

大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的遗传学与细胞学鉴定^{*}

杨守萍 盖钧镒 徐汉卿

(南京农业大学大豆研究所 南京 210095)

摘 要

花粉发芽实验 NJ89-1 雄性不育度高达 99.25% 以上且稳定,人工授粉试验 NJ89-1 的雌性育性正常,说明 NJ89-1 是一个雄性不育雌性可育突变体。不育株自然授粉后代中育性分离结果表明 NJ89-1 雄性不育性受单隐性核基因控制。等位性测验表明 NJ89-1 不育基因与 ms1~ms5 均不等位。NJ89-1 在败育时期、减数分裂、四分体形成、小孢子壁发生、花药壁发育、花粉粒形态等诸多方面与 ms1~ms6 突变体均存在差异,而与 st2~st5 突变体却有相似的减数分裂变异如联会异常等,但是 NJ89-1 的雌性育性正常, st2~st5 突变体的雌性均高度不育。因而 NJ89-1 是一个既不同于 ms 类型又不同于 st 类型的新雄性不育突变体。建议将 NJ89-1 雄性不育基因符号定为 ms7。

关键词 大豆;雄性不育;突变体;遗传学;细胞学

大豆雄性不育最早在本世纪 20 年代发现^[9],迄今已有很多报道,其中,绝大多数为细胞核雄性不育,包括结构不育(ft fs1fs2),部分雄性不育(msp),联会突变导致雄性雌性均不育(st2 st3 st4 st5),雄性不育雌性可育(ms1 ms2 ms3 ms4 ms5 ms6)等;质核互作雄性不育和光(温)敏雄性不育也有报道。国外大豆研究者对大多数细胞核雄性不育突变体,包括 fs1fs2 msp st2 st3 st4 st5 ms1 ms2 ms3 ms4 ms6 等,开展了细致的细胞学研究,国内尚未见到同类报道。1986 年南京农业大学大豆研究所马国荣等^[12]在[(南农 1138-2 × 南农 493-1)F₃-1-9-3-2 × 诱变 30]杂交组合的 F₆ 代株行中发现一个天然不育突变体 NJ89-1,人工授粉试验结果表明 NJ89-1 不育性可能由雄性不育所致,遗传研究发现 NJ89-1 不育性可能受单个隐性核基因控制, NJ89-1 不育基因与 ms1 等位的可能性小于 5% (0.025 < P < 0.05),为探明 NJ89-1 是否是一个新雄性不育突变体,本文从不育性的表现、遗传机制及细胞形态学特征三个方面进行鉴别。

^{*} 国家自然科学基金和“八五”攻关资助项目

收稿日期: 1997-09-24 This paper was received on Sep. 24, 1997.

材料与方法

1 不育性表现试验

1.1 大田自然群体中不育株的结荚状况调查

试验材料取自 1993年夏种于南京农业大学大豆研究所江浦试验站田间的 NJ89-1 大田自然群体。1993年秋大豆成熟时,调查 NJ89-1 大田自然群体中不育株的结荚状况(包括单株荚数和每荚粒数),并从中随机抽取 30株可育株,调查每荚粒数情况,以作为不育株相应情况的对照。

1.2 雄性不育度测定

以花粉发芽率作为测定雄性育性指标,以可育株作为不育株的对照。

试验材料取自 1994年夏种于南京卫岗田间的 NJ89-1 育性分离群体。由于通过大量观察已发现 NJ89-1 不育株产生的花粉粒大小不一,在形态上与可育株产生的大小均匀的花粉粒存在明显差异,所以在大豆开花时,首先通过镜检花粉粒形态区别出 NJ89-1 不育株与可育株,然后对 90株不育株与 10株对照可育株上、中、下三个不同部位的花朵及 3株不育株不同节位的花朵进行花粉发芽实验。采用悬滴培养法^[1]。培养液为 20%蔗糖溶液+ 120ppm 硼酸。早晨 6 00左右从田间采集新鲜、即将开放或刚开放的花朵,到实验室里,将花药挑出放在预先滴有培养液的盖玻片上,轻轻压出花粉后,剔去残余花药组织,制成悬滴玻片标本,1~ 1.5小时后镜检,计数发芽率。凡芽管超过花粉粒直径的算作发芽花粉粒。不育株花朵检查所有视野,计数总发芽率。可育株花朵计数三个代表性视野的发芽率,以三者平均作为一朵花的花粉发芽率。

