

# 大白菜雄性不育系小孢子发生的细胞形态学研究

郭晶心 孙日飞\* 宋家祥 张淑江

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 采用塑料半薄切片技术, 在光学显微镜下系统地观察了大白菜同质异核、异质同核细胞质雄性不育系、细胞核雄性不育系及其相应保持系花药发育过程的细胞形态学特征。研究表明: 细胞核雄性不育系花药败育主要发生在减数分裂期, 花粉母细胞不能发生正常的减数分裂; 细胞质雄性不育系花药败育主要发生在四分体时期或小孢子单核期, 表现为绒毡层细胞异常, 四分体或小孢子败育。

**关键词:** 大白菜; 雄性不育; 小孢子发生

**中图分类号:** S 634.1; Q 942 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 05-0409-06

大白菜 [*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson] 杂种优势明显, 利用雄性不育制种是国内外育种工作者的主攻方向。已研究的雄性不育系有: (1) 细胞核雄性不育两用系, 但需拔除母本 50 % 的可育株, 增加成本, 影响杂交率; (2) Ogura 萝卜胞质白菜雄性不育材料, 存在叶片黄化, 蜜腺退化等不良性状, 未能在生产中应用; (3) 核基因互作雄性不育系, 不育系和保持系很难回交转育; (4) 白菜 Polima 异源胞质不育系, 在不利环境下会出现微量花粉和轻度败育。鉴于上述雄性不育系所存在的问题, 我们从国外引进了大白菜细胞质雄性不育系“NYcms”, 它无苗期黄化, 有蜜腺, 生长和结籽正常, 转育容易, 育性稳定, 推测可能是由 Ogura 萝卜胞质改造而来。

本研究选用同质异核、同核异质细胞质雄性不育系和细胞核雄性不育系及其相应保持系, 研究花药发育过程中的细胞形态学特征, 目的是为“NYcms”大白菜雄性不育系的研究与利用提供依据, 为大白菜杂种优势育种提供参考。

## 1 材料和方法

供试材料为中国农科院蔬菜花卉所提供的大白菜细胞核雄性不育系 76A 及其保持系 76B, 大白菜细胞质雄性不育系 66A、61A 及其保持系 66B、61B。其中 66A 与 61A 属同质异核, 为“NYcms”细胞质雄性不育系, 76A 与 61A 在核组成上仅仅是在决定育性的核等位基因上有所差别, 基本属于同核异质。

于植株盛花期取主茎顶端整个总状花序, 按花蕾的着生顺序分类并立即固定。花蕾经 2.5 % 戊二醛和 1 % 锇酸双重固定, 各级酒精脱水, 环氧丙烷过渡, 环氧树脂包埋, 用

收稿日期: 2000 - 11 - 01; 修回日期: 2001 - 04 - 25

\*通讯作者 Author for correspondence. E-mail: sunrf @public. bta. net. cn

Leica Ultracut R 型超薄切片机切片 (厚度 1  $\mu\text{m}$ )。切片用 1% 甲苯胺蓝染色, Olympus BH2 型显微镜观察并照相<sup>[1]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白菜雄性不育保持系小孢子发生的细胞形态学观察

三个保持系 76B、66B、61B 的小孢子发生过程极为一致, 先后经历了造孢细胞、花粉母细胞、减数分裂、四分体、早期单核小孢子、单核靠边小孢子、二核花粉、成熟花粉共 8 个时期。

### 2.2 大白菜细胞核雄性不育系 76A 小孢子发生的细胞形态学观察

从孢原细胞分化到造孢细胞时期, 在细胞学水平上, 76A 的小孢子发育与保持系基本相同, 从处于造孢细胞时期的单个花药横截面上可见到 4 个药室已形成, 造孢细胞位于药室中央, 体积较大, 花药室壁的各层细胞已基本形成 (图版, 1)。从花粉母细胞开始, 76A 的花药发育出现异常。

