



李俊杰,赵洋,姜雯,等.白花桔梗雄性不育种质 BY-B1 的发现与鉴定[J].黑龙江农业科学,2022(11):87-91.

# 白花桔梗雄性不育种质 BY-B1 的发现与鉴定

李俊杰,赵洋,姜雯,杨嘉帅,全雪丽,严一字,吴松权

(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

**摘要:**为了开辟桔梗种质资源杂交优势利用的新途径,对在延边大学农学院桔梗试验圃地中所发现的白花桔梗不育种质个体 BY-B1 进行了花器及散粉情况观察、花粉生活力的测定、小孢子和雄配子体发育情况的观察以及自交、杂交试验。结果表明,白花桔梗雄性不育种质个体 BY-B1 的花与正常白花桔梗植株个体的花外观差异不大,但其花药皱缩干瘪且没有光泽;无花粉散出,挤出的花粉缺乏活力;雄配子体形状不规则,无精核和营养核;自交坐果率为 0,与正常白花、紫花桔梗杂交坐果率为 100%,表明 BY-B1 为雄性不育,可以利用白花桔梗雄性不育种质进行杂交培育新品种。

**关键词:**白花桔梗;雄性不育;种质个体

桔梗[*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.] 是桔梗科桔梗属多年生草本植物,又称铃铛花、包袱花、六角花、苦梗、僧帽花等<sup>[1]</sup>。李时珍在《本草纲目》中释其名曰:“此草之根结实而梗直,故名桔梗。”在中国、日本和韩国等东亚国家具有悠久的食用和药用历史<sup>[2]</sup>。其味苦、辛,性平,归肺经,有宣肺、利咽、祛痰和排脓的功效,主治咳嗽痰多、胸闷不畅、咽痛音哑和肺痈吐脓<sup>[3]</sup>。桔梗种质通常以花冠颜色为紫色类型的植株为主,在紫花植株

中有白色花产生,因此将白花桔梗作为紫花桔梗的一个变种<sup>[4-5]</sup>。研究发现白花桔梗和紫花桔梗药理作用基本一致<sup>[6]</sup>。随着桔梗资源不断地开发与利用,目前已成为集药用、食用、观赏于一体的大宗药材、经济作物、观赏植物,市场需求量非常大<sup>[7]</sup>。近年来野生桔梗已无法满足市场需要<sup>[8]</sup>,主要以栽培桔梗进入市场,但桔梗品种退化、种子质量较差等问题日益突出<sup>[9]</sup>,严重影响了桔梗的品质和产量。要解决上述问题,必须在收集和分析桔梗种质资源的基础上,逐步培育新品种。

植物雄性不育是一种植物在有性繁殖过程中无法产生正常的花药、花粉或雄配子的现象,在开花植物中广泛存在,最早在野生植物中被发现,之后又在许多栽培植物种内也发现了雄性不育性<sup>[10]</sup>。魏建和<sup>[11]</sup>首次发现了桔梗的雄性不育种质,系统研究表明,

收稿日期:2022-08-04

基金项目:吉林省自然科学基金项目(YDZJ202101ZYTS197);吉林省科研重点项目(20160204003YY)。

第一作者:李俊杰(1997—),女,硕士研究生,从事园林植物与应用相关研究。E-mail:1498483666@qq.com。

通信作者:吴松权(1972—),男,博士,教授,从事特种植物资源开发与利用等工作。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn。

## Method of Stem Cutting Seedling of *Tetrastigma hemsleyanum*

DU Jia-hui, LI Zhen-bin, CUI Yu-fa

(Southwest Guizhou Vocational and Technical College for Nationalities, Xingyi 562400, China)

**Abstract:** In order to promote rapid cutting seeding of *Tetrastigma hemsleyanum*. The split plot experiment method was used to study the number of stem nodes and shading rate of cuttings for *Tetrastigma hemsleyanum*. The survival rate, length of new shoots, number of leaflets and number of roots for *Tetrastigma hemsleyanum* under different treatments were compared and analyzed. The results showed that the correlation coefficients between length of new shoots, number of leaflets and survival rate were 0.824 0 and 0.774 5, respectively. Two stem nodes(A2) and 60% shading(B2), the survival rate(91.33%), new shoots length(16.11 cm) and number of leaflets(4.3) were higher than other combinations. It is believed that the cuttings should have two stem nodes and 60% shading treatment in the process of trial have the best results.

