

大白菜新型细胞质雄性不育系 6w-9605A 的育性鉴定和花药败育的细胞学观察

施展¹, 万正杰^{1*}, 徐跃进¹, 邹瑞昌¹, 黄涛³, 傅廷栋²

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 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; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; 3. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 采用石蜡切片技术, 研究了大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 细胞质雄性不育系 6w-9605A 及其保持系 6w-9605B 的花药发育过程的细胞形态学特征, 确定不育系花药败育时期及方式, 并对不育系 6w-9605A 进行花器官观察和育性鉴定。结果表明: 保持系 6w-9605B 花药发育正常; 不育系 6w-9605A 花药发育受阻于孢原分化时期, 占总败育花药的 66.7%, 不形成花粉囊和花粉粒, 属于无花粉囊型败育; 另外 33.3% 的败育花药可形成花粉囊, 小孢子均受阻于单核靠边期或者二胞期, 败育特点为绒毡层细胞异常肥大, 挤压小孢子, 导致小孢子和绒毡层解体; 6w-9605A 的不育性稳定、彻底, 不育株率和不育度均为 100%。

关键词: 大白菜; 细胞质雄性不育系; 花药发育; 小孢子

中图分类号: S634.1; S603.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)01-0049-06

Fertility and Cytomorphology of Anthers in New Cytoplasmic Male-Sterile Lines of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)

SHI Zhan¹, WAN Zheng-Jie^{1*}, XU Yue-Jin¹, ZOU Rui-Chang¹, HUANG Tao³, FU Ting-Dong²

(1. College of Horticulture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Plant Science and Technology, National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to determine the stage and pattern of anther abortion, anatomical observations of anthers in cytoplasmic male sterile line 6w-9605A and its maintainer line 6w-9605B in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) were made using paraffin sections. Simultaneously, the floral organ and fertility of 6w-9605A were observed. The results showed that the anthers of maintainer line 6w-9605B were normal and the abortion of male sterile line occurred mainly at the differentiation stage of archesporial cells, which accounted for 66.7% of anther abortion and resulted in no pollen sac differentiation. In the remaining 33.3% of abortion anthers, pollen sacs were produced but the development of microspores stopped at the late uninucleate or dinucleate stages, and the hypertrophic tapetal cells compressed the microspores and caused the sterility of pollen grains. The sterility of 6w-9605A was stable and complete (100%).

Key words: Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*); Cytoplasm male sterile line; Anther development; Microspore

收稿日期: 2011-04-22, 修回日期: 2011-06-22。

基金项目: 农业部 948 项目 (2008-Z26); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2009QC027); 湖北省重点自然科学基金 (2010CBB01703) 资助。

作者简介: 施展 (1987-), 女, 硕士, 主要从事蔬菜遗传育种研究 (E-mail: remembersz@yahoo.com.cn)。

* 通讯作者 (Author for correspondence): 万正杰 (1973-), 男, 副教授, 主要从事蔬菜遗传育种研究。通讯地址: 430070, 华中农业大学园林大楼 509 室 (E-mail: wanzj@mail.hzau.edu.cn)。

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)为十字花科芸薹属白菜种大白菜亚种,是我国重要的蔬菜之一,栽培面积与产量均居首位。大白菜是典型的异花授粉作物,品种或自交系间存在明显的杂种优势,国内外白菜的优良品种大部分为一代杂种。自交不亲和系、雄性不育系是蔬菜杂种优势利用的主要途径,而细胞质雄性不育系的选育和利用是以营养器官为食用产品对象的大白菜等蔬菜杂种优势育种的理想途径^[1]。因此利用新型细胞质雄性不育种质资源,克服不育系细胞质单一的脆弱性问题,是国内外育种工作者研究的重点。

