

新型甘蓝型油菜温敏核不育系SP2S的花药发育解剖学观察

郭英芬¹, 葛娟¹, 于澄宇^{1*}, 张国云², 董军刚¹, 董振生^{1*}

西北农林科技大学¹农学院, ²大型仪器设备管理中心, 陕西杨凌712100

摘要: SP2S是西北农林科技大学选育的甘蓝型油菜温敏核不育系, 本文采用半薄树脂切片、扫描电镜对SP2S及其可育近等基因系SP2F的花药发育及花粉形态进行观察比较, 发现SP2S花药发育在减数分裂时期出现异常, 单核花粉时期彻底败育。其主要特征是: 减数分裂时期绒毡层已经径向肥大且出现大液泡, 胼胝质不能及时降解, 使得单核小孢子相互粘连在一起, 小孢子无花粉壁的形成且细胞质物质逐渐降解, 最后小孢子仅剩下空壳残留物, 聚集在一起。SP2S败育特征与现有的核不育材料不同, 表明其有可能是一种新型温敏核不育材料。

关键词: 甘蓝型油菜; 光温敏不育; 花药败育; 解剖学观察; 小孢子

Anatomical Observation of Anther Development of a New Thermo-Sensitive Genic Male Sterile Line SP2S in *Brassica napus* L.

GUO Ying-Fen¹, GE Juan¹, YU Cheng-Yu^{1*}, ZHANG Guo-Yun², DONG Jun-Gang¹, DONG Zhen-Sheng^{1*}

¹College of Agronomy, ²Management Centre for Large Equipment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: SP2S is a new type thermo-sensitive genic male sterile line of *Brassica napus* breeding in Northwest A&F University. The anatomical characters of pollen and the anther development of SP2S at different stages were compared with its near isogenic line SP2F by semi-thin sections and scan electronic microscopy. The result indicated that the anther abortion occurred at the stage of meiosis and the anther completely aborted at the later stage of uni-nucleate. The tapetal cells were highly vacuolated and deformed at the stage of meiosis. Callose around the tetrads couldn't be degraded timely, which made the microspores adhesion with each other. And then the microspores didn't form the extine normally. The cytoplasm of pollen cells decayed gradually and at last became empty. These evidences obviously indicate that SP2S is probably a new thermo-sensitive male sterile line which is different from the previously materials.

Key words: *Brassica napus* L; thermo-sensitive male sterility; anther abortion; anatomical observation; microspore

甘蓝型油菜(*Brassica napus*)是一种重要的油料作物, 其杂种优势利用已经获得巨大成功, 光、温敏雄性不育是继细胞质不育、细胞核不育、化学杀雄之后又一重要的油菜杂种优势利用途径(于澄宇2011)。甘蓝型油菜中相继发现了温敏核不育系湘油91S (席代汶等1994)以及光、温敏核不育系H90S (王华等2003)、N196S (刘尊文等2006)、373S (于澄宇等2007)、H50S (孙晓敏等2009)等。目前已有温敏核不育两系杂交油菜‘湘杂油5号’(席代汶等2005)等通过品种审定, 表明两系杂交油菜具有广阔的应用前景。

关于油菜雄性不育花药发育的细胞形态学研究, 前人已经做了大量的工作。余凤群和傅廷栋(1990)比较几种不同类型的雄性不育系花药败育过程, 将甘蓝型油菜雄性不育系分为无花粉囊型、花粉母细胞败育型、单核花粉败育型3类。

作为一类新型雄性不育, 光、温敏核不育的细胞学观察目前很少, 核不育类型的H50S (孙晓敏等2009)和373S (李玮2007)败育发生在单核期, 而其他材料的细胞学未见报道。课题组从一份欧洲油菜资源后代发现并选育的甘蓝型油菜温敏细胞核不育系SP2S, 表现为低温可育、高温不育, 光周期对育性转换没有明显影响。SP2S与现有光温敏材料有明显不同, 既没有温敏不育系湘油91S (席代汶等1994)的稳定不育株分离的现象, 遗传测验也和课题组早期选育的光温敏不育系373S、Hui-

