

# 百合授粉亲和性与雌蕊中保护酶和激素的关系

杨晓苓, 杨利平\*, 尚爱芹, 刘凤栾

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

**摘要:** 对百合自交和杂交授粉过程中花粉在雌蕊上的生长动态进行了荧光观察, 并对雌蕊内保护酶和內源激素变化进行了比较分析。结果表明, 自交亲和、杂交不亲和授粉均引起了保护酶、內源激素的协同作用, 并随花粉萌发生长而变化。高水平的 SOD、POD 与 IAA、GA<sub>3</sub> 和 ZR 有利于亲和花粉与柱头的识别黏附及萌发 (授粉后 1~3 h), 且在此阶段 SOD、POD 活性变化与 IAA、GA<sub>3</sub> 和 ZR 的合成趋势相似。不亲和授粉雌蕊中 ABA 始终高于自交授粉, 说明高水平的 ABA 与杂交不亲和授粉相关。

**关键词:** 百合; 自交授粉; 杂交授粉; 花粉发育; 保护酶; 內源激素

**中图分类号:** S 682.2; Q 945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 06-0855-06

## Relationship Between Protective Enzymes, Endogenous Hormones in Pistil and Pollination Compatibility of *Lilium*

YANG Xiao-ling, YANG Li-ping\*, SHANG Ai-qin, and LIU Feng-luan

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** In this paper, the development of pollen was observed under fluoroscope, the dynamic changes of protective enzymes and endogenous hormones in pistil were studied during self-pollination and cross-pollination of *Lilium* 'Snow Queen'. The results showed that the co-changes of protective enzymes and endogenous hormones were caused by pollination compatibility, which varied with pollen development. The high level of SOD and POD and the contents of IAA, GA<sub>3</sub> and ZR were beneficial to compatible pollen adhesion and germination (1-3 h after pollination), the activities of SOD and POD had a similar tendency with the contents of IAA, GA<sub>3</sub> and ZR during this stage. The content of ABA of cross-pollination was higher than that in self-pollination, indicating that the high level of ABA was related with cross-incompatibility.

**Key words:** *Lilium*; self-pollination; cross-pollination; pollen development; protective enzymes; endogenous hormones

受精过程分为花粉在柱头上萌发, 花粉管进入柱头, 进入到花柱道, 进而达到胚珠和胚囊几个阶段 (孟金陵, 1995)。而受精作用能否完成受多方面因素的影响, 其中受精前信号能否被有效传导是花粉管顺利进入胚囊完成受精的关键所在 (吴能表等, 2004)。百合远缘杂交育种中, 受精前障碍普遍存在, 其主要表现是花粉在异种柱头上不萌发, 或者虽然能萌发, 但花粉管在母本柱头内不能正常生长到达胚珠 (郝瑞娟等, 2007)。对于百合受精前障碍的研究, 主要集中在切割柱头或花柱、涂抹激素或盐溶液、花粉诱导、重复授粉等克服措施方面 (黄济明, 1983; 杨利平等, 1997; van Creijl et al, 2000; 罗凤霞等, 2005; 陈琼等, 2007)。而有关不亲和授粉引起的雌蕊中保护酶系统以及激素的协同作用机制, 在百合中尚未见报道。有研究表明亲和与不亲和授粉处理, 在兰州百合 (*Lilium davidii* var. *unicolor*) 上, 蕾期授粉或自花授粉与不授粉的对照相比, 雌蕊的鞣醌含量无显著

收稿日期: 2008-11-11; 修回日期: 2009-05-11

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2008000265)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ylp1962@yahoo.com.cn)

差别, 鞣酮只参与雄配子体的发育和花粉的萌发, 但与受精的选择性无关 (杨中汉等, 1994); 在甘蓝 (*B. massica oleracea*) 和芸芥 (*Enuca sativa*) 中, 柱头的保护酶和蛋白质含量均呈上升趋势 (吴能表等, 2004; 王保成等, 2006); 梨属中, 花柱内的内源激素也呈上升趋势, 且杂交授粉激素含量始终高于自交授粉 (齐国辉等, 2007)。因此, 本研究中结合荧光显微镜法观测花粉管行为, 研究百合自交亲和与杂交不亲和授粉后, 雌蕊中保护酶以及内源激素的动态变化, 旨在阐明保护酶、内源激素与亲和性的关系, 以期为百合杂交育种克服受精前障碍提供有利的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以河北农业大学花卉温室栽植的自交亲和的麝香百合品种 ‘Snow Queen’ (雪皇后) 为母本 (罗建让等, 2006), 野生细叶百合 (*Lilium pumilum*) 为父本, 进行自交和杂交授粉。

