

小叶杨×旱柳属间杂交 实验胚胎学研究*

徐 涵** 李文钿

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 旱柳花粉能够萌发，花粉管能进入小叶杨柱头。受精过程基本正常。杂交障碍主要表现在：花粉管在花柱基部生长受阻；花粉管在子房腔中缠绕；受精频率低；胚和胚乳发育不协调，胚出现异常发育、停滞发育和败育现象。本文支持以不协调性模型解释杂交障碍的机制。报道了旱柳和小叶杨属间杂交原胚期胚珠培养的成功。

关键词 小叶杨；旱柳；杂交；胚珠培养

杨属和柳属树种是重要的造林树种，根据前人育种工作，此两属间杂交极难成功，但杂交障碍情况不明。本文以小叶杨(*Populus simonii*)和旱柳(*Salix matsudana*)为材料，对杂交胚胎学问题进行探讨，以期揭示杂交障碍，并寻求克服障碍的途径。

一、材料和方法

小叶杨雌枝和旱柳雄枝均采自北京西郊，按常规杂交育种法进行人工杂交^[1~2]。授粉时室温25℃。花柱枯萎后将隔离袋脱去。从授粉至果实成熟，温室日平均温度25℃，夜平均温度10℃。

石蜡切片厚8μm，苏木精固绿或PAS苏木精染色，荧光及扫描电镜方法同以往报道^[2]。胚和胚珠培养以MS或1/2MS为培养基，培养温度25±2℃，日光灯补充照明12h/天。

二、观察结果

(一) 对亲本特性的观察

1. 小叶杨和旱柳雌蕊和花粉的比较(表1)

2. 旱柳花粉的活力检验 用离体萌发率表示花粉活力，培养温度与杂交授粉时的温度均为25℃。统计不同条件下培养花粉的平均萌发率、萌发速度和平均生长速度。实验表明，旱柳花粉在2.5%~7.5%纯蔗糖液中就可萌发，5%最适；pH4~9，以pH7最适，授

本文于1989年5月12日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。扫描电镜工作承徐炳文先生协助，谨致谢意。

** 本文由徐涵硕士论文修改而成。徐涵现在地址：中国科学技术出版社。

表 1 小叶杨和旱柳雌蕊和花粉有关性状的比较

性 状	小 叶 杨	旱 柳
雄蕊长度 ^①	1 800 μm	1 600 μm
心皮数	2	2
胚珠	倒生，平均10枚 ^②	倒生，4枚
胎座式	侧膜	基底
柱头	2裂，接受面大，接受面细胞圆顶状	4裂，接受面小，接受面细胞乳突状
花柱	短、实心，分离；基部组织排列紧密并贮藏组织化	较短、实心，合生，组织排列疏松
珠被数	1	1
珠心	厚珠心	厚珠心
胚囊	蓼型	蓼型
成熟花粉	圆球型，无沟无孔，颗粒纹饰，平均直径 28.1 μm ^[3]	椭圆球状，三沟，网状纹饰，平均直径15.93 μm ^③
传粉媒介	风媒	虫媒

①20个雄蕊的平均值；②20个子房的平均值；③100个花粉的平均值。

粉前按上述条件确定花粉活力，活力<90%的不用于杂交授粉。

3. 种内授粉对照

旱柳×旱柳 授粉后半小时花粉水合膨胀，部分开始萌发。授粉后1 h，绝大多数花粉萌发。授粉后2 h，大量花粉管进入柱头。花粉管在柱头上很少爬行，一般生长不超过30 μm即进入柱头。花粉管在子房腔中生长相对平直，子房内胚珠一般都能发育为种子。

