

农学博士论文

甘兰型油菜(*Brassica napus* L.)

自交效应的研究

研究生： 孟金陵

指导老师： 刘后利教授

学科专业： 作物遗传育种

中华人民共和国 武汉 华中农学院

一九八四年十二月

目 录

摘 要 (Summary).....	(1)
导 言.....	(3)
试验材料和方法.....	(4)
一、材料来源.....	(4)
二、胚胎学研究的试验处理及光学显微镜的观察方法	(4)
三、透射电镜样品的制备和观察方法.....	(5)
四、幼苗色素的测定.....	(5)
五、产量及经济性状的试验分析.....	(5)
试验结果和分析.....	(6)
一、连续自交对胚胎发育的影响.....	(6)
1 · 甘兰型油菜的胚胎发育过程.....	(6)
1) 胚囊结构及受精过程.....	(6)
2) 原胚阶段的发育.....	(7)
3) 胚分化阶段的发育.....	(7)
4) 胚的充实和成熟.....	(8)
2 · 从花粉萌发到原胚阶段的自交效应.....	(9)
1) 花粉萌发和花粉管生长速度.....	(9)
2) 受精的快慢和频率.....	(9)
3) 胚乳游离核的发育速度.....	(10)
4) 合子的分裂速度及原胚的发育快慢.....	(14)
5) 胚胎发育中的变异系数和几种异常现象.....	(15)
3 · 胚分化至成熟阶段的自交效应.....	(17)
1) 胚的大小及成熟种子的重量.....	(17)
2) 种子大小与每果粒数和含油量的关系.....	(19)
二、连续自交对幼苗初期发育的影响.....	(21)
1 · 子叶色素含量的变化.....	(21)
1) 子叶黄化现象及黄化频率.....	(21)
2) 黄化幼苗子叶色素含量及色素比例的变化.....	(22)
2 · 在幼苗子叶超微结构方面的自交效应.....	(24)
1) 甘兰型油菜幼苗子叶的超微结构.....	(24)
2) 黄化幼苗子叶叶肉细胞超微结构的变化.....	(24)
三、连续自交对籽粒产量及各项经济性状的影响.....	(26)
1 · 自交效应在植株的几个主要经济性状上的表现.....	(26)

2 · 在单株籽粒产量及经济系数上的自交效应·····	(26)
四、主要结论 ·····	(27)
讨 论 ·····	(28)
一、胚和胚乳的发育特点及“原始资本”假说·····	(28)
二、胚胎发育期间几种异常现象发生原因的探讨·····	(30)
三、关于幼苗子叶黄化·····	(31)
四、长期自交的遗传效应以及自交在作物进化上的意义·····	(32)
五、甘兰型油菜育种中有关自交退化的几个问题·····	(33)
参考文献 ·····	(35)
图 版	

摘 要

以黄色种皮的甘兰型油菜为主要材料,以自由授粉群体和品系间杂种为对照,从组织和细胞的显微结构及超显微结构等方面研究了甘兰型油菜连续自交6至7代的后代在胚胎发育、苗期形态、生理及经济性状上表现的遗传效应。

自交后代的胚和胚乳的发育速度在授粉5天以后开始落后于杂交组,致使连续自交的成熟种子较少,且含油率降低。与自由授粉处理相比,自交组花粉管生长较慢,受精较晚,胚乳游离核数较少,胚在原胚阶段生长缓慢。但鱼雷形胚以后,自由授粉组的胚生长速度减缓,因而其成熟种子反而小于自交种子。自交后代常发生单受精、合子和原胚退化以及胚乳解体等异常现象,同时在受精频率、游离核数和原胚细胞数方面的变异系数都较自由授粉组为大,表明至少在胚胎发育前期,连续自交后代甚至比处于杂合状况的自由授粉群体表现更不整齐一致。

黄籽油菜自交后代的幼苗中出现受核基因控制的子叶黄化的隐性性状。黄化子叶中叶绿素和类胡萝卜素含量减少,叶绿体因外膜不能正常凸起而呈棒状切面,类囊体和基粒都显著减少。因此黄化幼苗生长慢、长势弱甚至早期死亡。但黄化苗的自交后代中仍可出现少数正常绿苗。

连续自交后代的经济性状大多变劣,籽粒产量均低于杂交后代和长期自由授粉后代,经济系数也低于自由授粉群体,表明连续自交后代植株在营养物质的合成、积累和转化上都受到影响,但某些性状或产量结构因素是否退化及其退化程度,则因试验材料不同而异。在连续自交后代中进行兄妹交或表兄妹交,都不能显著改善自交后代的退化状况,亲本遗传基础差异小和近交系数大是主要原因。

根据试验结果及理论上的分析,作者认为自交并不总是趋向纯合,长期自交后代在纯合的基础上可能产生新的遗传变异,从而可能成为作物进化的一种因素,也可能为作物育种提供稳定的耐自交材料。鉴于在胚胎发育中自交后代表现明显的衰退,而杂交组的优势显著,建议对作物的胚胎发育进行综合系统的研究,并对自交退化和杂种优势作出早期预测。提出采取在育种的早期世代材料中进行适当的近交或自由授粉,在连续自交后代中加强选择,以及采用轮回选择法等措施,以防止或克服甘兰型油菜自交退化的影响。

Summary

Since the discovery of yellow-seeded *Brassica napus* L. in 1975 in China, the phenomenon of inbreeding depression had been observed from the later offsprings by continued selfing. Several aspects of the effects of inbreeding in rape (*Brassica napus* L.) such as the embryo development, the morphology and physiology of the chloroplasts in seedlings and the economic characters of matured plants were studied in comparison with the open-pollinated population and hybrids from inbred lines which mainly originated from the yellow seed-coat rape materials.

