

‘青露’菜薹三倍体的获得及其胚胎学观察

张成合 张书玲 申书兴 王 梅 王彦华

(河北农业大学园艺系, 保定 071001)

摘 要: 对‘青露’菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的结实性及细胞胚胎学进行了观察。结果表明, $4x \times 2x$ 的成熟荚内平均有 40.13% 具幼龄胚的小粒种子, 而 $2x \times 4x$ 没有; 小粒种子的幼胚多处于心形胚晚期。幼胚发育停滞或败育主要是胚乳提早退化和内珠被细胞大量坏死, 营养来源断绝所致; $2x \times 4x$ 的胚胎败育方式与 $4x \times 2x$ 基本相似, 但发生的时期较早且彻底; 小粒种子在 $1/2$ MS 培养基上萌发成苗率为 95.9%; 被鉴定的 46 个小粒种子植株均为三倍体 ($2n=3x=30$); 三倍体植株能正常生长发育, 与二倍体原种回交, 结籽率高达 27.12%。

关键词: 菜薹; 胚胎学; 三倍体

中图分类号: S 634; Q 943 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 04-0317-06

植物三倍体是用以分离“三体”、“单体”等非整倍体的最有效的桥梁材料。获得三倍体的途径一般是利用四倍体与二倍体进行杂交。但十字花科植物中倍性间杂交存在高度不孕的现象, 如胡金良等^[1]、刘学岷等^[2]分别在小白菜、大白菜四倍体与二倍体杂交中均未获得三倍体植株, 迄今在十字花科芸薹属植物中尚未见有获得三倍体的报道。近年来, 我们在菜薹同源四倍体育种的基础上, 对其四倍体和二倍体进行正、反交观察, 发现以四倍体作母本 ($4x \times 2x$), 成熟荚内有许多大小为正常籽粒 $1/3$ 左右的具幼胚的小籽粒, 而以二倍体作母本 ($2x \times 4x$), 荚内则无小籽粒。这种现象在以往的植物倍性间杂交研究中未见报道。为此, 我们对‘青露’菜薹 (*Brassica parachinensis* L. H. Bailey) $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的授粉受精及胚胎发育过程进行了观察比较, 并对获得的小籽粒进行了培养拯救, 旨在从胚胎学上揭示其差异的实质, 并为获得三倍体植株寻求解决途径。

1 材料与方法

试材为青露菜薹的一个自交株系 ($2n=2x=20$) 及其同源四倍体 ($2n=4x=40$, 作者经秋水仙素诱变选育而成), 种植于日光温室, 于开花期选大小基本一致的花蕾进行人工去雄和授粉。分别在授粉后的 2、6、10、14、24、48、56、64 h 和 3、4、5、7、9、11、13、14、15、16、17、20 d 取雌蕊或幼荚 10~15 个, 于 FAA 固定液中固定, 用以压片或石蜡切片。采用 Frankling 的方法观察花粉在柱头上的萌发及花粉管在雌蕊中的生长, 常规石蜡切片法观察雌、雄配子受精及胚胎的发育过程。石蜡切片厚度为 8~10 μ m, 铁矾—苏木精染色, 固绿复染, 部分切片用 PAS 法染色, Olympus BH-2 型光学显微镜观察和照相。以 $1/2$ MS 培养基对杂交获得的小籽粒进行培养拯救; 用根尖或花粉母细胞压片方法鉴定杂交子代的倍性; TTC 染色法测定花粉活性; 用三倍体植株与二倍体植株回交的方法

测定雌配子的受精率。

2 结果与分析

2.1 菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的结实性比较

试验结果表明, $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 均能正常结荚, 但荚内成熟籽粒很少, 前者为 0.37 粒/荚, 后者为 0.33 粒/荚。不同的是, 前者荚内还有许多大小为正常成熟籽粒 $1/3$ 左右具幼胚的小籽粒, 而后者则无此小籽粒 (表 1)。这表明两者在授粉受精或胚胎发育的某个环节上可能存在差异。