开花前 3 d 进行去雄, 套袋。开花当天 9: 00—10: 00, 柱头分泌大量粘液时常规人工授粉, 授粉后继续套袋。

### 1.2 柱头花粉管行为荧光观察

取未授粉和授粉后 1、3、5、8、24 和 96 h 的雌蕊, 每个处理 5~10 朵花。FAA 固定 24 h 以上, 转移到 70% 的酒精 4 保存, 蒸馏水冲洗后, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液 60 恒温软化 20 min, 蒸馏水冲洗数次, 0.1% 的苯胺蓝 ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  缓冲液) 染色 20 min 以上, 压片, 利用 LEICA DM 2500-3HF-FL 荧光显微镜观察、照相。

### 1.3 酶活性和激素含量测定

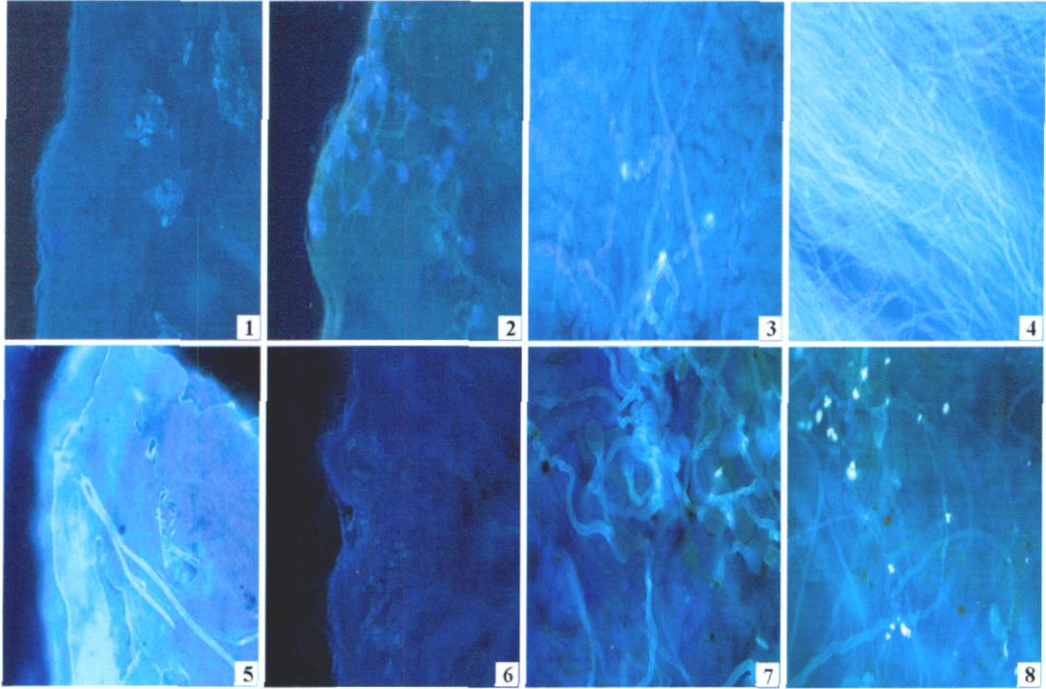
取未授粉和授粉后 1、3、5、8、24 h 的雌蕊, 每个处理 3 朵花, 重复 3 次。液氮速冻并置于 -70 冰箱内储存。采用氮蓝四唑 (NBT) 光还原法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 愈创木酚法测定过氧化物酶 (POD) 活性 (李合生, 2003) (略有改动)。采用酶联免疫法 (ELISA) 测定生长素 (IAA)、赤霉素 ( $\text{GA}_3$ )、玉米素核苷 (ZR) 和脱落酸 (ABA) 含量 (李宗霆和周燮, 1996), 由中国农业大学农学与生物技术学院完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 自交与杂交授粉后花粉在雌蕊上的生长动态

