

新型叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 的花药发育特征

邹瑞昌¹ 万正杰¹ 徐跃进¹ 杨文杰¹ 傅廷栋²

1. 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, 武汉 430070;

2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用石蜡切片方法, 对叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 及其保持系 0912B 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。结果表明, 0912A 不育系的败育形式多样, 主要有花药发育受阻于孢原细胞分化期, 无花粉囊的形成; 部分花药在花粉母细胞期至单核小孢子期出现发育异常: 有的花粉母细胞液泡化后浓缩解体, 还有的花粉母细胞因绒毡层细胞径向肥大或液泡化而受挤压解体; 有的花粉母细胞虽能进行减数分裂, 但发育到四分体时期或单核时期细胞解体, 花粉败育。同时对 0912A 的花器官形态进行观察, 发现其雄蕊退化为细丝状, 败育彻底。

关键词 叶用芥菜; 雄性不育; 石蜡切片; 细胞学; 花器官

中图分类号 S 637.202.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0044-06

自交不亲和性及雄性不育性是蔬菜杂种优势利用的重要途径, 其中细胞质雄性不育(CMS)是最为经济、理想的授粉途径之一, 已在大白菜^[1]、萝卜^[2]、甘蓝^[3]等多种蔬菜中得到广泛研究和应用, 细胞质雄性不育已成为十字花科蔬菜杂种优势利用的主要途径。芥菜(*Brassica juncea* Coss, n=18)属十字花科芸薹属蔬菜, 其中叶用芥菜营养丰富, 既可鲜食又可腌制加工, 是深受广大人民喜爱的蔬菜之一。目前生产上仍以常规品种为主, 为提高产量、抗性及改善品质, 急需选育优良的叶用芥菜雄性不育系进行杂交新品种的培育。而目前叶用芥菜雄性不育系的选育和利用的报道较少。金海霞^[4]利用从美国引进的萝卜不育胞质(*ogu* CMS)的新型白菜细胞质雄性不育材料为不育源, 转育成萝卜胞质的叶用芥菜雄性不育系。陈竹君等^[5]通过远缘杂交选育了茎用芥菜细胞质雄性不育系, 之后转育成叶用芥菜雄性不育系并克隆到不育相关基因 *orf220*。

hau CMS 是傅廷栋 1999 年发现的天然芥菜型油菜细胞质雄性不育类型, 万正杰等^[6]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 等油菜胞质不育类型, 是一种全新的油菜细胞质雄性不育类型。但由于目前仍未找到理想的恢复系, 在油菜育种中暂未得到利用。由于蔬菜是以收获营养器官为主, 不需要恢复系, 因此适于十字花科芸薹属蔬菜杂种优势育种^[7]。0912A 是以芥菜型油菜细胞质雄性不育系 *hau* CMS 为不育胞质供体与叶用芥菜(雪里蕻)经 1 次杂交、8 代回交后选育而成的新型叶用芥菜细胞质雄性不育系, 其不育性稳定, 不育株率及不育度均达 100%, 结实正常, 具有较高利用价值。

观察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, 对揭示雄性不育分子机制有重要意义。康俊根^[8]、卢成苗^[2]、田福发等^[9]进行了十字花科蔬菜雄性不育系花药发育的细胞学研究, 本研究以叶用芥菜胞质雄性不育系为材料, 探讨其花药败育时期、形式和特点, 以期为叶用芥菜细胞质雄性不育的杂种优势利用和雄性不育的分子机制研究及发育生物学机制提供理论依据。

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2009QC027, 2011QC082)和湖北省重点自然科学基金项目(2010CBB01703)

邹瑞昌, 硕士研究生。研究方向: 蔬菜遗传育种。E-mail: zouruichang@163.com

通讯作者: 万正杰, 博士, 副教授。研究方向: 蔬菜遗传育种。E-mail: wanzj@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A、保持系 0912B(叶用芥菜雪里蕻),芥菜型油菜细胞质雄性不育型 *hau* CMS(不育源),种植于华中农业大学国家蔬菜改良中心华中分中心基地大棚内。