There was lower percentage of fertilization and slower speed of the development of embryo and endosperm, but appeared faster growth of embryo volume in the inbred progenies than in the open pollinated ones after the torpedo-embryo stage. During the proembryo development, there were larger variability coefficient in the rate of fertilization, the number of free nuclei and the number of proembryo cells, and sterility and abnormal phenomena of proembryo and endosperm often occurred, which showed more ununiform than the open-pollinated ones. There were fewer seeds per silique and the oil content was lower in inbred F₁ and significantly larger than that of the open-pollinated ones.

The seedlings of the seeds with yellow seed coat had yellow cotyledons which was recessive character controlled by unclear genes. In the cells of yellowish cotyledons, the contents of chlorophyll and carotinoid decreased, the chloroplast had a bar shape being defeated in bulging the envelop, and there were fewer lamellar structures and granum so that the growth of seedlings was hindered. However, a few normal green seedlings may be found in the progenies of yellowish seedlings.

The seed yield per plant reduced and most economic characters declined, but this tendency depended upon the materials used. Whether certain characters would degenerate or a few characters might be better in inbred progenies than in the open-pollinated ones depended on the materials too. The sib-pollinated and the cousin-pollinated matings in successive inbreeding progenies could not be improved the depression state of inbreeding population.

Long-time inbreeding would probably increase inheritable variations in individuals and provide new variants for crop evolution and crop breeding. This paper also discussed how to forecast the inbreeding depression and heterosis and how to overcome and weaken the influence of inbreeding, and some suggestions were made.

导 言

近亲繁殖或自交 (inbreeding) 是在作物育种工作中广泛应用的一种手段, 由于自交导致等位基因的分离和后代基因型的纯合, 因此, 不论是在常规育种、杂种优势育种和品质育种中, 还是在良种繁育过程中, 都要借助于自交来达到排除不利的基因和使种质纯合的目的。

另一方面, 在绝大多数异花授粉作物和许多常异交作物中, 自交常常导致后代生活力减弱, 表现出自交衰退 (inbreeding depression) 的遗传效应。达尔文 (Darwin, 1876) 研究了 57 种植物, 发现自交对植物的高度、重量、结实率等重要性状普遍有不利的影响⁽¹⁴⁾。Jones (1939) 总结了 East (1905) 开始的玉米连续近亲繁殖的研究, 指出自交系后代植株变矮, 产量随自交代数的增加而持续下降 (引自 Hayes, H. K., 等, 1955)⁽³⁶⁾。本世纪 30 年代以后, 科学家们以玉米为主要材料, 在各个学科领域中研究了自交退化问题。在胚胎学方面, 多数研究者发现自交系的胚和胚乳发育较慢, 重量较轻^(74, 78)。在生理生化方面, 许多学者报道了自交后代在 DNA 和 RNA 的合成强度、酶和线粒体的活性以及光合速率等方面低于杂种^(2, 11, 33, 80)。连续自交甚至导致叶片和小孢子的超微结构及染色体行为异常⁽⁸⁰⁾。但是在对自交衰退机理的理论研究上进展不大, 主要是沿袭四十年代解释杂种优势的显性学说和超显性学说, 育种实践中提出的很多问题不能得到很好的解答⁽²¹⁾。因此有必要对自交的遗传效应作进一步深入探讨。

依自然异交率的不同, 十字花科植物可分为异交和常异交两大类, 白菜型油菜 (*Brassica campestris* L.)、黑芥 (*B. nigra* Koch) 和白芥 (*Sinapsis alba* Boiss) 为异交作物。孙逢吉 (1937)、戴松恩 (1940)、陈绍龄 (1942) 的研究表明, 白菜型油菜自交后代生活力衰退, 结果率、每果粒数等经济性状下降, 产量只及自由授粉的三分之一 (引自西北农学院主编《植物育种学》中刘后利编“油菜育种”一章, 1981)⁽¹⁰⁾。黄继英等 (1980) 报道了白菜型油菜自交后生长势很弱, 结实性差, 品种繁殖困难⁽³⁴⁾。Doloi, P. C. 和 Rai, B. (1981) 研究了九个白菜型油菜品种, 发现其中 7 个自交不亲和品种的自交后代除成熟期和含油量外, 主要经济性状均表现近交衰退现象, 而 2 个自交亲和品种则衰退不明显⁽⁴⁶⁾。Schuster, W. 等 (1978) 分别研究了黑芥与白芥自交一代到自交六代的遗传效应, 观察到黑芥和白芥自交后代结实率降低, 单株产量退化显著, 分别在自交第 5 代和第 6 代退化最严重^(64, 65)。

芥菜型油菜 (*Brassica juncea* Czern. & Coss.) 和甘兰型油菜 (*B. napus* L.) 属常异交的十字花科油料作物。Singh, A. B. 等 (1976) 曾报道芥菜型油菜的自交退化现象⁽⁶⁷⁾, 至于甘兰型油菜, 五十年代以前, 育种家们普遍认为自交后代不退化或退化很小。1950 年, Kloen 报道甘兰型油菜自交后在不同程度上均发生明显退化 (引自 Wagner, M. 1954)。Wagner, M. (1954) 发现甘兰型油菜在连续自交情况下发生退化, 到自交第 6 代退化最甚, 表现在种子数减少, 千粒重降低, 单株产量严重下降⁽⁷³⁾。之后, Manner (1959), Schuster (1969) (引自 Schuster, W. 等, 1976) 和 Johnston, J. D. (1971) 分别报道了甘兰型油菜自交后代在鲜重、每果粒数和单株产量等性状上存在明显退化^(52, 63)。

