

芸芥 (*Eruca sativa* Mill.) 与芸薹属 (*Brassica* L.) 3 个油用种的远缘杂交

孙万仓^{1,3} 官春云² 孟亚雄¹ 刘自刚³ 张涛³ 李 杓² 杨随庄³ 令利军³
陈社元² 曾秀存¹ 王鹤龄¹

(¹ 甘肃农业大学农学院, 甘肃兰州 730070; ² 湖南农业大学油料研究所, 湖南长沙 410128; ³ 甘肃省农业科学院, 甘肃兰州 730070)

摘要: 采用芸芥 (*Eruca sativa* Mill.) 与芸薹属 3 个油用种 (*Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica rapa*) 进行杂交, 共授粉 15 990 朵花, 获得 1 257 个角果, 711 粒杂交种子, 结角率为 7.86%, 亲和指数 0.045。经形态学鉴定, 无论芸芥作母本还是芸薹属的 3 个油用种作母本, F₁ 植株均为偏母植株。杂交所获得角果的角粒数很低, 许多角果为空角果, 但在多数角果中可见到许多败育胚的残迹, 这些败育胚中可能不乏杂种胚。对角果生长发育测量结果表明, 远缘杂交角果在授粉后 9 d 左右停止生长, 据此推断杂种胚的败育时期可能就在授粉后 9 d 左右。采用苯胺蓝染色法, 在荧光显微镜下对芸芥与甘蓝型油菜杂交时花粉在柱头上的黏合、萌发及萌发花粉管在柱头和花柱中的生长、伸长情况的观察结果表明, 异源花粉很难在柱头上黏合和萌发, 同时在花粉黏合的部位及其附近柱头乳突细胞内产生大量胼胝质; 萌发的少量花粉粒, 其花粉管进入柱头也比较困难。表明芸芥与芸薹属杂交, 存在严重的生殖隔离障碍, 而且主要是受精前障碍。

关键词: 芸芥; 芸薹属; 远缘杂交

中图分类号: S565

Intergeneric Crosses between *Eruca sativa* Mill. and *Brassica* Species

SUN Wan-Cang^{1,3}, GUAN Chun-Yun², MENG Ya-Xiong¹, LIU Zi-Gang³, ZHANG Tao³, LI Xun², YANG Sui-Zhuang³,
LING Li-Jun³, CHEN She-Yuan², ZENG Xi-Cun¹, WANG He-Lin¹

(¹ Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu; ² Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; ³ Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: Crosses were made between *Eruca sativa* Mill. and *Brassica napus*, *Brassica juncea* and *Brassica rapa* and the parent materials were selfed. Totally 15 990 stigmas were pollinated and 1 257 pods, 711 pollinated seeds and 675 F₁ plants were obtained. The pods set rate and compatibility index were 7.86%, 0.045 respectively. All the F₁ plants showed the same morphological characters as their female parents, which suggested that F₁ was matroclinous hybrid and the crosses between *E. sativa* Mill. and *B. napus*, *B. juncea* and *B. rapa* were highly incompatible. The relics of abortive embryos could be found in most of the pods developed from the distant crosses between *Brassica* and *Eruca*, and they were possibly the hybrid embryos. The hybrid embryos stopped growth 9 days after pollinated. The pollen stigma binding, germination of pollen grains and the growth of pollen tubes in the surface of stigma and style were observed under fluorescent microscope. The results showed that the binding degree and germinating rate of pollen grain were weakened when *E. sativa* Mill. was pollinated with *B. napus* and the binding degree and germinating rate of pollen grain varied on the cross direction. The pollen of *B. napus* was hardly ever observed binding to the stigma of *E. sativa* Mill. which was used as female parent. The callose could be found easily depositing in papillose cells when both *B. napus* and *E. sativa* Mill. were used as female parent. It was suggested that the incompatible reaction caused by pollen stigma interaction could be the one of main barriers of intergeneric crosses between *E. sativa* Mill. and *Brassica* crops.

Key words: *Eruca sativa* Mill.; *Brassica*; Intergeneric crosses

通过远缘杂交可以有效地进行异种、属间遗传 物质的相互引入和转移, 有目的地进行植物性状改

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (ZS991-A21-043-N 和 ZS031-A25-041-D)。

作者简介: 孙万仓 (1957 -), 男, 甘肃会宁人, 博士, 研究员, 主要从事油菜育种及十字花科植物资源和分子生物学研究。Tel: 0931-7673007; Fax: 0931-7632540 E-mail: wangcangsun@yahoo.com.cn

Received (收稿日期): 2003-08-22, Accepted (接受日期): 2004-01-09.

