

白菜和芜菁 *Ogura* 型雄性不育系与保持系的获得及其细胞学观察

崔辉梅^{1,2} 曹家树^{1*} 张明龙³ 姚祥坦¹ 向 珣¹

(¹ 浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; ² 石河子大学园艺系, 石河子 832003; ³ 浙江大学核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 通过甘蓝型油菜 *Ogura* 细胞质雄性不育材料与白菜、芜菁的种间杂交和连续回交, 获得了不育性稳定的白菜、芜菁 *Ogura* 细胞质雄性不育系 ‘新选 *Ogu28-4*’、‘矮脚黄 *Ogu33-14*’ 和 ‘耐病 *Ogu18-4*’ 及其相应的保持系。细胞形态学研究表明: 虽然这 3 个不育系核背景不同, 但花药败育时期基本相同, 均具有单核败育型的特征; 小孢子到单核期后不再向前继续发育, 而是迅速退化以至解体, 开花前彻底败育; 不育系的花药在减数分裂早期绒毡层细胞中已出现液泡, 有肥大趋势, 而正常花药绒毡层的发育在减数分裂过程中达到高峰, 四分体时出现退化迹象, 开花前完全解体。不同的 *Ogura* 细胞质雄性不育系, 虽然核背景不同, 但花药败育的时期基本相同, 说明 *Ogura* CMS 胞质互作关系稳定, 受核背景影响小。

关键词: 白菜; 芜菁; *Ogura* 细胞质雄性不育; 小孢子发生; 细胞形态学

中图分类号: S 634 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 04-0467-05

Production of the *Ogura* Cytoplasmic Male Sterile (CMS) Lines of Chinese Cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and Turnip (*B. campestris* L. ssp. *rapifera*) and Cytological Observation of Their Sterile Organs

Cui Huimei^{1,2}, Cao Jiashu^{1*}, Zhang Minglong³, Yao Xiangtan¹, and Xiang Xun¹

(¹ Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ² Department of Horticulture, Shihezi University, Shihezi 832003, China; ³ Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The *Ogura* CMS lines of Chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee.) and turnip [*B. campestris* L. ssp. *rapifera* (Metzg.) Sinsk] were obtained through interspecific hybridization between *Ogura* CMS in *B. napus* and Chinese cabbage-pak-choi and turnip, and successive backcrosses with Chinese cabbage-pak-choi and turnip as male parents, namely ‘Xinxuan *Ogu28-4*’, ‘Aijiaohuang *Ogu33-14*’, ‘Naibing *Ogu18-4*’. Cytomorphological studies indicated that the inhibition of *Ogura* CMS *B. campestris* anther development may occur at the tetrad-uninucleic pollen stage. The microspores stop developing at the uninucleic stage, quickly degenerated to disappear, and abort absolutely before blossom. Tapetum of the male sterile line began vasculatation during meiosis and did not disappear even when the uninucleic microspores had degenerated while that of the male fertile line began to generate at tetrad stage and disappear after the pollens had matured. The different nuclear background of *Ogura* CMS lines had similar abortive character. It might indicate that the relation of nucleo-cytoplasmic interaction is steady, and the cytoplasmic effects were hardly affected by the nucleus of the sterile lines.

Key words: *Brassica campestris* ssp. *chinensis*; *Brassica campestris* ssp. *rapifera*; *Brassica rapa*; Chinese cabbage-pak-choi; Turnip; *Ogura* CMS; Microsporogenesis; Cytomorphology

在迄今发现的十字花科植物细胞质雄性不育源中 *Ogura* CMS 是不育性最稳定的类型, 但低温黄

收稿日期: 2003-10-27; 修回日期: 2004-04-12

基金项目: 国家 863 计划项目 (2003 AA207120); 浙江省重大科技项目资助 (021102536)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jshcao@zju.edu.cn)

