

# 不结球白菜雄性不育系及其保持系花药发育的细胞学观察

朱红芳<sup>1,2,3</sup>, 侯瑞贤<sup>1,2</sup>, 李晓锋<sup>1,2</sup>, 朱玉英<sup>1,2\*</sup>, 侯喜林<sup>3</sup>

(1. 上海市农业科学院园艺研究所, 上海 201106; 2. 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106;

3. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘 要:** 以不结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 雄性不育系及其保持系为试验材料, 选择不同发育阶段的花蕾, 取其花药, 制成石蜡切片和超薄切片, 经染色后在电子显微镜下观察。结果表明, 不结球白菜雄性不育系与保持系的花药发育有明显的不同: 不育系花药发育受阻于花粉母细胞分化期, 形成 1~3 个药室, 并形成正常的四分体小孢子, 此时细胞组织逐步解体, 形成空腔花药; 最后向内皱缩; 保持系花粉母细胞能形成正常的四分体, 进而形成小孢子, 最终形成充满正常花粉粒的花药。

**关键词:** 不结球白菜; 雄性不育; 花药发育; 石蜡切片

**中图分类号:** Q942; S634.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 2095-0837(2011)02-0183-05

## Cytological Observation of Anther Development between the Male Sterile Line and Its Maintainer Line in Non-heading Chinese Cabbage

ZHU Hong-Fang<sup>1,2,3</sup>, HOU Rui-Xian<sup>1,2</sup>, LI Xiao-Feng<sup>1,2</sup>, ZHU Yu-Ying<sup>1,2\*</sup>, HOU Xi-Lin<sup>3</sup>

(1. Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201106, China; 2. Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201106, China; 3. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Buds selected at different developmental stages of a new germplasm sterile male of non-heading Chinese cabbage and its maintainer lines were studied. Anthers were collected, made into paraffin sections, stained, and observed by electron microscopy. Results show that non-heading Chinese cabbage sterile male lines and maintainer lines exhibited quite different anther development. Male sterile lines in relation to anther development were inhibited at the stage of archesporial cell, produced only 1–3 anther sacs, and formed normal sporogenous cells. The cells gradually disintegrated, formed cavity, and finally shrunk inward. The maintainer archesporial cells formed normal anther sacs, formed sporogenous cell, and ultimately formed anthers with normal pollen.

**Key words:** Non-heading Chinese cabbage; Male sterile lines; Anther development; Paraffin

不结球白菜, 学名白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino), 又称小白菜、青菜、油菜等。原产中国, 是我国南方地区普遍栽培的主要蔬菜之一, 在蔬菜周年供应中起重要作用。不结球白菜为十字花科芸薹属异花授粉作物, 杂交优势十分显著, 杂交种的选育已成为主要育种方法。而利用雄性不育系选育杂交种是解决人工去雄最为经济、有效的途径。从细胞学观察植物雄性不育发生过

程, 是更有效、更直观地了解和认清植物雄性不育的可靠方法之一。国内学者对不结球白菜四倍体雄性胞质不育及青花菜不育系花药进行过细胞学研究<sup>[1,2]</sup>, 但是对于二倍体不结球白菜不育花药的细胞学研究目前尚未见报道。本文通过细胞学的观察研究, 比较了新育成的不结球白菜雄性不育新种质 P70-203 及其保持系花药的发育过程, 旨在为该不育新种质的进一步利用提供一定的理论依据。

收稿日期: 2010-06-29, 修回日期: 2010-09-19。

基金项目: 上海科技攻关项目 (06DZ19103, 09391911400); 上海绿叶蔬菜产业技术体系专项资助。

作者简介: 朱红芳 (1980-), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事青菜遗传育种工作 (E-mail: zhf334480@126.com)。

\* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: yy5@saas.sh.cn)。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料是利用本单位发现的不结球白菜雄性不育源,经多年选育而成的100%雄性不育的不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino)不育系P70-203,其保持系为P60-27-1。田间试验在上海市农业科学院蔬菜试验地进行,2007年10月中旬于温室育苗,12月上旬定植于塑料大棚,田间常规管理。

### 1.2 方法

于2008年3月初不结球白菜雄性不育系和保持系植株现蕾抽薹中期,在晴天上午取不育系及其保持系主花序上处于生长不同时期(即大小不同)的花蕾,立即固定于卡诺固定液,24 h后用各级酒精脱水,二甲苯透明,取不同大小的花蕾采用常规石蜡切片程序包埋,制成厚度为10  $\mu\text{m}$ 的连续切片,铁矾苏木精染色,中性树胶干燥封片。在Leica DM 1000显微镜上观察并拍照记录<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 保持系和不育系的外形特征

