

研究报告
RESEARCH REPORT

水稻与高粱属间远缘杂交花粉管行为观察

丘杰 杨必建 江良荣* 黄育民 王侯聪

厦门大学生命科学学院, 厦门, 361005

* 通讯作者, lrjiang@126.com

摘要 水稻和高粱是禾本科的两个异属作物, 因其遗传距离较远, 杂交表现不亲和, 结实率极低, 难以获得种子。为初步了解水稻与高粱属间远缘杂交花粉管行为, 探索该远缘杂交的发生过程, 本实验以籼稻珍汕97A×珍汕97B和II-32A×II-32B两个组合为对照, 对珍汕97A×晋江多枝高粱和II-32A×晋江多枝高粱两个属间远缘杂交组合的花粉管行为作初步的观察与研究, 结果表明, 晋江多枝高粱花粉粒能象水稻花粉粒一样在水稻柱头上正常萌发, 花粉管在花柱及子房中生长与伸长, 有些能最终到达子房的基部; 同时高粱花粉管生长也出现诸如不能进入花柱、胼胝质不规则堆积、花粉管末端钝化等一系列的异常表现, 致使不少花粉管停滞生长。

关键词 水稻, 高粱, 属间杂交, 花粉管行为

Pollen Tube Behaviour of Interspecies Hybridization between Rice and Sorghum Observation

Qiu Jie Yang Bijian Jiang Liangrong* Huang Yumin Wang Houcong

School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, 361005

* Corresponding author, lrjiang@126.com

ABSTRACT Rice and Sorghum belongs to different genus. Distant hybridization between them becomes incompatible because of their further genetic distance. In order to detect the process of distant hybridization and the behavior of pollen tubes in the process, we conducted primary observation and research of the behavior of pollen tubes between two hybridization combinations of Zhenshan97A×Jinjiangduozhi sorghum and II-32A×Jinjiangduozhi compared with that of Zhenshan97A×Zhenshan97B and II-32A×II-32B. The results showed that the pollen of Jinjiangduozhi sorghum can germinate on the rice stigma normally just as rice's pollen. The pollen tubes also can grow and elongate on the style and ovary, some can reach the base of the ovary eventually. Meanwhile, the pollen tubes of sorghum present a series of abnormal phenomenon, such as pollen tubes unable to enter into the style, callose depositing irregularly and the bottom of pollen tubes getting passivated, which brings about many pollen tubes stagnate.

KEYWORDS Rice(*Oryza sativa* L.), Sorghum(*Sorghum bicolor* L.), Intergeneric hybridization, Pollen tube behavior

远缘杂交能为一些物种引入新的遗传资源, 增加该特种遗传物质的杂合性, 有利于杂种优势的利用, 丰富物种的优质性状, 不断创造新的种质。远缘杂交育种将是本世纪作物超高产育种的一个重要的重要途径(蔡得田等, 2001)。我国早在上世纪20年代就开始了远缘杂交的研究, 在一些方面取得了举世

瞩目的成就, 如水稻野败细胞质雄性不育的利用, 直接催生了水稻的“三系”育种。然而远缘杂交的理论研究相对于应用研究, 却严重地滞后。虽然国内外有些学者在染色体组型(程尧楚等, 1995, 湖南农业科学, (1): 10-13)、花粉管行为与胚胎发育(王景林, 1995; 李楠等, 1995; 梁铁金和母锡金, 1995; 黄群策

等, 2004)、分子标记鉴定(刘春林等, 1998, 湖南农业科学, (1): 22-23; 邱纪文等, 1999, 科学通报, 44(20): 2162-2166)及后代表型分离(Barre et al., 1998; 赵秀琴等, 2003)等方面开展了一些研究工作, 初步了解远缘杂交是部分遗传物质的导入, 但其杂交过程却还不甚明了, 有待于作深入地研究。

