

桔梗雄性不育突变体的发现与鉴定

刘自刚, 张雁, 杨亚丽

(商洛学院 生物医药工程系 陕西 商洛 726000)

摘要: 从2 a生桔梗群体中发现雄性不育种质 PA-1 个体, 随后对桔梗花器进行了大量田间观察, 相继发现桔梗雄性不育单株共12株, 统一编号为 PA-1 至 PA-12; 同时对桔梗不育性状表现及特征特性进行初步研究。结果表明: 与其相同来源的正常花相比, 不育花雄蕊短小、花药干瘪萎缩, 色泽为灰褐色; 花粉进行 I₂-KI 染色, 败育花粉外形不规则, 且不能被染色; 不育花雌蕊、蜜腺发育正常, 花冠略大, 对授粉昆虫具有与正常花等同的吸引力; 不育花强迫自交结籽率为0, 异花人工授粉和天然授粉结籽率与正常花间无明显差异, 初步表明 PA 单株为雄性不育材料, 为桔梗杂种优势的利用开辟了新途径。

关键词: 桔梗; 雄性不育; 种质个体; 鉴定

中图分类号: S 567.23⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)01-0040-04

在高等植物中雄性不育是一种很普遍的遗传现象, 到目前为止已在43科162属297种中发现了雄性不育的存在^[1]。不育性是特殊的育种目标性状, 通过雄性不育系进行杂交制种、利用杂种优势已成为许多异花乃至自花授粉植物的主要育种方向^[2], 不育突变体既可用于育种和群体改良, 也是植物生殖生物学和基因组学研究的基础材料。近年来该领域的分子生物学及基因组学研究取得许多进展, 特别是通过育性突变体研究, 使人们对植物雌雄配子发育、育性表现的分子机理有了更深入的了解^[3-5]。植物生殖发育直接维系子实产量, 因此对植物生殖器官发育遗传及调控机理的阐明将为提高植物育种成效奠定基础。

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC) 属于桔梗科、桔梗属, 为多年生双子叶草本植物, 是一种药、食、赏兼用植物。丰富的种质资源是进行桔梗遗传研究和种质改良的物质基础, 具有特异性状桔梗种质的研究鉴定及其遗传信息的占有是科学开展良种培育的前提, 随着桔梗种质观察研究的不断深入, 一些新的种质类型不断发现^[6]。试验于2006年对大量资源材料群体进行不育性的自然变异筛选, 对新发现的育性异常种质进行不育性鉴定, 分析桔梗自然发生不育性的变异特点, 为进一步桔梗育性特异种质发掘研究和利用提供材料和参考。

第一作者简介: 刘自刚(1975-), 男, 甘肃天水人, 硕士, 讲师, 现从事中草药种质资源及育种研究工作。E-mail: lzgworking@163.com。

基金项目: 陕西省科技计划资助项目[2008K16-02(01)]; 陕西省教育厅专项科研资助项目(07K237)。

收稿日期: 2008-08-10

1 材料与方法

1.1 不育突变材料的发现

2006年7月, 在进行桔梗去雄杂交、套袋自交的过程中, 在当地2 a生桔梗栽培群体中发现了1株雄蕊发育异常的桔梗单株, 根据其花器、雌雄蕊发育的形态特征, 初步判断该单株为雄性不育单株, 进一步的花粉染色活力鉴定表明此单株花药虽有少量花粉, 但花粉全部败育。随后在种质资源圃及大田中, 对桔梗花器形态结构展开了大量的田间观察和花粉活力的鉴定, 又相继发现了桔梗不育材料11株, 并统一编号为 PA-1 至 PA-12。

1.2 方法

1.2.1 花器官观察及雌雄蕊测量 初花期开始, 对发现的12株桔梗不育材料进行花器观察和育性鉴定, 每隔3 d进行1次, 随机取当日开放的花1朵, 测量花冠大小、子房、雌雄蕊、花药、花丝、花柱、柱头长度和宽度, 并以相同来源的可育花作为对照。并根据花药着生状态、色泽、花药大小、花粉量等特征, 将桔梗育性分为0~3级, 其中0级表现为花药干枯瘪小, 花药与柱头相离, 花药药室中无花粉; 1级花药干枯瘪小, 花药与柱头相离, 花药药室中有微量败育花粉; 2级花药瘦小扁平, 玉白色, 开花后花药紧裹在柱头上, 有少量花粉; 3级花药长舌状, 淡黄色, 紧裹柱头, 有大量花粉, 花药发育正常。

