

# 新型红菜薹细胞质雄性不育系的花药发育细胞学观察

邵明珠 徐跃进 万正杰

华中农业大学园艺林学学院/华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室/  
国家蔬菜改良中心华中分中心, 武汉 430070

**摘要** 采用石蜡切片方法,对新型红菜薹细胞质雄性不育系及其保持系俞优的花药发育过程进行细胞学观察,以确定其花药败育的时期、方式和特点。研究表明:此红菜薹胞质不育系的花药败育发生于单核小孢子早期,表现为绒毡层细胞异常膨大,挤压单核早期小孢子,从而导致其败育。

**关键词** 红菜薹; 细胞质雄性不育; 花药败育; 石蜡切片; 细胞学

**中图分类号** S 634.603 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-0436-04

目前十字花科芸薹属蔬菜杂种优势利用的主要途径包括自交不亲和性和雄性不育性,其中细胞质雄性不育(CMS)是最为经济、理想的授粉途径之一,已为国内外十字花科蔬菜杂种优势利用作出了巨大贡献。国内外已经报道的油菜胞质雄性不育系有 polima CMS<sup>[1]</sup>、ogura CMS<sup>[2]</sup>、tour CMS<sup>[3]</sup> 和 nap CMS<sup>[4]</sup>、mor CMS<sup>[5]</sup>、Nsa CMS<sup>[6]</sup> 等。这些不育系统在红菜薹育种上应用的并不多,红菜薹上应用的只有 polima CMS 和 ogura CMS。但 ogura CMS 转育的红菜薹不育系存在苗期遇低温叶片会黄化、且生长缓慢、蜜腺退化、雌蕊发育不正常、自然状态下种子产量低等缺点;而 polima CMS 转育的红菜薹不育系存在花期不育性对温度很敏感、在较高或较低的温度下易出现少量花粉、种子纯度低的缺点<sup>[7]</sup>。

观察十字花科蔬菜雄性不育系花药的败育时期和细胞学特点,是研究雄性不育基因时空特异表达的基础,对揭示雄性不育机理有重要现实意义。为此,前人对十字花科蔬菜细胞质雄性不育系花药败育的细胞学过程做了大量研究。杨晓芸等<sup>[8]</sup>通过显微和亚显微结构 2 个层次对不结球白菜波里马胞质雄性不育系及相应保持系花药发育进行对比研究。Wan 等<sup>[9]</sup>通过对 Hau CMS 进行了花药败育时期细胞学鉴定、恢保关系测定和 RFLP 分析研究,

结果表明 hau CMS 不同于国内外现有的 pol CMS、Shan 2A、ogu CMS、tour CMS、nap CMS 等油菜胞质不育型,是一种全新的油菜细胞质雄性不育类型。

甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 eru CMS 苗期遇低温叶片不黄化,不育性稳定,蜜腺正常,不育度和不育株率均为 100%,是一种优良的不育源。由于仍未找到理想的恢复系,在油菜育种中暂未得到利用,由于红菜薹是以收获营养器官为主,不需要恢复系,因此适用于十字花科蔬菜雄性不育系的杂种优势育种应用。远缘杂交是创造新种质资源和实现不育基因转移的有效手段。吴红美等<sup>[10]</sup>以新型甘蓝型油菜细胞质雄性不育源(eru CMS)为材料,通过杂交与胚抢救技术,获得了甘蓝型油菜与甘蓝的种间杂种。笔者所在研究组以甘蓝型油菜(*Brassica napus*, AACC,  $2n=38$ )与红菜薹自交系俞优为试验材料,经过种间杂交和连续回交代 6 代选育出新型红菜薹细胞质不育系,本研究对其花药发育进行研究,为红菜薹细胞质雄性不育系的杂种优势育种以及雄性不育的分子机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为新型红菜薹细胞质雄性不育系和红

收稿日期: 2011-07-09

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目(2010CBB01703)和中央高校基本科研业务费专项(2009QC027)

