

# 诸葛菜与芸苔属属间杂交时花粉—雌蕊 相互作用的研究

王幼平 罗 鹏 何兴金  
(四川联合大学生物系, 成都 610064)

**摘 要** 本文对诸葛菜和芸苔属属间杂交的花粉粒萌发和花粉管生长情况进行了研究。其中用诸葛菜作父本, 分别和甘蓝型油菜(“文油 6 号”、“云油 31 号”)、“羽衣甘蓝”和白菜型油菜(“凤仪油菜”)杂交时, 受精前有一定的亲和性; 而和白菜型油菜(“玉溪周永达油菜”)、芥菜型油菜(“泸州四棱”、“南充油菜”)、埃塞俄比亚芥杂交时, 存在受精前障碍。同时还发现通过蕾期授粉是克服属间杂交不亲和性的有效方法之一。

**关键词** 诸葛菜; 芸苔属; 属间杂交; 花粉—雌蕊相互作用

## STUDIES ON POLLEN—PISTIL INTERACTION BETWEEN ORYCHOPHRAGMUS VIOLACEUS AND GENUS BRASSICA

Wang Youping Luo Peng He Xinjin  
(Dept. of Biology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

**Abstract** Pollen grain germination and pollen tube growth were investigated in intergeneric crosses between *Brassica* species and *O. violaceus*. In crosses between *B. napus* (Wenyou 6, Yunyou 31), *B. oleracea*, *B. campestris* (Fongyi) with *O. violaceus*, pollen grains of *O. violaceus* were compatible to the stigmas of all their pistils. In crosses between *B. campestris* (Yuxi Zhongyongda), *B. juncea* (Luzhou sileng, Lanchong), *B. carinata* with *O. violaceus*, pre-fertilization barriers were observed. It was found that bud pollination was regarded as one of the effective method to solve the intergeneric cross incompatibility in the present paper.

**Key words** *Orychophragmus violaceus*; *Brassica* spp; intergeneric cross; pollen—pistil interaction

现代植物育种中, 以导入近缘种属的有利基因来实现产量、品质和抗性等方面的突破, 已成为越来越重要的手段。异源花粉被授到柱头上后, 要经过吸水、萌发和花粉管进入柱头、伸进花柱、穿过珠孔等步骤和历程, 才能实现受精, 在这个漫长历程中的每一阶段发生的不亲和性都可导致受精失败<sup>[1]</sup>。研究发现远缘杂交授粉后柱头乳突细胞内会沉积有大量的胼胝质, 有人认为乳突细胞内胼胝质的产生是远缘杂交时柱头对异源花粉的一种特异性拒绝反应,

1997—03—14 收稿

第一作者简介: 王幼平, 男, 1965 年出生, 博士, 副教授, 植物学专业。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.>

而且胼胝质反应的强度和杂交亲本的亲缘程度有一定的相关性<sup>[2-3]</sup>。胼胝质( $\beta$ , 3-聚葡萄糖)可以和脱色的苯胺蓝 ABF(aniline blue fluorescence)反应, 因此 ABF 法是鉴定杂交亲和性常见的测定方法<sup>[2]</sup>。

诸葛菜是从大量野生植物中筛选出的天然低芥源, 其种子的芥酸含量为 0.94%, 同时富含人体必需的脂肪酸油酸(20.32%)和亚油酸(53.17%)<sup>[4]</sup>。但诸葛菜的花期较长, 抗病性较差, 因此除了对它自身进行选育外, 还可以把它作为育种亲本, 和同族的芸苔属进行远缘杂交, 期望获得油菜育种新材料。为此, 本试验以诸葛菜为父本, 分别与芸苔属的基本种和复合种进行广泛的杂交, 通过 ABF 法来了解诸葛菜和芸苔属进行远缘杂交时生殖隔离发生的时期和作用部位, 为诸葛菜(新低芥源)的远缘杂交提供理论依据。