良,因而远缘杂交在芸薹属作物育种上得到广泛应用,并取得了显著成效。如用白菜型油菜与甘蓝型油菜杂交,改良甘蓝型油菜的熟性;以 *P₀*l CMS 为母本,结球白菜为父本杂交,然后回交,将甘蓝型油菜 *P₀*l CMS 的基因转育到结球白菜上;萝卜细胞质雄性不育基因被转育到芸薹属的各种作物上^[1]。芸芥是一种重要的十字花科油料作物和蔬菜作物,具有优异的抗逆性,诸如抗旱、耐瘠薄、抗白粉病、耐低温、耐蚜虫、耐(抗)盐碱等。在我国北方干旱、半干旱地区广为分布^[2,3],而且芸芥与芸薹属有一定亲缘关系^[4]。若通过远缘杂交的方法将芸芥的优良性状导入油用芸薹属种,增强芸薹属的抗旱等抗逆性能,无疑对干旱、半干旱地区的油料生产和育种具有重要意义。然而,芸芥与芸薹属远缘杂交十分困难,存

在严重的生殖障碍^[5~10]。我们于 1996 - 2000 年进行了芸芥与芸薹属 3 个油用种的远缘杂交研究,分析了花粉-柱头间相互作用,以明确芸芥与芸薹属远缘杂交时杂交亲和程度及生殖隔离障碍发生的主要时段,为芸芥与芸薹属的远缘杂交育种提供了参考和依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

杂交所用的油用芸薹属种为白菜型油菜、甘蓝型油菜与芥菜型油菜,其中白菜型油菜 6 个品种(系),甘蓝型油菜 2 个品种(系),芥菜型油菜 2 个品种(系)。芸芥采用甘肃省 5 个地方品种(详见表 1)。

表 1 参试植物材料

Table 1 The materials used in the study

种名 Name of the species	染色体组 Nuclear genome	染色体数 Chromosome number	参试品种 The cultivars used in the study
白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	AA	$n = 10$	陇油 3 号(Longyou 3), 陇油 4 号(Longyou 4) 武威小油菜(Wuwei Xiaoyoucai), 96m198, 97CF41*, 97Q-6
甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AACC	$n = 19$	陇油 2 号(Longyou 2), G851A*
芥菜型油菜 <i>B. juncea</i>	AABB	$n = 18$	甘芥 1 号(Ganjie 1), 湟芥(Huangjie)
芸芥 <i>E. sativa</i>	EE	$n = 11$	广河芸芥(Guanghe Yunjie), 靖远芸芥(Jingyuan Yunjie), 榆中芸芥(Yuzhong Yunjie), 永靖芸芥(Yongjing Yunjie), 青城芸芥(Qingcheng Yunjie)

注: * 细胞质雄性不育材料。Note: * CMS lines.

1.2 研究方法

1.2.1 杂交方法和结果统计 杂交试验在田间进行,开花时选择健壮植株作为杂交亲本,母本剥蕾去雄,成对杂交授粉后套袋防止串粉,然后挂牌标记杂交组合、授粉花朵数和授粉日期。每一杂交组合授粉花朵数为 400 ~ 450。授粉后 10 d,去掉纸袋,成熟时按组合和母本单株收获,考察计数每一花序的结角数、每角的饱满粒数、半饱满粒数和瘪粒数,并计算结角率与亲和指数。

结角率 = 获得的角果数/授粉花朵数 × 100 %

亲和指数 = 饱满种子数/授粉花朵数

1.2.2 子房生长测定 以白菜型油菜 97Q-6 和广河芸芥为亲本进行正反交,同时对亲本进行单株间控制授粉。定株、定柱头测量杂交角果的生长发育情况。从授粉当天直至第 12 天,共测定 8 次,每次测量 10 个子房。最后以授粉当天子房长、宽度为 100,计算子房相对生长量。

1.2.3 杂交后代鉴定 播种杂交所得种子及其亲本种子,统计每一组合的总株数、育性、偏母植株

数及其百分数,评价杂种 F_1 的真伪。

1.2.4 花粉在柱头上亲和反应的观察 以芸芥品种广河芸芥和甘蓝型油菜陇油 2 号为亲本,分别组配正反远缘杂交组合,同时每个亲本进行自交。杂交和自交均在田间进行,去雄、授粉、套袋、标记挂牌采用常规方法进行。授粉后 1、2、4、6、8、12、16、24、48、72 及 120 h,各取 20 个子房,用卡诺液(酒精:冰醋酸 = 3:1)固定 1 h,保存在 70 % 酒精中。再用 8 mol/L NaOH 溶液软化 12 h,用蒸馏水反复冲洗,然后在 0.1 % 苯胺蓝溶液(溶于 0.1 mol/L K_2PO_4)中染色 24 h,将染色后的子房压片,用 Olympus BHF-2 荧光显微镜在紫外光源下观察花粉的黏合、萌发、柱头乳突细胞的胼胝质产生及花粉管在柱头乳突细胞中的生长情况,并拍照。

2 结果与分析

2.1 芸芥与 3 个油用芸薹属种远缘杂交的结角率和亲和指数(见表 2)