自交授粉后 1 h, 在雌蕊柱头上没有观察到黏附的花粉粒 (图版, 1), 推测 1 h 内花粉与柱头之间黏附作用还没有完成, 未能牢固附着的花粉粒在试验过程中被洗掉。由此表明, 授粉 1 h, 花粉与柱头的黏附作用只发生到黏附吸胀时期, 还没有进行到花粉管伸出阶段, 因为花粉管伸出时花粉束缚作用很强, 即使用碱水浸洗柱头, 也难将花粉洗掉 (胡适宜, 1982)。授粉后 3 h, 花粉大量萌发 (图版, 2)。授粉 5~8 h, 花粉管伸长到柱头乳突细胞间 (图版, 3)。授粉后 24 h, 大量花粉管穿过柱头成束状进入花柱道中 (图版, 4)。授粉后 96 h, 观察到有花粉管生长到花柱道的 2/3 处 (图版, 5)。

杂交授粉后 1 h, 同自交情况相似, 柱头上并未观察到花粉粒黏附 (图版, 6)。授粉后 3 h, 花粉管在柱头表面大量萌发 (图版, 7)。授粉后 5~96 h, 观察到的花粉管动态基本相同, 即花粉管伸长生长到柱头的乳突细胞间, 但只停滞在其中, 并未观察到再向柱头内部生长的现象 (图版, 8)。而有研究表明, 不亲和授粉后 10 h, 大量形态正常的花粉管束即可穿进花柱 (刘春等, 2006); 30 h 后, 大量花粉管已经伸入到花柱组织中深达 1.45 cm, 授粉后 48~51 h 内花粉管停止生长 (王文和等, 2007)。可能由于杂交组合不同, 从而导致花粉管在柱头上的萌发和生长行为有所差异。



图版说明：1~5：‘Snow Queen’自交亲和授粉后 1、3、5~8、24、96 h花粉在雌蕊上的发育；6~8：‘Snow Queen’×细叶百合不亲和授粉后 1、3、5~96 h花粉在雌蕊上的发育。

**Explanation of plates:** 1 - 5: Pollen development of ‘Snow Queen’ 1, 3, 5 - 8, 24, 96 h after self-compatibility pollination; 6 - 8: Pollen development of *Lilium pumilum* 1, 3, 5 - 96 h after cross-incompatibility pollination

### 2.2 自交与杂交授粉后雌蕊中酶活性动态变化

如图 1 所示，花粉与柱头识别和花粉萌发阶段（授粉 3 h 内），自交授粉雌蕊中 SOD 活性呈上升趋势，此后一直下降。杂交授粉雌蕊中 SOD 活性在花粉与柱头识别阶段（授粉 1 h）下降，在授粉 1~5 h 呈上升趋势，5~8 h 下降，8~24 h 再次上升。

如图 2 所示，自交授粉雌蕊中 POD 活性在授粉 3 h 内呈上升趋势，3~5 h 随即下降，5~24 h 保持上升趋势。杂交授粉雌蕊中 POD 活性在花粉与柱头识别阶段（授粉 1 h）下降，在授粉 1~5 h 呈上升趋势，8 h 和 24 h 下降。

授粉 3 h 内，自交授粉雌蕊中 SOD、POD 活性分别高于杂交授粉雌蕊。表明高活性的 SOD、POD 有利于亲和花粉与柱头识别及花粉萌发。在花粉与柱头识别及黏附阶段（授粉 1 h），自交授粉雌蕊