1.2.2 花粉育性鉴定 在开花期每株取5个花药, 用解剖针将花药切断将花粉粒挤出, 用 I₂-KI 染色, 根据染色结果将花粉粒分为3种类型: 典败: 花粉粒发育不正常, 呈不规则形状, I₂-KI 染色呈不着色; 圆败: 花粉粒六边形, 少数椭圆形, I₂-KI 染色呈黄色; 正常花粉粒: 花粉粒五边形, 少数六边形, I₂-KI 染色均匀且为褐色。

1.2.3 柱头活性鉴定 柱头活性检测采用3% H₂O₂ 检

测法: 于花期从不育单株上分别选择当天开花的新鲜柱头 2 枚, 完全浸泡在 3% 的双氧水反应液中, 如有气泡产生则柱头具有活性, 否则无活性; 正常花柱头作对照。

1.2.4 胚珠数目及活性鉴定 从不育单株上选取即将开放的花蕾(花药未开裂)各 3 朵, 固定于 FAA 中, 带回实验室备用。将子房置于载玻片上, 细心解剖, 将胚珠从胎座中解开, 观察并计数, 重复 3 次。胚珠活性测定采用氯化三苯基四氮唑法(TTC 法), 取当天开放的花朵, 解剖后取出胚珠, 浸泡在 TTC 反应液中, 放置在 35℃ 恒温箱中反应 15 min, 然后置于低倍显微镜下观察, 有活性胚珠被染成红色, 无活性胚珠为无色。

1.2.5 不育株结实率鉴定 于花期对筛选的 12 个不育单株材料, 分别进行人工授粉、套袋自交和自然授粉 3 种处理, 并挂牌标记, 处理后 10 d 除去套袋; 在研究中发现桔梗具有自交不亲性, 且主要由雌雄蕊异熟和花后柱头绒毛隔离花粉造成的, 因此采用延迟授粉的方式进行人工授粉, 即花前 1 d 套袋, 套袋后 3 d 再人工授以新鲜花粉; 种子成熟后统计结实率、结籽率。

2 结果与分析

2.1 花形态特征

桔梗可育花花萼钟状, 裂片 5; 花冠阔钟形合生 5 裂, 大小为(2.53~7.77)cm×(3.02~4.57)cm, 裂深约 1.51 cm, 花色有紫、白、粉 3 种, 花瓣具清晰脉纹; 子房中下位, 5 室, 卵圆形, 长约 0.96 cm, 宽 0.75 cm; 柱头棒状紫色, 密被白色柔毛; 雄蕊 5 枚紧裹柱头, 与花冠裂片互生, 长 1.62 cm, 花药黄色 4 室, 长 0.78 cm, 花丝白色, 下端膨大成盾片状, 长 0.84 cm, 内侧被白色绒毛。桔梗不育花花冠大小、花瓣颜色、子房大小与相同来源的可育花相比没有明显差异; 但不育花柱头比可育花略大, 色泽也较深为蓝色, 柱头外被白色绒毛, 无或少有花粉附着; 花药干瘪萎缩为灰褐色, 与柱头相离, 宽仅为可育花花药的 1/3, 长为 2/3 左右。

2.2 花粉量、胚珠数和花粉胚珠活性

桔梗可育花单花花粉量为 146 880, 胚珠数 197.6 枚, P/O 较高, 为 743.3; 可育花粉经 L-KI 染色均匀且为褐色, 花粉粒正五边形; 胚珠与 TTC 反应被染成深红色, 具有较高活性。桔梗不育单株 PA-1、PA-3、PA-4、PA-5、PA-6、PA-7、PA-9 和 PA-11 有微量花粉产生, 染色镜检后发现花粉外形呈不规则状, 不能被 L-KI 染色, 为典败花粉, PA-6 花粉粒能被 L-KI 染成浅黄色, 花粉外形呈正六边形, 为圆败花粉, 其余不育单株花药中无花粉产生; 不育花单花平均有胚珠 203.4 枚, 比可育花略多, 发育正常, 且活性与可育花胚珠相当。

