

梨自花及异花授粉对其花柱自发荧光的影响

徐国华^{1*} 张绍铃^{1**} 张超英² 陈迪新¹¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 利用激光共聚焦显微技术研究了砂梨 (*Pyrus serotina* Rehd.) 品种‘丰水’自花授粉和异花(‘二十世纪’)授粉 16 h 后花柱自发荧光的分布规律。发现未授粉花柱整体的自发荧光比较弱, 但从柱头端向子房端花柱自发荧光呈上升趋势; 异花授粉和自花授粉后花柱整体的自发荧光都有所增加; 授粉后自发荧光变化最大的部位在柱头区域; 自花授粉后, 在柱头及距柱头 0~400 μm 范围内荧光值较高, 其他区域的荧光值相近; 而异花授粉后在花柱的中部(距柱头 1500~2050 μm 范围内)荧光值最低; 自花授粉后自发荧光除柱头以外主要分布在花柱的边缘区域; 异花授粉后自发荧光在花柱上半部的分布情况与自花授粉类似, 下半部分布相对均匀。

关键词: 梨; 自花授粉; 异花授粉; 花柱; 自发荧光; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0439-04

1 目的、材料与方法

梨 (*Pyrus*) 是典型的配子体型自交不亲和性果树, 目前虽然在梨自交不亲和性基因的克隆^[1]、表达特性^[2]、产物的分离纯化及其功能的研究^[3]等方面均取得了重大的进展, 但是还不能完全解释自交不亲和性的机理^[4]。植物自交不亲和性是雌蕊与花粉相互识别、相互作用结果的综合表现, 涉及植物细胞间信息传递、细胞识别及花粉管的定向生长等过程。已有研究主要集中在自交不亲和性相关因子对花粉萌发和花粉管伸长特性的影响方面^[5]。而对于梨等木本果树在自交不亲和性识别和反应过程中花柱活体或半活体的生理变化研究极少。作者利用激光共聚焦显微镜对梨半活体花柱在自花及异花授粉后的自发荧光进行了比较研究, 从另一个侧面来直观地反映自花与异花授粉后花柱各个部位的生理变化, 为研究配子体型自交不亲和性机理提供新的方法和手段。

以生产上主栽的已知 S 基因型的砂梨 (*Pyrus serotina* Rehd.) 品种‘丰水’(基因型 S_3S_5) 和‘二十世纪’(基因型 S_2S_4) 为试材。材料采自江苏省高邮市果树试验场梨园 6 年生树, 于 2002 年 3 月 1 日每品种各剪取长 60~80 cm 的 2 年生花枝 8 条, 每枝约有饱满花芽 10~20 个, 带回室内插入盛有 5% 蔗糖溶液的烧杯中(溶液高度约 5 cm, 每隔 2 d 更换 1 次糖溶液), 两个品种分放于两个光照培养箱中, 在光照 12 h、光强 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、20℃恒温下培养 15 d 左右开始开花。先采取开花前 1~2 d 的花蕾, 取出花药, 用透明纸包好后埋于硅胶内, 室温下干燥 1~2 d 即可散出花粉。选用花瓣即将展开的大花蕾进行人工授粉后仍置于原培养箱中, 不必套袋。设异花授粉: ‘丰水’(♀) × ‘二十世纪’(♂) 和自花授粉 ‘丰水’ × ‘丰水’。授粉 16 h 后, 选取基本等长的已授粉花柱, 用镊子将其从紧挨子房端取下, 立即置于配备 Zeiss 镜头的 BioRAD™ MRC 1024ES 激光共聚焦显微系统观察。将花柱置于载物台上, 依次从柱头开始向子房端分段观察, 每段长度 550 μm 左右。仪器沿花柱段的纵切面从一侧至另一侧每隔 2 μm 自动扫描 1 次, 通过计算机采集图像数据。试验激发波长为 488 nm,

收稿日期: 2003-03-04; 修回日期: 2003-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170651, 30270926); 国家高技术发展计划 (“863”) 项目 (2002AA241191); 高等学校博士点基金项目 (20010307012); 江苏教育学院 “十五” 科研重点资助项目

* 现工作单位: 江苏教育学院生物系, 南京 210013

** 通讯作者, E-mail: nnzsl@sina.com.cn

于 522 nm 波长采集图像。将扫描获得的系列图像储存于计算机中, 然后通过 Laser Sharp 3.2 及 Confo-cal Assistant 4.02 激光共聚焦图像分析软件将每一段花柱的系列图像进行“蒙太奇”(Montage)处理, 选取每段中荧光强度最强的一帧图像运用 Adobe™ Photoshop 6.0 进行像素(pixel)分析, 统计荧光值。以未授粉花柱作为对照, 每个处理进行 3 次重复。

