

不结球白菜 Ogura 雄性不育花器官形态 及败育细胞学的研究

单奇伟¹, 陈龙正², 徐海², 宋波², 安林海¹, 胡俏强¹, 苏小俊², 袁希汉²

(1 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095 2 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 对不结球白菜细胞质雄性不育系 S₂₁₀₈A 和 Y₃₆₁₁A 及其相应的保持系 S₂₁₀₈B 和 Y₃₆₁₁B 进行了花器官形态比较和花药发育细胞学观察, 结果表明: 两套不育系和保持系之间在花器官的多个性状上差异极显著, 而两个不育系 S₂₁₀₈A 和 Y₃₆₁₁A 之间除花蕾大小、雌蕊长和花瓣长有差异外, 其他均不显著, 说明从不同不育源转育来的两个不育系在花器官外形上差异不大; 两个不育系花药败育表现均起始于四分体时期, 且由于绒毡层的液泡化和径向膨大, 挤压四分体小孢子导致败育, 表明败育与绒毡层的不正常发育有关。此外, 与 Y₃₆₁₁A 不同, 在不育系 S₂₁₀₈A 中还存在另一种败育形式, 绒毡层细胞壁发生融合, 成为紧贴药室壁类似于变形型绒毡层的周原质团, 部分细胞质流入药室腔, 包裹粘连四分体小孢子, 成为染色很深的不连续团块状物, 花药败育; 两不育系花药发育存在花粉囊数目的变异, 且花粉囊发育时期不同步, 个别花粉囊较正常花粉囊发育推迟, 在不育系 Y₃₆₁₁A 中还有巨型花粉囊的现象。

关键词: 不结球白菜; Ogura 细胞质雄性不育; 花药; 细胞学

中图分类号: S634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)增刊-0025-05

Morphological Studies on Flower Organ of Ogura Cytoplasmic Male Sterile and Its Cytological Characterization of Abortion in Brassica rapa ssp. chinensis

SHAN Qiwei, CHEN Longzheng, XU Hai, SONG Bo, AN Linhai,
HU Qiaoqiang, SU Xiaojun, YUAN Xihan

(1. Horticulture College Nanjing Agricultural University Nanjing 210095 China; 2. Institute of
Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences Nanjing 210014 China)

Abstract The morphologic comparison of flower organ and anatomical observations were conducted on male sterile lines S₂₁₀₈A and Y₃₆₁₁A and their maintainer lines S₂₁₀₈B and Y₃₆₁₁B in Brassica rapa ssp. chinensis. The results showed that there were significant differences in several characters of blossom organ between two set of male sterile lines and their maintainer lines while between the two male sterile lines S₂₁₀₈A and Y₃₆₁₁A, the difference was not found except in the length of flower bud, pistil and length of petal, suggesting that no significant difference in blossom morphology between the two male sterile lines transferred from different origin. The anther abortion of the two male sterile lines started from tetrad period, that due to tapetum's vacuole changing and radial expansion, extrusion tetrad microspore and result in fail development, indicating the anther abortion had relationship with tapetum abnormally development. Moreover, different from Y₃₆₁₁A, there is another anther abortion style in S₂₁₀₈A, tapetum cell wall is fused into periplasmodium like amoeboid tapetum, cling to powder chamber wall, part of cytoplasm afflux into powder chamber, wrap and conglomerate tetrad microspore, the anther abortion. The number of clinandrium of the two male sterile lines is different, and development period of clinandrium is asynchronous, some clinandrium is late. In addition, huge clinandrium is found in the line of Y₃₆₁₁A.

Key words Brassica rapa ssp. chinensis; Ogura cytoplasmic male sterility; Anther; Cytology

收稿日期: 2009-11-12

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD13B06, 2006BAD11A7); 国家高技术研究发展计划“863”计划 (2008AA10Z150); 农业部公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (nyhysz07-007)

