

甘蓝×白菜种间花粉-柱头相互作用的研究

巩振辉 何玉科[✓] 王 飞 李华君

(西北农业大学园艺系, 陕西杨陵·712100)

S635.101

摘 要 以甘蓝为母本与白菜杂交, 授粉后采不同时期的子房用苯胺兰法染色, 在荧光显微镜下观察花粉在柱头上粘合、萌发及花粉管在柱头表面和花柱中的生长情况。试验结果表明: 甘蓝×白菜杂交的主要障碍在于白菜萌发的花粉管难以伸进柱头, 并与柱头表面发生严重的胼胝质反应, 使花粉管扭曲, 尖端膨大, 难以生长。

关键词 甘蓝, 白菜, 远缘杂交, 杂交不育, 花粉-柱头相互作用

中图分类号 S635.1, S634.1, Q321.3

大白菜和甘蓝是芸苔属栽培面积最大的两种蔬菜作物。这两种作物在抗寒性、耐热性、抗病虫及品质等方面均有明显差异。在自然状态下, 结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)和大白菜(*B. campestris* ssp. *pekinensis* var. *cephalata* Tsen et Lee)是高度不亲和的。国外一些学者研究表明, 以甘蓝作母本, 白菜作父本进行人工杂交, 其结籽率(结籽数÷授粉花朵数×100%)仅为0%~0.667%, 而且在这极低的结籽率中, 由假受精导致的无融合生殖的母型植株高达97%, 真杂种不足3%^[1~4]。在国内, 据陈玉卿等^[5]研究报道, 甘蓝×白菜的人工杂交结角率虽为94%, 但结籽率为0。本课题组在1990~1991年所进行的甘蓝×白菜的所有组合中, 包括人工杂交授粉数千朵, 均未收到种子。因此, 开展甘蓝×白菜种间花粉与柱头间的相互作用及受精过程的研究, 对于克服甘蓝×白菜远缘杂交的不亲和, 具有十分重要的理论和实践意义。

在芸苔属植物的种间杂交研究中, 国外研究者对合子形成后的胚胎发育障碍给予高度重视, 但对合子形成前的受精障碍却尚未作深入系统的研究^[6]。孟金陵^[7]对甘蓝型油菜与白菜、甘蓝、黑芥、芥菜型油菜和埃塞俄比亚芥菜的种、属间杂交的合子形成前的障碍进行了研究。关于甘蓝×白菜种间杂交时, 花粉与柱头相互作用的研究在国内外极少报道。本试验采用苯胺兰染色法, 在荧光显微镜下观察了白菜花粉在甘蓝柱头上的粘合、萌发及其萌发的花粉管在甘蓝柱头上和花柱中的生长、伸长情况, 试图查明甘蓝×白菜种间杂交时, 花粉管进入胚囊前的障碍, 为开展甘蓝、白菜的远缘杂交育种提供理论依据。

1 材料和方法

以甘蓝品种90-4为母本, 白菜品种NW₃和NW₄为父本, 分别配制远缘杂交组合90-4×NW₃(DC₁)和90-4×NW₄(DC₂), 以甘蓝品种90-4自交(以S表示)为对照。

文稿收到日期: 1991-07-25。

* 国家自然科学基金资助项目。

试验于 1991 年 5 月在西北农业大学进行。杂交和自交授粉均在温室进行, 去雄、授粉、套袋等采用常规方法。授粉后 3, 10, 24 和 48 h, 每处理分别采取 20 个子房, 用卡诺液(酒精: 冰醋酸=3:1)固定 1 h, 保存于 70% 酒精中, 再经 6 mol/L NaOH 溶液软化 12 h, 用蒸馏水反复冲洗, 然后在 0.1% 苯胺兰溶液(溶于 0.1 mol/L K_3PO_4 溶液中)里染色 24 h, 用 olympus BHF 型荧光显微镜在紫外光源下观察花粉的粘合、萌发、柱头乳突细胞的胼胝质反应及花粉管在花柱中的伸长情况⁽⁸⁾。授粉亲和指数参考 Matsuzawa⁽⁹⁾ 的花粉萌发指数公式计算。