Schuster, W.等(1976)报道甘兰型油菜自交后代的籽粒产量明显退化, 自交第一代降到标准品种的69%, 到自交第8代降至45%⁽⁶³⁾。志贺敏夫(1977)指出油菜自交后代出现多子叶和多主茎的畸形个体频率较高。他总结了欧洲关于甘兰型油菜自交退化的研究和考察了日本许多连续自交保存的品种的生产特性后, 指出在考虑油菜品种保纯、繁殖方法和育种方法时, 必须注意自交退化问题⁽⁴¹⁾。在我国的甘兰型油菜育种工作中, 随着培育自交系以利用杂种优势和品质育种工作的开展, 连续自交已成为我国育种工作者普遍采用的育种手段之一。自交退化的研究虽还鲜见报道, 但许多育种家已注意到了退化是客观存在的^(8·55)。华中农学院(1975—1981年)已得到的结果(未发表)表明: 甘兰型油菜中普遍存在着不同程度的自交退化现象。因此, 研究甘兰型油菜的自交遗传效应, 已提到我国油菜遗传育种工作的议事日程上了。

关于油菜在胚胎学方面表现的自交退化问题, 仅在白菜型油菜方面有过报道。Akhtar (1932)在白菜型油菜Toria中, 于不同植株间杂交授粉, 花粉管5小时到达子房, 而自交时需48小时(引自Singh, D·1958)⁽⁶⁸⁾。Doloi, P.C.等(1981)观察了3个白菜型油菜品种授粉后1—3天的胚珠, 其中自花授粉胚珠平均直径为284 μ , 异花授粉胚珠平均直径为312 μ , 差异极显著, 认为近亲繁殖对种子重量的抑制作用在受精之后立即开始⁽⁴⁷⁾。至于对甘兰型油菜连续自交遗传效应的认识, 多是限于对外部形态的直观观察, 这是很不够的, 必需在胚胎发育、形态结构以及生理生化等方面作进一步研究, 才能更深刻地认识甘兰型油菜自交的遗传效应和更有效地探索防止退化的途径。但是这方面的研究文章至今还未见报道。本文试图从胚胎发育、细胞结构和经济性状等几个角度综合考察甘兰型油菜连续自交后表现的遗传效应, 并就自交在进化上的地位和意义、自交退化的原因及如何在育种上克服或削弱退化等问题进行理论上的探讨。

试验材料和方法

一、材料来源

以甘兰型油菜YSR为主要试验材料。YSR系华中农学院油菜育种组1975年在甘兰型油菜品种华油3号中发现的黄籽油菜的后代⁽⁸⁾。YSR—51和YSR—52为YSR在1982年自交第6代时选出的姊妹株系, YSR—1为这两个株系的长期自由授粉群体。另一组试验材料甘314—1和甘105(均为黑色种皮)为甘兰型油菜华油12号自交第4代时选出的两个姊妹株系, 甘314—3为这两个株系的长期自由授粉群体。

二、胚胎学研究的试验处理及光学显微镜的观察方法

上述试验材料于1982年种植于华中农学院教学实习农场试验田内, 次年春分别在自交系YSR—51和甘314—1植株的主花序上选取第二天将开放的3—18朵花蕾去雄后套袋, 次日上午在同一花序上分别进行自花授粉(Self Pollination, 简称SP)、姊妹株系间授粉(Cousin Pollination, 简称CoP)、品系间授粉(YSR—51和甘341—1相互授粉, Cross Pollination, 简称CP), 用不同颜色的细丝线系在果柄上作标记。为避免角果上下部位不同造成的差异, 授粉时让SP、CoP和CP以均等的机会处在主花序的上、中、下部。同时在自由授粉群体YSR—1和甘314—3植株上挂牌标记当天开放的花朵, 任其自由授粉(Open Pollination, 简称OP)。授粉后(对于OP是开花后)18、24、36小时和2、3、5天, 各取8—10个发育正常的子房, 固定于卡诺液(酒精: 醋酸=3: 1)中。授粉

后7、10、15、20、30、40、50天,各取3—4个发育正常的角果剥取出胚珠固定。对于授粉后20天以前的材料,均经酒精——二甲苯处理后制成石蜡切片。授粉后25—50天的材料一部分制成石蜡切片,一部分则将胚珠解剖出来直接在显微镜下观察。石蜡切片厚8—10 μ ,以爱苏氏苏木精整体染色法⁽¹²⁾、海氏苏木精染色法和PAS反应+海氏苏木精染色法⁽³⁰⁾染色观察。以四氧化钨(O_4O_4)固定染色法⁽²⁸⁾观察油的积累。在连续的石蜡切片上计数胚乳游离核和胚细胞的数目,以测微尺测量胚的大小。对于授粉后15—25天的胚,从胚本体与胚柄的结合处起,沿纵轴量至胚的顶端,作为胚的长度指标;在子叶和胚轴的分界处量取胚的宽度^(71、72)。授粉30天以后,胚近圆球形,取与胚根平行和垂直的胚直径的平均值衡量胚的大小。

1984年以YSR为材料重复进行了胚胎学试验。于授粉后于1、2、4、6、10、15、24、48、72小时在田间自然条件下采取SP和OP的雌蕊各8—10枚固定。在室内25℃的恒温条件下,于授粉后1、2、4、6、10、15、20、24小时每间隔时间采取SP、CoP、CP、OP的花柱各7—8枚固定。对花柱以苯胺兰染色法⁽⁵⁸⁾在荧光显微镜下和以间苯二酚兰——马休黄染色法⁽²⁸⁾在光学显微镜下压片观察花粉粒的萌发和花粉管的生长。对子房以石蜡切片观察授粉后24、48、72小时胚珠的受精频率。对授粉后25天、46天的胚珠,解剖后在显微镜下观测胚的大小。

