

油菜复配化学杂交剂研究及应用^①

刘绚霞, 刘创社, 董振生

西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 为筛选新型高效油菜复配化学杂交剂, 研究其应用技术及杀雄机理, 用其拟制细胞质不育系低温微粉和选育化杀两系杂交种. 将 2 种高活性杂交剂复配, 多年多点大田试验研究其应用技术, 生理生化、大田调查和细胞学观察研究其杀雄机理和杀雄效果, 醋酸洋红染色测定花粉活力. 油菜单核期在茎叶上喷雾 0.5~0.8 mg/L 复配化学杂交剂, 杀雄效果好, 花药皱缩干瘪呈针状、花丝明显缩短、花药无花粉或为空秕、畸形的败育花粉, 绒毡层提前解体或液泡化, 全不育株率 95% 以上, 不育株率 100%, 不育度 95% 以上, 杂交种纯度提高 8% 以上. 复配化学杂交剂是一种活性高、用量少、成本低、较为理想的新型油菜化学杂交剂.

关键词: 油菜; 化学杂交剂; 杀雄效果; 雄性不育; 杂交种

中图分类号: S634.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0042-07

化学物质诱导作物雄性不育已成为油菜杂种优势利用的 3 条主要途径之一. 本研究筛选的复配化学杂交剂比传统单剂用量少, 成本低、残留少、效果好; 可以有效控制细胞质不育系低温微粉的发生, 提高了杂交种的纯度, 从而减少了油菜生产的风险; 育种程序简单、周期短、风险低, 减少了转育不育系等繁琐程序. 官春云等^[1] 1977 年开始油菜化学杀雄研究, 1979 年和 1981 年研究报道了杀雄剂 1 号对甘蓝型油菜的杀雄效果及其杀雄机理, 诱导雄性不育达 80% 以上, 这项技术确立了我国在世界上油菜化学杀雄杂种研究和应用的领先地位^[2-3]. Banga^[4] 分别在 1983 年和 1984 年用乙烯利诱导芥菜型油菜雄性不育, 制种杂交率为 10%~54%, 无法在生产上应用. 张耀文等^[5-6] 用 SX-1 控制甘蓝型油菜 CMS 的微粉, 使杂交恢复率提高了 5%~10%. 于澄宇等^[7] 用化学杂交剂 EXP 诱导油菜雄性不育, 不育率达 92%~97%. 高志宏等^[8] 用化杀灵 WP3 使 GMS 中的可育株雄性败育, 促使其杂交结实, 纯度达 95% 以上, 刘绚霞等^[9] 研究了 EN 的杀雄效果. 湖南农业大学、西南农业大学^[10-11]、四川农业大学和陕西杂交油菜中心利用化学杀雄技术已经育成湘杂油、渝黄、渝杂、蜀杂、秦优等近 20 个油菜杂交种. 目前最主要的问题是缺少理想的油菜化学杂交剂, 寻求高效、稳定和低毒的化学杂交剂并掌握其应用技术是油菜化学杂交开发的主要任务之一, 以上报道和近年所报专利 CN 100345484C 与 CN 1251597C 均为单一杂交剂, 油菜复配化学杂交剂未见报道. 本文将磺酰脲类高活性除草剂苯磺隆和噻吩磺隆复配, 筛选新型油菜化学杂交剂, 研究其应用技术, 最佳用药时期、浓度范围和杀雄机理, 拟解决的关键问题是筛选新型复配油菜化学杂交剂, 以抑制细胞质不育系低温微粉发生和选育杂交种. 复配化学杂交剂在油菜单核期一次喷雾, 可以诱导细胞质雄性不育系和正常可育植株完全雄性不育, 全不育株率 95% 以上, 不育株率 100%, 并对农艺性状影响小, 是一种活性高、用

① 收稿日期: 2013-07-02

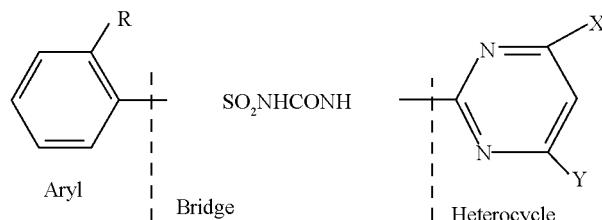
基金项目: 陕西省农业攻关资助项目(2013K02-09); 杨陵示范区科技计划资助项目(2014NY-25); 唐仲英育种基金资助项目(A212021208).

