

温度敏感大白菜胞质雄性不育系微量花粉活力研究

张鲁刚 惠麦侠 张明科

(西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100)

摘 要: 以大白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] 的欧洲油菜 (*Brassica napus* L.) 胞质雄性不育系 CMS3411-7 和 CMS7311 为试材, 通过人工低温诱导产生微量花粉, 研究了不同育性级别花药中的相对正常花粉率以及 1~2 级花药中花粉的相对生活力和杂交竞争力。结果表明: 诱导产生的 1、2、3 级花药中的花粉量分别相当于正常花药的 73.5%~84.4%、47.6%~51.5% (半不育) 和 28.4%~32.5%, 4 级花药中均无花粉; 1、2 级花药中的花粉具有授粉能力, 自交单荚结籽 3.9 粒, 相当于低自交不亲和; 在提前 4 h 授粉的情况下, 1、2 级花药中花粉的杂交竞争力仅是紫菜薹 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. var. *purpurea* Bailey) 正常花粉的 9.1%~16.6%, 即正常花粉的 1/6~1/10。最后提出了利用温度敏感胞质雄性不育制杂交种时应注意的问题, 讨论了利用人工诱导微量花粉进行不育系自身保持的可行性。

关键词: 大白菜; 温度敏感雄性不育; 花粉; 生活力; 杂交竞争力

中图分类号: S 634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0663-05

大白菜胞质雄性不育主要有两类, 一类是萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 胞质雄性不育, 一类是欧洲油菜 (*Brassica napus* L.) 胞质雄性不育。前者一般表现为不育性彻底, 不育度 100%, 但采用连续回交的核置换方法育成的大白菜胞质雄性不育系普遍存在蜜腺退化, 幼叶黄化, 生长势弱等缺陷^[1,2]。近年来, 采用原生质体融合技术已获得了无黄化的萝卜胞质甘蓝型油菜雄性不育系^[3], 而且在芸薹属蔬菜, 花椰菜、甘蓝、大白菜中进行转育^[4,5], 黄化现象、蜜腺退化等问题基本解决, 但配合力不高仍限制着这一不育源的应用^[4,6]。与此相反, 后者虽没有黄化现象, 蜜腺正常, 而且生长势强, 杂种优势明显^[7], 但却由于存在不同程度的环境敏感, 时常出现微量花粉^[8~10], 这对杂交种的纯度有潜在影响。本文针对这一现象对微量花粉的活力进行生物学鉴定, 以期对杂交制种、新不育系选育及有效利用温度敏感雄性不育材料提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

两份大白菜胞质雄性不育系 CMS3411-7 (A_1), CMS7311 (A_2)、对应的保持系 (B_1 、 B_2) 和白菜 (S_1)、紫菜薹 (S_2) (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. var. *purpurea* Bailey) 等由西北农林科技大学园艺学院白菜研究室选育^[7,10]。

1.2 方法

1.2.1 微量花粉诱导 取 A_1 、 A_2 显蕾期的幼苗, 在 5℃ 下处理 9 d^[10], 然后置于温室, 在隔离区生长, 开花后逐株观察单花雄蕊育性, 并分级。0 级: 花药大小为正常花药的 4/5 以上, 或与测交父本相近; 1 级: 花药膨大部分为正常花药的 2/3~4/5; 2 级: 花药膨大部分为正常花药的 2/3~1/3; 3 级: 花药膨大部分为正常花药的 1/3 以下; 4 级: 花药均瘦小, 呈白色透明状, 无花粉。同时标记有 1、2、3 级花药的单株备用。

收稿日期: 2003-01-27; 修回日期: 2003-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270913); 国家“863”项目 (2001AA241124)

