

# 茎芥菜细胞质四倍体白菜雄性不育系花药发育的研究

孔艳娥, 张蜀宁\*, 侯喜林, 刘惠吉, 钟程

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要:** 以茎芥菜胞质雄性不育系与四倍体白菜杂交获得的同源四倍体白菜异源胞质雄性不育系及其保持系为材料, 采用形态学和石蜡切片方法研究其花药解剖结构及其发育。结果表明: 该雄性不育系为结构性雄性不育, 其退化或畸形雄蕊分为 5 种类型: 盾状雄蕊、条状雄蕊、片状雄蕊、羽状雄蕊和瓣状雄蕊。该雄性不育系花药发育败育有两个时期, 盾状雄蕊花药败育于孢原细胞分化期, 雄蕊整个发育时期均处在孢原细胞分化期, 无绒毡层与花粉母细胞的分化, 不形成药室, 属孢子体败育型; 其它类型雄蕊, 花药败育发生在雄蕊原基分化时期, 由于雄蕊原基偏离正常的分化轨道, 形成瓣状化雄蕊。

**关键词:** 白菜; 茎芥菜; 同源四倍体; 异源茎芥菜细胞质雄性不育; 雄蕊形态; 花药发育

**中图分类号:** S 634.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 02-0267-06

## Studies on Anther Development of Mustard Tubers Cytoplasmic Male Sterile Lines in Chinese Cabbage

KONG Yan-e, ZHANG Shu-ning\*, Hou Xi-lin, LU Hui-ji, and ZHONG Cheng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Anther anatomical structure and development was observed using a light microscope through paraffin slices on the mustard tubers cytoplasmic male sterility line (CMS) and its corresponding maintainer line in tetraploid Chinese cabbage. The results showed that this allogenic cytoplasmic male sterility belongs to structural male sterility. There were five types in the degraded and abnormal stamens as follows: (1) peltate stamen; (2) stripe stamen; (3) sheet stamen; (4) pinnate stamen; (5) petaloid stamen. The anther development of the tetraploid Chinese cabbage CMS was inhibited at two stage. The abortion of peltate stamen anther occurred at the stage of archesporial cell differentiation, at which there was no differentiation of fibrous layer, middle layers, tapetum and microspore mother cell and no anther sac formed. Peltate stamen of the allogenic cytoplasmic male sterility line belongs to non-sporange cytoplasmic male sterility. And the abortion of other types anther might occur at the stage of stamen anlage polarization. The stamen anlage deviated from the normal polarization and formed petal anlage, developing into petal.

**Key words:** Chinese cabbage; *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino; *Brassica juncea* Czern. et Coss var *tsatsai* Mao; allogenic tetraploid; mustard tubers cytoplasmic CMS; stamen morphological; anther development

关于白菜、花椰菜、甘蓝、萝卜、油菜等作物雄性不育系及其保持系的花药发育已有较多研究报告 (Laser & Lersten, 1972; 余凤群和傅廷栋, 1990; 杨晓云和曹寿椿, 1997; 赵前程等, 2002; 崔辉梅等, 2004; 黄浩等, 2004; 汤伟华等, 2008), 但同源四倍体白菜异源茎芥菜细胞质不育系花

收稿日期: 2008 - 11 - 06; 修回日期: 2009 - 01 - 22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2008341)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: snzhang@njau.edu.cn)

药发育研究未见报道。

刘惠吉和王华 (2004) 获得的同源四倍体白菜异源胞质雄性不育系, 该不育系优于 Ogura CMS 和 Po1CMS, 表现为黄化轻, 蜜腺较正常, 不受低温影响, 不育度与不育率均为 100%, 结实率高, 具实用价值。

作者对其花药发育进行解剖学研究, 旨在探明花药败育时期和方式, 为四倍体白菜异源胞质雄性不育基础理论研究及生产应用提供细胞学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验于 2007—2008 年在南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室进行。

茎芥菜胞质四倍体白菜雄性不育系 (4xA) 由本实验室利用茎芥菜 (*Brassica juncea* Czern. et Coss var *tsatsai* Mao) 胞质雄性不育系 8982-4 ( $2n=2A+2B=36$ , 引自浙江大学) 与同源四倍体白菜 ‘中白梗’ ( $2n=4A=40$ ) 远缘杂交及 9 代回交获得, 其基因组组成与四倍体 ‘中白梗’ ( $2n=4A=40$ ) 相似。

