

棉花单隐性核不育两用系镜检观察与选育技术

马惠应, 彭家成, 汪华春, 黄书伟, 张庆虎 (合肥丰乐种业股份有限公司, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的]为加快棉花单隐性核不育两用系选育探索新的技术。[方法]对棉花花药、花粉母细胞采用化学试剂染色和镜检, 观察形态特征, 依据育种目标及显微形态特征, 确定“对株交”组合。[结果]选择可育株花粉母细胞中染败细胞比例较高的单株, 作为花粉供体, 可快速提高后代群体中不育株率。选择花药无粉及花粉母细胞以圆败或典败为主的不育株, 作为“对株交”花粉的受体, 可提高后代不育系的不育度。[结论]该项技术具有一定的实践意义, 可提高不育系选择的准确性及不育系改造与稳定多样性的选育速度。

关键词 棉花单隐性核不育两用系; 染败型不育株; 圆败型不育株; 典败型不育株

中图分类号 S562 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2013)07 - 02926 - 03

利用杂种优势是提高棉花产量、改善纤维品质、增强抗性的重要途径。这被在长江流域棉区, 抗虫杂交棉花新品种得到大面积推广并取得巨大经济效益和生态效益所证实。然而当前生产上应用的杂交棉花品种主要是人工去雄杂交。杂交制种劳动强度大, 随着社会进步, 劳动力成本逐年提高, 人工去雄杂交棉走入了困境。利用单隐性核不育两用系配制杂交种较人工剥花制种节省成本 30% ~ 50%。这项技术也比较成熟, 前几年, 相继通过几个省审、国审品种, 但目前大多数已退出长江棉区种子销售市场, 究其原因是杂交 F_1 种大田表现存在一定比例的不育株, 生产有风险, 限制其广泛应用。

棉花单隐性核不育两用系利用成败关键在于该类不育系改造与稳定多样性的选育。不育系改造重点解决快速提高不育株在后代群体中分离比例和提高不育系不育度, 雄性不育花粉母细胞败育要彻底。稳定多样性选育要求选育出的不育系集高产、多抗、生长势强等优良性状于一身。不育系本身及所配制的杂交 F_1 种大田表现育性稳定, 受生态环境影响小^[1-5]。鉴于以上要求, 在进行该类不育系改造选育时, 仅靠传统的眼观、手感选择, 难以快速、准确、到位, 取得预期效果。为此, 笔者进行了不育系、可育株及用该不育系配制的杂交 F_1 花药、花粉镜检观察与选育技术方面的探索。

1 棉花花药、花粉母细胞镜检方法及显微图片特征

1.1 花药镜检观察 取样时间: 7月上旬 ~ 8月中旬 07:00 ~ 09:00。取样对象: 花苞突出苞叶, 当天上午即将开放的花。摘取杂交 F_1 可育株、不育株上的花数朵, 立即拿到实验室, 放在亮光处, 待花完全开放后, 剥去花冠, 采用 TTC 染色法(染色液三苯基氯化四氮唑)对花药进行染色。然后用镊子摘下每朵花上任意一个花药, 置激光共聚焦显微镜下观察, 拍照。其中, 杂交 F_1 花药上着生密集花粉粒, 且圆、大、黑, 呈毛球状(图 1)。可育株: 花药上着生密集花粉粒相对稀少, 体积也较小(图 2)。有微粉不育株, 花药上虽无花粉粒着生, 但四周见到少量花粉粒散落分布(图 3)。败育彻底的不育株: 花药上无花粉粒着生(图 4)。