三、透射电镜样品的制备和观察方法

1983年,用上述的授粉方法获得YSR的自交、品系间杂交和自由授粉3个处理的授粉后20、30、50天的胚后,立即将子叶和胚轴切成0.8mm²大小的碎片,固定于2.5%戊二醛+5%蔗糖的0.1M磷酸盐缓冲溶液(PH7.2)中约4小时,经5%蔗糖的磷酸缓冲溶液洗涤后,以丙酮逐级脱水,Epon—812环氧树脂渗透、包埋。经35℃、45℃和60℃逐级聚合,获得胚的电镜样品。将YSR的自交、品系间杂交和自由授粉的成熟种子播于室外,待幼苗出土时和子叶平展时,避开子叶主脉剪取子叶碎片,以2.5%戊二醛磷酸盐缓冲液前固定2小时,1% O_4O_4 后固定3小时,酒精脱水,无水丙酮为中间代换液,经环氧树脂渗透包埋,然后聚合,制成幼苗子叶的电镜样品。所有电镜样品均用LK B—4型超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,在JEM—100s和JEM—100cx透射电镜上观察、照相。

四、幼苗色素含量的测定

1983年秋,将YSR的SP、CoP、CP和OP的种子及甘314—3的OP种子(1984年为甘314—1的SP种子)播于室外,待幼苗子叶平展后,每处理各取10对子叶,称鲜重后置于80%丙酮中碾成匀浆,以80%丙酮为浸提液,在玻璃坩埚漏斗中过滤,提取色素。各6次重复。在日立200—10型分光光度计上分别测定提取液在440、645、663nm波长下的吸光度。色素浓度计算公式如下:

$$C_{\text{叶绿素a}} = 12.7D_{663} - 2.69D_{645}$$

$$C_{\text{叶绿素b}} = 22.9D_{645} - 4.68D_{663}$$

$$C_{\text{叶绿素a+b}} = 20.2D_{645} + 8.02D_{663}^{(13)}$$

$$C_{\text{类胡萝卜素}} = 4.7D_{440} - 0.27C_{\text{叶绿素a+b}}^{(26)}$$

1984年夏季重复进行了色素测定试验。

五、产量及经济性状的试验分析

1983年在自交系YSR—51和甘314—1植株的不同分枝上分别获取自交、表兄妹交、

品系间杂交以及兄妹株间授粉(Sib Pollination, 简称SiP)和一次自由授粉 (First Open Pollination, 简称FOP) 的种子, 在 YSR—1 和甘314—3 植株上各获取长期自由授粉种子。同年秋将12种处理的种子按材料来源分为 YSR和甘314两个试验区, 小区行长4.5 尺。YSR试验区为 6 行区, 每小区60株, 甘314试验区为 3 行区, 每小区30株, 随机区组设计, 各 4 次重复。1984年春收获时, 在 YSR试验区内每小区随机采样12株, 甘314试验区每小区采 9 株, 考察株高、分枝部位、茎粗、一次有效分枝数、主花序长度、主花序角果数、单株角果总数、角果长度、每果粒数、千粒重、干物重和单株产量等13个经济性状, 并称量了小区籽粒总产量。以索氏抽提法测定种子的含油量。

各项试验中采用的试验材料及各授粉处理见表 1。

表 1 各项试验中采用的试验材料及授粉处理

处 理 材 料 试验项目	YSR—51					YSR -1(ck)	甘314—1					甘314— 3(ck)
	S P	SiP	CoP	C P	FOP	O P	S P	SiP	CoP	C P	FOP	O P
胚胎学研究 (光镜部分)	√		√	√		√	√		√	√		√
胚胎学研究 (电镜部分)	√			√		√						
幼苗子叶的超微结构	√			√		√						
幼苗子叶色素含量	√		√	√		√	√					√
植株经济性状和产量	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

对胚胎发育、色素测定和田间试验中的绝大多数数据,都进行了方差分析,用新复极差法测验各处理间的差异显著性。其中受精频率的数据进行反正弦转换,胚乳游离核数和胚的细胞数进行对数转换,然后再进行统计分析。

试验结果和分析

一、连续自交对胚胎发育的影响

1、甘兰型油菜的胚胎发育过程

(1) 胚囊结构及受精过程

以 YSR—1 自由授粉处理为主,对甘兰型油菜的胚胎发育进行了观察。甘兰型油菜的胚囊属蓼型^(32,40)。至花开时 3 个反足细胞已退化,卵细胞处胚囊珠孔端,两个助细胞具明显的丝状器,中央细胞的两个极核靠近卵器。卵核、助细胞核和中央细胞核周围富含淀粉。人工授粉后 4 小时花粉粒开始大量在柱头上萌发。在自由授粉条件下,则视昆虫采访花朵的早晚和风向、风力大小而定。1984年春开花后 4 小时仅个别花柱上有较多花粉粒萌发,直至开花后10小时,大多数柱头上才可见到许多萌发的花粉粒。花粉粒萌发后,花粉管迅速沿花柱向下生长。至开花后48小时,花柱基部可见大量的花粉管,大多数胚珠已开始受精。这和陈梅生等(1980)的观察较一致⁽²⁴⁾。