2 结果分析与讨论

2.1 未授粉花柱的自发荧光值

未授粉‘丰水’花柱整体的自发荧光比较弱(图版 1、2, 限于篇幅, 花柱中间部分的图像未给出), 但是在靠近子房端存在一个明显的上升趋势, 子房端的荧光值是柱头端的 3 倍多(图 1)。

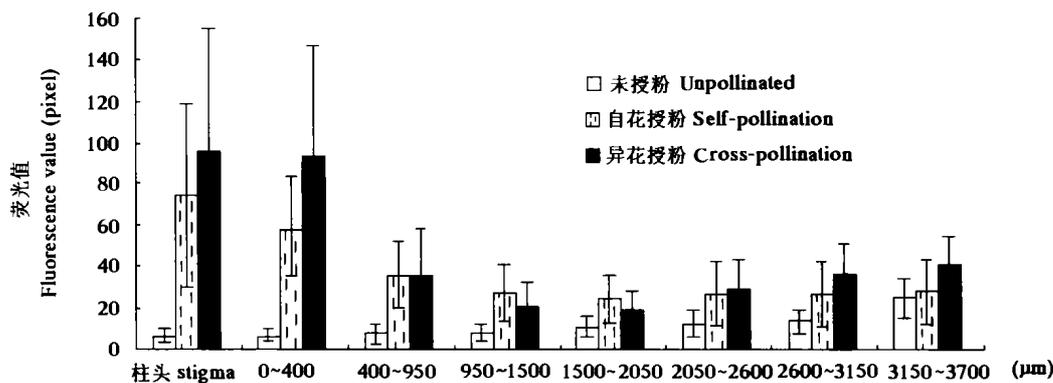


图 1 距柱头不同距离的花柱各部荧光强度值(垂直线代表标准误)

Fig. 1 Fluorescence value of each part of style (Vertical bars represent standard errors)

2.2 授粉后花柱的自发荧光值

与未授粉相比, 授粉刺激(包括花粉萌发和花粉管生长所引起的生理生化变化等)增强了柱头及花柱的自发荧光, 且无论是异花授粉(图版, 3~9)还是自花授粉(图版, 10~16)后花柱整体的自发荧光都发生了极大的变化(图 1)。授粉后自发荧光变化最大的部位都在柱头及距柱头 0~400 μm 的区域, 异花授粉(图版, 3)和自花授粉(图版, 10)柱头的荧光强度分别达到未授粉柱头自发荧光强度的 13 倍和 9 倍。而在靠近子房端花柱自发荧光值因授粉与否的差异较小。以上试验结果表明, 授粉后柱头及花柱上部的强荧光可能与花粉刺激有关, 无论是自花授粉还是异花授粉, 柱头上都发生了剧烈的生理变化。

自花与异花授粉后花柱自发荧光值也有一定差异, 自花授粉后, 除在柱头及距柱头 0~400 μm 区域(图版, 10)的荧光值达到 74 像素和 59 像素外, 其他区域(图版, 11~16)的荧光密度的绝对值差异不大, 荧光值基本上稳定于 24~28 像素之间(图 1); 而异花授粉后花柱自发荧光发生了较大的改变, 柱头区及距柱头 0~400 μm 左右区域的荧光值分别达到 96 像素和 94 像素(图版, 3), 但是在花柱的中部(图版, 6)荧光值最低, 只有 18 像素(图 1), 然后向着子房端荧光值又升至 41 像素。同时我们从图 1 可以看出, 各种处理所得的数据的标准误较大, 表明在同一段花柱中不同部位的荧光强度变化较大, 但是这种荧光分布的差异在自花授粉和异花授粉后又有所区别, 自花授粉后自发荧光除柱头以外主要分布在花柱的边缘区域(图版, 11~13), 而异花授粉后花柱上半部自发荧光的分布与自花授粉时类似(图版, 4~9), 但是在花柱的后半段(图版, 7~9)自发荧光在整个花柱中表现比较均匀。

自花授粉与异花授粉后花柱自发荧光的差异主要是从花柱的中部开始表现出来, 因为从柱头到花柱中部自花授粉与异花授粉的自发荧光都在较高的水平上(与对照相比)下降, 而从中部到子房端的是自花授粉与异花授粉差异表现的区域(尽管差异不够显著)。异花授粉时自发荧光从中部开始恢复