高粱是 C_4 作物, 具有高光效、抗倒伏、粒密、穗大、适应性好等诸多优点。利用高粱花粉与水稻杂交, 将其某些优良性状遗传物质导入水稻中, 对水稻的超高产育种具有重要意义。高粱和水稻是禾本科的两个异属作物, 杂交出现严重不亲和, 往往很难获得种子。距今为止, 我国利用水稻与高粱杂交育成的品种仅有 5 个, 其中 4 个品种于 1967-1968 年育成(林世成和闵绍楷主编, 1991, 中国水稻品种及其系谱, 上海科技出版社, 中国, 上海), 另一个——超丰早 1 号是 1997 年湖南农业大学水稻科学研究所育成的(伏军, 1999)。一些学者对水稻与高粱杂交后代进行了染色体组型分析(程尧楚等, 1995, 湖南农业科学, (1): 10-13)和分子标记鉴定(刘春林等, 1998, 湖南农业科学, (1): 22-23)等方面的研究, 但还未见有关水稻与高粱远缘杂交受精行为和胚胎发育方面的报道。本研究对高粱花粉在水稻柱头上的萌发、生长行为进行对比观察, 以初步了解高粱与水稻属间远缘杂交的花粉管行为表现, 为进一步研究其受精行为、胚胎发育作准备。

1 材料与方法

1.1 供试材料

水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种珍汕 97A 和珍汕 97B、II-32A 和 II-32B, 高粱(*Sorghum bicolor* L.) 品种是晋江多枝高粱(文中简称高粱)。

1.2 杂交方法

为尽可能避免假杂种, 同时促使珍汕 97A (II-32A) 颖壳充分张开, 将珍汕 97A (II-32A) 试验株 (2 株) 进行温烫杀雄 (45℃ 温水, 5min) 处理, 并剪除颖壳的前半端。处理过的珍汕 97A (II-32A) 中的 1 株授予高粱花粉, 另 1 株授予珍汕 97B (II-32B) 花粉, 作为对照, 然后套袋隔离。

1.3 取样方法

2004 年 10 月, 在厦大农场进行珍汕 97A 与高粱杂交实验, 取样组合有 2 个: 珍汕 97A×高粱和珍

汕 97A×珍汕 97B。授粉后 5、15、30、50、70、100、130、160、190、210、240min 分别取样, 每个品种取 20 粒, 用卡诺氏固定液(乙醇:冰醋酸=3:1)固定。

2005 年 6 月, 在厦大农场进行 II-32A 与高粱杂交实验, 取样组合有 2 个: II-32A×高粱和 II-32A×II-32B。授粉后 5、15、30、60、90、120、150、180min 分别取样, 处理方式同上。

1.4 染色及压片

染色及压片参照刘国成(1993, 北方果树, 2: 30)的方法。

1.5 显微镜观察方法

利用荧光显微镜(OLYMPUS BX41)在 WU(紫外光)激发光下观察拍摄结果, 花粉粒和花粉管均清晰可见。

2 结果分析

2.1 花粉粒的萌发与花粉管的伸长

授粉 5min 后, 无论是授予水稻(珍汕 97B 和 II-32B)花粉还是高粱花粉(晋江多枝高粱高粱), 花粉粒在水稻柱头(珍汕 97A 和 II-32A)上都很快地萌发, 并迅速长出花粉管来, 长度可达花粉粒直径的 $1/2-2d$ (d 为花粉粒的直径)(图 1)。相对而言, 水稻花粉粒萌发稍快点, 伸长得较快, 此时也有少部分花粉管进入柱头的羽状组织。而高粱花粉粒很多刚露出萌发孔, 不少也长出花粉管, 但长度相对较短, 大多在羽状组织表面盘绕, 还没有花粉管进行柱头的羽状组织。15min 后, 除极少数高粱花粉粒还未萌发外, 绝大部分高粱花粉管长度达 $2d$ 左右, 这些花粉管大部分在柱头羽状组织上盘绕, 只有极小部分进入羽状组织中, 而水稻花粉管已穿过柱头羽状组织, 到达柱头(图 2)。60min 前后, 大量高粱花粉管穿过柱头并在花柱中快速伸长, 此时, 水稻花粉管已达到了子房顶部(图 3)。100min 前后, 大量高粱花粉管达到子房顶部; 水稻花粉管则到达子房的中下部, 甚至是基部(图 4)。150min 后, 两种杂交组合中, 花粉管都到达子房基部, 水稻与水稻杂交组合(珍汕 97A×珍汕 97B 和 II-32A×II-32B 两个杂交组合)中, 花粉管留下明显进入珠孔的痕迹, 水稻与高粱杂交组合(珍汕 97A×高粱和 II-32A×高粱两个杂交组合)中也好象有花粉管进入进入珠孔的迹象(图 5)。由此可见, 晋江多枝高粱高粱花粉粒能在水稻柱