小叶杨×小叶杨 对种内传粉的胚胎学研究已有报道^[3]。本实验对所采小叶杨雌株的自然传粉子房进行了统计，平均每子房含饱满种子10枚。

(二) 小叶杨×旱柳花粉管行为

旱柳花粉在小叶杨柱头上都能水合，授粉后1 h(1 HAP)开始萌发，2 HAP萌发达最大值，并大量向柱头内生长。萌发率60%(花粉活力90%)，进入柱头的花粉管数占授粉量的30%~40%。部分花粉管在柱头表面爬行、扭曲，不能进入柱头。柱头无胼胝质反应。5 HAP花粉管达花柱基部，21.5 HAP花粉管开始进入子房(图版I-4, 5, 7)。

大量花粉管到达花柱基部后停滞不前，管内沉积胼胝质，只有少量花粉管能够进入子房，这与旱柳和小叶杨种内传粉的情形迥异。对小叶杨和旱柳花柱基部进行解剖比较，发现旱柳花柱组织疏松，花柱较短(图版I-3)，小叶杨花柱较长，花柱组织较紧密，子房腔在花柱基部稍有延长(图版I-1)，腔壁为一层排列紧密的表皮细胞，这层表皮细胞及附近的花柱细胞贮藏组织化，富含淀粉粒(图版I-2)。

除个别花粉管在30 HAP到达距花柱最近的胚珠外，一般是在57~94 HAP进入子房腔。在观察的近100个子房中，只有约一半出现花粉管(图版I-7)。进入子房腔的花粉管又有一些在子房腔上方缠绕，不能向胚珠生长(图版I-6)。已接近胚珠的花粉管生长平滑，在珠孔旁可急转弯向珠孔生长(图版I-8, 9)。

(三) 杂交受精作用和胚与胚乳的发育

受精作用发生在授粉后第8天。出现受精作用的子房，一般进入子房腔的花粉管有限，

达4~6条，而且有时部分花粉管在子房腔上部缠绕。由于进入子房的花粉管有限，绝大多数胚囊没有机会接受花粉管，因而受精频率很低；但如果花粉管进入胚囊，受精作用可正常进行(图版Ⅱ-1~4)。

一般初生胚乳核比合子早3天分裂，授粉后11天(11 DAP)出现2细胞原胚(图版Ⅱ-5)。杂种胚多在13~15 DAP发育到球形期，但有些胚已发育到心形期至鱼雷期，而有的只处于2细胞期或合子期。在合子期至心形期，杂种胚出现败育(图版Ⅲ-2, 3)和异常现象(图版Ⅱ-6~8)。在鱼雷期一些胚的子叶细胞出现大量小核，多的每细胞5~6个，这些小核分散在细胞质中(图版Ⅲ-4)。

胚乳游离核数在合子期为2~32个，2~3细胞原胚期为7~61个，4~6细胞原胚期为17~66个，7~8细胞原胚期为33~140个。由此可见，在相同的胚发育时期，胚乳游离核的数目差异很大。同时，在授粉后同一天中，各胚囊的胚乳游离核数差异更大，达数十至数百个。

胚乳游离核或细胞在发育期间都能进行正常的有丝分裂(图版Ⅲ-5, 6)。特别是在胚败育时，旁边的胚乳仍可进行正常的有丝分裂(图版Ⅱ-2)。胚乳多核仁的情况时有发生，但胚不因此而败育(图版Ⅱ-9, 10)。胚乳细胞化最早发生在15 DAP，与亲本的时间相同，这时胚处于球形期至鱼雷期，或发育良好，或败育。

在相同条件下，未授粉的小叶杨和旱柳雌花枝都没有任何成熟或发育的果实，花序相继枯萎脱落。该对照显示本实验无花粉污染。

(四) 通过离体培养获得杂种试管苗

在授粉后第11天，以 $1/2\text{MS} + 0.01\text{ mg/L IAA} + 0.1\text{ mg/L BA} + 0.01\text{ mg/L GA}$ 培养基对原胚期杂种胚珠进行培养，100天后获得了5株试管苗(出苗率14.7%)(图版Ⅳ-1~7)。在这一培养中，杂种苗可由两种方式产生：①合子胚长出子叶(图版Ⅳ-3~6)；②下胚轴先伸出并分化芽丛(图版Ⅳ-2)。另有一个芽丛来源不明，是由珠被内直接长出芽丛(图版Ⅳ-1)。无论子叶能否长出，顶芽都不易发育而被下胚轴基部分化的芽丛取代(图版Ⅳ-4~6)。