2.2.1 花粉母细胞时期 76A 花粉母细胞呈多边形, 体积较大, 与处于同一时期的可育花药相比, 其细胞核较小, 染色较浅, 细胞壁出现微小褶皱, 不象可育的细胞壁那样平滑饱满。此时, 绒毡层细胞排列不整齐, 核相对较小, 液泡相对较大, 花药室壁的其他各层细胞排列也不整齐 (图版, 2)。

2.2.2 减数分裂期 花粉母细胞的体积有所增大, 有的细胞可见两团染色质, 表明正在进行核分裂, 但花粉母细胞之间排列松散, 有空隙, 不象可育的花粉母细胞那样彼此相贴, 空隙间充满染色很深的物质。绒毡层细胞已提前解体退化, 径向壁溶解, 分辨不出单个细胞。(图版, 3)。

2.2.3 减数分裂之后 花粉母细胞不能进行正常的减数分裂而逐渐变形解体, 连同绒毡层细胞一起退化为染色很深的物质, 表皮、药室内壁、中层细胞逐渐增大, 变为圆形, 排列不规则, 此时药室呈扁圆形 (图版, 4)。最后整个药室收缩干瘪, 已解体的绒毡层细胞和花粉母细胞残骸形成一条染色很深的带状物 (图版, 5)。

### 2.3 大白菜细胞质雄性不育系 61A 和 66A 小孢子发生的细胞形态学观察

61A 和 66A 的小孢子发育, 自造孢细胞期至减数分裂期与可育的十分相似, 从四分体时期开始呈现败育迹象。

2.3.1 61A 四分体时期 四分体形态基本正常, 呈正四面体形, 外被胼胝质壁。而绒毡层细胞呈现两种形态, 随后的花药败育也因绒毡层的这两种状态而表现出不同的败育方式。(1) 有的药室中绒毡层细胞异常膨大, 内部出现大液泡, 可见双核或单核 (图版, 6), 随后绒毡层细胞继续膨大, 液泡化更为明显, 有的成为巨型细胞, 侵入药室腔挤压四分体 (图版, 7); 四分体受到挤压, 逐渐破裂解体, 同时绒毡层细胞的液泡化进一步加剧 (图版, 8), 四分体和绒毡层细胞进一步降解为空壳状 (图版, 9), 最后整个花药收缩干瘪。(2) 另外一些药室中绒毡层细胞在四分体时期并不膨大, 而是保留在原位逐渐解体; 有的药室中, 绒毡层细胞能保持原有的形状, 细胞壁清晰, 但细胞液泡化严重, 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 (图版, 10); 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, 同时四分体

发生液泡化(图版, 11), 随后四分体连同变形的绒毡层细胞内容物逐渐消失, 花药败育。

2.3.2 66A 四分体时期 66A 四分体形态正常, 外被胼胝质壁, 绒毡层细胞内出现较大的液泡, 而同期可育的绒毡层细胞内却没有出现液泡, 此时花药室壁的其他各层细胞排列也不甚整齐(图版, 12)。

66A 小孢子时期四分体的胼胝质壁溶解, 小孢子被释放出来。小孢子呈圆形, 单核居中, 内部出现小液泡, 外壁单薄, 发育不良。此时绒毡层细胞已开始解体, 并表现出两种状态, 一种为保留在原位形成周原质团并逐渐退化(图版, 13), 一种为异常膨大侵入药室腔挤压小孢子(图版, 14)。

66A 小孢子败育期小孢子停止发育, 细胞质逐渐液泡化并消失, 呈瘪缩空壳状; 绒毡层细胞的内容物逐渐减少, 只剩下残余的细胞壁, 中层细胞仍未解体(图版, 15); 随后小孢子和绒毡层细胞的退化残余物聚在一起成为染色很深的物质停留在药室中(图版, 16), 花药败育。