邵明珠,硕士研究生,研究方向:蔬菜遗传育种。E-mail: shmzh0319\_love@163.com

通讯作者: 徐跃进,教授,研究方向:蔬菜遗传育种。E-mail: xyjho@mail.hzau.edu.cn

菜薹保持系俞优,由华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室提供。

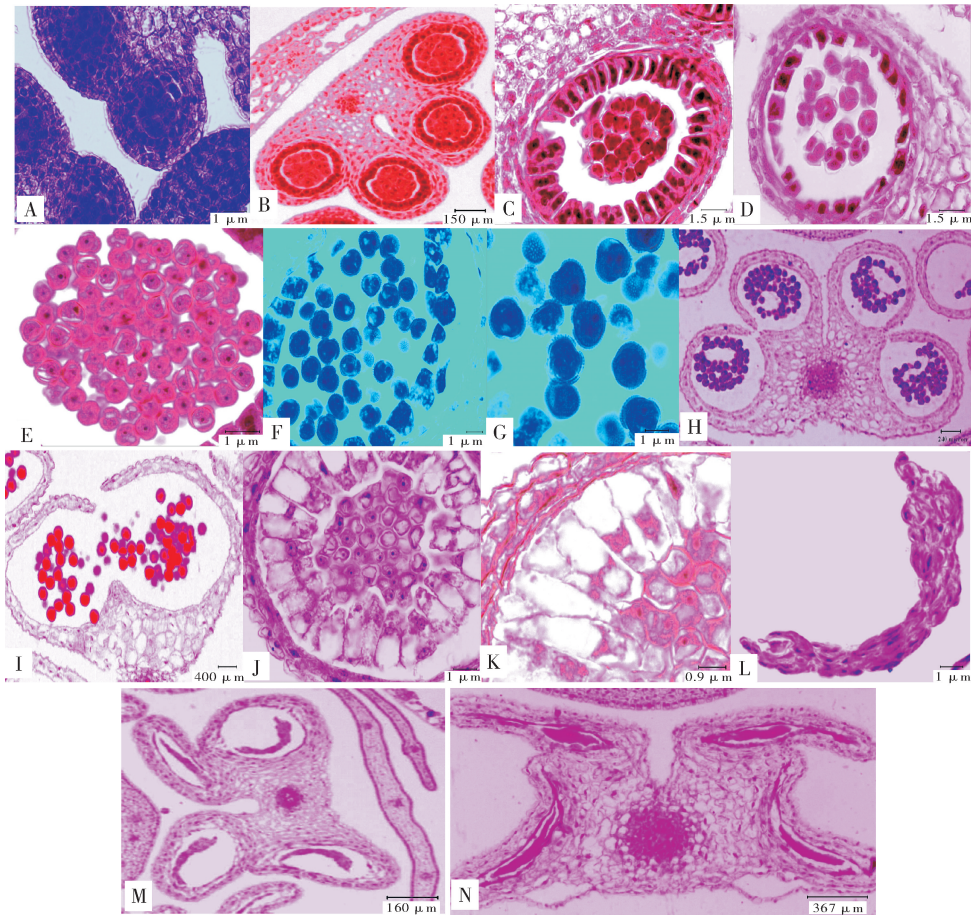
1.2 试验方法

于材料盛花期选取主茎顶端花序,按花蕾的着生顺序及大小分级后,FAA 固定液固定,70%乙醇保存。按常规石蜡切片程序制作切片<sup>[11]</sup>:抽真空→爱氏苏木精-伊红整体染色法→逐级乙醇脱水→逐级氯仿透明→浸蜡→包埋→切片→展片→封片。花蕾横切,切片厚度 8 μm,Olympus CX4 显微镜观察,Mshot MD30 摄影。

2 结果与分析

2.1 保持系俞优花药的发育

在幼小花药的表皮内侧分化出孢原细胞,孢原细胞通过 1 次平周分裂,形成内外 2 层细胞。外层细胞为周缘细胞,内层为造孢细胞(图 1-A),周缘细胞再进行平周和垂周分裂形成花药的 3 层壁,造孢细胞也进行分裂或直接发育成花粉母细胞(图 1-B)。花粉母细胞进入减数分裂期(图 1-C),形成四分体(图1-D)。包裹四分体的胼胝质开始溶解,小



A-I:红菜薹保持系俞优的花药形成与发育过程 The developmental process of anther of purple Cai-tai male-sterile maintainer line; A:造孢细胞(×40) Sporogenous cell(×40); B:花粉母细胞(×10) Pollen mother cell(×40); C:花粉母细胞减数分裂期(×40) Pollen mother cell meiosis stage; D:小孢子四分体(×40) Tetrad stage(×40); E:单核小孢子早期(×40) Microspore early stage(×40); F:单核靠边期(×40) The late uninucleate stage(×40); G:二核花粉粒(×40) 2-nucleate pollen stage(×40); H:示成熟花药(×4) Showing the mature anther(×4); I:开裂花药(×10) The splitting anther(×10); J-N:新型红菜薹不育系的花药败育过程 The developmental process of anther of male-sterile line; J:单核小孢子早期,示绒毡层细胞的异常膨大(×40) Microspore early stage,the tapetum cells showed hypertrophic(×40); K:单核小孢子早期,示绒毡层细胞挤压单核早期小孢子(×40) Microspore early stage,the tapetum cells extruded microspore early stage (×40); L:小孢子和绒毡层降解物(×40) Microspore and tapetum degradants(×40); M:败育花粉囊(×4) The pollen had aborted(×4); N:示萎缩的花粉囊(×10) Showing atrophied anther sac(×10).