在杂种胚发育后期的各阶段对胚和胚珠进行离体培养都获得了试管苗，出苗率约49%。附加 0.01 mg/L IAA 、 $0.1\sim 0.4\text{ mg/L BA}$ 和(或) 0.01 mg/L GA 的 $1/2\text{MS}$ 和 MS 培养基对杂种胚和胚珠是普遍适宜的。在近成熟期，培养基不加激素就能满足杂种胚和胚珠的离体生长需要(图版Ⅲ-7~9)。

三、讨 论

(一) 杂交障碍及其克服途径

尽管旱柳花粉在小叶杨柱头上有不能萌发、爬行、盘绕等障碍，但因为大量花粉管可以进入柱头，故杂交的主要障碍不发生在柱头上，而在于：①大量花粉管无力通过花柱。花粉管在花柱中生长速度最初与亲本的情形相似，但在花柱基部受到贮藏组织化的质密区的阻碍。②进入子房的花粉管数不多，而约有一半(有的为全部)花粉管在子房腔上方缠绕成团，进一步减少了受精的机会。③胚停滞发育和败育。本实验对杨属和柳属属间杂交的胚和胚珠进行培养都获得了试管籽苗，这证明胚和胚珠培养是克服杂种胚败育，特别是拯救停滞发育

胚的有效途径。这次对杨属和柳属属间杂交原胚期胚珠培养的成功，使远缘杂交受精后障碍的克服范围提前到了早球形胚期。

(二) 远缘杂交障碍的机制

本实验结果表明：①旱柳花粉管不能大量进入子房或到达胚囊，主要是由小叶杨雌蕊的结构及生理状况与旱柳的差异造成的。只有具足够活力的旱柳花粉管才有可能穿越小叶杨花柱进入子房腔。②杂种胚和胚乳发育不同步的实质是一部分胚或胚乳发育，而另一部分发育迟缓或停止，胚和胚乳各按自己的遗传状况进行其生理进程。虽然上述两个方面障碍的发生位点不同，但都显示了一种不协调关系，即在孢子体与配子体之间、杂种胚与胚乳之间，缺乏协调的匹配关系。

许多研究者发现胚的败育与胚乳有关^[2,4]。在本杂交中，胚乳整体败育极少，胚乳能正常有丝分裂，细胞化的时间也与种内传粉的情形相同，特别是在败育的胚旁可以伴有完全正常的胚乳，因此，本杂交中胚败育的原因不在于胚乳败育而切断了胚的营养，而主要是杂种细胞内远缘基因组的不协调表达，杂种后代自身失去了正常协调的生长代谢功能。杂种胚和胚乳细胞中出现大量小核，这是远缘基因组互相排斥的结果，杂种胚和胚乳发育的不协调是这种基因基础的反映。

在解释远缘杂交障碍，追踪其基因基础时，部分人将解释自交不亲和性的S等位基因模型推延到杂交障碍的解释中^[6]，对此，Hogenboom(1975)提出不同见解，认为远缘杂交障碍的主要机制是不协调性，即由于杂交双方缺乏匹配的遗传信息而被动拒绝，造成杂交无效。识别的不亲和性随着杂交双方亲缘关系的疏远而变为次要的^[6]。本实验结果支持Hogenboom的不协调性模型，但是，认为该理论忽略了植物及其细胞作为一个有机的整体可能发生的随机生理活动对不协调性障碍的影响，同时，该模型也未能解释组培条件可拯救杂种胚的事实。