2.1.1 芸芥与白菜型油菜杂交 白菜型油菜 ×

芸芥,共组配15个正、反杂交组合。10个白菜型油菜×芸芥正交组合,共杂交7010朵花,获得了866个杂交角果,结角率12.35%,亲和指数0.060。收获后考种,平均每角果肉眼可见败育胚残迹1.39个;5个反交组合,共杂交2200朵花,获得3个角果,结角率0.14%,亲和指数0.002,败育胚残迹罕见,而且只有在以靖远芸芥为母本的两个组合中得到了角果。正交的结角率、亲和指数分别为反交的

10倍和30倍,平均每角果肉眼可见败育胚残迹数,正交亦远远大于反交。如武威小油菜×广河芸芥,结角率7.56%,亲和指数0.080,平均每角果败育胚残迹数0.76个,而反交组合广河芸芥×武威小油菜,3项指标均为0。可见,芸芥与白菜型油菜杂交,以白菜型油菜作母本、芸芥作父本的杂交组合,易获得种子;反之,则很难获得杂交角果。

表2 芸芥与芸薹属3个油用种杂交的结角率与亲和指数

Table 2 The ratio of setting pods and compatibility index in the crosses of *E. sativa* and Brassica

组合名称 Cross combination	授粉柱 头数 No. of pollinated stigma	结角数 No. of pods	结角率 Ratio of setting pods (%)	饱满粒数 Full seeds	瘪粒数 Hollow seeds	亲和指数 Compatibility index	败育胚 残迹数/角 No. of aborted embryo/pod
白菜型油菜×芸芥 <i>B. rapa</i> × <i>E. sativa</i>							
武威小油菜×广河芸芥 Wuwei Xiaoyoucai ×Guanghe Yunjie	450	34.0	7.56	36.0	4.0	0.080	0.76
96ml89×广河芸芥 96ml89 ×Guanghe Yunjie	450	25.0	5.56	30.0	9.0	0.067	1.52
97Q-6×广河芸芥 97Q-6 ×Guanghe Yunjie	400	20.0	5.00	2.0	2.0	0.005	1.60
97Q-6×靖远芸芥 97Q-6 ×Jingyuan Yunjie	400	60.0	16.50	21.0	35.0	0.052	1.92
陇油4号×靖远芸芥 Longyou 4 ×Jingyuan Yunjie	450	45.0	10.00	54.0	2.0	0.120	3.49
陇油3号×榆中芸芥 Longyou 3 ×Yuzhong Yunjie	450	84.0	18.67	44.0	12.0	0.098	2.24
97CF41×青城芸芥 97CF41 ×Qingcheng Yunjie	1020	94.0	9.22	77.0	0.0	0.023	1.17
97CF41×靖远芸芥 97CF41 ×Jingyuan Yunjie	1050	187.0	17.80	2.0	3.0	0.010	0.68
97CF41×广河芸芥 97CF41 ×Guanghe Yunjie	1340	96.0	7.16	51.0	0.0	0.089	1.30
97CF41×榆中芸芥 97CF41 ×Yuzhong Yunjie	1000	215.0	21.50	6.0	6.0	0.086	1.23
总计 Total	7010	866.0		403.0	73.0		1203.00
平均 Average			12.35			0.060	1.39
芸芥×白菜型油菜 <i>E. sativa</i> × <i>B. rapa</i>							
榆中芸芥×陇油4号 Yuzhong Yunjie ×Longyou 4	450	0.0	0.00	0.0	0.0	0.000	0.00
广河芸芥×武威小油菜 Guanghe Yunjie ×Wuwei Xiaoyoucai	450	0.0	0.00	0.0	0.0	0.000	0.00
广河芸芥×97Q-6 Guanghe Yunjie ×97Q-6	450	0.0	0.00	0.0	0.0	0.000	0.00
靖远芸芥×97Q-6 Jingyuan Yunjie ×97Q-6	400	1.0	0.25	0.0	2.0	0.000	0.00
靖远芸芥×陇油4号 Jingyuan Yunjie ×Longyou 4	450	2.0	0.44	5.0	0.0	0.011	1.00
总计 Total	2200	3.0		5.0	2.0		1.00
平均 Average			0.14			0.002	0.33
芥菜型油菜×芸芥 <i>B. juncea</i> × <i>E. sativa</i>							
甘芥1号×靖远芸芥 Ganjie1 ×Jingyuan Yunjie	500	67.0	13.40	31.0	11.0	0.062	0.67
滹芥×靖远芸芥 Huangjie ×Jingyuan Yunjie	400	23.0	5.70	21.0	2.0	0.052	1.65
滹芥×永靖芸芥 Huangjie ×Yongjing Yunjie	800	48.0	12.00	64.0	5.0	0.080	0.63
总计 Total	1700	138.0		116.0	16.0		113.00
平均 Average			8.12			0.068	0.82
芸芥×芥菜型油菜 <i>E. sativa</i> × <i>B. juncea</i>							
靖远芸芥×甘芥1号 Jingyuan Yunjie ×Ganjie 1	670	14.0	2.09	4.0	53.0	0.060	0.57
永靖芸芥×滹芥 Yongjing Yunjie ×Huangjie	800	19.0	4.27	50.0	34.0	0.063	0.53
总计 Total	1470	33.0		54.0	87.0		18.00
平均 Average			2.24			0.037	0.55
甘蓝型油菜×芸芥 <i>B. napus</i> × <i>E. sativa</i>							
陇油2号×永靖芸芥 Longyou2 ×Yongjing Yunjie	400	18.0	4.50	0.0	1.0	0.000	0.44
陇油2号×靖远芸芥 Longyou2 ×Jingyuan Yunjie	400	13.0	3.25	11.0	2.0	0.028	0.77
G851A×永靖芸芥 G851A ×Yongjing Yunjie	410	57.0	13.90	38.0	107.0	0.093	0.30
G851A×靖远芸芥 G851A ×Jingyuan Yunjie	800	49.0	12.25	72.0	36.0	0.090	0.28
G851A×广河芸芥 G851A ×Guanghe Yunjie	800	70.0	17.50	2.0	2.0	0.050	0.43
总计 Total	2810	207.0		123.0	148.0		81.00
平均 Average			7.37			0.044	0.39
芸芥×甘蓝型油菜 <i>E. sativa</i> × <i>B. napus</i>							
永靖芸芥×陇油2号 Yongjing Yunjie ×Longyou 2	400	9.0	2.25	5.0	0.0	0.013	0.55
靖远芸芥×陇油2号 Jingyuan Yunjie ×Longyou 2	400	1.0	0.25	5.0	0.0	0.013	0.00
总计 Total	800	10.0		10.0	0.0		5.00
平均 Average			1.25			0.013	0.50

