

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202008060

苜蓿、小冠花和百脉根花粉管引导和 胚珠败育研究*

王晓娟¹, 黄利春², 张树振³

- (1. 上海科技馆, 上海自然博物馆自然史研究中心, 上海 200127;
2. 科尔沁右翼前旗农业技术推广中心, 内蒙古 科尔沁右翼前旗 137713;
3. 新疆农业大学 草业与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:【目的】豆科牧草苜蓿、小冠花和百脉根异花授粉, 胚珠败育现象显著, 种子实际产量远低于理论产量, 但有关其授粉后的花粉管引导和受精后胚胎发育的基础数据缺乏。【方法】采用人工授粉方法, 对3种豆科牧草花粉管引导和胚胎发育进行荧光显微观察, 并结合田间数据进行胚珠败育统计分析。【结果】3种牧草柱头授粉最佳时期为花药开裂阶段, 柱头角质层是其花粉管穿入花柱的机械屏障; 苜蓿授粉2 h后花粉萌发, 8 h后花粉管生长并到达胚珠, 24 h后75%的胚珠处有花粉管到达; 小冠花和百脉根花粉管萌发生长到达胚珠的时间比苜蓿快, 授粉4 h后即观察到花粉管生长到达胚珠, 8 h后2种牧草96%和100%的胚珠处均有花粉管分布。进一步的荚果结实观察发现: 苜蓿、小冠花和百脉根授粉后胚珠败育严重, 平均败育率分别为87.67%、78.00%和81.33%, 荚果内败育胚珠的位置具有随机性。以上结果表明: 授粉后不同牧草花粉萌发和花粉管生长速率明显不同, 尽管小冠花和百脉根的花柱比苜蓿长, 其花粉管生长引导速度比苜蓿快; 从到达胚珠的花粉管数量来看, 3种牧草花粉数量均可满足其胚珠受精需要。【结论】3种豆科牧草胚珠败育并非由于受精前的花粉萌发和花粉管引导限制, 而是和受精后的胚胎发育受阻有关。

关键词: 紫花苜蓿; 小冠花; 百脉根; 授粉; 花粉管; 胚珠败育

中图分类号: S 541.032

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0114-10

Study on the Pollen Tube Introduction and Ovule Abortion after Cross-pollination in *Medicago sativa*, *Coronilla varia* and *Lotus corniculatus*

WANG Xiaojuan¹, HUANG Lichun², ZHANG Shuzhen³

- (1. Shanghai Science & Technology Museum, Natural History Research Center for Shanghai Natural History Museum, Shanghai 200127, China; 2. Agricultural Technology Extension and Service Center, Ke'erqin Youyi Qianqi 137713, China; 3. College of Grassland and Environment Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: [Purpose] Leguminous forages *Medicago sativa*, *Coronilla varia* and *Lotus corniculatus* are typical allogamy. Ovule abortion reduced the seeds numbers per pod, and actual seed production is much lower than their potential seed production. But fundamental data related to pollen tube introduction and embryo development after pollination are still lack. [Method] Using controlled pollination method, pollen tube introduction and embryo development were observed in *M. sativa*, *C.*

收稿日期: 2020-08-26

修回日期: 2020-10-07

网络首发时间: 2021-01-15 15:27:11

*基金项目: 上海市自然科学基金(18ZR1425400)。

作者简介: 王晓娟(1972—), 女, 甘肃静宁人, 博士, 教授, 主要从事植物生态学和传粉生物学研究。

E-mail: wangxj@sstm.org.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210115.0847.001.html>



varia and *L. corniculatus* using fluorescence microscope. And random abortive position of seed in one pod was also collected and analyzed in field trial. [Result] The stigmas of these three leguminous forages were receptive at the stage of dehiscence, and cuticles of stigma were mechanical barrier as pollen tubes penetrating the style. In *M. sativa*, pollen grains germinated 2 h after pollination and pollen tube reached the ovary after 8 h. The potential rate of ovule fertilization was up to 75% and remained unchanged 24 h after pollination. In *C. varia* and *L. corniculatus*, pollen tubes reached the ovule 4 h after pollination, and the potential rate of ovule fertilization reached 96% and 100% 8 h after pollination, respectively. Even then, the percentage of seed abortion in *M. sativa*, *C. varia* and *L. corniculatus* were still higher as 87.67%, 78.00% and 81.33%, respectively. Pollen tube growth and introduction were different in three leguminous forages. Although style lengths of *C. varia* and *L. corniculatus* were longer than that of *M. sativa*, pollen tubes grew quicker in these two legumes. In *M. sativa*, *C. varia* and *L. corniculatus* respectively, and random abortive position of seed in one pod was also observed. These results indicated that number of pollen tubes arrived in embryo sac in *M. sativa*, *C. varia* and *L. corniculatus* could meet the demand of double fertilization.

[Conclusion] The numbers of pollen grains loaded on the stigma as well as pollen tube introduction were not the limited factors for seed set, and ovule abortion could be due to embryo development restriction after fertilization in these leguminous forages.

Keywords: *Medicago sativa*; *Coronilla varia*; *Lotus corniculatus*; cross-pollination; pollen tube; ovule abortion

作为蝶形花植物的典型代表, 豆科牧草大多为雌雄同花但异花授粉, 结实依赖传粉昆虫。围绕豆科牧草实际种子产量远低于潜在种子产量这一问题, 前人提出昆虫传粉是制约其种子产量的重要因素^[1]。传粉是一个复杂的过程, 可概括为花粉释放—转运—降落 3 个动态过程。花粉释放具有一定的时空效应, 花药开裂是花粉释放的前提, 昆虫作用是花粉释放的必要条件, 花粉运输必须借助传粉昆虫, 而花粉的沉降同样离不开传粉者的参与。因此, 花粉来源及其活力可能影响种子形成, 间接制约种子的产量^[2]。由于雌配子体依次被包埋在胚珠、子房中, 因此, 被子植物在进化过程中形成了一种特殊的运送雄配子的方式——花粉管伸长和引导, 即包含有 2 个精细胞和 1 个营养核的花粉管从雌蕊柱头定向延伸, 将携带的 2 个精子送达胚珠从而实现双受精^[3]。通常, 花粉到达柱头后经过分泌物水合, 继而萌发生长, 在引导组织的引导下, 最终到达胚囊与胚珠结合, 完成双受精。研究发现: 一些常见豆科牧草胚珠败育严重, 如紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 实际种子产量仅为潜在种子产量的 4%, 自然授粉条件下每小花平均胚珠数达 13 个, 结籽数却