作者简介: 单奇伟 (1984-) 男, 河北青龙人, 硕士, 主要从事不结球白菜遗传育种研究。

通讯作者: 袁希汉 (1955-) 男, 江苏宝应人, 研究员, 主要从事十字花科及瓜类蔬菜育种研究。

关于植物雄性不育系花器官的形态和细胞学研究已经有很多报道,但不同植物种类的雄性不育系甚至同一种类的不同雄性不育系的花粉败育方式和时期也不相同。Lasek和 Lersten^[1]对 13 科 38 种植物的 62 例 CMS 类型花粉败育时期进行了统计,Got taschall和 Kaul^[2]对 12 科 48 种植物的 99 例 NMS 雄性不育类型花粉败育时期进行了统计,结果显示从造孢细胞至二核花粉各时期均可发生败育,其中四分体时期以后败育的比例达到 70% 左右。刘忠松等^[3]就此进行了总结,如孢原细胞不分化、造孢细胞相互粘连、花粉母细胞减数分裂异常、减数分裂后胞质不分裂、四分体不分离、小孢子壁的形成不正常、花粉没有功能等,表明败育发生的时期不同,败育特点也不同。

本试验拟对两个不育系 S2108A 和 Y3611A 的花器官和花药进行形态及细胞学观察,以阐明其败育的时期、方式,为不结球白菜雄性不育系的研究与利用提供依据,为不结球白菜杂种优势育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为江苏省农业科学院蔬菜研究所十字花科课题组选育的不结球白菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) 细胞质雄性不育系 S2108A 和 Y3611A 及其相应的保持系 S2108B 和 Y3611B。不育系 S2108A 为 Ogura CMS 是从大白菜细胞质雄性不育材料转育而来,并经 7 代以上回交而成的稳定的不育系;不育系 Y3611A 是油菜育种田中发现的天然

雄性不育株,与不结球白菜经 7 代回交育成的稳定的不育系,特异引物扩增结果显示含有 orf138 特异条带 (Ogura CMS 特有),故初步鉴定也为 Ogura CMS 但与 S2108A 存在个别碱基的变异。两不育系不育性彻底稳定,综合经济性状优良,均为理想的亲本材料,但不育系 Y3611A 的不育机理是否与 Ogura CMS 相同尚没有研究。

1.2 方法

1.2.1 花器官的形态学观察比较 在盛花期,比较两个不育系及与各自保持系花器官情况,每个材料随机取 5 朵花,测量其花蕾大小、花朵开展度和花丝、花药、雌蕊、花瓣的长度,观察雄蕊是否正常,花药有无花粉。数据采用 SPSS12.0 进行数据统计分析。

1.2.2 花药发育的细胞学显微观察 在盛花期取完整饱满的整个花序,对花蕾大小进行分级,用卡诺固定液固定 (乙醇 冰醋酸 = 3 : 1)。采用常规石蜡切片法制片^[4],系列浓度乙醇脱水 (70%, 85%, 95%, 100%),二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚度 8 μ m 铁钒 苏木精染色,固绿复染,中性树胶封片,OM-PUS BH-2 光学显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 花器官的形态学观察比较

花器官形态观察,两套雄性不育系和保持系花蕾均为绿色、花瓣为金黄色;雄性不育系不育性彻底,完全无花粉,花药短丝状,干瘪,黄白色,略带褐色,蜜腺正常,均为 4 个;保持系花药饱满,花粉多 (图 1)。



1. 保持系 S2108B 及其不育系 S2108A 花冠形态; 2. 保持系 S2108B 及其不育系 S2108A 雌雄蕊形态;
3. 保持系 Y3611B 及其不育系 Y3611A 花冠形态; 4. 保持系 Y3611B 及其不育系 Y3611A 雌雄蕊形态。

1. Corolla of maintainer line S2108B and its sterile line S2108A 2. Pistil and stamen of maintainer line S2108B and its sterile line S2108A
3. Corolla of maintainer line Y3611B and its sterile line Y3611A 4. Pistil and stamen of maintainer line Y3611B and its sterile line Y3611A

图 1 不育系及保持系花器官的形态比较

Fig 1 Flower organ comparisons of male sterile line and its maintainer line

对不育系 S2108A Y3611A 及其保持系 S2108B Y3611B 进行花器官各项指标的测定,结果见表 1。

从表 1 可以看出,不育系与保持系相比,其各项指标均较低。分析结果表明,不育系 S2108A 和保

持系 S2108B 在花药长、花瓣宽两性状差异不显著,雌蕊长分别为 5.40 mm 和 6.40 mm,差异显著,其他性状如花开展度分别是 13.60 mm 和 16.20 mm,长花丝长度分别为 1.82 mm 和 5.80 mm,均达极显著水平;不育系 Y3611A 和其保持系 Y3611B 的花药