就白菜型油菜为母本的正交组合而言,结角率和亲和指数因杂交组合不同差异亦较大。如 97CF41 × 榆中芸芥、陇油 3 号 × 榆中芸芥、97Q-6 × 靖远芸芥、陇油 4 号 × 靖远芸芥的结角率、亲和指数与败育胚残迹数较高,而 97m189 × 广河芸芥、97Q-6 × 广河芸芥较低。另外,父本对杂交结角率与亲和指数影响也很大,如 97Q-6 × 靖远芸芥的结角率与亲和指数远远高于 97Q-6 × 广河芸芥。在靖远芸芥与陇油 4 号组配的正、反交组合中,均获得了角果与败育胚残迹,亲和程度较高,说明靖远芸芥是一个比较好的父本,也是一个好的母本。表明杂交亲和程度与亲本基因型有很大关系。

以白菜型油菜细胞质雄性不育材料作母本比其育性正常者作母本与芸芥杂交,结角率等指标均有一定提高。

2.1.2 芸芥与芥菜型油菜杂交 共组配 5 个正、反交组合。3 个芥菜型油菜 × 芸芥的正交组合,共授粉 1 700 个柱头,结角率 8.12%,亲和指数 0.068,平均每角果败育胚残迹数 0.82 个。2 个芸芥 × 芥菜型油菜的反交组合,授粉 1 470 朵花,获得 33 个角果,54 粒种子,结角率 2.24%,亲和指数 0.037,平均每角果败育胚残迹数 0.55 个。可见芸芥与芥菜型油菜杂交,正、反交也有很大差异,芥菜型油菜作母本的正交组合的结角率、亲和指数分别为反交的 4 倍和 2 倍,败育胚残迹数亦远远高于反交组合(表 2)。

2.1.3 芸芥与甘蓝型油菜杂交 共组配 7 个正、反交组合。5 个甘蓝型油菜作母本的正交组合,共授粉 2 810 个柱头,获得 207 个角果,结角率 7.37%,

亲和指数 0.044,平均每角果败育胚残迹数 0.39 个。所获得的角果中绝大多数为空角果。其中 3 个以甘蓝型油菜细胞质雄性不育材料 G851A 作母本的杂交组合,结角率、亲和指数均高于以普通甘蓝型油菜作母本的杂交组合。两个反交组合共授粉 800 个柱头,获得 10 个角果,结角率 1.25%,亲和指数 0.013,败育胚残迹 0.5 个;结角率、亲和指数及败育胚残迹数均低于以甘蓝型油菜作母本的正交组合。