作者简介: 刘绚霞(1964-), 女, 陕西咸阳人, 副研究员, 主要从事油菜遗传育种研究.

量少、成本低、较为理想的新型油菜化学杂交剂. 将其用于油菜育种, 效果良好. 控制细胞质微粉, 种子纯度达 95% 以上, 杂交种纯度提高 8% 以上, 已经省级鉴定化杀不育系 2 个, 审定化杀杂交种 1 个.

复配化学杂交剂的研究是根据油菜个体发育到一定时期, 雌雄蕊对该组合物敏感程度的差异来诱导油菜雄性不育. 研究选择该组合物在油菜生殖生长的适宜时期喷施适宜用量, 诱导油菜雄蕊完全不育, 而雌蕊可育. 即对雄配子有选择性地杀伤或抑制发育, 使花粉生理性不育, 或抑制花粉正常发育或阻止花粉形成, 使花粉失去受精能力, 达到自交不结实即去雄的目的, 给杂交制种提供母本, 而对雌配子无不良影响或影响很小.

复配化学杂交剂为磺酰脲类化合物, 这类化合物共有 30 多种, 结构模式如下:



分为芳环(Aryl)、脲桥(Bridge)和杂环(Heterocycle)3 部分. 苯环邻位引入各种取代基(R)均可增强活性, 许多吸电子基和给电子基都是活性基团, 且吸电子基比给电子基更为有利. 常见的活性基团 R 有 NO₂, F, Cl, Br, CO₂CH₃, SO₂N(CH₃)₂, CF₃, CH₂OCH₃, OCF₃ 等, 但 R 为 COOH 或 OH 时有减弱活性的作用. 将苯环改为噻吩、吡啶、吡唑、呋喃、萘、喹啉等杂环的磺酰脲也有活性. 具有无修饰脲桥的磺酰脲活性最高, 脲桥经修饰的化合物也具有活性, 其活性大小取决于芳环和杂环上的取代基, 因此本课题组选择了活性较高的苯磺隆和噻吩磺隆作为复配化学杂交剂主要成分. 苯磺隆和噻吩磺隆都是磺酰脲类内吸传导型芽后选择性除草剂, 经多年研究发现, 苯磺隆与噻吩磺隆用除草剂推荐剂量的 1/100~1/1000 均可诱导十字花科作物如油菜、甘蓝和白菜等雄性不育, 对十字花科作物的生殖生长具有抑制作用. 本研究表明, 两者复配后作为植物的化学杂交剂, 效果更好, 更安全, 易被植物的茎叶吸收, 经木质部和韧皮部传导至植物的分生组织, 在植物体内的作用靶标是乙酰乳酸合成酶, 通过抑制该酶活性, 阻止支链氨基酸亮氨酸、异亮氨酸等的合成.

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

2010—2011 年, 田间试验在西北农林科技大学西乡油菜基地进行, 室内试验在杨凌西北农林科技大学油菜研究中心实验室进行.

1.2 材料

化学杂交剂由苯磺隆和噻吩磺隆复配而成. 供试油菜为自育的甘蓝型油菜自交系 S309, S212, S509, S319, 1521C, 119C, 1186C 和 1286c. 主要药品: 酒精、冰乙酸、二甲苯、醋酸洋红、铁矾苏木精等. 主要仪器: 电子天平、高压喷雾器、石蜡切片机、显微镜、显微摄像机、a 索尼照相机等.