收稿 2011-11-29 修定 2011-12-28

资助 国家自然科学基金(31071454)、教育部新世纪优秀人才项目(NCET-10-0693)和中央高校基本科研业务费专项(QN2009008)。

* 共同通讯作者(E-mail: yu1009@nwsuaf.edu.cn, dzs05319@163.com; Tel: 029-87082854)。

you50S (葛娟等待发表)不等位, 而且在陕西杨凌大田环境下SP2S的不育性更为稳定, 在杂交育种中更为安全。因此, SP2S很可能是一种新型温敏隐性细胞核不育系。本文利用半薄切片对SP2S花药发育的细胞形态学进行观察, 探讨雄性不育系小孢子败育时期和特点, 为油菜光温敏雄性不育类型划分及两系杂交种的选育奠定基础。

材料与amp;方法

1 材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)温敏细胞核不育系SP2S及其可育近等基因系SP2F于2010年9月播种, 12月初通过春化后移栽温室培养。温室人工光源为Philips SonT Agro 430生长灯, 光强度大于 $910 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$, 设置光周期为昼12 h/夜12 h, 温度为昼 24°C /夜 18°C , 在此条件下SP2S表现为完全不育。同时在人工气候培养箱中对SP2S进行3种不同温度处理[$12^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$ 、 $18^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$ 、 $24^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$, 光周期均为12 h/12 h (昼/夜)], 每组温度处理15 d, 开花后育性分别为可育、半不育和不育。

2 方法

2.1 花粉粒扫描电镜观察

分别取SP2S不育株和半不育株及SP2F新鲜

花朵, 用双面胶将花粉直接粘于样品台上(为避免花粉粒散失, 不使用脱水、干燥程序), 以LB3型离子溅射仪镀上一层金属膜后, 用日本电子株式会社产JSM6360LV型扫描电镜观察。

2.2 半薄切片制样及观察

油菜现蕾开花后, 分别取SP2S和SP2F的不同大小的花蕾, 捣碎雄蕊, 1%醋酸洋红染色进行镜检, 确定小孢子、花粉发育各个时期, 分组取样, 迅速投入固定液[4%戊二醛, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.8)]中并抽气使其浸没, 然后 4°C 过夜处理, 基本程序同杨光圣等(1999)。用瑞典LKB2088切片切片机切片, 半薄切片厚 $2\sim 3 \mu\text{m}$, 2%甲苯胺蓝染色, Olympus-BX51显微镜观察并照相。

实验结果

1 SP2S花器官形态比较

SP2S从可育到不育的育性转换阶段雄蕊数目渐次减少, 花朵逐渐变小(图1)。可育花药较肥大, 可以释放较多花粉(图1-A)。不育花花冠较小, 花丝较短, 雄蕊低于花冠(图1-E), 花药褐色干瘪纤细, 不能释放有活力花粉。

2 花粉扫描电镜观察结果

扫描电镜观察表明, SP2F可育株花粉可育度

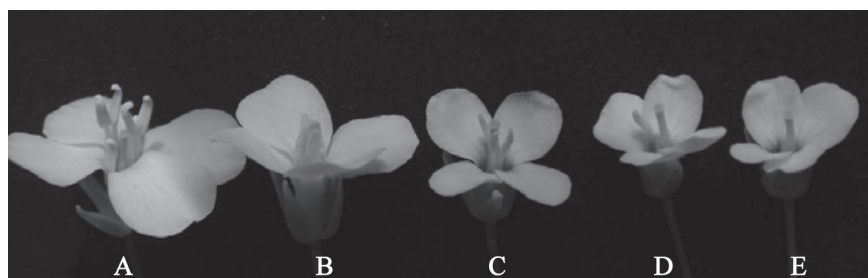


图1 SP2S不同育性的花朵

Fig.1 Flowers of SP2S at different fertile level

A: 可育花; B, C, D: 半不育花; E: 全不育花。

很高, 畸形花粉粒较少(图2-A), 多数花粉粒为椭圆形, 外形饱满, 花粉壁表面呈网状, 网眼不规则, 具有三条萌发沟(图2-B)。SP2F半不育株花药上可育、不育花粉共存, 不育花粉外形呈现扭曲、凹陷等, 且形成的畸形花粉粒相互粘连在一起(图2-C)。不育株SP2S花粉粒数目很少, 在同一视野下很难发现多个花粉, 花粉粒严重畸形。完全败

