

甘蓝型油菜生态雄性不育系 533S 花药发育的细胞学研究^{*}

董军刚, 董振生, 刘绚霞, 刘创社, 李红兵

(西北农林科技大学 农学院经作所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对甘蓝型油菜生态雄性不育系 533S 的花药发育过程进行了石蜡切片和显微观察, 结果表明: 533S 的花药发育受阻于孢原细胞时期, 其主要特点是不能形成正常的孢原细胞进而分化出花粉囊, 属无花粉囊型不育系。在败育过程中, 花药的大小一直在增加, 但始终无花粉囊的分化。随着生态条件的变化, 533S 的部分花药可分化出 1~2 个花粉囊, 产生少量可育花粉粒。最终, 随着生态条件的进一步变化, 花药的发育完全正常, 产生大量正常可育花粉粒。

[关键词] 甘蓝型油菜; 生态不育系; 花药发育; 细胞学

[中图分类号] S565 401

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0061-06

自水稻光敏雄性不育系农垦 58S^[1]发现以后, 在不同类型油菜中也发现了生态雄性不育系。如甘蓝型油菜生态雄性不育系湘 91S, AB₁, H90S, 501-8S 等及芥菜型油菜生态雄性不育系“遵矮 S”^[2]。对水稻、小麦的生态雄性不育系的细胞学研究较多, 但对油菜生态雄性不育系的细胞学研究却未见报道。作者从甘蓝型油菜 Ledos × 3645 的 F₃ 代群体中, 发现了几株对生态环境敏感的不育株, 后经自交选育成生态雄性不育系 533S^[3]。该不育系属低温短日照不育型, 在陕西杨凌种植具有特殊的表现, 即前期开的花不育; 中期开的花为半不育, 自交可少量结实; 后期开的花为正常可育, 自交可大量结实。本研究利用石蜡切片观察了 533S 花药发育过程, 旨在阐明 533S 花药发育的特点, 探求其育性变化的细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

甘蓝型油菜生态雄性不育系 533S 由本课题组选育, 对照材料为来源于选育 533S 的组合 Ledos × 3645 的高代可育自交系。

1.2 方 法

油菜现蕾后取油菜花蕾, 迅速投入 Carnoy's 液中固定, 体积分数 70% 酒精保存。以后每隔 3 d 取样

1 次, 直到终花前。石蜡包埋, 旋转式切片机切片, 切片厚度 10 μm。海氏苏木精染色, 加拿大树胶封藏, Olympus BH-2 显微镜观察并照相。显微测量花药横切面最大长度与最大宽度及子房横切面直径。

2 结果与分析

2.1 正常花药与雌蕊的发育过程

据余凤群等^[4]、杨光圣等^[5]报道, 正常油菜的花药发育可分为孢原细胞时期、造孢细胞时期、花粉母细胞减数分裂至四分体时期、单核花粉期、二细胞花粉期、三细胞花粉期等。按照以上划分方法, 对发育正常的对照材料花药发育过程进行了观察, 同时对相应时期雌蕊的发育进行了观察。