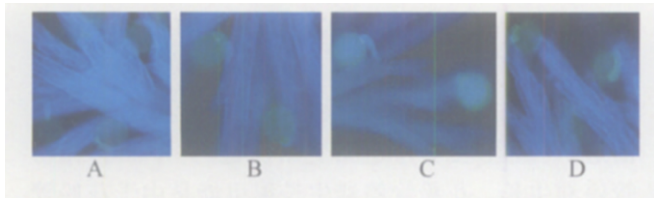


图 1 授粉 5min 后花粉粒在水稻柱头上的萌发情况($\times 400$)
注 :A 是珍汕 97A \times 晋江多枝高粱组合 ;B 是珍汕 97A \times 珍汕 97B 组合 ;C 是 II -32A \times 晋江多枝高粱组合 ;D 是 II -32A \times II -32B 组合(图 2-4 同)

Figure 1 The germination of the pollened microspores on the rice stigmas ($\times 400$) in 5 minutes

Note: A is from Zhenshan97A \times Jinjiangduozhi sorghum, B is from Zhenshan97A \times Zhenshan97B, C is from II -32A \times Jinjiangduozhi sorghum and D is from II -32A \times II -32B (the same to figure 2-4)

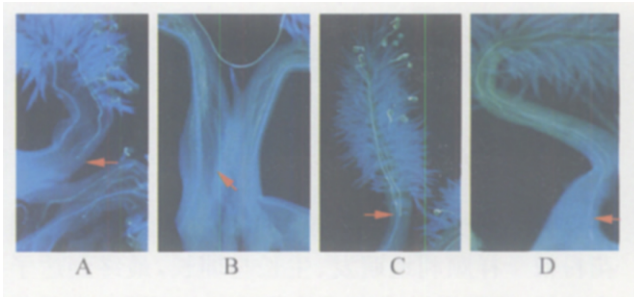


图 3 授粉 60min 后花粉管在水稻柱头中的生长情况($\times 100$)

注 :A & C: 高粱花粉管穿过水稻柱头并在花柱中快速伸长 ;B & D: 水稻花粉管已达到了子房顶部(箭头所示)

Figure 3 the growth and elongation of pollen tubes in rice stigmas ($\times 100$) in 60 minutes

Note: A & C: Sorghum pollen tubes quickly elongated in the rice stigmas ;B & D: Rice pollen tubes arrived at the top of the rice ovary (Arrow)