育的畸形花粉粒明显比可育花粉小、干瘪、形态不规则(图2-D)。

3 SP2F与SP2S花药发育的解剖学观察

造孢细胞时期: SP2F花药可以分化形成造孢细胞和各壁细胞。此时, 花药横切面呈蝴蝶状(图3-A)。

花粉母细胞减数分裂至四分体时期: SP2F与

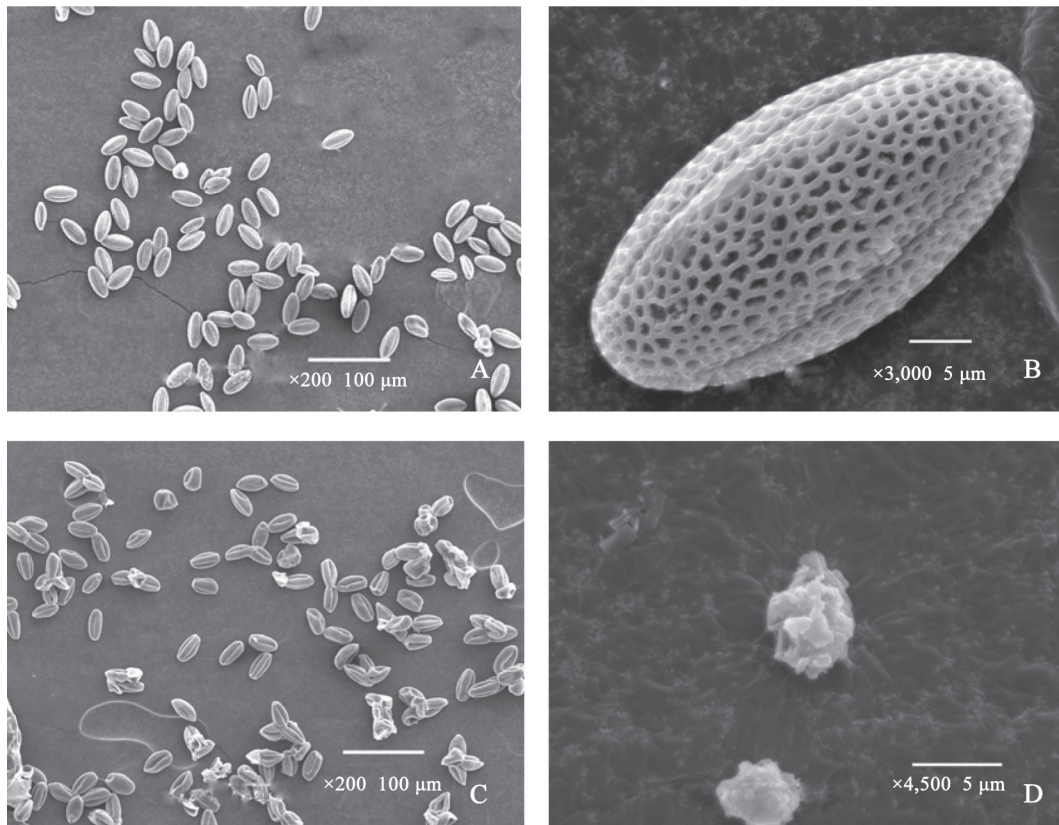


图2 SP2F、SP2S花粉粒的扫描电镜图

Fig.2 Scan electronic microscopic structure of SP2F and SP2S

A,B: SP2F可育花粉; C: SP2F半不育花粉; D: SP2S不育花粉。

SP2S花粉母细胞均由早期的多边形逐渐向圆形过渡(图3-B, 图4-A), SP2F的花药经减数分裂形成四分体, 四分体由胼胝质包裹, 呈四面体型(图3-C)。而SP2S花药发育异常始于减数分裂时期。整个减数分裂过程中, 最明显的差异为绒毡层细胞明显液泡化且径向肥大, 二分体、四分体被挤压成一团(图4-B, C); 且形成的四分体较SP2F的染色浅(图3-C, 图4-C)。