表 1 菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的结实性比较

Table 1 Comparison of seed set between $4x \times 2x$ and $2x \times 4x$ in false pakchoi

组 合 Combination	花 蕾 数 Flower buds	胚珠数/子房 Ovules/ovary	大粒种子/荚 Normal seeds/pod	小粒种子/荚 Small seeds/pod	小 籽 粒 率 Rate of small seed (%)
$4x \times 2x$	43	28.9	0.37	11.65	40.31
$2x \times 4x$	41	29.5	0.33	0	0
$2x$ (CK)	30	30.2	23.4	0	0
$4x$ (CK)	30	28.6	12.2	0	0

2.2 菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的授粉受精比较

通过荧光显微镜观察到, $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的花粉萌发、花粉管在花柱及子房中的生长均能正常进行。花粉管由珠孔进入胚珠之后呈明亮的浅黄色 (图版, 1), 这与无花粉管进入的胚珠形成鲜明的对比。对授粉后 56 h 子房内有花粉管进入的胚珠数和授粉后 5 d 子房内膨大的胚珠数进行了统计比较。由表 2 可知, $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 中有花粉管进入的胚珠率和膨大胚珠率均达 70% 以上, 这表明菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的结实性差异不是由授粉受精的障碍所致。

表 2 菜薹有花粉管进入的胚珠率与膨大胚珠率的比较

Table 2 Comparison between rates of ovules with pollen tube and inflated ovules

组 合 Combinations	观察子 房数 Observed ovaries	有花粉管进入 的胚珠率 Rate of ovules with pollen tube (%)	膨大胚珠率 Rate of inflated ovules (%)
$4x \times 2x$	15	78.5	76.5
$2x \times 4x$	15	75.6	72.2
$2x$ (CK)	12	82.9	78.8
$4x$ (CK)	15	76.6	46.9

2.3 菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的胚胎发育比较

有关菜薹二倍体 ($2x$) 和四倍体 ($4x$) 的胚胎发育过程作者已作过报道^[3]。与菜薹二倍体和四倍体的胚胎发育比较, $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的胚胎发育均存在异常现象。在 $4x \times 2x$ 杂种中, 心形胚形成以前, 胚胎和胚乳一般能正常发育, 如球形胚早期胚乳呈游离核状态, 球形胚中、晚期, 胚乳核已形成胚乳细胞并充满胚体的周围空间 (图版, 2), 但心形胚形成以后, 胚乳便开始迅速退化消失, 随之内珠被细胞出现坏死 (图版, 3), 从而使胚胎发育因缺乏营养供给而受到阻碍。到授粉后 20 d, 内珠被细胞已全部坏死, 停滞在心形胚中期或后期阶段的幼胚被紧紧地包裹在坏死组织之中而完全停止生长发育 (图版, 4, 5); 与 $4x \times 2x$ 相比, $2x \times 4x$ 主要表现有两点不同, 其一, 由胚乳核形成胚乳细胞的时期较晚, 在球形胚中、后期, $4x \times 2x$ 的胚乳已完全细胞化 (图版, 2), 而 $2x \times 4x$ 的胚乳则仍处于胚乳核状态 (图版, 6); 其二, 胚乳、胚胎发生败育的时期早, 胚胎一般仅能发育到球形胚的中、后期阶段, 而此时胚乳核已开始解体退化, 内珠被细胞亦出现坏死现象

(图版, 6), 到授粉后 14 d, 球形胚大小的胚胎已明显趋于解体退化 (图版, 7), 到授粉后 20 d, 胚胎已完全解体退化 (图版, 8)。由上述可见, $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 胚胎败育方式基本相似, 都是伴随着胚乳的退化、内珠被细胞的坏死, 使胚胎因断绝营养而死, 不同的是前者在胚胎停滞生长发育之前已有了明显的组织和器官分化, 因此胚胎干化后能形成具幼胚的小粒种子, 而后者在胚胎进行组织和器官分化之前即已解体退化, 故败育非常彻底。