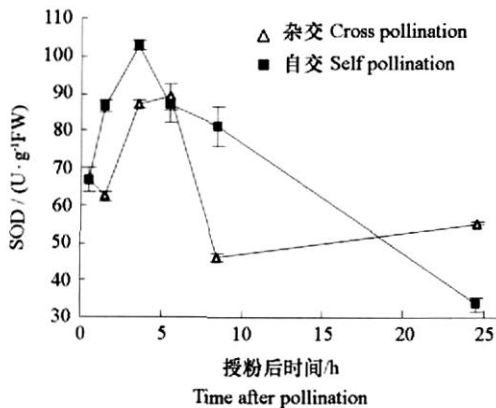


图 1 百合雌蕊中 SOD 活性的变化  
Fig. 1 Changes of SOD activity in pistil of *Lilium*

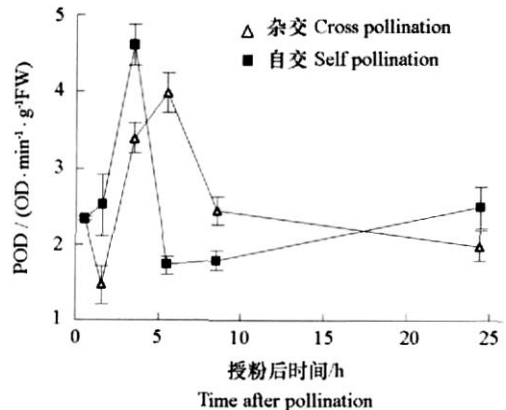


图 2 百合雌蕊中 POD 活性的变化  
Fig. 2 Changes of POD activity in pistil of *Lilium*

中 SOD、POD 活性上升，而杂交授粉雌蕊中 SOD、POD 活性下降，表明在此阶段亲和授粉提高了 SOD、POD 活性，而不亲和授粉抑制了其活性。

### 2.3 自交与杂交授粉后雌蕊中内源激素含量的变化

#### 2.3.1 IAA、GA<sub>3</sub>、ZR 含量变化

如图 3、图 4、图 5 所示，IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 的变化趋势相似，在花粉黏附、萌发阶段（授粉后 3 h 内）自交授粉雌蕊中的 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 含量一直高于杂交，而授粉后 5~24 h 低于杂交，表明在黏附和萌发阶段，高水平的 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 对亲和花粉是有利的，而在乳突细胞及花柱道生长阶段需要低水平的 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR。

自交授粉雌蕊中 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 含量在花粉与柱头识别、黏附到大量萌发时期（授粉后 1~3 h）均呈上升趋势，但随着花粉管生长到乳突细胞进入柱头组织阶段（3~8 h）突然下降，在花粉管进入到花柱组织后（授粉后 24 h），表现略上升的趋势。而杂交雌蕊在授粉后 1 h，IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 含量下降，3~8 h 呈上升态势，8 h 和 24 h 基本上无变化。这与荧光观察到的 8~24 h 花粉管一直都停留在柱头组织中不继续生长现象较为吻合。

#### 2.3.2 ABA 含量变化

在花粉黏附萌发、花粉管生长阶段，ABA 含量变化与 IAA、GA、ZR 含量变化呈相反的趋势。自交雌蕊在授粉后 1~3 h 内明显下降，随即上升。8 h 时达到高峰，24 h 又再次下降（图 6）。杂交雌蕊在授粉 1 h 时 ABA 含量上升，随即在 3 h 下降到最低点，继而上升，在 8 h 时达到最高点，24 h 明显下降。杂交雌蕊的 ABA 含量始终高于自交雌蕊。由此可见，高水平的 ABA 可能与不亲和性相关。