仅为 2~3 个^[4-5]。BOS 等^[6]认为实际种子产量低于潜在种子产量是豆科牧草为了适应生存而逐渐形成的繁殖策略。

前人研究发现: 大部分植物花的胚珠数都要多于其种子数^[7]。针对这种现象存在 2 种不同假说: 一是广泛选择也称选择性败育假说, 通过开花样式增加对传粉者的吸引, 通过选择高质量的后代提高雌性适合度; 二是雄性功能假说, 通过高质量的花粉传播提高雄性适合度, 这样可以补充因植食作用、天气或其他外界因素对花的破坏, 保证资源和花粉的可利用性^[8]。也有学者提出了花粉限制机制和资源限制机制 2 种假说, 前者强调因没有足够数量的花粉传递到柱头上而引起结实率低下, 后者则指出没有足够多的营养资源供果实和种子发育成熟导致种子败育^[9]。依据上述假说, 植物形成多的花是一种“赌注策略”, 其目的是在没有花粉限制和资源限制的条件下产生更多的后代^[6]。

尽管以上观点侧重点不同, 但是依然能发现二者之间的共同点: 都强调了花粉因素, 在传粉过程中花粉量不足可能制约种子产量, 胚珠败育可能间接反映了花粉量不足。然而, 对于大部分

植物而言,导致果实与花(花器官)比率低下的原因还知之甚少,对豆科牧草多胚珠和低结实率现象还少有关关注,有关授粉后的花粉管引导和受精后胚胎发育的基础数据缺乏。目前,关于这一问题的讨论仍然是植物繁殖生物研究的热点。DUAN 等^[10]研究揭示了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中受体激酶 (FERONIA) 具有确保精子递送和阻止多重受精的作用,FERONIA 通过一系列功能上相互联系的控制过程,阻止多个花粉管进入雌配子体。另有研究关注枣 (*Ziziphus jujuba*) 和长瓣短柱茶 (*Camellia grijsii*) 的花粉管引导,探讨其结实障碍问题^[11-12]。前期本课题组在开展苜蓿花粉和胚珠遗传变异^[5]、传粉昆虫访花行为及其环境互作^[13-14]、花部适应机制和传粉系统^[15]、花粉管极性引导^[16]以及雌、雄配子体发育和胚胎发生^[17-18]等繁殖生物学研究过程中,发现常见豆科牧草种子生产依靠传粉昆虫,但胚珠败育严重影响了每荚种子数,实际种子产量远低于理论种子产量这一问题。

鉴于此,本研究围绕 3 种常见豆科牧草紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、多变小冠花 (*Coronilla varia*) 和百脉根 (*Lotus corniculatus*) 的胚珠败育现象,通过异花授粉后不同时期 3 种豆科牧草花粉管生长、引导和胚珠受精的显微观察,探究其胚珠败育发生的限制因素。

1 材料与方法

1.1 供试材料和研究地点

供试材料为多年生紫花苜蓿 (*M. sativa*)、多变小冠花 (*C. varia*) 和百脉根 (*L. corniculatus*),栽种于甘肃武威河西实验站 (E102°84', N37°67', 海拔 1 593 m),该地区年均日照总时间 1 664~2 532 h,年平均降水量 154.6 mm,年均气温 8 ℃。其中,紫花苜蓿为总状花序,小冠花和百

脉根为伞形花序,3 种豆科牧草都有无限开花习性,花期较长。紫花苜蓿开花期为 5 月中下旬至 7 月下旬,长达 70 d 左右,6 月上旬至下旬为盛花期,单个小花完全开放可以持续 7 d 左右。多变小冠花花期 5 月中下旬至 7 月下旬,花期长达 50~60 d,6 月上旬至下旬为盛花期,单个小花的花期为 10 d 左右。百脉根花期 6 月初至 7 月下旬,长达 50 d 左右,6 月中旬至 7 月上旬为盛花期,单个小花的花期为 15 d 左右 (图 1)。

1.2 苜蓿、小冠花和百脉根的人工和自然授粉杂交处理

每种牧草在试验地随机标记 5 株,于盛花期分别进行人工自交授粉、人工异交授粉和自然授粉,每株每个处理选择 10 个花序,每个花序处理 7~10 朵小花。人工授粉在晴天 9:30—11:30 和 15:00—16:00 进行。其中,异交授粉保证父本的花粉离母株在 2~5 m,且花粉量充足,一般选择 3~5 朵小花授予母本的柱头上。授粉前对父本的花粉进行检验,保证花粉平均活力 $\geq 80\%$ 。

1.3 苜蓿、小冠花和百脉根柱头的可授性和角质层检测

根据 3 种豆科牧草的开花特性,将其小花花期分为 3 个阶段:花冠紧闭、花冠展开 (花药未裂) 和花冠展开 (花药开裂)。3 种豆科牧草每株随机选取 5 朵小花,采用联苯胺—过氧化氢法对其柱头可授性进行检验,反应液配方为联苯胺 (1%):过氧化氢 (3%):水=4:11:22 (体积比)^[19]。把小花的雌蕊解剖出来,放到载玻片上,滴加反应液后移到解剖镜下观察,如果立刻出现大量气泡说明柱头具有可授性,反之则没有可授性。3 种豆科牧草每个单株随机选取 5 朵小花,将雌蕊解剖出来,放到载玻片上,用 0.02% 中性红染色,在解剖镜下观察,出现红色则说明存在角质层,反之则无角质层^[20]。



图 1 紫花苜蓿 (a)、多变小冠花 (b) 和百脉根 (c) 的花

Fig. 1 Florets of *M. sativa* (a), *C. varia* (b) and *L. corniculatus* (c)

1.4 苜蓿、小冠花和百脉根花粉管引导的荧光显微观察

在标记的植株上进行人工异花授粉, 每个豆科牧草处理 5 个花序, 每个花序约 8 朵小花。分别选取 2、4、8、12、24 和 48 h 后的小花, 卡诺固定液固定 24 h, 观察前可转移保存在 70% 的酒精中。小心解剖出雌蕊, 将雌蕊置于 8 mol/L 的 NaOH 溶液中透明 5 h, 蒸馏水冲洗 2 次, 再转移到含有 0.1% 苯胺蓝的 0.1 mol/L K_3PO_4 溶液中, 于 5 ℃ 的黑暗环境中过夜染色, 去除雌蕊, 置于滴有 50% 甘油和 50% 0.5 mol/L 碳酸盐缓冲液 (抗荧光淬灭), 盖片, 用手指均匀挤压, 置于荧光显微镜 (OLYMPUS BX51, Japan) 下观察照相。每个小花观察 4 个视野, 统计胚珠的受精率, 有花粉管进入胚珠则视为胚珠受精, 没有花粉管到达的胚珠则视为未受精。

1.5 苜蓿、小冠花和百脉根胚珠败育位置及其败育率统计

在荚果成熟时分别对 3 种牧草荚内种子的败育位置进行统计, 每种植物统计 100 个荚, 败育位置分为上部、中部和下部 3 个部位, 连接荚果的部位是下部, 荚果顶端是上部, 中间部分统称中部。