其相应保持系源自四倍体 ‘上海青’ (4xB)。

### 1.2 方法

于 2008 年 3 月中旬晴天上午, 取不育系和保持系现蕾期和初花期花蕾, 卡诺氏固定液固定 2~4 h, 期间抽气 1 次, 在体积分数 70% 的酒精中保存。

常规石蜡切片程序包埋, 制成 8  $\mu$ m 厚的连续切片, 铁矾—苏木精染色, 固绿复染, 树胶封片, 在 Leica DM 1000 显微镜上观察并拍照。

2008 年 4 月上旬, 选取 4xA 和 4xB 花器, 观察记载其雄蕊形态特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 四倍体白菜雄性不育系雄蕊类型及解剖结构

保持系 4xB 雄蕊 6 枚, 浅黄色, 花药发育正常, 横切面呈蝴蝶状 (图版, 1)。不育系 4xA 雄蕊 5~8 枚, 花药发育异常, 横切面呈变形的蝴蝶状, 但不形成药室, 属结构性不育。

不育系雄蕊退化或畸形可分为 5 种类型:

(1) 盾状雄蕊: 花丝短小, 花药盾状白色 (图版, 2), 横切面呈不规则蝴蝶状, 在其非角隅处有 1~3 个染色较深的区域;

(2) 棒状雄蕊: 黄白色, 花药和花丝等径 (图版, 3), 横切面呈两角椭圆形, 在非角隅处有 0~2 个染色较深的区域;

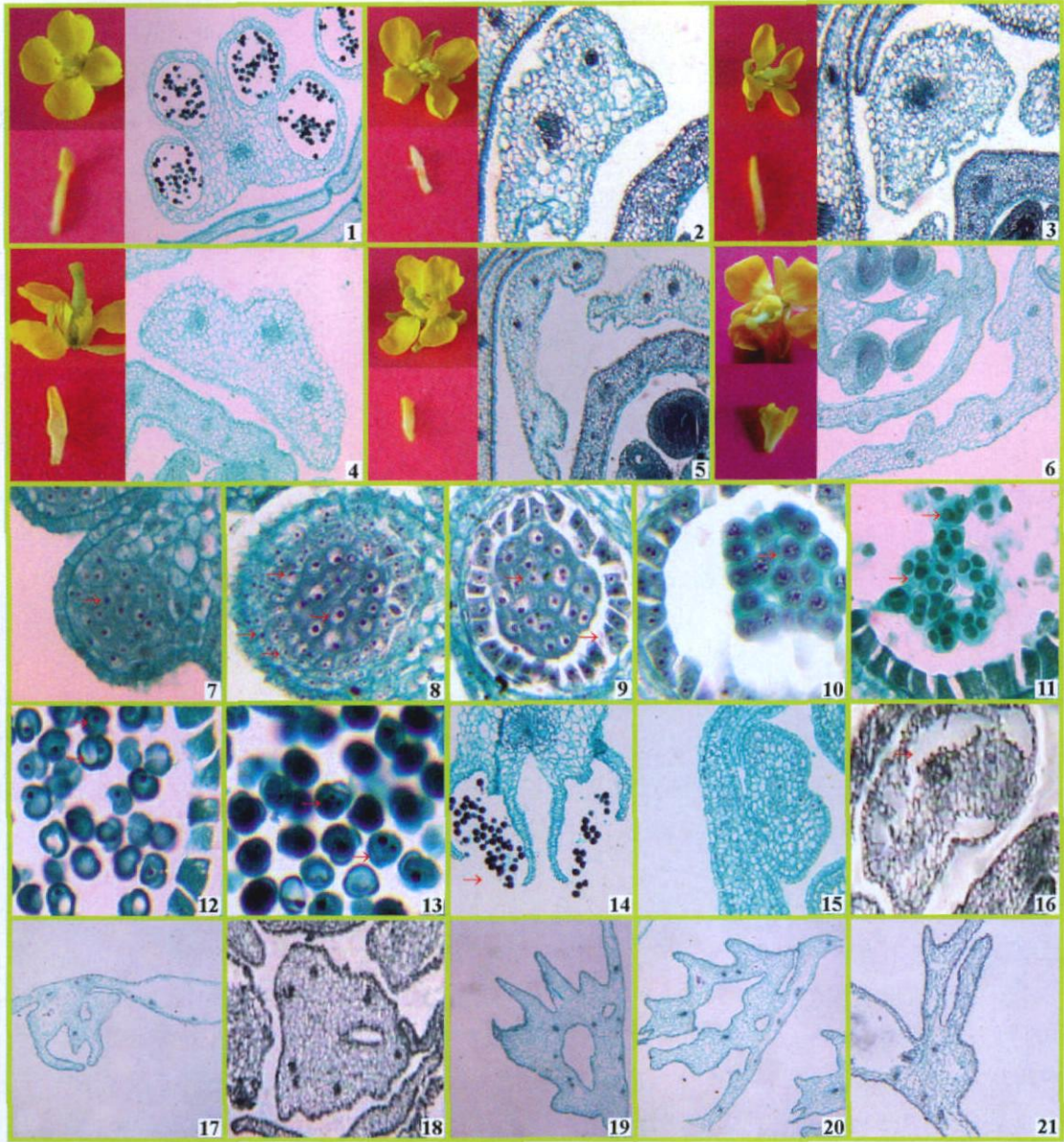
(3) 片状雄蕊: 雄蕊心皮化 (图版, 4), 花药横切面类似叶片, 在非角隅处有 0~2 个染色较深的区域;