2 结果与分析

2.1 花粉粒在柱头表面的粘合情况

芸苔属作物花粉-柱头相互作用的第一步, 是花粉与柱头上乳突细胞表面发生水合作用而粘合在柱头上。柱头表面花粉粒粘合的速度与数量, 反映了花粉与柱头发生水合作用的强弱。甘蓝自交授粉后 3 h, 平均有 30 粒左右的花粉粒粘合在柱头上, 授粉 10 h 后增加到 40 余粒, 到 24~48 h, 可见到大量的花粉粒粘合在柱头上(图版 1, 2 及表 1)。甘蓝×白菜种间杂交两个组合 DC_1 、 DC_2 , 在授粉后 10 h 内柱头上粘合的花粉粒与对照无明显差异; 到 24~48 h, 粘合在柱头上的花粉粒明显低于对照。这表明甘蓝柱头对异种花粉的反应迟钝, 有可能通过提早授粉(蕾期授粉)提高异种花粉粘含量。从表 1 还可看出, 两个白菜品种的花粉在甘蓝柱头上不同时期的粘含量无明显差异, 说明不同白菜品种的花粉对其与甘蓝乳突细胞表面发生的水合作用没有明显影响。

表 1 白菜与甘蓝柱头作用的花粉数

组合	授粉后 时 间 (h)	粘合在柱头表 面的花粉粒 ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	在柱头表面已 萌发的花粉粒 ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	进入柱头的 花 粉 管 ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	进入花柱的 花 粉 管 ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
S	3	32.5±19.7	8.8±7.4	7.0±3.8	0
	10	46.7±17.0	27.5±11.8	19.0±4.1	2.5±1.7
	24	90.0±10.3	67.5±11.5	55.0±24.9	7.5±2.6
	48	100.0±10.7	100.0±10.3	50.0±31.4	16.7±8.7
DC_1	3	29.0±15.9	7.6±4.9	2.5±1.4	0
	10	39.0±17.8	9.4±5.8	2.5±1.7	0
	24	48.8±15.7	16.0±10.3	7.0±3.1	0
	48	56.0±10.2	25.3±10.7	7.0±4.2	0
DC_2	3	34.0±20.9	8.3±4.7	0	0
	10	49.0±26.1	13.3±8.2	0	0
	24	58.5±32.3	19.0±12.8	6.7±3.7	0
	48	53.3±30.9	31.7±14.3	13.3±2.8	3.2±2.9

2.2 花粉粒的萌发及花粉管与柱头表面的相互作用

粘合在柱头上的花粉粒能否萌发, 以及萌发的花粉管能否穿入柱头是芸苔属作物花粉-柱头相互作用极为重要的环节。柱头上萌发的花粉粒及穿入柱头的花粉管数量则反映了花粉与柱头的亲和能力。甘蓝自花授粉 10 h, 柱头上花粉萌发量已达 27 粒左右, 并有 19 条穿入柱头; 24 h 后, 萌发和穿入柱头的花粉管数量均大幅度增加; 48 h, 柱头上的花粉粒几乎全部萌发, 并有一半萌发的花粉穿入柱头乳突细胞, 花粉管无任何异常现象, 亦未见到花粉管和柱头乳突细胞有胼胝质反应(图版 1, 2, 3, 表 1)。