1.2.2 不同级别花药相对正常花粉量的测定 每次取不同级别的花药 1 个放在载玻片上, 加 1 滴醋酸洋红, 用玻璃棒捣碎, 涂成 1 cm^2 大小, 在 10×10 倍显微镜下, 随机观察 10 个视野, 重复 3 次。统计形态正常花粉 (圆形, 大小一致, 细胞质染红色) 和形态异常花粉 (皱褶、体积小, 细胞质无色或淡红色) 数, 以对应保持系为对照, 计算相对正常花粉数率和形态异常花粉率。相对正常花粉率 (%) = 形态正常花粉数/对应保持系形态正常花粉数 $\times 100$; 形态异常花粉率 (%) = 形态异常花粉数/(形态异常花粉数 + 形态正常花粉数) $\times 100$ 。

1.2.3 微量花粉活力的测定 以正常不育系 A_1 、 A_2 为母本, 分别挂蓝牌、红牌, 单株编号 A_{1-1} 、 A_{1-2} 、 A_{1-3} 和 A_{2-1} 、 A_{2-2} 、 A_{2-3} , 并分别授以 A_1 、 A_2 各自经诱导获得的 1、2 级花药的微量花粉和白菜花粉 S_1 (对照), 分析结荚率及单荚结籽数, 判断微量花粉的相对授粉能力。

1.2.4 微量花粉杂交竞争力的测定: 以不育系 A_1 、 A_2 为母本, 分别挂蓝牌、红牌, 并单株编号 A_{1-6} 、 A_{1-7} 、 A_{1-8} 、 A_{1-9} 、 A_{1-10} 和 A_{2-16} 、 A_{2-17} 、 A_{2-18} 、 A_{2-19} 、 A_{2-20} , 先在上午 10 时分别给 A_1 、 A_2 单株自然开放的花朵授微量花粉, 然后间隔 4、8、24、28、32 h 重复授紫菜薹花粉 (竞争花粉, 与不育系杂交完全亲和), 每株授 30~50 朵花, 统计结荚率、单荚结籽数及后代杂交植株类型。

2 结果与分析

2.1 不同育性花药相对正常花粉率比较

从图 1 可以看出, A_1 、 A_2 两个不育系在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温诱导下产生的花粉均随不育级别由小到大, 不育性提高, 花药中正常形态的花粉数量逐渐减少, 其中 1、2、3 级花药中的正常花粉量分别占正常花药的 73.5%~84.4%、47.6%~51.5% (半不育) 和 28.4%~32.5%, 4 级花药中均无花粉。而形态异常花粉量则随不育性提高 (不育级别由小到大) 逐渐增加。但总体而言, 形态异常花粉数较形态正常花粉数明显少, 这与该胞质不育属于无孢原细胞雄性不育^[11]相一致。在 1 级、2 级、3 级花药中, 形态异常花粉分别占 7.1%~9.4%、15.3%~16.8% 和 43.5%~45%, 即随不育度提高, 败育花粉在总花粉量中的比率也逐渐增加。

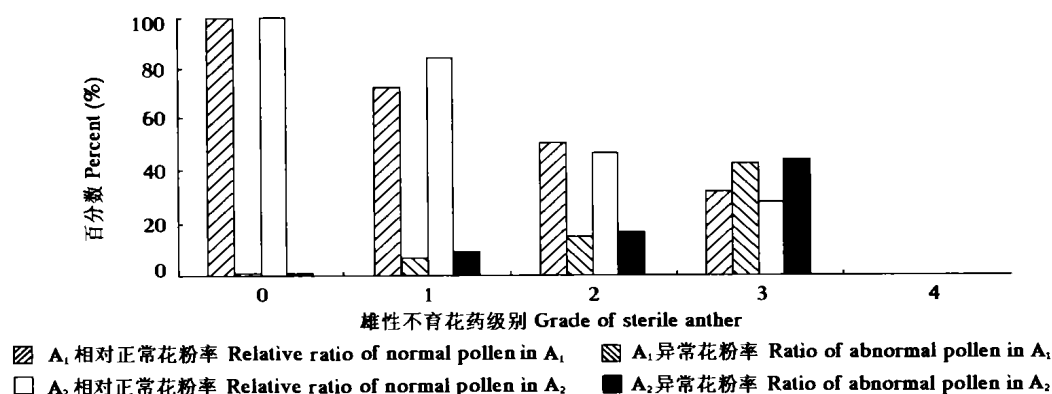


图 1 不同育性级别花药中相对正常花粉率和异常花粉率

Fig. 1 The relative ratio of normal-shape pollen and ratio of abnormal-shape pollen in anthers of different sterile grade