1.2 方法

于盛花期,在晴日上午 10:00 左右,随机选取不育系及保持系各 15 朵花,游标卡尺测量花冠开展度、花瓣长、花瓣宽、花柱直径、花柱长、雄蕊长等,并对不育花和可育花进行拍照。

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^[10]制作切片:抽真空→爱氏苏木精整体染色→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 不育系和保持系花器官形态

显微观察显示:不育源芥菜型油菜 *hau* CMS 的雄蕊花瓣化,雄蕊发育不全、花丝变宽、花药不存在,整个雄蕊成花瓣状(图 1-A)。而转育成的叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 的花药为细丝状,整个雄蕊退化成白色的细丝状结构,但雌蕊发育正常(图 1-B)。



A; *hau* CMS; B; 0912A; C; 0912B.

图 1 芥菜型油菜胞质不育 *hau* CMS 和不育系 0912A 及其保持系 0912B 的花器官形态

Fig. 1 Flower morphology of *hau* CMS,

male sterile line 0912A and its maintainer line 0912B

对花器官的观察发现,叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 的花冠开展度、花瓣长、花瓣宽、花柱

长、雄蕊长都显著小于其保持系的花器官,而 *hau* CMS 的花器官则介于两者之间(表 1)。

表 1 芥菜型油菜胞质不育 *hau* CMS 和叶用芥菜雄性不育系 0912A 及其保持系 0912B 的花器形态比较¹⁾

Table 1 Comparison of the flowering of *hau* CMS, 0912A and 0912B

| 材料 Material | 花冠开展度/ mm^2 Corolla expansion | 花瓣长/ mm Length of petal | 花瓣宽/ mm Width of petal | 花柱直径/ mm Diameter of style | 花柱长/ mm Length of style | 雄蕊长/ mm Length of stamen |
|----------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>hau</i> CMS | 85.69 \pm 0.61 b | 7.01 \pm 0.16 b | 2.51 \pm 0.05 b | 0.86 \pm 0.02 a | 6.78 \pm 0.14 b | 5.65 \pm 0.13 b |
| 0912A | 74.75 \pm 2.37 c | 6.33 \pm 0.11 c | 2.36 \pm 0.02 b | 0.91 \pm 0.03 a | 6.26 \pm 0.15 c | 4.74 \pm 0.22 c |
| 0912B | 121.89 \pm 1.56 a | 8.45 \pm 0.17 a | 3.66 \pm 0.07 a | 0.88 \pm 0.02 a | 7.43 \pm 0.08 a | 8.09 \pm 0.03 a |

1) 利用新复极差法多重比较,标有不同字母的数值间没有显著差异($P < 0.05$)。Values followed by different letters are not significantly different($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

