵梁军<sup>1</sup>, 韩 益<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学园林系, 北京 100094; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** 将地锦和五叶地锦杂交, 未能获得杂交种。对人工辅助自交和杂交后, 花粉萌发和花粉管生长情况进行了荧光显微观测。观察发现: 人工辅助自交后, 花粉粒可在各自柱头表面正常萌发, 花粉管可伸入花柱内。将地锦和五叶地锦杂交时, 多数花粉粒不能在柱头表面萌发, 或者花粉管呈卷曲、先端膨大、破裂等异常现象。授粉后 2~ 48 h 的花柱中, 未观察到花粉管。由此推断, 地锦和五叶地锦之间的不亲和发生在柱头表面。

**关键词:** 地锦; 五叶地锦; 种间杂交; 不亲和性

中图分类号: S688 文献标识码: A

## Preliminary Study on Interspecific Incompatibility between *Parthenocissus tricuspidata* and *P. quinquefolia*

Fu Yarrong<sup>1</sup>, SUN Zhenyuan<sup>2</sup>, ZHAO Liangjun<sup>1</sup>, HAN-Yi<sup>1</sup>

(1. Department of Landscape Architecture, China Agriculture University, Beijing 100094, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091 China)

**Abstract:** The hybrids failed to get when crossing *P. tricuspidata* with *P. quinquefolia*. Germination of pollen and growth of pollen tube were studied by fluorescence microscope observation. The findings are as follows: pollens of *P. tricuspidata* and *P. quinquefolia* could germinate on the surface of their stigmas, respectively. Pollen tubes could grow into styles. While crossing *P. tricuspidata* with *P. quinquefolia*, most of the pollens could not germinate on the stigma. Even if germinated, the pollen tubes showed some abnormality such as twinning, tip inflation and bursting. 2~ 48 h after pollinating, pollen tube was not observed in the styles of mother parents. It can be concluded that the cross incompatibility was taken place on the surface of stigma.

**Key Words:** *Parthenocissus tricuspidata*; *Parthenocissus quinquefolia*; interspecific hybridization; cross incompatibility

地锦 (*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et. Zucc.) Planch.) 和五叶地锦 (*Parthenocissus quinquefolia* Planch.) 是葡萄科 (Vitaceae) 爬山虎属的两种重要藤本植物, 在城市垂直绿化、荒漠覆盖、道路保护等方面有很好的应用前景<sup>[1~ 3]</sup>。

地锦俗称爬山虎、爬墙虎, 原产于中国, 叶片呈三裂状, 吸盘发达, 固着能力强, 生长速度慢。五叶地锦又称美国地锦, 原产美国, 叶片呈五裂, 吸盘不发达, 固着能力稍弱, 生长速度相对较快<sup>[1]</sup>。

为培育综合二者优点, 具备新观赏性状的杂交后代, 2002—2003年, 笔者将地锦和五叶地锦相互授粉, 每年授粉小花数都在 3 000 朵以上, 但未能获得杂交种子。因此, 推断这两个种间存在一定的生殖隔离 (Reproduction Isolation)。本文基于地锦和五叶地锦杂交未能获得杂种的现象, 通过对人工辅助自交和杂交后花粉萌发和花粉管生长的观察, 试图找出二者不亲和发生的时间和部位, 为克服不亲和性提供理论依据。

收稿日期: 2004 06 10

基金项目: 863 项目“地锦 (爬山虎) 种质资源创新及优良品种培育” (2001AA244031)

作者简介: 付彦荣 (1975—), 男, 河北邯郸人, 在读硕士研究生。

通讯作者: 赵梁军, 教授, Email: Zhaolj5073 @ sina.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

地锦和五叶地锦多年生、发育健壮 的开花植株。分别于开花前 15 d, 选取 50 个发育一致的花序挂牌标记备用。

### 1.2 杂交与采样

事先采集地锦和五叶地锦刚开放小 花的花粉, 充分干燥后, 于 4 ℃冰箱中保存, 授粉前做花粉育性测定。从初花期至盛花期, 分别选取地锦和五叶地锦接近开放小花, 进行人工辅助自交和种间杂交, 常规杂交操作。授粉后 2、8、16、24、36、48 h, 采集授粉后小花, 用卡诺氏液固定。每次采集小花 20 个, 观测 15 个小花花柱。