保持系P60-27-1花蕾卵圆形、较圆润,雄蕊发育正常,花药大而饱满,其中充满花粉粒,而不育系P70-203花蕾虽也为卵圆形、但较瘦长外,且在开花时花器形态结构也有较大的不同,雄蕊高度退化,花药短小呈丝状结构且不含花粉粒。

### 2.2 保持系花药发育的细胞学观察

保持系的一个花药分化成4个药室,各药室左右对称,中间的维管束通过药隔将其相连成蝶状(图版I:1)。

在显微镜下可以看到,保持系幼小花药横切面的最外层是表皮,紧靠表皮内有几个较大的细胞是孢原细胞。孢原细胞平周分裂向外侧形成初生壁细胞,向内侧形成初生造孢细胞(图版I:1,2)。初生壁细胞经平周分裂和垂周分裂形成花药内壁、中层和绒毡层。初生造孢细胞进行几次分裂产生小孢子母细胞(图版I:4)。

保持系的花药在小孢子母细胞分化初期,其细胞排列紧密、体积较大,细胞核也较大,细胞质浓,其外围则是绒毡层、中层、药室内壁及表皮(图版I:4)。当小孢子母细胞进行减数分裂时,绒毡层细胞

发育成熟,可以明显看到单核靠边时期(图版I:6),而后呈双核(图版I:7)和三核(图版I:8),细胞质浓,染色较深。然后随着小孢子母细胞的分化,绒毡层细胞出现退化现象、细胞分离,逐步解体。

小孢子母细胞减数分裂后形成四分体(图版I:5),四周和每个小孢子之间由胼胝质包围。以后胼胝质壁溶解,4个小孢子彼此分开,释放到药室中(图版I:9),小孢子不断增大,呈圆形或椭圆形(图版I:10)的花粉粒。此时,绒毡层细胞已完全解体,药室壁只剩下表皮和纤维层。表皮裂开花药进行散粉(图版I:10)。

### 2.3 不育系花药发育的细胞学观察

不育系植株的花药和保持系植株相比,在孢原细胞时期(图版II:1)差别不是很大,花粉母细胞时期开始出现(图版II:5),不育系植株只形成1~3个药室(图版II:2,3,4),且形成的药室的花药壁也同样有4层细胞,小孢子母细胞形状不规则和数量较少。小孢子母细胞进入减数分裂后,也能形成正常的四分体(图版II:6),但是不能正常的释放小孢子,绒毡层细胞一直包围着四分体(图版II:7),出现液泡化(图版II:8),把小孢子母细胞排挤在中间,使其不能继续生长发育形成花粉粒。最后绒毡层细胞解体,整个花药皱缩(图版II:9,10),最后败育(图版II:11)。

## 3 结论与讨论

### 3.1 败育发生的时期和方式

几位专家认为白菜细胞雄性不育系的花药败育的时期发生在花粉母细胞发育的各个时期,但主要还是在小孢子发育过程中<sup>[4-7]</sup>,Laser等<sup>[8]</sup>认为双子叶植物花药败育多在四分体形成之前,油菜细胞雄性不育系的花药败育发生在减数分裂期<sup>[9]</sup>,本试验所用的不结球白菜雄性不育材料,在孢原细胞分化初期与其保持系基本相同,可清楚地看到孢原细胞。造孢细胞在分化初期出现不同,保持系能分化形成蝶形有4个药室,但不育系植株不能形成蝶形只有1~3个药室,这1~3个药室经过减数分裂后也能形成四分体,但是不能正常释放小孢子,以致不能发育成正常的花粉粒。这说明不育系花药的败育,首先发生在造孢细胞分化时期,然后在减数分裂后小孢子的形成时期,最后在小孢子的发育时期。