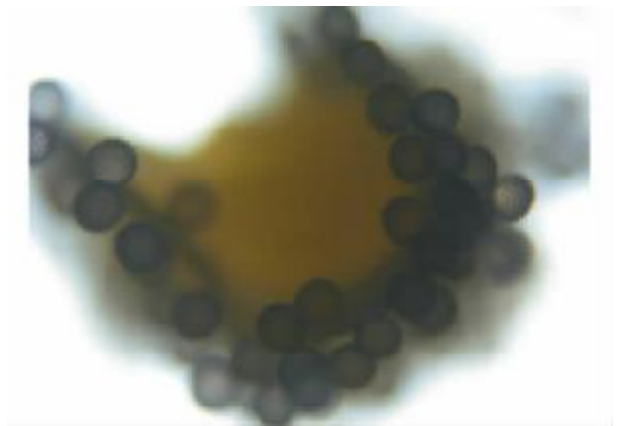


图 1 杂交 F_1 花药形态



图 2 可育株花药形态



图 3 有微粉不育株的花药形态

基金项目 转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX08013016)。

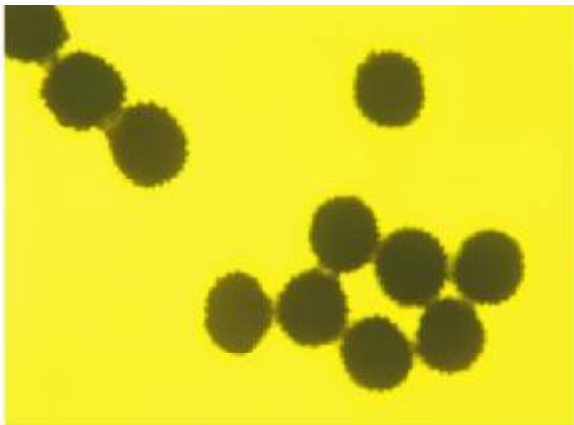
作者简介 马惠应(1958 -), 男, 安徽肥西人, 高级农艺师, 硕士, 从事棉花育种工作, E-mail: mhy1958@163.com。

收稿日期 2013-02-28



图4 不育株花药形态

1.2 花粉母细胞镜检观察 取样时间、取样对象与花药镜检相同。在试验室待花开放后剥去花冠,用镊子压碎花粉粒,放在载玻片上,滴1~2滴碘酞,盖上盖玻片,置激光共聚焦显微镜下观察,拍照。其中,杂交 F_1 :经碘酞染色后,显微镜下,花粉母细胞全部呈黑色,四周棘毛明显(图5)。可育株:经碘酞染色后,显微镜下,一个显微视野圈内,虽然大多数被染成黑色,但存在一定比例褐色细胞(图6)。染败型不育株:经碘酞染色后,显微镜下,一个显微视野圈内以染败细胞为主(图7)。圆败型不育株:经碘酞染色后,显微镜下,一个显微视野圈内以圆败细胞为主,同时存在少量染败细胞(镜检图片特征介于图7与图8之间)。典败型不育株:经碘酞染色后,显微镜下,一个显微视野圈内以典败或无形细胞为主,同时存在少量圆败细胞(图8)。

图5 杂交 F_1 花粉母细胞

2 不育系改造与稳定多样性选育

2.1 快速提高群体中不育株率 依据育种目标对“洞A”及其衍生系进行改造与选育,通常采用多亲本杂交、回交相结合方法,促高产、优质、抗性、生长势强等优质性状向不育系集中。实践中面临着在采用多亲本杂交、回交手段聚合优质资源时,杂交后代群体中显现不育株比例较低,一般10%以下。将不育株率从10%快速提高到50%以上,普遍采用对株交。在进行对株交操作过程中,选择适宜可育株配对是关键。适宜可育株标准:产量、抗性、农艺等性状符合育种目标,镜检花粉母细胞中染败或黑褐色比较高的单株。作为不育株花粉供源,多代轮回选择,进行对株交。直至群体中