2.2 叶用芥菜细胞质雄性不育保持系 0912B 花药的发育

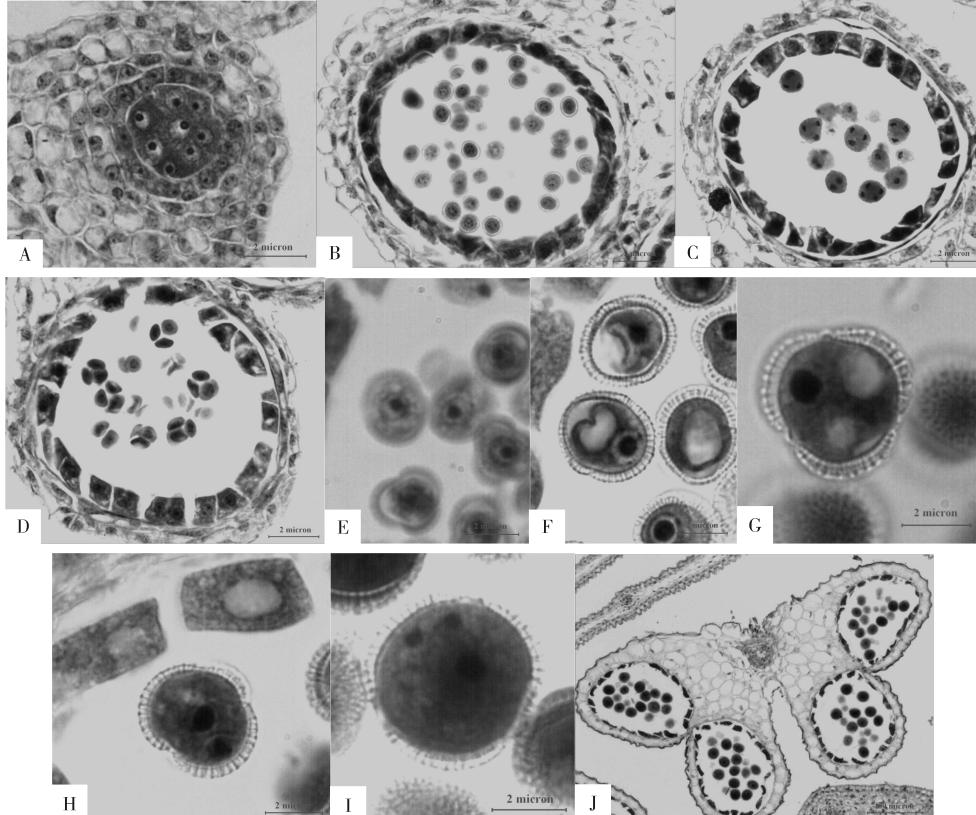
显微观察显示:在幼小花药的表皮内侧分化出

(图 2-A),并进一步发育为花粉母细胞(图 2-B)。花粉母细胞进入减数分裂期(图 2-C),形成四分体(图 2-D)。四分体分开,形成游离小孢子,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 2-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 2-F)。随后小孢子外壁的孢粉素和脂类物质沉积,花粉粒呈三角花型(图 2-G)。单核花粉粒经过 1

次不均等的分裂,形成 1 个大的营养核和 1 个小的生殖核,即二核花粉粒(图 2-H)。接着,生殖细胞再进行 1 次有丝分裂,形成 2 个精细胞,成熟花粉粒即为三核花粉粒(图 2-I)。成熟的花药呈典型的蝶形(图 2-J)。



A:造孢细胞($\times 40$) Sporogenous cell($\times 40$); B:花粉母细胞($\times 40$) Pollen mother cell($\times 40$); C:花粉母细胞减数分裂期($\times 40$) The meiosis stage of pollen mother cell($\times 40$); D:小孢子四分体($\times 40$) The tetrad stage of microspore($\times 40$); E:单核小孢子早期($\times 100$) The early stage of mononuclear microspore($\times 100$); F:单核靠边期($\times 100$) The late uninucleate stage($\times 100$); G:示花粉壁加厚($\times 100$) Showing the thickness of the extine($\times 100$); H:二核花粉粒($\times 100$) Two-nucleate pollen stage($\times 100$); I:三核花粉粒($\times 100$) Three-nucleate pollen stage($\times 100$); J:成熟花药($\times 10$) The mature anther($\times 10$)。

图 2 叶用芥菜保持系 0912B 的花药形成及发育过程

Fig. 2 The formation and development of 0912B maintainer line's anther

2.3 叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 花药的发育

不育系 0912A 花药败育形式多样,主要分为两大类:

1)无花粉囊型。其花药发育受阻于孢原细胞分化期(对 70 个蕾进行统计,该败育形式占 87.9%)。早期少部分花药角隅处也出现孢原细胞,但孢原细胞并不分裂形成造孢细胞和壁细胞(图 3-A),后期花药只是向边缘生长(图 3-B-D)并最终发育成由表皮、基本组织和维管束组成的无花粉囊型花药