关于十字花科芸薹属作物雄性不育的花药发育细胞学研究,前人在这方面做了很多工作。按花药受阻的时期和方式可将雄性不育系分为无花粉囊型、花粉母细胞败育型和单核花粉败育型3类败育类型^[2]。梁燕等^[3]对结球白菜波里马胞质不育系的花药发育进行细胞学研究,发现其花药发育受阻于孢原时期。杨晓云等^[4]研究不结球白菜波里马胞质雄性不育系花药发育,发现其受阻于孢原细胞分化期,没有孢原细胞分化,没有形成药室,属于无花粉囊型败育。杨光圣^[5]对甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育系宜3A花药发育进行显微结构观察,结果表明败育发生于花粉母细胞阶段,属于花粉母细胞败育型。黄邦全等^[6]研究紫菜薹 *ogu* 细胞质雄性不育系花药发育特点,发现该不育系兼有无花粉囊型和单核败育型的特征。田福发等^[7]通过石蜡切片技术对红菜薹波里马胞质不育系和萝卜胞质雄性不育系进行了细胞学研究,结果发现 *pol* CMS 受阻于孢原细胞阶段,而 *ogu* CMS 花药败育发生于小孢子母细胞时期或四分体时期。

本研究采用的大白菜细胞质雄性不育材料 6w-9605A 是以芥菜细胞质雄性不育 *hau* CMS 为不育源^[8,9],以大白菜 DH 系 6w-9605B 为轮回亲本,通过种间杂交和连续回交,获得遗传稳定的 BC₉。大白菜细胞质雄性不育系 6w-9605A。通过对该不育系的花药发育进行细胞学研究,并结合田间进行育性鉴定,为进一步开展大白菜雄性不育系的杂种优势利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)细胞质雄性不育系 6w-9605A 和大白菜保持系 6w-9605B。6w-9605A 是芥菜型油菜细胞质雄性不育系 *hau* CMS 与大白菜保持系 6w-9605B 经过种间杂交和连续回交 8 代获得的,由国家蔬菜改良中心华中分中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 田间育性鉴定

2009–2010 年于大白菜细胞质雄性不育系 6w-9605A 盛花期调查其不育株率和花器官形态;选 300 个单株套袋自交,收获时考察结荚率和不育度。育性分级标准采用柯桂兰^[10]的方法。

1.2.2 石蜡切片

于植株盛花期上午 8:00–9:00 取不育系 6w-9605A 和保持系 6w-9605B 主茎顶端整个总状花序,按花蕾的着生顺序分类。不育系 6w-9605A 和保持系 6w-9605B 总状花序各 5 个(约 260 个花蕾),观察花蕾数不育系 6w-9605A 为 160 个,保持系 6w-9605B 为 30 个。

常规石蜡切片程序制片:卡诺固定液固定 24 h, 70% 酒精保存。抽真空、爱氏苏木精整体染色、逐级酒精脱水、逐级氯仿透明、浸蜡、石蜡包埋,花蕾横切,切片厚度为 10 μ m,蛋清甘油粘片,二甲苯脱蜡,透明,加拿大树胶封片^[11]。Olympus CX41 显微镜观察, Mshot MD30 摄影。

2 结果与分析

2.1 大白菜不育系 6w-9605A 花器官形态观察及不育性鉴定

通过对大白菜不育系、保持系以及原始芥菜不育系的花器官观察,发现大白菜不育系花器官开放正常,花器官大小、颜色以及雌蕊等方面均与保持系比较接近,只是不育系花药干瘪,无花粉;保持系的雄蕊上花药饱满,有很多淡黄色的花粉(图版 II: G, H);而原始芥菜不育系花器官比两种大白菜的稍小,花瓣较细,雄蕊退化成花瓣状(图版 II: I)。

2009 年 3 月和 2010 年 3 月在武汉对大白菜不

育系 6w-9605A 的 300 个单株进行了不育株的调查,同时对 3000 朵花套袋自交,收获期进行了结莢率统计。结果表明不育系 6w-9605A 的不育株率为 100%,不育度为 100%,育性级别为 0 级(表 1)。