1.6 统计分析

苜蓿、小冠花和百脉根胚珠受精率和胚珠败育率用平均数±标准误表示; 3 种豆科牧草异花授粉后不同时间胚珠受精率和胚珠败育率采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 利用最小显著差数法 (LSD), 当 $P<0.05$ 时, 表明存在显著差异; 当 $P<0.01$ 时, 存在极显著差异。

2 结果与分析

2.1 3 种豆科牧草的柱头可授性和柱头角质层

分别选取 3 种豆科牧草 3 个不同开放阶段的小花: 花冠紧闭、花冠展开 (花药未裂) 和花冠展开 (花药开裂), 柱头可授性试验结果发现: 3 种豆科牧草在小花开放的各个阶段, 柱头对联苯胺—过氧化氢都有积极的反应, 即使是在第 1 阶段小花还没有开放, 花瓣紧闭时, 柱头也会有零星气泡产生, 不过量少而且速度极慢。到小花开放的第 2 阶段, 即花药裂开但花瓣内的雌雄合蕊还没有释放出来时, 除小冠花外, 另外 2 种

牧草的柱头反应强烈。到第 3 阶段小花完全开放时, 3 种牧草的柱头对联苯胺—过氧化氢反应都很强烈, 柱头瞬间会产生大量的气泡, 而且气泡很大。以上结果表明: 花冠展开 (花药开裂) 阶段是 3 种豆科牧草柱头授粉的最佳时间, 同种豆科牧草的异花授粉花粉和柱头之间存在亲和性和柱头可授性 (表 1)。

表 1 3 种豆科牧草的柱头可授性比较
Tab. 1 Comparisons of stigma receptivity in three leguminous forages

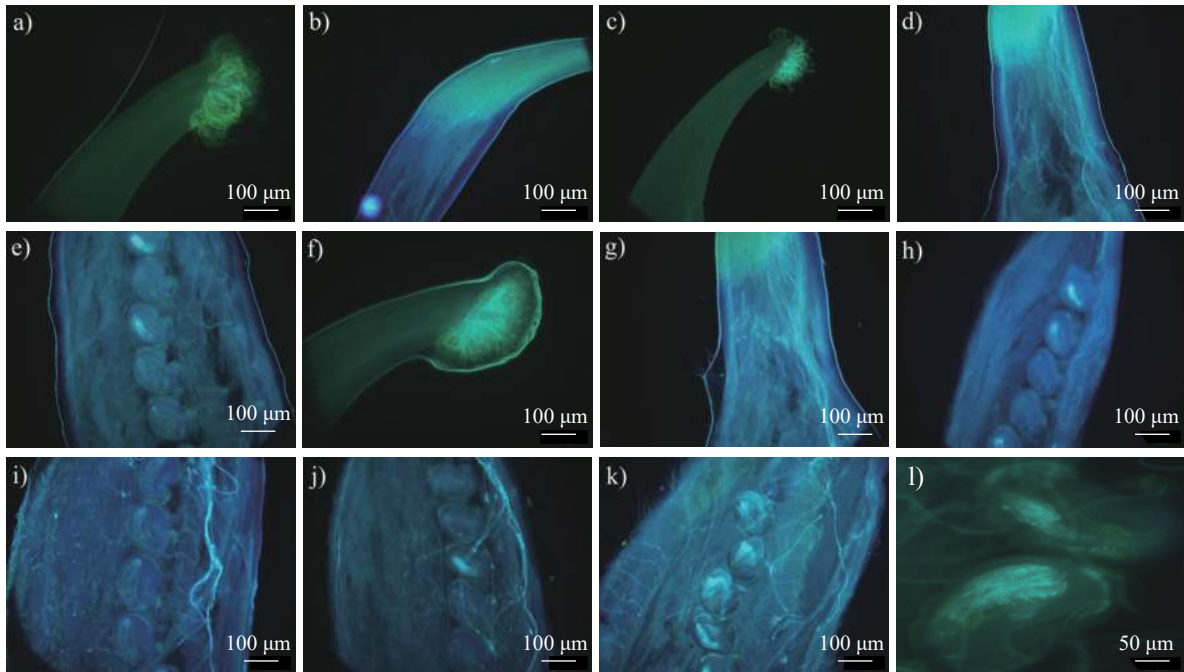
豆科牧草 leguminous forages	柱头可授性 stigma receptivity			柱头角质层 cuticle of stigma
	阶段 1 stage 1	阶段 2 stage 2	阶段 3 stage 3	
紫花苜蓿 <i>M. sativa</i>	×	√	√	√
多变小冠花 <i>C. varia</i>	×	×	√	√
百脉根 <i>L. corniculatus</i>	×	√	√	√

中性红染色主要是检测柱头角质层的破裂程度以表征柱头的可授性, 柱头着色则说明其角质层破坏, 只有角质层破坏后柱头分泌物才能溢出并黏附花粉^[21]。对紫花苜蓿、多变小冠花和百脉根的柱头角质层进行中性红染色检验, 发现不作任何处理的小花 98% 的柱头不能显色, 用毛笔刷过的柱头有 72% 的柱头可以被染成红色, 而自然授粉的则有 88% 的柱头可以被染色, 说明 3 种豆科牧草的柱头均存在机械屏障也就是柱头角质层 (表 1)。

2.2 授粉后 3 种豆科牧草花粉管生长和引导显微观察

由图 2 可见: 苜蓿在授粉 2 h 后少量花粉在柱头上萌发 (图 2a), 但是还不能穿过花柱基部 (图 2b); 4 h 后花粉萌发的数量明显增多 (图 2c), 并且可见少量花粉管穿过花柱基部 (图 2d), 但是尚未到达花柱基部的胚珠位置 (图 2e); 授粉 8 h 后柱头上可见大量花粉萌发 (图 2f), 穿过花柱的花粉管数量也在不断增加 (图 2g), 而且有少数花粉管到达胚珠附近 (图 2h); 授粉 12 h 后, 到达胚珠位置的花粉管增多 (图 2i); 授粉 4 h 后, 可以观察到花粉管向胚珠珠孔位置的生长和引导 (图 2j~k); 授粉 48 h 后可见花粉管成功引导进入胚囊, 双受精发生, 胚胎发育启动 (图 2l)。

图 3 显示: 小冠花在授粉 2 h 后, 柱头上的花粉尚未萌发 (图 3a), 花柱道未见花粉管生长



注: a)~b) 授粉 2 h, 柱头上的花粉 (a) 和花柱基部 (b); c)~e) 授粉 4 h, 花粉在柱头萌发 (c), 少量花粉管进入花柱 (d), 尚未到达胚珠 (e); f)~h) 授粉 8 h, 大量花粉在柱头萌发 (f), 穿过花柱的花粉管 (g) 和到达胚珠的花粉管 (h); i) 授粉 12 h, 大量花粉管生长至胚珠位置; j)~k) 授粉 24 h, 花粉管继续引导生长 (j) 直至珠孔位置 (k); l) 授粉 48 h, 花粉管进入胚囊。

Note: a)~b) 2 h after pollination, pollens on the stigma (a) and style (b); c)~e) 4 h after pollination, few pollens germinated on the stigma (c), pollen tubes appeared in the style (d) but not at the ovule (e); f)~h) 8 h after pollination, lots of pollens germinated on the stigma (f), pollen tubes through style (g) arrived at the ovules (h); i) 12 h after pollination, more pollen tubes arrived at the ovules; j)~k) 24 h after pollination, pollen tube growth (j) and guidance to the micro-pyle (k); l) 48 h after pollination, pollen tube entered into the embryo sac.