化和蜜腺严重退化是最大缺陷,至今在生产上的应用极为有限。近 10 年来,国内外研究者在甘蓝型油菜、结球甘蓝、花椰菜、白菜等作物的黄化改良方面取得了一定进展^[1-4],并对同一不育源在不同作物中花药发育机制进行了研究。在萝卜、油菜、大白菜 *Ogura* CMS 系中,花药发育受阻于四分体至单核花粉期,而紫菜薹 *Ogura* CMS 花药发育具有无花粉囊型和单核败育型两种类型^[5-10]。本研究采用 *Ogura* 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L., AACC 染色体组) 细胞质雄性不育源为母本,以白菜 [*B. campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee, AA 染色体组] 自交系 ‘新选 1 号’、‘矮脚黄’和芜菁 [*B. campestris* L. ssp. *rapifera* (Matzg.) Sinsk, AA 染色体组] 自交系 ‘耐病 98-1’ 为轮回亲本进行回交转育,得到 3 份不育性稳定、不黄化的材料。通过研究 *Ogura* CMS 在白菜、芜菁不同核背景下小孢子发生过程及特点,探索 *Ogura* CMS 在不同作物中其花药发育机制,旨在加速不育系选育和保持系筛选,为白菜和芜菁杂种优势的利用提供一条新途径。

1 材料与方 法

以甘蓝型油菜 *Ogura* 雄性不育材料(无黄化现象,蜜腺正常)为母本(不育率达 100%),以白菜自交系 ‘新选 1 号’(青梗)‘矮脚黄’(白梗)和芜菁自交系 ‘耐病 98-1’ 为父本,通过种间杂交和连续回交,在 BC₃ 代即获得不育性稳定的白菜和芜菁 *Ogura* 型细胞质雄性不育系。

2003 年春在田间采取即将开放的白菜、芜菁 *Ogura* 型细胞质雄性不育系和保持系的单株花朵,在载玻片上加一滴 0.1% 脱色水溶性苯胺蓝,取花药在苯胺蓝中挤出花粉,盖上盖玻片,在 Leica DM-LB 荧光显微镜下观察并照相。其中激发光为 355~425 nm,中间阻挡为 455 nm,接受的发射光为 >470 nm。同年在白菜、芜菁现蕾期和初花期取不育株和可育株大小不同的花蕾,FAA 固定,用铁矾—苏木精染色,按常规石蜡切片程序包埋,横切花蕾,切片厚度为 8 μm。二甲苯脱蜡、透明。在 Leica DMLB 显微镜下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 白菜和芜菁 *Ogura* 雄性不育转育后代的植物学特征

用白梗、青梗白菜自交系和芜菁自交系分别与甘蓝型油菜 *Ogura* CMS 杂交,随后进行了 3 代回交转育。结果表明,可育白菜、芜菁自交系都是 *Ogura* CMS 的保持系。回交后代不育性稳定,没有植株黄化的现象。不育株花药呈白色、瘦小无花粉,花瓣开放正常,蜜腺清晰可见(图 1),结籽正常。随着回交代数增加到 BC₃ 代,各种农艺性状向保持系转变(表 1,图 1)。

表 1 白菜和芜菁 *Ogura* 型雄性不育系和保持系的植物学特征

Table 1 The plant characters observation of *Ogura* CMS lines and maintenance lines in *B. campestris* L. ssp. *chinensis* (L.)

Makino var. *communis* Tsen et Lee and *B. campestris* L. ssp. *rapifera* (Matzg.) Sinsk.

材料 Material	株高 Plant height (cm)	株幅 Plant length (cm)	最大叶 The biggest leaf (cm)		花瓣 Petal (cm)		长花丝 Long filament (cm)	短花丝 Short filament (cm)	花药 Anther (cm)		柱头长 Style length (cm)	蜜腺数 Number nectary
			长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width			长 Length	宽 Width		
新选 1 号 Xinxuan 1	22.8	36.7	25.9	14.1	1.09	0.61	0.53	0.32	0.24	0.22	0.58	4
新选 <i>Ogu</i> 28-4	23.2	36.2	28.3	14.0	1.11	0.68	0.53	0.29	0.22	0.18	0.61	4
Xinxuan <i>Ogu</i> 28-4												
矮脚黄 Aijiaohuang	27.5	42.1	31.2	21.8	1.09	0.78	0.46	0.29	0.24	0.23	0.55	4
矮脚黄 <i>Ogu</i> 33-14	28.6	41.6	35.5	19.9	1.19	0.76	0.43	0.27	0.22	0.21	0.57	4
Aijiaohuang <i>Ogu</i> 33-14												
耐病 98-1	29.2	59.4	33.7	18.3	1.05	0.51	0.53	0.37	0.17	0.16	0.54	4
Naibing 98-1												
耐病 <i>Ogu</i> 18-4	29.2	58.9	31.5	18.4	1.09	0.52	0.52	0.35	0.18	0.17	0.56	4
Naibing <i>Ogu</i> 18-4												

注:数据为 30 株平均值。Note: The number is the average of 30 plants.