花粉管到达胚囊后,释放出两个精子。一个精子进入卵细胞,附于卵核上,随后精核的染

色质逐渐分散在卵核中并出现雄性核仁(图版1—1、2)。精卵核融合后,合子经过一段休眠期后才开始分裂。休眠期在形态上的表现为合子迅速伸长,这时胚乳游离核约16个左右。合子核最先位于合子的中部,随着合子的伸长,核逐渐移向顶部,细胞质亦集中于此,苏木精染色极深(图版1—3、4)。这时合子中的淀粉已消失,可能用于急剧增加的细胞壁物质。开花后5天,合子才开始分裂(图版1—5、6)。参与双受精的另一精核与二极核融合后,迅即发生分裂(图版1—7),开花后两天,大多数胚囊中已有16—32个胚乳游离核(图版1—8)。合子分裂时,游离核已达90个左右,沿胚囊壁分布,胚囊中央为大液泡。开花5天时,分裂已较不一致,尔后常伴有无丝分裂(图版1—9)。

(2) 原胚阶段的发育

合子横向分裂后形成具一个顶细胞和一个基细胞的二胞原胚。顶细胞经一系列细胞分裂,形成胚体,基细胞分裂若干次后形成一系列胚柄细胞并参与胚根的形成,在胚胎发生的分类中属十字花型(Crucifer type)^(40,71,72)。开花后10天,顶细胞经1—2次纵向分裂,形成二分体或四分体,并重新积累淀粉(图版2—1)。而胚柄细胞显然分裂速度较快,这时已具有4—7个细胞。游离核在合点处分裂较快,形成的游离核数较多;有的胚囊的游离核总数已达690个之多(图版2—2)。随后胚体的分裂加快,至开花后15天,成为具200个细胞左右的球形胚。淀粉在胚体中较少较小,但在胚柄中积累稍多。胚和胚柄周围原生质丰富,游离核密集(图版2—3)。游离核和原生质除在珠孔端分布较多外,在合点端亦较集中,游离核亦较大。

(3) 胚分化阶段的发育

开花17天以后,在胚的顶端出现2个子叶原基,并向前方逐渐突起,至授粉后20天,胚已成为心形(图版2—4);胚柄具10个细胞左右,形成一条长400—500 μ 的长柄,将心形胚推向胚囊中央。许多发育较快的胚,2个子叶已相当伸长,下胚轴相应增长,胚成为鱼雷形(图版2—5),胚中淀粉消失。当出现心形胚时,开始形成胚乳细胞,并向胚囊中心发展,最后扩展到整个胚囊。最外层胚乳细胞较紧密,内层细胞液泡化,淀粉粒围绕在胚乳细胞核周围。合点端胚乳直至开花后25天才开始形成细胞,这些细胞无淀粉、壁薄,与合点母体组织邻接面的细胞壁成网络状,呈吸器式结构。这种结构一直维持到胚近成熟(图版2—6),它对整个胚乳以及胚后期发育的营养供应,可能起重要作用。彭秦身(1965)认为鱼雷形胚阶段才出现胚乳细胞⁽³⁹⁾,本试验的观察结果则略早。当游离核转变为细胞前(授粉后17天),在解剖镜下可见沿胚囊壁的胚乳中出现绿色。至胚乳细胞形成后,绿色始终存在。绿色的出现,是由于胚乳中存在较多的叶绿体。活体的心形胚亦为淡绿色。Schulz, R.等(1968)在荠菜(*Capsella burse—pastoris*)中观察到在心形胚的超薄切片中,质体形成片层系统(lamellar system),并且不含淀粉粒⁽⁶²⁾。本试验观察到活体的心形胚呈淡绿色,且切片中未见淀粉,可能与叶绿体的发育有关。

开花25天,胚呈浅绿色,下胚轴和子叶进一步伸长,子叶前端弯曲,胚柄尚未完全退化,已分化出茎端生长点和根冠(图版2—7)。淀粉在胚根端积累较多,子叶端较少,形成一种梯度,这似乎与子叶正在旺盛生长有关。在子叶的电镜照片上,可看到这种淀粉粒包含在质体(plastid)中,它膨胀得很大,几乎占据了整个质体的内部空间;基质片层(stroma lamellae)以及可能结合在类囊体(thylakoid)膜上的叶绿素都被挤到质体的外围,看不到基粒片层(grana lamellae),可见此时胚中的质体由叶绿体形态转变为造粉

质体(amyloplast)形态(图版2—8, 3—1)。除了质体外,细胞内还可观察到核糖体(ribosomes)、内质网(endoplasmic reticulum)和脂体(lipid bodies)等(图版3—1、3—2)。Wanner, G.等(1981)报道脂体由一半单位膜(half-unit membrane)包被,并认为质体和内质网可能参与贮藏油脂的合成⁽⁷⁵⁾。由于鱼雷胚的质体中缺乏精细的片层结构,尤其是缺乏基粒片层,从结构和功能统一的观点看和从脂体的物质来源看,可以认为此时胚中质体的主要功能不是进行光合作用,而是与淀粉及油脂的合成、积累有关。

(4) 胚的充实和成熟

开花后30天,胚轴进一步伸长,子叶弯曲到根端附近,使胚成U形。子叶的叶肉细胞已分化出栅栏细胞和胞间隙不发达的海绵细胞。胚柄完全退化,这时胚的营养全靠胚乳细胞提供。胚细胞中淀粉含量增多,但子叶端仍少于胚根端(图版3—5、6)。在光镜下还能观察到细微的油脂颗粒。在电镜照片中,可看到细胞中脂体数量已增加很多,质体内仍包含着一个大淀粉粒,蛋白质开始积累(图版3—3、4)。在一部分细胞中,蛋白质以纤丝状沉积在液泡中,在另一些细胞中,液泡中沉积的蛋白质体大小约5—9 μ ,中间包含着许多细小的多面体颗粒。这种蛋白质在白芥(*Sinapis alba* L.)中被Rest, J.A.等(1972)称为糊粉粒(aleurone grains),具糊粉粒的细胞称为糊粉细胞(aleurone cells)⁽⁶⁰⁾。在甘兰型油菜的子叶中,糊粉细胞是基本的贮藏细胞。