2.4 菜薹小粒种子培养获得三倍体植株

将消毒的小粒种子接种在 1/2 MS 培养基上进行培养拯救。结果表明, 在 25 °C 下培养 7 d 后, 绝大多数小籽粒已萌发, 萌发成苗率达 95.9%, 可见心形胚后期阶段的幼胚已完全具备了形态建成的能力, 对具这类幼胚的小粒种子进行培养拯救很容易成功。

试验中, $4x \times 2x$ 共获得 501 粒小粒种子和 16 粒大粒种子, $2x \times 4x$ 只获得 11 粒大粒种子。经细胞学鉴定, $2x \times 4x$ 的 11 粒大粒种子植株均为二倍体, $4x \times 2x$ 的 16 粒大粒种子植株中有两株为三倍体, 其余 14 株为四倍体, 而随机鉴定的 46 株小粒种子植株均为三倍体 ($2n=3x=30$, 图版, 9)。由此可见, 在通过二倍体与四倍体杂交获得三倍体的研究中, 应特别注意保留和培养那些具幼胚的小粒种子, 这对倍性间杂交不易成功的植物种类来说或许是获取三倍体的一个有效途径。

2.5 菜薹三倍体同源组的分离与雌、雄配子的育性

对菜薹三倍体同源组的分离及雌、雄配子的育性进行了观察。由表 3 可见, 菜薹三倍体的 10 个同源组在后期 I 分向两极的染色体很不均衡, 从 20/10~15/15 的分离均有分布, 其中 14/16 的分离最多, 占 35.15%, 10/20 的最少, 占 0.84%。一般来说只有那些含有完整染色体组的配子才是可育的。菜薹染色体基数为 $x=10$, 按理论计算, 产生具完整染色体组的雌、雄配子 ($n=x=10$ 或 $n=2x=20$) 的概率应分别为 $(1/2)^{10}=1/1024$ 和 $(1/2)^9=1/512$, 即 0.098% 和 0.195%, 而实际有生活力的花粉率为 56.26%, 三倍体与二倍体原种回交的结籽率为 27.12% (表 4), 均远远高于理论比率, 这表明有些具染色体数或染色体组成不均衡的配子是有生活力的, 但哪些有生活力的非均衡的花粉和哪些非均衡的雌配子参与了受精尚有待进一步研究。

表 3 菜薹三倍体 10 个同源组的染色体分离

Table 3 Chromosome distribution of 10 homologues

花粉母 细胞数 No. of PMC	in the triploid false pakchoi (%)						其他 Others
	染色体分离 Chromosome distribution	10/20	11/19	12/18	13/17	14/16	
239	0.84	3.77	10.46	23.43	35.15	23.01	3.35

表 4 菜薹三倍体的花粉活性和结籽率

Table 4 Pollen viability and seed setting of

triploid false pakchoi

材 料 Material	观察花 粉数 Pollen observed	有活性花 粉数 Pollen with viability	花粉生活力 Rate of pollen with viability (%)	结籽率 Seed setting (%)
3x	1 250	56.24	703	—
$3x \times 2x$	—	—	—	27.12
$2x$ (CK)	980	939	95.82	77.5

3 讨论

被子植物中异倍体间杂交不稔是比较普遍的现象, 如谷子二倍体与四倍体间杂交获得三倍体的频率仅为 0.24%^[4], 水稻为 0.07%^[5], 而在大白菜和小白菜中则均未获得三倍体^[1,2]。这在一定程度上影响了植物三倍体的研究和利用。最近, 我们在菜薹、甘蓝和芥