### 1.3 花粉育性测定

花粉活力测定采用 TTC 法<sup>[4]</sup>。35 ℃下, 15 min 后观测。有活力花粉在显微镜下呈粉红或深红色, 无活力花粉没有颜色。花粉萌发率测定参照何凤仙<sup>[5]</sup>的方法。25 ℃恒温箱中培养 2 h 后观测。以花粉管超过花粉粒长度为萌发。花粉培养基配方: 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、500  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ 、100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ 、琼脂 8  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 蔗糖浓度为 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

### 1.4 花粉萌发及花粉管生长观察

参照王灶安<sup>[6]</sup>的方法进行荧光显微观测。0.01% 脱色苯胺蓝溶液 (pH 值 8.2 磷酸缓冲液配制) 中染色 4 h, 沿子房顶部将花柱切下压片, 在 Olympus BH2 落射式荧光显微镜下观察。激发滤光片为 BG12、阻断滤光片为 475, 激发光为黄绿色荧光。活花粉粒和花粉管发出黄绿色荧光。

## 2 结果与分析

### 2.1 花粉活力及萌发率

亲本花粉活力的高低是杂交成功的前提。地锦

和五叶地锦花粉活力萌发率测定结果见表 1。

表 1 地锦和五叶地锦花粉活力和萌发率

花粉种类	花粉活力			萌发率		
	观测花粉数	有活力花粉数	有活力花粉率/%	观测花粉数	萌发花粉数	萌发花粉率/%
地 锦	216	203	94.4	305	29	9.5
五叶地锦	376	258	68.6	298	28	9.4

由测定结果可知, 地锦和五叶地锦的花粉均表现出较高的活力, 但萌发率相对较低, 这可能与选用的萌发培养基和培养条件有关。花粉本身不是导致杂交不结实的主要原因。

### 2.2 人工辅助自交时的花粉萌发与花粉管生长

对授粉后不同时间, 地锦花柱的荧光显微观测发现: 授粉后 2 h, 少量柱头上能观测到有花粉粒附着, 花粉数量很少, 未见萌发; 授粉后 8 h, 约半数柱头上可观察到花粉粒, 花粉量增多, 少数花粉粒在柱头表面萌发 (图 1); 至授粉后 16 h, 约半数花柱上的花粉管长入了花柱内 (图 2), 24 h 时, 可观察到花粉管沿花柱内的引导组织向下生长, 个别花粉管已生长至花柱基部 (图 3)。在荧光显微镜下, 花粉管发出黄绿色荧光, 花粉管平滑、伸展。至授粉后 48 h 时, 大量花粉管长至花柱基部。

五叶地锦的观测结果与地锦类似, 授粉后 2 h 的柱头表面未见花粉萌发 (图 4); 授粉后 8 h, 部分花粉粒在柱头表面萌发, 并开始进入花柱内 (图 5), 授粉 24 h 时, 多数花粉管生长至花柱中部, 至授粉后 48 h, 花粉管到达花柱基部 (图 6)。

由以上观测结果可知, 人工辅助自交后, 地锦和五叶地锦的花粉粒可在各自柱头表面正常萌发, 伸长的花粉管进入花柱后, 沿花柱中的引导组织向下生长, 花粉管生长正常。对授粉后不同时间, 不同状态花柱比例做了统计 (表 2)。

表 2 人工辅助自交后不同时间各种状态花柱比例

授粉后小时数/h	无花粉粒/%		有花粉附着但未萌发/%		有花粉萌发但未进花柱/%		花粉管进入花柱中/%		花粉管生长至花柱基部/%	
	PT×PT	Q×Q	PT×PT	Q×Q	PT×PT	Q×Q	PT×PT	Q×Q	PT×PT	Q×Q
2	86.7	73.3	13.3	26.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	40.0	20.0	33.3	46.7	20.0	26.6	6.7	6.7	0.0	0.0
16	20.0	26.7	13.3	33.3	13.3	20.0	53.4	20.0	0.0	0.0
24	20.0	20.0	6.7	20.0	20.0	20.0	46.6	40.0	6.7	0.0
36	20.0	—	0.0	—	13.3	—	46.7	—	20.0	—
48	26.7	40.0	6.7	0.0	0.0	13.3	33.3	33.4	33.3	13.3