1.3 雌性育性检测

通过比较不育株与可育株的人工杂交成功率,检测不育株的雌性育性。

试验材料取自 1994年夏种于卫岗田间的 NJ89-1 育性分离群体。同样,首先通过镜检花粉形态区别出 NJ89-1 不育株与可育株,然后分别对 NJ89-1 不育株、可育株进行人工去雄授粉(授粉用花粉均来自泗豆 11),计数人工杂交成功率。1995年夏在卫岗田间对真假杂种进行鉴别。

2 遗传试验

2.1 自然授粉后代的育性表现试验

1993年夏在江浦将 1992年收到的 NJ89-1 不育株上种子种于田间,植株成熟时,去除不育株,可育株(为杂合体)单株收获。1994年夏在卫岗将上年收获的可育单株种成株行(S_1),植株成熟时,计数分离行与不分离行,分离行内可育株数与不育株数,并对分离行内可育株进行单株收获。1995年夏在江浦将上年收获的可育单株再种成株行(S_2),植株成熟时,计数分离行与不分离行,分离行内可育株数与不育株数。根据各世代(S_1 、 S_2)中育性分离情况,推断 NJ89-1 的遗传机制。

2.2 等位性测验试验

采用杂合体间杂交,测验 NJ89-1 不育基因与 ms1 ms2 ms3 ms4 ms5 的等位关系。

1993 年和 1994 年夏在江浦将上年获得的 N J89- 1 ms1(T266)、 ms2(T259)、 ms3(T273)、 ms4(T274)和 ms5(T277)不育株上种子种于田间,植株开花时,以 N J89- 1作母本或父本,与 ms1(T266)、 ms2(T259)、 ms3(T273)、 ms4(T274)及 ms5(T277)进行杂交,植株成熟时,从可育株上收获杂交种子。1994 年和 1995 年夏在卫岗和江浦将上年收到的杂交种子(S₀)种于田间,并两边种上亲本,以便鉴别真假杂种,植株成熟时,观察育性分离情况

3 细胞形态学观察

采用常规的压片、石蜡切片、透射电子显微镜和扫描电子显微镜等技术,以可育株花药、花粉的发育过程为对照,研究不育株花药、花粉的异常发育,揭示 N J89- 1雄性不育性的细胞形态学特征

结果与分析

1 N J89- 1不育性的表现

1.1 大田自然群体中不育株的结荚状况

对 N J89- 1大田自然群体中 372株不育株进行结荚状况(包括单株荚数和每荚粒数)调查,发现 N J89- 1不育株结荚呈现两个特点: 1. 单株荚数较少,平均单株荚数仅为 1. 22个/株,但变异幅度较大,大多数不育株(约 76%)只结 1个荚或不结荚,少数不育株可结 22个荚; 2 与可育同胞以二粒荚(约 54%)、三粒荚(约 36%)为主相比,不育株以一粒荚为主(约 72%),部分二粒荚(约 25%),三粒荚则很少(约 3%)。不育株结荚、结实减少一般与花粉不足和雌性育性下降有关。在雌性育性检测试验中, N J89- 1不育株的雌性育性并未下降,那么, N J89- 1不育株结荚、结实减少可能是由花粉不足所致

1.2 雄性不育度

对 90株 N J89- 1不育株及 10株对照可育株上、中、下三个不同部位的花分别共 306朵和 30朵,进行花粉发芽实验,计数花粉发芽率,结果如下: 对照 N J89- 1可育株的花粉发芽率比较高,约 90% 花朵的花粉发芽率在 50% 以上,最高达 99. 13%,平均花粉发芽率为 78. 18%;而 N J89- 1不育株的花粉发芽率很低,约 90% 低于 0. 1%,最高只有 0. 75%,平均值仅为 0. 03%。这说明 N J89- 1不育株的雄性不育度高,达 99. 25% 以上。对 3株 N J89- 1不育株不同节位花的花粉发芽率作系统观察,发现 N J89- 1不育株不同节位花的花粉发芽率均很低,大多数为 0. 00%,少数大于 0. 00%,但仍小于 0. 10%,说明 N J89- 1不育株花朵的花粉发芽率未受到节位的影响,即 N J89- 1不育株的雄性不育性稳定。

表 1 N J89- 1不育株、可育株的人工杂交成功率

材 料	杂交花数	结荚数	成功率
N J89- 1不育株	72	6	8. 33%
N J89- 1可育株	258	30	11. 63%

1.3 雌性育性

分别对 N J89- 1不育株、可育株进行人工去雄授粉,得到它们的人工杂交成功率列

于表 1 中。差异显著性测验表明,N J89- 1 不育株与可育株之间人工杂交成功率无明显差异,说明 N J89- 1 不育株的雌性育性未受到明显影响,这与马国荣等^[2]的研究结果一致。