## 1 材料和方法

父本诸葛菜 [*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz] 为我室通过单株选育的品系。母本包括芸苔属的基本种甘蓝 (*Brassica oleracea*), 品种为“羽衣甘蓝”; 白菜型油菜 (*B. campestris*), 品种为“凤仪油菜”和“玉溪周永达”。复合种甘蓝型油菜 (*B. napus*), 品种为“云油 31 号”和“文油 6 号”; 芥菜型油菜 (*B. juncea*), 品种为“泸州四棱”和“南充油菜”; 埃塞俄比亚芥 (*B. carniata*) 均由本室所保存。

取开花前 2~5 d 幼蕾进行杂交和自交, 去雄、授粉和套袋等操作方法与常规杂交育种相同。分别取授粉后第 1、第 2 和第 3 天的雌蕊, 每次每处理各取 2 个花序, 约 10 枚, 用卡诺固定液(酒精 醋酸=3:1), 固定 24 h 后, 保存于 70% 酒精中。雌蕊用 6N NaOH 处理 12 h, 水洗后用含 0.1 M  $K_3PO_4$  的 0.1% 水溶性苯胺蓝溶液浸泡一昼夜, 然后在荧光显微镜下观察花粉的萌发, 柱头乳突细胞的胼胝质(callose)反应和花粉管生长情况。

## 2 实验结果

十字花科植物是干燥型柱头, 即乳头突起较长, 且表面缺少或只有少量的液态分泌物<sup>[5]</sup>。因此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是花粉与柱头相互识别反应的第一步<sup>[6]</sup>。诸葛菜的花粉在芸苔属植物柱头上生长情况列于表 1。

### 2.1 诸葛菜花粉与甘蓝雌蕊的相互作用

“羽衣甘蓝”人工自花授粉 1 d 后即有大量的花粉附着在柱头表面并开始萌发, 花粉萌发后, 大多顺利进入柱头, 且花粉管生长正常, 同时柱头乳突细胞内有胼胝质反应。授粉 2 d 后花粉管通过珠孔受精。“羽衣甘蓝” $\times$  诸葛菜属间杂交, 授粉 1 d 后有大量的诸葛菜花粉附着在“羽衣甘蓝”柱头上, 花粉能正常萌发; 授粉 2 d 后有少量的花粉管进入花柱, 同时乳突细胞有弱的胼胝质反应, 胼胝质在荧光显微镜下发出黄绿色荧光, 因此“羽衣甘蓝”和诸葛菜属间杂交受精前存在弱的亲和性。

### 2.2 诸葛菜花粉与白菜型油菜雌蕊的相互作用

白菜型油菜人工自花授粉 1 d 后有大量的花粉在柱头表面萌发, 同时有弱的胼胝质反应; 授粉后第 2、3 天花柱中有大量花粉管通过珠孔受精, 同时柱头乳突细胞也有强烈的胼胝质反应出现。诸葛菜的花粉在“凤仪油菜”的柱头上能正常萌发, 授粉后第 3 天乳突细胞有弱的胼

胼质反应,能正常完成受精作用,即受精前是亲和的。诸葛菜的花粉在“玉溪周永达”的柱头上只有少量萌发,花粉管顶端受阻于柱头乳突细胞或缠绕于乳突细胞表面,授粉后第2天柱头的乳突细胞有大量的胼质生成,因此存在受精前障碍。

表1 诸葛菜花粉在芸苔属植物柱头上生长情况

Table 1 Growing status of *O. violaceus* pollen on the stigmas of Genus *Brassica*