图 2 苜蓿异花授粉后 2~48 h 花粉管的生长和引导

Fig. 2 Growth and guidance of pollen tubes in *M. sativa* 2-48 h after cross pollination

(图 3b); 在授粉 4 h 后, 花柱基部可见花粉管生长 (图 3c), 并有花粉管已经到达胚珠位置 (图 3d), 此时胚囊的受精率可达 88.97%; 在授粉 8 h 后, 可以观察到柱头上大量花粉萌发 (图 3e), 随后花粉管生长穿过花柱基部到达胚珠 (图 3f), 以及花粉管向胚珠珠孔端的生长和引导 (图 3g), 此时, 胚囊的受精率达到 96.43%, 此后, 胚囊受精率基本不变 (表 2); 授粉 12~24 h, 可以观察到每个胚珠都有花粉管的引导生长和进入珠孔端 (图 3h~i); 授粉 48 h 后可以明显看到胚胎的发育 (图 3j~l)。

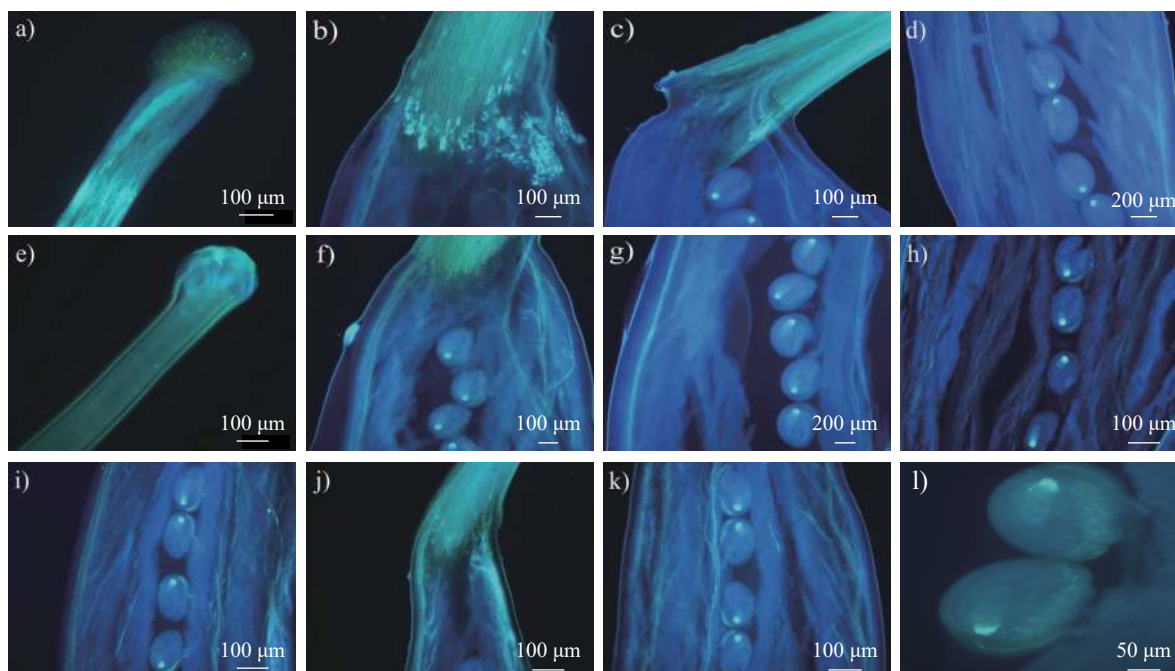
图 4 显示: 百脉根在授粉 2 h 后柱头上的花粉还没有萌发 (图 4a), 花柱道和胚珠未见花粉管的分布 (图 4b); 在授粉 4 h 后, 可以观察到百脉根柱头上花粉的萌发, 并且可见少量花粉管向花柱道和胚珠方向的生长 (图 4c~d), 此时胚囊的受精率可达 89.81%; 在授粉 8 h 后, 可见花粉管向花柱基部的生长 (图 4e) 和花粉管在胚珠位置的分布 (图 4f), 该阶段胚囊的受精率达 95.38%, 此后, 胚囊受精率保持不变 (表 2)。与小冠花类

似, 授粉 12~24 h, 观察到大量花粉管向胚珠方向生长 (图 4g), 花粉管向珠孔端的运动 (图 4h), 以及花粉管向胚珠珠孔处的引导 (图 4i~k); 授粉 48 h 后, 花粉管进入胚囊, 并且每个胚珠都可以观察到花粉管的进入 (图 4l)。

3 种豆科牧草不同的授粉时间后花粉管陆续进入胚囊, 苜蓿在授粉 24 h 后花粉管的数量尽管和授粉 48 和 96 h 后没有显著差异, 但是数量还在不断增加, 在授粉 96 h 后胚囊的受精率达 76.40%, 而小冠花和百脉根在授粉 4 h 后胚囊的受精率分别达到 88.97% 和 89.81%, 授粉 24 h 后几乎接近 100% 受精。总体来看 3 种牧草的受精率都比较高, 苜蓿相对小冠花和百脉根而言, 受精率较低, 但也可以满足 >70% 的胚囊受精, 然而本结果并不与苜蓿种子成熟时较低的结实率相符。

2.3 3 种豆科牧草胚珠败育位置和败育率的比较

3 种豆科牧草荚果成熟后对荚内种子的败育位置统计结果 (表 3) 发现: 苜蓿荚果上部败育率



注: a)~b) 授粉 2 h, 柱头上花粉尚未萌发 (a) 和花柱 (b); c)~d) 授粉 4 h, 花柱基部少量花粉管 (c) 和到达胚珠的花粉管 (d); e)~g) 授粉 8 h, 柱头上花粉萌发和花粉管生长 (e), 穿过花柱基部到达胚珠的花粉管 (f), 花粉管向胚珠珠孔端的生长和引导 (g); h)~i) 授粉 12 和 24 h 的胚珠; j)~l) 授粉 48 h, 花柱道 (j)、胚珠附近 (k) 的花粉管和花粉管进入胚囊 (l)。

Note: a)~b) 2 h after pollination, pollens not yet germinated on the stigma (a) and the style (b); c)~d) 4 h after pollination, pollen tubes appeared in the style (c) and few arrived at the ovule (d); e)~g) 8 h after pollination, pollens germinated on the stigma (e), pollen tubes through the style, arrived at the ovules (f) and guidance to the micropyle (g); h)~i) the ovules pollinated after 12 and 24 h; j)~l) 48 h after pollination, pollen tubes in the style (j), around the ovules (k) and entered into the embryo sac (l).