2 N J89- 1 雄性不育性的遗传

2.1 自然授粉后代分析

鉴于所用材料来源于不育株所结种子长成的植株(杂合可育株)自交产生的后代,本文将不育株所结种子长成的植株(杂合可育株)以 S_0 表示,由 S_0 自交产生的后代记为 $S_{0:1}$,由 $S_{0:1}$ 自交产生的后代记为 $S_{1:2}$ 。

马国荣等^[2]曾认为 N J89- 1 雄性不育性可能由单隐性核基因控制。如果 N J89- 1 雄性不育性受单隐性核基因控制,那么, $S_{0:1}$ 将表现育性分离,分离比例为 3(可育株):1(不育株), $S_{1:2}$ 将表现育性分离行与育性不分离行之比为 2:1,育性分离行内分离比例为 3(可育株):1(不育株)。本试验中, $S_{0:1}$ 共有 17 个株系,株系内均育性分离,分离比例经 χ^2 测验均符合 3(可育株):1(不育株);17 个株系合并,共有 981 株,其中 742 株可育,239 株不育,齐性测验结果(χ^2 值为 12.0967, $0.50 < P < 0.75$)表明这 17 个株系来自一个群体(表 2)。 $S_{1:2}$ 共有 181 个家系,其中 114 个家系表现育性分离,67 个家系表现一致可育,分离家系与不分离家系之比,经 χ^2 测验符合 2:1(χ^2 值为 0.9454, $0.25 < P < 0.50$) (表 3);各分离家系内,育性分离,分离比例经 χ^2 测验均符合 3(可育株):1(不育株);114 个分离家系合并,共有 5270 株,其中 3994 株可育,1276 株不育,齐性测验(χ^2 值为 51.0668, $P > 0.995$) 同样表明这 114 个分离家系来源于同一个群体(表 2)。根据以上结果,可推断 N J89- 1 雄性不育性是受单隐性核基因控制,马国荣等^[2]的研究结果得到了进一步的验证。

表 2 N J89- 1 不育株所结种子后代 ($S_{0:1}$, $S_{1:2}$) 的育性分离比例

	$S_{0:1}$					$S_{1:2}$				
	可育株数	不育株数	df	$\chi^2(3:1)$	P	可育株数	不育株数	df	$\chi^2(3:1)$	P
总	742	239	17	12.2764	0.75-0.90	3994	1276	114	52.7680	>0.995
合并 χ^2			1	0.1797	0.50-0.75			1	1.7012	0.10-0.25
同质性 χ^2			16	12.0967	0.50-0.75			113	51.0668	>0.90

* $S_{0:1}$ 代表不育株所结种子长成的植株(杂合可育株)自交产生的后代

* * $S_{1:2}$ 代表 $S_{0:1}$ 自交产生的后代

表 3 N J89- 1 不育株所结种子后代 $S_{1:2}$ 中分离家系与不分离家系的比例

分离家系数	不分离家系数	$\chi^2(2:1)$	P
114	67	0.9454	0.25-0.50

2.2 等位性杂交测验

习惯上将两个纯系亲本间的杂交称为 F_1 , 本文将两个杂合体间的杂交用 S_0 代表,其自交后代记为 $S_{0:1}$ 。

如果测验的两个基因等位,则 S_0 表现育性分离,分离比例为 3(可育株):1(不育株); S_0 中可育株自交产生的 $S_{0:1}$ 将表现行间分离,分离行内分离比例为 3(可育株):1(不育株)与不分离行(全部为可育株)之比为 2:1。若测验的两个基因不等位,则 S_0 表

现一致可育; S_0 表现行间分离, 分离行与不分离行之比为 3(分离行): 1(不分离行), 其中分离行又区分为 3(可育株): 1(不育株) 分离行和 9(可育株): 7(不育株) 分离行两种, 它们的比例为 2(3: 1 分离行): 1(9: 7 分离行)。

为方便起见, 假定待定的 NJ89- 1 不育基因为 msx , NJ89- 1 不育基因 msx 与 $ms1$ $ms2$ $ms3$ $ms4$ $ms5$ 的等位性测验结果列在表 4 中。NJ89- 1 杂合体 ($Msxmsx$) 作母本或父本, 与 $ms1$ $ms2$ $ms3$ $ms4$ $ms5$ 杂合体 ($Ms1ms1$ $Ms2ms2$ $Ms3ms3$ $Ms4ms4$ $Ms5ms5$) 杂交, S_0 虽然植株数比较少, 但均表现为可育株, 没有发生育性分离, 可初步说明 NJ89- 1 不育基因 msx 与 $ms1$ $ms2$ $ms3$ $ms4$ $ms5$ 均不等位, 遗憾的是, 由于洪水等原因, 杂交二代均未能获得。当然, 以上初步结论还待另外的等位测验试验证实。