(图 3-E),成熟花药形态与花瓣类似(图 3-F)。此类型花药存在多个维管束的异常现象。

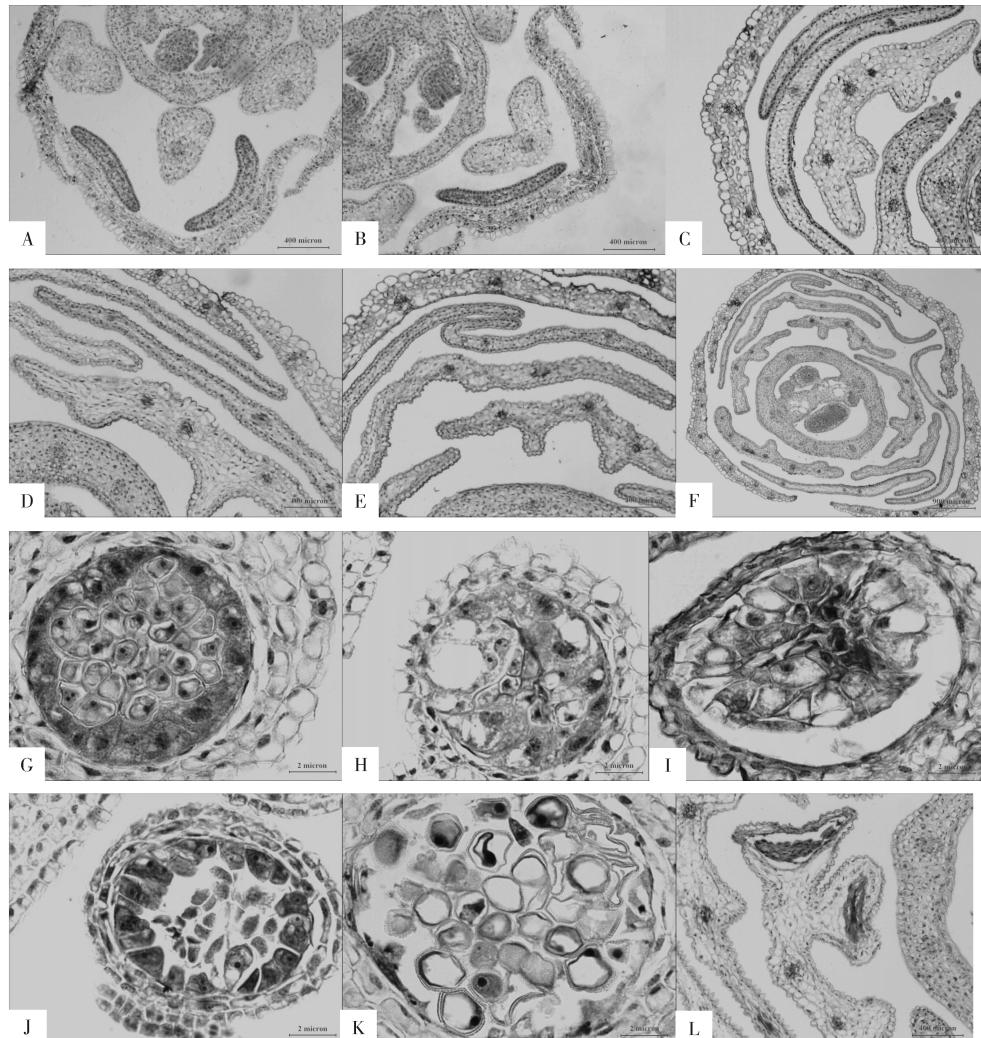
2)无花粉型或花粉败育型。12.1%花药有花粉囊的分化,即孢原细胞可正常分裂发育出造孢细胞和壁细胞,并发育至花粉母细胞。但花药发育在花粉母细胞期至单核小孢子期均可出现异常,并导致花药发育终止,花药败育。

观察到的败育形式有:有的花粉母细胞液泡化后浓缩解体(图 3-G),还有的花粉母细胞因绒毡层细胞径向增大或高度液泡化而受挤压并解体(花粉

母细胞不能进行减数分裂)(图 3-H,I);而有的花粉母细胞能进行减数分裂至四分体,但之后四分体解体破碎,光镜下可见离解的细胞碎片(图 3-J);部分四分体分离,释放出小孢子,之后小孢子高度液泡化、变形解体(图 3-K)。该类型可在成熟花药中观