上升, 而自花授粉时自发荧光未曾恢复上升状态; 从中部到子房端荧光不均匀分布的差异与活体花柱内自花花粉管在花柱的中部开始受到抑制的研究结果^[2,6]相符。

本研究的方法可为在活体/半活体条件下研究木本植物的自交不亲和性提供借鉴。以往离体条件下的实验结果往往与生物活体中实际情况存在一定的偏差, 离体研究的结果只有在活体中得到证实才能够更加完善^[7]。我们在试验中首次直观地在花柱中初步观察到了自花和异花授粉后花柱中出现不同反应的区域, 并为已有的生理及生化研究结果^[2,6]提供了直观的佐证。但是由于试验中发现花粉一旦萌发之后自身原本就很低的自发荧光几近消失^[8], 所以, 本试验尚无法应用这种方法来直观地观察花粉管到达的位置与花柱自发荧光改变之间的关系。另外, 本试验为延长取样时期和控制试验条件, 剪取带花芽的枝条在室内培养促进开花, 可能与田间自然开花存在一定差异, 这种差异对研究结果是否产生影响还有待于进一步的研究。

参考文献:

- 1 Norioka N, Norioka S, Ohnishi Y, et al. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J. Biochem.*, 1996, 120 (2): 335 ~ 345
- 2 Zhang S L, Hiratsuka S. Variations in S-protein levels in styles of Japanese pears and the expression of self-incompatibility. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 1999, 68 (5): 911 ~ 918
- 3 张绍铃, 平塚伸, 徐国华, 等. 梨自交不亲和及其亲和突变品种花柱内 S_4 (S_4^{SM}) 基因表达与作用的比较. *植物学报*, 2001, 43 (11): 1172 ~ 1178
- 4 McCubbin A G, Kao T H. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2000, 16: 333 ~ 364
- 5 Snowman B N, Kovar D R, Shevchenko G, et al. Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell*, 2002, 14: 2613 ~ 2626
- 6 Zhang S L, Hiratsuka S. Analysis of varietal differences in self- and cross-incompatibility reactions of Japanese pears using stylar culture technique. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 1999, 68 (2): 373 ~ 383
- 7 Wheeler M J, Franklin-Tong V E, Franklin F C H. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytologist*, 2001, 151: 565 ~ 584
- 8 徐国华, 张绍铃, 张超英, 等. 梨自花及异花授粉后花粉胞内游离 Ca^{2+} 分布的变化. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29 (2): 97 ~ 103

The Variation of Style Auto-fluorescence after Self- and Cross-pollination in *Pyrus serotina* Rehd.

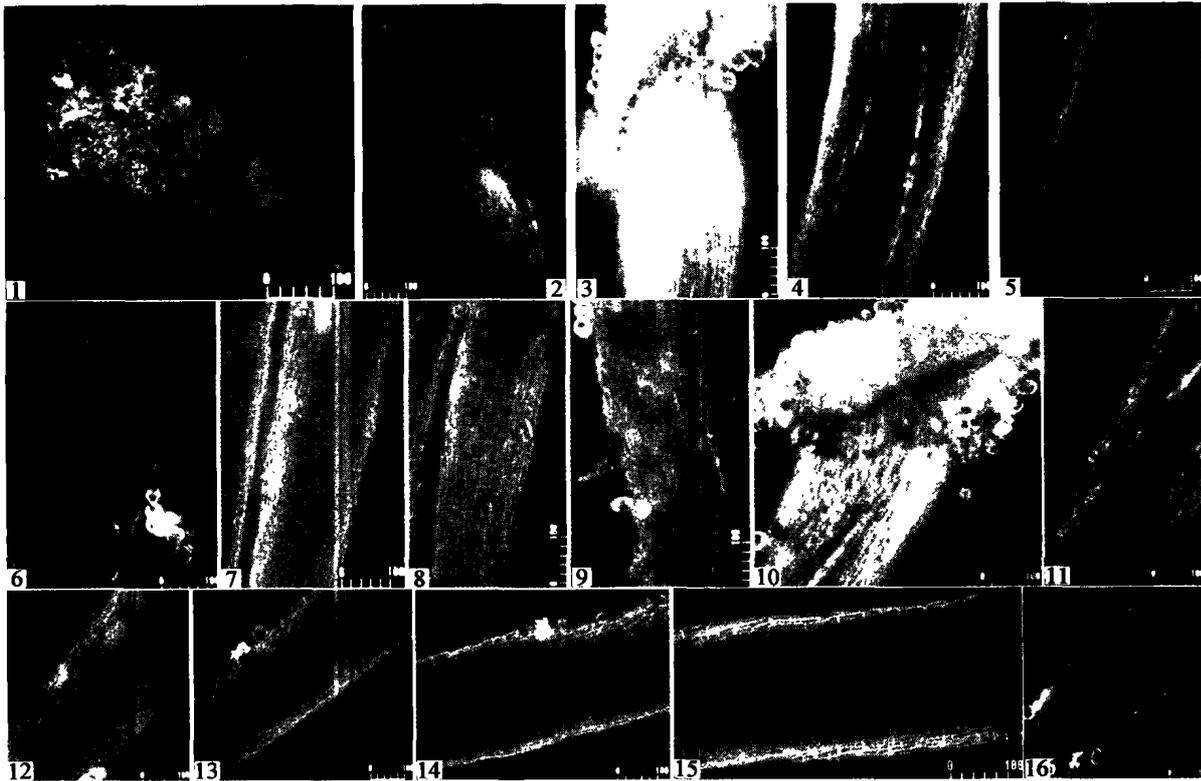
Xu Guohua¹, Zhang Shaoling¹, Zhang Chaoying², and Chen Dixin¹