2.3 柱头运动及活性

桔梗可育花花蕾刚开放时, 柱头被 5 枚雄蕊紧紧包裹, 也有的柱头顶部微露。花后 6 h 花丝开始逐渐离开

柱头。柱头为浅紫色棒状, 表面密被白色柔毛, 可能是柱头表面细胞壁的突起物。花后 1 d, 柱头白色柔毛开始减少, 花后 2 d 被毛消失, 柱头表面变得光滑, 紫色加深, 柱头微裂; 花后 3 d 柱头 5 裂, 裂片向下卷曲, 至 4 d 柱头与 H₂O₂ 反应, 仍有大量气泡产生, 说明此时柱头活性仍较高, 到花后 5 d 时, 柱头开始逐渐干萎。不育花花药短小与柱头相离, 花药不开裂, 柱头深蓝色密被白色绒毛, 随后绒毛减少, 柱头五裂, 但柱头活性保持时间比可育花柱头长。

2.4 开花物候期

12 个桔梗不育单株 6 月 29 日~7 月 6 日先后开花, 平均单株花期约为 45 d, 开花的次序为植株顶部花蕾最先开放, 在分枝上一般也是顶部花蕾先开, 单株总花数为 50~110 朵, 平均 70 朵; 单株每天开 0~7 朵花, 通常为 1~4 朵。单花花期一般为 2~3 d, 当阴天低温可延长至 3~4 d。夏季晴天, 花蕾一般在上午 6:00~10:30 陆续开放, 若遇阴天低温, 开花时间延迟到 8:00~11:30, 也有些花蕾在黎明 6:00 以前, 但很少花蕾在午后开放。

2.5 桔梗不育株的天然传粉

2.5.1 花部特征对传粉昆虫的招引作用 试验设去除雄蕊、去除柱头、去除花冠、吸尽花蜜和完整花(对照) 5 种处理, 检测桔梗花部特征对昆虫的招引作用。结果表明: 桔梗花冠对授粉昆虫具有强烈的招引作用, 花蜜次之, 而柱头和花药对昆虫都没有明显招引作用。去除花冠和吸干花蜜后, 授粉昆虫访花频率与对照相比有明显降低, 其中去除花冠后昆虫访问频率为 0; 吸干花蜜处理昆虫访问频率也仅为对照的 15.38%, 而且访花昆虫在单花上停留时间也明显缩短。与相同来源的可育花相比, 桔梗不育花蜜腺、子房均发育正常, 花冠、柱头略大, 而花药较小, 由于花药对授粉昆虫的吸引作用不明显, 较小的花药并没有降低不育花对昆虫的吸引力, 表明不育花与可育花对授粉昆虫具有等同的吸引作用。

2.5.2 访花昆虫 桔梗不育花的访花昆虫及其行为与可育花相同, 主要有土蜂、蜜蜂、熊蜂、木蜂、黄蜂、蝶类、蝇类等十几种昆虫, 其中访花频率较高、较稳定的访花者仅有土蜂和蜜蜂, 熊蜂和木蜂次之, 其它访花者少见或偶见。土蜂和蜜蜂采花均从花冠正前方足先落到柱头上, 也有少数足先落到花冠内侧, 再爬上柱头, 然后沿柱头爬到花冠基部, 喙管从花丝缝隙间伸入采吸花蜜。土蜂和蜜蜂访花主要目的是采蜜, 但偶尔也有采花粉的, 这 2 种传粉者都有良好的授粉效果。土蜂访花一般在单花上停留 17.1 s, 蜜蜂平均停留 18.0 s, 这 2 种蜂一般 1 次连续访花 4~8 朵, 然后离去。木蜂访花目的是吸取花蜜, 一般在单花上停留 3.7 s, 访花时在花冠内踏足, 由于木蜂体形较大, 可以较好地给柱头授粉; 木蜂采花范围较大, 1 次一般采 7~18 朵花。黄蜂偶尔采花, 一般

在单花上停留 2.8 s。蝶类极少访花, 访花目的不明确。蛾类偶尔访花, 访花时在柱头或花冠上踏足, 通过长长的喙管吸食花蜜。食蚜蝇访花目的主要是吸食花冠汁液, 踏足位置不固定, 一般接触不到柱头, 因此授粉的可能性不大。

