

野生瓣化型雄性不育胡萝卜 ‘武野-不育’的特征鉴定与分析

谭国飞, 王 枫, 马 静, 张馨月, 熊爱生

(作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部华东地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室/南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要:胡萝卜雄性不育材料,在胡萝卜育种中具有重要作用。本研究描述了一种从武汉市洪山区野生胡萝卜材料中获得的野生瓣化型胡萝卜雄性不育材料(‘武野-不育’,简称‘Wuye-BY’)的特征。该野生瓣化型雄性不育胡萝卜特征在于:无明显膨大的肉质根,嫩茎、叶片及其叶柄深绿色,几乎无毛,无花瓣和花药。花萼数量8~10个,花丝数量为0~2个,染色体数目为 $2n=18$ 。双悬果顶端及其花丝顶端具有大量的蜜液,能接受栽培胡萝卜花粉。杂交 F_1 的根大小、根重,胡萝卜素、总糖和维生素C含量,具有明显优势。

关键词:野生胡萝卜;瓣化型雄性不育;‘武野-不育’;杂交优势;特征

Identification and Analysis of the Characteristics of a Wild Petaloid Male-sterile Carrot ‘Wuye-BY’

TAN Guo-fei, WANG Feng, MA Jing, ZHANG Xin-yue, XIONG Ai-sheng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Male sterility played important roles in carrot breeding. In this study, a wild petaloid male-sterile carrot (named: ‘Wuye-BY’) was obtained from the wild carrot in Hongshan district of Wuhan city, China. The wild petaloid male-sterile carrot was not obvious fleshy taproots. Its tender stems, leaf blades and petioles were dark green without pubescence, petal and anther. The number of calyxes was 8-10 and the number of filaments was 0-2. The chromosome number of the male sterility was $2n=18$. The top of mericarps and filaments contained a large amount of nectars. The male sterility could freely receive the pollen of cultivated carrots. The hybrid F_1 had obvious advantages in root size, root weight, carotene, total sugar and vitamin C content.

Key words: wild carrot; petaloid male-sterile; ‘Wuye-BY’; heterosis; characteristics

胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 为世界主要根菜类蔬菜作物之一,其特有的风味和营养物质,深受人们喜欢^[1-2]。胡萝卜由于花器官小、花两性和花多,去雄杂交不易,限制了胡萝卜杂交育种优势的利用^[3]。胡萝卜雄性不育材料的发现,为胡萝卜杂种优势利用提供了很大的方便^[4]。

胡萝卜雄性不育材料,按照不育特点,主要分成两类:褐药型雄性不育和瓣化型雄性不育^[5-6]。褐药型雄性不育特点,在于发育过程中花药褐化,不能形成有活力的花粉。同时,褐药型雄性不育材料稳

定性较差,易被自然环境恢复育性。瓣化型雄性不育特点,在于花药花丝结构被花瓣或者萼片替换,表现出无花药和无花丝结构。瓣化型雄性材料不育特性相对较稳定,已广泛用于胡萝卜杂交育种中^[5,7]。

本课题组从武汉市洪山区野生胡萝卜种质资源中,发现一株野生瓣化型胡萝卜雄性不育材料。本研究对该胡萝卜雄性不育材料开展了性状观察、杂交特性、染色体数量、杂交后代表型和营养物质含量等方面的研究,以期对胡萝卜杂种优势的利用提供新材料和理论基础。

收稿日期:2017-03-29 修回日期:2017-04-22 网络出版日期:2017-10-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171017.1052.004.html>

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0670);江苏省杰出青年基金项目(BK20130027);江苏高校优势学科建设项目(PAPD)

第一作者主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究。E-mail: 2014204024@njau.edu.cn

通信作者:熊爱生,研究方向蔬菜遗传育种与分子遗传学。E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 植物材料

2012 年,在武汉市洪山区发现野生胡萝卜种质资源,采集单株种子。2013 年秋季,分行播种于南京农业大学园艺学院江浦园艺试验场,进行野生胡萝卜种质提纯工作。2014 年冬,发现一株表现特异的野生胡萝卜植株。该植株挖取移栽于南京农业大学卫岗校区伞形科蔬菜作物遗传与种质创新实验室试验大棚内,开花期表现出瓣化型雄性不育特征,将其命名为‘武野-不育’。将该野生材料用组培方法进行扩繁和保存,保存于南京农业大学伞形科蔬菜作物遗传与种质创新实验室。栽培胡萝卜品种齐头黄为课题组保存。