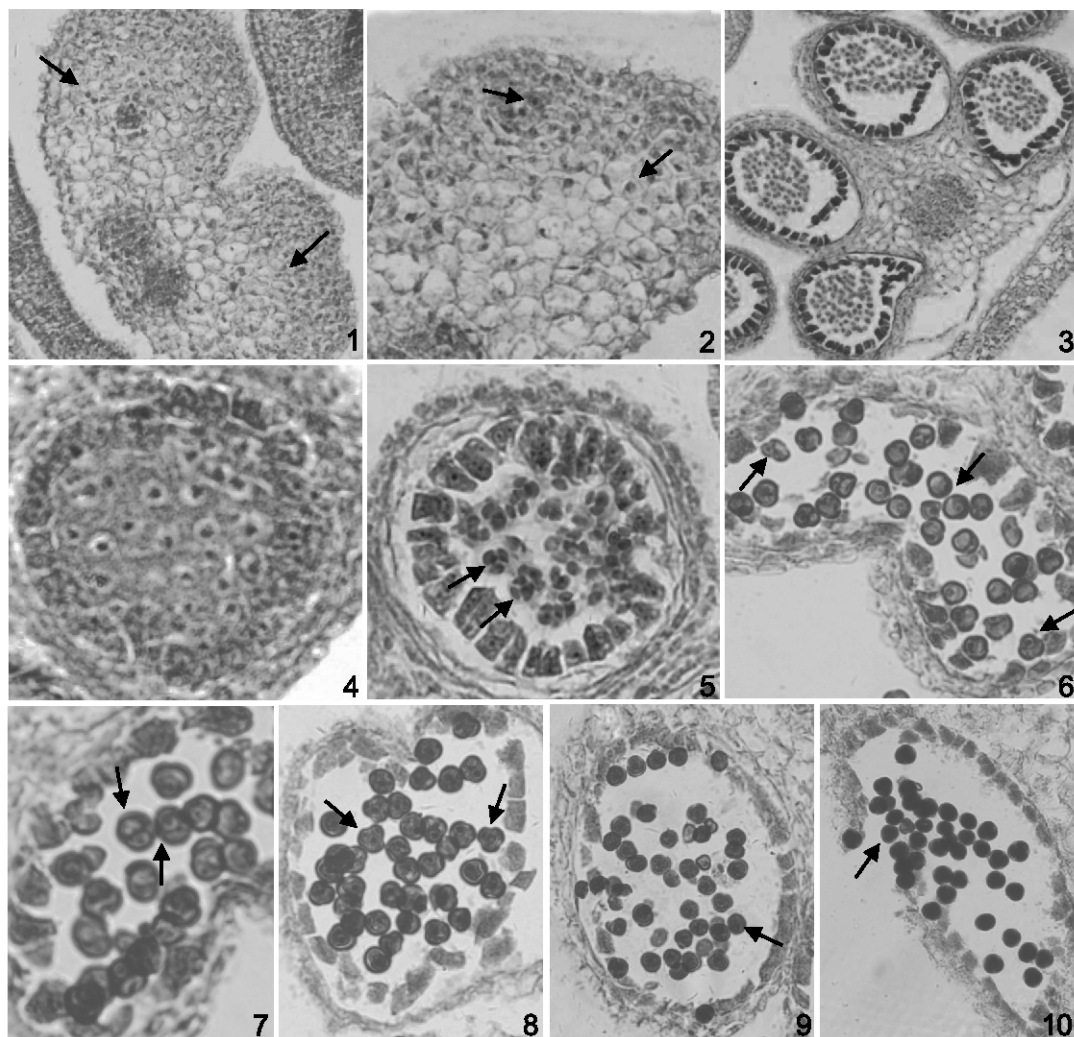
### 3.2 败育发生的可能原因

在前人研究的结论中,都表明花粉的败育和绒毡层的发育异常有密切的关系<sup>[10]</sup>,绒毡层是最靠近花粉母细胞的,花粉母细胞所需营养都是其供给的。绒毡层发生异常,就必然会引起花粉母细胞的发育异常,该实验也发现,伴随着小孢子发育失败的,就是绒毡层细胞的变化,不断膨大,液泡化,使小孢子排挤在中间,失去了营养供给,也抑制了小孢子的生长发育。杨晓云等实验证明,白菜花粉的败育还与物质的转化有关,不过物质的转化与绒毡层的异常有关<sup>[4]</sup>。朱玉英等<sup>[2]</sup>发现萝卜细胞质青花菜雄性不育系花药的败育发生在小孢子母细胞分化过程中,减数分裂受到影响,小孢子形成四分体或随即液泡化解体,这与不育源有关。本实验中不结球白菜雄性不育系的败育也发生在小孢子母细胞分化过程,减数分裂受到一定影响,只形成1~3个药室,部分药室能分化形成四分体,但在小孢子发育过程中,绒毡层的异常也影响了小孢子的发育,不能形成花粉粒。由此可推出,该不结球白菜雄性不育新种质与不育性的来源有关,根据 Ogura<sup>[11]</sup>报道,该不育系花药败育发生在四分体到单核小孢子期;同时绒毡层也是导致其不育的原因之一。