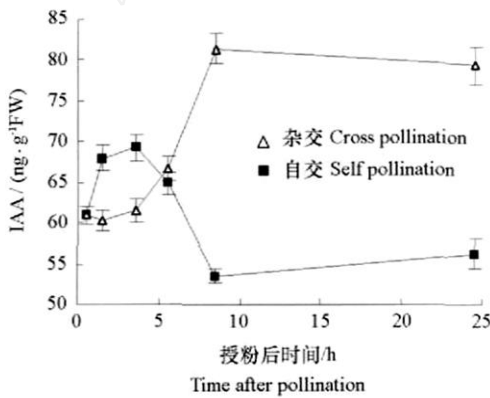


图 3 百合雌蕊中 IAA 含量变化

Fig. 3 Changes of IAA content in pistil of *Lilium*

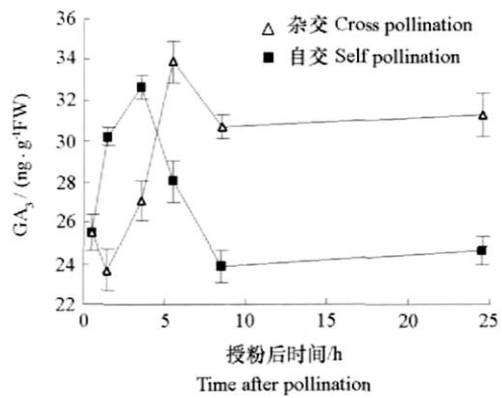


图 4 百合雌蕊中 GA<sub>3</sub> 含量变化

Fig. 4 Changes of GA<sub>3</sub> content in pistil of *Lilium*

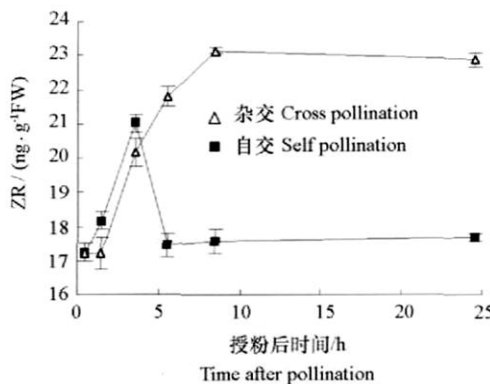


图 5 百合雌蕊中 ZR 含量变化

Fig. 5 Changes of ZR content in pistil of *Lilium*

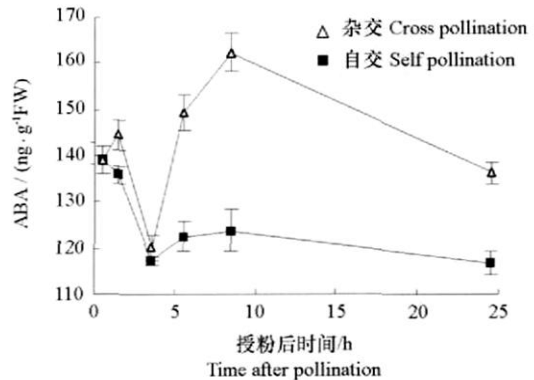


图 6 百合雌蕊中 ABA 含量变化

Fig. 6 Changes of ABA content in pistil of *Lilium*

### 3 讨论

#### 3.1 自交授粉、杂交授粉与雌蕊中酶活性的关系

研究表明, SOD、POD 两种酶活性的变化与亲和基因的调控有关(王保成等, 2006)。授粉可以使 SOD、POD 活性显著上升, 而且亲和授粉的酶活性显著高于不亲和授粉(吴能表等, 2004)。本研究中, 自交和杂交授粉, 只在花粉黏附、萌发阶段(授粉后 3 h 内) SOD、POD 两种酶活性的变化趋势大体相似, 而亲和授粉的酶活性明显高于不亲和授粉, 表明在此阶段亲和机制及亲和基因的调控在 SOD、POD 的活性变化上表现的较为明显, 与前人研究结果一致。

#### 3.2 自交授粉、杂交授粉与雌蕊中内源激素的关系

内源激素与花粉柱头识别及萌发生长关系密切。IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 是植物体内重要的信号物质, 可调节植物的多种生命活动, 梨花柱中高水平的 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 有利于授粉受精正常进行, 花柱中低水平的生长促进物质 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 使自交不亲和和不结实(齐国辉等, 2007; 许明等, 2007)。而百合杂交雌蕊在花粉黏附、萌发生长到停滞在柱头组织阶段(授粉后 1~5 h), IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 含量一直处于上升阶段, 而且在 5 h 以后含量都高于自交授粉的雌蕊。是否说明柱头在抑制不亲和花粉生长时, 启动了另外的反应系统, 引起了激素含量的上升, 其原因尚待进一步研究。

#### 3.3 酶活性与内源激素的关系

研究表明, POD、ABA 和较低含量的 IAA 可能在一定程度上抑制花粉的萌发, 培养基中一定浓度 GA<sub>3</sub>促进花粉萌发生长(杨晓玲等, 2003)。而本研究中发现, 在花粉萌发阶段(授粉后 1~3 h), 自交授粉雌蕊中 SOD、POD 以及 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 含量都高于杂交雌蕊, 且分别都呈上升趋势, 表明上述酶和激素促进花粉萌发, 而高水平的 SOD、POD 以及 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 利于亲和花粉的萌发。