表 4 NJ89- 1 不育基因 msx 与 $ms1$ $ms2$ $ms3$ $ms4$ $ms5$ 的等位性测验

杂交组合	年份	S_0 植株数	S_0 育性表现
NJ89- 1($Msxmsx$) \times T266($Ms1ms1$)	1995	5	可育
NJ89- 1($Msxmsx$) \times T259($Ms2ms2$)	1995	6	可育
T259($Ms2ms2$) \times NJ89- 1($Msxmsx$)	1995	5	可育
NJ89- 1($Msxmsx$) \times T273($Ms3ms3$)	1994	6	可育
T273($Ms3ms3$) \times NJ89- 1($Msxmsx$)	1994	6	可育
NJ89- 1($Msxmsx$) \times T274($Ms4ms4$)	1995	4	可育
T274($Ms4ms4$) \times NJ89- 1($Msxmsx$)	1995	3	可育
T277($Ms5ms5$) \times NJ89- 1($Msxmsx$)	1995	3	可育

* S_0 代表两个杂合体杂交产生的杂交一代

3 NJ89- 1 雄性不育性的细胞形态学特征

通过 NJ89- 1 不育株与可育株间花药、花粉发育的光镜及电镜观察比较, 揭示了 NJ89- 1 雄性不育性的细胞形态学特征, 并将其与已报道的 $ms1$ ~ $ms6$ ^[3- 5, 7, 11, 13] 突变体的细胞形态学特征作比较, 发现在败育时期、减数分裂、四分体形成、小孢子壁发生、花药壁发育、花粉粒形态等诸多方面, NJ89- 1 与 $ms1$ ~ $ms6$ 突变体均不相同。例如: (1) 败育时期方面, NJ89- 1 雄性败育发生最早, 在小孢子母细胞减数分裂的早前期 I 即开始败育; 而 $ms1$ ~ $ms6$ 雄性败育均发生较晚, $ms1$ $ms4$ 和 $ms6$ 败育发生在减数分裂末期 II 之后不久, $ms2$ 和 $ms3$ 败育发生在四分体之后不久。(2) 减数分裂方面, NJ89- 1 小孢子母细胞减数分裂高度变异, 出现联会异常现象, 包括单价体、染色体减数、落后染色体、染色体桥、染色体分配不均衡等; $ms1$ 和 $ms4$ 直到胞质分裂时才出现减数分裂异常, $ms1$ 不发生胞质分裂, $ms4$ 表现为多种情况: 不发生胞质分裂, 或发生不完全、不规则和完全、规则的胞质分裂; $ms6$ 在末期 II 后至胞质分裂前小孢子母细胞即退化; $ms2$ 和 $ms3$ 中减数分裂正常。(3) 四分体形成方面, NJ89- 1 形成异常的二分体、三分体、四分体及五分体、六分体、七分体等多分体; $ms1$ 形成多核小孢子 (CM); $ms4$ 除形成多核小孢子 (CM) 外, 还可形成多分体和正常四分体; $ms6$ 未形成四分体, 小孢子母细胞即退化; $ms2$ 和 $ms3$ 形成正常四分体。(4) 花粉粒形态方面, NJ89- 1 形成大小不等, 有时聚集成块的花粉粒; $ms1$ 形成大型的, 有时聚合成团的多核小孢子 (CM); $ms4$ 形成细胞聚合体, 偶而从聚合体中释放出有用花粉粒; $ms2$ 、 $ms3$ 和 $ms6$ 无花粉粒, 只有退化细胞, 还有许多其他细胞形态学上

的不同,这里不一一例举

N J89- 1在细胞形态学特征上与 $st2\sim st5^{8\ 10\ 12]}$ 突变体较相似,如小孢子细胞减数分裂高度变异,出现联会异常现象等,但是,在雌性育性上,N J89- 1又明显不同于 $st2\sim st5$ 突变体,N J89- 1雌性育性正常,而 $st2\sim st5$ 突变体的雌性均高度不育。