图版说明

C

1. 甘蓝自花授粉 3 h, 示花粉萌发并进入柱头乳突细胞间隙, $\times 200$; 2. 甘蓝自花授粉 24 h, 示花粉管进入柱头和花柱组织, $\times 200$; 3. 甘蓝自花授粉 48 h, 示大量花粉管进入柱头和花柱组织, $\times 200$; 4. DC_1 杂交授粉 3 h, 示花粉管很短, 前端产生扭曲的胼胝质亮点, $\times 300$; 5. DC_2 杂交授粉 10 h, 示一个花粉粒萌发, 花粉管伸进乳突细胞, 有胼胝质积累, $\times 400$; 6. DC_2 杂并授粉 24 h, 示花粉管在柱头上扭曲, $\times 300$; 7. DC_2 杂交授粉 48 h, 示花粉管进入乳突细胞后扭曲、膨大, $\times 300$; 8. DC_1 杂交授粉 24 h, 示花粉管进入乳突细胞后扭曲, 有胼胝质亮点, $\times 400$

甘蓝×白菜 DC₁ 组合授粉后 10 h, 柱头表面萌发的花粉粒仅有 9 粒, 穿入柱头的花粉管有 1~5 条; 24 h, 与对照已有明显差异; 48 h, 柱头表面萌发的花粉粒约 25 粒, 穿入柱头的花粉管仅 5~10 条。DC₂ 组合授粉后 10 h, 柱头表面萌发的花粉粒有 13 粒左右, 但未发现有穿入柱头的花粉管; 24 h, 柱头表面萌发的花粉粒有 19 粒, 穿入柱头的花粉管有 5~10 条; 48 h, 柱头表面萌发的花粉粒达 31 粒, 穿入柱头的花粉管有 13 条(表 1)。方差分析结果表明, 无论是柱头上萌发的花粉数, 还是穿入柱头的花粉管, 对照都显著高于 DC₂ 和 DC₁ 两个远缘杂交组合。DC₁ 和 DC₂ 在柱头上萌发的花粉数和穿入柱头的花粉管数均无明显差异(表 2)。这说明, 不同品种的白菜花粉并没有明显改善甘蓝×白菜杂交中花粉-柱头的相互作用。

在甘蓝柱头上, 供试的两个白菜品种其花粉萌发形成的花粉管均发生严重的扭曲, 尖端膨大, 乳突细胞内积累大量胼胝质现象, 致使花粉管难以伸长, 生长受到严重抑制。直到授粉后 48 h, 大多数萌发的花粉管长度尚未超过花粉直径的 2.0 倍, 只有极少数的花粉管穿入柱头(图版 4, 5, 6, 7, 8)。

表 2 甘蓝×白菜几个亲和性参数的方差分析

组合	柱头上萌发的花粉粒(粒)	差异显著性*		进入柱头的花粉管数(条)	差异显著性		授粉亲和指数	差异显著性	
		5%	1%		5%	1%		5%	1%
S	50.95	a	A	32.75	a	A	2.82	a	A
DC ₂	18.08	b	A	5.00	b	A	1.13	b	B
DC ₁	14.58	b	A	4.75	b	A	1.01	b	B

* Duncan's 新复极差法。

2.3 花粉管与花柱的相互作用

穿入柱头的花粉管在花柱中能否正常生长到达花柱基部是芸苔属作物花粉-花柱相互作用的结果。甘蓝自花授粉 10 h, 即平均有 2.5 条花粉管到达花柱基部; 24 h, 增加到 7.5 条, 48 h, 平均每花柱有花粉管 16 条以上(表 1)。甘蓝×白菜 DC₁ 组合, 在授粉后供试的时间范围内, 未见有花粉管进入花柱基部; DC₂ 组合, 授粉后 24 h 以内, 未发现有花粉管进入花柱, 直到授粉后 48 h, 平均每花柱仅有 3.2 条花粉管穿入花柱组织, 但并未发现有花粉管进入胚囊。由于供试不同杂交组合穿入柱头的花粉管数有差异, 为了明确花粉管与花柱的相互作用, 我们引用了花粉管生长指数(进入花柱的花粉管÷穿入柱头的花粉管)这一参数。计算结果表明, 授粉后 10, 24, 48 h, 甘蓝自交的花粉管生长指数分别为 0.132、0.136 和 0.334; 甘蓝×白菜 DC₁ 组合均为 0; 甘蓝×白菜 DC₂ 组合, 分别为 0、0 和 0.241。显然, 甘蓝花柱对异种花粉管的穿入、生长有明显的抑制作用, 且对不同白菜品种的花粉管的穿入、生长抑制作用略有差异。