图 3 小冠花异花授粉后 2~48 h 花粉管的生长和引导

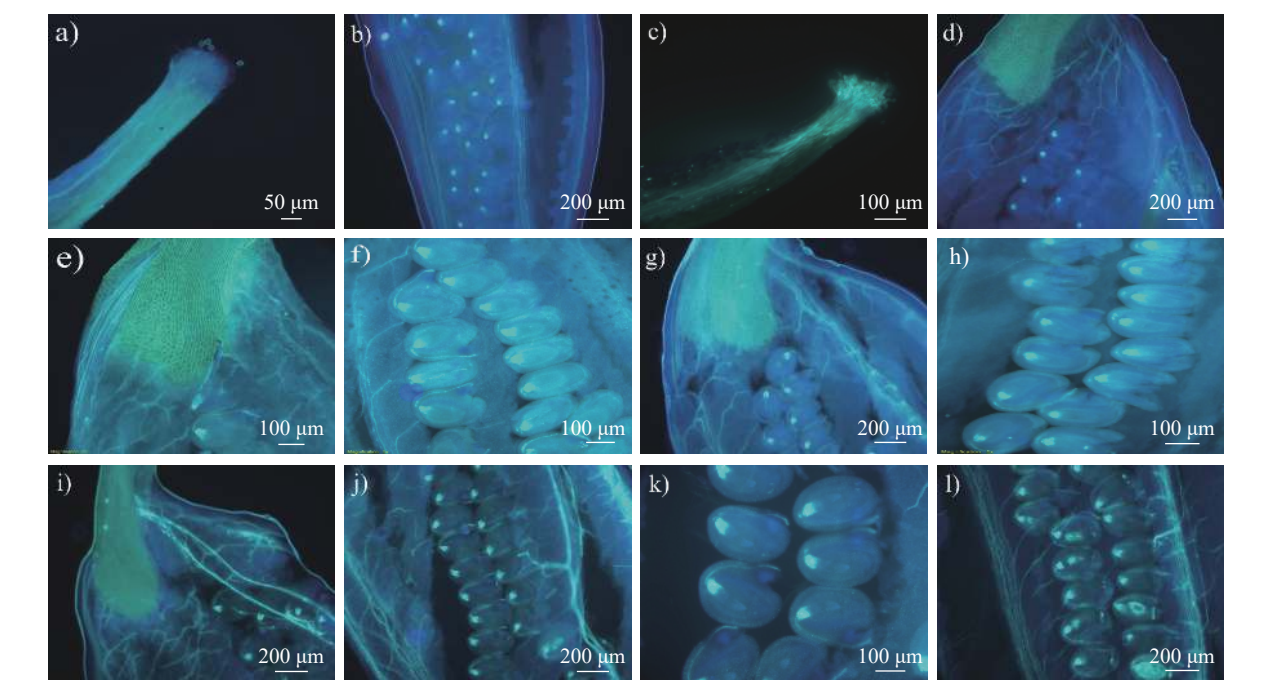
Fig. 3 Growth and guidance of pollen tubes in *C. varia* 2-48 h after cross pollination

最高为 94%, 荚果中部和下部分别为 88% 和 81%, 3 个位置的败育率没有显著差异。小冠花荚果上部的败育率最高为 82%, 荚果中部和下部的败育率分别为 74% 和 78%, 3 个位置的败育率也没有显著差异; 百脉根荚果中部的败育率最高为 86%, 荚果上部和荚果下部的败育率分别为 76% 和 82%, 3 个位置的败育率同样没有显著差异。以上结果表明: 3 种牧草种子在荚内没有特定的败育位置, 种子在荚内的败育位置具有随机性。

3 讨论

苜蓿、小冠花和百脉根作为重要的豆科牧草, 其种子产量普遍低下, 实际种子产量显著低于潜在种子产量, 已有学者从传粉昆虫^[1, 22]、种子产量性状^[23]等方面进行了探析, 旨在解析异花授粉豆科牧草种子生产要素, 促进产量提升。豆科牧草普遍存在的胚珠败育现象, 与其授粉后花粉萌发、花粉管引导和胚珠受精过程紧密相关。豆科牧草属典型的湿 (润) 型柱头, 成熟柱头表面呈现“蜂窝状”结构, 并且柱头表面具有一层角质

层, 在柱头成熟过程中角质层降解, 使位于角质层下方的分泌物泌出到柱头上, 以利于黏附和识别花粉^[18, 21, 24]。柱头角质层主要有 2 个功能, 一是可以阻挡自身的花粉, 从而起到限制自花授粉的作用; 二是角质层是一层机械组织, 可以保护柱头, 使柱头免受或减少外来的不良侵害。当柱头的角质层被破坏后花粉才会萌发生长, 而传粉昆虫往往就是扮演这种“破坏者”的主要角色。本研究对苜蓿、小冠花和百脉根柱头检测结果显示: 柱头在花瓣还没有完全开放时就具有一定的可授性, 但可授性较低, 当花药完全开裂时, 柱头的可授性最强; 其中, 苜蓿和百脉根的柱头在花药还没有开裂时即具有可授性, 当花药完全开裂时, 3 种牧草的柱头可授性最佳 (表 1)。DAFNI 等^[25]认为花药完全开裂时正是传粉昆虫活动的高峰期, 柱头上的角质层被破坏的概率最高, 这样可以使传粉昆虫携带的花粉较容易突破角质层萌发。另外, 植物花粉的萌发及花粉管生长与授粉当天的气候条件也存在密切的关系。柱头表皮由角质层覆盖, 水和大分子物质可通过, 但对花粉



注：a)~b) 授粉 2 h，柱头上尚未萌发的花粉 (a) 和胚珠 (b)；c)~d) 授粉 4 h，柱头上萌发花粉 (c) 和少量花粉管向花柱道生长 (d)；e)~f) 授粉 8 h，花粉管向花柱基部生长 (e) 和少量花粉管到达胚珠位置 (f)；g)~h) 授粉 12 h，大量花粉管向胚珠方向生长 (g) 和花粉管向珠孔端的引导 (h)；i)~k) 授粉 24 h，花粉管向胚珠珠孔处的引导生长；l) 授粉 48 h，花粉管进入胚囊。

Note: a)~b) 2 h after pollination, pollens not yet germinated on the stigma (a) and the ovule (b); c)~d) 4 h after pollination, pollens germinated on the stigma (c) and few pollen tubes appeared in the style (d); e)~f) 8 h after pollination, pollen tubes went through the style (e) and few arrived at the ovule (f); g)~h) 12 h after pollination, lots of pollen tubes towards the ovule (g) and guided to the micropyles (h); i)~k) 24 h after pollination, guidance of pollen tube to ovules and then to the micropyles; l) 48 h after pollination, pollen tube entered into the embryo sac.