2.2 子房的生长发育

以亲本单株间控制授粉的母本子房生长量为 100%,计算远缘杂交授粉子房的相对生长量(表 3)。由表 3 可以看出,授粉后 1~7 d 远缘杂交授粉子房的生长与亲本单株间控制授粉子房的生长并无差异,都在迅速生长;授粉后 9 d 左右,远缘杂交授粉子房停止或接近停止生长,而它们亲本的子房仍在正常生长。授粉 9 d 时,广河芸芥与广河芸芥 × 97Q-6 子房相对生长量分别为 192、179,后者为前者的 93%;97Q-6 与 97Q-6 × 广河芸芥的子房相对生长量分别为 747、525,后者为前者的 70.28%;授粉 12 d 时,广河芸芥与广河芸芥 × 97Q-6 子房相对生长量分别为 250、179,后者为前者的 72%;97Q-6 与 97Q-6 × 广河芸芥的子房相对生长量分别为 845、541,后者为前者的 65.4%。表明远缘杂交子房生长发育在授粉后 9 d 左右基本停止,这可能与卵细胞未受精或受精后胚乳不发育等原因有关,杂种胚的败育也可能在授粉后 9 d 左右开始。因此,在授粉后 9 d 左右进行子房培养和胚培养可能是获得远缘杂种的一种可取方法。

表 3 芸芥 × 白菜型油菜与亲本自交(单株间控制授粉)子房相对生长量(%比较)

Table 3 Ovary development comparison of selfed pollination and crossed pollination between *E. sativa* and *B. rapa*

子房 Ovary	组合 Cross	授粉后时间 Days after pollination(d)							
		0	1	3	5	7	9	10	12
长 Length	广河芸芥 ⊙ Guanghe Yunjie ⊙	100	108	111	112	163	192	205	250
	广河芸芥 × 97Q-6 Guanghe Yunjie × 97Q-6	100	108	110	112	162	179	179	179
	97Q-6 × 广河芸芥 97Q-6 × Guanghe Yunjie	100	124	141	204	343	525	553	541
	97Q-6 ⊙	100	124	142	238	459	747	819	845
宽 Width	广河芸芥 ⊙ Guanghe Yunjie ⊙	100	113	127	175	295	398	457	625
	广河芸芥 × 97Q-6 Guanghe Yunjie × 97Q-6	100	120	124	178	296	376	376	376
	97Q-6 × 广河芸芥 97Q-6 × Guanghe Yunjie	100	117	134	143	224	284	298	298
	97Q-6 ⊙	100	135	153	151	241	416	484	559

2.3 芸芥与油菜杂交 F₁ 材料鉴定

1999 年秋在温室中种植芸芥 × 油菜杂交种子及其亲本,观察 F₁ 植株的形态变异情况,鉴定真伪杂种。播种 711 粒正、反交 F₁ 种子,获得 675 个 F₁ 植株。从植物学形态看,幼苗、叶片、花器都倾向于母本,没有表现出中间性状或带有父本性状的植株。

它们的育性与其母本完全一致,即母本为可育株时,F₁ 全部为可育株;母本植株为雄性不育株时,F₁ 全部为雄性不育株,初步判断这些植株至少在形态上属于偏母植株。F₁ 代材料开花后进行自交,F₁ 雄性不育株用相应的白菜型油菜和甘蓝型油菜授粉,结实正常。2000 年春播 F₁ 种子,F₂ 植株没有出现任

何分离现象,也未出现带有中间性状的植株,证明杂交所获种子全部为假杂种。

2.4 芸芥与甘蓝型油菜远缘杂交的花粉-柱头亲和反应观察

2.4.1 花粉粒在柱头表面的黏合

甘蓝型油菜自交,2 h 后就有大量花粉粒在柱头上附着,并有少数花粉粒萌发(图 1),平均每个柱头上黏合的花粉粒达到 69 粒;6~12 h,柱头上黏合的花粉粒接近高峰,平均达到 200 粒(表 4)。甘蓝型油菜 × 芸芥的远缘杂交组合,花粉较难在柱头上附着,即使附着在柱

头上,花粉附着的时间也较甘蓝型油菜自交时滞后,多数柱头上难以见到花粉粒。6~16 h,花粉粒附着数量明显增多,但远较甘蓝型油菜自交时为少。反交组合芸芥 × 甘蓝型油菜,花粉更难在柱头上附着,而且附着在柱头上的花粉粒数变异很大,多数柱头上只有少量花粉粒(图 5)。对芸芥进行剥蕾授粉自交,花粉在柱头上的附着情况与甘蓝型油菜和芸芥杂交的现象类似。与甘蓝型油菜自交相比,在相同时期,芸芥自交黏合在柱头上的花粉粒远远低于甘蓝型油菜自交。

表 4 芸芥与甘蓝型油菜不同杂交方式柱头上黏附的花粉粒数

Table 4 Number of pollen grains attached to the stigma in different types of pollination between *B. napus* and *E. sativa*