单核花粉时期: SP2F的初生小孢子成不规则形状, 细胞壁很薄, 无液泡且染色较深, 细胞核位居细胞中央(图3-D)。随后细胞内开始液泡化, 细胞核移向细胞一侧(图3-E)。花粉壁出现三边加厚的特征并趋于圆形, 形成单核花粉粒(图3-F)。相比之下, SP2S的胼胝质不能及时降解, 形成的单核小孢子排列紧密, 相互粘连在一起; 小孢子细胞质稀薄、染色浅(图4-D)。同时小孢子无花粉壁的加厚, 小孢子内的细胞质物质逐渐降解, 最终变成无

内容物的空泡; 整个过程中绒毡层不断径向肥大且液泡化, 其细胞质亦逐渐降解, 最终仅剩空壳(图4-E, F)。

双核和成熟花粉时期: SP2F的单核花粉经过两次不均等分裂形成二核花粉(图3-G)及成熟花粉(图3-H), 绒毡层不断降解直至完全解体。但SP2S小孢子内的细胞质物质及绒毡层的异常降解, 使得小孢子不能进行有丝分裂形成花粉粒, 最终变为空壳残留在花粉囊内(图4-G)。小孢子和绒毡层最终成为花粉囊内一团染色较深的物质, 花药彻底败育(图4-H)。

通过捣碎花药经醋酸洋红染色直接压片观察, 发现SP2F的花粉为暗红色, 表明花粉内染色质丰富(图3-I)。而SP2S初生单核小孢子细胞内容物收缩畸形, 外部的胼胝质不能及时降解, 单核小孢子不容易分开, 相互之间容易粘连(图4-I), 这与切片观察结果一致(图4-D, E)。