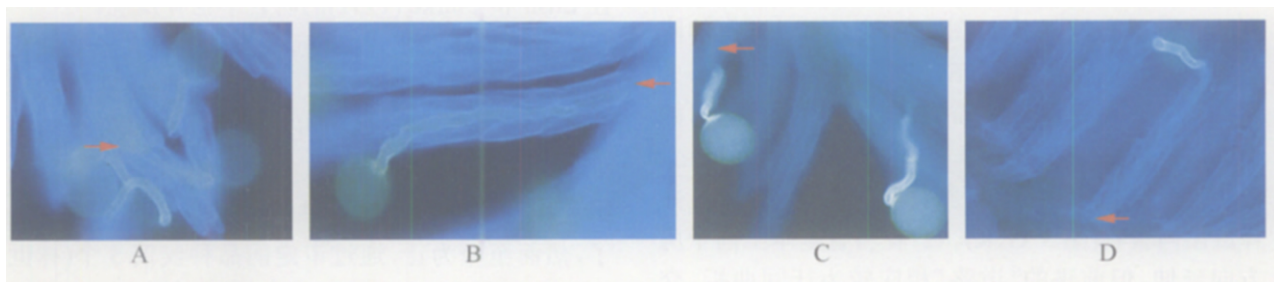


图 2 授粉 15min 后 ,花粉管进入水稻柱头羽状组织或柱头($\times 400$)

注 :A 和 C: 有些高粱花粉管已进入水稻花柱羽状组织 ;B 和 D: 水稻花粉管已穿过水稻的柱头羽状组织进入花柱中 (箭头所示)

Figure 2 Pollen tube entered into the pinnate organizations or the rice stigmas ($\times 400$) in 15 minutes

Note: A & C: Some sorghum pollen tubes entered into rice pinnate organizations of rice stigma (empty arrow); B & D: Some rice pollen tubes entered into rice stigmas (Arrow)

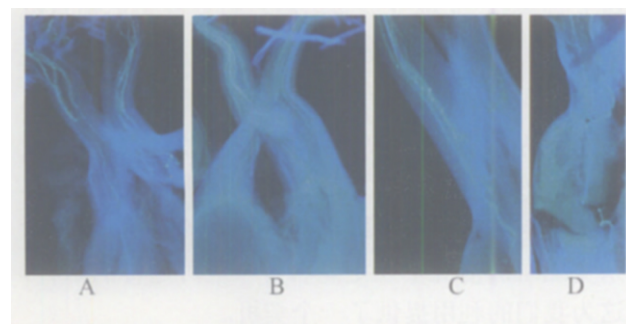


图 4 授粉后约 100min 花粉管水稻子房中的生长情况($\times 100$)
注 :A 和 C: 许多高粱花粉管达到子房顶部 ;B 和 D: 水稻花粉管则到达子房的中下部 ,甚至是基部

Figure 4 The growth and elongation of the pollen tubes in rice ovary ($\times 100$) in about 100 minutes

Note: A & C: Many sorghum pollen tubes arrived at the top of rice ovary; B & D: Rice pollen tubes arrived at the middle point of rice ovary and some even arrived at the base

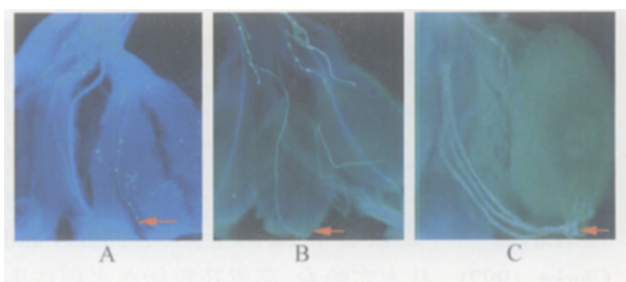


图 5 花粉管到达子房基部($\times 100$)

注 :A 是珍汕 97A \times 晋江多枝高粱组合组合 ,B 是 II -32A \times 晋江多枝高粱组合 ,C 是 II -32A \times II -32B 组合 ;水稻花粉管和高粱花粉管都达到水稻子房的基部(箭头)

Figure 5 The pollen tubes at the base of the rice ovary ($\times 100$)

Note: A is that from Zhenshan97A \times Jinjiangduozhi sorghum, B is that from II -32A \times Jinjiangduozhi sorghum and C is that from II -32A \times II -32B (the same to Figure 2-4); Sorghum and rice pollen tube both arrived at the base of rice ovary