2.4 授粉亲和指数

甘蓝柱头上花粉的粘含量、萌发量、穿入柱头、进入花柱的花粉量都不同程度地反映了不同杂交组合的亲和性。为了综合比较不同授粉组合的亲和指数, 人们常采用授粉亲和指数这一参数^[2]。甘蓝自交的授粉亲和指数为 2.82, 甘蓝×白菜 DC₂ 和 DC₁ 组合的授粉亲和指数分别为 1.13 和 1.01, 方差分析结果表明, 甘蓝×白菜 DC₁ 和 DC₂ 组合的授粉亲和指数极显著地低于甘蓝自交, DC₁ 和 DC₂ 间的授粉亲和指数差异不显

著(表2)。这一结果说明,不同白菜父本花粉与甘蓝柱头的亲和力差异不明显,即很难通过提供不同白菜品种的花粉来提高甘蓝×白菜的亲和力。

3 讨 论

在作物的远缘杂交中,异源花粉在柱头上要经过粘合、萌发、穿入柱头和进入花柱等过程,才有可能获得远缘杂交种。本试验结果表明,虽然白菜花粉及其花粉管在甘蓝柱头上的粘合及穿入花柱的数量较甘蓝自交要少,但花粉管进入胚囊前,主要障碍在于白菜花粉在甘蓝柱头上萌发较少,萌发的花粉管难以生长穿入柱头。在形态上,花粉管发生严重扭曲、膨大,其长度很少超过花粉直径的2.0倍。因此,通过试管受精以及在柱头表面喷施某些生理活性物质,或切断柱头等方法有可能成为解决甘蓝×白菜杂交困难的有效途径。

许多学者在进行远缘杂交研究时都认为,亲本的基因型强烈地影响着种间杂交亲和性的高低。Matsuzawa^[9]在甘蓝×白菜中发现,不同基因型的甘蓝母本与白菜的杂交亲和性差异极大。关于不同基因型的白菜父本对甘蓝×白菜杂交亲和性的影响,迄今尚未见报道。因此,进一步深入研究不同基因型的白菜(包括不同变种,不同生态型)父本在甘蓝×白菜种间杂交中的作用,对于探明不同基因型亲本对甘蓝×白菜杂交亲和性的影响,以及研究提高其杂交亲和性都是必要的。

Dumas C.^[10]和 Heslop Harrison^[11]研究指出,芸苔属(*Brassica*)自花授粉时,花粉粒萌发困难,花粉粒在柱头表面粘合后,在乳突细胞内沉积胼胝质及花粉管受阻于乳突细胞之外,是十字花科等植物中由S等位基因决定的花粉壁蛋白与柱头蛋白膜的一种特异性反应,是孢子体自交不亲和性的典型特征。然而许多学者在甘蓝型油菜与白芥的属间杂交^[12]、甘蓝型油菜与白菜、甘蓝、芥菜型油菜等种间杂交和百日草属内的种间杂交^[13]中也都发现异源花粉受阻于柱头表面,乳突细胞内产生大量胼胝质。远缘杂交不亲和性反应和自交不亲和性反应,在形态解剖上的这种相似性,使得人们认为两种不亲和的机理可能有共同之处。因此,一些学者提出用克服自交不亲和的方法——蕾期授粉来克服远缘杂交的不亲和性^[7,12,13]。本试验中,甘蓝×白菜杂交不亲和在子房中反应的部位及乳突细胞内胼胝质的沉积也都与自交不亲和性的表现相似。1990~1991年我们曾进行了大量的甘蓝×白菜蕾期授粉,均未获得种子。然而我们采用蕾期授粉,子房离体培养或胚珠培养的方法获得了大量的杂种种子或植株(另有报道)。这说明,在甘蓝×白菜中,障碍不仅存在于合子形成前,而且也存在着杂种胚败育的问题。因此,研究试用克服自交不亲和性的方法(如蕾期授粉、柱头喷施某些活性物质或化学物质),或采用截断柱头的方法来克服甘蓝×白菜受精前的障碍;用子房培养、胚珠培养克服杂种胚败育问题;或研究应用试管胚珠授粉受精的方法,对于提高甘蓝×白菜的杂种成苗率具有同等重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Inomata N. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* × *B. oleracea* by culture in vitro of excised ovaries II Development of excised ovaries in the crosses of various culture. *Japan J Genetics*, 1978 (343): 161~171