**Keywords:** *Tetrastigma hemsleyanum*; cuttage propagation; shading rate

桔梗不育株的雄性不育性可以稳定表现、遗传和保持。吴基日等<sup>[12]</sup>在龙井当地采集的3年生野生桔梗种源圃中发现一棵雄性桔梗不育种质,通过套袋自交发现,结籽率为0,而进行异花授粉时结实正常。王志芬等<sup>[13]</sup>、刘自刚等<sup>[14]</sup>也先后在田间发现了桔梗雄性不育株,为桔梗种质资源杂交优势的利用开辟了新的途径。桔梗是异花授粉植物<sup>[15]</sup>,通过雄性不育进行杂交育种,不仅能提高育种效率,还能稳定其遗传效应。白花桔梗因其具有独特的颜色,在园林植物应用方面也具有较大的开发潜力。本研究发现和鉴定了白花桔梗雄性不育株,命名为BY-B1,为桔梗种质资源杂交优势的利用提供了新的途径,同时降低杂交种子生产成本,提高杂种质量,有效保证杂种纯度,为利用白花桔梗雄性不育株进行杂交育种培育新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2020年7月在延边大学农学院桔梗试验圃地中,对白花桔梗进行去雄杂交、套袋自交的过程中,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,初步判定该单株为雄性不育单株,暂时命名为BY-B1。

### 1.2 方法

1.2.1 花器及散粉情况观察 2021年7月对白花桔梗雄性不育株BY-B1和正常白花桔梗植株进行观察,记录其开花的过程,并对其雌雄蕊发育情况、花药开裂和散粉情况进行了观测。

1.2.2 花粉生活力的测定 用氯化三苯基四氮唑(TTC)法<sup>[16]</sup>测定花粉生活力,把 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH7.2的磷酸缓冲液制备为1%TTC溶液,取一块载玻片,在其上注入(滴2滴)TTC溶液,用毛笔将待测花粉洒在溶液上面,盖好盖玻片,将其放置在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中,15~20 min后取出载玻片在显微镜下观察染色情况。具有较为强烈的呼吸作用的花粉可产生还原型辅酶I(NADH<sub>2</sub>)或还原型辅酶II(NADPH<sub>2</sub>),能够将无色的氯化三苯基四氮唑(TTC)还原成红色的三苯基甲(TTF);呼吸作用比较弱的花粉无法使TTC的颜色发生变化,所以可根据花粉吸收TTC后的颜色变化作为判断花粉活性的标准<sup>[17]</sup>。即被染成红色或浅红色的花粉被判定其具有活力,未被染色则被判定为无活力。

1.2.3 小孢子和雄配子体发育情况的观察 采

用石蜡切片法<sup>[18]</sup>,将BY-B1和对照植株的新鲜花朵(花药)分别置于FAA固定液中,用不同浓度的酒精进行脱水,二甲苯进行透明,用石蜡进行包埋,徕卡RM2016轮转式切片机进行切片,得到厚度为 $14\text{ }\mu\text{m}$ 的切片。用番红-固绿染色法进行染色,中性树胶封片。最后用OLYMPUS光学显微镜对小孢子发育情况进行观察。

1.2.4 自交、杂交试验 用硫酸纸对即将开放的BY-B1的花蕾进行套袋,选取15朵进行自交。桔梗是异花授粉植物,其自花授粉的结实率较低<sup>[19]</sup>,所以本试验中采用自株交(同株异花交)的方法。将15朵正常白花桔梗植株的花粉和15朵正常紫花桔梗植株的花粉,分别授给BY-B1,进行杂交,并将正常白花桔梗植株和正常紫花桔梗植株去雄后,每种花色植株各选取15朵,用硫酸纸套袋进行自交,以供对照。秋季观察种子发育情况并计算其千粒重。

## 2 结果与分析

### 2.1 花器及散粉情况观察

观察发现,白花桔梗雄性不育株BY-B1花的外观与正常白花桔梗植株无明显差异,且子房发育正常。在开花当天,观察到包裹在正常白花桔梗植株柱头周围的5枚花药较为饱满,且有光泽(图1A),BY-B1的花药虽也包在柱头周围,但其花药皱瘪(图2A);开花第2天,正常白花桔梗植株的花药已经开裂,有大量的花粉散出并附着在柱头表面(图1B),而BY-B1花药虽正常开裂,但柱头表面没有发现散出的花粉(图2B);开花第3天,正常白花桔梗植株的花药逐渐干枯萎缩并从柱头上脱落,花粉主要附着在柱头中部,其余散落到花瓣上(图1C),而BY-B1花药在枯萎后也从柱头上脱落,但花柱及花瓣上均没有观察到花粉(图2C);第4天,正常白花桔梗雌蕊裂开(图1D),开始进行授粉,与正常白花桔梗植株相比,BY-B1雌蕊发育正常(图2D)。