(4) 羽状雄蕊: 心皮化雄蕊边缘齿状 (图版, 5), 花药横切面呈蠕虫状, 在非角隅处有 1~3 个染色较深的区域;

(5) 瓣状雄蕊: 形似花瓣 (图版, 6), 黄色, 花药横切面非角隅处有 2~4 个染色较深的区域。

除以上 5 种类型外, 少数雄蕊横切面呈环状畸形 (图版, 17~21), 有 5~10 个染色较深的区域。

此外, 这 5 种类型雄蕊均结实性不同, 盾状雄蕊结实率最高, 每荚为 14.24 粒, 其次是棒状雄蕊为 12.55 粒、羽状雄蕊为 11.17 粒、片状雄蕊为 10.09 粒、瓣状雄蕊为 8.76 粒, 横切面呈环状畸形的雄蕊植株结实率最低, 为 7.32 粒。



图版说明：1. 保持系 4xB 花器及雄蕊横切；2~6 不育系 4xA 花器及雄蕊横切（2 盾状雄蕊；3 条状雄蕊；4 片状雄蕊；5 羽状雄蕊；6 瓣状雄蕊）；7~14. 保持系 4xB 花药发育（7. 孢原细胞分化；8. 造孢细胞、纤维层、中层和绒毡层；9. 花粉母细胞及中层分解；10. 花粉母细胞减数分裂；11. 四分体和释放的小孢子；12. 单核居中及单核靠边；13. 二核及三核花粉；14. 成熟花药及散粉）；15, 16. 不育系 4xA 花药发育（15. 孢原细胞分化前期；16. 开花期的花药）；17~21. 不育系 4xA 退化雄蕊横切。（7~12、17~21.  $\times 100$ ；13.  $\times 1\ 000$ ；14.  $\times 40$ ；15.  $\times 400$ ）。

**Explanation of plates:** 1. Flower and stamen transverse section of 4xB; 2 - 6 Flower and stamen transverse section of 4xA (2. Peltate stamen; 3. Stripe stamen; 4. Sheet stamen; 5. Pinnate stamen; 6. Petaloid stamen); 7 - 14. Anther development of 4xB (7. Differentiation of archesporial cell; 8. Sporogenous cells, fibrous layer, middle layer and tepetal cell; 9. Microspore mother cell and degenerated middle layer; 10. Microspore mother cell at stage of meiosis; 11. Tetrad and released microspores; 12. Mono-nuclear located at the middle and moved to fringe; 13. Binucleate phase and trinucleated pollen; 14. Mature anther and pollen spilled out); 15, 16. Anther development of 4xA (15. At the early stage of archesporial cell; 16. The anther of florescence); 17 - 21. Degraded and abnormal stamens of 4xA. (7 - 12, 16 - 21.  $\times 100$ ; 13.  $\times 1\ 000$ ; 14.  $\times 40$ ; 15.  $\times 400$ ).