1.3 方法

1.3.1 田间试验

田间试验于 2010—2011 年在西北农林科技大学西乡油菜基地进行. 2010 年 9 月播种, 行长 3 m, 行距 0.5 m, 留苗密度 18 万株/hm². 2011 年配制 0.7, 0.8, 1.0, 1.3 mg/L 体积质量分数的杂交剂溶液, 根据多年研究的经验, 在以往研究的基础上用背囊式高压喷雾器在甘蓝型油菜自交系 S309, S212, S509, S319, 1521C, 119C, 1186C, 1286c 的小孢子发育单核期, 以各自适合的体积质量分数各喷 1 次, 每个体积质量分数处理喷 10 行. 喷药后每隔 5 d 调查油菜生长开花情况, 适宜时期测量花冠直径、花瓣大小、雌蕊长度、花丝长度、花药长度等, 观察花粉活力, 调查统计初花期、终花期、每个体积质量分数处理的

全不育株率、半不育株率、可育株率和药害株率, 并套袋自交, 必要时照相, 收获后考察各农艺性状, 统计自交、自然结实率. 花期选择杀雄效果好, 农艺性状优良, 高含油量双低甘蓝型油菜自交 S309, S319 和 S509 作母本配制杂交组合.

1.3.2 花粉活力测定

油菜初花开始每 3 d 取样镜检 1 次. 上午 9—10 点采摘当天开放的花朵, 取其花粉. 采用 1% 醋酸洋红染色, 镜检呈深红色的花粉为活花粉, 淡红色的为部分失去活力的花粉, 无色、空秕、畸形的为败育的或死的花粉粒.

1.3.3 育性鉴定

以油菜花期花器形态、花粉活力和田间结实情况确定. 全不育株: 雄蕊退化呈针状, 花药无花粉, 败育、死花粉率 90% 以上, 自交不结实; 半不育株: 雄蕊退化呈三角形, 位置低于雌蕊, 花药有少量花粉, 败育、死花粉率 60%~90%, 自交有部分结实; 可育株: 花器正常, 花药有大量花粉, 80% 以上花粉有活力, 自交正常结实.

1.3.4 细胞学观察

上午 9—10 点采摘单核期处理的 S309 自交系主序花蕾, 卡诺液固定, 20 h 后转入 70% 酒精中保存, 经洗涤、脱水与硬化、脱酒精、封埋、石蜡切片、粘片、脱蜡等步骤, 铁矾苏木精染色, 酒精脱水, 二甲苯透明, 切片厚度为 5~7 μm , Olympus 显微镜观察并拍照.

2 结果与分析

2.1 复配化学杂交剂杀雄机理

细胞学观察表明, 油菜用化学杂交剂处理后, 在造孢细胞时期花药细胞粘连, 空泡化(图 1). 减数分裂至四分体时期, 药室成挤压状, 绒毡层与花粉母细胞粘连在一起, 膨大扭曲变形(图 2, 图 3), 单核至成熟期有的花药完全无花粉粒, 或有少量畸形花粉粒, 细胞质收缩, 成质壁分离状, 花粉粒形状不规则, 绒毡层提前解体或液泡化, 花药皱缩、空秕、有的花药室内是死的空秕花粉, 或完全无花粉, 或花粉无活力(图 4).