图1 ‘矮脚黄 *Ogu33-14*’ 不育系及其保持系

A: 不育系花朵, 花药瘦小干瘪无花粉; B: 保持系花朵, 花药正常, 呈黄色; C: 不育系植株生长正常, 无黄化现象。

Fig. 1 ‘Aijiaohuang *Ogu33-14*’ and maintenance line

A, the flower of Aijiaohuang *Ogu33-14*, anther was white and empty; B, the flower of maintenance line, anther was yellow and normal;

C, the ‘Aijiaohuang *Ogu33-14*’ plants shows growth well and no chlorophyll deficiency.

2.2 白菜和芜菁 *Ogura* 型雄性不育系和保持系花粉生活力的荧光检测

在荧光显微镜下观察了大量花粉(表2), ‘新选1号’、‘矮脚黄’白菜和‘耐病98-1’芜菁的可育株均为有生活力的花粉, 而各自的不育系花粉较少, 且多为无生活力的花粉粒(图版, 1, 2)。这说明 *Ogura* 不育源转育到白菜和芜菁均能获得稳定的花粉粒失活的后代植株, 不同细胞核基因对 *Ogura* 不育基因的互作作用没有明显表现出来。

表2 白菜和芜菁 *Ogura* 型雄性不育系和保持系花粉生活力的荧光检测Table 2 The fluorochrome test of pollen vitality of *Ogura* CMS lines and maintenance lines in *B. campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee and *B. campestris* L. ssp. *rapifera* (Metzg.) Sinsk.

品种 Cultivars	视野数 No. of view	观察的花粉数 No. of pollen	花粉特征 Characters of pollen	生活力 Viability(%)
新选1号 Xinxuan 1	30	492	椭圆形, 有荧光 Elliptic, fluorescence	100
新选 <i>Ogu28-4</i> Xinxuan <i>Ogu28-4</i>	30	90	无荧光, 畸形 No fluorescence, deformed	0
矮脚黄 Aijiaohuang	30	459	椭圆形, 有荧光 Elliptic, fluorescence	100
矮脚黄 <i>Ogu33-14</i> Aijiaohuang <i>Ogu33-14</i>	30	93	无荧光, 畸形 No fluorescence, deformed	0
耐病98-1 Naibing 98-1	30	637	椭圆形, 有荧光 Elliptic, fluorescence	100
耐病 <i>Ogu18-4</i> Naibing <i>Ogu18-4</i>	30	75	无荧光, 畸形 No fluorescence, deformed	0

2.3 白菜和芜菁 *Ogura* 型雄性不育系和保持系小孢子发育的细胞形态学比较

‘新选 *Ogu28-4*’、‘矮脚黄 *Ogu33-14*’白菜和‘耐病 *Ogu18-4*’芜菁3个不育系的花药发育过程完全相同。它们的败育时期和方式相同, 它们受阻于单核花粉期。在四分体期以前3个不育系的花药发育正常(图版, 3~5和10~12)。以后正常可育的保持系包裹四分体的胼胝质开始溶解, 小孢子释放, 此时绒毡层细胞出现退化迹象, 趋于自我解体(图版, 6)。3个不育系由四分体释出的早期单核小孢子与保持系无可见差异(图版, 13)。随着保持系小孢子体积增长和液泡化, 小孢子呈不规则形状(图版, 7)。小孢子继续成熟时, 三沟萌发孔明显, 绒毡层细胞解体(图版, 8)。而后小孢子经有丝分裂形成了成熟的花粉。此时的花药壁只留下表皮层、药室内壁, 中层细胞消失, 绒毡层细胞完全解体或仅在药室内壁留有残迹, 相邻两个孢子囊的隔壁解体破裂, 为花粉的散出打开通道(图版, 9)。而3个不育系的花粉粒到了单胞时期停止发育, 停止发育的花粉粒细胞质内出现小液泡, 外壁很薄, 细胞质特别淡, 核仁很小, 这些小孢子即呈现败育迹象(图版, 14)。单核晚期的小孢子败育更趋明显, 小孢子相互粘连, 细胞质稀薄并收缩, 细胞核染色也变淡, 有的小孢子形状不规则且大小不等(图版, 15)。以后, 小孢子的细胞质继续液泡化, 细胞核不能分裂并瓦解, 细胞壁解体。开花时, 花药不开裂, 小孢子残余物聚在一起, 成为染色很深的团块物质停留在药室中, 最终花药瘪缩变形, 各药室扭曲极为严重(图版, 16)。