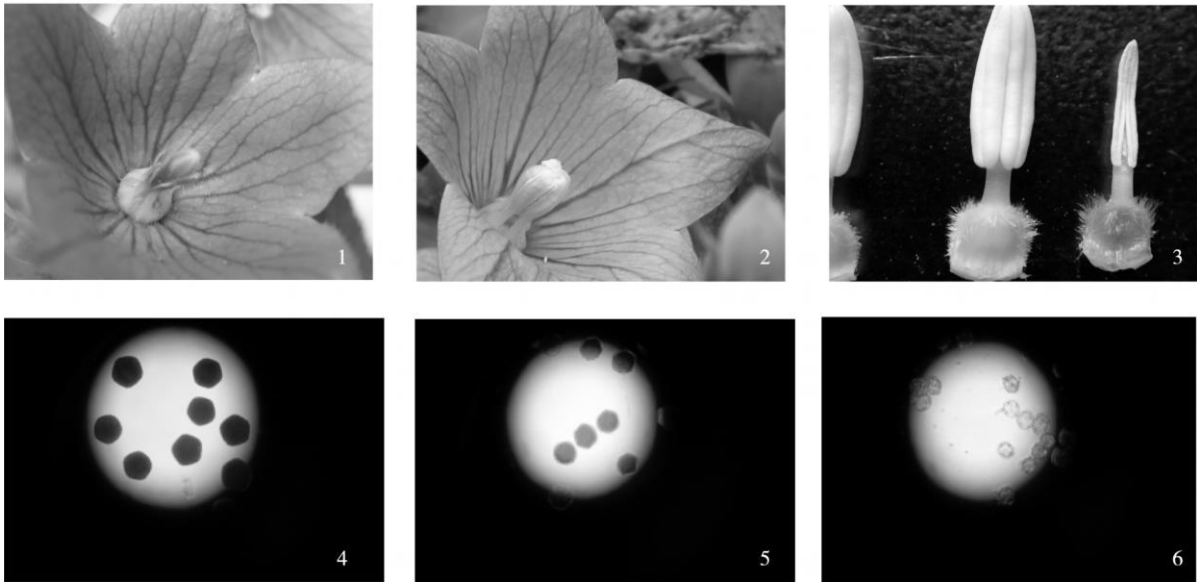
2.6 不育花结实率

桔梗不育花与正常花人工杂交和自然授粉结果率、

结籽率和亲和指数均较高, 不育花与相同来源的可育花在结实性上无明显差异; 不育花自交不能结籽, 桔梗不育花花粉无授粉活力, 表明不育花雌蕊正常可育而雄蕊不育, 发现的桔梗不育单株确为雄性不育单株(见表 1)。从表 1 还可以看出, 桔梗自交和杂交结籽率、亲和指数均较高, 表明延迟 3 d 授粉是克服桔梗人工授粉结实率

表 1 桔梗不育花与可育花结实比较

Table 1 Compare with male sterility flower and normal flower for the ratio of setting seeds								
育性类型	授粉方式	授粉花数 No. of	结果数 No. of	结果率 Ratio of	饱满粒数 Full	瘪籽数 Hollow	亲和指数	败育残迹
Style of sterility	Style of pollination	pollinated stigma/ 个	fruity/ 个	fruit-set/ %	seeds/ 个	seeds/ 个	Compatibility index	No. of aborted embryo
不育花 Male-sterility flower	人工授粉 Artificial pollination	50	47	94	3 686	42	73.72	21.5
	强迫自交 Forced self-pollination	50	2	4	0	0	0	0
	自然授粉 Natural pollination	50	50	100	3 812	12	76.24	12.3
正常花 Normal flower	人工授粉 Artificial pollination	100	96	96.0	7 572	1.0	75.72	0.4
	强迫自交 Forced self-pollination	100	92	92.0	7 168	9.1	71.68	6.4
	自然授粉 Natural pollination	100	98	98.0	7 458	32.5	74.58	28



图版说明: 1. 雄性不育花; 2. 正常花; 3. 不育花药、正常花药; 4. 正常花粉; 5. 圆败花粉; 6. 典型败花粉。

Plate 1. Male-sterility flower; 2. Normal flower; 3. Abortive anther and normal anther; 4. Normal pollen; 5. Spherical abortion; 6. Typical abortion

3 讨论

在自然条件下, 出现一定频率雄性败育突变体, 在高等植物中是一种较为普遍的现象。桔梗的不育种质在吉林^[7]、山东^[8]已有发现。在 2006 年 7~8 月桔梗花期期间, 在当地桔梗群体中发现桔梗雄性不育单株 12 个, 对其花粉、柱头、胚珠活性进行了鉴定, 并在田间对其进行了不同授粉处理, 结果显示不育花无花粉或有微

量败育花粉, 而柱头、胚珠发育正常, 田间授粉结籽率与相同来源的正常花无明显差异, 初步判断发现的 PA 单株为雄性不育突变体材料, 这一发现拓宽了桔梗不育种质的遗传基础。植物与其授粉者的相互作用被认为是被子植物花进化的重要推动力, 相互作用表现在花部特征对访花者行为和花粉传递机制的影响^[9], 植物花的特征可从两个