头上大量萌发,不少花粉管也能象水稻花粉管一样在水稻花柱中顺利地迅速生长与伸长,并最终到达子房基部。

2.2 花粉管生长过程中的异常表现

尽管不少高粱花粉粒在水稻柱头上能象水稻花粉粒一样顺利地萌发、生长与伸长,最终到达子房基部,我们通过观察还是发现许多不同于水稻花粉粒萌发生长的表现。(1) 高粱花粉粒在水稻柱头羽状组织表面萌发后,往往先在表面盘绕,较迟进入羽状组织,有不少根本不进入羽状组织,在萌发后不久就可能停止了生长,到 180min 后,还是象刚刚萌发的样子,花粉管行短,盘绕卷曲在花柱羽状组织表面(图 6-A、B)。(5) 花粉管末端出现弯曲转折、忽大忽小等不规则生长现象(图 3-C)。(3) 胼胝质分布不均,有的在花粉管转折处堆积(图 6-D),有的胼胝质塞长短不一(图 3-E, 白色箭头)、有的附着在花粉管的一侧(图 3-E, I, 黑箭头)、有的局部大量堆积引起花粉管膨胀(图 3-F、J)。(4) 进入子房的上部时,大部分花粉管末端因胼胝质堆积而钝化,停止伸长(图 3-H)。(6) 有些花粉管末端似破裂,并释放出内含物(图 3-G、K)。(2) 花粉管基本上向子房方向延伸,但前进的“道路”相应较为迂回曲折,交错前进,在花粉管生长的各阶段均可发现停滞生长的花粉管(图 6-F、L)。

3 讨论

通常而言,植物在授粉后花粉粒与母本雌花柱头相互识别,当两者亲和时花粉将很快(具体时间因不同植物而异)开始萌发,长出花粉管伸入花柱组织,在一定信号导向下,花粉管有规则地不断向子房延伸,并最终到达胚珠,完成受精过程(华志明等, 1998; 邢树平, 1998)。其间,胼胝质在花粉管中有规则地均匀地间隔沉积是花粉管生长的一个尤为显著的特点(梁铁金和母锡金, 1995; Lush and Clarke, 1997)。从本实验看,高粱花粉能在水稻柱头上萌发生长,花粉管迅速伸长,然而在花粉管的生长过程中,我们发现了一些异常。高粱花粉粒在柱头上 5~15min 之内几乎都已萌发,并长出花粉管。Lansac 等(1994)研究表明高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 离体花粉在相对湿度 $80 \pm 5\%$ 的密闭的小瓶中,不加培养基条件下,5~10min 内有 70% 花粉萌发,在加入培养基的条件下,萌发速度更快。这一萌发时间与本研究中高粱萌发时间较为接近,这表时

本研究中高粱花粉粒在水稻柱头上的萌发是较为正常的。研究中也发现高粱花粉管长势很旺,但花粉管在花柱中延伸时并没像其它组合那么顺利地前进,而往往表现为迂回交错前进,并不断有花粉管停滞生长。花粉管停滞生长很可能是由于花粉管胼胝质不规则堆积造成的。胼胝质不规则堆积主要表现在胼胝质塞有的较长、有的较短、有的附着在花粉管的一侧、有的局部大量堆积引起花粉管膨胀、还有大量的花粉管末端因胼胝质堆积而钝化。这些现象, Lush 和 Clarke(1997)在自交不亲和烟草的花粉管生长,梁铁兵和母锡金(1995)在美味猕猴桃和软枣猕猴桃种间杂交花粉管行为的研究中都表现得较为突出。说明花粉管中胼胝质的不规则堆积是杂交或自交不亲和的花粉管行为的一个重要的表现。另外个别的花粉管末端破裂,这两种现象在 Lush 和 Clarke(1997)的研究中也有发现。