蓝等种内四、二倍体杂交中看到荚内都有一些并不很皱瘪的小籽粒，尤其是菜薹，小籽粒率高达 40.31%，这类小籽粒在适当的培养基上很容易萌发成苗，经细胞学鉴定均为三倍体。因此，在植物异倍体间杂交中注意保留和培养那些具幼胚的小籽粒可能是获得三倍体的一个有效途径。在菜薹 $4x \times 2x$ 和 $2x \times 4x$ 的杂交中，还都得到了少量籽粒大小基本正常的种子，经染色体数目鉴定，这些籽粒的倍性大都与其母本的倍性相同。分析其原因很可能是由于杂交过程中，在去雄、授粉和套袋隔离的某个环节上操作不够严格而造成花粉污染的结果，也可能由二倍配子体无融合生殖或自然产生未减数的 $2n$ 雌雄配子所致。此外，在 $4x \times 2x$ 中得到的籽粒大小基本正常的种子中，还鉴定出 2 粒为三倍体。事实上，在 $4x \times 2x$ 的小粒种子中，籽粒的大小也不完全一致，其幼胚所处的发育阶段也不尽相同，有的处于心形胚中期，有的处于心形胚晚期。这种胚胎发育程度的差异是否与不同的基因组合有关还有待深入研究。

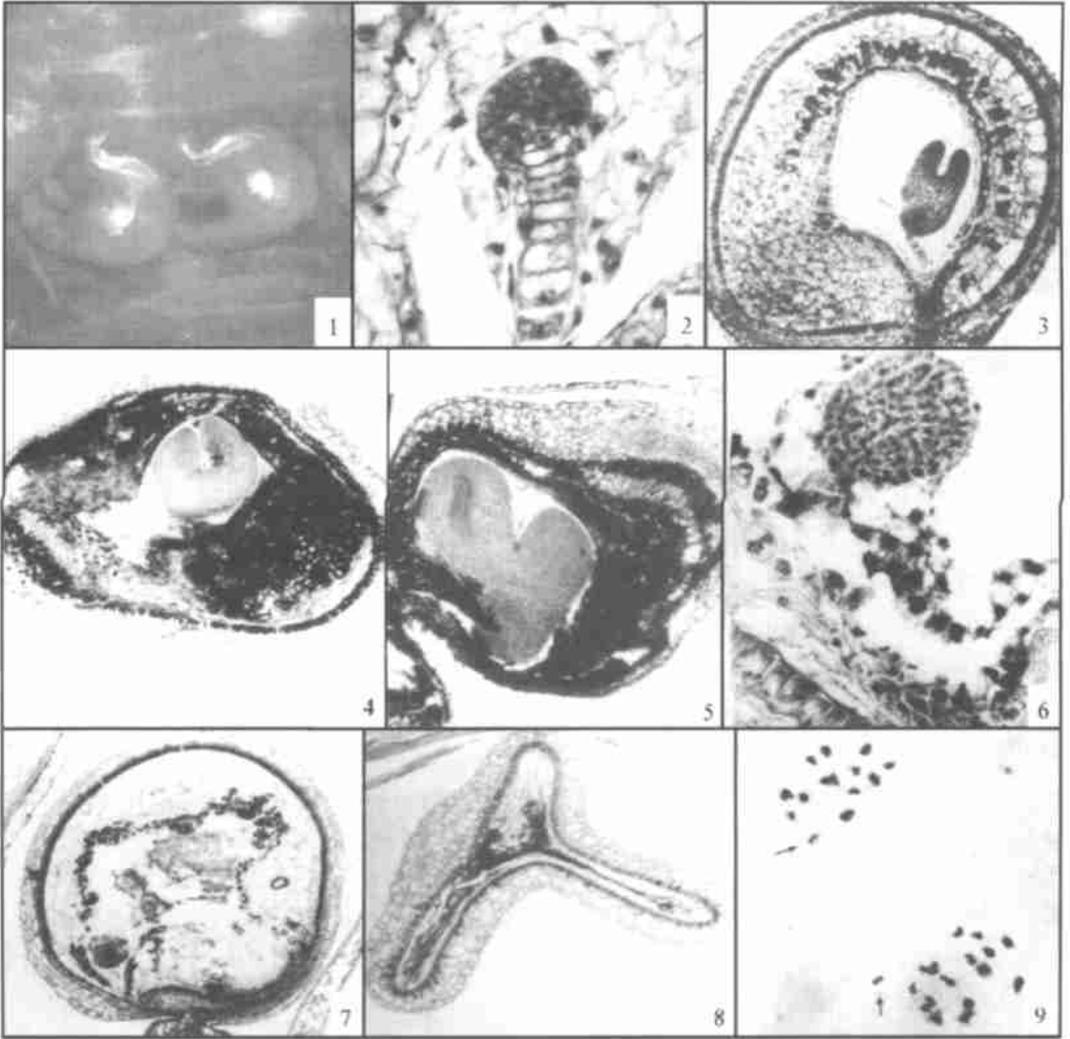
大量的研究表明，引起异倍体间杂交不稔的原因主要是胚胎在发育过程中发生了败育。关于胚胎败育的原因，一般认为与胚乳的异常退化有关，如张新宁^[6]在枸杞，Mcleman 等^[7]在苜蓿，申书兴等^[8]在番茄的四、二倍体杂交中都看到胚乳过早地退化。我们在菜薹倍性间杂交的胚胎学观察中亦看到胚乳提前退化的现象，尤其是 $2x \times 4x$ 在胚乳核尚未形成胚乳细胞之前就已解体退化，显然这与胚胎的发育受阻或败育有关。但胚乳的异常退化并非造成菜薹胚胎败育的唯一因素，观察中看到，伴随着胚乳的衰退，内珠被细胞迅速坏死。内珠被细胞的坏死不仅使胚胎发育失去了一个重要的营养物质来源，而且坏死的细胞组织也可能阻塞营养物质的运输通道，因此内珠被细胞的坏死也是导致菜薹胚胎败育或发育受阻的重要因素之一。