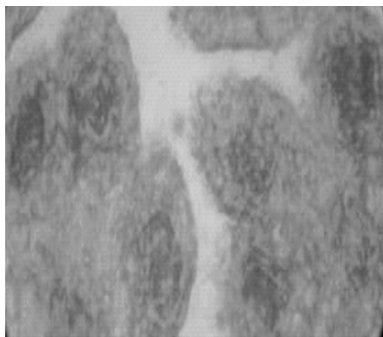


图 1 造孢细胞时期

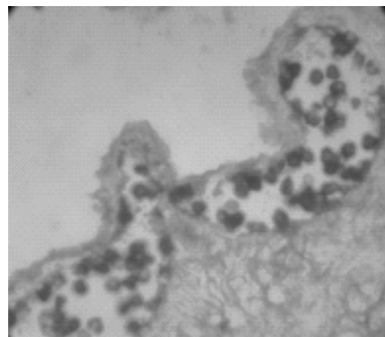


图 2 减数分裂至四分体时期

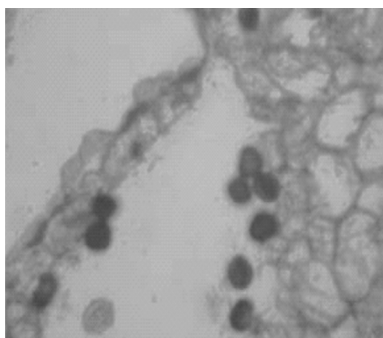


图 3 减数分裂至四分体时期

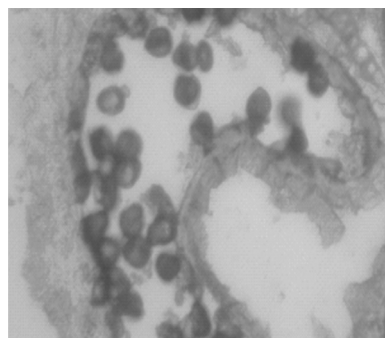


图 4 成熟期

2.2 不同油菜品系最适合体积质量分数的杀雄效果

多年研究表明,甘蓝型油菜不同品系对杂交剂敏感性不同,本课题组在以往研究的基础上,根据多年的研究经验,在单核期用 0.7 mg/L 处理 S212,用 0.8 mg/L 处理 S309 和 S509,用 1.0 mg/L 处理 119C,1186C 和 1286c,用 1.3 mg/L 处理 1521C. 每个处理喷 10 行,花期每个株系调查 100 株. 结果表明,每个品系在单核期处理,杀雄效果良好,全不育株率 95% 以上,不育株率 100%,也进一步证明了不同油菜品系对杂交剂敏感性不同,0.7~1.3 mg/L 为最佳有效体积质量分数范围. 油菜单核期(最大花蕾长度 2~3 mm)为最适喷药时期,自交结实率为 0.1%~1.0%,自然结实率在 88% 以上,详细结果见表 1. 单株和群体杀雄效果见图 5,图 6 和图 7.

表 1 不同品系最适合体积质量分数的杀雄效果

品系	最适合体积质量分数	全不育株率	半不育株率	不育株率	自交结实率	自然结实率
	/(mg·L ⁻¹)	/%	/%	/%	/%	/%
S309	0.8	100	0	100	0	95
S212	0.7	98	2	100	0.3	91
S509	0.8	95	5	100	0.6	90
1521C	1.3	100	0	100	0.1	90
119C	1.0	96	4	100	0.7	88
1186C	1.0	100	0	100	0.5	89
1286C	1.0	98	2	100	1.0	91

注: 2010 年油菜单核期杀雄效果.



图 5 S319 杀雄效果



图 6 S309 杀雄效果



图 7 1521C 群体杀雄效果

2.3 不同品系杀雄前后油菜花器大小和花粉活力比较

从图 8,图 9 可以清楚看到,花冠直径略微变小、花瓣颜色略微变淡,雌蕊长度明显增加,雄蕊退化呈针状,花丝明显缩短瘦秕,花药略有伸长,皱缩干秕,朝内紧贴于雌蕊上,高度明显低于雌蕊,形状与细胞核不育系相似.花粉活力观察表明,90%花药无花粉,或为空秕、畸形的败育花粉(表 2).



图 8 4 个品系喷施前后花瓣比较



图 9 4 个品系喷施前后雌、雄蕊比较

表 2 不同品系甘蓝型油菜花器大小和花粉活力的比较

项目	品系	花冠直径	花瓣大小	雌蕊长	花丝长	花药长	花粉活力
		/mm	/mm	/mm	/mm	/mm	/%
全不育株	S309	22.4	15.1×8.8	12.2	4.1	2.4	1
	S319	18.5	10.0×7.8	10	3.8	2.5	2.1
	S509	20.6	11.4×8.0	9.8	3.1	2.8	1.2
	1521C	19	12.4×8.3	9.4	3.9	3	1.5
	1186C	22	14.5×8.5	11.5	3.2	3	0.6
	1286C	21.5	14.0×9.5	9.9	4	2.9	90
可育株	S309	22.3	15.2×9.0	9	6.8	2.3	92
	S319	18.7	10.3×8.1	8.5	6.7	2.3	95
	S509	21	12.0×8.6	9.5	7	2.6	88
	1521C	20.6	13.9×9.5	9.2	6.8	2.9	96
	1186C	21.9	14.5×8.7	9.7	6.8	2.5	93
	1286C	22.1	14.6×9.9	9	7.5	2.6	91

注:表 2 中结果均为 5 株 10 朵花平均值.