作为对这一理论的扩展和修改，本文将杂交障碍的“多位点性”和植物体内的“随机过程”引入不协调性理论。多位点性是指杂交障碍在杂交有性过程和杂种F₁代发育中可以在多个位点发生。即在同一个杂交中，杂交障碍在受精前、受精和受精后的诸阶段中能够出现多次，只要存在杂交双方遗传信息不匹配的地方，杂交障碍就可能在那里发生。小叶杨×旱柳的杂交障碍就具有这一性质。随机过程是指当杂交障碍发生时，植物体内可出现某些随机的生理活动。这些活动有些是无益的，有些则对克服障碍有益，能替代或弥补某个缺失基因的功能、或甚至颉颃某个远缘不协调基因的作用，以缓解障碍造成的损失。当障碍发生时，如果体内没有这种保护性随机活动，则有性过程或个体发育就不能继续进行；当这种活动的作用较强时，不协调性就被相应地克服，不再成为杂交的主要障碍。在小叶杨×旱柳的杂交中，旱柳花粉管对扩大了的小叶杨子房腔不适应，生长呈随机状态，但当花粉管在随机生长中进入雌配子体吸引的有效半径时，遂趋向珠孔生长。在受精后障碍中，当杂种胚在发育过程中远缘基因组的表达不能满足胚的发育需要时，有的胚可产生一些保护性随机活动，如甩掉部分不协调的染色体片段(如在杂种胚和胚乳细胞中看到的小核)，或由正常的细胞进行分裂，取代败育的细胞；有的胚则在这一位点无法凭自身或借助胚乳物质克服不协调性，出现发育停滞、趋于败育的情形，这时用离体培养方法提供胚生长的必要物质就成为克服杂种胚败育的重要途径。组织培养可以起类似植物体随机过程的作用，如果培养环境包含了胚发育

所需要的条件，该离体培养就能帮助杂种后代渡过不协调阶段。但这里产生了一个重要的生物技术问题，即由于不协调性的表现形式和出现的阶段各不相同，所以理论上在同一培养条件下，一般不可能使杂种胚全部得到拯救。因此，离体培养所要做的只是：①找到大多数杂种胚发育所需要的培养条件，②扩大杂种败育胚的拯救范围。

参 考 文 献

- [1] 李文卿等，1983，小叶杨与美杨种间杂交的胚胎发育和杂种胚珠的离体培养，植物学报，25(5):409~417。
- [2] 李文卿等，1986，胡杨与小叶杨远缘杂交不亲和性的障碍，林业科学，22(1): 1~9。
- [3] 李文卿等，1982，小叶杨种子发育的胚胎学观察，林业科学，18(2):113~119。
- [4] 胡适宜等，1965，陆地棉和亚洲棉种间杂交的有性过程的观察，植物学报，13(4):314~324。
- [5] Lewis, D. et al., 1958, Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants, *Heredity*, 12: 233~256.
- [6] Hogenboom, N. G., 1975, Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 188: 361~375.

