

铁皮石斛自交和杂交亲和性的细胞学研究

高 杨¹, 林韧安², 袁超群¹, 马丽娅¹, 王佳囡¹, 朱玉球¹, 高燕会¹

(1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省乐清市林业良种科技中心, 浙江 乐清 325600)

摘要: 为了探讨铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 自交和杂交亲和性的生物学机制, 利用荧光显微镜观察铁皮石斛自交、种内杂交后柱头性状和花粉管的生长情况。结果发现: 自花授粉 1 h 后, 花粉粒萌发, 花粉管到达花柱基部接近子房处, 4 h 后花粉管进入子房, 8 h 后停止生长, 72 h 后子房萎缩, 花粉管消失, 不同的亲本间略有差别。种内杂交后的花粉管能够顺利进入子房, 发育良好。由于铁皮石斛自交花粉管进入子房后停止生长, 导致子房萎缩, 可以认为铁皮石斛属于配子体自交不亲和。研究结果为铁皮石斛的自交不结实机理研究提供了细胞学基础, 也为铁皮石斛种质资源保育、杂交育种等研究提供理论依据。图 4 表 1 参 23

关键词: 中草药学; 铁皮石斛; 自交; 杂交; 亲和性

中图分类号: S567.9

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)04-0618-06

Cytological study on self and hybridization affinity in *Dendrobium officinale*

GAO Yang¹, LIN Ren'an², YUAN Chaoqun¹, MA Liya¹, WANG Jia'nan¹, ZHU Yuqiu¹, GAO Yanhui¹

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. Science and Technology Center of Yueqing Forestry Improved Variety, Yueqing 325600, Zhejiang, China)

Abstract: To investigate the biological mechanism of self and hybridization affinity in *Dendrobium officinale*, stigma characteristics and pollen tube growth after self-pollination and after intraspecific hybridization in *D. officinale* were studied using fluorescence microscopy. Results for self-pollination showed that the pollen germinated, and the pollen tube reached the style base close to the ovary at 1 h. The pollen tube entered the ovary after 4 h, and growth stopped after 8 h. The ovary atrophied after 72 h, and then the pollen tube disappeared. There was a slight difference between parents. For intraspecific hybridization, the pollen tube smoothly entered the ovary. Hypothetically, *D. officinale* was gametophytic and self-incompatible. These results could provide cytological evidence for studying self-incompatibility in *D. officinale* as well as a technical and theoretical basis for germplasm conservation, cross breeding, and selection of new cultivars of *D. officinale*. [Ch, 4 fig. 1 tab. 23 ref.]

Key words: Chinese herbology; *Dendrobium officinale*; selfing; hybridization; compatibility

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 又名黑节草, 属兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 多年生附生草本植物, 主要分布于中国安徽、浙江、福建、云南、四川等省和华南某些地区, 具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、降血糖和有效减轻肝损伤等作用^[1-3], 被誉为“中华九大仙草”之首, 国际药用植物界的“药界大熊猫”^[3]。对铁皮石斛种质资源的保存研究发现, 铁皮石斛自交结实率较低, 甚至不结实,

收稿日期: 2017-06-05; 修回日期: 2017-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603228); 浙江农林大学学生科研基金资助项目(102-2013200008)

作者简介: 高杨, 从事药用植物和观赏植物生物技术研究。E-mail: 449167463@qq.com。通信作者: 高燕会, 副教授, 博士, 从事植物生物技术、观赏植物和药用植物新品种选育研究。E-mail: gaoyan-hui408@126.com