1.2 性状及其染色体数目观察

2015 年 8 月,将组培扩繁得到的‘武野-不育’组培苗,移栽于南京农业大学园艺学院江浦园艺试验场。入冬前,挖取‘武野-不育’,观察植株根部特点,移栽于南京农业大学卫岗校区试验大棚内,让其安全过冬。同时,挖取栽培品种齐头黄,共同种植于试验大棚内。

2016 年春,对其茎、叶及其根进行观察。于花期时,对其花进行解剖观察,主要确定花瓣和花丝、花药的有无,萼片数量多少及其蜜液的有无。

2016 年春,将齐头黄和‘武野-不育’的根尖,固定于甲醇与冰乙醇(3:1, v/v)的固定液中。然后,按照陈建民等^[8]的方法,进行染色体制片观察。齐头黄与‘武野-不育’获得的杂交种收获后,将种子播种于蛭石中,根尖伸长后,取根尖,进行染色体制片观察。

1.3 育性及其杂交结实率

2015 年 6 月与 2016 年 6 月,胡萝卜花期时,采齐头黄的花粉授粉给‘武野-不育’,观察‘武野-不育’的结实情况。

1.4 杂交后代根直径、根重和干重测定

‘武野-不育’、齐头黄及其两者杂交种,种植于南京农业大学园艺学院江浦园艺试验场。入冬前,从‘武野-不育’(20 株)、齐头黄及其两者杂交种(各 200 株)群体中,随机各挖取 5 株材料,根部用水清洗、去除须根后,用游标卡尺测定肉质根直径大小。肉质根重量用分析天平测定。随后,将三者的肉质根,分别切成小片,在 80 ℃烘箱内烘干至重量不发生变化,用分析天平测定干物质含量。

1.5 杂交后代根营养物质含量测定

用分光光度计(Alpha-1860 型,上海谱元仪器有限公司)测定三者肉质根的营养物质含量,包括

胡萝卜素、总糖和维生素 C 含量。试验所用到的标样,均购置于上海源叶生物科技有限公司,试剂均为分析纯。

胡萝卜素测定方法:取 2 g 切成小片的样品,用 4% (v/v) 氢氧化钠甲醇溶液研磨,在 65 ℃皂化 1 h。然后,使用丙酮:汽油(3:7, v/v)的混合溶剂作为萃取溶剂和洗脱剂, MgO 作为吸收剂分离胡萝卜素,在 447 nm 波长下,测定胡萝卜素的含量^[9]。总糖含量测定方法:取 2 g 样品中加入少量的水,研磨成匀浆。沸水煮沸 10 min,冷却过滤后,蒸馏水定量 100 mL。取 1 mL 提取液,加入 1 mL 的水和 0.5 mL 蒽酮试剂(2% ,v/v),缓慢加入 5 mL 浓硫酸,盖上盖子,沸水浴 10 min。冷却室温后,625 nm 处测定总糖含量^[10]。维生素 C 含量测定方法:冰上研磨 5 g 与 10 mL 预冷的磷酸钠缓冲液(磷酸二氢钠(0.1 mol/L, pH = 6)含有 1 mol/L NaCl 和 0.5 mmol/L 的 EDTA)混合的样品。4 ℃离心机 12000 r/min 离心 30 min,上清液收集于棕色瓶中。取 1 mL 的上清液,冰上与 2,4-二硝基苯酚反应,生成红色络合物。520 nm 处测定维生素 C 含量^[11]。

数据采用 Excel 2007 及 SPSS 20.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 植株特性及染色体数目

获得的野生瓣化型胡萝卜雄性不育材料,地上部分茸毛或者刺毛几乎没有,而其野生胡萝卜地上部分茸毛或者刺毛含量多(图 1)。对‘武野-不育’进一步观察,发现‘武野-不育’无明显膨大的肉质根,根淡黄色(图 2A)。其茎深绿色光滑,茎上几乎无毛(图 2B)。叶片光滑、深绿(图 2C、D)。花序梗光滑(图 2E),花序紧凑,花序含花多(图 2F、G),小花展开无花药及花瓣(图 2G)。进一步根尖制片观察染色体数量,结果表明‘武野-不育’和齐头黄及其两者杂交种,染色体数目一致,都为 $2n = 18$ (图 3),符合胡萝卜染色体数目^[6]。