## 2.2 四倍体白菜雄性不育系及其保持系花药发育的细胞学观察

4xB 花药发育过程与已有报道 (杨晓云和曹寿椿, 1997; 汤伟华 等, 2008) 的二倍体、四倍体白菜雄性不育保持系基本一致, 先后经历造孢细胞 (图版, 7、8)、花粉母细胞 (图版, 9)、减数分裂 (图版, 10) 及四分体 (图版, 11)、单核花粉 (图版, 12)、二核花粉和三核花粉时期 (图版, 13), 最终发育成成熟花药 (图版, 14)。

4xA 花药发育过程与已报道的二倍体、四倍体白菜雄性不育系有差异, 其花药败育于造孢细胞或造孢细胞形成前, 并且 4xA 盾状雄蕊与其余 4 种雄蕊类型花药发育进程明显不同。

4xA 盾状雄蕊花药比同期 4xB 小, 横切面呈不规则蝴蝶形, 可以分辨出类似于药室的 4 个角隅, 不形成花粉囊, 属无花粉型。

4xA 盾状雄蕊刚现幼蕾时 (蕾长 0.5 mm), 与 4xB 相似, 小花药微显四棱形, 由尚未分化的细胞所组成 (图版, 15)。

在相当于 4xB 孢原细胞时期, 在花药非角隅处有染色深的区域 1~4 个 (图版, 2), 细胞分裂较快, 无造孢细胞分化, 不形成药室结构, 但其维管束发育正常, 细胞染色深。

当 4xB 经孢原细胞至成熟花粉各时期时, 4xA 盾状雄蕊花药发育始终停留在孢原细胞时期 (图版, 2), 少数花药在相当于 4xB 花粉成熟时期, 4 个角隅处细胞逐渐分解出现空腔 (图版, 16)。

4xA 其它 4 种类型雄蕊心皮化, 其花药横切面形状多样, 与花瓣横切相似 (图版, 3~6), 细胞层数多。

在相当于 4xB 花药各个发育时期, 该类型花药没有孢原细胞的形成, 更无造孢细胞和花粉囊的形成, 但有 1~10 个染色深细胞分裂较快的区域, 该区域细胞分化发育类似维管束细胞。这表明其败育时期比 4xA 盾状雄蕊早, 可能发生在雄蕊原基分化时期, 其雄蕊原基偏离正常的分化轨道, 形成花瓣原基, 并最终发育为瓣状化或条状、羽状、片状雄蕊。

## 3 讨论

在细胞质雄性不育系的花药发育过程中, 花粉败育的形式和时期是多种多样的。目前国内外报道的十字花科作物细胞质雄性不育 (CMS) 类型主要有 Po1 CMS (Fu, 1981)、Ogu CMS (Pelletier et al, 1983)、Nap CMS (Slliga & Baba, 1973) 和 Tour CMS (Rawat & Anand, 1979) 等。其中白菜和甘蓝型油菜 Po1 CMS (余凤群和傅延栋, 1990; 汤伟华 等, 2008) 花药发育受阻于孢原细胞分化前; 甘蓝型油菜 Ogu CMS 花药发育受阻于四分体到单核花粉形成之间 (常桂菊和王保仁, 1985); 甘蓝型油菜 Nap CMS 花药败育的原因是由于花药粘连, 以致花粉延迟发育 (Grant et al, 1986); 芥菜型油菜 Tour CMS 败育时期在孢原细胞时期至花粉粒形成各个时期 (万正杰 等, 2006)。

茎芥菜胞质雄性不育系花药败育的时期分为两种 (陈竹君 等, 1995): (1) 孢子体败育型, 花药发育受阻于孢原细胞和造孢细胞时期; (2) 配子体败育型, 小孢子发育受阻, 有单核花粉形成, 但很难形成三核花粉。

本试验材料不育源引自该茎芥菜不育系, 研究表明, 该不育系盾状雄蕊花药发育属孢子体败育型, 其它类型雄蕊花药败育时期较早, 发生在雄蕊原基分化时期, 这种败育方式在白菜上还没见报道, 在其它作物上的报道也很少见。万正杰等 (2006) 用天然野芥雄性不育株转育得到的芥菜型油菜不育系 6-102A 花药发育相似。