2.2 微量花粉的活力

由表 1 可以看出, 诱导 A_1 、 A_2 产生的微量花粉自交或互交均可结荚结籽。自交的单荚结籽数均为 3.9 粒, 互交时分别为 5.4 和 3.2 粒, 说明 A_1 、 A_2 的微量花粉具有授粉、受精能力, 但两种微量花粉的单荚结籽数都仅为异源花粉的 46%~55%。与异源花粉 S_1 相比, A_1 、 A_2 微量花粉对 A_2 授粉时的结荚率基本正常, 而对 A_1 授粉时的结荚率明显低于异源花粉, 这可能是由于 A_1 柱头与 A_2 花粉不亲和所致。

表 1 微量花粉活力比较

Table 1 Comparison of vigor of trace-pollen in 1-2 grades anthers of A₁ and A₂

母本材料 Maternal materials	单株编号 Code of plant	授粉花朵数 Number of flower pollinated	结荚数 Number of silique harvested	结籽数 Total seeds harvested	结荚率 Ratio of silique-set (%)	单荚结籽数 Number of seeds per silique	花粉来源(父本) Origin of pollen
A ₂	A ₂₋₁	66	51	276	77.3	5.4	A ₁ 微粉 Trace pollen of A ₁
	A ₂₋₂	174	126	492	72.4	3.9	A ₂ 微粉 Trace pollen of A ₂
	A ₂₋₃	131	94	671	71.8	7.1	S ₁
A ₁	A ₁₋₁	84	48	187	57.1	3.9	A ₁ 微粉 Trace pollen A ₁
	A ₁₋₂	108	47	151	44.8	3.2	A ₂ 微粉 Trace pollen A ₂
	A ₁₋₃	159	116	975	73.0	8.4	S ₁

注: A₁, 不育系 CMS3411-7; A₂, 不育系 CMS7311; S₁, 白菜的花粉。

Note: A₁, CMS3411-7; A₂, CMS7311, S₁, the pollen of a non-heading Chinese cabbage.

2.3 微量花粉杂交竞争力

分别以正常不育系 A₁、A₂ 为母本, 以紫菜薹为指示花粉, 取 A₁、A₂ 诱导产生的 1~2 级的花药, 于上午 10 时交叉饱和授粉, 其后间隔不同时间重复授予紫菜薹花粉, 杂交后代中均出现两种类型植株(表 2), 与紫菜薹的杂交植株很容易识别。

可以看出以 A₂ 为母本, A₁ 微粉与紫菜薹为重复授粉竞争花粉时, 混合结荚率均在 77.6%~93.5%, 而且单荚结籽数均在 8.5 粒以上, 基本上达正常水平, 处理间差异不显著。从后代杂交苗看, 紫菜薹的花粉较 A₁ 微粉有明显的杂交竞争优势。在 A₁ 微粉授粉后 4、8、24、28、32 h 时, 重复授予紫菜薹花粉, 后代中由紫菜薹花粉产生的杂交苗率分别为 83.4%、81.4%、50.0%、43.1% 和 16.7%, 说明在 A₁ 微粉提前 4 h 授粉的情况下, 其杂交竞争力仅是紫菜薹正常花粉的 16.6%, 即 1/6, 而只有提前 24 h 授粉时, A₁ 微粉才与紫菜薹花粉的竞争力相当。