2.2 花解剖观察及其杂交结实率

花期时,于解剖镜下,对‘武野-不育’花结构进行解剖观察。结果表明,‘武野-不育’花柱为 2 个,无花瓣和花药,部分花中含有 1~2 个无花药的花丝(图 4A-D),萼片数量在 8~10 个。该雄性不育材料,在柱头伸长过程中,有大量的蜜液分泌,蜜液主要分布在子房上部(图 4E、F)和花丝上部(图 4G),花具有浓郁花香味。



图1 武汉野生胡萝卜 (A) 与‘武野-不育’ (B) 地上部分的比较
Fig. 1 Comparison of aboveground part of Wuhan wild carrot (A) and ‘Wuye-BY’ (B)



A: 根; B: 茎; C: 植株形态; D: 叶; E: 花序梗; F: 花序; G: 花展开
A: Root, B: Stem, C: The phenotypes of plant, D: Leaf, E: Peduncle, F: Inflorescence, G: Blooming

图2 ‘武野-不育’ 植物形态
Fig. 2 The visible phenotypes of ‘Wuye-BY’

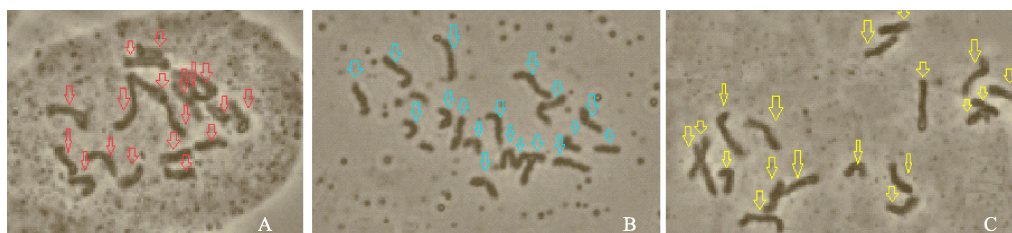


图3 ‘武野-不育’ (A)、杂交种 (B) 和齐头黄 (C) 染色体观察
Fig. 3 Chromosome of ‘Wuye-BY’ (A), Hybrids (B) and ‘Qi tou huang’ (C)

‘武野-不育’与齐头黄杂交结果表明,该野生雄性不育材料易于接受栽培品种齐头黄的花粉,结种率高达 90% ~ 95% (图 4H)。分别于 2014 年和 2015 年,将‘武野-不育’与齐头黄杂交获得的 F₁播种种植,植株均能正常生长,且植株表现不育。



A: 无花丝; B: 有 1 个花丝; C 和 D: 2 个花丝; E ~ G: 蜜液观察; H: 杂交种
A: 0 filament, B: 1 filament, C and D: 2 filaments, E-G: Nectar, H: Hybrid seeds
图 4 解剖镜下观察‘武野-不育’花结构(A ~ G)和杂交结籽情况(H)
Fig. 4 Flower structure of the ‘Wuye-BY’ (A-G) and hybrid seeds (H)