长、花蕾长和雌蕊长差异不显著,其他除短花丝长度外均达极显著水平,如长花丝长分别是 1.70 mm和 5.34 mm;而两个不育系 S2108A Y3611A 差异多不显著,只有花蕾长、花蕾宽、雌蕊长和花瓣长有显

表 1 不结球白菜雄性不育系与保持系花器结构特征的比较

Tab 1 Comparison of the flower organ's forms between sterile flowers and fertile flowers mm										
材料代号 Material code	花蕾长 Length of flower bud	花蕾宽 Width of flower bud	花开展度 Expansion of corolla	短花丝 Short thrum	长花丝 Long thrum	花药长 Length of anther	花药宽 Width of anther	雌蕊长 Length of pistil	花瓣长 Length of petal	花瓣宽 Width of petal
S2108A	4.54 aA	2.48 aA	13.60 aA	1.20 aA	1.82 aA	1.44 aA	0.30 aA	5.40 aA	8.20 aA	5.60 aA
S2108B	5.14 bB	2.92 bB	16.20 bBC	4.70 bB	5.80 bB	1.54 aA	0.86 bB	6.40 bAB	10.00 bB	5.80 aA
Y3611A	5.40 bBC	2.20 cA	14.60 abAB	1.30 aA	1.70 aA	1.38 aA	0.24 aA	6.74 bB	9.20 cB	5.20 bA
Y3611B	5.70 cC	2.86 bB	17.40 cC	3.50 cC	5.34 bB	1.40 aA	0.64 cC	6.94 bB	11.50 dC	7.40 cB

注:采用 Duncan' 分析方法,大写字母为 $P<0.01$,小写字母为 $P<0.05$ 。
Note: With Duncan's analysis capital and small letters show $P<0.01$ and $P<0.05$ respectively

2.2 花药发育的细胞学显微观察

2.2.1 保持系 Y3611B花药发育的细胞学观察
保持系花药正常可育,和前人报道发育过程高度相同, Y3611B的发育过程与 S2108B相同。孢原细胞经过平周分裂形成初生壁细胞和初生造孢细胞。初生壁细胞分裂最终形成药室内壁、中层和绒毡层;初生造孢细胞有丝分裂形成次生造孢细胞,次生造孢细胞核大,核仁极其明显(图 2-A箭头所示);绒毡层细胞胞质浓厚,细胞核较大,呈径向伸长的近长方形。

保持系造孢细胞经过多次有丝分裂后,形成花粉母细胞(图 2-B箭头所示),花粉母细胞整齐排列,细胞核较大,染色深,胞质浓厚(图 2-C D);中层变得略薄。

花粉母细胞减数分裂时期,花粉母细胞的细胞壁和质膜间开始积累胼胝质,花粉母细胞排列变得松散,不再棱角分明;绒毡层此期间核分裂,变为双核(图 2-E箭头所示),中层细胞扁平,开始出现退化。

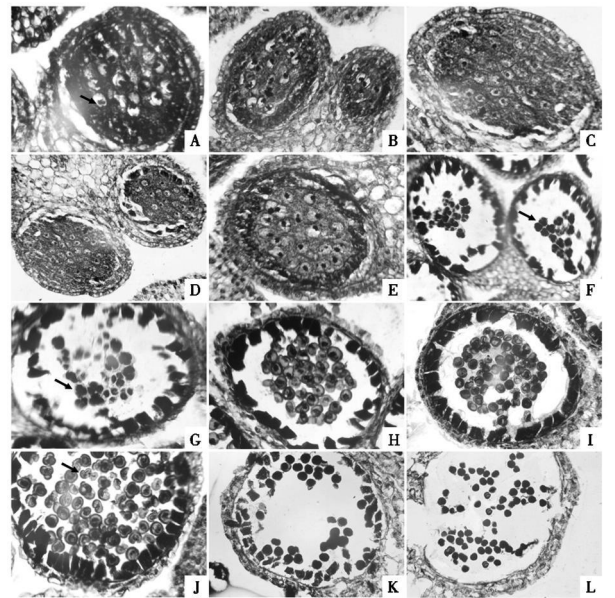
花粉母细胞减数分裂形成四面体状四分体,被胼胝质壁包裹(图 2-F G箭头所示);绒毡层细胞开始解体,空隙变大,排列变得不整齐,中层变得很薄。