察到萎缩的花粉囊,花粉囊中无花粉粒或有少量空瘪的花粉粒(图 3-L)。

在第 2 类花药败育过程中观察到绒毡层细胞的异常现象。绒毡层细胞或径向增大而异常生长,或高度液泡化并巨型化,且都极其不规则。



A: 早期花药形态($\times 10$) The morphology of early anther($\times 10$); B-D: 花药不断向边缘生长($\times 10$) The anther constantly growing to the edge($\times 10$); E: 成熟花药形态($\times 10$) The morphology of mature anther($\times 10$); F: 败育花器官形态($\times 4$) Flower organ morphology of abortion($\times 4$). G-I: 花粉母细胞期败育($\times 40$) The abortion at pollen mother cell stage($\times 40$); J: 四分体解体破碎($\times 40$) The tetrads disintegrated($\times 40$); K: 单核小孢子解体($\times 40$) The disaggregation of mononuclear microspore($\times 40$); L: 萎缩的花粉囊($\times 10$) Atrophied anther sac($\times 10$)。

图 3 叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 花药败育形式

Fig. 3 The abortion patterns of 0912A cytoplasmic male sterility line

3 讨 论

叶用芥菜胞质雄性不育系 0912A 表现出败育时期和细胞学特点的复杂性,其花药发育不是受阻于某特定时期,大部分花药发育受阻于孢原细胞分

化期,部分在花粉母细胞期至单核小孢子期出现异常而终止发育,这与前人报道的 *pol* CMS 和 *ogu* CMS 的败育方式都不同^[11-12]。早期败育的花药无花粉囊,也无绒毡层的形成,说明大部分花药的败育不是由绒毡层的异常引起的,但晚期败育的花粉囊

观察到绒毡层的径向肥大和高度液泡化的异常现象,说明这部分花药的败育可能与绒毡层的过度生长有关。

关于绒毡层和雄性不育的关系前人曾做过总结^[13],并将绒毡层的异常现象分为两类:一类是绒毡层细胞维持分生细胞性质,过度生长膨大并侵占药室而挤压小孢子;另一类异常是绒毡层细胞提早解体,不能及时分泌胼胝质酶,使小孢子无法从四分体中释放出来,或是绒毡层细胞壁解体后细胞内含物融合形成周原质团,侵入药室引起小孢子败育。不育系0912A绒毡层的异常类似第一类,但膨大时期提早至花粉母细胞期,这与萝卜胞质不育系(*ogu CMS*)的败育方式不同^[14]。

大部分研究发现,来源相同的不育胞质在种间或种内转育后其小孢子败育的时期和方式等方面都具有一定的相似性,这在*pol CMS*及*ogu CMS*的转育利用中都有报道。值得注意的是,不育系0912A的败育方式与不育源*hau CMS*不同,*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^[15]。但0912A有花药形态的分化,小部分花药还有花粉囊的形成,只是后期花粉囊萎缩。*hau CMS*和0912A的花药败育细胞学结果与其花器官形态吻合,不育源*hau CMS*为花瓣化雄蕊,而不育系0912A的雄蕊为细丝状,初步说明*hau CMS*不育胞质在不同的核背景下,其花药败育方式会发生改变,这与王涛涛等^[7]的研究结果一致。根据花器官发育的同源异型基因作用模型^[16](ABC模型),花器官的发育受核基因(ABC)的调控,任何ABC基因的失活都会造成花器官不正常发生,对细胞质雄性不育材料的研究也发现,B类和C类基因表达的降低会导致花瓣状、丝状、心皮状等退化雄蕊^[17];而杨景华等^[18]在对榨菜胞质雄性不育系研究时提出,线粒体基因组可能反向调控核同源异型基因并导致花器官的形态变化。