图 4 百脉根的异花授粉后 2~48 h 花粉管生长和引导

Fig. 4 Growth and guidance of pollen tubes in *L. corniculatus* 2-48 h after cross pollination

表 2 3 种豆科牧草不同授粉时间胚珠受精率			
Tab. 2 Ovule fertilization rate after cross pollination in three leguminous forages %			
授粉时间/h time	苜蓿 <i>M. sativa</i>	小冠花 <i>C. varia</i>	百脉根 <i>L. corniculatus</i>
4	—	88.97±8.41 a	89.81±4.85 a
8	17.42±6.86 a	96.43±3.57 b	95.38±1.56 b
12	40.28±8.33 b	97.73±3.94 b	99.39±1.22 c
24	64.24±11.47 bcd	97.92±3.61 b	99.09±1.82 c
48	70.69±7.82 cd	100.00±0.00 b	100.00±0.00 c
96	76.40±4.45 d	100.00±0.00 b	100.00±0.00 c

注：不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)；下同。
Note: Different small letters indicate significant difference at 0.05 level ($P<0.05$); the same as below.

表 3 3 种豆科牧草胚珠败育位置及其败育率			
Tab. 3 Position of ovule abortion and ovule abortion rate in three leguminous forages %			
败育位置 position of ovule abortion	苜蓿 <i>M. sativa</i>	小冠花 <i>C. varia</i>	百脉根 <i>L. corniculatus</i>
荚果上部 upper part of pod	94±2.58 a	82±3.65 a	76±9.09 a
荚果中部 middle part of pod	88±5.16 a	74±4.76 a	86±5.03 a
荚果下部 lower part of pod	81±8.22 a	78±7.39 a	82±7.02 a

管穿透形成障碍。3 种豆科牧草花粉萌发和生长显微观察结果表明：来自异花授粉的花粉与柱头的水合反应、花粉管萌发可以很快发生，时间在 1~2 h (图 2~4)。这一方面与花粉在花药开裂时干化的程度有关；另一方面，恰当的花粉发育时期是接受花粉能力的关键时期，不成熟的柱头或衰老、退化的柱头都不能提供正常的授粉过程。

一旦成熟的花粉落在柱头上，经过花粉与柱头的水合反应，花粉在柱头萌发，并穿过柱头乳突细胞间隙，花粉管伸向位于花柱和子房的引导组织。已有研究证明花粉管早期生长不受胚珠的影响，说明该阶段生长和引导是由孢子体控制的^[26]。本研究观察发现：3 种豆科牧草花粉管生长的速度明显不同，尽管小冠花和百脉根花柱比苜蓿长，但是花粉管生长速度要比苜蓿快。苜蓿花粉管突破引导组织需要 8 h，而小冠花和百脉根只需要 4 h (图 2~4)。在已有研究的其他植物中，矮慈姑 (*Sagittaria pygmaea*) 人工授粉 0.5 h 后花粉萌发，花粉管在授粉 2 h 后部分到达子房，4 h 内进入胚珠，花粉管生长速率为 1.0 mm/h^[27]；陆

地棉 (*Gossypium hirsutum*) 花粉萌发在授粉后 1~4 h、12 h 后大量的花粉管伸长到花柱基部, 花粉管的平均生长速度为 0.29 cm/h^[28]; 辣椒 (*Capsicum annuum*) 从授粉到开始受精大约需要 12 h, 花粉管生长速度为 0.8 mm/h, 子房内胚珠全部完成受精需要 26 h 以上^[29]; 软条红梅花柱内异花授粉花粉管生长速度明显比自花授粉的快, 前者花粉管能够到达花柱基部, 平均速度为 0.83 mm/h, 而自花授粉的花粉管在花柱中部被抑制而停止生长^[30]。

花柱是连接柱头和子房的柱状结构, 是花粉管进入子房的通道。花粉萌发后花粉管的早期生长包括 2 个主要过程, 一是克服柱头表面的影响, 二是找到引导组织。已有研究发现: 花粉进入柱头后, 在花柱中的生长除了传输通道中营养物质的供应外, 还受到从花柱到胚珠梯度分布化学信号及其他信号物质的指引^[31]。玉米中一种被称为花粉过敏原 I (β -expansins) 的蛋白质能够促进花粉管侵入柱头组织^[32]。另有研究发现: 百合柱头中有诱导花粉管向药性的小碱性蛋白质 (chemocyanin), 能有效地引导携带精细胞的花粉管进入胚珠, 该蛋白只在百合中有功能, 而百合柱头中另一种蛋白 SCA (由百合引导组织表皮分泌的脂质转运蛋白, lipid transfer protein) 可明显促进小碱性蛋白质对花粉管的引导^[33]。从图 2~4 可以看出: 苜蓿、小冠花和百脉根花柱的中央均有数条纵行的花柱道, 自柱头通向子房, 属空心型花柱类型。3 种豆科牧草的花柱沟道表面为高度腺性的花柱道细胞, 所产生的黏性分泌物释放到花柱道的表面, 传粉后花粉粒萌发所形成的花粉管沿着花柱道并吸收、利用花柱道表面的分泌物营养自身而进一步生长、穿行。由此可见, 不同植物的花粉管生长速度不同, 甚至同一牧草的不同品种 (基因型) 之间也有一定的差别^[34]。

花粉管在花柱中的生长会受到来自胚珠的信号指引, 包括长距离指引和短距离指引。双子叶植物花粉管穿过引导组织出现在胎座表层, 然后沿着珠柄的表皮向珠孔端生长进入胚珠, 最终抵达被深埋的雌配子体实现受精^[3, 35]。玉米和拟南芥等植物作为研究花粉管极性生长的模式材料, 通过细胞遗传分析已鉴定发现了许多控制花粉管极性生长的相关基因, 雌配子体特异性的蛋白质 ZmEA1 和 LUREs 被确定为花粉管生长和引导诱物^[36-37]。DUAN 等^[10]最新研究发现: 拟南芥受体

激酶 (FERONIA) 具有确保精子递送和阻止多重受精的作用, 引导花粉管成功“绕开”已经被“占位”的胚珠, 找到尚未“占位”的胚珠。苜蓿、小冠花和百脉根授粉 4 h 后的胚囊受精率分别为 76.40%、88.97% 和 89.81%, 表明异花授粉状态下, 进入雌蕊中的花粉管数量满足胚珠的受精需要, 其结实率低下并非由于花粉限制。