2.2 大白菜保持系 6w-9605B 的花药发育

大白菜保持系 6w-9605B 雄蕊发育正常,花药呈典型的蝶形(图版 I: H)。未成熟花药花粉囊壁由表皮、药室内壁、中层和绒毡层组成,绒毡层细胞长轴与花粉囊壁垂直,排列整齐(图版 I: A)。减数分裂结束后形成四分体,四分体为四面体形排列(图版 I: B)。随着花药的发育,小孢子从四分体中分离出来,呈圆球状,细胞核位于中央,胞质浓厚(图版 I: C)。之后单核花粉粒细胞体积增大,细胞质液泡化,中央形成一个大液泡,细胞核移向一侧,为单核靠边期(图版 I: D)。单胞花粉经一次有丝分裂形成小生殖核和大营养核,即二核花粉粒(图版 I: E, F),接着生殖细胞又经过一次有丝分裂,形成 2 个精细胞后为成熟花粉粒,即三核花粉粒(图版 I: G)。此时花粉囊壁中层和绒毡层已全部解体,药室内壁纤维化成纤维层,相邻花粉囊的隔壁解体破裂,为花粉的散出打开了通道(图版 I: H)。

2.3 大白菜不育系 6w-9605A 的花药败育过程

大白菜细胞质雄性不育系 6w-9605A 除雄蕊外,其他组织发育正常,雄蕊明显低于柱头,花药干瘪,呈典型败育形态(图版 II: G)。6w-9605A 花药败育主要有两种方式,一种是花药发育受阻于孢原细胞分化期,产生孢原细胞,即花药外侧的一层细胞(图版 II: A,黑箭头所示);内侧孢原细胞不进一步分化成周缘细胞和初生造孢细胞,只形成相同形态的薄壁细胞(图版 II: A,红箭头所示);也有个别花药有孢原细胞的分化,形成周缘细胞和初生造孢细胞,仍在花药一隅形成,但不能形成花粉囊和花粉。这些都属于无花粉囊型败育(图版 II: B)。另一种是花药分化出药室,但一个花蕾里 6 个花药只有个

别分化出 1~2 个花粉囊(图版 II: C)。药室中有花粉母细胞减数分裂形成的四分体(图版 II: D)。单核花粉粒从四分体中释放出来后绒毡层细胞径向膨大变形,并侵占药室挤压小孢子(图版 II: E),之后小孢子高度液泡化变形解体(图版 II: F)。本研究对 30 个花蕾进行败育统计,发现 66.7% 的花蕾中雄蕊没有药室的分化,无花粉囊,花药表皮内为无形态差异的薄壁细胞,属于无花粉囊型败育;33.3% 的花蕾中个别雄蕊形成 1~2 个花粉囊,药室内花粉母细胞也能完成减数分裂。但随后绒毡层生长异常,导致花粉在单核靠边期至二胞花粉期解体,雄蕊败育。

3 讨论

3.1 保持系 6w-9605B 的花药发育特点

本研究对保持系 6w-9605B 的花药发育进行了显微观察,保持系花药发育与前人研究一致^[12]。余凤群^[13]对多个甘蓝型油菜品种的花药进行细胞学研究,并将花药的发育分为 5 个时期:造孢细胞时期、花粉母细胞分裂至四分体形成时期、单胞花粉期、二胞花粉期和三胞花粉期。保持系 6w-9605B 的花药发育正常,其二胞花粉期的花粉粒细胞壁层加厚,出现网纹结构(图版 I: F)。

3.2 大白菜细胞质雄性不育系 6w-9605A 的花药发育及不育性鉴定的解析

对芸薹属作物细胞质雄性不育的花药发育,前人做了很多研究,发现花粉败育的时期和方式都是不同的。在生产上有重要利用价值的 *pol* 胞质不育系、*ogu* 胞质不育系、*nap* 胞质不育系等的花药败育都已进行了细胞学研究。*pol* 胞质不育系的花药发育受阻于孢原细胞分化期,没有形成花粉囊;*ogu* 胞质不育系的花药发育受阻于四分体至单核花粉时期,小孢子难以从四分体中释放出来^[13];而 *nap* 胞质不育系则是由于花药彼此粘连、花粉延迟发育而