本研究中0912A花药败育方式及雄蕊形态的变化,可能正是线粒体基因组在与不同核基因互作时,线粒体基因组这种反向调控花发育基因表达的途径发生了改变,当然进一步的机制及原因还有待深入的研究。*hau CMS*不育胞质这种在不同核背景下败育方式及花器形态变化的现象,不仅为核质

互作线粒体反向调控核基因提出了一种途径的假设,同时也为今后研究雄性不育的分子机制和发育生物学机制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 柯桂兰,赵稚雅,宋胭脂,等.大白菜异源胞质雄性不育系CMS3411-7的选育及应用[J].园艺学报,1992,19(4):333-340.
- [2] 卢成苗.萝卜细胞质雄性不育细胞形态学、配合力及其同工酶的研究[D].扬州:扬州大学图书馆,2007.
- [3] 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(3):290-294.
- [4] 金海霞.芥菜细胞学雄性不育系的创制与利用[D].沈阳:沈阳农业大学图书馆,2006.
- [5] 杨景华,张明方,喻景权,等.叶用芥菜细胞质雄性不育相关基因orf 220的分子特性[J].遗传学报,2005,32(6):594-599.
- [6] 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.
- [7] 王涛涛,蔡晓峰,张俊红,等.芥菜型油菜雄性不育系与甘蓝远缘杂交育种及早代育性鉴定[J].园艺学报,2010,37(10):1661-1666.
- [8] 康俊根.四种类型甘蓝雄性不育系花药败育特征及基因表达谱分析[D].北京:中国农业科学院,2006.
- [9] 田福发,徐跃进,袁黎,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,2004,22(3):269-272.
- [10] 李和平.植物显微技术[M].2版.北京:科学出版社,2009:45-46.
- [11] 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,1988,10(4):23-24.
- [12] 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,2001:78-80.
- [13] TSVETOVA M I, ELKONIN L A. Cytological investigation of male sterility in sorghum caused by a dominant mutation (Mstc) derived from tissue culture[J]. Sex Plant Reprod, 2003, 16:43-49.
- [14] 赵会芳,巩振辉,赵利民,等.大白菜萝卜细胞质雄性不育系RC7花药发育的解剖学和同工酶研究[J].中国农业大学学报,2009,14(2):64-69.
- [15] 万正杰,王显军,傅廷栋,等.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.
- [16] THEISSEN G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house[J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4(1):75-85.
- [17] HAMA E, TAKUMI S, OGIHARA Y, et al. Pistillody is caused by

alteration to the class-B MAADS-box gene expression pattern in al-
loplasmic wheats[J]. *Planta*, 2004, 218(5): 712-720.

[18] 杨景华, 张明方. 线粒体反向介导高等植物细胞质雄性不育发
生机制[J]. *遗传*, 2007, 29(10): 1173-1181.

Anther development of 0912A as a novel cytoplasmic male sterile line of leaf mustard

ZOU Rui-chang¹ WAN Zheng-jie¹ XU Yue-jin¹ YANG Wen-jie¹ FU Ting-dong²

1. College of Horticulture and Forestry/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology,
Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To investigate the spatial-temporal patterns and other characteristics of anther abortion in 0912A as a leaf mustard cytoplasmic male sterile line and its maintainer line 0912B, cytological observations of anther development were made by means of paraffin sections. The results showed that the abortion of male sterile line was diverse. The abortion mainly occurred at the differentiation stage of archesporial cell, which lacked the formation of pollen sacs. Part of anther abortion occurred at the period from pollen mother cell to the mono-nuclear microspore: some pollen mother cells gathered and disintegrated gradually after vacuolization; some pollen mother cells disintegrated due to the hypertrophy of tapetal layer cells in the radial direction; some pollen mother cells could develop to tetrad, then disintegrated; part of the pollen mother cells could develop to the mono-nucleus microspores, however the mono-nucleus microspores broke when they were highly vacuolated. The stamens of 0912A were also found to degenerate as abortive filaments.

Key words leaf mustard; male sterile; paraffin section; cytology; floral organ

(责任编辑:张志钰)