注: PT 代表地锦, Q 代表五叶地锦 (下同), PT×PT, Q×Q 分别表示地锦、五叶地锦自交; 自交时所用花粉为同株异花的花粉。

## 2.3 杂交时的花粉萌发与花粉管生长

2.3.1 五叶地锦给地锦授粉(PT × PQ)时的花粉萌发和花粉管生长 当以地锦为母本,授以五叶地锦花粉时,观察发现:授粉2 h的柱头上有花粉粒附着,但数量很少,一般不超过5粒;多数授粉8 h的柱头上可看到花粉粒,花粉量较多。部分花粉粒发生水合作用(图7),呈黄绿色,圆形。个别花粉萌发,但花粉管前端多膨大或分叉(图8,图9),或者仅在柱头表面生长,不能穿过乳突细胞进入花柱内。16、24、36、48 h时采集的花柱中,均未看到花粉管(图10)。

2.3.2 地锦花粉给五叶地锦授粉(PQ × PT)时的花

粉萌发和花粉管生长 对授粉后不同时间柱头的荧光观察发现,授粉后2 h,五叶地锦柱头表面可看到花粉粒附着,有花粉粘附的花柱约占到观察花柱数的一半。授粉8 h的花柱上,可见少量花粉萌发(图11),但花粉管在柱头表面盘绕,不能进入花柱内(图12)。此后的观测结果与8 h的观测结果类似,在花柱内均未观察到花粉管(图13)。

由以上观察结果可知,将地锦和五叶地锦相互授粉时,花粉粒不能在柱头表面正常萌发,或者花粉管不能进入花柱中,不亲和反应发生在柱头表面。地锦和五叶地锦相互授粉后不同时间,各种状态花柱数量见表3。

表3 地锦和五叶地锦相互授粉后不同时间各种状态花柱比例

授粉后小时数/h	无花粉粒/%		有花粉粘附在柱头表面/%		有花粉粒发生水合作用/%		有花粉粒萌发/%		花粉管进入花柱/%	
	PT × PQ	PQ × PT	PT × PQ	PQ × PT	PT × PQ	PQ × PT	PT × PQ	PQ × PT	PT × PQ	PQ × PT
2	66.7	53.3	26.6	46.7	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	13.3	26.7	80.0	60.0	6.7	0.0	0.0	13.3	0.0	0.0
16	13.3	—	66.7	—	13.3	—	6.7	—	0.0	—
24	26.7	6.7	60.0	86.6	13.3	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0
36	20.0	26.7	73.3	66.6	0.0	0.0	6.7	6.7	0.0	0.0
48	26.7	26.7	73.3	73.3	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0

注:短横线是指该时段未进行采样观察。

## 3 结论与讨论

(1) 弄清种间杂交障碍的表达部位和产生原因,对克服远缘杂交障碍,获得远缘杂种具有重要意义。地锦和五叶地锦刚成熟的花粉活力很高,但萌发率测定结果较低,这可能与培养基的配比、蔗糖浓度高低和培养条件有关。结合自交后花粉在柱头表面的萌发情况来看,花粉育性不是导致杂交不亲和的主要原因。

(2) 在自然情况下,任何种植物开花时,有可能接受本种的花粉和同时接受异种的花粉,但是,只有具有一定遗传背景的个体之间才能实现亲和性的交配。人们从细胞学角度,已明确了受精作用中亲和和不亲和首先是一个花粉与雌蕊组织之间“认可”或“拒绝”的识别反应<sup>[7]</sup>。地锦和五叶地锦人工辅助自交后,花粉粒可以在柱头表面萌发,随后花粉管伸入花柱内,花粉管生长正常。地锦和五叶地锦自交时,没有观察到不亲和反应。观察发现,授粉2 h所采柱头上观察到的花粉粒数一般少于8 h所采柱头。一些其它的报道