组合 Combination	授粉后时间 Hours after pollination (h)									
	1	2	4	6	8	12	24	48	72	120
甘蓝型油菜 [⊙] <i>B. napus</i> self	19.7.0 ±6.6	69.0 ±8.6	102.0 ±16.4	172.0 ±27.7	174.4 ±43.9	202.2 ±29.1	208.0 ±8.19	173.0 ±16.6	132.0 ±27.0	43.0 ±10.4
甘蓝型油菜 × 芸芥 <i>B. napus</i> × <i>E. sativa</i>	3.5 ±1.5		4.2 ±2.0	44.0 ±10.2	83.2 ±9.5	89.8 ±17.7	95.6 ±11.5	70.2 ±9.2	60.0 ±13.0	52.0 ±8.0
芸芥 × 甘蓝型油菜 <i>E. sativa</i> × <i>B. napus</i>	2.8 ±1.1	2.5 ±1.3	3.5 ±1.5	6.8 ±2.4	20.5 ±5.5	20.2 ±3.5	24.0 ±6.2	25.3 ±5.8	23.0 ±6.0	5.0 ±1.2
芸芥 [⊙] <i>E. sativa</i> self	10.0 ±3.5	15.0 ±4.6	32.4 ±7.1	50.3 ±8.2	83.0 ±12.4	107.0 ±11.2	118.3 ±7.6	117.0 ±15.6	110.0 ±13.8	80.0 ±18.5

2.4.2 花粉在柱头上的萌发及花粉管的生长

甘蓝型油菜 × 芸芥,花粉几乎难以在异属柱头上萌发,除在授粉后 24 h 的柱头上观察到少量几个萌发的花粉粒外,其余时段均未观察到萌发的花粉粒,并在花粉与柱头接触的部位观察到有大量胼胝质,胼胝质在荧光显微镜下发出黄绿色荧光(图 4)。芸芥 × 甘蓝型油菜,花粉同样在柱头上难以萌发,仅在授粉后 24 h 观察到少数几例花粉萌发的现象,并在花粉-柱头相接触的部位产生大量的胼胝质。

甘蓝型油菜自花授粉后 2 h,柱头即有少量花粉

萌发(图 1);4~8 h 有 50% 的花粉萌发(图 2);8~12 h,几乎全部花粉萌发(表 5,图 3)。在甘蓝型油菜自交时,发现柱头乳突细胞有胼胝质产生,这种现象与甘蓝型油菜有弱的自交不亲和性有关。与甘蓝型油菜自交相比,芸芥自交时花粉粒萌发明显推迟,花粉粒萌发数量明显减少。授粉后 6 h 才见到少量花粉粒萌发,8 h 左右有较多花粉粒萌发,24~48 h,全部花粉粒开始萌发(图 6)。由此可见,芸芥自交时花粉萌发的推迟,显然与其自交不亲和性有关。

表 5 芸芥与甘蓝型油菜不同杂交方式柱头上萌发的花粉粒数

Table 5 Number of germinated pollen grains in different types of pollination between *B. napus* and *E. sativa*

组合 Combination	授粉后时间 Hours after pollination (h)									
	1	2	4	6	8	12	24	48	72	
甘蓝型油菜 [⊙] <i>B. napus</i> self	0.0	16.4 ±3.3	64.8 ±10.3	130.5 ±15.5	163.0 ±14.3	190.5 ±90.5	137.0 ±18.6	136.0 ±15.4	128.0 ±15.9	
甘蓝型油菜 × 芸芥 <i>B. napus</i> × <i>E. sativa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.8 ±2.1	0.0	0.0	
芸芥 × 甘蓝型油菜 <i>E. sativa</i> × <i>B. napus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.5 ±1.8	0.0	0.0	
芸芥 [⊙] <i>E. sativa</i> self	0.0	0.0	0.0	25.8 ±6.1	40.0 ±5.6	69.0 ±16.2	88.0 ±9.5	78.0 ±14.5	75.0 ±13.2	

2.4.3 不同交配方式进入柱头的花粉管数

甘蓝型油菜 × 芸芥与芸芥 × 甘蓝型油菜的杂交组合中,花粉管均很难穿入柱头组织,但也曾观察到少数

几例花粉管穿入柱头组织的现象,同时发现有大量胼胝质产生。

甘蓝型油菜自交后 6 h 左右便有比较多的花粉

管穿入柱头;8~12 h,花粉管纷纷穿入柱头(图 3); 24~48 h,花粉管基本全部穿入柱头,进入花柱组织(表 6),很少有胼胝质产生。芸芥自交后 8 h 左右,

可观察到少量花粉管穿入柱头;24~48 h,有比较多的花粉管穿入柱头,并有花粉管进入花柱组织。

表 6 芸芥与甘蓝型油菜不同杂交方式进入柱头的花粉管数

Table 6 Number of pollen tubes in the stigma in different types of pollination between *B. napus* and *E. sativa*