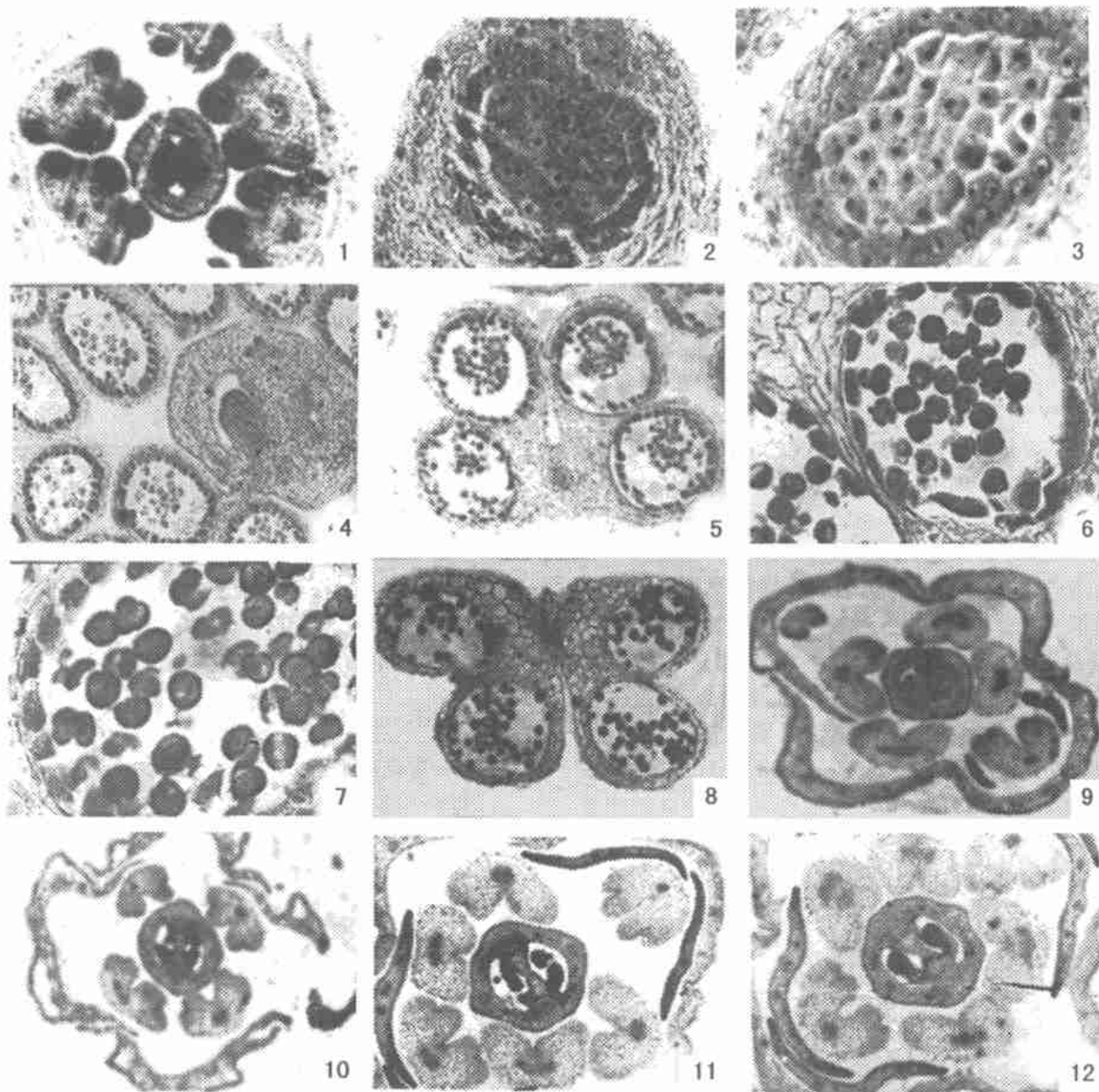
2.1.1 孢原细胞时期 在花蕾横切面上, 可见 1 个雌蕊和 6 个雄蕊, 雄蕊呈圆形或稍呈椭圆形, 直径约为 200 μm 左右, 细胞染色均匀。雌蕊内无子房腔的分化, 直径约为 200 μm 左右。

2.1.2 造孢细胞时期 花药的 4 个角上出现 4 个染色较深的区域, 绒毡层不易辨认。后来形成清晰的药室, 药室的壁层完整。维管束区域也被染色, 十分清晰。花粉囊内的细胞均被染色, 核质染色深浅一致, 核仁清晰。子房内出现假隔膜, 胚珠原始体出现。子房直径 220 μm 左右, 花药横切面大小约为 300 μm × 270 μm (图版 I-1)。

^{*} [收稿日期] 2003-11-10

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2003C09); 西北农林科技大学青年科研专项基金项目

[作者简介] 董军刚(1972-), 男, 陕西岐山人, 助研, 主要从事油菜育种研究。



图版 I 甘蓝型油菜正常花药发育和生态雄性不育系 533S 花药发育的显微结构

1. 正常花药造孢细胞时期, $\times 50$; 2. 正常花药花粉母细胞早期, $\times 132$; 3. 正常花药花粉母细胞减数分裂早期 $\times 132$; 4. 正常花药四分体时期, $\times 26$; 5. 正常花药单核早期, $\times 67$; 6. 正常花药单核晚期, $\times 67$; 7. 正常花粉粒, $\times 200$; 8. 正常花药三核期, $\times 33$; 9. 不育花药造孢细胞时期, $\times 20$; 10. 不育花药花粉母细胞减数分裂至四分体形成期, $\times 20$; 11. 不育花药单核期, $\times 20$; 12. 不育花药二三核期, $\times 20$