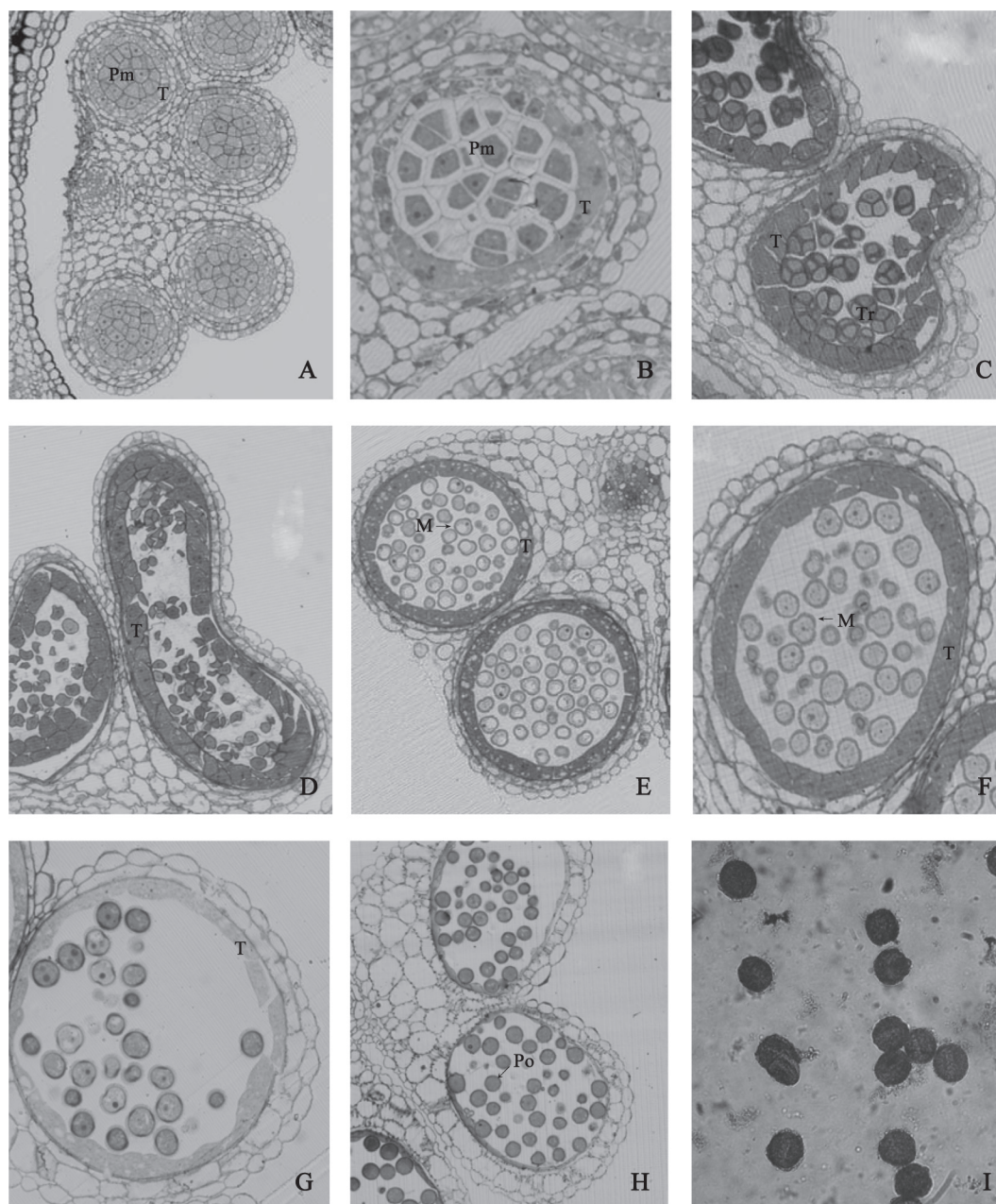


图3 SP2F花药发育的细胞学观察

Fig.3 Microscopical structure of SP2F anthers at different development stages

A: 造孢细胞时期, $\times 200$; B: 花粉母细胞时期, $\times 400$; C: 四分体时期, $\times 400$; D, E, F: 单核期, E: $\times 200$, D, F: $\times 400$; G: 双核期, $\times 400$; H: 成熟期, $\times 200$; I: 成熟花粉压片, $\times 400$ 。图中缩写字母含义如下, M: 小孢子; Pm: 花粉母细胞; Po: 花粉粒; T: 绒毡层; Tr: 四分体。

讨 论

1 SP2S败育的细胞学特征

前人已经对甘蓝型油菜雄性不育系的花药发育进行了研究(董军刚等2004; 李慧等2010; 李玮2007; 孙晓敏等2009; 杨光圣等1999; 余凤群等1990; González-Melendi等2008; Wei等2009; Wan等2008),

但早期研究多采用石蜡切片, 对细胞结构的剖析不是很清楚。不育系Hau CMS败育很早, 在雄蕊原基分化期(Wan等2008), Polima CMS、nap CMS、533S等在孢原细胞时期败育, 彻底败育后无花粉囊(董军刚等2004; 余凤群等1990), Ogura CMS在四分体至单核期败育(González-Melendi等