组合 Pollination	授粉时间 Hours after pollination(h)							
	1	2	4	6	8	12	24	48
甘蓝型油菜 ⊙ <i>B. napus</i> self	0.0	0.0	8.3 ±2.5	25.0 ±5.4	108.0 ±15.6	150.0 ±12.6	120.0 ±20.5	118.0 ±18.4
甘蓝型油菜 ×芸芥 <i>B. napus</i> × <i>E. sativa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0 ±1.2
芸芥 ×甘蓝型油菜 <i>E. sativa</i> × <i>B. napus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0 ±1.3
芸芥 ⊙ <i>E. sativa</i> self	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8 ±2.1	30.5 ±7.6

3 讨论与结论

3.1 本研究表明,芸芥与芸薹属的 3 个油用种杂交时高度不亲和。共授粉 15 990 个柱头,获得 1 257 个角果、711 粒杂交种子及部分败育胚残迹。对 F_1 植株的形态学鉴定表明,它们均为偏母植株。Nishi S 在白菜型油菜 ×芸芥^[6]、Enink A H^[7-11] 在甘蓝 ×芸芥的研究中也获得了类似结果,而且他发现芸芥与芸薹属杂交时,在染色体 $n=10$ 和 $n=9$ 的一些种作母本、芸芥作父本的情况下,偏母种子形成频率更高。偏母植株的产生可能是异源父本花粉诱导的孤雌生殖所致^[7-11]。

3.2 通过苯胺蓝染色法对芸芥与甘蓝型油菜远缘杂交的花粉-柱头互作研究表明,芸芥与油菜杂交不亲和的原因较多,但主要是受精前障碍。芸芥与甘蓝型油菜杂交时,异源花粉很难在柱头上黏合和萌发,而且花粉黏合到柱头上的时间也较自交大大推迟;即使有少量花粉粒萌发,由于在花粉黏合的部位及其附近柱头乳突细胞内产生大量胼胝质,花粉管很难生长进入柱头,造成受精困难。Sampson D R 1961 年以 *Rapistrum rugosum*、*B. oleracea*、*Draba lanceolata*、*Erucastrum gallicium* 和芸芥等为材料研究十字花科种属间柱头-花粉相互作用^[11]、孟金陵在以甘蓝型油菜为母本,与白菜、甘蓝、黑芥、埃塞俄比亚芥和芥菜型油菜作父本的远缘杂交^[12-14]以及巩振辉在甘蓝与白菜^[15]、白芥与白菜的远缘杂交^[16]中也发现类似现象,如花粉黏合程度降低,花粉黏合时间推迟、异源花粉在柱头上萌发缓慢,花粉管生长迟缓,且发生严重扭曲、分叉畸形,与花粉管接触的柱头乳突细胞与花粉管中普遍产生胼胝质,花粉管常

常难以穿入柱头等现象,导致杂交不亲和^[17]。

3.3 芸芥与油菜杂交时,其亲和程度存在一定单向性。即当以油菜为母本,芸芥为花粉供体时,柱头上黏合的花粉粒数、萌发的花粉粒数、亲和指数和败育胚残迹数等均大于芸芥作母本、油菜作父本的反交组合,花粉黏合到柱头的速度亦正交大于反交。在其他许多植物中,如芸薹、番茄、辣椒、曼陀罗、烟草、亚麻等,均发现种间杂交时存在单向不亲和性,即栽培种或染色体数目多的种作母本的组合,亲和性大于野生种或染色体数目少的种作母本的组合^[11]。

3.4 芸芥与油菜的杂交亲和性大小与两个杂交亲本的亲缘关系亲疏有关。以结角率、亲和指数及败育胚残迹数来衡量芸薹属与芸芥的杂交亲和性,则亲和性大小次序为白菜型油菜 > 芥菜型油菜 > 甘蓝型油菜。芸芥的 EE 基因组与白菜型油菜 AA 基因组亲缘关系最近^[4],虽然甘蓝型油菜的 AACC 基因组与芥菜型油菜的 AABB 基因组中也含有 AA 基因组,但由于他们在长期的系统进化过程中,与白菜型油菜 AA 基因组已经形成一定差异,即亚基因组间的差异,这种差异可能是芸芥与白菜型油菜的杂交亲和性大于其他两种油菜的原因之一。

杂交亲和性还与亲本的基因型有关,如本研究中,与靖远芸芥有关的杂交组合,陇油 4 号 ×靖远芸芥、97Q-6 ×靖远芸芥杂交亲和性显著高于其他组合,而且陇油 4 号 ×靖远芸芥,无论正、反交,均获得了较多的杂交角果与败育胚残迹。显然,靖远芸芥是良好的杂交亲本。孟金陵^[13]在甘蓝型油菜与芥菜型油菜的远缘杂交中也发现,亲本基因型分别控制受精指数高低和结实性强弱。