表 1 大白菜细胞质雄性不育系 6w-9605A 的不育度和不育株率的调查

Table 1 The identification of the ‘sterility degree’ and ‘sterility rate’ of 6w-9605A (*Brassica campestris*)

材料名称 Accession of materials	总单株数 Total plants	可育株 Fertile plants	不育株 Sterile plants	套袋小花数 Flowers bagged	角果数 Silique numbers covered	不育株率(%) Sterility rate	不育度(%) Sterility degree
6w-9605A	300	0	300	—	—	100	—
6w-9605A	300	0	300	3000	0	—	100

导致不育^[14]。综合来看,不育系花药败育在每一个发育阶段都有可能发生,败育的高峰期是小孢子四分体至单核花粉期。本研究材料 6w-9605A 是通过芥菜型油菜细胞质雄性不育系 *hau* CMS (AABB) 与大白菜 DH 系 6w-9605B (AA) 远缘杂交选育而成的新型大白菜细胞质雄性不育系,6w-9605A 的主要败育时期为孢原细胞分化期,没有造孢细胞和壁细胞的分化,属于无花粉囊型,这与 *pol* 胞质不育系败育方式类似。同时观察结果也发现转育后获得的 6w-9605A 败育时期与 *hau* CMS 不同,6w-9605A 的败育时期推迟,败育时期主要在孢原细胞分化期,且都有花药形态的分化,部分花药还有花粉囊的形成,只是后期败育了,而 *hau* CMS 花药败育发生在雄蕊原基分化期,典型特征是雄蕊原基偏离正常的分化轨道,形成花瓣原基,无孢原细胞及花粉囊的形成,6 枚雄蕊发育成小花瓣^[8]。说明芥菜与白菜远缘杂交后,*hau* CMS 胞质的败育时期在不同的核背景下发生了变化,可能回交转育过程中发生核置换,新的细胞核基因对不育细胞质基因的调控作用对花药的发育产生影响,这与王涛涛等^[15]的研究结果一致,目前其原因及机理正在研究中。