### 3 讨论

#### 3.1 3 份大白菜雄性不育材料花药发育的细胞学比较

61A 与 66A 的核背景不同, 但具有共同的不育胞质。两者在细胞学上的败育既有某些相似, 又存在差异。相似之处在于, 二者的绒毡层细胞在四分体时期出现液泡化, 在败育的主要时期都出现异常, 并呈现两种状态, 一种为保留在原位形成周原质团, 逐渐退化; 一种为异常膨大, 侵入药室腔, 这种情况在水稻中也有过报道<sup>[2]</sup>。不同之处在于二者的败育时期不同, 61A 在四分体时期败育, 66A 在四分体时仅出现较大液泡和药室壁各层细胞排列不整齐的异常, 而败育主要在小孢子时期。

夏涛<sup>[3]</sup>详细研究了玉米三种不育胞质(T型、C型、S型)在不同核背景下的CMS材料, 发现它们的败育行为有一个总的趋势和规律, 并提出细胞学观察可以作为不育胞质类型划分的辅助指标。人们通过研究萝卜不育胞质发现<sup>[4~8]</sup>, 具有萝卜Ogura不育胞质的萝卜CMS系和甘蓝CMS系的花药败育均发生在四分体至单核花粉期, 绒毡层行为异常。由于66A、61A的花药败育时期和方式与具Ogura胞质的雄性不育材料相似, 我们推测, “NYcms”胞质可能来自于Ogura胞质。

76A 与 61A 尽管在核组成上十分相似, 但由于各自控制雄性不育的遗传系统不同, 因而在细胞学上的败育存在很大差异。76A 为细胞核雄性不育系, 其花药败育发生在减数分裂期, 类似的情况在白菜型油菜<sup>[9]</sup>和甘蓝型油菜<sup>[10]</sup>都有报道。已知减数分裂是植物世代转变的关键时期, 它是一个有序的过程, 由一系列基因精确的调控。因此减数分裂的异常必然会影响小孢子的发育。而绒毡层细胞作为花粉母细胞的哺育组织, 在植物花药发育过程中起着非常重要的作用。76A 在花药败育过程中, 花粉母细胞的减数分裂和绒毡层细胞同时出现异常, 花药很快败育。

#### 3.2 雄性不育小孢子败育与营养物质供应的关系

花药维管束组织和绒毡层细胞具有向药室内细胞提供营养的重要功能, 而人们在大量雄性不育材料中普遍发现了绒毡层细胞和维管束组织异常的现象<sup>[2,4~6,11,12]</sup>。由此有人推断, 营养物质失调是小孢子败育的原因。本研究中的3份大白菜雄性不育材料在小孢子败

育过程中绒毡层细胞均出现了异常,并且绒毡层的异常行为与药室内细胞的退化有密切关系。但有些研究结果<sup>[13,14]</sup>又与这种推断不符。我们认为,雄性不育作为一个性状而言,其实现是很复杂的。在物质代谢水平上出现营养物质供应失调,可能只是不育基因的一种表现形式。植物雄性不育小孢子的败育时期和方式多种多样,正如 Laser<sup>[12]</sup>推测的那样,雄性不育可能涉及不止一种败育机制。