授粉后40天,胚的宽度增加,占据了胚囊的绝大部分空间,已出现第一真叶原基,子叶中淀粉的积累达到最大程度(图版3—7、4—1)。胚乳细胞大多解体并被胚所吸收,但紧靠胚囊壁的1—2层胚乳细胞却始终维持生活状态。它们的结构紧密、原生质丰富,从其结构及所处位置看,这层胚乳细胞在消化内珠被薄壁细胞和向胚囊转运营养物质方面可能起重要作用。

开花后50天,种子开始失水,胚的绿色褪淡,一片子叶在外紧抱在内的另一片子叶,胚弯曲为球形。上胚轴具1—2个真叶原基。维管系统发育完好。细胞中淀粉含量减少,油脂含量增加(图版4—2、3)。在叶肉细胞的电镜照片上,糊粉粒居于细胞中央,脂体居于细胞四周,由于互相紧密挤压,脂体的外形成为多边形。在脂体和糊粉粒之间,还分布有少许造粉质体。其余的细胞器已难辨出(图版4—4)。

珠被是胚囊和胚的保护机构,又是胚胎发育的营养供应者之一。开花时,内、外珠被分别具10—14层和4—6层细胞,均含有淀粉。授粉后15天以前,随着胚和胚乳的发育,珠被细胞亦不断分裂、发育,致使胚珠日益增大,内外珠被中淀粉积累亦日益增加。授粉15天以后,内珠被细胞逐渐被胚乳细胞分解、吸收,最终在成熟种子中完全消失,外珠被细胞则发育成种皮⁽²³⁾。图版4—5为近成熟时的种皮结构。

在1983年的试验材料中发现种子内有多胚的现象出现。1984年解剖了Y S R—1自由授粉后25天的304个胚珠,有4个胚珠中出现双胚,1个胚珠中出现三胚(图版4—6),多胚的频率为1.74%。在具多胚的胚珠里,常常是一个胚较大,另外的胚稍小。这些胚一般都能发育至成熟。一般而言,被子植物多胚可源于原胚裂生、胚囊内卵细胞以外的其它细胞、多胚囊以及胚珠的体细胞^(44、56、57),付文吾1979年试验观察到甘兰型油菜中有裂生多胚发生⁽⁶⁾。本试验中多胚的起源、染色体倍数性及其在育种上的意义如何,尚待进一步研究。

2 从花粉萌发到原胚阶段的自交效应

(1) 花粉萌发和花粉管生长速度

供试材料中平均每个子房具胚珠27—34枚，其中少数胚珠无胚囊分化或胚囊中一些成分在开花前即已退化解体。在自由授粉群体 YSR—1 的子房中这种胚珠约占8.8%，而在自交系 YSR—51 中为26.3%，比前者高3倍。

在室内人工辅助授粉条件下，SP、CoP、CP和OP四个处理的花粉粒均在授粉后4小时开始大量萌发，授粉后6小时花粉粒的萌发达到高潮。授粉后20小时，各处理平均每子房有1—2根花粉管到达花柱基部；授粉后24小时，花柱基部有花粉管2—8根，处理间差异不显著。但在田间进行试验时，受传粉媒介影响，OP柱头上至开花后10小时才普遍有大量花粉粒萌发，比人工自交授粉者迟6小时。开花后24小时尚未见花粉管到达基部（表2）。开花后48小时，OP花柱基部的花粉管数赶上SP，至72小时已超过SP近一倍，t测验差异显著。由此可见，自由授粉时虽然花粉粒落在柱头上的时间较晚，但花粉管生长速度较自交组快，最终进入子房的花粉管较自交组多。

表2 到达花柱基部的花粉管数 (1984年田间试验材料)

处 理 授 粉 后 时 间(注)	S P		O P	
	观 察 子 房 数	花 粉 管 数 / 子 房	观 察 子 房 数	花 粉 管 数 / 子 房
24小时	11	2.09 ± 2.59	10	0
48小时	10	31.00 ± 7.30	9	35.22 ± 7.69
72小时	3	38.67* ± 8.08	9	60.22 ± 11.65

(注)：对于OP，为开花后时间，下同。

*为差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

(2) 受精的快慢和频率

花粉管萌发和生长速度上的这种差异，直接影响到受精过程发生的迟早。1984年度，授粉后48小时胚囊的受精频率，SP和OP分别为33.83%和36.83%。1983年度的受精比1984年要早些（表3）。从表3中可看到，在1983年度，授粉后1天半时，OP受精胚囊百分率低于SP、CoP和CP。授粉2天以后，OP的受精频率超过其它三个处理，但由于观察个体数少，均未达显著程度。当以授粉后2—5天所有子房的胚囊受精频率为观察值进行分析（以增大样品量，减少试验误差，表3第5项）时，OP与SP之间差异达到显著水平，其余每处理间差异不显著（表4）。各处理的受精百分率随着授粉后天数的增加而递增，这表明在同一角果内的胚囊受精有先有后。从授粉后25天受精胚珠的百分率看，OP最终可有95%的胚珠受精，显著高于SP。整个趋势是自由授粉组发生受精的时间早，受精百分率较高；自交组稍逊于表兄妹交，但差异不明显。