### 2.2 花粉生活力的测定

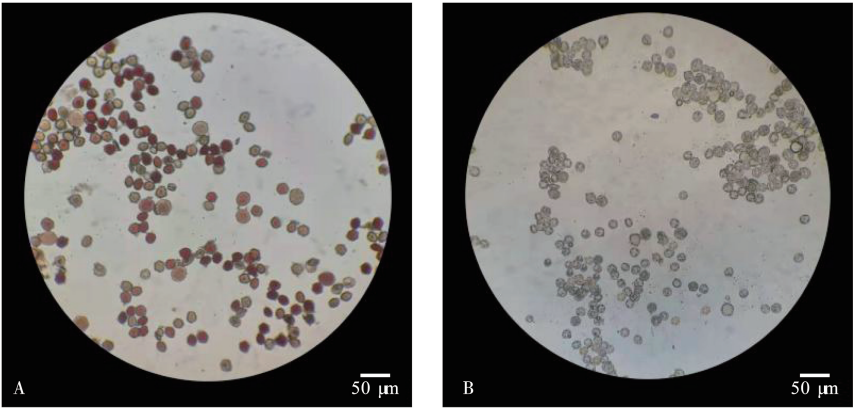
图3为显微镜下观察到的用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定的花粉生活力结果。结果表明,正常白花桔梗植株的花粉绝大多数形状较为规则,且花粉均被染成红色或浅红色(图3A),说明花粉有活力;而BY-B1的绝大多数花粉呈不规则型,且花粉未被染色(图3B),这说明其花粉没有活力。



图 1 正常白花桔梗植株的开花动态



图 2 白花桔梗不育株 BY-B1 的开花动态



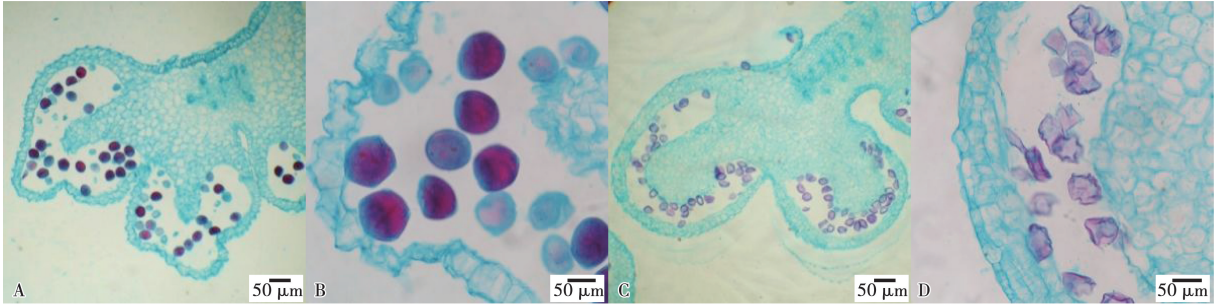
A.正常植株花粉; B. BY-B1花粉。

图 3 花粉生活力鉴定

2.3 小孢子和雄配子体的发育情况

观察发现,正常白花桔梗植株(图 4A)和 BY-B1 (图 4C)花药均有 4 个花粉囊,且横切面均呈蝶形,由四分体释放的小孢子在经过一段时间的发育后形成雄性配子体。正常白花桔梗植株的小孢子从四分体中释放出来后,体积逐渐增大,从不规

则形状逐渐变圆,且花粉粒完全成熟,雄配子体内能观察到精核、营养核,染色较深,并且均匀(图 4B);但 BY-B1 形状仍为不规则形状,其细胞质和细胞核解体,只剩下内空的花粉粒,表现不成熟,染色较浅(图 4D)。这表明 BY-B1 的小孢子发育异常,雄配子体表现为不育。



A.可育花药横切面( $\times 100$ ); B.可育花粉粒( $\times 400$ ); C.败育花药横切面( $\times 100$ ); D.败育花粉粒( $\times 400$ )。

图 4 显微镜下观察到的桔梗雄配子体发育情况



## 2.4 自交、杂交试验

2021 年 10 月采收各试验植株种子,观察种子发育情况并称量其千粒重。结果表明,BY-B1 套袋自交的坐果率为 0。而正常白花桔梗植株和正常紫花桔梗植株花粉分别授给 BY-B1,其坐果率为 100%,且种子发育正常。