图 1 新型红菜薹不育系及保持系俞优的花药形成与发育过程观察

Fig. 1 The developmental process of anther of purple Cai-tai male-sterile maintainer line and male-sterile line

孢子释放出来,此时的小孢子细胞质浓厚,染色较深,核位于细胞中央,为单核小孢子早期(图1-E)。单核小孢子不断吸收营养和水分体积变大,液泡化明显,核逐渐移向花粉粒的一侧,即单核靠边期(图1-F)。单核花粉粒经过一次有丝分裂,形成一个大的营养核和一个小的生殖核,即二核花粉粒(图1-G)。成熟的花药呈典型的蝶形(图1-H),紧接着释放出花粉粒(图1-I)。

## 2.2 新型红菜薹细胞质雄性不育系花药的发育特征

石蜡切片观察显示新型红菜薹不育系的花药发育,从造孢细胞期到四分体与可育的十分相似,并无差别。小孢子被释放出来之后,药室中绒毡层细胞异常膨大,内部出现大液泡,可见双核或单核(图1-J),随后绒毡层细胞继续膨大(主要是径向膨大),而且着色颜色较浅,液泡化更为明显,有的成为巨型细胞,侵入药室腔挤压单核小孢子早期(图1-K),单核小孢子受到挤压,逐渐破裂解体,同时绒毡层细胞的液泡化进一步加剧,单核小孢子早期和绒毡层细胞进一步降解为一团条状物(图1-L),此条状物着色比较深,最后药室变为中间有一条条状物的空腔药室,绒毡层细胞已经完全消失了(图1-M),随后空腔药室变为干瘪(图1-N)。

根据以上结果可知,新型红菜薹不育系花药败育发生于单核小孢子早期,表现为绒毡层细胞异常,挤压单核早期的小孢子,导致其解体或败育。

## 3 讨论

关于十字花科芸薹属作物雄性不育的细胞学特征,前人已经做了较多研究。余凤群等<sup>[12]</sup>对6个甘蓝型细胞质雄性不育系和1个细胞核雄性不育系“宜3A”共7个材料的雄性败育进行了细胞学研究,根据败育时期的不同,将7个不育系分成3类:①无花粉囊型,其花粉发育受阻于孢原细胞期;②花粉母细胞败育型,它的花粉发育异常开始于花粉母细胞时期,花粉母细胞死亡或减数分裂异常,或不进行减数分裂等;③单核花粉败育型,花粉败育发生在四分体至单核花粉期之间,败育方式为小孢子不能从四分体释放出来,或虽缓慢释放,但细胞质液化、核不分裂,花粉外壁发育不良,最终败育。田福发等<sup>[13]</sup>研究红菜薹 polima CMS 和 ogura CMS 花药得出:红菜薹 polima CMS 花药发育受阻于孢原细胞阶段,不形成花粉,属无花粉型,此不育系花药不

形成绒毡层和中层;而红菜薹 ogura CMS 花药败育发生于小孢子母细胞期或四分体时期,表现为绒毡层细胞异常,挤压四分体,导致四分体和绒毡层同时解体而败育。本研究中新型红菜薹不育系的花药败育发生于单核小孢子早期,表现为绒毡层细胞异常,挤压单核早期的小孢子,导致其解体或败育,与上述2种红菜薹细胞质雄性不育花药败育不同。

关于绒毡层与花粉败育的关系,大多认为花粉败育是因为绒毡层结构异常<sup>[14-17]</sup>,即绒毡层细胞在花粉形成和发育过程中过度肥大液泡化或形成周原质团、提前或延缓退化。本研究观察到新型红菜薹细胞质雄性不育的花药由于绒毡层细胞的液泡化和径向变大,导致其体积迅速膨大延伸到药囊腔内部,使小孢子有被挤压的趋势,而在药囊腔中央形成一团条状物,小孢子发育受到阻碍,而在相应的保持系花粉发育过程中,绒毡层细胞自然降解消亡。