表3

胚囊受精频率比较

授粉后时间 处理	S P		C o P		C P		O P	
	观察子房数	子房内受精胚囊(%)	观察子房数	子房内受精胚囊(%)	观察子房数	子房内受精胚囊(%)	观察子房数	子房内受精胚囊(%)
1.5天	8	34.74 ± 23.15	8	24.25 ± 17.72	6	33.16 ± 15.68	9	18.76 ± 14.37
2天	11	46.40 ± 21.08	7	54.49 ± 24.75	6	42.57 ± 17.93	7	69.07 ± 10.02
3天	4	52.40 ± 13.69	5	68.88 ± 25.77	5	45.78 ± 20.48	9	61.98 ± 17.12
5天	7	61.16 ± 32.21	7	55.34 ± 28.62	8	72.65 ± 15.15	8	75.64 ± 7.77
2—5天 ^(注1)	22	52.19 ± 24.07	19	58.66 ± 25.74	19	55.97 ± 22.18	24	68.60 ± 13.45
25天 ^(注2)	8	76.75 ± 24.53	8	81.00 ± 21.78	8	82.25 ± 13.50	9	95.33 ± 4.12

(注1): 为2天、3天、5天所有被观测子房的平均值。

(注2): 授粉后25天的观察值为1984年试验结果, 其余均为1983年的观察值。

表4

受精频率的差异显著性

授粉后天数 处理	2—5天		25天	
OP	a ^(注)	A	a	A
CP	ab	A	ab	A
C o P	ab	A	ab	A
SP	b	A	b	A

(注): 多重比较时, 小写字母表示 $\alpha=0.05$ 显著水平, 大写字母表示 $\alpha=0.01$ 显著水平, 在同一列内, 具有不同标记字母的处理差异显著, 下同。

(3) 胚乳游离核的发育速度

在长期自交情况下, 花粉管进入胚囊后, 一般都能实现双受精。精子和极核结合形成三倍体的初生胚乳核后, 迅即开始分裂, 形成多个胚乳游离核。在同一取样时间内, 胚乳游离核数目的多少是否与受精频率的高低有关? 分析了YSR中各处理在不同的取样日期内游离核数和受精频率的相关性, 发现仅在授粉后5天时有显著的相关, 而在2天和3天时相关系数均未达到显著程度(表5)。这表明在各授粉时间内, 游离核数的多少与该处理的受精频率有一定关系, 但并不十分密切。因此在取样时间相同时, 胚乳游离核数主要应由各处理游离核在单位时间内的分裂次数决定, 是该处理遗传特性的一种表现。从表6和表7可看到在YSR中, 授粉后2天和3天时, OP和SP的游离核数相近, 它们均超过CoP和CP。CP在授

表 6

各处理胚乳游离核数目比较

处 理	SP					C ₀ P					CP					OP		
	内 容	观察胚囊数	平均 游离 核数	众 数	变 幅	观察胚囊数	平均 游离 核数	众 数	变 幅	观察胚囊数	平均 游离 核数	众 数	变 幅	观察胚囊数	平均 游离 核数	众 数	变 幅	
YSR	材料类型 授粉后天数																	
	2	125	23.71± 13.72	16	2—63	97	15.71± 11.57	16	2—58	64	15.84± 10.15	16	2—42	130	22.71± 13.17	32	2—58	
	3	54	41.61± 19.59	32	4—98	111	42.49± 18.06	32	4—84	60	33.90± 19.29	32	4—63	144	44.40± 19.26	32	4—106	
	5	112	67.48± 28.13	59	4—124	104	66.05± 22.30	59	4—111	173	75.18± 27.19	104	16—117	133	80.56± 27.40	104	6—120	
	7	17	98.92± 20.69	94	66—198	17	122.71± 44.29	162	40—190	18	134.00± 42.48	162	36—188	13	187.15± 27.39	196	129—216	
	10	12	225.83± 98.95	319	94—330	13	294.08± 138.16	319	91—654	13	352.69± 198.12	319	129—690	17	345.35± 61.04	370	202—469	
	5	39	105.05± 35.60	94	16—174	26	67.35± 38.88	94	4—112	42	86.67± 35.80	73	22—180	43	124.77± 33.66	115	56—228	
	10	15	334.20± 158.73	320	122—566	14	266.57± 178.96	268	67—564	11	318.18± 144.96	320	83—608	14	514.43± 112.54	524	350—681	

314 中

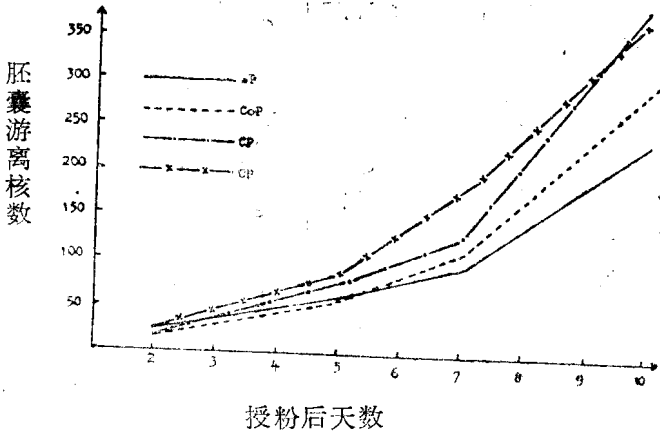
粉后 3 天仍然落后。从授粉后 5 天起，CP 和 OP 的游离核分裂速度显然加快，游离核数开始居于领先地位，至授粉后 10 天，超过 SP 达 53% 以上。图一反映了这种趋势。在来自甘 314 的材料中，OP 的游离核数也一直居于各处理之首，差异显著，表现出与 YSR 相同的规律性；CP 和 SP 居中，它们之间的差异不显著（表 6，7）。