#### 参考文献:

- [1] 汤伟华,张蜀宁,孔艳娥. 不结球白菜同源四倍体 Pol CMS 及其保持系花药发育的解剖学研究[J]. 西北植物学报,2008,28(4): 704-708.
- [2] 朱玉英,龚静,吴晓光,金海军,姚文岳,李式军,吴琴生. 萝卜胞质青花菜雄性不育系花药发育的细胞形态学研究[J]. 上海农业学报,2004,20(3): 42-44.
- [3] 林加涵,魏文林,彭宣宪. 现代生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社;海德堡:施普林格出版社,2000.
- [4] 谢潮添,杨延红,朱学艺,田惠桥. 白菜细胞核雄性不育花药细胞学观察[J]. 实验生物学报,2004,37(4): 296-302.
- [5] 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.
- [6] 冯辉,魏毓棠,许明. 大白菜核基因雄性不育系遗传假说及其验证[C]//韩振海. 中国科协第二届青年学会——园艺学论文集. 北京:北京农业大学出版社,1995: 453-466.
- [7] 王玉刚,冯辉,林桂荣,林桂荣,徐书法,杨昆艳,张乃嘉. 白菜核基因雄性不育系转育研究[J]. 园艺学报,2005,32(4): 628-631.
- [8] Laser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms[J]. *Bot Rev*, 1972, 38(3): 425-454.
- [9] 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): 209-218.
- [10] 韩玉珠,贾长兰,张汉卿. 大白菜细胞质雄性不育系及保持系的花药发育[J]. 吉林农业大学学报,1999,21(1): 52-55.
- [11] Ogura H. Studies on the new mela sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds[J]. *Men Fac Agric Kagoshima Univ*, 1968, 6: 73-78.