笔者对新型红菜薹不育系的花药发育进行了细胞学研究,结果显示其花药败育时期主要发生在单核小孢子早期,但花蕾开放时没有发现有功能的花粉粒。从细胞学水平上明确了其花粉败育彻底,败育率为100%,这与多年田间育性调查结果相一致,并且通过多年多地点(武汉、兰州、山东等)的田间表型观察得出,新型红菜薹不育株率和不育度均为100%,蜜腺正常且无低温叶片会黄化和少量微粉问题。说明该材料具有优良红菜薹雄性不育系的生产潜力,目前正在进行杂交组合试配及配合力分析的工作,为选育优良的红菜薹细胞质雄性不育系打下基础。

## 参 考 文 献

- [1] FU T D. Production and research of rapeseed in the People's Republic of China[J]. Eucarpia Cruciferae Newsletter, 1981 (6):6-7.
- [2] PELLETIER G, PRIMARD C, VEDEL F, et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion[J]. Molecular General Genetics, 1983, 191:244-250.
- [3] RAWAT D S, ANAND I J. Male sterility in Indian mustard[J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1979, 39: 412-414.
- [4] SHIGA T, BABA S. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape (*Brassica napus* L.), and its utilization to breeding [J]. Japanese Journal of Breeding, 1973, 23(4):187-197.
- [5] PRAKASH P B, KIRTI P, PRAKASH S, et al. A *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterility and fertility restora-



tion system in *Brassica juncea* [J]. Theoretical and Applied Genetics,1998,97:488-492.

[6] 危文亮. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 NCa 的研究[D]. 北京：中国农业科学院研究生院,2005.

[7] 谭远宝,徐跃进,张艳,等. 红菜薹与甘蓝型油菜远缘杂交后代的植物学和细胞学分析[C]//中国园艺学会十字花科分会. 中国十字花科蔬菜研究进展. 北京：中国园艺学会,2009:210-214.

[8] 杨晓云,曹寿椿. 不结球白菜波里马胞质雄性不育系花药发育的细胞形态学研究[J]. 南京农业大学学报,1997,20(3):36-43.

[9] WAN Z J,JING B,TU J X,et al. Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system(hau) in *Brassica juncea* and its transfer to *B. napus*[J]. Theor Appl Genet,2008,116:355-362.

[10] 吴红美,徐跃进,万正杰. 甘蓝型油菜与甘蓝种间杂种的鉴定及特性研究[J]. 华中农业大学学报,2011,30(2):290-294.

[11] 李和平. 植物显微技术[M]. 2 版. 北京：科学出版社,2009:45-46.

[12] 余凤群,傅廷栋. 甘蓝型油菜几个雄性不育系花药发育的细胞形态学研究[J]. 武汉植物学研究,1989,8(3):209-216.

[13] 田福发,徐跃进,陈建军,等. 红菜薹雄性不育系花药败育的细胞形态学观察[J]. 武汉植物学研究,2004,23(3):269-272.

[14] 杨光圣,瞿波,王淑新,等. 一个甘蓝型油菜 DGCMS 雄性不育系的花器形态及细胞学研究[J]. 中国油料作物学报,2000,22(3):16-21.

[15] KINI A V,SEETHARAM A,JOSHI S S. Mechanism of pollen abortion in cytoplasmic male lines of sunflower[J]. Ctologia,1994,59(1):425-454.

[16] 郭晶心,孙日飞,宋家祥,等. 大白菜雄性不育系小孢子发生的细胞形态学研究[J]. 园艺学报,2001,28(5):400-414.

[17] 邓云娟,胡胜武,田保明,等. 甘蓝型油菜双显性细胞核雄性不育系 Shaan-GMS 雄配子发育观察[J]. 中国油料作物学报,2010,32(1):1-5.

Cytological study of anther abortion in a novel cytoplasmic male-sterile line of purple Cai-tai

SHAO Ming-zhu XU Yue-jin WAN Zheng-jie

College of Horticulture and Forestry/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China

**Abstract** Cytological observations of anther in a novel cytoplasmic male sterile line and its maintainer line Yuyou of purple Cai-tai (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. var. *utilis* Tsen et Lee) was made by means of paraffin section to determine the characteristics of anther abortion. The results showed that the abortion occurred at the early stage of single-nucleus microspore. The abnormal tapetum cells were observed and microspores at early stage were extruded. In the end,the tapetum cell and microspore at early stage disaggregated.

**Key words** purple Cai-tai(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. var. *utilis* Tsen et Lee); cytoplasmic male sterility; anther abortion; paraffin section; cytology

(责任编辑:张志钰)