其优良品种只能通过种内杂交或者无性繁殖才能保存。因此,深入研究铁皮石斛自花不育机制,广泛开展种内种间杂交育种是实现铁皮石斛种质保存以及种质资源创新的有效手段。近年来,有关铁皮石斛花粉活力^[4]、杂交育种^[5]、栽培技术^[6]及化学成分^[7]等的研究较多,但涉及铁皮石斛自交和杂交亲和性细胞学基础和机制方面的研究甚少。与众多显花植物一样,铁皮石斛在长期进化过程中形成了自交不亲和的生殖隔离机制,表现为雌雄蕊发育正常且同熟,自花或同基因型异花传粉后却不能结实^[8]。对显花植物自交不亲和性的研究一直是植物界的研究热点之一,十字花科 *Cruciferae*^[9-10],罂粟科 *Papaveraceae*^[11],紫葳科 *Bignoniaceae*^[12],蔷薇科 *Rosaceae*^[13]等植物的自交不亲和性的细胞学和分子遗传学研究已较为深入。石斛属植物自交不亲和性的研究虽已有报道^[14-15],但关于铁皮石斛自交不亲和性尚不确定。为了进一步了解铁皮石斛自交和杂交亲和性生物学机制,本研究对自交(自花授粉)和种内杂交的样品进行细胞学观察,考察自交和杂交后花粉管的生长情况,为铁皮石斛的自交不结实现象的类型和机制研究、种质资源保育、杂交育种及新品种选育提供细胞学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用 8 个铁皮石斛亲本材料分别为 78×69, 17×163, 124×30, 18×22, 13×163, 966, C13, 6A2B。栽培于天目山铁皮石斛示范种植基地,为设施栽培,栽培基质为松树皮。各材料随机选择生长健壮并正常开花的 200 朵花分别进行自交(自花授粉)和种内杂交(正交和反交),重复 3 次。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉生活力测定 于 2016 年 5–6 月盛花期采集 8 种铁皮石斛的新鲜花粉,采用联苯胺法^[16-17]测定亲本的花粉生命力。观察 5 视野·材料⁻¹,观察花粉数量≥30 个·视野⁻¹,重复 3 次。花粉萌发率=萌发花粉数/观察花粉数×100%。

1.2.2 自交和种内杂交 选择茎秆粗壮且分节明显、无病虫害的铁皮石斛植株作为亲本,于开花的第 3–5 天,选择 200 朵·亲本⁻¹,进行自交和杂交试验。自交花粉来自同株自花或异花成熟花粉,杂交时去掉母本雄蕊,夹掉唇瓣,去除药帽,用镊子将花粉团送入母本柱头内进行授粉^[18]。授粉后注明亲本和授粉时间,用于花粉管荧光显微观察和坐果率的统计。

1.2.3 花粉管萌发观察及生长测定 分别于授粉后 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 和 96 h,采集雌蕊,15 朵·样品⁻¹,甲醛-冰乙酸-乙醇(FAA)固定液[V(70%乙醇):V(冰乙酸):V(甲醛)=90:5:5]固定,4℃冰箱保存备用^[19-20]。采用脱色苯胺蓝荧光染色技术^[11]测定花粉管萌发及生长情况。在常温下,用 8 mol·L⁻¹ 氢氧化钠(NaOH)溶液软化脱色 2 h,然后用质量分数为 0.5%的苯胺蓝溶液染色 6 h,再用甘油压片;分别在莱卡显微镜(Leica DM 4000, 德国)明视场和荧光模式紫外光激发状态下观察和拍照。样品经 FAA 固定、氢氧化钠处理及蒸馏水清洗等过程,简单附着在柱头的花粉将会被洗掉,因此最终留在柱头上的花粉可视为萌发。花粉管荧光观察时分别采用未授粉染色和未染色的雌蕊为对照,比较花粉管萌发和花粉管生长情况。

2 结果与分析

2.1 花的结构

铁皮石斛花为总状花序、唇型花。花瓣与萼片均为乳黄绿色,其中 1 枚花瓣变异为唇瓣;雌蕊与雄蕊合为一体形成典型的合蕊柱,雌蕊位于下方,雄蕊在上方,中间有隔膜将两者隔开;隔膜下方有 1 个柱头窝,上方为药室,药室有 1 个药帽覆盖^[20];花粉粒呈乳黄色水滴状,4 粒,两两连在一起形成 2 个花粉块。花结构如图 1 所示。

2.2 亲本花粉生活力测定

采用联苯胺法^[17]测定花粉生命力。结果发现:8 个亲本的花粉生活力均高于 88.0%(图 2),说明试验材料的花粉活性均较高,符合后续研究需要。

2.3 花粉管的萌发和生长

铁皮石斛花粉授到柱头上后,随即开始水合并萌发,长出花粉管。花粉管通过乳突细胞间隙和乳突



图 1 铁皮石斛花的结构

Figure 1 Flower structure of *Dendrobium officinale*

细胞进入柱头, 进而汇集到花柱道中, 经花柱道内表皮腺细胞分泌的黏液层向下生长^[14]。对柱头染色处理可见: 花粉管在荧光的激发下呈现蓝绿色荧光, 可以观察到花粉粒在柱头上的萌发和花粉管的生长情况。显微观察发现: 铁皮石斛花柱道中空, 花柱从上到下呈现出花柱道逐渐贴合的趋势; 自交和杂交花粉管都汇集在一起沿着两壁纵向生长(图 3A)。