千粒重结果如表 1,正常紫花桔梗植株自交的千粒重为 1.19 g,正常紫花桔梗植株与 BY-B1 杂交的千粒重为 1.16 g,无明显差异。正常白花桔梗植株自交和其与 BY-B1 杂交的千粒重分别为 0.91 和 0.93 g,也无明显差异。这表明 BY-B1 雌蕊发育正常且与正常白花桔梗、正常紫花桔梗种源有高度亲和力,可作为提高桔梗种质资源的试验材料。

表 1 杂交试验种子的千粒重 单位:g

项目	自交	杂交
正常紫花植株	1.19±0.03 a	1.16±0.03 a
正常白花植株	0.91±0.01 a	0.93±0.01 a

注:小写字母表示在  $P<0.05$  水平差异显著。

## 3 讨论

植物雄性不育是指植物雄性生殖器官无法产生正常有功能花粉的现象<sup>[20-21]</sup>,在植物生长发育过程中发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。在杂交育种时,可以避免在极端气候条件下进行人工去雄或机械去雄等问题。利用雄性不育性配制杂交种是简化制种的有效手段,能够降低杂交种子生产成本,提高杂种质量,扩大杂种优势的利用范围,是杂种优势利用最优化的制种途径<sup>[23-24]</sup>。通过植物雄性不育性进行杂交制种、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<sup>[25]</sup>。已有研究发现了紫花桔梗雄性不育株,但还未见有关白花桔梗雄性不育株的报道。本研究发现,与正常白花桔梗植株相比,BY-B1 花器外观正常,雌蕊发育正常,但其花药皱瘪、无光泽,且不能产生有活力的花粉粒。观察到 BY-B1 花药绒毡层提前退化解体等异常现象,这可能是导致小孢子发育异常的重要原因。在被子植物中,一般单子叶植物小孢子败育多发生在双核期或靠近双核期,而双子叶植物多发生在四分体时期或小孢子早期<sup>[26]</sup>。

绒毡层由花药壁最内 1~2 层细胞构成的具有分泌功能的哺育组织<sup>[27]</sup>,可向药室内分泌释放各种营养物质和大量酶类成分,为花粉母细胞和小孢子各阶段的发育提供了所必需的物质基础<sup>[28]</sup>。朴雪梅<sup>[10]</sup>在研究中发现花粉败育主要与花药绒毡层发育异常有关,张雁<sup>[29]</sup>也认为绒毡层细胞在形态、结构及功能等方面的异常均可能引起植物雄配子体发育进程受阻,引起成熟花粉育性降低甚至导致彻底败育。BY-B1 自交坐果率为 0,而与正常白花、紫花桔梗植株杂交的坐果率均为 100%,这与吴基日等<sup>[12]</sup>研究结果一致。BY-B1 与其他植株杂交后千粒重与正常植株自交的千粒重无明显差异,表明 BY-B1 与其他桔梗种质资源有高度亲和力,可作为优良的育种材料。

## 4 结论

本研究对所发现的白花桔梗雄性不育种质 BY-B1 进行生物学观察、花粉活力鉴定、解剖学分析、自交和杂交试验。结果发现 BY-B1 花冠大小、花瓣色泽、花柱及花药长度与对照相比无明显差异,子房发育正常,但花药干瘪萎缩;花粉外形呈不规则状,且无法着色;花药绒毡层提前退化解体,小孢子发育异常;自交坐果率为 0,与正常白花、紫花桔梗杂交坐果率为 100%;杂交种子千粒重与正常白花、紫花桔梗自交种子千粒重无明显差异。这些结果表明 BY-B1 为雄性不育,可作为创制白花桔梗新种质的试验材料。

### 参考文献:

- [1] 王丹,舒钰,赵学丽,等.药食兼型桔梗的创新开发价值[J].黑龙江农业科学,2018(11):112-115.
- [2] 孙慧杰.桔梗的生物学特征及栽培技术[J].长春中医学院学报,2005,21(4):32.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [4] 樊恒均.桔梗种质资源的比较及适应性研究[D].延吉:延边大学,2021.
- [5] 薛均诚,严一字,朴锦,等.白花桔梗和紫花桔梗的种子性状比较[J].安徽农业科学,2009,37(18):8465-8466,8469.
- [6] 张树臣,杨晓静,候桂华,等.白花桔梗与紫花桔梗药理作用比较[J].中成药研究,1984(2):37.
- [7] 蒋桃,祖矩雄,向华.药食兼用桔梗的引种栽培研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2018,16(2):148-152.
- [8] 韩蕊,李爽,杨柳,等.桔梗组织培养技术研究进展[J].人参研究,2018,30(2):48-51.