2.4 复配化学杂交剂对农艺性状的影响

不同油菜品系在单核期用各自最适合的体积质量分数处理,不育株率均达 100%.并且对油菜生长发育、农艺性状和结实率影响不大,植株高度略有降低,一次分枝数、角果数和角粒数变化不明显,初花期和花期明显推迟,S309,S212 和 S509 花期推迟 3 d,119C,1186C 和 1286c 花期推迟 5 d,1521C 花期推迟 7 d,说明喷施体积质量分数越大,花期推迟时间越长.详细情况见表 3.

表 3 不同品系甘蓝型油菜杀雄前后农艺性状

品系	株高	分枝数	主序长	角果数	角粒数	初花期	花期
	/cm	/个	/cm	/个	/个		/d
S309	178/176	9.8/9.8	65.5/63.2	402/400	20.5/20.3	3.24/3.27	26/29
S212	170/168	8.7/8.6	58.2/58.0	380/375	18.6/18.2	3.22/3.25	27/30
S509	175/173	9.1/9.0	60.5/59.5	400/386	17.3/17.2	3.20/3.23	25/28
119C	176/175	8.8/8.8	56.2/56.1	350/341	16.8/16.5	3.19/3.24	21/26
1521C	161/160	8.5/8.4	55.0/54.0	378/374	18.1/18.0	3.25/3.30	24/29
1186C	169/168	8.6/8.7	68.3/67.5	385/382	19.0/18.8	3.20/3.25	23/28
1286C	170/168	8.9/9.0	66.1/65.2	390/380	19.2/18.5	3.21/3.28	20/27

注:各性状数据为 2011 年 10 株平均值.

3 讨 论

化学杀雄育种首先由湖南农学院官春云院士 1979 提出,他筛选了杀雄剂 1 号等,杀雄效果 80%以上.刘绚霞 1995 年发现磺酰脲类麦田除草剂可诱导油菜雄性不育,经过研究 1999 年提出化学杂交剂 EN,杀雄效果不育株率达 100%,不育度 95%以上.到目前为止,研究报道的化学杂交剂较多,但最理想的杂交剂还是磺酰脲类除草剂.本文报道的化学杂交剂是由磺酰脲类高活性除草剂苯磺隆和噻吩磺隆复配而成,与 EN 相比杀雄效果稳定,重现性好.

CHA 诱导的生理雄性不育,亲本选择范围广,不存在细胞核质互作雄性不育体系中所要求的恢保关系,可以避免对某一细胞质的依赖性而引起的不良细胞质效应,亲本选择自由,可以任意组配杂交组合,筛选强优势组合的机会大,更换组合与生产应用速度快,周期短.制种方法简单,成本低,杂交种在生产上应用不会出现不育株,安全可靠,可以有效解决不育系微粉问题和替代人工去雄,提高育种效率.但 CHA 杂交油菜生产体系的关键是要有一种理想的化学杂交剂,本文报道的复配化学杂交剂可以作为理想的杂交剂.用复配化学杂交剂诱导的 S309 和 S319 化杀不育系杀雄效果好,综合农艺性状优良,含油量高,配制的杂交种产量、产油量高,S309 和 S319 于 2012 年 4 月 6 日通过陕西省油料专业组鉴定.用 S309 作母本育成的油菜化杀新品种“陕油 19”两年产量平均增产 5.7%,生产试验增产 8.4%,2013 年 4 月通过陕西省审定.

油菜制种中,在母本小孢子发育的单核期,喷施 0.5 mg/L 的复配化学杂交剂 1 000 多亩,全不育株率为 98%,不育度 95%以上,杂交种纯度提高 8%以上,种子纯度达 95%以上.