| 品 种 名 称                        | 观察项目和授粉后天数 (d) |   |   |               |   |   |           |   |   |           |   |   |       |   |   |
|--------------------------------|----------------|---|---|---------------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-------|---|---|
|                                | 粘在柱头表面的花粉①     |   |   | 在柱头表面上已萌发的花粉② |   |   | 进入柱头的花粉管③ |   |   | 进入花柱的花粉管④ |   |   | 胼质反应⑤ |   |   |
|                                | 1              | 2 | 3 | 1             | 2 | 3 | 1         | 2 | 3 | 1         | 2 | 3 | 1     | 2 | 3 |
| 甘蓝 ( <i>B. oleracea</i> )      |                |   |   |               |   |   |           |   |   |           |   |   |       |   |   |
| “羽衣甘蓝”自交                       | +              | + | + | +             | + | + | ±         | ± | + | ±         | ± | + | +     | + | + |
| “羽衣甘蓝”× 诸葛菜                    | +              | + | + | +             | + | ± | +         | ± | 0 | ±         | ± | ± | ±     | ± | + |
| 白菜型油菜 ( <i>B. campestris</i> ) |                |   |   |               |   |   |           |   |   |           |   |   |       |   |   |
| “凤仪油菜”自交                       | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | ± | +     | + | + |
| “凤仪油菜”× 诸葛菜                    | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | 0 | 0     | ± | ± |
| “玉溪周永达”自交                      | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | ± | +     | + | + |
| “玉溪周永达”× 诸葛菜                   | +              | + | + | ±             | ± | ± | ±         | ± | 0 | 0         | 0 | ± | +     | + | + |
| 甘蓝型油菜 ( <i>B. napus</i> )      |                |   |   |               |   |   |           |   |   |           |   |   |       |   |   |
| “云油 31”自交                      | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | 0 | 0     | 0 | 0 |
| “云油 31”× 诸葛菜                   | +              | + | ± | +             | + | 0 | +         | + | ± | ±         | + | ± | ±     | ± | + |
| “文油 6号”自交                      | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | + | 0     | 0 | 0 |
| “文油 6号”× 诸葛菜                   | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | ± | ± | 0     | ± | ± |
| 芥菜型油菜 ( <i>B. juncea</i> )     |                |   |   |               |   |   |           |   |   |           |   |   |       |   |   |
| “泸州四棱”自交                       | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | 0 | 0     | 0 | 0 |
| “泸州四棱”× 诸葛菜                    | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | 0 | 0         | 0 | ± | +     | + | + |
| “南充油菜”自交                       | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | + | 0     | 0 | 0 |
| “南充油菜”× 诸葛菜                    | +              | + | + | +             | ± | 0 | 0         | ± | 0 | 0         | 0 | ± | +     | + | + |
| 埃塞俄比亚芥 ( <i>B. carnata</i> )   |                |   |   |               |   |   |           |   |   |           |   |   |       |   |   |
| 埃塞俄比亚芥自交                       | +              | + | + | +             | + | + | +         | + | + | +         | + | + | 0     | 0 | 0 |
| 埃塞俄比亚芥× 诸葛菜                    | ±              | ± | ± | ±             | ± | ± | 0         | 0 | ± | 0         | 0 | ± | +     | + | + |

注: ①粘在柱头表面的花粉经授粉和固定后测出,等级:0,无花粉粒附着;±,小于5个花粉粒附着;+,大于5个花粉粒附着。②柱头上萌发的花粉等级:0,无;±,小于5个花粉萌发;+,大于5个花粉萌发。③进入柱头花粉管数等级:0,无;±,小于5个花粉管;+,大于5个花粉管。

④进入花柱花粉管数等级:0,无;±,小于5个花粉管;+,大于5个花粉管。⑤胼质反应用脱色的ABF染色,等级:

0,无荧光反应;±,弱的荧光反应;+,强的荧光反应。

## 2.3 诸葛菜花粉与甘蓝型油菜雌蕊的相互作用

甘蓝型油菜人工自花授粉后第1天花粉萌发达到高潮,花粉管生长正常,未发现柱头乳突细胞内有胼质反应,能正常完成受精作用。“云油31”× 诸葛菜属间杂交,授粉1d后有少量的花粉管进入花柱,乳突细胞有弱的胼质生成。“文油6号”× 诸葛菜授粉2d后柱头乳突细胞才有弱的胼质出现,这说明甘蓝型油菜和诸葛菜远缘杂交受精前是亲和的。