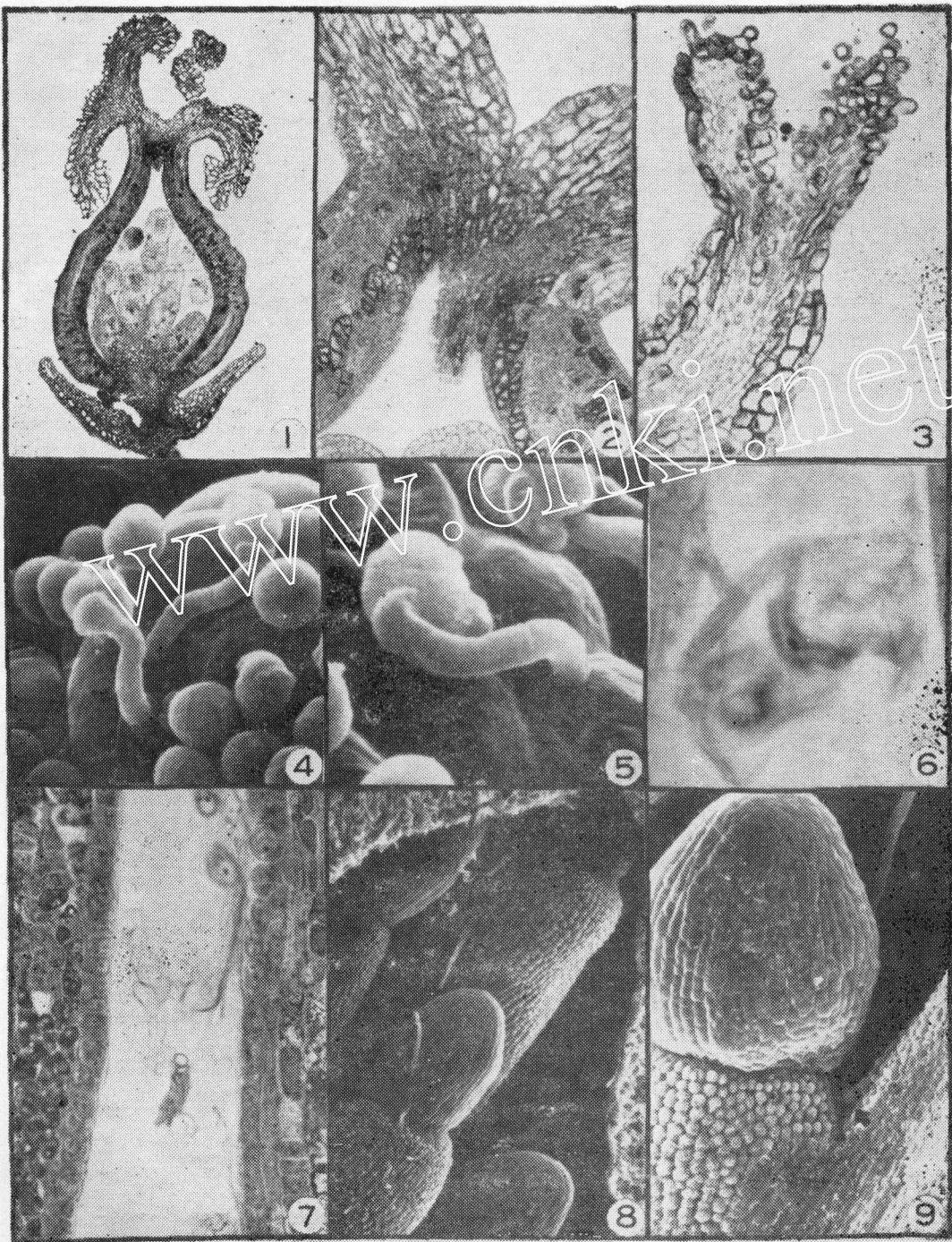
EXPERIMENTAL STUDY ON THE EMBRYOLOGY OF THE INTERGENERIC CROSS BETWEEN *POPULUS* *SIMONII* AND *SALIX MATSUDANA*