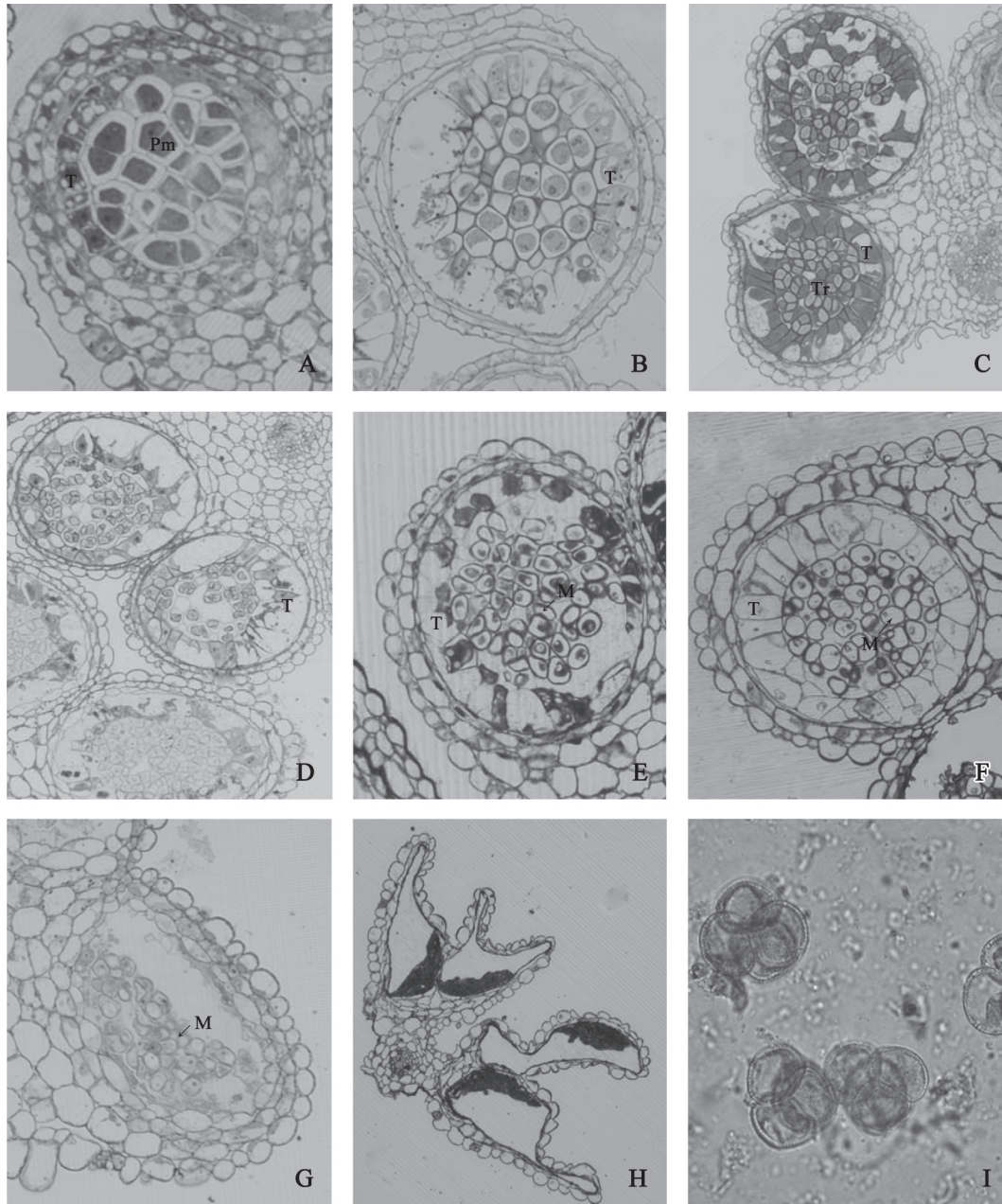


图4 SP2S花药发育的细胞学观察

Fig.4 Microscopical structure of SP2S anthers at different development stages

A: 花粉母细胞初期, $\times 400$; B: 减数分裂I后期, $\times 400$; C: 四分体时期, $\times 200$; D, E, F, G: 单核期(败育时期), D, E, G: $\times 200$, F: $\times 400$; H: 败育的花药, $\times 200$; I: 光镜直接观察到的四分体-单核期败育, $\times 400$ 。图中缩写字母含义如下, M: 小孢子, Pm: 花粉母细胞, Po: 花粉粒, T: 绒毡层, Tr: 四分体。