4 结 论

复配化学杂交剂在甘蓝型油菜小孢子发育单核期 1 次喷雾,可以诱导产生完全雄性不育,全不育株率 95%以上,不育株率 100%,是一种较为理想的新型油菜化学杂交剂,杀雄效果好.花药皱缩干瘪呈针状,花丝明显缩短,花药无花粉或为空秕、畸形的败育花粉,绒毡层提前解体或液泡化,在植物体内的作用靶标是乙酰乳酸合成酶,通过抑制该酶活性,阻止支链氨基酸亮氨酸、异亮氨酸等的合成,诱导油菜雄蕊完全不育,而雌蕊可育.该杂交制也用于拟制细胞质不育系微粉的发生,杂交种纯度提高 8%以上,具有活性高、用量少、成本低和使用方便等特点,制种时每公顷仅需数克药剂,所以用较低的成本可得到较高的效益,毒性低、残留少、对人畜安全、残效期短、在土壤中能迅速降解、对下茬作物安全.

参考文献:

- [1] 官春云,王国槐,赵均田,等. “杀雄剂 1 号”诱导油菜雄性不育的效果及其机理的初步研究 [J]. 遗传, 1981, 5: 15—17.
- [2] 官春云,李 栒,王国槐,等. 化学杂交剂诱导油菜雄性不育机理的研究 [J]. 作物学报, 1997, 23(5): 513—518.
- [3] 官春云,李 栒,王国槐,等. 化学杂交剂诱导油菜雄性不育机理的研究 II. KMS-1 对甘蓝型油菜育性的影响 [J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(3): 1—4.
- [4] BANGA S S. Male Sterility in Indian Mustard by Z Chloroethyl-Phosphonik Acid. Z [J]. Pflanzenzuchtg, 1984, 92: 229—233.
- [5] 张耀文,尚 毅,李永红,等. 新型化学杂交剂 SX—1 对甘蓝型油菜 CMS 的作用效果研究 [J]. 西北农业学报, 2003, 12(3): 57—61.
- [6] 张耀文,尚 毅,李永红,等. 新型化学杂交剂 SX—1 和肥料混用对甘蓝型油菜 CMS 的作用效果 [J]. 西北农业学报, 2004, 13(3): 9—13.
- [7] 于澄宇,胡胜武,张春宏,等. 化学杂交剂 EXP 对油菜的杀雄效果 [J]. 作物学报, 2005, 31(11): 1455—1459.
- [8] 高志宏,孙志刚,付云龙. 化杀灵在油菜核不育两系制种除杂中的应用效果研究 [J]. 种子, 2011, 30(1): 121—123.

[9] 刘绚霞, 董振生, 刘创社, 等. 新型油菜化学杂交剂 EN 的杀雄效果与应用研究初报 [J]. 西北农业学报, 1999, 8(4): 60—62.

[10] 张学昆, 李加纳, 唐章林, 等. 化学杂交剂对油菜胞质不育系波利马育性的影响 [J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(2): 140—143.

[11] 谌利, 李加纳, 唐章林, 等. 甘蓝型黄籽杂交油菜新品种渝黄 1 号的选育 [J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(1): 45—47.

A Compound Chemical Hybridizing Agent for Rapeseed Research and Application

LIU Xuan-xia, LIU Chuang-she, DONG Zhen-sheng

College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China

Abstract: In this research, the gametocidal mechanism of a compound chemical hybridizing agent and its application technology were studied so as to use it in the breeding of two-line hybrids of rapeseed by inhibiting the formation of viable micro-pollen. Two chemical hybridizing agents with high activity, tribenuron-methyl and thifensulfuron, were mixed, and the resulting compound chemical hybridizing agent was used in multi-year and multi-location experiments to establish an effective application technology. Physiological and biochemical methods, field investigation and cytological observation were combined to study its gametocidal effect and mechanism of action. The viability of pollen was tested by acetocarmine staining. At the unilete stage of microspores of the crop, foliar spray of the compound agent gave good results. The anthers were shrunk and shrivelled to present a needle-like shape, the filaments were markedly shortened and there was no pollen or only some empty and deformed pollen in the anthers. The tapetum was prematurely degraded or vacuolated. The percentage of completely sterile plants was over 95%, and percentage of total sterile plants was 100%, the male sterile flower rate was higher than 95%. The hybridity increased by 8 percent or more, thus indicating that this compound chemical hybridizing agent is a desirable chemical hybridizing agent for rapeseed owing to its high activity and low cost.

Key words: rapeseed; chemical hybridizing agent; gametocidal effect; male sterility; hybrid

责任编辑 夏娟