[9] 张燕,李阳,李倩,等. 桔梗种质资源研究新进展[J]. 中国野生植物资源,2017,36(3):53-56,82.

[10] 朴雪梅. 桔梗雄性不育的鉴定及分类的研究[D]. 延吉:延边大学,2010.

[11] 魏建和. 中药桔梗杂种优势利用基础研究[D]. 北京:中国中医科学院,2006.

[12] 吴基日,严一字,朴锦,等. 桔梗雄性不育种质 JXB-1 的发现与鉴定[J]. 延边大学农学报,2007,29(4):245-248.

[13] 王志芬,苏学合,单成钢,等. 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.

[14] 刘自刚,张雁,杨亚丽. 桔梗雄性不育突变体的发现与鉴定[J]. 北方园艺,2009(1):40-43.

[15] 刘鸣远,付承新. 桔梗生物学的研究[J]. 植物研究,1985(1):71-80.

[16] 吴丽,刘妍妍. 董薇花粉粒活力研究[J]. 河南农业,2021(8):48-50.

[17] 于楷力,权赫根,洪国,等. 杠柳开花习性与花器解剖结构研究[J]. 辽宁林业科技,2021(1):7-9,37,58.

[18] 李今,邵锦震. 药用植物桔梗的传粉效率与结实率研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2001(2):73-75.

[19] 时子文,何青,赵卓凡,等. 玉米雄性不育资源的发掘与利用[J]. 遗传,2022,44(2):134-152.

[20] 孙小媛,王一帆,王韞慧,等. 大豆细胞核雄性不育基因研究进展[J]. 遗传,2021,43(1):52-65.

[21] 王保明,陈永忠,李红波,等. 植物雄性不育的机制及应用研究进展[J]. 河南农业科学,2019,48(5):1-9.

[22] 王浩. 芸薹属植物 PRX 基因家族的比较基因组学研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2021.

[23] 石子,宋伟,赵久然. 雄性不育在作物杂种优势中的应用途径分析[J]. 中国生物工程杂志,2018,38(1):126-134.

[24] 王保明,陈永忠,李红波,等. 植物雄性不育的机制及应用研究进展[J]. 河南农业科学,2019,48(5):1-9.

[25] 雷刚,周坤华,陈学军,等. 辣椒细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞学形态鉴定[J]. 江西农业学报,2022,34(4):28-32.

[26] 樊建青,张立平,赵昌平,等. 光温敏核雄性不育小麦 BS366 花粉母细胞减数分裂的细胞学研究[J]. 中国细胞生物学报,2011,33(6):622-628.

[27] 杨景华,张明方. 线粒体反向调控介导高等植物细胞质雄性不育发生机制[J]. 遗传,2007,29(10):1173-1181.

[28] 王茜,陈景斌,林云,等. 豆类作物雄性不育及杂种优势利用的研究进展[J]. 江苏农业科学,2022,50(4):9-16.

[29] 张雁. 桔梗花粉母细胞减数分裂及雄性败育的细胞生理学研究[J]. 西北植物学报,2013,33(7):1339-1347.

# Discovery and Identification of Male Sterile Germplasm BY-B1 of White Flower *Platycodon grandiflorum*

LI Jun-jie, ZHAO Yang, JIANG Wen, YANG Jia-shuai, QUAN Xue-li, YAN Yi-zi, WU Song-quan  
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133000, China)

**Abstract:** In order to establish a new way for the utilization of the heterosis of *Platycodon grandiflorum* germplasm resources, the floral organ and pollen dispersal, activity of pollen, development of microspores and male gametophytes, seed condition of inbred and hybrid for the male sterile germplasm BY-B1 of white flower *P. grandiflorum* found in experimental nursery of Agricultural College of Yanbian University were studied. The results showed that the flower appearance of male sterile germplasm BY-B1 of white flower *P. grandiflorum* was not significantly different from that of normal white flower *P. grandiflorum*, but anthers of BY-B1 were shrunk and without gloss, and forced pollen with no activities; The male gametophytes of BY-B1 were irregular in shape, without sperm nucleus and vegetative nucleus; Its self-pollination rate was zero and it had 100% of hybrid seed set percentage with normal white flower *P. grandiflorum* and normal purple flower *P. grandiflorum*. These results indicated that BY-B1 was male sterile, which laid a foundation for breeding new varieties by using male sterile germplasm of *P. grandiflorum*.

**Keywords:** *Platycodon grandiflorum*; male sterile; germplasm

欢迎关注本刊微信公众号