以 A₁ 为母本, A₂ 微粉与 S₂ 花粉的杂交竞争力表现与上述趋势相同(表 2), A₂ 微粉授粉后 4、8、24、28、32 h, 再重复授 S₂ 花粉时, A₁ 花粉相对 S₂ 花粉的杂交竞争力分别为 8.9% (91.9%)、30% (70%)、42.4% (57.6%)、40.7% (59.3%) 和 53.9% (46.1%), 说明重复授 S₂ 花粉的间隔时间越长, A₂ 微粉的杂交竞争优势越强, 间隔时间越短杂交竞争优势越弱。与 A₁ 不同的是 A₂ 微粉授粉 8 h 后, 延长重复授粉时间对 A₂ 微粉的杂交竞争力提高较慢。

表 2 雄性不育微量花粉杂交竞争力比较

Table 2 Comparison of cross-fertilize ability of trace-pollen in 1-2 grades anthers of A₁ and A₂

母本材料 Maternal materials	单株编号 Code of plant	授粉花朵数 Number of flower pollinated	结荚数 Number of silique harvested	结籽数 Total seeds harvested	结荚率 Ratio of silique-set (%)	单荚结籽数 Number of seeds per silique	S ₂ 花粉的 杂交苗数 Number of F ₁ from S ₂ pollen	交互杂 交苗数 Number of F ₁ from A ₁ (A ₂) pollen	S ₂ 花粉的 杂交率 Ratio of F ₁ from S ₂ pollen (%)	花粉来源(父本) 和授粉时间 Time of pollination and origin of pollen(pollen peasant)
A ₁	A ₁₋₆	30	29	275	96.7	9.5	91	8	91.9	A ₂ + S ₂ (4h*)
	A ₁₋₇	34	29	361	85.3	12.4	91	39	70.0	A ₂ + S ₂ (8h)
	A ₁₋₈	38	32	171	84.2	5.3	70	48	59.3	A ₂ + S ₂ (24h)
	A ₁₋₉	55	52	465	94.5	8.9	102	75	57.6	A ₂ + S ₂ (28h)
	A ₁₋₁₀	52	39	363	75.0	9.3	88	103	46.1	A ₂ + S ₂ (32h)
A ₂	A ₂₋₁₆	102	82	815	80.4	9.9	181	36	83.4	A ₁ + S ₂ (4h)
	A ₂₋₁₇	98	76	645	77.6	8.5	180	41	81.4	A ₁ + S ₂ (8h)
	A ₂₋₁₈	31	29	311	93.5	10.7	53	53	50.0	A ₁ + S ₂ (24h)
	A ₂₋₁₉	67	55	492	82.1	8.9	53	70	43.1	A ₁ + S ₂ (28h)
	A ₂₋₂₀	21	17	159	81.0	9.4	4	20	16.7	A ₁ + S ₂ (32h)

注: S₂, 紫菜薹的花粉; *, 重复授粉间隔时间。

Note: S₂, pollen of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. var. *purpurea* Bailey; *, interval time pollinated repeatedly.

3 讨论

3.1 利用温度敏感胞质雄性不育系制杂交种时应注意的问题

杂交种的制种以获得高杂交率的杂交种为主要标准之一, 利用雄性不育系也是一样。温度敏感雄性不育系在遇到低温或在其它条件下, 常出现微量花粉, 有可能造成假杂种。研究表明, 不同育性级别的花药, 其花粉量明显少于正常花药, 在人工饱和授粉情况下的杂交竞争力仅为异源正常花粉的 $1/6$, 并且随异源父本花粉授粉时间延迟, 微量花粉的相对杂交竞争力会有所提高。因此, 在利用这类不育系生产杂交种时应注意做好以下几点: (1) 适当早播父本, 保证父本花期早于不育系花期, 防止不育系内自交; (2) 适当晚播, 推迟不育系显蕾期, 防止不育系显蕾后遭遇持续低温, 诱导产生微量花粉; (3) 要求不育系不育株率 100%, 不育度达 95% 以上。根据不育系分级及分类标准, 不育度达 95% 的群体中, 出现 1~2 级花药的可能仅为 5%, 这样杂交竞争力在饱和授粉 (自然情况下是不可能的) 时仅为 0.23% ($5\% \times 84.4\% \times 16.6\%$), 而且 1~2 级花药一般低于柱头 $2/3$ 以下, 很难自交授粉。另外, 不育系的 1~2 级花药散粉较父本系正常花药晚 1~2 d, 这样杂交竞争力将更低, 不会影响杂种质量。我们利用不育株率 100%, 不育度达 95% 以上的不育系, 在多年的自然隔离制种实践中, 杂交制种的杂交率一直保持 100% 也证实了这一点。