Ogura 不育系花药发育中药室的绒毡层细胞异常是十分普遍的现象。正常花药的绒毡层在小孢子

成熟后,自然缓慢解体;而3个不育系花药绒毡层细胞变化异常明显,在减数分裂的早期绒毡层细胞中已出现液泡,在四分体时绒毡层细胞液泡化更加明显,细胞之间出现间隙,并径向肥大,向药囊腔中央延伸,使小孢子有被挤压的趋势,在药囊腔中央形成一团(图版,15)。单核晚期绒毡层已经基本解体,只留有一些退化残余物,小孢子的败育与绒毡层细胞的液泡化有一定的关系。

3 讨论

3.1 回交转育改良 *Ogura* CMS 植物学特征

研究表明,用白梗、青梗白菜和芜菁自交系与甘蓝型油菜 *Ogura* CMS 杂交,经过3代回交转育获得了白菜、芜菁 *Ogura* 不育系。转育结果表明,具有 AACC 染色体组物种与 AA 染色体组物种杂交经少数几代回交即可迅速获得后代性状相对稳定的不育系。我们认为当与有染色体组相同的异源多倍体进行远缘杂交和回交时,其稳定的速度要远远快于没有染色体组相同的物种之间的远缘杂交。

3.2 雄性不育系小孢子的败育时期和特点

Leser 等曾指出植物雄性不育花药的败育可以发生在小孢子发育的每一个时期,单子叶植物花药败育多数在单核至双核期,双子叶植物中大多数发生在四分体和小孢子形成期^[11]。前人报道萝卜、甘蓝、白菜 *Ogura* 细胞质雄性不育系花粉败育大多发生在四分体至单核花粉期,紫菜薹 *Ogura* 细胞质雄性不育系花药发育有单核败育型和无花粉囊型的特征。本试验中白菜、芜菁 *Ogura* 型细胞质雄性不育系的小孢子败育征兆是出现在单核早期,与前人报道基本一致。不同的萝卜细胞质雄性不育系,虽然核背景不同(萝卜型核、甘蓝型核、大白菜型核、紫菜薹型核等)但其花药败育的时期基本相同,说明 *Ogura* CMS 胞质互作关系稳定,受核背景的影响小,在芸薹属作物中具有广泛的应用价值。