自花授粉交与杂交授粉对花粉粒在柱头的萌发情况无明显差异。授粉 1 h 内, 花粉管生长速度极快。1 h 后伸长变缓, 此时花粉管生长到花柱基部并接近子房, 花粉管中均能观察到精核细胞, 但是杂交处理的精核数量远远超过自交(图 3B, 图 3C)。由于花粉管汇集在一起且纵向生长, 从形态上看自交与杂交处理未见明显差异(图 3D, 图 3E)。授粉后约 2 h, 花粉管生长到达花柱基部, 此时发现杂交后的花粉管继续向子房生长, 而自交后的花粉管在花柱基部生长减缓, 部分生长停滞(图 3F), 只有少数能够进入子房。不同的铁皮石斛亲本花粉管的生长速度也略有不同。

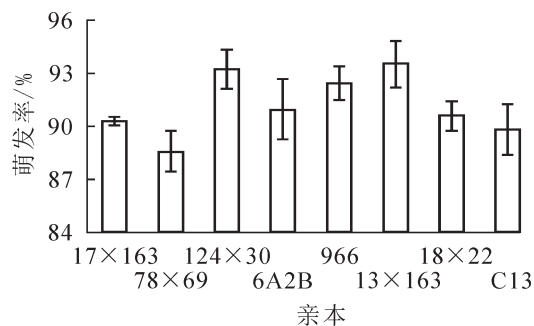
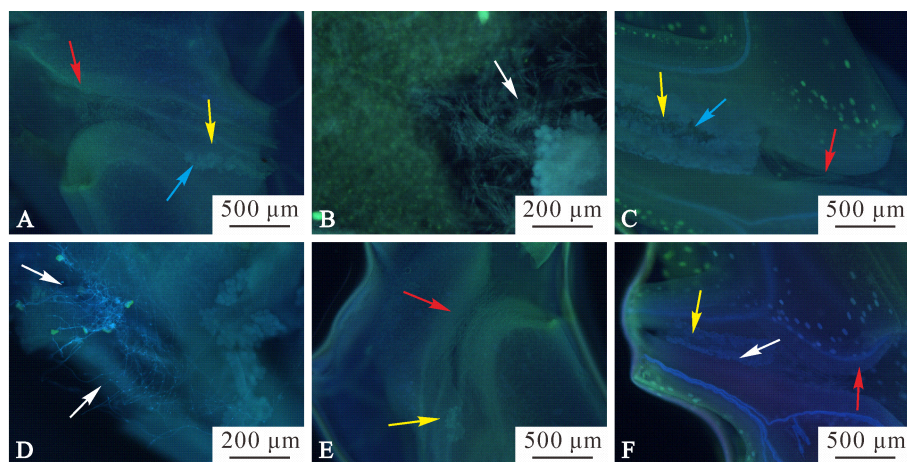


图 2 不同铁皮石斛亲本花粉萌发率

Figure 2 Determination of pollen viability of different *Dendrobium officinale* cultivars