豆科牧草具有自交不亲和性, 自交衰退明显, 提高种子产量主要是通过杂交育种手段来改善。紫花苜蓿、小冠花和百脉根胚珠败育率极高, 分别为 87.67%、78.00% 和 81.33%, 且荚内胚珠败育位置也具有随机性 (表 3)。由此可见, 胚珠败育减少了每荚种子数, 大大降低了其种子产量。通常导致植物选择性败育的原因主要有资源限制和遗传因子 2 个方面, 这种选择性败育常常可见于豆科植物中, 豆科植物产生过多的花和胚珠是其选择高质量后代的一种进化机制^[38]。从资源限制角度分析, 雌雄同株植物通过雌蕊选择性败育, 把资源转移到雄性器官的发育上, 形成形态较大、色泽艳丽的花冠, 增强对传粉者的吸引, 并产生较丰富的花粉粒等, 这些报酬可以增加昆虫的拜访频率, 因而在雌雄同株上不存在花粉限制^[39]。有研究发现: 苜蓿的胚珠不育性与珠心胼胝质的沉积密切相关, 但不育性具有较大的遗传变异, 胼胝质沉积的随机性决定了种子在荚内败育的随机性^[40-41]。从遗传因子方面来看, 受精后胚珠败育是 3 种豆科牧草结实率低下的主要原因, 而胼胝质的沉积确实一定程度上影响了苜蓿胚珠的育性。

4 结论

3 种豆科牧草苜蓿、小冠花和百脉根的柱头在小花还没有完全开放时就具有一定的可授性, 当花药完全开裂时, 柱头的可授性最强, 为昆虫授粉最佳时期。3 种豆科牧草来自异花授粉的花粉与柱头的水合反应、花粉管萌发时间在 1~2 h, 其中, 小冠花和百脉根花柱比苜蓿长, 其花粉管生长速度要比苜蓿快, 小冠花和百脉根花粉管突破引导组织仅需要 4 h 而苜蓿需要 8 h。3 种豆科牧草属空心型花柱类型, 花柱的中央均有数条纵行的花柱道, 花柱沟道表面高度腺性的细胞产生的粘性分泌物可为花粉管的生长和穿行提供营养。苜蓿、小冠花和百脉根授粉 4 h 后的胚囊受精率分别为 76.40%、88.97% 和 89.81%, 表明异

花授粉状态下, 进入雌蕊中的花粉管数量满足胚珠的受精需要, 其结实率低下并非由于花粉限制。因此, 3 种豆科牧草胚珠败育并非由于受精前的花粉萌发和花粉管引导限制, 而是和受精后的胚胎发育受阻有关。

[参考文献]

- [1] 张爱勤, 谭敦炎, 朱进忠. 苜蓿传粉特性及其制约种子产量形成的因分析[J]. 草业科学, 2005, 22(11): 40. DOI: [10.3969/j.issn.1001-0629.2005.11.009](#).
- [2] BECKER T, VOSS N, DURKA W. Pollen limitation and inbreeding depression in an 'oldrare' bumble bee-pollinated grassland herb[J]. Plant Biology, 2011, 13(6): 857. DOI: [10.1111/j.1438-8677.2011.00452.x](#).
- [3] RUDALL P J, BATEMAN R M. Developmental bases for key innovations in the seed-plant microgametophyte[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12: 317. DOI: [10.1016/J.TPLANTS.2007.06.004](#).
- [4] LORENZETTI F. Achieving potential herbage seed yields in species of temperate regions[C]//BAKER M J. Proceedings of the 17th International Grassland Congress. Wellington, New Zealand, 1993.
- [5] 李晓霞, 金樑, 王晓娟. 几个紫花苜蓿亚(变)种花粉和胚珠遗传变异分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 1911. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2009.06.005](#).
- [6] BOS M M, VEDDELER D, BOGDANSKI A K, et al. Caveats to quantifying ecosystem services: fruit abortion blurs benefits from crop pollination[J]. Ecological Applications, 2007, 17(6): 1841. DOI: [10.1890/06-1763.1](#).
- [7] AYRE D J, WHELLAN R J. Factors controlling fruit set in hermaphroditic plants: studies with the Australian Proteaceae[J]. Trends in Ecology & Evolution, 1989, 4(9): 267. DOI: [10.1016/0169-5347\(89\)90197-3](#).
- [8] STEPHENSON A G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1981, 12: 253. DOI: [10.1146/annurev.es.12.110181.001345](#).
- [9] BURD M. Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set[J]. The Botanical Review, 1994, 60(1): 83. DOI: [10.1007/BF02856594](#).
- [10] DUAN Q H, LIU M C J, KITA D, et al. FERONIA controls pectin- and nitric oxide-mediated male-female interaction[J]. Nature, 2020, 579: 561. DOI: [10.1038/s41586-020-2106-2](#).
- [11] XIONG H, ZOU F, YUAN D, et al. Comparison of self- and cross-pollination in pollen tube growth, early ovule development and fruit set of *Camellia grijsii*[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2019, 21(4): 819. DOI: [10.17957/IJAB/15.0960](#).
- [12] SHAO F X, WANG S, LIU Z M, et al. Pollination, fertilization, and embryo development in Southern China fresh-eating jujube[J]. HortScience, 2020, 55(8): 1315. DOI: [10.21273/HORTSCI15144-20](#).
- [13] 刘红平, 李晓霞, 王晓娟. 紫花苜蓿的传粉昆虫种类及其访花行为[J]. 生态学杂志, 2008, 27(5): 780. DOI: [10.13292/j.1000-4890.2008.0173](#).
- [14] WANG X J, LIU H P, HUANG L C, et al. Biodiversity of wild alfalfa pollinators and their temporal foraging characters in Hexi Corridor, Northwest China[J]. Entomologica Fennica, 2012, 23: 4. DOI: [10.33338/ef.84561](#).
- [15] 黄利春, 金樑, 李晶, 等. 蝶形花亚科植物花部适应机制与传粉系统[J]. 生态学报, 2014, 34(19): 5360. DOI: [10.5846/stxb201301180120](#).
- [16] 张静文, 金樑, 邓志刚, 等. 花粉管生长和极性引导的孢子体和配子体控制[J]. 西北植物学报, 2012, 32(8): 1712. DOI: [10.3969/j.issn.1000-4025.2012.08.032](#).
- [17] WANG X J, FENG G H, DENG Z G, et al. Microsporogenesis and microgametogenesis of male-sterile mutant *ms1* in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Crop Science, 2013, 53: 679. DOI: [10.2135/cropsci2012.06.0400](#).
- [18] JIN L, ZHANG J W, LI J, et al. Spontaneous multi-pistil mutant *mp1* in alfalfa: floral anatomy and embryo sac development[J]. Agronomy Journal, 2014, 106: 431. DOI: [10.2134/agronj2013.0406](#).
- [19] 刘林德, 张洪军, 祝宁. 刺五加花粉活力和柱头可授性的研究[J]. 植物研究, 2001, 21(3): 376. DOI: [10.3969/j.issn.1673-5102.2001.03.013](#).
- [20] HESLOP-HARRISON J, HESLOP-HARRISON Y. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: constituents of the stylar fluid and stigma secretion of *Trifolium pratense* L.[J]. Annals of Botany, 1982, 49(6): 729. DOI: [10.1093/oxfordjournals.aob.a086302](#).
- [21] KREITNER G L, SORENSEN E L. Stigma development and the stigmatic cuticle of alfalfa, *Medicago sativa* L.[J]. Botanical Gazette, 1984, 145(4): 436. DOI: [10.2307/2474251](#).
- [22] 何承刚, 毕玉芬, 姜华, 等. 紫花苜蓿的花蜜量和访花蜜蜂数量对种子产量的影响[J]. 生态学杂志, 2005, 24(12): 1388.
- [23] 李世雄, 王彦荣, 孙建华. 中国苜蓿品种种子产量性状的遗传多样性[J]. 草业学报, 2003(1): 23. DOI: [10.3321/j.issn:1004-5759.2003.01.005](#).
- [24] RODRIGUEZ-RIÑO T, LÓPEZ-MARTINEZ J, ORTEGA-OLIVENCIA A, et al. Pollen grain germination, stigmatic receptivity and ovule penetration in *Cytisus multiflorus* (Papilionoideae)[J]. Acta Horticulturae, 2001, 561: 95. DOI: [10.17660/ActaHortic.2001.561.14](#).
- [25] DAFNI A, PACINI E, NEPI M. Pollen and stigma biology[M]. Cambridge: Enviroquest Ltd., 2005.
- [26] BOOY G, KRENS F A, BINO R J. Analysis of pollen-tube growth in cultured maize silks[J]. Sexual Plant Reproduction, 1992, 5: 227. DOI: [10.1007/BF00189816](#).
- [27] 王金平. 矮慈姑人工授粉后花粉管生长的荧光显微观察[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 1999, 12(2): 185. DOI: [10.3969/j.issn.1003-0972.1999.02.018](#).
- [28] 于艳杰, 吴李君, 吴跃进, 等. 陆地棉花花粉粒萌发和花粉管生长特性[J]. 自然科学进展, 2007, 17(9): 1299. DOI: [10.3321/j.issn:1002-008x.2007.09.021](#).
- [29] 申家恒, 申业, 丁常宏, 等. 辣椒受精过程及其经历时间