酶活性一般受激素水平及激素间平衡的调控。在花粉与柱头识别、花粉萌发阶段(授粉后 3 h), 自交、杂交雌蕊的 SOD、POD 与 IAA、GA<sub>3</sub>和 ZR 变化趋势相似而与 ABA 变化趋势相反, 表明在此阶段激素的合成与酶活性的变化同步。而在此后酶活性变化与激素变化不同步, 是否有其他激素合成或酶参与了反应调控尚需探讨。

### Reference

- Chen Qiong, Mu Ding, Yi Ming-fang, Ming Jun, Liu Chun. 2007. Effects of different pollination methods on bypassing pre-fertilization barriers in lily breeding. *Journal of China Agricultural University*, 12 (4): 35 - 40. (in Chinese)
- 陈琼, 穆鼎, 义鸣放, 明军, 刘春. 2007. 不同授粉方法对克服百合杂交受精前障碍的作用. *中国农业大学学报*, 12 (4): 35 - 40.
- Hao Rui-juan, Mu Ding, Wang Zhou-feng. 2007. A preliminary study on the methods of prevention pre-crossing and post-crossing barriers of *Lilium longiflorum*. *Journal of Yanan University: Natural Science Edition*, 26 (1): 59 - 61. (in Chinese)
- 郝瑞娟, 穆鼎, 王周锋. 2007. 克服麝香百合受精前后障碍方法的初步研究. *延安大学学报: 自然科学版*, 26 (1): 59 - 61.
- Huang Jiming. 1983. Use of cut-style and embryo culture in cultivating lily hybrid. *Seed*, (3): 24 - 27. (in Chinese)
- 黄济明. 1983. 采用切割花柱和幼胚离体培养方法培育百合种间远源杂交种. *种子*, (3): 24 - 27.
- Hu Shi-yi. 1982. *Embryology of angiosperm*. Beijing: People's Education Press (in Chinese)
- 胡适宜. 1982. *被子植物胚胎学*. 北京: 人民教育出版社.
- Li He-sheng. 2000. *Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment*. Beijing: Higher Education Press (in Chinese)
- 李合生. 2003. *植物生理生化实验原理和技术*. 北京: 高等教育出版社.
- Li Zong-ting, Zhou Xie. 1996. *Phytohormone and immunoassay*. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press (in Chinese)
- 李宗霆, 周燮. 1996. *植物激素及其免疫检测技术*. 南京: 江苏科学技术出版社.
- Liu Chun, Mu Ding, Ming Jun, Dong Ling. 2006. The pre-fertilization barriers research of *Lilium* interspecific hybridization. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 653 - 656. (in Chinese)