中也见到类似情况<sup>[8]</sup>。发生这种现象的原因,可能是授粉2 h,花粉粒未能在柱头上牢固附着,在材料处理的过程中,被冲刷下来;而8 h的柱头上,花粉粒已牢固附着,很少被冲刷掉的缘故。

(3) 许多育种实践表明,远缘杂交存在不同程度的不亲和性(Incompatibility)。这是植物育种家进行远缘杂交以转移优良性状基因的主要障碍。受精前的生殖隔离即通常所称的杂交不亲和性。根据不亲和的表达部位,可分为柱头不亲和、花柱不亲和、胚囊不亲和3种类型<sup>[9]</sup>。将地锦和五叶地锦进行相互授粉时,绝大多数花粉粒不能在母本柱头表面萌发,即使能够萌发,花粉管也会出现先端膨大、分叉、盘绕等异常情况,不能伸入花柱内部。这是导致二者杂交不亲和的主要原因。地锦与五叶地锦杂交不亲和发生在柱头表面,属于柱头不亲和类型。基于以上分析,通过一些克服授精前障碍的方法,如辐射花粉、花粉蒙导、柱头短截<sup>[7]</sup>等技术措施,有望在一定程度上克服地锦和五叶地锦的杂交不亲和性,获得杂交种。这方面试验正在进行中。