本研究还发出,尽管远缘杂交中绝大多数花粉管在花柱在由于种种原因而受阻,但也有些花粉管能到达子房基部,这为花粉管进入胚珠及受精提供了可能,也给远缘杂交育种的利用带来希望。我国利用高粱改良水稻育种已有半个多世纪的历史了,然而至今为止,通过审定的品种仅仅 5 个(林世成和闵绍楷,主编,1991,中国水稻品种及其系谱,上海科技出版社,中国,上海;伏军,1999),国外则未见有报道,说明水稻与高粱属间远缘杂交具有个当的难度。1990 年早季伏军(1999)在利用青壳洋高粱花粉与早稻品种中 87~156 杂交时,共做了 3 个稻穗,合计 169 粒,仅获得 3 粒种子,结实率为 1.78%。本课题组也从事了多年的水稻与高粱的远缘杂交育种,获得了一些中间材料。其间发现早籼稻品种佳香 3 号与高粱杂交的结实率为 0.7%,早籼稻品种佳辐占与高粱杂交的结实率为 1.23%,不育系新香 A 与高粱杂交的结实率为 2.27%,平均仅为 1.4%(未发表数据,私人通讯)。所有迹象表明,尽管水稻与高粱属间远缘杂交有相当的困难,但大量杂交配组的情况下还是能获得一些可遗传的杂种,这为我们的利用提供了一个契机。

远缘杂交的实质,长期以来是一个颇有争议的问题。无论是染色体组型分析(程尧楚等,1995,湖南农业科学, (1): 10-13)还是分子标记鉴定(栗翼玖等,1994,山东农业科学, 1: 16-18; 邱纪文等,1999,科学通报, 44(20): 2162-2166; 本课题组发表中数据)都显示,远缘杂交的效果是“部分遗传物质的转移”。父本的“部分遗传物质”究竟是如何转移的,至今还只