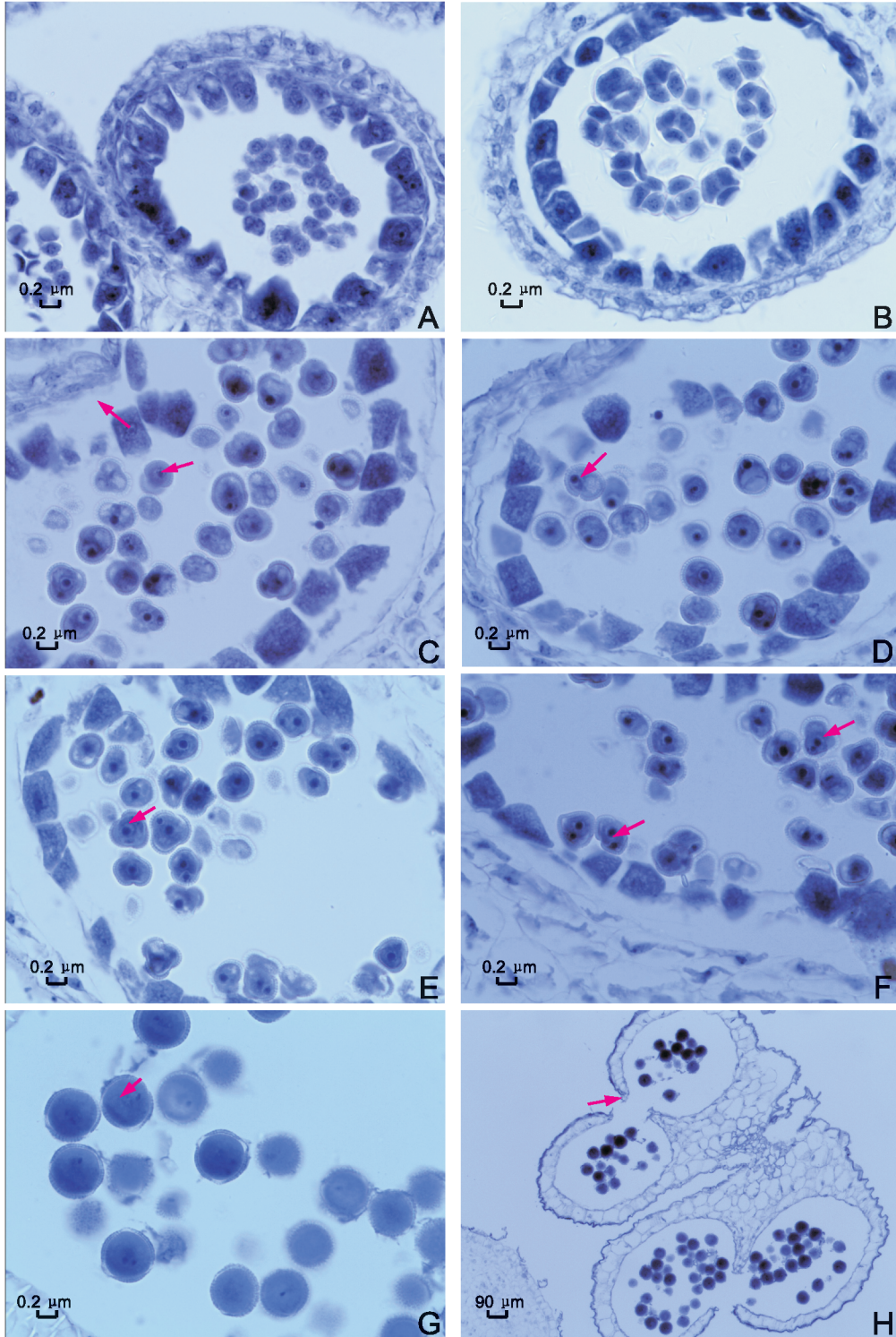
不育系 6w-9605A 的细胞学研究结果与田间不育性鉴定结果一致,其不育性稳定,不育度和不育株率均为 100%;花器官特点表现稍有不同,原始芥菜的花瓣细小,柱头明显高于花瓣;6w-9605A 的花瓣明显大于原始芥菜花瓣,柱头略高于花瓣,两不育系蜜腺均正常。可以作为大白菜细胞质雄性不育系的种质资源,从而进一步加以利用。

参考文献:

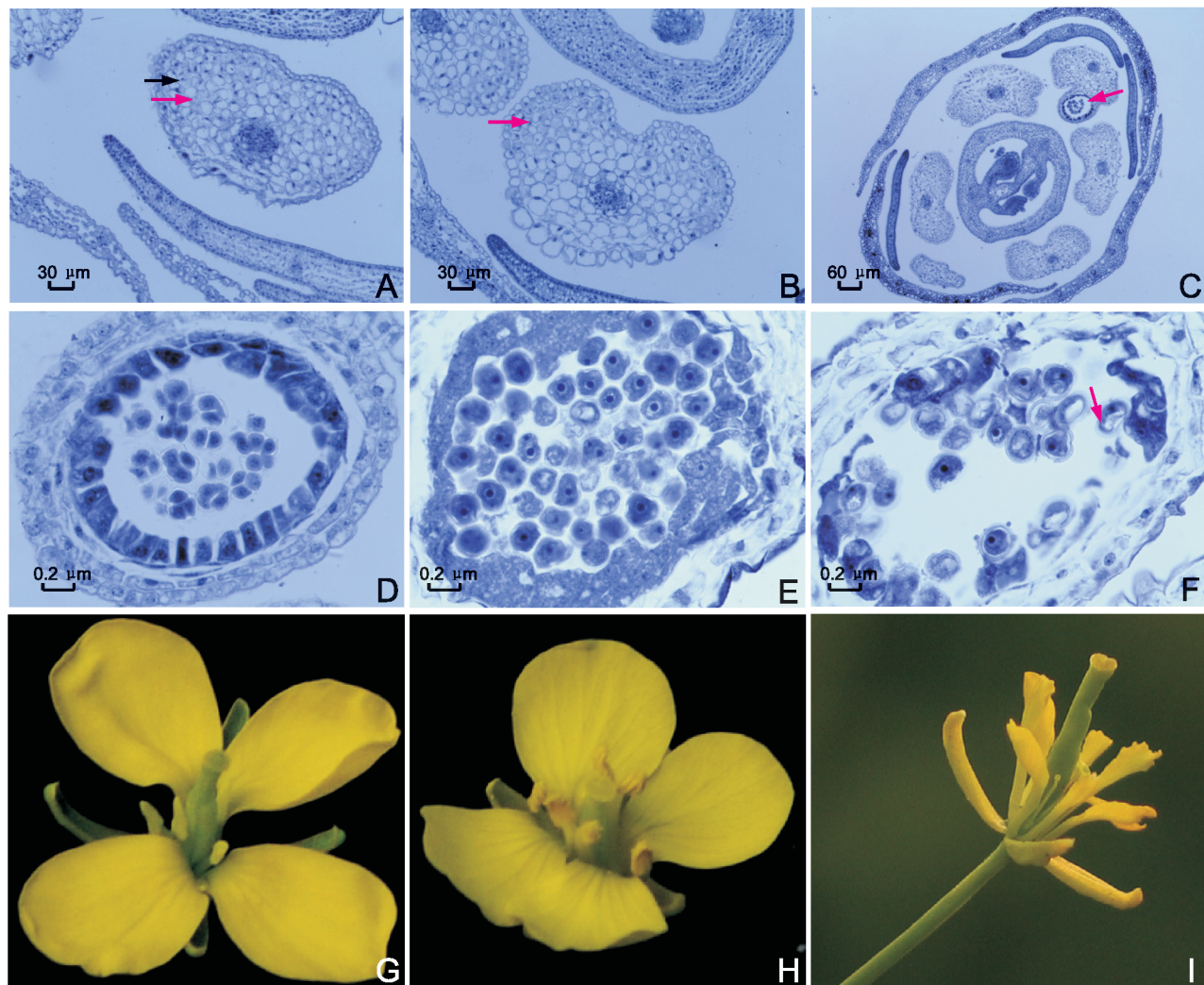
- [1] 张德双. 大白菜 CMS 96 细胞质雄性不育的分子特性及育种应用研究[D]. 北京:中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 2006.
- [2] 余凤群,傅廷栋. 甘蓝型油菜几个雄性不育系花药发育的细胞形态学研究[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8 (3): 209-210.
- [3] 梁燕,王鸣. 结球白菜细胞质雄性不育系花药和花粉的发育[J]. 西北农业大学学报, 1994, 22 (3): 19-23.
- [4] 杨晓云,曹寿椿. 不结球白菜波里马胞质雄性不育系花药发育的细胞形态学研究[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20 (3): 36-43.
- [5] 杨光圣,瞿波,傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育系宜 3A 花药发育的解剖学研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18 (5): 405-406.
- [6] 黄邦全,常玲,陈建国,夏益冰. 紫菜苔 *Ogura* 细胞质雄性不育系花药发育的细胞形态学研究[J]. 湖北大学学报, 2001, 23 (3): 273-275.
- [7] 田福发,徐跃进,袁黎,陈建军. 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, 22 (3): 270-271.
- [8] 万正杰,王显军,傅廷栋,涂金星. 芥菜型油菜细胞质雄性不育系 6-102A 的细胞学观察[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28 (3): 268-271.
- [9] Wan Z J, Bing J, Fu T D, Tu J X, Ma C Z, Shen J X, Yi B, Wen J, Huang T. Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (*hau*) in *Brassica juncea* and its transfer to *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 116 (3): 355-362.
- [10] 柯桂兰,张鲁刚. 大白菜异源胞质雄性不育恢保关系的研究[J]. 西北农业学报, 1993, 2 (1): 15-20.
- [11] 李和平. 植物显微技术[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 2009: 40-42.
- [12] 叶纨芝,曹家树,余小林,崔辉梅,黄鹂,向珣,陶甦. 白菜细胞核雄性不育两用系的细胞学观察[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26: 516-522.
- [13] 余凤群,傅廷栋. 甘蓝型油菜几个品种花药发育的细胞学研究[J]. 中国油料作物学报, 1988, 4: 23-24.
- [14] Grant I, Beversdorf W D, Peterson R L. A comparative light and electron microscopic study of microspore and tapetal development in male fertile and cytoplasmic male fertile and cytoplasmic male sterile oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. *Can J Bot*, 1986, 64 (5): 1055-1068.
- [15] 王涛涛,蔡晓峰,张俊红,李汉霞,叶志彪. 芥菜型油菜雄性不育系与甘蓝远缘杂交胚培养及早代育性鉴定[J]. 园艺学报, 2010, 37 (10): 1661-1666.