2008), NCa CMS的花药败育发生在单核花粉晚期(Wei等2009), 而多数甘蓝型油菜核不育材料属于花粉母细胞-单核花粉时期败育型: 隐性核不育系S45A、117A败育于四分体至单核小孢子阶段(杨光圣等1999); 上位互作核不育9012A及其衍生材料1740A败育于四分体时期(李慧等2010; Dun 等

2011; Wan 等2010; Zhu等2010); 光、温敏核不育系H50S (孙晓敏等2009)、373S (李玮2007)、Huiyou50S (葛娟等待发表)为单核花粉败育型。

双隐性核不育117A败育始于四分体时期, 胼胝质能很快降解, 释放出游离单核小孢子(杨光圣等1999)。上位互作核不育9012A小孢子发育停留

在四分体时期, 胼胝质不能降解, 小孢子不能释放出来, 以四分体的形式逐渐降解(李慧等2010; Wan等2010; Zhu等2010)。本文发现SP2S花药败育和其他核不育有类似之处, 即在单核花粉期彻底败育。但从绒毡层结构、胼胝质、小孢子游离状态变化来看, SP2S败育特征与现有核不育均有不同, SP2S败育始于花粉母细胞减数分裂时期, 绒毡层异常膨大, 胼胝质不能及时降解, 小孢子相互粘连在一起。虽然9012A及其衍生材料1740A(杨光圣等1999; 李慧等2010; Wan等2010; Zhu等2010)的败育与SP2S有相似的地方, 即绒毡层异常膨大, 小孢子聚集, 但SP2S绒毡层膨大较早, 更为明显, 而且9012A及其衍生系为稳定不育, 没有低温可育的特征。

目前关于油菜光温敏雄性不育系花药发育的细胞学研究很少。H50S(孙晓敏等2009)、373S(李玮2007)败育比较类似, 都发生在单核期, 小孢子被释放出来, 无液泡, 花粉粒壁可以发育, 细胞质物质解体, 只剩下花粉空壳, 不同之处在于H50S绒毡层消失缓慢, 而373S绒毡层解体较早。据我们观察, 光温敏核不育Huiyou50S败育也发生在单核期, 小孢子细胞质收缩、解体, 最终只剩余空瘪的花粉壳; 花药绒毡层在单核后期提前降解, 绒毡层解体速度快于可育株(葛娟等待发表数据)。可见, 上述光温敏核不育材料都没有绒毡层异常膨大的现象, 与温敏核不育系SP2S的败育存在较大差异。

2 绒毡层与花药败育的关系

绒毡层是花药壁最内一层包围花粉母细胞或小孢子的细胞, 发育到一定阶段, 需要经过一个细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)的降解过程为小孢子的发育提供营养和物质保证, 因此绒毡层细胞降解的提前或者延迟都将导致雄性不育(张虹等2008; Vizcay-Barrena等2006)。我们的研究结果显示, SP2S花药发育过程中, 绒毡层细胞在花粉母细胞时期已经向肥大且出现较大的液泡, 绒毡层细胞提前降解, 没有正常的PCD程序, 小孢子得不到正常发育所需的营养物质和结构物质, 无法实现细胞壁的形成与加厚。由此可见SP2S绒毡层的异常与花药败育有密切的联系。

本研究结果初步显示, SP2S花药败育始于花

粉母细胞减数分裂时期, 于单核花粉期彻底败育, 其败育特征与现有的核不育材料不同, 表明该不育系有可能是一种全新的温敏核不育材料。从低温、高温不同温度处理的比较来看, 温度处理对SP2S花序上长度2 mm及以后的小花蕾育性才有明显的影响(未发表数据), 与此相对应的发育时期是花粉母细胞阶段, 这与本文细胞学观察结果一致, 表明SP2S育性转换敏感时期是花粉母细胞时期。但目前研究仅对该不育系花药败育的显微水平有了初步的了解, 还有待通过透射电镜等对其花药败育的超微结构进行更深一步了解, 从中发现更为清楚、细致的花药败育特征, 为该不育系的进一步研究与利用提供理论基础。