四分体分开形成单核小孢子,分散在花粉囊中,此时小孢子没有明显液泡,细胞核位于中央,为单核早期(图 2-H箭头所示),中央大液泡形成后,进入单核靠边期,此时绒毡层形状、厚薄变得不规则,细胞内有很多大液泡(图 2- 箭头所示),中层几乎完全消失。

单核靠边期的小孢子经过一次不均等分裂,形成一个大的营养细胞和一个小的生殖细胞,发育成为二细胞花粉(图 2-J箭头所示),经过三细胞花粉期,小孢子发育为成熟花粉(图 2-K L),此时的花粉染色很深,几乎看不见细胞核。花药接近成熟时,绒

著差异,花蕾长分别为 4.54 mm和 5.40 mm,雌蕊长分别为 5.40 mm和 6.74 mm,为极显著水平,这说明从不同不育源转育来的两个不育系在花器官外形上差异不大,而两套不育系和保持系之间差异极大。

毡层已完全降解(图 2-L)。在整个发育过程中,绒毡层一直在原来的位置直到降解,所以不结球白菜的绒毡层是腺质绒毡层。



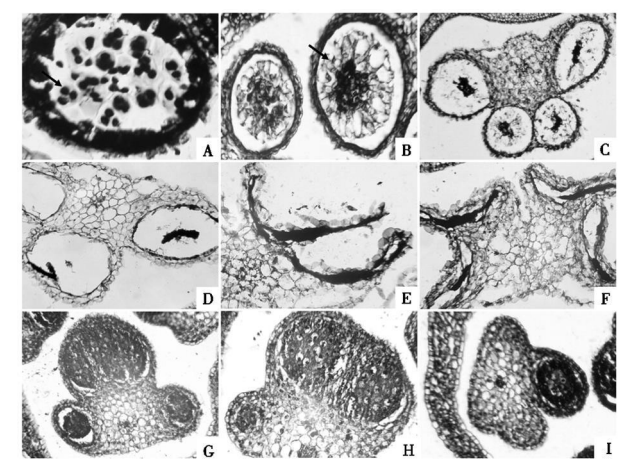
A 造孢细胞时期, 400×; B~ E 花粉母细胞时期, 400×; F G 四分体时期, 400×; H 小孢子单核早期, 400×; I 单核靠边期, 400×; J 二细胞花粉, 400×; K L 成熟花粉, 400×。
A Sporogenous cell stage 400×; B~ E Pollen mother cell stage 400×; F G Tetrads of microspores stage 400×; H Early uninucleate microspore stage 400×; I Late uninucleate microspore stage 400×; J Two-cell stage 400×; K L Mature pollen grain stage 400×.

图 2 保持系 Y3611B花药发育过程
Fig 2 Anther develop process of the maintainer line Y3611B

2.2.2 不育系 Y3611A花药发育的细胞学观察
不育系 Y3611A花药发育过程在四分体时期之前与保持系没有明显差别,造孢细胞能进行有丝分裂产生花粉母细胞,之后减数分裂形成四分体小孢子(图 3-A箭头所示);和保持系相比,中层细胞未发生降解。之后绒毡层细胞形成中央大液泡,细胞核被挤到一角,细胞膨大,凸向药室腔(图 3-B箭头所示),四分体得不到营养供给,停止发育,又由于胼

质壁不能及时降解,小孢子无法释放,被液泡化绒毡层细胞挤为一团(图 3-C D)。最终四分体小孢子连同绒毡层残骸形成染色极深的条状物(图 3-E F)。

正常可育花药均为 4 花粉囊,且发育进程一致,而观察不育系 Y3611 A 花药发育过程发现,存在花粉囊数目的变异(图 3-G H I)并且发育时期不同步,还有巨型花粉囊的现象(图 3-G H)。



A 四分体时期, 400 \times ; B C 绒毡层细胞液泡化, 400 \times ; D~F 液泡化绒毡层细胞挤压小孢子, 导致败育, 形成染色很深的团块状物, 400 \times ; G~I 花粉囊数目变异和巨型花粉囊, 400 \times 。
A Tetrads of microspores stage 400 \times ; B C Tapetum's vacuole changing 400 \times ; D~F Vacuole changing tapetum cell squeeze tetrad microspore and result in fail development 400 \times ; G~I Variation of clinandrium numbers of and huge clinandrium 400 \times 。