综合上述,不育性表现试验表明 N J89- 1的雌性育性正常,即 N J89- 1是一个雄性不育雌性可育突变体,其雄性不育度高达 99.2% 以上且稳定;遗传试验表明 N J89- 1雄性不育性受单隐性核基因控制,N J89- 1不育基因与 $ms1\sim ms5$ 均不等位;细胞形态学观察发现在细胞形态学特征上 N J89- 1与 $ms1\sim ms6$ 突变体均不相同,而与 $st2\sim st5$ 突变体较相似,但是在雌性育性上,N J89- 1与 $st2\sim st5$ 突变体又明显不同,因此,N J89- 1是一个既不同于 ms 类型又不同于 st 类型的新雄性不育突变体,鉴于其雌性育性正常,即 N J89- 1属于雄性不育雌性可育突变体,大豆上迄今共报道了 6个雄性不育雌性可育突变体($ms1\sim ms6$),本文建议将 N J89- 1雄性不育基因符号定为 $ms7$

参 考 文 献

- [1] 盖钧镒,胡蕴珠,陈建民,顾蕴洁,1980,保存大豆花粉生活力的试验,作物学报 6(1): 11~ 16
- [2] 马国荣,刘佑斌,盖钧镒,1993,大豆雄性不育突变体 N J89- 1的发现与表现,大豆科学 12(2): 172~ 174
- [3] Albertsen, M. C. and R. G. Palmer. 1979. A comparative light- and electron- microscopic study of microsporogenesis in male sterile($ms1$) and male fertile soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). Amer. J. Bot. 66(3): 253~ 265
- [4] Buss, G. R. 1983. Inheritance of a male- sterile mutant from irradiated Essex soybeans. Soybean Genetics Newsletter 10 104~ 108
- [5] Delannay, X. and R. G. Palmer. 1982. Genetics and cytology of the ms^4 male- sterile soybean. The Journal of Heredity 73 219~ 223
- [6] Gai Junyi, Yang Shouping and Xu Hanqing. 1997. The performance and allelism study of the new male sterile mutant N J89- 1 of the soybean. Soybean Genetics Newsletter 24 57~ 59
- [7] Graybosch, R. A. et al. 1984. Genetic and cytological studies of a male- sterile, female- fertile soybean mutant. The Journal of Heredity 75 383~ 388
- [8] Hadley, H. H. and W. J. Starnes. 1964. Sterility in Soybeans Caused by Asynapsis. Crop Sci. 4 421~ 424
- [9] Owen, F. V. 1928. A sterile character in soybeans. Plant Physiology 3 223~ 226
- [10] Palmer, R. G. 1974. A Desynaptic Mutant in the Soybean. The Journal of Heredity 65 280~ 286
- [11] Palmer, R. G., C. W. Johns, and P. S. Muir. 1980. Genetics and cytology of the $ms3$ male- sterile soybean. The Journal of Heredity 71 343~ 348
- [12] Palmer, R. G. and M. L. H. Kaul. 1983. Genetics, cytology, and linkage studies of a desynaptic soybean mutant. The Journal of Heredity 74 260~ 264
- [13] Skorupska, H. and R. G. Palmer. 1989. Genetics and Cytology of the $ms6$ Male- Sterile Soybean. The Journal of Heredity 80 304~ 310

A GENETICAL AND CYTOMORPHOLOGICAL STUDY ON THE MALE STERILE MUTANT NJ89- 1 IN SOYBEANS

Yang Shouping Gai Junyi Xu Hanqing

(*Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*)

Abstract

Artificial pollination experiments revealed that the female fertility of NJ89- 1 was normal, then, NJ89- 1 was a male- sterile female- fertile mutant. Pollen germination experiments showed that the male sterility of NJ89- 1 was pretty high and stable with a pollen germination percentage less than 0. 75%. Genetic data led to the conclusion that the male sterility of NJ89- 1 was controlled by a single recessive nuclear gene. Allelism tests indicated that the male sterile gene of NJ89- 1 was non- allelic to the male sterile genes of ms1, ms2, ms3, ms4 and ms5. The cytomorphological observations on anther and pollen development showed that NJ89- 1 was different from ms1~ ms6 mutants in many aspects such as abortion stage, meiosis, tetrad formation, pollen wall and anther wall etc. NJ89- 1 displayed similar meiotic abnormalities of asynapsis or desynapsis to those of st2~ st5 mutants, but differed from st2~ st5 mutants in female fertility, namely, the female of NJ89- 1 was normal, while those of st2~ st5 mutants were strongly impaired. Therefore, NJ89- 1 was a new male sterile mutant. The male sterile gene symbol of NJ89- 1 was proposed to be ms7.

Key words Soybean; Male Sterility; Mutant; Inheritance; Cytomorphology