## 2.4 诸葛菜花粉与芥菜型油菜雌蕊的相互作用

芥菜型油菜人工自花授粉1d后柱头上有大量的花粉附着并开始萌发,花粉管到达花柱基部,柱头乳突细胞没有胼质的出现。“泸州四棱”× 诸葛菜和“南充油菜”× 诸葛菜杂交时,花粉均能在柱头表面萌发,但前者花粉管可进入柱头,由于花粉管粗细不均匀,最终不能进入花柱;后者只有少数花粉管能穿越柱头,多数花粉管受阻于柱头乳突细胞表面,表明芥菜型油菜和诸葛菜存在受精前不亲和。

## 2.5 诸葛菜花粉与埃塞俄比亚芥雌蕊的相互作用

埃塞俄比亚芥自交时花粉能正常萌发,花粉管生长正常,柱头乳突细胞没有胼质的出现。埃塞俄比亚芥× 诸葛菜,授粉第1天只有少量的花粉萌发,直到第3天才有少量的花粉管

进入柱头和花柱,花粉管生长异常,同时柱头乳突细胞有强烈的胼胝质反应,不能正常完成受精作用。

### 3 讨 论

#### 3.1 母本基因型对花粉—雌蕊相互作用的影响

本文用诸葛菜作父本,与不同类型油菜杂交,发现母本基因型在受精亲和性上表现不一致。如“凤仪油菜”和诸葛菜杂交时,授粉后第3天乳突细胞有弱的胼胝质反应,能完成受精作用;但诸葛菜的花粉在“玉溪周永达”的柱头上只有少量萌发,花粉管顶端受阻于柱头乳突细胞或缠绕于乳突细胞表面,授粉后第2天柱头的乳突细胞有大量的胼胝质生成,即存在受精前不亲和。另外,“泸州四棱”×诸葛菜和“南充油菜”×诸葛菜杂交时,前者花粉管可进入柱头,由于花粉管粗细不均匀,不能进入花柱,而后者只有少数花粉管能穿越柱头,多数花粉管受阻于柱头乳突细胞表面。这说明物种之间的生殖隔离表现在不同水平上,因此在进行远缘杂交时最好选用不同基因型作为母本,不要轻意对种间或属间杂交的可交配性进行定论。

#### 3.2 蕾期授粉是克服远缘杂交不亲和性的有效方法之一

在植物中远缘杂交的最大困难是由于物种的生殖隔离,而这种隔离发生在生殖过程中的不同水平上<sup>[1]</sup>。具体表现在亲本杂交的不亲和性、 $F_1$ 杂种的无生活力和 $F_1$ 杂种不育<sup>[7]</sup>。亲本杂交的不亲和性主要表现在受精前障碍或受精后胚胎发育障碍,而前者可通过蕾期授粉来克服。目前普遍认为不亲和反应的因素仅仅是在刚开花之前出现,所以如果在蕾期对未成熟的柱头授粉,这时抑制因素尚未出现,花粉管将顺利生长和有效的受精<sup>[8]</sup>,本实验均取开花前2~5 d的花蕾授粉,作者曾通过蕾期授粉方法首次获得芥菜型油菜与海甘蓝的属间杂种<sup>[9]</sup>,因此通过蕾期授粉无疑是克服远缘杂交不亲和性的有效方法之一。

### 参 考 文 献

- 1 孟金陵,刘定富,罗 鹏等. 植物生殖遗传学. 北京: 科学出版社 1995
- 2 Dumas C, Knox R B. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor. Appl. Genet.*, 1983, **67**: 1~10
- 3 Kerhoas C, Knox R B, Dumas C. Specificity of the callose response in stigmas of Brassica. *Ann. Bot.*, 1983, **52** (4): 597~602
- 4 罗 鹏, 蓝泽莲, 黄 建等. 珍贵油料植物诸葛菜的研究. 自然资源学报, 1991, **6** (3): 206~210
- 5 刘后利. 油菜的遗传和育种. 上海: 上海科技出版社 1985
- 6 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): 19~25
- 7 Sharma H C. Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica*, 1983, **32**: 17~31
- 8 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社 1983
- 9 王幼平, 罗 鹏, 李旭峰. 芥菜型油菜与海甘蓝属间杂种的获得与鉴定. 植物学报, 1997, **39** (4): 269~301