红色箭头指向花粉管, 黄色箭头指向子房, 蓝色箭头指向子房壁, 白色箭头指向精核

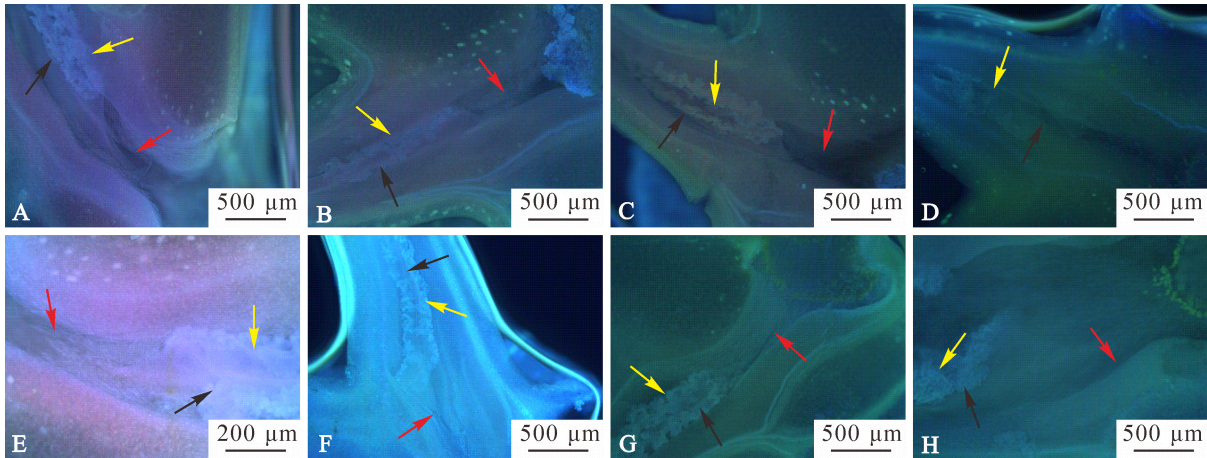
图 3 铁皮石斛自交和杂交后花粉管在花柱中的生长情况

Figure 3 Growth of pollen tube in the style of self pollination and hybridization of *Dendrobium officinale*

2.4 花粉管在子房中的生长特性

花粉管伸长进入子房后, 在侧膜胎座内继续生长。观察发现, 自交授粉后的 2~4 h, 花粉管生长缓慢, 只有少数进入子房内部(图 4A); 杂交授粉 4 h 后, 大量花粉管呈束状进入子房, 沿胎座空隙向子房底部生长(图 4B)。由此认为, 自交与杂交处理尽管在花粉管进入子房的时间上差异不显著, 但数量明显少于杂交。此后 1 d 内, 自交处理多数花粉管停留在花柱基部与子房连接的上下区域缓慢生长, 即便有少数能够进入子房, 长到一定长度后最终也停止生长, 未能达到子房底部(图 4C); 杂交处理花粉管在继续沿子房缓慢向下生长(图 4D), 并在授粉后 48 h 生长至子房 1/3 处(图 4E), 直至授粉 96 h, 子

房内依旧有大量的花粉管，子房表现为饱满(图 4F)；而自交处理的花粉管数量在 48 h 后明显减少，子房的饱满度较低(图 4G)，授粉后 96 h，花柱内的花粉管基本都消失，子房也出现严重的萎缩现象(图 4H)。由此推测，铁皮石斛自交不能结实可能是由于某种自身的机制导致精核无法到达胚珠完成受精而造成。



红色箭头指向花粉管，黄色箭头指向子房，黑色箭头指向子房壁

图 4 铁皮石斛自交和杂交花粉管在子房中的生长

Figure 4 Growth of pollen tube of self pollination and hybridization in *Dendrobium officinale*

2.5 自交和杂交结实情况

于 2016 年 6 月和 10 月分别对铁皮石斛自交和杂交坐果率进行统计(表 1)。相同条件下，铁皮石斛亲本自交的坐果率均为 0，而种内杂交坐果率普遍为 60.0%~96.0%，大部分正交和反交的坐果率相差不大，仅有 6A2B 和 18 × 22 作为亲本时正反交坐果率差异较大，分别为 94.8%和 29.5%，这可能与亲本之间的亲和力有关。

表 1 铁皮石斛种内杂交坐果率

Table 1 Percentage of fertile fruit of *Dendrobium officinale* interspecific hybridization

正交			反交		
母本	父本	坐果率/%	母本	父本	坐果率/%
17×163	966	82.0	966	17×163	78.0
966	13×163	63.1	13×163	966	63.8
124×30	C13	86.1	C13	124×30	60.9
124×30	13×163	95.8	13×163	124×30	92.6
124×30	6A2B	96.0	6A2B	124×30	88.3
124×30	18×22	83.1	18×22	124×30	86.2
13×163	17×163	86.0	17×163	13×163	94.0
17×163	18×22	78.0	18×22	17×163	90.0
6A2B	18×22	94.8	18×22	6A2B	29.5
6A2B	C13	87.3	C13	6A2B	69.4

3 讨论

受到花粉与柱头、花粉管与花柱及雌雄配子体之间识别作用的限制，植物自交和杂交亲和性障碍主要发生在花粉粒的萌发，花粉管进入柱头，花粉管通过花柱和受精、胚发育等阶段，每个阶段的障碍均可能引起自交和杂交的不亲和^[21]。本研究发现，种内杂交坐果率普遍为 60.0%~96.0%，少数亲本种间杂交坐果率为 29.0%~34.0%，8 个品种自交坐果率均为 0，说明铁皮石斛花朵种内杂交能良好进行，但其自交无法产生后代，可以认为铁皮石斛具有自交不亲和的特性。