3.2 利用人工诱导微量花粉进行不育系自身保持的可行性

植物雄性不育性在杂种优势中发挥了重要作用, 雄性不育理论及不育性利用途径也不断丰富和完善, 特别是水稻光温敏雄性不育的发现与利用^[12], 开辟了雄性不育研究新的领域。如何简化程序, 变两系为一系的研究已在许多作物中开展^[13,14], 大白菜温度敏感雄性不育是否可以加以利用也是我们一直思考的问题。本文采用人工诱导方法证实了较高程度的恢复花药 (1~2 级) 中具有正常花药 50%~80% 的花粉, 而且自交结荚率正常, 单荚结籽数可达 3~5 粒, 为正常单荚结籽数的一半左右, 这同自交不亲和系相比, 程序还相对简单。因此, 利用人工诱导微量花粉作为不育系原原种保存是可行的。

参考文献:

- 1 Dickson M H. Male sterile persistent white curd cauliflower NY7642A and its maintainer NY7642B. Horticulture, 1985, 20 (5): 957
- 2 鹿英杰. 大白菜细胞质雄性不育系细胞质效应研究. 北方园艺, 2000, (6): 1~3
- 3 Pelletier G, Primard C, Vedel F, et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Mol. Gen. Genet., 1985, 191: 244~250
- 4 Melo P E, Giordano L B. Effect of *Ogura* male sterile cytoplasm on the performance of cabbage hybrid variety. Euphytica, 1994, 76: 117~123
- 5 Walter T W, Mutschler M A, Earle E D. Protoplast fusion-derived *Ogura* male sterile cauliflower with cold tolerance. Plant Cell Report, 1992, 10: 624~628
- 6 Sigareva M A, Earle E D. Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. Theor. Appl. Genet., 1997, 94: 213~220
- 7 柯桂兰, 赵稚雅, 宋脂脂, 等. 大白菜异源胞质雄性不育系的选育. 园艺学报, 1992, 2 (1): 15~20
- 8 张鲁刚, 郝东方, 柯桂兰. 玻利马胞质大白菜雄性不育系 CMS3411-7 温度敏感特性研究. 园艺学报, 2001, 28 (5): 415~420
- 9 侯佐国, 朱永生, 潘文生. 甘蓝型油菜质不育材料微量花粉问题研究 I. 微量花粉发生规律的观察. 贵州农业科学, 1991, (2): 17~21
- 10 张鲁刚, 郝东方. 结球白菜温度敏感细胞质雄性不育系 CMS7311 育性转换的研究. 植物学报, 2001, 43 (11): 1123~1128
- 11 梁 燕, 王 鸣, 赵稚雅. 结球白菜细胞质雄性不育花药和花粉的发育. 西北农业大学学报, 1994, 2: 44~48
- 12 石明松. 对光照长度敏感的隐性雄性不育水稻的发现与初步研究. 中国农业科学, 1985, 19 (3): 34~38
- 13 何立人, 李正玮, 张建奎, 等. 温敏型雄性不育小麦 $\alpha 49s$ 育性转换与温度的关系. 西南农业大学学报, 1996, 18 (4): 328~332
- 14 Koji Murai, Koichiro Tsunewaki. Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility induced in Japanese wheat cultivars by transferring *Aegilops crassa* cytoplasm. Breeding Science, 1995, 45: 199~203