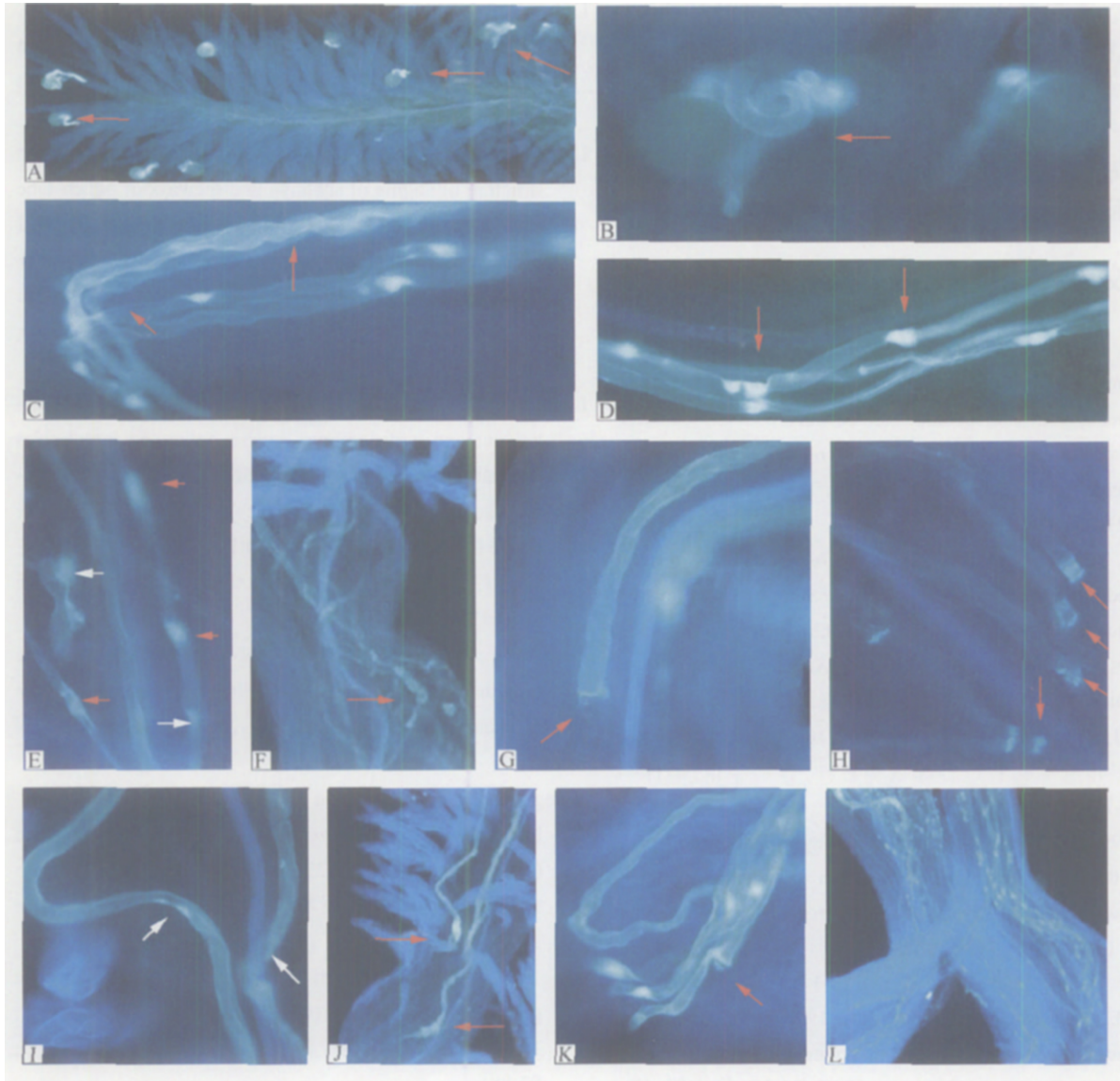


图6 高粱花粉管在水稻柱头上、花柱和子房中的异常表现

注 A 和 B :180min 时 ,有些花粉管还行短 ,未能进入花柱 ,盘绕卷曲在花柱羽状组织表面 ,可能停止生长 ;C :花粉管不规则生长 ,忽大忽小交错前进 ;D :花粉管转折处 ,胼胝质堆积 ;E :红箭头显示胼胝质塞长短不一 ,白箭头显示胼胝质在花分管一侧堆积 ;F :胼胝质局部大量堆积而使花粉管膨胀 ,许多花粉管交错前进 ;G :花粉管破裂 ,释放出内含物 ;H :花粉管末端胼胝质堆积而钝化 ,并停止伸长 ;I :胼胝质在花分管一侧堆积 ;J :胼胝质在末端堆积 ,花粉管膨胀并停止生长 ;K :花粉管末端破裂 ,释放出内含物 ;L :花分管在花柱迂回前进 ,大量花粉管胼胝质分布不规则 ,并停止生长

Figure 6 The deviant behavior of sorghum pollen tubes on rice stigmas, in rice stigma and ovary

Note: A & B: 180 min later, some sorghum tubes were still very short, crimped on the pinnate organizations of rice stigma and stop elongating at last; C: Sorghum pollen tubes elongated unsymmetrically, and sometimes they were wide and sometime narrow; D: Callose deposited at the turn of sorghum pollen tubes; E: Callose plugs were irregular and some were shorter and some were longer (black arrow), callose only deposited at one side of the sorghum pollen tubes; F: Sorghum pollen tubes swelled because much callose deposited; G: Sorghum pollen tube broke and inclusion was released; H, sorghum pollen tube blunted because of the deposition of callose and stop growing; I: Callose only deposited at one side of sorghum pollen tubes; J, the end of sorghum pollen tubes swelled because of the deposition of callose and stopped growing; K: The end of sorghum pollen tube broke and callose released, L: Much callose irregularly deposited and sorghum pollen tube weaved and stopped elongated at last

是个谜。要揭开这个谜,花粉管进入胚珠及胚的发育是极其重要的研究内容。本研究已初步表明,高粱个别高粱花粉管有可能到达子房基部,实践也证明水稻与高粱远缘杂交能结实,本课题组将改进方法,对高粱花粉管进入胚珠、受精和胚的发育进行深入地研究。