Xu Han Li Wendian

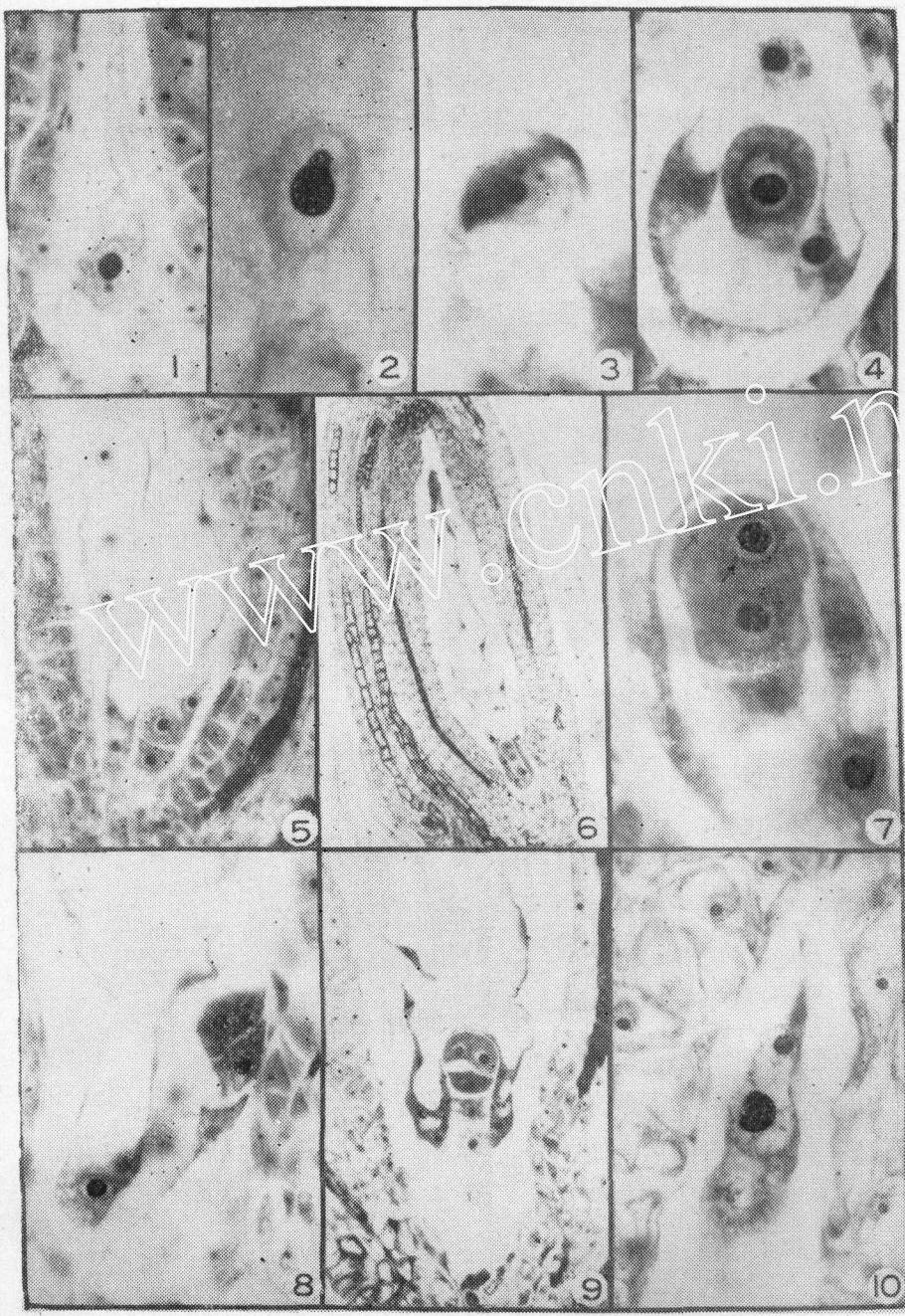
(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract The pollen grains of *Salix matsudana* can hydrate on the stigma of *Populus simonii*. Most of them germinate and many pollen tubes penetrate into the stigma with no serious barriers. The major prefertilization barriers are: ① Most of the pollen tubes cease to grow at the basal part of the style of *P. simonii* in which the stylar cells are arranged more compactly than those of *S. matsudana* and contain a lot of starch grains. ② A large number of the pollen tubes which have entered the ovarian cavity coil and fail to reach the ovules. The frequency of fertilization is very low while the process is somehow normal if it takes place. The postfertilization barriers are: the development of some hybrid embryos appears abnormal and the incongruity between the hybrid embryos and their endosperms is quite obvious. Some hybrid embryos even abort before maturation. *In vitro* culture of immature embryos or ovules is proved to be effective to overcome postfertilization barriers. A successful culture of the 11th DAP ovules containing proembryos has been done and it is the first report that in a woody-plant intergeneric hybridization, the hybrid ovules at proembryo stage can be cultured into seedlings. The model for incongruity is discussed here. As an improvement, the concepts of random process and polyplacidity are introduced into the model.