参考文献

- 董军刚, 董振生, 刘绚霞, 刘创社, 李红兵(2004). 甘蓝型油菜生态雄性不育系533S花药发育的细胞学研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 32(7): 61~66
- 李慧, 胡胜武, 李玮, 于澄宇(2010). 甘蓝型油菜隐性上位互作核不育系的选育及其细胞学研究. 西北农林科技大学学报, 38(1): 111~118, 124
- 李玮(2007). 油菜生态核不育373S及芥菜型油菜黄花突变体的研究[硕士论文]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学
- 刘尊文, 吴平, 袁卫红, 周贱根, 周小萍(2006). 甘蓝型油菜光温敏核不育两用系N196S的选育. 江西农业大学学报, 28(5): 654~658
- 孙晓敏, 胡胜武, 于澄宇(2009). 油菜生态不育系H50S花药发育的细胞学观察. 西北农业学报, 18(5): 153~158
- 王华, 汤晓华, 赵继献(2001). 甘蓝型细胞核雄性不育材料H90S的遗传研究. 中国油料作物学报, 23(4): 11~15
- 席代汶, 陈卫江, 宁祖良(1994). 甘蓝型油菜温敏核不育系“湘91S”的选育. 湖南农业科学, (4): 17~18
- 席代汶, 郭贤梦, 宁祖良, 邓锡兴, 陈卫江, 易冬莲, 李莓, 黄虎兰, 丁登杰(2005). 优质两系杂交油菜湘杂油5号的选育. 中国油料作物学报, 27(1): 23~25
- 杨光圣, 瞿波, 傅廷栋(1999). 三个甘蓝型油菜隐性核不育系小孢子发生的细胞学研究. 华中农业大学学报, 18(6): 520~523
- 于澄宇(2011). 甘蓝型油菜授粉控制系统研究现状与前景. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 39(9): 1~8
- 于澄宇, 李玮, 常建军, 胡胜武(2007). 油菜温敏雄性不育系373S的选育. 中国农学通报, 23(7): 245~248
- 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. 武汉植物学研究, 8(3): 209~216
- 张虹, 梁婉琪, 张大兵(2008). 花药绒毡层细胞程序性死亡研究进展. 上海交通大学学报: 农业科学版, 26(1): 86~90
- Dun XL, Zhou ZF, Xia SQ, Wen J, Yi B, Shen JX, Ma CZ, Tu JX, Fu TD (2011). BnaC.Tic40, a plastid inner membrane translocon originating from *Brassica oleracea*, is essential for tapetal function and microspore development in *Brassica napus*. Plant J, 68: 532~545

- González-Melendi P, Uyttewaal M, Morcillo CN, Hernández Mora JR, Fajardo S, Budar F, Lucas MM (2008). A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*). *J Exp Bot*, 59 (4): 827~838
- Vizcay-Barrena G, Wilson ZA (2006). Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant. *J Exp Bot*, 57: 2709~2717
- Wan LL, Xia XY, Hong DF, Li J, Yang GS (2010). Abnormal Vacuolization of the tapetum during the tetrad stage is associated with male sterility in the recessive genic male sterile *Brassica napus* L line 9012A. *J Plant Biol*, 53: 121~133
- Wan ZJ, Jing B, Tu JX, Ma CZ, Shen JX, Yi B, Wen J, Huang T, Wang XJ, Fu TD (2008). Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (*hau*) in *Brassica juncea* and its transfer to *B. napus*. *Theor Appl Genet*, 116: 355~362
- Wei WL, Wang HZ, Liu GH (2009). Cytological and molecular characterization of a new cytoplasmic male sterility in rapeseed. *Plant Breeding*, 128 (4): 426~428
- Zhu Y, Dun XL, Zhou ZF, Xia SQ, Yi B, Wen J, Shen JX, Ma CZ, Tu JX, Fu TD (2010). A separation defect of tapetum cells and microspore mother cells results in male sterility in *Brassica napus*: the role of abscisic acid in early anther development. *Plant Mol Biol*, 72: 111~123