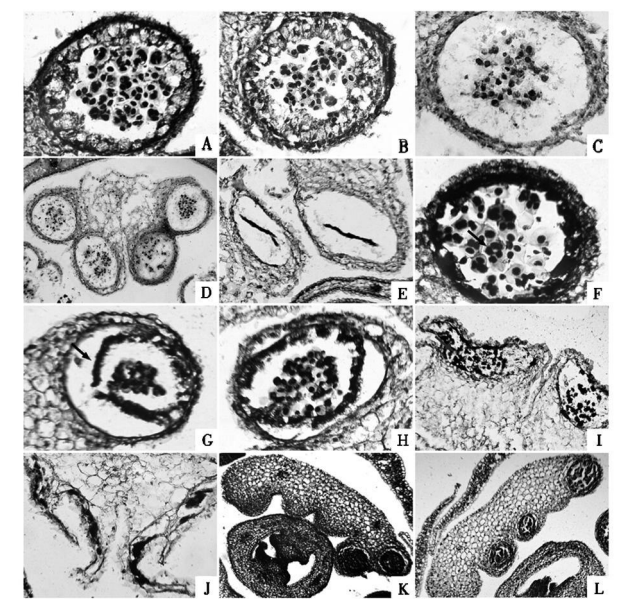
图 3 不育系 Y3611 A 花药发育过程

Fig 3 Anther develop process of the male sterile line Y3611 A

2.2.3 不育系 S2108 A 花药发育的细胞学观察 不育系 S2108 A 花药发育过程在四分体时期之前与保持系也没有明显差别,到四分体时期之后,存在两个不同的败育方式,一种和 Y3611 A 的相似,绒毡层细胞液泡化膨大挤压四分体小孢子,最终导致小孢子败育(图 4-A-E)。另一种败育形式,在四分体时期绒毡层未发生液泡化,初期停在原位(图 4-F 箭头所示),绒毡层细胞能保持原有的形状,细胞壁清晰,内容物很少,表明细胞的降解早已开始,此时的四分体也发生了退化;有的药室中绒毡层细胞壁发生融合,成为紧贴药室壁的周原质团,部分细胞质流入药室腔(图 4-G H 箭头所示),随后四分体连同变形的绒毡层细胞内容物逐渐融合,成为染色很深的不连续团块状物(图 4-I 箭头所示),最终在花粉囊壁加压下成一团(图 4-J),花药败育。对两种不同败育方式的细胞切片进行统计发现,总共 54 张切片中,第一种败育形式的有 38 张,第二种败育形式为 14 张,两者之比约为 3:1。

不育系 S2108 A 花药发育也存在异常,少数花

药粘连在一起,也可能是多花粉囊现象(图 4-K L),且同一花药不同花粉囊发育时期不同步。



A B 四分体时期, 绒毡层细胞液泡化, 400 \times ; C~E 液泡化绒毡层细胞挤压小孢子最终导致败育, 400 \times ; F 四分体时期, 绒毡层未发生液泡化, 400 \times ; G~J 绒毡层细胞壁融合成为周原质团,脱离药室内壁包围四分体和小孢子,导致败育, 400 \times ; K, L 花药的多花粉囊变异, 400 \times 。

A B Tetrads of microspores stage tapetum's vacuole changing 400 \times ; C~E Vacuole changing tapetum cell squeeze tetrad microspore and result in fail development 400 \times ; F Tetrads of microspores stage tapetum's not vacuole changing 400 \times ; G~J Tapetum cell wall occur amalgamation into as amoeboid tapetum wrap and conglutinate tetrad microspore result in fail development 400 \times ; K~L Variation of clinandrium numbers of the anthers 400 \times 。

图 4 不育系 S2108 A 花药发育过程

Fig 4 Anther develop process of the male sterile line S2108 A

3 讨论

正常的花药发育过程一般分为:造孢细胞时期、花粉母细胞时期、二至四分体时期、单核花粉粒时期和成熟花粉粒 5 个时期。对保持系 Y3611 B 花药发育过程的观察,发现了这几个时期的不同特征,也验证了这一结论。对雄性不育花药的组织学和细胞学进行研究时发现绒毡层发育异常非常普遍^[5],多数植物不育系花药败育与花粉的哺育组织绒毡层细胞有关。这种绒毡层异常主要表现在绒毡层细胞膨大或液泡化^[6]、绒毡层提前解体^[7]和延迟解体或者不解体^[8]。本研究中,在两个不育系 S2108 A 和 Y3611 A 中都观察到绒毡层细胞膨大和液泡化现象,此外,不育系 Y3611 A 的绒毡层延迟解体,绒毡层细胞的细胞壁分解,细胞质连成一体,形成的周原质团直到小孢子败育晚期还在药室内壁上留有残余。这种导致小孢子败育方式在不结球白菜上未见报道,以前研究只发现存在绒毡层细胞膨大或液泡