一般而言，由三倍体产生的配子是高度不育的，尤其是花粉，如三倍体谷子的花粉几乎全无活性^[4]。但在三倍体菜薹中看到，花药能正常开裂散粉，花粉量也比较充足，花粉生活力高达 56.26%。三倍体的育性与染色体基数有关，染色体基数少的物种产生具完整染色体组的配子的机率较大，育性较高。但谷子的染色体的基数为 $x=9$ ，而菜薹为 $x=10$ ，看来植物三倍体的育性也存在着种间或基因型间的差异。

植物三倍体是用以创造“三体”等系列非整倍体遗传材料的最有效的工具之一。因此，菜薹三倍体的成功获得为其“三体系”的建立等遗传基础研究奠定了基础。

参考文献:

- 1 胡金良, 徐汉卿, 刘惠吉. 二倍体和四倍体小白菜的胚胎学研究. 南京农业大学学报, 1996, 19 (4): 15~19
- 2 刘学岷, 申书兴, 孙日飞. 大白菜二倍体与四倍体杂交后代倍性及胚胎学观察. 园艺学报, 1996, 23 (3): 309~311
- 3 张书玲, 张成合, 刘世雄, 等. 菜心二、四倍体授粉受精及胚胎发育比较. 园艺学进展第四辑. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2000. 326~331
- 4 王润奇, 高俊华, 王志兴, 等. 谷子三体系的建立. 粟类作物, 1994, 36 (9): 690~693
- 5 黄群策, 孙敬三. 通过异倍性水稻间杂交获得同源三倍体植株. 植物学报, 1999, 41 (7): 741~746
- 6 张新宁, 沈效东, 王锦秀. 枸杞四倍体同二倍体杂交败育的形态分析及解决办法. 宁夏农村科技, 1996, 4: 16~18
- 7 Mcleman, H. A. Cytogenetic behaviour of alfalfa hybrids from tetraploid by diploid crosses. Can. J. Genet. Cytol., 1996, 8: 544~555
- 8 申书兴, 邹道谦. 普通番茄四倍体与二倍体杂交的杂种不育性研究. 遗传学报, 1991, 18 (6): 520~524