自交不亲和是在受精过程中发生的主动识别和拒绝自交花粉的机制,根据植物花型的不同,自交不亲和性可分为同形性自交不亲和(homomorphic SI)和异形性自交不亲和(heteromorphic SI)^[22];根据花粉自交不亲和性的遗传控制方式,同形性自交不亲和性又可分为孢子体型自交不亲和(sporophytic SI, SSI)和配子体自交不亲和(gametophytic SI, GSI)2种类型。配子体型自交不亲和性即花粉在柱头上萌发后可侵入柱头,并能在花柱组织中延伸一段,此后受到抑制。孢子体型自交不亲和性即花粉落在柱头上不能正常萌发,或萌发后缠绕在柱头乳突细胞上但却无法侵入柱头,花粉的这种行为取决于二倍体亲本的基因型^[11,23]。本研究在对铁皮石斛进行自交和杂交时,发现花粉管中均含有精核,花粉管具有活力能正常生长进入花柱;授粉后1 h内,与自交相比,杂交花粉管生长速度略快;自交后花粉管在进入子房1/3处停止生长,而杂交花粉管顺利进入子房;48~72 h时,自交花粉管逐渐消失,杂交后的花粉管不消失。由此可以判断,铁皮石斛属于配子体自交不亲和性,与兰科植物甲虫兰属 *Restrepia*^[23],石斛属的束花石斛 *Dendrobium chrysanthum*^[18]的自交不亲和性相一致。这一结果可为铁皮石斛克服自交不亲和性以及组合杂交育种、创制新种质及种质资源保育提供理论基础。

4 参考文献

- [1] 吕圭源, 颜美秋, 陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, **38**(4): 489 – 493.
LÜ Guiyuan, YAN Meiqiu, CHEN Suhong. Review of pharmacological activities of *Dendrobium officinale* based on traditional functions [J]. *China J Chin Mater Med*, 2013, **38**(4): 489 – 493.
- [2] 李娟, 李顺祥, 黄丹, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, **29**(18): 74 – 79.
LI Juan, LI Shunxiang, HUANG Dan, *et al.* Advances in the of resources, constituents and pharmacological effects of *Dendrobium officinale* [J]. *Sci Technol Rev*, 2011, **29**(18): 74 – 79.
- [3] 赵贵林, 蔡捷炫, 曲洪安, 等. ‘双晖1号’铁皮石斛的选育及其特征特性[J]. 热带农业科学, 2013, **33**(11): 24 – 26.
ZHAO Guilin, CAI Jiexuan, QU Hongan, *et al.* Breeding of *Dendrobium officinale* ‘Shuanghui No.1’ and its characteristics [J]. *Chin J Trop Agric*, 2013, **33**(11): 24 – 26.
- [4] 朱波, 苑鹤, 俞巧仙, 等. 铁皮石斛花粉活力与种质创制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(6): 755 – 757.
ZHU Bo, YUAN He, YU Qiaoxian, *et al.* Pollen vigor and development of germplasm of *Dendrobium officinale* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, **36**(6): 755 – 757.
- [5] 朱波, 华金渭, 吉庆勇, 等. 铁皮石斛杂交育种 F₁ 代叶面积回归测定方法研究[J]. 浙江农业学报, 2015, **27**(10): 1761 – 1764.
ZHU Bo, HUA Jinwei, JI Qingyong, *et al.* Study on regeneration method of leaf area of F₁ generation of *Dendrobium officinale* cross breeding [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2015, **27**(10): 1761 – 1764.
- [6] 斯金平, 诸燕, 朱玉球. 铁皮石斛人工栽培技术的研究与应用进展[J]. 浙江林业科技, 2009, **29**(6): 66 – 70.
SI Jinping, ZHU Yan, ZHU Yuqiu. Progress on research and utilization of cultivation of *Dendrobium officinale* [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2009, **29**(6): 66 – 70.
- [7] 陈晓梅, 肖盛元, 郭顺星. 铁皮石斛与金钗石斛化学成分的比较[J]. 中国医学科学院学报, 2006, **28**(4): 524 – 529.
CHEN Xiaomei, XIAO Shengyuan, GUO Shunxing. Comparison of chemical compositions between *Dendrobium candidum* and *Dendrobium nobile* [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2006, **28**(4): 524 – 529.
- [8] CANTO J D, STUDER B, LUBBERSTEDT T. Overcoming self-incompatibility in grasses: a pathway to hybrid breeding [J]. *Theory Appl Genet*, 2016, **129**(10): 1815 – 1829.
- [9] 赵天荣, 龚义勤, 柳李旺, 等. 萝卜自交不亲和特性的荧光快速鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, **30**(4): 30 – 34.
ZHAO Tianrong, GONG Yiqin, LIU Liwang, *et al.* Rapid identification of self-incompatibility in radish (*Raphanus sativus* L.) with fluorescent observation [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2007, **30**(4): 30 – 34.
- [10] 葛宇, 许明, 石研. 白萝卜自交不亲和性显微结构观察[J]. 种子, 2008, **27**(4): 31 – 33.
GE Yu, XU Ming, SHI Yan. Identification of self-incompatible of radish in microscopical structure [J]. *Seed*, 2008,