- 的研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 995. DOI: [10.16420/j.issn.0513-353x.2008.07.011](https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2008.07.011).
- [30] 陶书田, 张绍铃, 陈迪新, 等. 果梅花粉原位萌发及花粉管生长特性的研究[J]. 果树学报, 2004, 21(4): 338. DOI: [10.3969/j.issn.1009-9980.2004.04.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-9980.2004.04.014).
- [31] MÁRTON M L, DRESSELHAUS T. Female gametophyte-controlled pollen tube guidance[J]. Biochemical Society Transactions, 2010, 38(2): 627. DOI: [10.1042/BST0380627](https://doi.org/10.1042/BST0380627).
- [32] VALDIVIA E R, STEPHENSON A G, DURACHKO D M, et al. Class B β -expansins are needed for pollen separation and stigma penetration[J]. Sexual Plant Reproduction, 2009, 22: 141. DOI: [10.1007/s00497-009-0099-y](https://doi.org/10.1007/s00497-009-0099-y).
- [33] CHAE K, LORD E M. Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins[J]. Annals of Botany, 2011, 108(4): 627. DOI: [10.1007/s00497-014-0247-x](https://doi.org/10.1007/s00497-014-0247-x).
- [34] PFAHLER P L, PEREIRA M J, BARNETT R D. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95(8): 1218. DOI: [10.1007/s001220050684](https://doi.org/10.1007/s001220050684).
- [35] LAUSSER A, DRESSELHAUS T. Sporophytic control of pollen tube growth and guidance in grasses[J]. Biochemical Society Transactions, 2010, 38(2): 631. DOI: [10.1093/jxb/erp330](https://doi.org/10.1093/jxb/erp330).
- [36] DRESSELHAUS T, LAUSSER A, MÁRTON M L. Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses[J]. Annals of Botany, 2011, 108(4): 727. DOI: [10.1093/aob/mcr017](https://doi.org/10.1093/aob/mcr017).
- [37] PUNWANI J A, DREWS G N. Development and function of the synergid cell[J]. Sexual Plant Reproduction, 2008, 21: 7. DOI: [10.1007/s00497-007-0059-3](https://doi.org/10.1007/s00497-007-0059-3).
- [38] 赵学杰, 谭敦炎. 种子植物的选择性败育及其进化生态意义[J]. 植物生态学报, 2007, 31(6): 1007. DOI: [10.17521/cjpe.2007.0128](https://doi.org/10.17521/cjpe.2007.0128).
- [39] SPALIK K. On evolution of andromonoecy and ‘overproduction’ of flowers: a resource allocation model[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 1991, 42(3): 325. DOI: [10.1111/j.1095-8312.1991.tb00566.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00566.x).
- [40] KOLYASNIKOVA N L. Determining the fertility of alfalfa by means of fluorescence microscopy[J]. Botanicheskie Issledovaniya Urale, 1985: 25.
- [41] ROSELLINI D, FERRANTI F, BARONE P, et al. Expression of female sterility in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Sexual Plant Reproduction, 2003, 15: 271. DOI: [10.1007/s00497-003-0163-y](https://doi.org/10.1007/s00497-003-0163-y).

责任编辑: 何承刚

(上接第 46 页)

- [8] VAN LITH J P. Contribution to the knowledge of the Indo-Australian Psenini (Hymenoptera. Sphecidae). Part III. New species of the subgenera *Psen* Latreille and *Mimumesa* Malloch and a review of East-Asiatic and Indo-Australian *Psen* Latreille, s. l.[J]. Zoologische Verhandelingen, 1965, 73: 3.
- [9] VAN LITH J P. Contribution to the knowledge of Indo-Australian, South Pacific and East Asiatic Psenini. Genus *Psen* Latreille (Hymenoptera, Sphecidae)[J]. Tijdschrift voor Entomologie, 1968, 111: 89.
- [10] CAMERON P. Description of a new genus and some new species of fossorial Hymenoptera from the Oriental Zoological Region[J]. The Annals and Magazine of Natural History (Series 7), 1899, 4: 52. DOI: [10.1080/00222939908678162](https://doi.org/10.1080/00222939908678162).
- [11] VAN LITH J P. Contribution to the knowledge of the Indo-Australian Pseninae (Hymenoptera. Sphecidae). Part II. Genus *Psenulus* Kohl, 1896[J]. Zoologische Verhandelingen, 1962, 52: 1.
- [12] TSUNEKI K. Contribution to the knowledge of the Pemphredoninae fauna of Formosa and the Ryukyus (Hymenoptera, Sphecidae)[J]. Etizenia, 1966, 14: 1.

责任编辑: 何馨成