3.3 绒毡层的异常与小孢子败育的关系

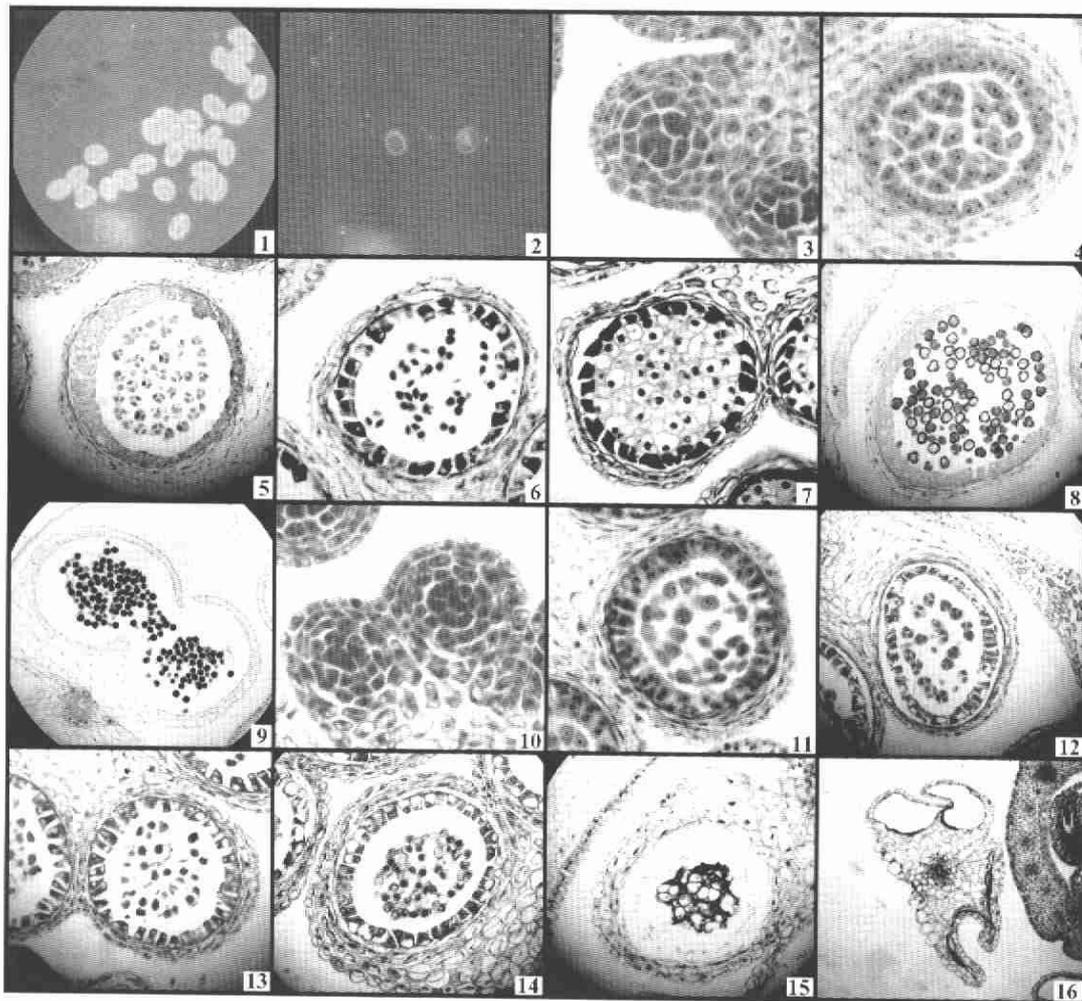
关于绒毡层与小孢子败育的关系,大多认为花粉败育是因为绒毡层结构异常^[11-13],即绒毡层细胞在花粉形成和发育过程中过度肥大液泡化或形成周原质团、提前或延缓退化。本试验观察到白菜、芜菁 *Ogura* 雄性不育花药由于绒毡层细胞的液泡化和径向肥大,导致其体积迅速膨大延伸到药囊腔内部,使小孢子有被挤压的趋势,而在药囊腔中央形成一团,造成小孢子发育受阻,而在相应保持系花粉发育过程中,绒毡层细胞自然降解消亡。这与前人在 *Ogura* CMS 甘蓝型油菜和大白菜上的研究基本一致^[7,8,10]。但我们观察到上述3种 *Ogura* 雄性不育材料的绒毡层在单核晚期已经基本解体,只剩下一些残迹,这一点不同于前人在 *Ogura* 型细胞质 CMS 甘蓝和紫菜薹上的研究^[2,9]。他们观察到绒毡层延迟退化,到开花时还未完全消失。从这一点可以看出, *Ogura* CMS 在不同的核背景下其败育方式基本相同,但在败育的过程中绒毡层的液泡化、径向生长和对小孢子的挤压程度等存在着细微的差异。

绒毡层细胞提早凋亡现象可能是由于绒毡层细胞的程序性死亡(programmed cell death)或细胞凋亡(apoptosis)^[14]引起的。本试验中,可育白菜、芜菁的花粉发育过程中绒毡层细胞的适时解体,及时提供花粉发育所需的营养物质并为花粉粒体积激增提供空间。在 *Ogura* 不育白菜、芜菁花粉发育中,这种程序化死亡过程发生紊乱,绒毡层细胞提早降解,导致小孢子在发育过程中不能从绒毡层获得足够的营养物质,以至最后小孢子败育;但也可能是由于不育基因在小孢子发育成熟前,通过调控绒毡层细胞行为,使其提前降解,并产生了一些信号物质,使未成熟小孢子中的一些致死基因表达,引起小孢子发育异常导致花粉败育。但最终是不育相关基因致使绒毡层差异表达引起小孢子不能完成正常发育,还是不育相关基因直接作用于小孢子,引起其发育异常导致败育,还有待于进一步研究。

参考文献:

- 1 Pelletier G, Primard C, Vedel F, et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, 1983, 191: 244 ~ 250
- 2 朱玉英、姚文岳、张素琴,等. *Ogura* 细胞质甘蓝雄性不育系及其利用. *上海农业学报*, 1998, 14 (2): 19 ~ 24
- 3 何承坤、郭素枝、张智毅,等. 花椰菜异源细胞质雄性不育材料的初步研究. *园艺学报*, 1999, 26 (2): 125 ~ 127

- 4 侯喜林, 曹寿椿, 余建明, 等. 原生质体非对称电融合获得不结球白菜胞质杂种. 园艺学报, 2001, 28 (6): 532~537
- 5 Ogura H. Studies on the new male-sterility in Japanese radish with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ., 1968, 6: 39~78
- 6 Bartkowiak-Broda I, Rousselle P, Renard M. Investigations of two kinds of cytoplasmic male sterility in rape seed (*Brassica napus* L.). Genet. Pol., 1979, 20: 487~492
- 7 常桂菊, 王保仁. 甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育系花粉败育的细胞学研究. 湖南师范大学学报(自然科学版), 1985, (4): 63~66
- 8 余凤群, 傅延栋. 甘蓝型油菜几个雄性不育系花药发育的细胞形态学研究. 武汉植物学研究, 1990, 3 (8): 209~216
- 9 黄邦全, 常玲, 陈建国, 等. 紫菜蕈 *Ogura* 细胞质雄性不育系花药发育的细胞形态学研究. 湖北大学学报(自然科学版), 2001, 21 (3): 273~276
- 10 梁燕, 赵稚雅, 王鸣. *Ogu* CMS 结球白菜雌性不育系研究. 西北农业学报, 1994, 3 (2): 14~16
- 11 Laser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev., 1972, 38 (3): 425~454
- 12 Kini A V, Seetharam A, Joshi S S. Mechanism of pollen abortion in cytoplasmic male lines of sunflower. Cytologia, 1994, 38: 425~454
- 13 郭晶心, 孙日飞, 宋家祥, 等. 大白菜雌性不育系小孢子发生的细胞形态学研究. 园艺学报, 2001, 28 (5): 409~414
- 14 华志明, 陈睦传, 沈明山. 植物生长发育中程序性细胞死亡. 生物工程进展, 1998, 18 (3): 32~36



图版 白菜 *Ogura* 细胞质雄性不育系与保持系小孢子发生的细胞学观察

1. 可育株的花粉粒 ($\times 100$); 2. 不育株的花粉粒 ($\times 100$); 3~9. 可育株的小孢子发育过程 [3. 造孢细胞期 ($\times 400$); 4. 减数分裂期 ($\times 400$); 5. 四分体期 ($\times 400$); 6. 小孢子释放期 ($\times 400$); 7. 小孢子液泡化期 ($\times 400$); 8. 小孢子成熟期 ($\times 400$); 9. 药室开裂, 花粉散出 ($\times 400$)]; 10~16. 不育株的小孢子发育过程 [10. 小孢子母细胞时期 ($\times 400$); 11. 减数分裂期 ($\times 400$); 12. 四分体期 ($\times 400$); 13. 小孢子释放期 ($\times 400$); 14. 小孢子液泡化期 ($\times 400$); 15. 小孢子败育 ($\times 400$); 16. 花粉败育终期 ($\times 200$)].

Plates Cytological observation of microsporogenesis for *Ogura* CMS line and maintenance line in *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee.

1. The grain of fertile pollen ($\times 100$); 2. The grain of sterile pollen ($\times 100$); 3~9. Sections of male fertile plants; [3. Microspore mother cell ($\times 400$); 4. Meiotic prophase ($\times 400$); 5. Tetrads of microspores ($\times 400$); 6. Early stage of just release microspores ($\times 400$); 7. Vacuolate microspore ($\times 400$); 8. Binucleate pollen ($\times 400$); 9. anther sac slitting and anther spilling out ($\times 400$)]; 10~16. Sections of male sterile plants [10. Microspore mother cell ($\times 400$); 11. Meiotic prophase ($\times 400$); 12. Tetrads of microspores ($\times 400$); 13. Early stage of just release microspores ($\times 400$); 14. Vacuolate microspore ($\times 400$); 15. Degenerated tapetum ($\times 400$); 16. Pollen abortion termination ($\times 200$)].