### 参考文献:

- 1 徐是雄. 植物材料的薄切片和超薄切片技术. 北京: 北京大学出版社, 1981. 168
- 2 王 台, 董 哲. 光周期敏感核不育水稻 58S 不育花药的显微结构变化. 作物学报, 1992, 18 (2): 132 ~ 135
- 3 夏 涛. 玉米细胞质雄性不育的细胞学及组织抗氰呼吸的研究: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 1988. 1 ~ 72
- 4 卞春松. 几份不同遗传类型甘蓝雄性不育花药发育的细胞形态学研究: [硕士学位论文]. 北京: 中国农科院研究生院, 1994. 1 ~ 6
- 5 董庆华, 利容千, 王建波. 萝卜雄性不育系花药发育的细胞形态学研究. 武汉大学学报 (自然科学版), 1996, 42 (2): 207 ~ 212
- 6 任成伟. 萝卜细胞质芸薹属作物雄性不育材料的研究概况, 中国蔬菜. 1992, (2): 42 ~ 45
- 7 Ogura H M. Study on the new male-sterility in Japanese radish with special reference of the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 1968, 6: 39 ~ 68
- 8 Polowick P L. Sawhney V K. Microsporogenesis in a normal line and in the *Ogu* cytoplasmic male-sterile line of *Brassica napus*. Sex. Plant. Report, 1990, 3: 263 ~ 276
- 9 Zuberi S, Ahmad A, Zuberi M I. Male sterility in rapeseed *Brassica campestris* L. Development of male fertile and genic male sterile anthers. Phytomorphology, 1988, 38 (2.3): 219 ~ 221
- 10 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 sterile oilseed rape (*Brassica napus*). Can. J. Bot, 1968, 72 (11): 1055 ~ 1068
- 11 孙日飞, 吴飞燕, 司家钢, 等. 大白菜雄性不育两用系小孢子发生的细胞学研究. 园艺学报, 1995, 2 (2): 153 ~ 156
- 12 Laser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev., 1972, 38 (3): 425 ~ 454
- 13 北京大学生物系. 雄性不育和雄性能育小麦花药和花粉的细胞形态学观察. 作物学报, 1976, 18 (2): 141 ~ 149
- 14 Graybosch R A, Palmer R G. Male sterility in Soybean (*Glycine max*). Amer. J. Bot, 1985, 72 (11): 1738 ~ 1750

## Microsporogenesis of Several Male-Sterile Lines in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*

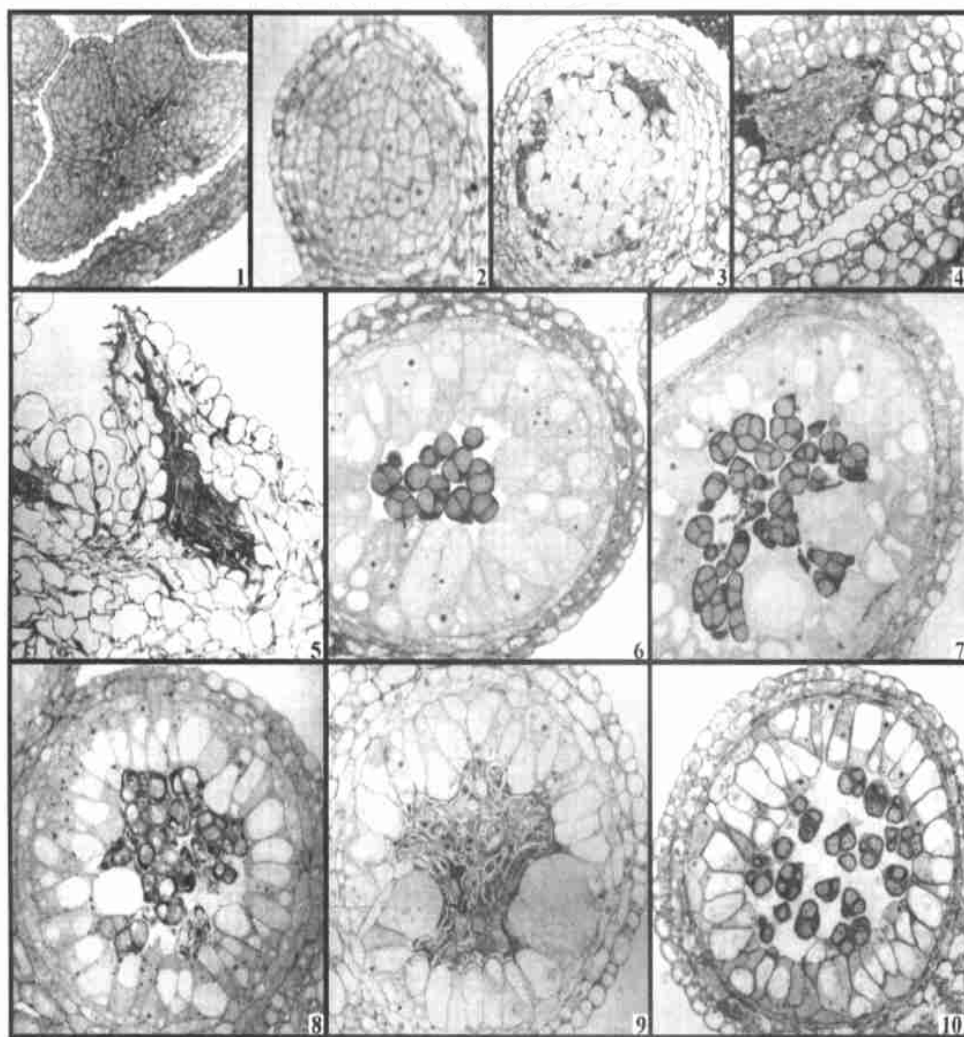
Guo Jingxin, Sun Rifei, Song Jiaxiang, and Zhang Shujiang