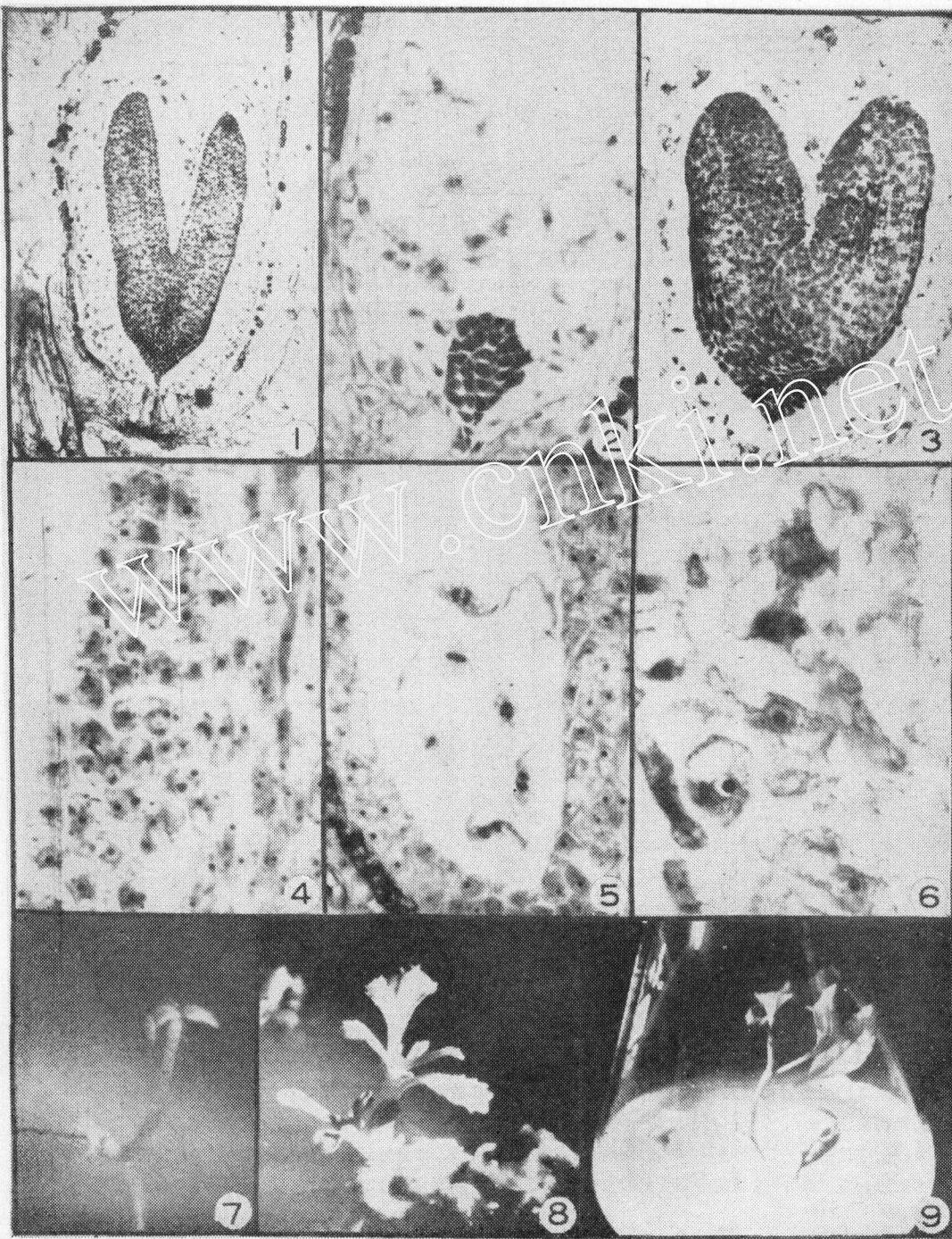
Key words *Populus simonii*; *Salix matsudana*; cross; embryo culture