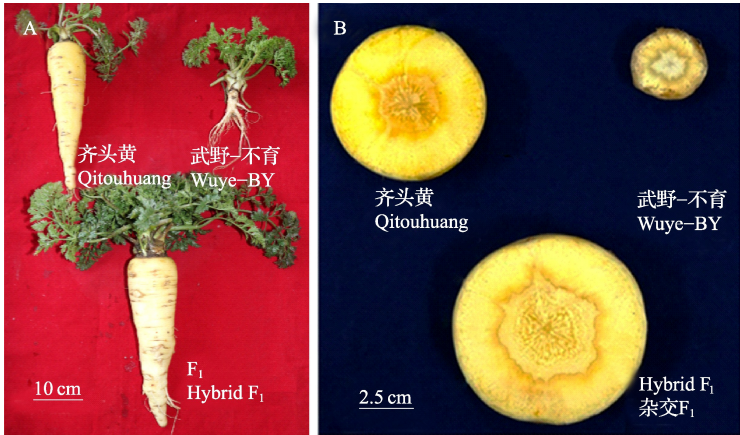


图 5 杂交 F₁ 和两个亲本肉质根比较
Fig. 5 The roots phenotype of F₁ carrot and their parents

2.3 杂交后代表现及营养成分

F₁肉质根表现出明显的膨大特点,膨大程度大于齐头黄(图 5)。数据测定表明,杂交种 F₁除了干物质低于‘武野-不育’外,在根重、根直径、总糖和

维生素 C 含量上,均极显著($p < 0.01$)高于两亲本。在胡萝卜素含量上,F₁肉质根中含量显著($p < 0.05$)高于两亲本(表 1)。

表 1 杂交 F₁肉质根大小及营养物质含量与亲本比较

Table 1 Carrot root diameter and nutrition content of hybrids F₁ compared with their parents

材料 Material	根重(g) Weigh	直径(cm) Diameter	干物质(g/100 g) Dry matter	胡萝卜素 (mg/100 g) Carotene	总糖 (mg/g) Total sugar	维生素 C (mg/100 g) Vitamin C
武野-不育/Wuye-BY	5.2 ± 1.0	1.8 ± 0.3	17.2 ± 3.3	1.5 ± 0.3	25.6 ± 3.7	7.1 ± 0.5
F ₁	250.7 ± 10.5 **	6.1 ± 0.4 **	14.3 ± 2.1	2.3 ± 0.2 *	84.2 ± 7.2 **	12.6 ± 1.2 **
齐头黄/Qitouhuang	150.9 ± 8.2	4.2 ± 0.4	9.5 ± 0.8	1.1 ± 0.2	40.5 ± 2.6	9.3 ± 0.8

* :显著水平 5% ; ** :显著水平 1%
* :Significantly at 5% probability level, ** :Significantly at 1% probability level

3 讨论

栽培胡萝卜与野生胡萝卜,不同点主要在于是否有明显膨大的肉质根,两者在茎和叶中都含有茸毛或者刺毛,但属于不同的种,能自由杂交^[12]。‘武野-不育’无明显膨大的肉质根,茎和叶光滑,几乎无毛。形态上与栽培胡萝卜有明显差别,其染色体数目与栽培胡萝卜一致,为 $2n = 18$ ^[6]。获得的该野生材料,茎及其叶深绿色,伞形花中含花数目多。对比传统的雄性不育材料,该材料有花丝但无花药,而通常褐药型雄性不育材料具有花丝和花药结构,瓣化型雄性不育材料花瓣退化成萼片或者花瓣,无花丝结构^[12]。

高等植物中,植物雄性不育发生的原因主要有:小孢子和绒毡层细胞发育异常(如蒲公英^[13])、ATP酶活性异常(如K型小麦^[14])、 Ca^{2+} 浓度过高(如云南紫稻细胞质雄性不育^[15])等。另外,环境条件,特别是温度和光照,在一定范围内能使植物不育材料转育,如小麦光温敏雄性不育系BNS^[16]和高粱温敏雄性不育系冀130A^[17]。褐药型胡萝卜雄性不育主要是由小孢子和绒毡层细胞发育异常,受到核质互作引起,其遗传方式较复杂,研究观点不一^[6,18]。瓣化型胡萝卜雄性不育一般由细胞质引起,与线粒体基因有关,如 *atp6*^[19-20]、*atp9*^[21-22]、*MADS*^[5] 和 *orfB-CMS*^[23] 等基因。‘武野-不育’为瓣化型胡萝卜雄性不育材料,是否由线粒体基因或者其他因素导致的不育,其育性是否能在特殊条件下转育,目前尚不清楚,需要进一步深入研究。

开花植物,花中蜜腺能够分泌含有特殊香气的蜜液,能够吸引昆虫授粉,是授粉成功的因素之一^[24-25]。本研究中,获得的‘武野-不育’不育材料,具有大量的蜜液分布于子房和花丝顶端,能够接受栽培胡萝卜齐头黄的花粉,结种率高。该野生雄性不育与栽培胡萝卜杂交后代,在肉质根大小、营养物质含量等,具有明显的优势。从‘武野-不育’性状特点及其杂交上看,该材料可以作为胡萝卜雄性不育材料,用于胡萝卜育种及其相关研究中。