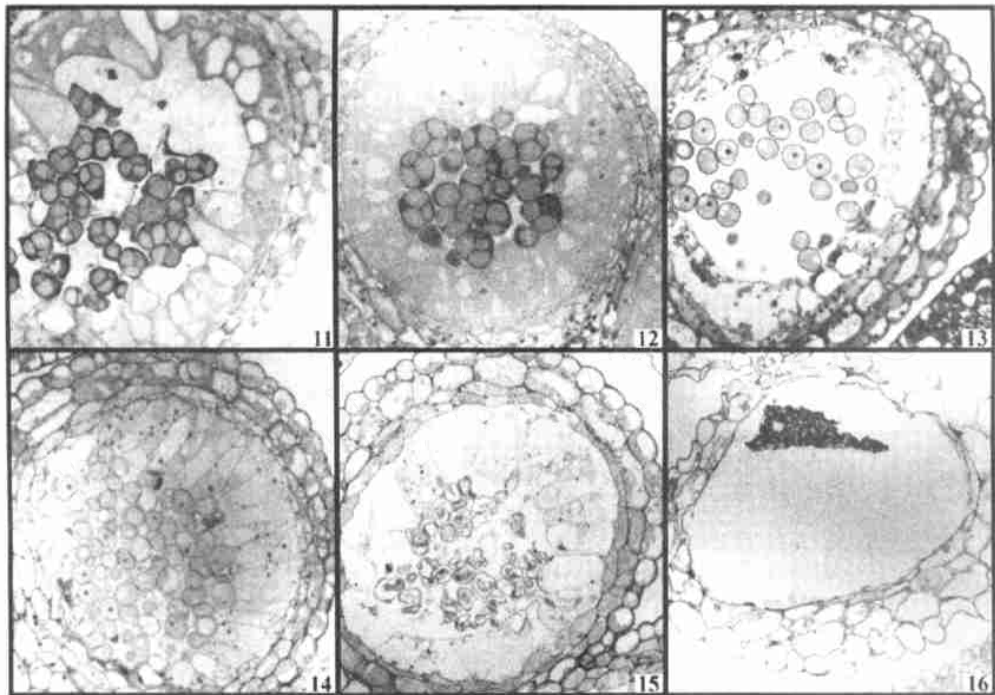
(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** Microsporogenesis of two cytoplasmic male sterile (CMS) lines 66A and 61A, one genic male sterile (GMS) line 76A and their maintainers was investigated cytologically by using plastic semi-thin sections with light microscopy. The complete abortion of 76A occurred at the stage of

meiosis, the pollen mother cells could not develop to form tetrads due to the abnormal meiosis meanwhile the tapetum cells degenerated prematurely. CMS 61A line formed abnormal tetrad. The callose wall did not degenerate and no microspores were released from the tetrad. At the same time, an abnormal morphology of the tapetum cells was observed, which showed either hypertrophy or a formation of periplasmdium. The inhibition of mosporogenesis of CMS 66A occurred at the uninucleate stage when the microspore failed to continue gametogenesis and abnormal vacuolation and rudimental exine were observed. The tapetum cells were abnormal with hypertrophy or forming periplasmdium.