1~2.PAS苏木精染色：1.小叶杨雌蕊纵切面 $14\times$ ；2.小叶杨花柱基部大量积累淀粉粒 $150\times$ ；3.旱柳花柱，示无淀粉粒，细胞排列疏松 $200\times$ ；4~9.杂交中旱柳花粉管的行为：4.花粉粒水合及萌发 $1050\times$ ；5.花粉管进入柱头 $1620\times$ ；6.子房腔上部缠绕的花粉管，其中一条花粉管内可见精子 $650\times$ ；7.进入子房腔的花粉管 $300\times$ ；8.向珠孔和向基部胚珠生长的花粉管 $156\times$ ；9.进入珠孔的花粉管(箭头) $312\times$ (图版缩至原大的 $97/100$ ，上述放大倍数相应缩小 $3/100$)。



1. 8 DAP, 精核核仁靠近次生核核仁 $800\times$; 2. 8 DAP, 精核核仁与次生核核仁融合 $1500\times$; 3. 8 DAP, 卵核中出现精核核仁 $1100\times$; 4. 13DAP, 合子与胚乳游离核 $1000\times$; 5. 11DAP, 2细胞原胚 $400\times$; 6. 13DAP, 3细胞线型原胚 $200\times$; 7. 13DAP, 4细胞原胚, 顶细胞形成的两个子细胞的间壁(箭头所示)为斜向的 $1000\times$; 8. 13DAP, 4细胞原胚在胚乳囊(此时为33个胚乳游离核)之外 $240\times$; 9. 15DAP, 8细胞原胚(胚乳游离核为140个左右), 大量胚乳游离核多核仁 $400\times$; 10. 同9, 胚囊合点端的胚乳 $600\times$ (图版缩至原大的 $86/100$, 上述放大倍数相应缩小 $14/100$)。



1. 33DAP, 鱼雷胚, 细胞胚乳已开始退化 $100\times$; 2. 25DAP, 约120细胞的球形胚完全败育, 此时胚乳在合点端仍为游离核状态, 在珠孔端已细胞化。注意胚乳仍大量进行有丝分裂 $200\times$; 3. 33DAP, 开始败育的后心形胚 $110\times$; 4. 35DAP, 鱼雷胚子叶细胞具多小核 $300\times$; 5. 13DAP, 3细胞原胚胚囊中胚乳游离核正常的有丝分裂 $300\times$; 6. 35DAP, 鱼雷胚期的胚囊内层胚乳尚呈游离核状态, 并正常地进行有丝分裂 $1000\times$; 7. 杂种胚珠培养产生的试管籽苗 $3\times$; 8. 27DAP, 胚珠培养产生的试管苗, 叶子呈长椭圆、近全缘和具锯齿的披针形 $3\times$; 9. 试管苗在分化培养基上进行茎段微繁殖 (图版缩至原大的 $96/100$, 上述放大倍数相应缩小 $4/100$)。



小叶杨×旱柳授粉后第11天的原胚期杂种胚珠培养。1. 珠被内长出芽丛 $7\times$; 2. 下胚轴自珠被内伸出 $8\times$;
3. 胚珠内长出子叶 $8\times$; 4. 子叶肥大(箭头), 顶芽不发育, 下胚轴产生不定芽 $8\times$; 5. 不定芽继续分化芽丛
 $8\times$; 6. 肥大的子叶(箭头所示)与胚轴分化的芽丛 $5\times$; 7. 培养时固定的对照胚珠中最大的胚囊, 右上方为解
剖出的胚乳囊 $60\times$ (图版缩至原大的97/100, 上述放大倍数相应缩小3/100)。