朱红芳等: 图版 I

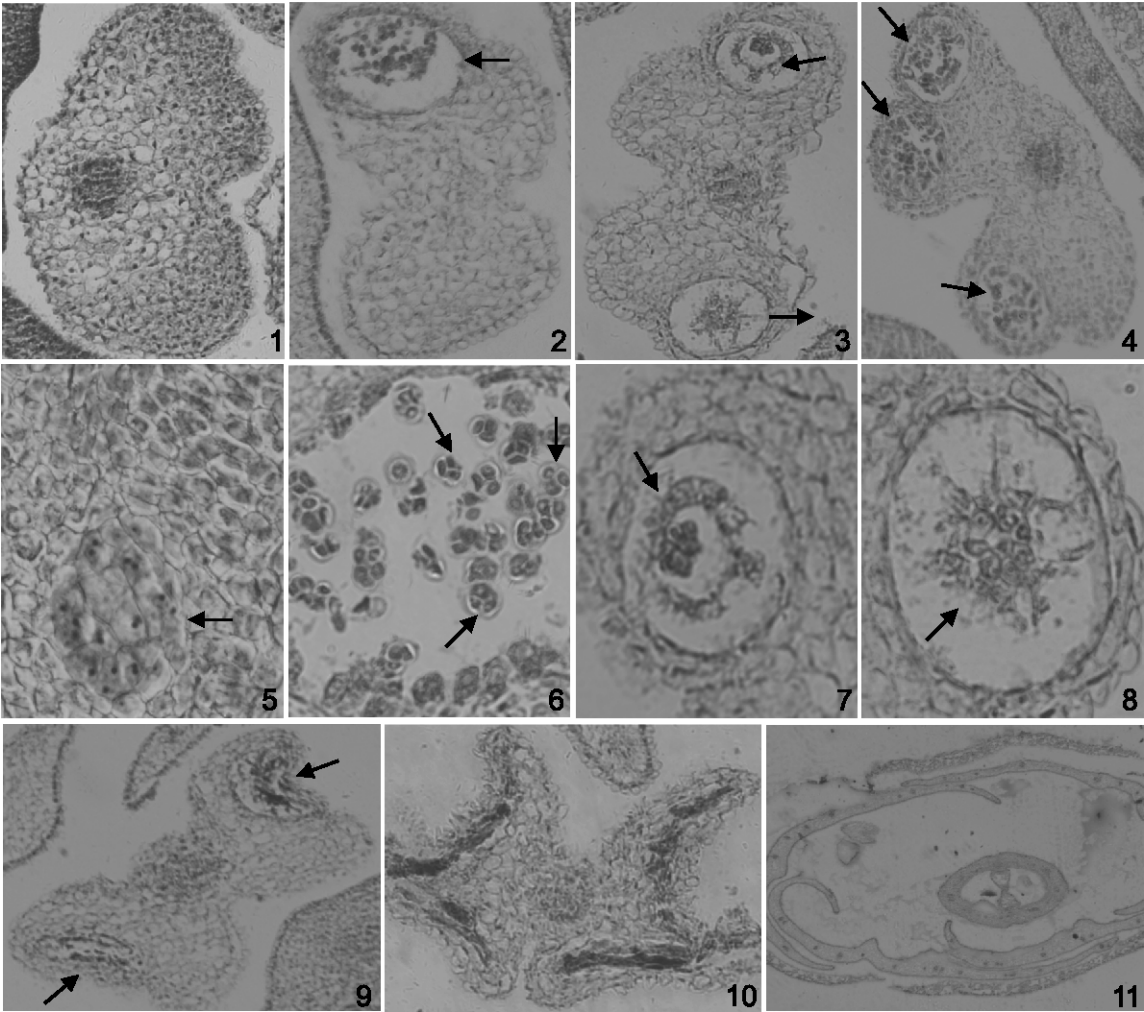
ZHU Hong-Fang *et al.*: Plate I

保持系 P60-27-1 小孢子发育过程。1. 孢原细胞,  $\times 1000$ ; 2. 周缘细胞及初生造孢细胞,  $\times 1000$ ; 3. 花粉母细胞,  $\times 1000$ ; 4. 造孢细胞,  $\times 1000$ ; 5. 减数分裂四分体,  $\times 400$ ; 6. 单核靠边期,  $\times 400$ ; 7. 双核,  $\times 1000$ ; 8. 三核,  $\times 1000$ ; 9. 花粉粒,  $\times 400$ ; 10. 花粉粒散粉,  $\times 400$ 。图中箭头所指处为孢原细胞。

**Development process of microspores for maintainer line P60-27-1.** 1. Sporogenous cells,  $\times 1000$ ; 2. Parietal cell and primary sporogenous cells,  $\times 1000$ ; 3. Pollen mother cells,  $\times 1000$ ; 4. Secondary sporogenous cells,  $\times 1000$ ; 5. Quadrant in meiosis stage,  $\times 400$ ; 6. Period of single-core step aside,  $\times 400$ ; 7. Dual-Core,  $\times 1000$ ; 8. Trinuclear,  $\times 1000$ ; 9. Pollen grains,  $\times 400$ ; 10. Pollen loose powder,  $\times 400$ . Arrow place are sporogenous cells.

朱红芳等：图版 II

ZHU Hong-Fang *et al.*: Plate II



不育系 P70-203 小孢子发育过程。1. 孢原细胞,  $\times 1000$ ; 2. 一个药室的花药,  $\times 400$ ; 3. 二个药室的花药,  $\times 400$ ; 4. 三个药室的花药,  $\times 400$ ; 5. 造孢细胞,  $\times 1000$ ; 6. 异常的小孢子时,  $\times 1000$ ; 7. 绒毡层异常,  $\times 400$ ; 8. 细胞液泡化,  $\times 400$ ; 9. 花粉母细胞皱缩退化,  $\times 400$ ; 10. 皱缩的花药,  $\times 400$ ; 11. 退化了的花药残留组织,  $\times 100$ 。箭头所指处为孢原细胞。

**Development process of microspores for male sterile line P70-203.** 1. Sporogenous cells,  $\times 1000$ ; 2. One anther sac,  $\times 400$ ; 3. Two anther sacs,  $\times 400$ ; 4. Three anther sacs,  $\times 400$ ; 5. Parietal cells,  $\times 1000$ ; 6. Abnormal microspore time,  $\times 1000$ ; 7. Disintegration of tapetal cells,  $\times 400$ ; 8. Cell vacuolization,  $\times 400$ ; 9. Retrogression and disintegration of PMCs,  $\times 400$ ; 10. Shrinkage of the anther,  $\times 400$ ; 11. Retrogressive anther relic,  $\times 100$ . Arrow place are sporogenous cells.

(责任编辑：张 平)