- 27(4): 31 – 33.
- [11] WHEELER M J, de GRAAF B H J, HADJIOSIF N, *et al.* Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas* [J]. *Nature*, 2009, **459**(7149): 992 – 995.
- [12] 樊莉丽, 彭方仁, 王改萍, 等. 楸树自交及种内、种间杂交亲和性的细胞学观察[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2013, **37**(4): 1 – 7.
FAN Lili, PENG Fangren, WANG Gaiping, *et al.* Cytological observation of fertilization compatibility of *Catalpa bungei* after self, intraspecific cross and interspecific cross-pollination [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2013, **37**(4): 1 – 7.
- [13] ASHKANI J, REES D J. A comprehensive study of molecular evolution at the self-incompatibility locus of Rosaceae [J]. *J Mol Evol*, 2016, **82**(2/3): 128 – 145.
- [14] 黄捷. 石斛属植物交配亲和性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
HUANG Jie. *Study on Cross-Compatibility of the Genus Dendrobium* [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [15] 李乐兴. 束花石斛自交不亲和转录组学分析以及相关 miRNA 的挖掘[D]. 深圳: 深圳大学, 2016.
LI Lexing. *Comparative Transcriptome Analysis Reveals Similar and Distinct Features of Genes in Dendrobium chrysanthum Pistil upon Self and Cross Pollination* [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2016.
- [16] 邢虎成, 揭雨成, 周清明, 等. 苧麻花粉活力测定方法研究[J]. 中国农学通报, 2010, **26**(17): 65 – 69.
XING Hucheng, JIE Yucheng, ZHOU Qingming, *et al.* Study on the determine of ramie pollen viability [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2010, **26**(17): 65 – 69.
- [17] 凌春英, 肖恩, 严冬瑾, 等. 大花蕙兰和墨兰花粉活力测定及贮藏研究[J]. 安徽农业科学, 2010, **38**(5): 2312 – 2314.
LING Chunying, XIAO En, YAN Dongjin, *et al.* Study of pollen viability testing on *Cymbidium hybridum* and *Cymbidium sinense* and their pollen preservation [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, **38**(5): 2312 – 2314.
- [18] 邓茜玫. 石斛兰杂交亲和性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
DENG Ximei. *Studies on Cross-compatibility in Dendrobium* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2013.
- [19] 高燕会, 周芬静, 童再康, 等. 石蒜与中国石蒜杂交亲和性的研究[G]//张启翔. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 2014: 250 – 257.
GAO Yanhui, ZHOU Fenjing, TONG Zaikang, *et al.* Study on cross-compatibility between *Lycoris radiata* and *L. chinensis*[G]//ZHANG Qixiang. *Advances in Ornamental Horticulture of China*. Beijing: China Forestry Publishing House, 2014: 250 – 257.
- [20] 金银兵. 铁皮石斛的生物学特性与开花授粉技术研究[J]. 安徽农业科学, 2009, **37**(11): 5280 – 5282.
JIN Yinbing. Study on biological characteristics and flowering pollination technology of *Dendrobium candidum* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, **37**(11): 5280 – 5282.
- [21] 高超, 袁德义, 杨亚, 等. 油茶自交不亲和性的解剖特征[J]. 林业科学, 2015, **51**(2): 60 – 68.
GAO Chao, YUAN Deyi, YANG Ya, *et al.* Anatomical characteristics of self-incompatibility of *Camellia oleifera* [J]. *Sci Silv Sin*, 2015, **51**(2): 60 – 68.
- [22] 吴华清, 张绍铃, 李晓, 等. 植物自交不亲和性的分子生物学进展[J]. 南京农业大学学报, 2006, **29**(4): 119 – 126.
WU Huaqing, ZHANG Shaoling, LI Xiao, *et al.* Advance in molecular biology of self-incompatibility in flowering plants [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2006, **29**(4): 119 – 126.
- [23] MILLNER H J, McCREA A R, BALDWIN T C. An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia* [J]. *Am J Bot*, 2015, **102**(3): 487 – 494.