- 2 Nishi S J, Kawata M Toda. In the breeding of interspecific hybrids between two genomes "c" and "a" of *Brassica* through the application of embryo culture techniques. *Japan J Breed*, 1959, (8): 215~222.
- 3 Yamagish H, Takayanagi K. Cross-compatibility of hakurao (artificially synthesized *Brassica napus*) with *Brassica* vegetables. *Cruiferae Newsletter*, 1982 (7): 34~35.
- 4 Hosoda T, M Sarashima, H Namai. Studies on the breeding of artificially synthesized *Napus* crops by mean of interspecific crosses between $n=10$ group and $n=9$ group in genus *Brassica*. *Men Fac Agri Tokyo Univ Education*, 1969 (15): 193~209.
- 5 陈玉卿. 芸苔属六个种自交, 品种内互交和种间杂交亲和性的初步观察. 中国油料, 1987 (3): 1~6.
- 6 孟金陵. 芸苔属植物远缘杂交不亲和的研究进展. 中国油料, 1987 (4): 71~76.
- 7 孟金陵. 甘蓝型油菜与近缘种、属杂交时花粉—雌蕊相互作用的研究. 作物学报, 1990, 16(1): 19~24.
- 8 Dolstra O. Synthesis and fertility of $\times$ *Brassicoraphanus* and ways of transferring *Raphanus* characters to *Brassica*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 1982: 19~23.
- 9 Matsuzawa Y. Studies on the interspecific hybridization in genus *Brassica*. II Crossability in interspecific cross, *B oleracea* L $\times$ *B campestris* L. *Japan J Breed*, 1983, 33(3): 321~330.
- 10 Dumas C, Knox R B. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor Appl Genet*, 1983 (67): 1~10.
- 11 Heslop-Harrison J. Incompatibility and the pollen stigma interaction. *Ann Rev Plant Physiol*, 1975 (26): 403~425.
- 12 Kerhoas C. Specificity of the callose response in stigmas of *Brassica*. *Ann Bot*, 1983, 52(4): 597~602.
- 13 Boyle T H, Stimart D P. Self incompatibility and interspecific incompatibility, relationships in intra and interspecific crosses of *Zinnia elegans* Jacq and *Z angustifolia* HBK (compositae). *Theor Appl Genet*, 1986, 73(2): 305~315.

Studies on Pollen-Stigma Interaction Between Cabbage and Chinese Cabbage

Gong Zhenhui He Yuke Wang Fei Li HuaJun

(Horticultural Department, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract The cross was made between cabbage as female parent and Chinese cabbage. Ovaries of different periods after pollination were collected and stained with aniline blue. The degree of pollen-stigma binding, germination of pollen grains and growth of pollen tubes in stigma surface and style were observed under fluorescent microscope. The results showed that the main barrier to cross was that pollen tubes failed to penetrate stigma whose surface produced serious callose reaction, giving rise to the distortion of pollen tubes, swelling of their tops and failure to growth.

Key words cabbage, chinese cabbage, distant hybridization, interspecific incompatibility, pollen-stigma interaction