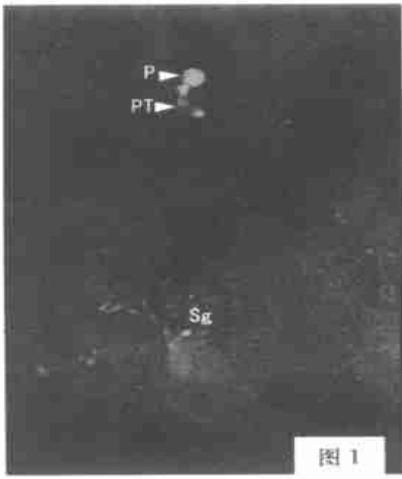


图 1

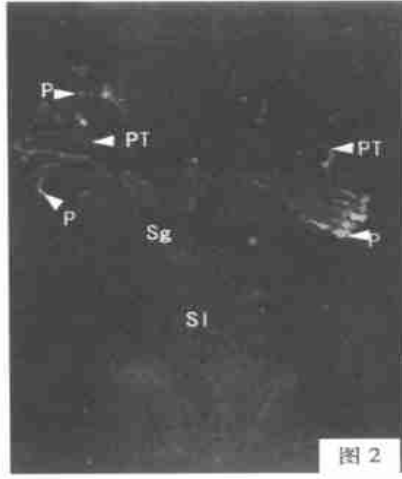


图 2

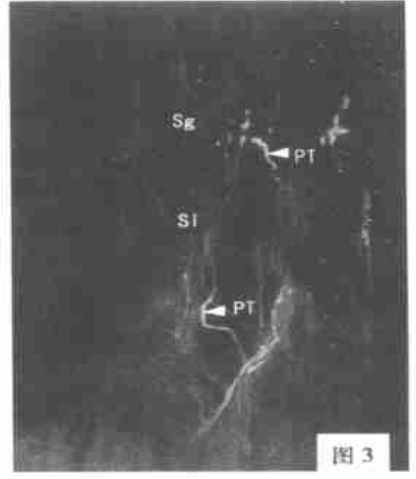


图 3

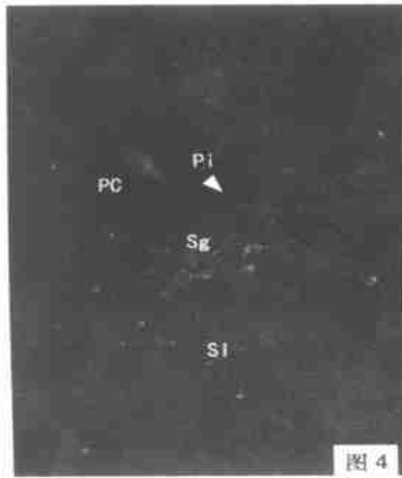


图 4

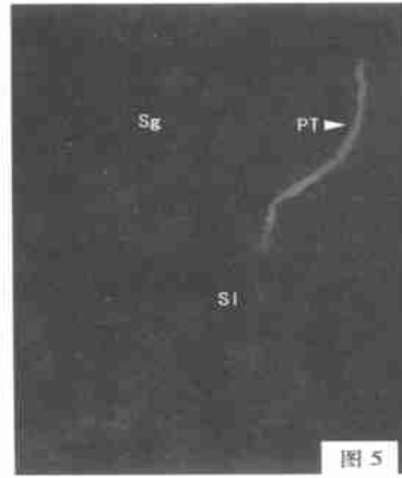


图 5

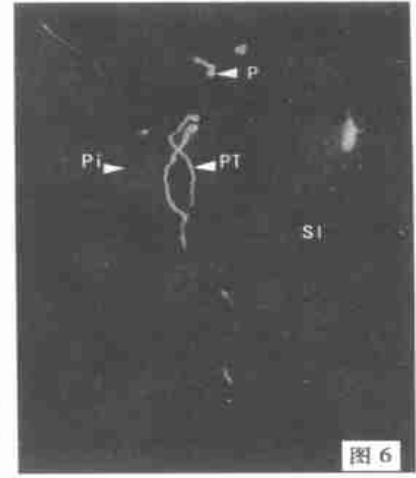


图 6

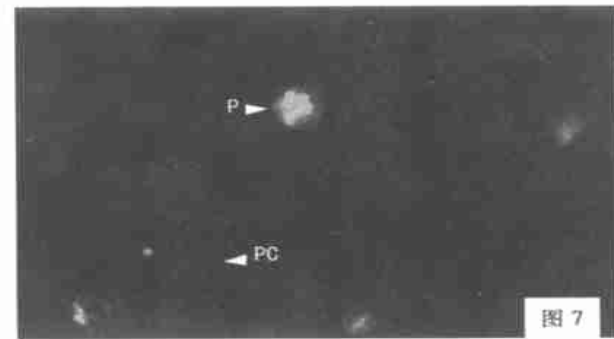


图 7

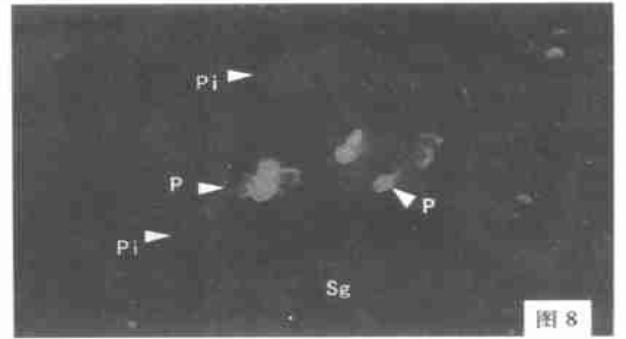
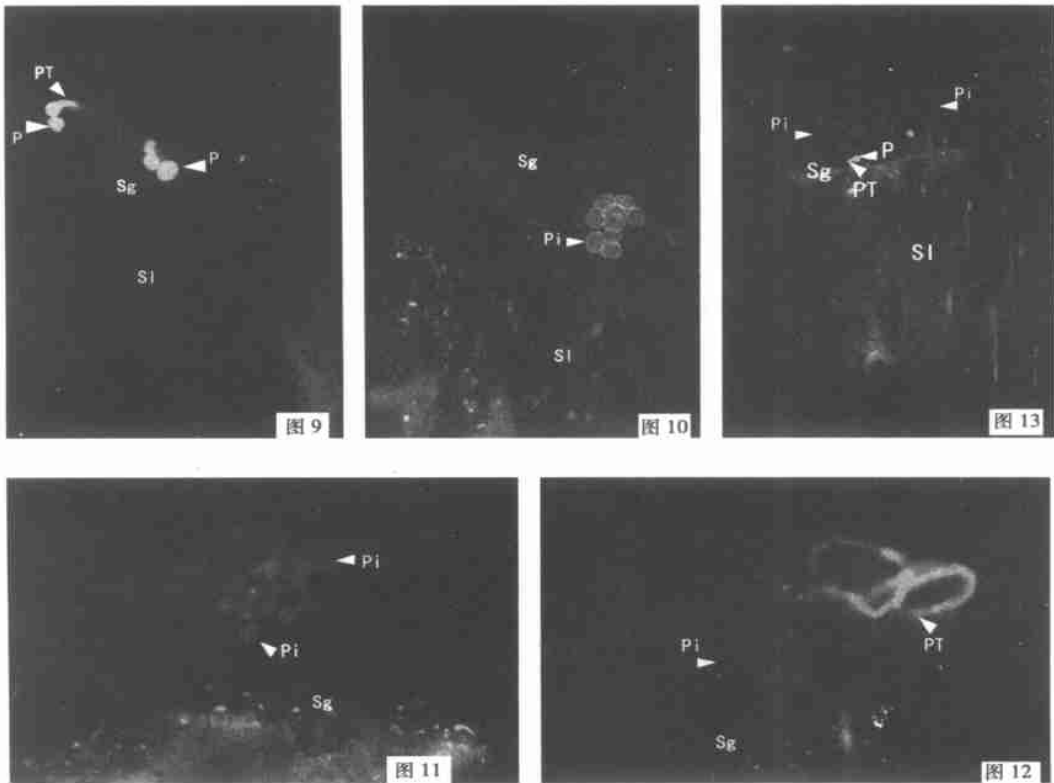