本研究表明,虽然芸芥与油菜杂交存在高度不

亲和性,但还是有少量花粉能够萌发,而且对杂交所得角果内含许多败育胚残迹,说明完全有可能发生受精作用,产生合子而形成杂种胚,只不过这种杂种胚在授粉后9 d即败育。因此,通过选择适宜的亲本和杂交技术,如筛选杂交亲和基因型、利用雄性不育材料与自交亲和亲本材料、组配适宜的杂交组合、采用子房培养和胚培养等手段,是能够获得芸芥-油菜杂种的^[18]。

致 谢:甘肃省农业科学院田际良副研究员、湖南农业大学农学系刘忠松博士、甘肃省农业科学院张建平博士、程鸿助理研究员审阅本文并提出了宝贵修改意见,在此一并表示衷心感谢。

References

- [1] 侯喜林,曹寿椿,吴志行. 十字花科作物几种重要细胞质雄性不育类型及其利用. 长江蔬菜, 1999, 5: 1 - 3 (in Chinese)
- [2] Sun W-C, Zhang T. Assessment on drought tolerance of *Eruca sativa* genotype from northwestern China, 10th international rapeseed congress, Canberra, 1999. 217
- [3] Sun W-C(孙万仓), Guan C-Y(官春云), Zhang J-W(张金文), Meng Y-X(孟亚雄), Liu Z-G(刘志刚), Zhang T(张涛), Li X(李焱), Chen S-Y(陈社元). Genetic diversity analysis of Yunjie (*Eruca sativa* Mill.) in China by RAPD marker. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2003, 36(11): 1 248 - 1 253
- [4] Guan C-Y(官春云), Li X(李焱), Li W-B(李文彬). Bioengineering in Brassica Plants(芸薹属植物的生物工程). Changsha: Hunan Sci & Tech Press, 1999. 217 - 238 (in Chinese)
- [5] Zhang T(张涛), Sun W-C(孙万仓). The advancement on the study of intergeneric crosses of *Eruca sativa* Mill. and Brassica crops. *Chinese Journal of oil Crop Sciences* (中国油料作物学报), 2003, 25(2): 107 - 109
- [6] Nishi S, Kuriyama T, Hiraoka T. Studies on the breeding of crucifer vegetables by interspecific and intergeneric hybridization. *Bull Hort Res Sta* (Japan, ser. A), 1964, 245 - 250
- [7] Eenink A H. Matromorphy in *Brassica oleracea* L. . Differences in parthenogenesis ability and parthenogenesis inducing ability. *Euphytica*, 1975, 23: 435 - 444
- [8] Eenink A H. Matromorphy in *Brassica oleracea* L. . The influence of temperature, delayed prickle pollination and growth regulators on the number of matromorphic seed formed. *Euphytica*, 1974, 23: 711 - 718
- [9] Eenink A H. Matromorphy in *Brassica oleracea* L. . Formation of homozygous and heterozygous diploid products of gametogenesis and quantitative genetical research on matromorphic plants. *Euphytica*, 1974, 23: 719 - 724
- [10] Eenink A H. Matromorphy in *Brassica oleracea* L. . Studies on quantitative characters of matromorphic plants and their progeny. *Euphytica*, 1974, 23: 725 - 726
- [11] Sampson D R. Intergenic pollen-stigma incompatibility in the cruciferae. *Can J Genet Cytol*, 1962, 4: 38 - 49
- [12] Meng J-L(孟金陵). Studies on the interspecific compatibility of *Brassica napus* × *B. oleracea* . The pollen-pistil interaction and early development of hybrids. *Journal of Huazhong Agricultural University* (华中农业大学学报), 1987, 6(3): 203 - 209
- [13] Meng J-L(孟金陵), Wu J-S(吴江生), Han J-X(韩继祥). Influence of genotypes of female parent on the interspecific crossability of rapeseed. *Crop Research* (作物研究), 1992, 6(2): 28 - 32
- [14] Meng J-L(孟金陵). Studies on pollen-pistil interaction between *Brassica napus* and its relative species and genus. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1990, 16(1): 19 - 25
- [15] Gong Z-H(巩振辉), He Y-K(何玉科), Wang F(王飞), Li H-J(李华君). Studies on pollen-pistil interaction between cabbage and Chinese cabbage. *Acta Univ Agri Boreali-occidentalis* (西北农业大学学报), 1992, 20(3): 1 - 6
- [16] Gong Z-H(巩振辉), He Y-K(何玉科), Wang M(王鸣), Wang F(王飞). Studies on pollen-stigma interaction between Chinese cabbage and white mustard. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* (西北农业学报), 1994, 3(1): 35 - 38
- [17] Dumas C, Knox R B. Callose determination of pistil viability and incompatibility. *Theor Appl Genet*, 1983, 67(1): 1 - 10
- [18] Agnihotri A, Gupta V, Malathi S. Production of *Eruca-Brassica* hybrids by embryo rescue. *Plant Breeding*, 1998, 104: 281 - 289