施 展等：图版 I

SHI Zhan *et al.* : Plate I



保持系 6w-9605B 花药的发育过程。A. 花粉母细胞时期；B. 花粉母细胞减数分裂完成，形成四分体；C. 四分体分离，进入花粉单核期，红色箭头为单核早期小孢子；D. 单核靠边期，即单核花粉粒晚期，红色箭头为单核晚期小孢子；E. 二核花粉期，红色箭头为二核花粉粒；F. 二胞花粉粒，网纹结构，红色箭头所示；G. 三胞期，红色箭头为三核花粉粒；H. 花粉粒成熟期，花粉囊隔壁破裂，红色箭头所示。
Developmental process of anthers of male-sterile line's. A. Early period of pollen mother cell; B. Period of pollen at the stage of tetrad ; C. Period of pollen at the stage of mono-nucleus, the red arrows for early mononuclear stage of microsporogenesis; D. Period of pollen at the stage of side-nucleus, the red arrows for later mononuclear stage of microsporogenesis; E. Period of pollen at the stage equal to two-nucleate pollen, the red arrows for 2-nucleate pollen; F. Two-celled pollen, textured structure, as shown at the arrow; G. Three-celled pollen, as shown at the arrow; H. Mature pollen, the pollen sac wall busted, as shown at the arrow.



不育系 6w-9605A 花药败育过程。 A. 花药横切, 孢原细胞时期, 黑色箭头为孢原细胞, 红色箭头为薄壁细胞; B. 造孢细胞时期, 示分化出 2 个角隅, 红色箭头为初生造孢细胞; C. 花药横切, 6 个花药中仅 1 个分化出 1 个花粉囊, 红色箭头所示; D. 四分体时期; E. 单核花粉粒时期和二胞期, 示绒毡层膨大变形; F. 花粉粒开始解体, 红色箭头为液泡化的小孢子细胞; G. 白菜细胞质雄性不育系花器官形态, 花瓣发育完全, 雄蕊不育, 花药干瘪; H. 白菜保持系花器官形态, 雄蕊发育正常; I. 芥菜型油菜细胞质雄性不育系花器官形态, 雄蕊退化为小花瓣。

Developmental process of anthers of sterility line's. A. Cross section, the period of archesporial cell, the black arrows for archesporial cell, the red arrows for parenchyma cell; B. Period of sporogenous cell, differentiating two suduts, the red arrows for primary sporogenous cell; C. Cross section, one of six anthers differentiating pollen sac, as shown at the arrow; D. Period of tetrad; E. Monocaryotic phase and two-celled pollen; F. Microspores were disintegrating, the red arrows for the small vacuole of spores; G. Flower organ morphology of cytoplasmic male sterile line in Chinese cabbage, the development of petal was normal but the pollen was abortion; H. Flower organ morphology of maintainer line in Chinese cabbage, the development of male flower was normal; I. Flower organ morphology of cytoplasmic male sterile line in *Brassica juncea*, stamens have degenerated into small petals.

(责任编辑: 王豫鄂)