**Key words :** *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*; Male-sterile; Microsporogenesis





**图版说明** 1. 76A 造孢细胞时期, 与可育的基本相同,  $\times 800$ ; 2. 76A 花粉母细胞时期, 示花粉母细胞的细胞壁发生轻微褶皱,  $\times 800$ ; 3. 76A 减数分裂期, 示减数分裂异常, 绒毡层细胞提前解体,  $\times 800$ ; 4. 76A 减数分裂之后, 示绒毡层与花粉母细胞退化为染色很深的无结构物质,  $\times 800$ ; 5. 76A 败育期, 花药细胞皱缩干瘪, 完全败育,  $\times 800$ ; 6. 61A 四分体时期, 示绒毡层膨大, 出现液泡化, 内部出现双核或多核,  $\times 800$ ; 7. 61A 四分体时期稍后, 示绒毡层细胞膨大, 挤压四分体,  $\times 800$ ; 8. 61A 败育初期, 示四分体和绒毡层细胞已呈空壳状,  $\times 800$ ; 9. 61A 败育后期, 示四分体完全变形, 绒毡层细胞内空无一物,  $\times 800$ ; 10. 61A 四分体时期稍后, 示四分体与保留在原位的绒毡层细胞一同降解,  $\times 800$ ; 11. 61A 四分体时期稍后, 示绒毡层形成周原质团,  $\times 800$ ; 12. 66A 四分体时期, 示绒毡层细胞出现液泡,  $\times 800$ ; 13. 66A 小孢子单核期, 示小孢子外壁发育不良, 绒毡层形成周原质团并逐渐退化,  $\times 800$ ; 14. 66A 小孢子单核期, 示绒毡层细胞异常膨大挤压小孢子,  $\times 800$ ; 15. 66A 败育初期, 示小孢子和绒毡层降解为空壳状,  $\times 800$ ; 16. 66A 败育后期, 示小孢子和绒毡层的退化残余物停留在药室,  $\times 800$ 。

**Explanation of plates** 1. 76A Sporogenous cells, as normal,  $\times 800$ ; 2. 76A Pollen mother cells, its wall has little folding,  $\times 800$ ; 3. 76A Meiosis, the tapetum cells degenerated prematurely,  $\times 800$ ; 4. 76A After meiosis, pollen mother cell and tapetum cell have degenerated completely,  $\times 800$ ; 5. 76A Abortion stage,  $\times 800$ ; 6. 61A Tetrads of microspores, the tapetum cells showed vacuolated,  $\times 800$ ; 7. 61A Tetrads of microspores, the tapetum cells showed hypertrophic,  $\times 800$ ; 8. 61A Early stage of abortion, the tetrads and the tapetum cells had no contents,  $\times 800$ ; 9. 61A Late stage of abortion, the tetrads became deformed,  $\times 800$ ; 10. 61A Tetrads of microspores, the tetrads and the tapetum cells had degenerated,  $\times 800$ ; 11. 61A Tetrads of microspores, the tapetum cells had formed periplasmidium,  $\times 800$ ; 12. 66A Tetrads of microspores, the tapetum cells showed vacuolated,  $\times 800$ ; 13. 66A Uninucleate microspore, the wall of microspore were thin, the tapetum cells had formed periplasmidium,  $\times 800$ ; 14. 66A Uninucleate microspore, the tapetum cells showed hypertrophic,  $\times 800$ ; 15. 66A Early stage of abortion, the microspores and the tapetum cells had degenerated,  $\times 800$ ; 16. 66A Late stage of abortion,  $\times 800$ .