参考文献

- Barre P., Akaffou S., Louarn J., Charrier A., Hamon S., and Noiro M., 1998, Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species *Coffea liberica var dewevrei* and a wild species caffeine-free *C. pseudozanguebariae*, *Theor. Appl. Genet.*, 96(2): 306-311
- Cai D.T., Yuan L.P., and Lu X.G., 2001, A new strategy of rice breeding in the 21st century II. Searching a new pathway of rice breeding by utilization of double heterosis of wide cross and polyploidization, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 27(1): 110-116 (蔡得田, 袁隆平, 卢兴桂, 2001, 二十一世纪水稻育种新战略 II. 利用远缘杂交和多倍体双重优势进行超级稻育种, *作物学报*, 27(1): 110-116)
- Fu J., 1999, Development of the new variety Chaofengzao No.1 by the wide hybridization between rice and sorghum, *Zuowu Pinzhong Ziyuan (The Source of Crop Variety)*, (1): 13-14 (伏军, 1999, 水稻与高粱远缘杂交育成新种质超丰早 1 号, *作物品种资源*, (1): 13-14)
- Hua Z.M., Chen M.C., and Shen M.S., 1998, From stigma to embryo sac—recent advances in pollen tube development, *Shengwu Gongcheng Jinzhang*, 18(6): 32-35 (华志明, 陈睦传, 沈明山, 1998, 从柱头到胚囊——花粉管发育研究进展, *生物工程进展*, 18(6): 32-35)
- Huang Q.C., Qin G.Y., and Liang Q.X., 2004, Embryological evidences of seed-setting in intergeneric crosses of autotetraploid rice and *pennisetum alopecuroides*, *Zajiao Shuidao (Hybrid Rice)*, 19 (1): 56-59 (黄群策, 秦广雍, 梁秋霞, 2004, 同源四倍体水稻与狼尾草杂交结实的胚胎学证据, *杂交水稻*, 19(1): 56-59)
- Lansac A.R., Sullivan C.Y., Johnson B.E., and Lee K.W., 1994, Viability and germination of the pollen of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], *Annals of Botany*, 74: 27-33
- Li N., Zhang X.H., Xue M.N., and Yang J.H., 1995, Studies on structure of stigma of shatinyu and the ways of pollen tube enter the stigma, *Guangxi Shifan Daxue Xuebao (Journal of Guangxi Normal University)*, 13(4): 58-63 (李楠, 张杏辉, 薛妙男, 杨继华, 1995, 沙田柚柱头表面结构及花粉管进入柱头细胞的研究, *广西师范大学学报*, 13(4): 58-63)
- Liang T.J., and Mu X.J., 1995, Observation of pollen tube behaviour and early embryo genesis following interspecies pollination between *actinidia deliciosa* and *A. arguta*, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 37(8): 607-612 (梁铁金, 母锡金, 1995, 美味猕猴桃和软枣猕猴桃种间杂交花粉管行为和早期胚胎发生的观察, *植物学报*, 37(8): 607-612)
- Lush W.M., and Clarke A.E., 1997, Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility, *Sex Plant Reprod*, 10(1): 27-35
- Wang J.L., 1995, Fertilization and embryo development in hybridization between wheat and *lymus*, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 37(3): 177-180 (王景林, 1995, 小麦与赖草远缘杂交的受精和胚胎发育, *植物学报*, 37(3): 177-180)
- Xing S.P., 1998, Research advances in regulation of pollen tube growth, *Guangxi Zhiwu (Guihaia)*, 18(1): 82-88 (邢树平, 1998, 花粉管生长调控的研究进展, *广西植物*, 18(1): 82-88)
- Zhao X.Q., Zhao M., Xiao J.T., Zhang W.X., Guan D.M., Wang M.Y., Lu J., and Zang N., 2003, Stomata characteristics of leaves of high-photosynthetic efficiency progenies from a cross between *O. sativa* and *O. rufipogon* and their parents, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 29(22): 216-221 (赵秀琴, 赵明, 肖俊涛, 张文绪, 关东明, 王美云, 陆军, 臧宁, 2003, 栽野稻远缘杂交高光效后代及其亲本叶片的气孔特性, *作物学报*, 29(22): 216-221)