- 刘春, 穆鼎, 明军, 董玲. 2006. 百合种间杂交受精前障碍的研究. 园艺学报, 33 (3): 653 - 656
- Luo Feng-xia, Nian Yu-xin, Sun Xiao-mei, Li Zhi-hui, Wang Xian. 2005. Influences on seed formation of different hybrid combinations in cut flower lilies by four pollination techniques. Acta Horticulturae Sinica, 32 (4): 729 - 731. (in Chinese)
- 罗凤霞, 年玉欣, 孙晓梅, 李智辉, 王贤. 2005. 4种授粉方法对切花百合不同杂交组合结籽量的影响. 园艺学报, 32 (4): 729 - 731.
- Luo Jian-rang, Niu Li-xin, Zhang Yan-long, Han Feng-ming. 2006. Study on cross compatibility of several *Lilium* species and cultivars. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 15 (2): 112 - 116. (in Chinese)
- 罗建让, 牛立新, 张延龙, 韩凤鸣. 2006. 百合野生种及品种交配亲和性的研究. 西北农业学报, 15 (2): 112 - 116.
- Meng Jin-ling. 1995. Plant reproductive genetics. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 孟金陵. 1995. 植物生殖遗传学. 北京: 科学出版社.
- Qi Guo-hui, Xu Ji-zhong, Zhang Yu-xing. 2007. Relationship between endogenous hormones in style and self-incompatibility of Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). Journal of Agricultural University of Hebei, 30 (1): 31 - 34. (in Chinese)
- 齐国辉, 徐继忠, 张玉星. 2007. 鸭梨自交不亲和性与花柱内源激素关系的研究. 河北农业大学学报, 30 (1): 31 - 34.
- van Creijl GM, Kerck Hoffs DM F J, van Tuly JM. 2000. Application of four pollination techniques and of hormone treatment for bypass interspecific crossing barriers in *Lilium* L. Proc Cadic Acta Hort, 508: 267 - 274.
- Wang Bao-cheng, Sun Wan-cang, Fan Hui-ling, Meng Ya-xiong, Ma Jing-fang, Ye Jian, Liu Ya-li, Shao Deng-kui, Yan Ni, Zhu Hui-xia, Wu Jun-yan, Zeng Jun, Zhang Ya-hong. 2006. Studies on SOD, POD and CAT activity between self-compatible and self-incompatible lines in *Enuca sativa* Mill. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 28 (2): 848 - 851. (in Chinese)
- 王保成, 孙万仓, 范惠玲, 孟亚雄, 马静芳, 叶剑, 刘雅丽, 邵登魁, 燕妮, 朱惠霞, 武军艳, 曾军, 张亚宏. 2006. 芸芥自交亲和系与自交不亲和系 SOD、POD和CAT酶活性. 中国油料作物学报, 28 (2): 848 - 851.
- Wang Wen-he, Wang Shu-dong, Zhao Xiang-yun, Li Xiao-ying, Yu Jian-jun, Chen Zhi-huan. 2007. Process of pollen sprouting and pollen tube growth on the lily distant hybridization. Acta Agriculturae Boreali-occidentalia Sinica, 27 (9): 1790 - 1794. (in Chinese)
- 王文和, 王树栋, 赵祥云, 李小英, 于建军, 陈之欢. 2007. 百合远缘杂交花粉萌发及花粉管生长过程观察. 西北植物学报, 27 (9): 1790 - 1794.
- Wu Neng-biao, Xu Guang-de, Tang Yu-ting, Zhu Li-quan, Wang Xiao-jia. 2004. Pollen germination and change of protective enzyme activity in style of self incompatible *B. brassica oleracea*. Journal of Southwest China Normal University: Nat Sci Edi, 29 (5): 848 - 851. (in Chinese)
- 吴能表, 徐光德, 唐于婷, 朱利泉, 王小佳. 2004. 自交不亲和和甘蓝的花粉萌发与花柱内保护酶活性变化. 西南师范大学学报: 自然科学版, 29 (5): 848 - 851. (in Chinese)
- Xu Ming, Bai Ming-yi, Wei Yu-tang. 2007. Changes in endogenous hormone between *B. campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea* Hort CMS lines and their maintainer line at different development stages. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 16 (3): 124 - 127, 135. (in Chinese)
- 许明, 白明义, 魏毓棠. 2007. 紫菜薹细胞质雄性不育系及其保持系在不同发育时期内源激素的变化. 西北农业学报, 16 (3): 124 - 127, 135.
- Yang Liping, Ma Xian-hong, Ding Bing, Zhang Xiao-fang. 1997. Cultivation of hybrid species in genus *Lilium* flowers. Journal of Northeast Forestry University, 25 (1): 29 - 32. (in Chinese)
- 杨利平, 马宪红, 丁冰, 张方. 1997. 百合花卉种间杂交种的培育. 东北林业大学学报, 25 (1): 29 - 32.
- Yang Xiao-ling, Guo Shou-hua, Zhang Jian-wen, Zhang Jin-xia. 2003. Relations between fertilization ability and physiological and biochemical characteristics of hawthorn's pollen and pistil. Scientia Silvae Sinicae, 39 (5): 24 - 28. (in Chinese)
- 杨晓玲, 郭守华, 张建文, 张金霞. 2003. 山楂受精能力与其花和雌蕊生理生化特性的关系. 林业科学, 39 (5): 24 - 28.
- Yang Zhong-han, Tang Yin, Cao Zong-xun. 1994. The changes of steroidal sex hormone - testosterone contents in reproductive organs of *Lilium davidii* Duch. Acta Botanica Sinica, 36 (3): 215 - 220. (in Chinese)
- 杨中汉, 唐因, 曹宗巽. 1994. 兰州百合生殖器官中睾酮含量的变化. 植物学报, 36 (3): 215 - 220.