图 8



符号说明:

花粉粒: pollen, P; 花粉管: pollen tube, PT; 花柱: style, Sl; 柱头: stigma, Sg; 乳突细胞: papillae cell, PC; 未萌发花粉粒: Pi;

符号说明:

花粉粒: pollen, P; 花粉管: pollen tube, PT; 花柱: style, Sl; 柱头: stigma, Sg; 乳突细胞: papillae cell, PC; 未萌发花粉粒: Pi;

图 1 地锦自交后 8 h 柱头, 示花粉粒萌发(40×); 图 2 地锦自交后 16 h 花柱, 示花粉管进入花柱(20×); 图 3 地锦自交后 24 h 花柱, 示花粉管伸长至花柱基部(40×); 图 4 五叶地锦自交后 2 h 柱头, 示花粉粒附着在柱头表面(40×); 图 5 五叶地锦自交后 8 h 花柱, 示花粉管进入花柱(40×); 图 6 五叶地锦自交后 24 h 花柱, 示花粉管伸长至花柱基部(20×); 图 7 地锦×五叶地锦 8 h 柱头, 示花粉粒水合(80×); 图 8 地锦×五叶地锦 8 h 柱头, 示花粉管异常(80×); 图 9 地锦×五叶地锦 48 h 花柱, 示花粉管异常(40×); 图 10 地锦×五叶地锦 48 h 花柱, 花柱内未发现花粉管(20×); 图 11 五叶地锦×地锦 2 h 柱头, 示花粉粒附着在柱头上(40×); 图 12 五叶地锦×地锦 8 h 柱头, 示花粉管在柱头表面缠绕(40×); 图 13 五叶地锦×地锦 72 h 花柱, 示花粉管未能长至花柱内(20×)

## 参考文献:

- [1] 付彦荣, 赵梁军. 爬山虎属植物的研究进展及园林应用[A]. 见: 加入 WTO 后中国花卉产业形势与发展战略研讨会主委会. 中国花卉(II)[M]. 昆明: 云南美术出版社, 2002: 139~145
- [2] 张毅功, 孙振元, 陆诗雷. 爬山虎绿化荒山作用初步研究[J]. 林业科技通讯, 2000(3): 26~27
- [3] 武菊英, 王庆海, 孙振元, 等. 物理和化学方法对五叶地锦的防控作用[J]. 林业科学研究, 2004, 17(2): 237~240
- [4] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 242~243
- [5] 何凤仙. 植物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 71~84
- [6] 王灶安. 植物显微技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992: 87~88
- [7] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982: 128
- [8] 李瑞芬, 李聪, 苏加楷. 沙打旺与鹰咀紫云英种间杂交不亲和性研究[J]. 草地学报, 2001, 9(3): 8~15
- [9] 孟金陵. 植物特生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 296~300