图版说明 1. $4\times 2\times$, 授粉后 56 h, 花粉管进入胚囊。2. $4\times 2\times$, 授粉后 11 d, 球形胚中后期, 胚乳已细胞化。3. $4\times 2\times$, 授粉后 14 d, 心形胚中后期, 胚乳已退化消失, 内珠被细胞出现坏死。4. 5. $4\times 2\times$, 授粉后 20 d, 内珠被细胞已完全坏死, 胚胎停滞在心形胚中后期阶段。6. $2\times 4\times$, 授粉后 11 d, 球形胚阶段, 胚乳核尚未形成胚乳细胞, 但已解体。7. $2\times 4\times$, 授粉后 14 d, 胚乳已完全消失, 内珠被细胞出现坏死, 胚体已明显退化。8. $2\times 4\times$, 授粉后 20 d, 胚胎已完全退化解体。9. 三倍体, 减数分裂后期 I (14/16 分离, \uparrow 示提前分离的染色单体)。

Explanation of plate 1. $4\times 2\times$, 56 h after pollination, the pollen tube has entered the micropyle. 2. $4\times 2\times$, 11 days after pollination, shows globe shaped embryo and endosperm cells. 3. $4\times 2\times$, 14 days after pollination, heart shaped embryo, endosperm disappeared, some cells of inner integument dying off. 4- 5. $4\times 2\times$, 20 days after pollination, almost all the inner integument cells died, late heart shaped embryo stopping development. 6. $2\times 4\times$, 11 days after pollination, globe shaped embryo stage, endosperm nuclei has not turned into cells but beginning to collapse. 7. $2\times 4\times$, 14 days after pollination, endosperm disappeared, inner integument cells dying off, embryo collapsed obviously. 8. $2\times 4\times$, 20 days after pollination, embryo collapsed completely. 9. Triploid, meiosis anaphase I (14/16 segregation, \uparrow showing pre segregated chromatid).

Observation on Obtaining the Triploid by $4x \times 2x$ and Its Cytoembryology in False Pakchoi

Zhang Chenghe, Zhang Shuling, Shen Shuxing, Wang Mei, and Wang Yanhua
(Department of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Abstract: The diploid false pakchoi (*Brassica parachinensis* L. H. Bailey) and its tetraploid line were used to create triploid hybrids by reciprocal crossing. The result indicated that in the combination of $4x \times 2x$, about 40.13% smaller seed with late heart-shaped embryo were obtained, but in the combination of $2x \times 4x$, no similar seeds were formed in the ripe pods. The embryological studies showed, the main cause of leading to the young embryo stopping development or embryo collapse is the inner integument cells dying off following the endosperm degeneration abnormally. The way of causing the embryo collapse is similar in both combinations, but the time of occurring embryo collapse is obviously earlier in the $2x \times 4x$ than in the $4x \times 2x$, generally at glob-shaped embryo stage in the former and at the late heart shaped embryo stage in the latter. Because there was no organogenesis at the glob-shaped embryo stage, therefor the embryo collapsed very thoroughly and no seed formed in the $2x \times 4x$. Under the tissue culture condition ($1/2$ MS medium, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), the smaller seeds with young embryo can germinate slowly and form normal seedlings. By cytological identification, all seedlings identified by cytological observation are triploids ($2n = 3x = 30$); The triploid plants developed normally, and seed setting of the $3x \times 2x$ was as high as 27.12%, which laid a foundation for selecting a complete set of trisome of false pakchoi.

Key words: *Brassica parachinensis*; Embryology; Triploid

《园艺学报》2002 年改为大 16 开本

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术刊物, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物和西瓜、甜瓜等方面未曾发表的学术论文、研究报告、研究简讯、经过省(直辖市)级审定或鉴定的新品种、学术活动报道及广告等。读者对象主要是园艺科研人员、大专院校师生及专业技术人员。2002 年改为大 16 开本, 96 页, 双月 25 日出版。每期定价 6 元, 全年 36 元。国内外公开发行, 全国各地邮局办理订阅, 邮发代号: 82-471, 漏订者可直接寄款至本编辑部订购。国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 BM448。自办发行本刊 2000 年增刊和 2001 年增刊, 每册 10 元, 欲购者请与编辑部联系。地址: 北京中关村南大街 12 号 中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮政编码: 100081, 电话: (010) 68919523。