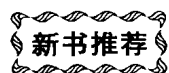
Vigor and Hybridizing Ability of Trace Pollen of Temperature-sensitive CMS in Chinese Cabbage

Zhang Lugang, Hui Maixia, and Zhang Mingke

(College of Horticulture, Northwest Sci-tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The male sterile line of Chinese cabbage CMS3411-7 and CMS7311, with cytoplasm of *Brassica napus* L. were induced under 5℃/9 days condition to obtain trace pollens, which relative vigor and cross-fertile ability was tested by biological way. Its results show that the quantity of trace pollen in anther of sterile grade 1, grade 2 and grade 3 were 73.5% – 84.4%, 47.6% – 51.5% (half sterile) and 28.4% – 32.5% of normal anther respectively; the trace pollen in anther of sterile grade 1 and grade 2 both can fertile by self-pollinated and got about 3.9 grain seeds per silique, which is similar to the situation of low incompatible line; the cross-fertile ability of it is only 9.1% – 16.6% compared with pollen of flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. var. *purpurea* Bailey) even pollinated 4 h before. This is about one sixth to one tenth of normal pollen. Additional, we present the question that should be paid attention to in hybrid production, and the reliability of using the trace pollen induced to reproduce CMS lines was discussed.

Key words: Chinese cabbage; Temperature-sensitive CMS; Vigor of pollen; Cross-fertile ability



新书推荐

《中国果树病虫原色图谱》(第二版) 吕佩珂主编

为了适应我国调整产业结构和发展名特优水果及生产绿色果品的需要,对原图谱进行了大刀阔斧的修订。修订第二版含彩版 144 页,彩色生态照片 1152 幅,文字 120 万,包括落叶果树病害 305 种,害虫 338 种;常绿及热带亚热带果树病害 195 种,害虫 160 种,全书介绍果树病虫害近千种,较原图谱图片和病虫数量增加了 50%,成为中国果树病虫害识别与防治大全。该书图文并茂、内容新颖、信息量大,既突出了无公害和生物防治,也介绍了综合防治方法,以适应入关后南北方生产无公害果品防治病虫害的需要。可供全国果树站、植保站、果林科技人员、广大果农、农资系统、农林院校师生参考。定价:101 元(含邮资)。

《中国蔬菜病虫原色图谱》(第三版·无公害)

《中国蔬菜病虫原色图谱》第三版包括南北方瓜类、茄果类、豆类、葱蒜类、绿叶蔬菜类、多年生及水生蔬菜等病虫害 521 种,其中蔬菜病害 389 种,虫害 134 种,彩图 680 幅、文字 55 万,该书图文并茂,内容新颖。第三版防治方法定位在无公害蔬菜生产上,除充实大量生物防治法外,还介绍了综合防治技术和方法,药剂防治中删去了蔬菜上不得使用 and 限制使用的农药,重点选择使用全国农业技术推广服务中心推荐的无公害农药及高效、低毒、低残留的新品种,以适应加入世贸组织后,全国实施新阶段“菜篮子”工程生产无公害蔬菜的防治病虫害的需要。可供蔬菜站、植保站、农技站、农资系统、庄稼医院、农业院校师生、有关农业企业和科技人员参考。定价:69 元(含邮资)。

《中国花卉病虫原色图鉴》 吕佩珂等主编

该图鉴共有彩版 208 页,彩色生态照片 1664 幅,病原墨线和电镜扫描图片 171 幅,文字 137 万,含花卉病虫害 1608 种,其中病害 1321 种,虫害 287 种,分上下两册。上册包括草本花卉、木本花卉、仙人掌与多浆类花卉病害 903 种,彩色照片 896 幅,彩版 112 页,文字 68 万。下册重点介绍 115 种鲜切花和草坪草病害 418 种,花木害虫 287 种,文字 69 万,含彩色生态照片 768 幅。该图鉴图文并茂、内容新颖、实用性强,是我国第一部花卉病虫害识别与防治大全,是观赏植物植保重要工具书。定价:158 元(上、下册,含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。