层次来认识,即花部构成和花的开放式样,花部构成包括花的结构、颜色、气味和蜜汁产量等单个花的所有特征,花的开放式样是指花在某一个时间开放的数量和空间排列,可看作花在群体水平上表现出的特征^[10]。而花的招引包括几个同时作用的刺激物:视觉的、嗅觉的和短程的触觉指示;而招引的强度依赖于花的颜色、大小和形状以及挥发物的挥发强度和传粉者的感知^[11]。在许多植物中普遍存不育花花瓣皱缩、蜜腺退化等问题,降低授粉昆虫访花频率,使不育株系结籽率下降,常造成不育株系的繁种和通过不育系制备杂交种的成本大为增加,成为不育材料广泛利用的不利因素。桔梗不育花花冠、蜜腺、雌蕊均发育正常,与相同来源的正常花相比,对授粉昆虫具有等同的招引作用。花冠对授粉昆虫具有强烈的招引作用,花蜜次之,而花药对昆虫没有明显招引作用。

在对桔梗不育单株开花习性的研究中,观察到PA-5、PA-7和PA-9不育株,同一单株后期开的花比前期开的花败育更为彻底,6月下旬至7月上旬所开不育花有微量花粉,随着气温逐渐上升,到7月下旬所开不育花花药变小,色泽灰褐干枯,仅有微量败育花粉。不育花在温度等环境因子影响下出现微量花粉,在许多作物不育性状表现中也较为常见,这可能是由于花蕾形成过程中气候条件不同造成的,气候上的差异可能使某些

控制育性的微效基因对花粉的形成过程产生修饰和干预,导致了较高温度下小孢子发育异常时间的提早,最终造成雄蕊的败育更为彻底。

参考文献

[1] 谢潮添,魏冬梅,田惠桥.高等植物雄性不育的细胞生物学研究进展[J].植物生理与分子生物学报,2006,32(1):17-23.
[2] 孟金陵.植物生殖遗传学[M].北京:科学出版社,1995.
[3] 赵团结,盖钧铭.大豆不育性自然变异的发现与鉴定[J].中国农业科学,2006,39(9):1756-1764.
[4] 秦垦,田英,李云翔,等.宁夏枸杞雄性不育种质个体YX-1的发现与鉴定[J].西北植物学报,2006,26(9):1838-1841.
[5] 王玖瑞,刘玲,刘孟军,等.枣树雄性不育新种质的获得[J].园艺学报,2006,33(2):374-377.
[6] 刘自刚,张雁,王新军,等.桔梗育种研究进展[J].中草药,2006,37(6):6-8.
[7] 吴基日,严一字,朴锦.桔梗雄性不育种质JXB-1的发现与鉴定[J].延边大学农学学报,2007,29(4):245-248.
[8] 王志芬,苏学合,单成钢.桔梗雄性不育材料的发现与鉴定[J].现代中药研究与实践,2007,21(5):8-10.
[9] 黄双全,郭友好.传粉生物学的研究进展[J].科学通报,2000,45(2):223-273.
[10] Barrett S C H, Harder L D. Ecology and evolution of plant mating[J]. Trends in Ecology and Evolution,1996(11):73-78.
[11] 王英强,张奠湘,陈忠毅.益智传粉生物学研究[J].植物生态学报,2005,29(4):599-609.

Discovery and Identification for Male-sterile *Platycodon*

LIU Zi-gang, ZHANG Yan, YANG Ya-li

(Biological Medicine Engineering Department of Shangluo University, Shangluo, Shanxi 726000, China)

Abstract: There was male sterility *Platycodon germplasm* PA-1 discovered in the two-year colony. In succession, flowers of platycodon were observed largely in the diverse colony of platycodon. One after the other, 12 individuals of male-sterility *Platycodon* were discovered, and were denominated severally from PA-1 to PA-12. Characteristic and behave of male-sterility plant were further studied. Results showed: to compare with the nature flower, the stamen of male-sterility flower was smallish, anther was atrophic and dust color. The shape of abortive pollens was anomalistic and I₂-KI staining indicated that no pollens were stained. Corolla was slightly big, pistil and nectary was natural in abortive flowers. To compare with normal flower, there were the uniform effect in attracting pollinators. Its forced self-pollination rate was zero, however, its natural pollination and artificial pollination rate was normal. A new way was opened up for utilizing hybridization crossbreeding of germplasm resources since discovery male-sterile of platycodon.

Key words: *Platycodon grandiflorum*; Male-sterility plant; Germplasm