表 5 受精频率和游离核数的相关

授粉后天数	2 天	3 天	5 天
考察角果数	31	23	30
相关系数 r	0.2506	0.3349	0.3615*

表 7 胚乳游离核数的差异显著性

材料类型	YSR					甘 314	
授粉后天数							
处理	2	3	5	7	10	5	10
OP	a A	a A	a A	a A	a A	a A	a A
CP	b B	b B	a A B	b B	a A B	b A	b A
CoP	b B	a A	b B	b c B	ab A B	c B	c B
SP	a A	a A	b B	c B	b B	ab A	b A



图一 YSR 中各处理胚乳游离核发育速度比较

授粉 10 天以后，胚囊中胚乳游离核继续分裂，总数可达数千，没有作进一步的计数统计。授粉后 20 天时，各处理中胚乳均形成细胞，并逐渐被胚吸收利用。这时胚乳组织不适于进行细胞计数，而在胚乳的形态特征上和多糖的组织化学上，均未能见到处理间的明显差异。

表 8 各处理胚的细胞数目 (注) 比较

处 理		SP			CoP			CP			OP		
材料类型	授粉后天数	观察胚数	平均细胞数	众数	变幅	观察胚数	平均细胞数	众数	变幅	观察胚数	平均细胞数	众数	变幅
		观察胚数	平均细胞数	众数	变幅	观察胚数	平均细胞数	众数	变幅	观察胚数	平均细胞数	众数	变幅
YSR	5	112	1.32±0.47	1	1—2	105	1.27±0.44	1	1—2	173	1.44±0.50	1	1—2
	7	18	2.06±0.64	2	1—3	17	2.29±0.69	2	1—3	19	2.68±0.89	3	1—4
	10	13	4.92±1.94	3	3—8	18	5.44±1.76	6	3—9	14	6.43±3.03	9	3—12
314	5	41	1.42±0.50	1	1—2	28	1.14±0.36	1	1—2	51	1.45±0.50	1	1—2
	10	20	5.95±2.42	5	2—10	17	6.00±2.72	6	2—10	17	8.12±3.30	9	2—13

注: 包括胚柄细胞。

(4) 合子的分裂速度及原胚的发育快慢

在YSR中, OP和CP的合子都分裂较早, 授粉后5天已有近一半的胚囊中见到二胞原胚(表8, 图版1—6)。而这时在SP和CoP中70%的合子仍未分裂(图版4—7), 与前两个处理差异显著(表9)。授粉后7天, SP和CoP普遍形成二胞原胚时, OP和CP的基细胞已经历了又一次分裂, 形成三个细胞的胚; 少数发育较快者顶细胞已分裂, 形成二分体。

表9 胚细胞数目的差异显著性

材料类型		YSR						甘 314			
处 理	授粉后天数	5		7		10		5		10	
		a	A	a	A	a	A	a	A	a	A
OP		a	A	a	A	a	A	a	A	a	A
CP		a	AB	b	AB	a	A	b	B	b	AB
CoP		c	B	bc	B	a	A	c	C	c	B
SP		b	B	c	B	a	A	b	B	c	B

到授粉后10天, OP和CP平均每胚已有六个以上的细胞, 三分之一以上的胚体为四分体(图版4—8)。SP和CoP则仅具五个细胞左右, 约1/6的胚体为四分体, 绝大多数胚仍停留在二分体阶段。由于此时各个处理内的胚细胞数目变幅较大, 故处理间的差异未达显著程度。

在甘314的材料中, OP的合子分裂速度亦较快, 与其余三个组相比差异显著(表8、9)。授粉后5天, OP的合子已普遍发生分裂, 其它三组已分裂的合子数还不足1/2。授粉后10天, OP的胚进入四分体阶段(图版2—1), 整个胚的细胞数比SP将近多一倍。CP的合子分裂虽然并不早于SP, 但胚的细胞分裂速度较快, 授粉后10天时胚的细胞数显著多于SP和CoP。SP和CoP之间在授粉后5天有一定差异, 但在授粉后10天时差异不显著。

至授粉后15天, 原胚已发育至球形期。这时较难准确计数胚细胞数目, 而以胚体的长度和宽度来衡量连续自交的遗传效应。无论是在YSR还是在甘314中, OP在胚的长和宽两方面都显著大于相应的其它各处理。CP和SP之间的差异虽未达到统计上的显著程度, 但从整个趋势上看, CP的胚还是略大于SP(表10, 图版5—1、2)。

表10 授粉后15天原胚大小比较

处 理		SP		CoP		CP		OP	
材料类型	内 容 项 目	观察胚数	长度(μ)	观察胚数	长度(μ)	观察胚数	长度(μ)	观察胚数	长度(μ)
YSR	胚长	15	48.13 ± 7.95	14	50.70 ± 7.26	19	50.54 ± 7.22	16	54.98 ± 11.71
	胚宽		38.43 ± 8.76		44.57 ± 6.45		43.33 ± 7.93		51.01 ± 9.09
甘 314	胚长	16	28.13 ± 5.46	18	29.70 ± 6.16	16	30.86 ± 3.74	13	35.82 ± 10.29
	胚宽		29.16 ± 4.59		29.06 ± 6.20		30.94 ± 4.00		37.14 ± 7.94