由此可见, Po1 CMS、Ogu CMS 和 Nap CMS 等在不同作物上具有相同的败育特征, 但芥菜 CMS 在不同作物上败育特征不同, 但其败育的遗传机理还有待进一步研究。

关于小孢子败育原因的研究, 大多认为花粉败育是因为绒毡层结构异常 (Laser & Lersten, 1972; Kini et al, 1994; 郭晶心等, 2001), 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。本试验结果表明同源四倍体白菜异源胞质不育系花药败育, 是造孢细胞不正常分化或雄蕊原基偏离正常的分化轨道引起的, 这一点不同于前人在细胞质雄性不育上的研究。

同源四倍体白菜异源茎芥菜 CMS 优于 Po1 CMS, 不育性彻底, 不育度 100%, 无低温影响下的微量花粉现象。

该不育性保持系谱较宽, 易转育到其它类型的白菜品种上。

异源细胞质带来了基因组间的杂合性, 遗传变异范围广, 增强其抗逆性和适用性强, 有利于白菜品种杂种优势的利用, 所以该不育系具有广泛应用的潜力。

## References

- Chang Gui-ju, Wang Bao-ren. 1985. Cytologic study of pollen abortion of cytoplasmic male-sterile line in *B. rassica napus* var. *oleiferu* (*Raphanus sativus* L.). Journal of Natural Science of Hunan Normal University, (4): 63 - 66. (in Chinese)
- 常桂菊, 王保仁. 1985. 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, (4): 63 - 66.
- Chen Zhu-jun, Zhang Ming-fang, Wang Bing-liang, Dong Wei-min, Huang Su-qing. 1995. A study on fertility and agronomic characters of CMS lines for tuber mustard. Acta Horticulturae Sinica, 22 (1): 40 - 46. (in Chinese)
- 陈竹君, 张明方, 汪炳良, 董伟敏, 黄素青. 1995. 榨菜胞质雄性不育及其农艺性状的研究. 园艺学报, 22 (1): 40 - 46.
- Cui Hui-mei, Cao Jia-shu, Zhang Ming-long, Yao Xiang-tan, Xiang Xun. 2004. Production of the ogura cytoplasmic male sterile (CMS) lines of chinese cabbage-pak-choi (*B. rassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and turnip (*B. campestris* L. ssp. *rapifera*) and cytological observation of their sterile organs. Acta Horticulturae Sinica, 31 (4): 467 - 471. (in Chinese)
- 崔辉梅, 曹家树, 张明龙, 姚祥坦, 向迅. 2004. 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. 园艺学报, 31 (4): 467 - 471.
- Fu T.D. 1981. Production and research of rape seed in the People's Republic of China. Eucarpia Cruciferae Newsletter, (6): 6 - 7.
- Grant I, Beversdorf W D, Peterson R L. 1986. A comparative light and electron microscopic study of microspore and tapetal development in male fertile and cytoplasmic male sterile oilseed rape (*B. rassica napus*). Canada Journal of Botany, 64 (5): 1055 - 1086.
- Guo Jing-xin, Sun Ri-fei, Song Jia-xiang, Zhang Shu-jiang. 2001. Microsporogenesis of several male-sterile lines in *B. rassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. Acta Horticulturae Sinica, 28 (5): 409 - 414. (in Chinese)
- 郭晶心, 孙日飞, 宋家祥, 张淑江. 2001. 大白菜雄性不育系小孢子发生的细胞形态学研究. 园艺学报, 28 (5): 409 - 414.
- Huang Hao, Liu Li-wang, Chen Chong-shun, Gong Yi-qin, Song Xian-yong, Wei Kai-yu. 2004. Cytological investigation on microsporogenesis of cytoplasmic male sterility in radish. Bulletin of Botanical Research, 24 (3): 306 - 312. (in Chinese)
- 黄浩, 柳李旺, 陈崇顺, 龚义勤, 宋贤勇, 韦开余. 2004. 萝卜 CMS 不育系与保持系小孢子发生的细胞学研究. 植物研究, 24 (3): 306 - 312.
- Kini A V, Seetharam A, Joshi S S. 1994. Mechanism of pollen abortion in cytoplasmic male lines of sunflower. Cytologia, 38: 425 - 454.
- Laser K D, Lersten N K. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile (CMS) angiosperms. Bot Rev, 38 (3): 425 - 454.
- Liu Hui-ji, Wang Hua. 2004. Breeding of alb-cytoplasmic male sterile line in autotetraploid Chinese cabbage pak-choi. Journal of Nanjing Agricultural University, 27 (2): 30 - 33. (in Chinese)
- 刘惠吉, 王华. 2004. 同源四倍体白菜异源胞质雄性不育系的选育. 南京农业大学学报, 27 (2): 30 - 33.
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle, Renard M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Molecular General Genetics, 191: 244 - 250.
- Rawat D S, Anand I J. 1979. Male sterility in Indian mustard. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 39: 412 - 414.
- Slliga T, Baba S. 1973. Cytoplasmic male sterility in oil seed rape (*B. rassica napus* L.), and its utilization to breeding. Japanese Journal of Breeding, 23 (4): 187 - 197.