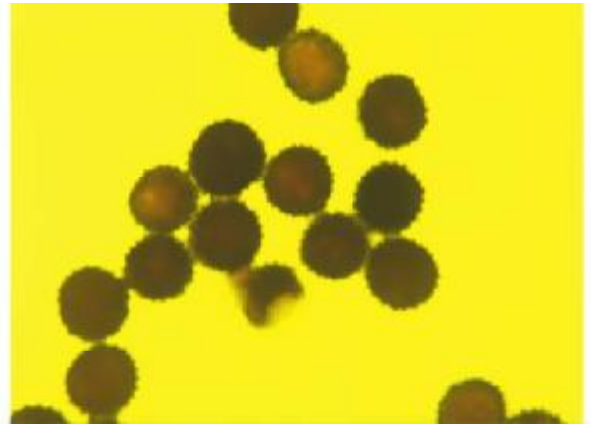


图6 可育株花粉母细胞

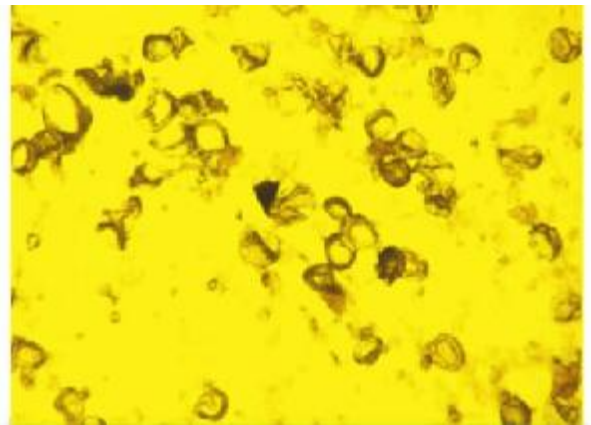


图7 染败型不育株花粉母细胞

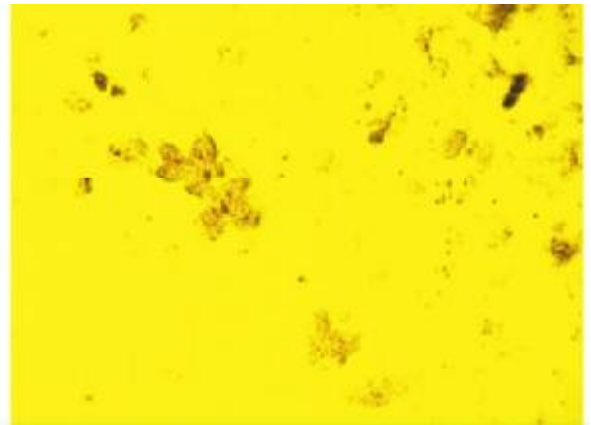


图8 典败型不育株花粉母细胞

不育株分离比例达45%~50%。

2.2 提升不育株的不育度水平 所选育的棉花核不育两用系群体中不育株率稳定在45%~50%时,注重不育株花粉败育程度高低选择,首先对田间各不育系株行育性评估,理想的株系:7~8月检测,不育株花粉母细胞圆败或典败,甚至无形。若达不到上述标准,需进一步改进,从群体中选择理想的不育株与理想可育株配对,进行对株交。轮回选择多代,直至符合标准。

2.3 降低杂交 F_1 种不育株率 选用的单隐性核不育两用系中的不育系同恢复系配制杂交种前,应注重检测不育株花药四周是否残存花粉粒。被检花若存在比例超过0.5‰时,考虑到大田生产安全,应弃之不用。

3 结论与讨论

棉花不育系雄性不育花药、花粉形态观察与选育技术方面研究,过去未被人重视,相关报道也较少。通过笔者观察及几年选育实践,证明其较眼观、手感选择准确到位。利用此项技术,笔者曾相继选育了丰81A、丰88A,现在已进入测配、筛选杂交棉花新品阶段。该研究中,染败、圆败、典败之间区分标准是借助水稻不育系,花粉碘酞剂染色的经验标准划分的。染败是花粉圆形,遇碘边缘着色或部分染色。圆败是花粉圆形,遇碘不染色。典败是花粉呈不规则形状,菱形或圆形凸凹,遇碘完全不着色。需要说明的是,花粉母细胞败育程度完全依据镜检花粉母细胞镜检形态特征人为划分的。整个棉花花粉发育过程与败育型关系有待于进一步研

(上接第2912页)

绘制标准曲线,计算回归方程。(2)精密度试验。精密吸取尿囊素对照品溶液10 μl,连续进样5次,记录峰面积并计算RSD。(3)稳定性试验。精密吸取尿囊素对照品溶液5 μl,每隔2 h进样1次,共进样5次,记录峰面积并计算RSD。(4)加标回收试验。精密吸取已知山药尿囊素浓度为1 mg/ml的样品溶液5份,每份取0.1 ml,分别精密加入30.0、60.0、90.0、120.0和150.0 μg尿囊素对照品溶液,计算尿囊素的平均回收率和RSD。

1.2.7 怀山药和零余子尿囊素的含量测定。准确吸取怀山药样品溶液20 μl,连续进样3次,根据标准曲线回归方程计算怀山药中尿囊素的含量。准确吸取怀山药零余子样品溶液20 μl,连续进样3次,根据标准曲线回归方程计算怀山药零余子中尿囊素的含量。

2 结果与分析

2.1 吸收波长的选择 图1表明,在190~300 nm波长范围内,最大吸收峰在224 nm处,因此选择224 nm作为测定波长。

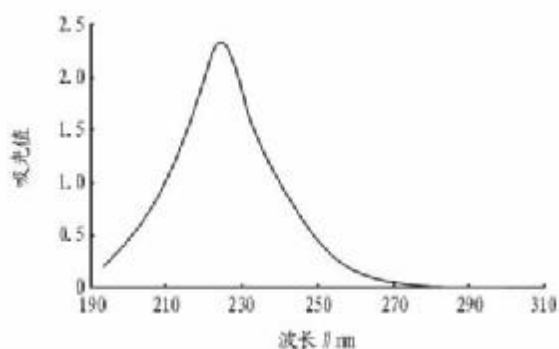


图1 测定波长的选择

2.2 方法学考察 (1)线性关系的考察。通过计算得尿囊素对照品含量对以峰面积积分值的线性回归方程为 $Y = 10.9190X + 0.1768$, $R^2 = 0.999$ 。试验结果表明,尿囊素在0~0.002 mg/ml浓度范围内与峰面积积分值的线性关系良好。(2)精密度试验。经测定得峰面积平均值为10.935, RSD为1.32% ($n=5$),表明精密度良好。(3)稳定性试验。经测定峰面积平均值为5.572, RSD为0.62 ($n=5$),表明尿囊素溶液在