(¹ College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The variations of style auto-fluorescence after self- and cross-pollination in *Pyrus serotina* Rehd. were studied with laser scanning confocal microscope (LSCM). The pollination combinations were as follows: 'Housui' (S_3S_5) (♀) \times 'Housui' (♂) and 'Housui' \times 'Nijiseiki' (S_2S_4). The style auto-fluorescence increased after pollination and the most remarkable increases occurred in the stigma and the area 0 - 400 μm down (total length of style is about 3700 μm). After self-pollination, with a rapid decline of auto-fluorescence from stigma to 950 μm down, there was almost no variation from 950 μm to the end of style. But a visible climbing of auto-fluorescence can be detected from 950 μm to the end of style after cross-pollination. Results also showed that there were differences of style auto-fluorescence distribution between self- and cross-pollination treatments. All treatments proved that in the upper half of the style the auto-fluorescence in the parietal part was stronger than that in the middle part and so did that in the lower part after self-pollination. But after cross-pollination the auto-fluo-

rescence was relatively evenly distributed in the lower half of the style. All above indicated that, with LSCM, visible changes in the style after various pollination treatments can be detected and thus another method to study the self-incompatibility in vivo or semi in vivo can be established.

Key words: *Pyrus serotina* Rehd.; Self-pollination; Cross-pollination; Style; Auto-fluorescence; Laser scanning confocal microscope



图版说明: 花柱各部分的自发光图 1. 授粉前柱头及其下 0~400 μm 花柱; 2. 授粉前花柱近子房端; 3~9. 异花授粉后花柱各部 (3. 柱头及柱头下 0~400 μm ; 4. 距柱头 400~950 μm ; 5. 950~1500 μm ; 6. 1500~2050 μm ; 7. 2050~2600 μm ; 8. 2600~3150 μm ; 9. 3150~3700 μm); 10~16. 自花授粉后花柱各部 (10. 柱头及柱头下 0~400 μm ; 11. 距柱头 400~950 μm ; 12. 950~1500 μm ; 13. 1500~2050 μm ; 14. 2050~2600 μm ; 15. 2600~3150 μm ; 16. 3150~3700 μm)。箭头所示为未萌发花粉。

Explanation of plates: The auto-fluorescence of each part of style 1. Unpollinated stigma and 0~400 μm down; 2. Style adjacent to ovary; 3~9. Auto-fluorescence of each part of style after cross-pollination (3. Stigma and 0~400 μm down; 4. 400~950 μm ; 5. 950~1500 μm ; 6. 1500~2050 μm ; 7. 2050~2600 μm ; 8. 2600~3150 μm ; 9. 3150~3700 μm); 10~16. Auto-fluorescence of each part of style after self-pollination (10. Stigma and 0~400 μm down; 11. 400~950 μm ; 12. 950~1500 μm ; 13. 1500~2050 μm ; 14. 2050~2600 μm ; 15. 2600~3150 μm ; 16. 3150~3700 μm). Arrows point to the pollen grain.

新书推荐

《中国木本植物种子》

全书共收集 492 属、1276 个种 (含变种和亚种)。按属或种简要记述生长习性、分布、用途和开花结实特点; 着重描述果实的采收、种子调制、种子储藏、发芽前的种子处理、发芽测定、播种等主要生产环节的要点。参与撰稿的多达 70 余人, 均为国内知名学者专家。本书融集体智慧之大成, 汇科学研究之精华, 既总结生产实践的先进经验, 又验之于撰稿人的直接知识; 记载翔实, 描述准确, 数据来自于实际。每个属或种均配有种子外观图和剖视图, 种子发芽进程图。具有先进性、科学性和实用性, 可供植物工作者、园林工作者、院校师生以及基层技术人员、行政管理人员参考。

定价: 200.00 元 (含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。