参考文献

- [1] 严怡红. 胡萝卜营养价值与功能食品加工[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(6): 120-122
- [2] 谭国飞, 王枫, 马静, 等. 室温贮藏过程中胡萝卜口感及部分营养成分含量变化[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(1): 107-109
- [3] 司家钢, 朱德蔚, 杜永臣, 等. 胡萝卜雄性不育性研究及利用[J]. 园艺学报, 2011, 28(8): 633-636
- [4] 梁艳荣, 胡小红, 陈源闽, 等. 胡萝卜雄性不育系生理生化特性研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 19-22

- [5] Linke B, Nothnagel T, Borner T. Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of *MAD box* genes homologous to *globosa* and *deficiens* [J]. Plant J, 2003, 34(1): 27-37
- [6] 庄飞云. 中国胡萝卜种质资源及其育种技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005
- [7] Robison M, Wolyn D. Complex organization of the mitochondrial genome of petaloid CMS carrot [J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268(2): 232-239
- [8] 陈建民, 秦秋琳, 汤颀, 等. 火柴头染色体核型及核糖体基因原位杂交研究[J]. 杂草科学, 2004(1): 1-4
- [9] 刘晓燕, 陈章鑫, 姜黎. 新鲜蔬菜中β-胡萝卜素提取和测定的研究[J]. 绵阳师范学院学报, 2009, 28(2): 46-50
- [10] Klopotek Y, Otto K, Bohm V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(14): 5640-5646
- [11] Tsukakoshi Y, Naito S, Ishida N, et al. Variation in moisture, total sugar, and carotene content of Japanese carrots: Use in sample size determination [J]. J Food Compos Anal, 2009, 22(5): 373-380
- [12] Magnussen L S, Hauser T P. Hybrids between cultivated and wild carrots in natural populations in Denmark [J]. Heredity, 2007, 99(2): 185-192
- [13] 孙帅, 张晓嘉, 马铭, 等. 长春蒲公英雄性不育株形态学观察与败育细胞学研究[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(3): 491-496
- [14] 姚雅琴, 张改生, 刘宏伟, 等. K型小麦花粉粒内壁及ATP酶活性与雄性不育的相关性[J]. 西北植物学报, 2002, 22(2): 333-337
- [15] 陈小军, 刘树楠, 魏磊, 等. 云南紫稻细胞质雄性不育系花药发育过程中 Ca^{2+} 的分布特点[J]. 植物科学学报, 2005, 23(2): 101-106
- [16] 张自刚, 马小飞, 张红霞, 等. 小麦光温敏雄性不育系BNS育性转换与内源激素的关系研究[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(5): 913-919
- [17] 马晓娣, 王建书, 卢彦琦, 等. 不同温度条件下高粱温敏雄性不育系冀130A育性变化规律及花粉败育研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 212-218
- [18] Erickson E H, Peterson C E, Werner P. Honeybee foraging and resultant seed set among male-fertile and cytoplasmically male-sterile carrot inbreds and hybrid seed parents [J]. J Am Soc Hortic Sci, 1979, 104: 635-638
- [19] Bach I C, Olesen A, Simon P W. PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Euphytica, 2002, 127(3): 353-365
- [20] Szklarczyk M, Oczkowski M, Augustyniak H, et al. Organisation and expression of mitochondrial *atp9* genes from CMS and fertile carrots [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(2): 263-270
- [21] Tan G F, Wang F, Zhang X Y, et al. Different lengths, copies and expression levels of the mitochondrial *atp6* gene in male sterile and fertile lines of carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Mitochondrial DNA Part A, 2017, 1-10
- [22] Szklarczyk M, Szymanski M, Wojcik-Jagla M, et al. Mitochondrial *atp9* genes from petaloid male-sterile and male-fertile carrots differ in their status of heteroplasmy, recombination involvement, post-transcriptional processing as well as accumulation of RNA and protein product [J]. Theor Appl Genet, 2014, 127(8): 1689-1701
- [23] Nakajima Y, Yamamoto T, Muranaka T, et al. A novel *orfB-related* gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS) [J]. Plant Mol Biol, 2001, 46(1): 99-107
- [24] 侯喜林, 曹寿椿. 不结球白菜OguCMS下胚轴原生质体的核失活研究[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(3): 116-117
- [25] 舒金帅, 刘玉梅, 李占省, 等. 植物蜜腺研究进展及展望[J]. 园艺学报, 2014, 41(9): 1846-1860