究。该研究中呈现的照片属碘型照片。实际镜检中,大多数同一株不同部位所开的花存在差异。同一朵花常以圆、染混生型居多,碘、圆混生型居少,单独典败型难找,需要进行大量的花检,才能作出正确判断,取得良好的效果。

参考文献

- [1] 刘金兰,徐征秀,聂以春. 棉花花粉不同发育时期的扫描电镜观察[J]. 华中农业大学学报,1994,13(1):15-18.
- [2] 聂志华. 对典败和圆败的认识和讨论[J]. 江西农业科技,1980(4):10-12.
- [3] 梅正鼎,贺云新,张志刚,等. 浅析国内棉花不育系的研究与应用[J]. 江西棉花,2011,33(4):3-5.
- [4] 张志刚,周世象,李育强. 湖南棉花不育系研究进展与发展思路[J]. 湖南农业科学,2007(1):19-21.
- [5] 王斌,费德友,杨洪理. 棉花不育系与恢复系配合力分析[J]. 中国棉花,1998,25(8):8-9.

4 h内基本稳定。(4)加标回收试验。由表1可知,平均回收率为98.35%, RSD为1.29%,表明该方法简便、易行、准确度高,可用于怀山药零余子中尿囊素成分的含量测定。

表1 加标回收率实验结果($n=5$)

序号	对照品含量	测得量	回收率	平均回	RSD
	μg	μg	%	收率//%	%
1	30	125.75	96.73	98.35	1.29
2	60	156.54	97.84		
3	90	190.51	100.27		
4	120	216.98	98.63		
5	150	245.71	98.28		

2.3 怀山药和零余子尿囊素的含量测定 测得怀山药供试液峰面积平均值为2.505,根据标准曲线回归方程计算出怀山药中尿囊素含量为0.533%。测得怀山药零余子供试液峰面积平均值为3.876,根据标准曲线回归方程计算出怀山药零余子中尿囊素的含量为0.848%。

3 结论与讨论

试验采用高效液相色谱方法测定尿囊素,方法简单、易行、准确,且精密度高,稳定性好。试验结果表明,怀山药尿囊素含量为0.533%,零余子中尿囊素含量为0.848%;怀山药零余子中尿囊素的含量高于怀山药中尿囊素的含量,可以进行深入开发研究。但该试验未对怀山药零余子中尿囊素的提取工艺进行优化,仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 谢宗万. 中药材品种论述. 中册[M]. 上海:上海科技出版社,1984:193.
- [2] 聂桂华,周可范,董秀华,等. 山药的研究概况[J]. 中草药,1993,24(3):158-160.
- [3] DOMSCH K H, GAMS W, ANDERSON T H. Compendium of the soil fungi [M]. London: New York: Academic Press, 1980:1580-1593.
- [4] 周文静,范鸿雁,何凡,等. 海南省西瓜炭疽病菌生物学特性及药剂毒力测定[J]. 安徽农业科学,2012,40(4):2070-2073.
- [5] 范鸿雁,罗霓,陶挺燕,等. 番木瓜弯孢霉叶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2010,39(2):45-47.
- [6] 薛建平,祝红蕾,尧俊英. 铁棍山药及其零余子营养成分的比较研究[J]. 食品工业科技,2008(8):268-269.
- [7] 凌育赵. 高效液相色谱法检测淮山米粉尿囊素的研究[J]. 粮油食品科技,2006,14(1):52-59.
- [8] 王玲,王东. 不同产地山药中尿囊素含量的HPLC测定[J]. 河南中医学院学报,2006,21(5):20-22.
- [9] 王宝华,江佩芬,杜海燕,等. HPLC法测定山药中尿囊素的含量[J]. 北京中医药大学学报,1995,18(1):67-68.
- [10] 毛维伦,夏险峰,田连起,等. 茯苓饮片的紫外光谱分析[J]. 湖北中医学院学报,2006,8(1):37-38.