化现象。

花药的中层通常由 1~3 层细胞组成，一般含有淀粉和其他贮藏物。在花粉母细胞的减数分裂时期，中层细胞贮藏物减少，细胞变为扁平，然后趋于解体 and 被吸收，为四分体发育提供营养。从本试验的结果来看，两个不育系 S2108A 和 Y3611A 的中层细胞在四分体时期无解体和变薄的现象，一直保持完整，可能是与绒毡层细胞异常发育有关，由于绒毡层细胞膨大和液泡化，不消耗中层细胞营养的结果，这与在甜椒^[9]和辣椒^[10]雄性不育研究中类似。

前人对植物雄性不育细胞学观察发现雄性不育的败育时期发生在自造孢细胞期至单核小孢子期的各个时期，而 Osgura CMS 败育发生在四分体至单核小孢子期，由于绒毡层的液泡化和径向膨大挤压四分体小孢子导致败育^[11]。对不育系 S2108A 和 Y3611A 的花药细胞观察也发现这种败育方式，时期也是在四分体时期开始，在单核小孢子期之前已经败育。然而，S2108A 与 Y3611A 相比还存在第二种败育形式，即绒毡层细胞壁融合，释放出周原质团，部分流入药室腔，包裹粘连四分体小孢子，导致败育，败育也从四分体时期开始。这种败育方式在大白菜雄性不育^[12]及水稻雄性不育^[13]中有过报道。不育系 Y3611A 只发现一种败育情况，两个不育系 S2108A 和 Y3611A 间存在败育表现差异，是否与两者之间碱基差异有关，还需要进一步验证。

在保持系 S2108A 花药中观察到的花粉囊数目均为 4 个，为正常数目，而在不育系 S2108A 与 Y3611A 中存在花粉囊数目变异，1~6 个不等，不育系 Y3611A 中看到的巨型花粉囊也是一种花粉囊数目变异形式，一般是 3 花粉囊，这种多花粉囊现象在结球白菜^[14]和甘蓝型油菜^[15]的雄性不育中曾有报道。

参考文献:

[1] Lasser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms [J].

Botanical Review 1972 38 427—454

[2] Gottschalk W, Kau M L H. The genetic control of microsporogenesis in higher plants [J]. Nucleus 1974 17: 133—166

[3] 刘忠松, 官春云, 陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000

[4] 李正理. 植物组织制片学 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1989

[5] Kau M L H. Male sterility in higher plants [M]. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 1988

[6] 吴鹤鸣, 余建明, 周开扬, 等. 羊角椒雄性不育系与保持系的细胞学观察 [J]. 江苏农业学报, 1988 4(2): 35—38

[7] 张天真, 陆地棉 1355A 和 104-7A 不育系的细胞学研究 [J]. 棉花学报, 1995 7(2): 73—75

[8] 余凤群, 傅廷栋. 甘蓝型油菜几个雄性不育系花药的细胞形态学研究 [J]. 武汉植物学研究, 1990 8(3): 209—215

[9] 罗双霞, 范妍芹, 申书兴, 等. 甜椒雄性不育两用系小孢子发育的显微观察 [J]. 华北农学报, 2006 21(2): 99—103

[10] 何长征, 刘志敏, 熊兴耀, 等. 辣椒细胞质雄性不育系 9704A 花药发育的细胞学观察 [J]. 园艺学报, 2008 35(4): 521—528

[11] 栗翼玖, 赵双宜, 张燕君, 等. 萝卜雄性不育系小孢子发生的细胞形态学研究 [J]. 园艺学报, 1995 22(4): 348—352

[12] 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): 409—414

[13] 王 台, 童 哲. 光周期敏感核不育水稻 58S 不育花药的显微结构变化 [J]. 作物学报, 1992 18(2): 132—135

[14] 梁 燕, 王 鸣, 赵稚雅. 结球白菜细胞质雄性不育系花药和花粉的发育 [J]. 西北农业大学学报, 1994 22(3): 19—23

[15] 张英涛, 杨海东, 陈朱希昭. 绒毡层研究进展 [J]. 植物学通报, 1996 13(4): 6—13