- Tang Wei-hua, Zhang Shu-ning, Kong Yan-re. 2008. Anther development of Po1 CMS and its corresponding maintainer line in autotetraploid non-heading Chinese cabbage. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 28 (4): 704 - 708. (in Chinese)
- 汤伟华, 张蜀宁, 孔艳娥. 2008. 不结球白菜同源四倍体 Po1 CMS 及其保持系花药发育的解剖学研究. *西北植物学报*, 28 (4): 704 - 708.
- Wan Zheng-jie, Wang Xian-jun, Fu Ting-dong, Tu Jin-xing. 2006. Cytology study on the cytoplasmic male sterile line 6-102A in *B. juncea*. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 28 (3): 268 - 271. (in Chinese)
- 万正杰, 王显军, 傅廷栋, 涂金星. 2006. 芥菜型油菜细胞质雄性不育系 6-102A 的细胞学观察. *中国油料作物学报*, 28 (3): 268 - 271.
- Wang Fu-qing, Wang Cui-lan, Song Zai-hua. 2001. The cytological observation of pollen and anther development in the cabbage 88-3 male sterile line. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 21 (3): 570 - 574. (in Chinese)
- 王福青, 王翠兰, 宋再华. 2001. 大白菜雄性不育系 88-3 花药和花粉发育的细胞形态学观察. *西北植物学报*, 21 (3): 570 - 574.
- Yang Xiao-yun, Cao Shou-chun. 1997. Cytomorphological research on anther development of Po1 CMS in non-heading Chinese cabbage (*B. ramosissima* L. ssp. *chinensis* Makino). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 20 (3): 36 - 43. (in Chinese)
- 杨晓云, 曹寿椿. 1997. 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. *南京农业大学学报*, 20 (3): 36 - 43.
- Yu Feng-qun, Fu Ting-dong. 1990. Cytomorphological research on anther development of several male sterile lines in *B. napus* L. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 8 (3): 209 - 216. (in Chinese)
- 余凤群, 傅廷栋. 1990. 甘蓝型油菜几个雄性不育系花药发育的细胞形态学研究. *武汉植物研究*, 8 (3): 209 - 216.
- Zhao Qian-cheng, Geng Xiao, Chen Xue-ping, Wang Yan-hua, Fang Wen-hui, Zhang Bao-zhen, Zhang Cheng-he. 2002. Cytological observation on microsporogenesis of male sterile line of cauliflower. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 17 (2): 108 - 111. (in Chinese)
- 赵前程, 耿宵, 陈雪平, 王彦华, 方文慧, 张宝珍, 张成合. 2002. 花椰菜雄性不育系小孢子发育过程及 POD 活性. *华北农学报*, 17 (2): 108 - 111.

## 图书推荐

### 《蔬菜学》

本书由方智远院士主编, 江苏科学技术出版社出版发行。全书共分 7 大章, 33 个小节, 44 万字, 552 页, 本书系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就; 比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容; 简述了 21 世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体, 有利于读者更加深入地了解蔬菜学, 研究蔬菜学, 是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价: 47 元 (含邮费)。

### 《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷, 1~6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2 263 个品种, 1 347 页; 7~12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2 550 个品种, 1 177 页。入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子子公司、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。