Plate I Development of normal anther and ecological male sterile line 533S

1. Cross section of a normal bud at the stage of sporogenous cell, $\times 50$; 2. Cross section of a normal anther at the stage of early pollen mother cell, $\times 132$; 3. Cross section of a normal anther at the stage of meiosis, $\times 132$; 4. Cross section of a normal bud at the stage of tetrad $\times 26$; 5. Cross section of normal anther at the stage of early mono-nucleus microspore, $\times 26$; 6. Cross section of a pollen sac at the stage of lately mono-nucleus microspore, $\times 67$; 7. The normal pollen with thickness increased, $\times 200$; 8. Cross section of a normal anther in which there are mature pollen, $\times 33$; 9. Cross section of 533S bud at the stage sporogenous cell, $\times 20$; 10. Cross section of 533S bud at the stage from meiosis to tetrad, $\times 20$; 11. Cross section of 533S bud at the stage of equaling to mono-nucleus microspore $\times 20$; 12. Cross section of 533S' bud at the stage of equaling to mature pollen, $\times 20$

2. 1. 3 花粉母细胞减数分裂至四分体时期 早期 的花粉母细胞相互连成一片, 均被染色。此时, 药室

药隔清晰, 绒毡层发育较为清晰, 有明显核仁存在。此期胚珠原始体增大。接着花粉母细胞分离, 变为单个圆球形细胞。同期的绒毡层非常规则, 成圈状排列, 个别细胞内可见 2 个明显的核仁存在。至四分体形成时, 绒毡层内出现多核细胞。此时雌蕊内已形成小球状胚珠和珠柄, 此期内子房直径为 220~ 300 μm , 雄蕊横切面为 (300~ 380) $\mu\text{m} \times$ (250~ 300) μm , 四分体大小为 15 μm 左右(图版 I-2~ 4)。

2.1.4 单核期 花粉粒从四分体中释放出来, 形成单个花粉粒, 花粉粒壁不明显。药室中层细胞径向变薄, 花瓣稍有加宽。随后, 绒毡层细胞开始解体, 药室中层消失。此期的子房腔内胚珠体积加大。子房直径为 300~ 450 μm , 雄蕊横切面为 (400~ 720) $\mu\text{m} \times$ (270~ 420) μm , 花粉粒直径 8~ 14 μm (图版 I-5, 6)。

2.1.5 二细胞花粉、三细胞花粉期 花粉粒出现清晰的壁层, 圆球形, 核仁处于中央, 后变为三棱状圆形, 最终成为壁层清晰的圆球形。绒毡层细胞的细胞质染色浅, 核不清晰, 但核仁明显, 最终消失。药室只留表皮层和增厚的纤维层。此期雌蕊内胚珠、珠柄已

清晰可见, 珠被形成, 最后形成成熟的胚囊。处于此期的花药横切面大小为 (700~ 1 000) $\mu\text{m} \times$ (410~ 620) μm , 子房直径为 500~ 600 μm , 花粉粒直径为 15~ 22 μm (图版 I-7, 8)。

2.2 533S 雄性不育花药的细胞学特点

2.2.1 533S 花药的发育特点 对 533S 不育花药的细胞学观察表明, 子房腔内胚囊已形成, 花瓣加宽且有重叠, 而雄蕊仍处于孢原细胞时期, 呈蝶形、肾形、方形等, 形状不一, 大小不等。花药角隅处无染色深的区域, 无造孢细胞的分化, 维管束发育正常, 细胞染色深(图版 I-9, 10)。按照雌蕊发育进程推断, 533S 的雄蕊应该发育到造孢细胞时期和花粉母细胞减数分裂期。到雌蕊发育成熟时, 花药仍处于孢原细胞时期, 花药细胞染色浅, 所有细胞性质相同, 细胞变得透明, 细胞质稀薄, 细胞壁变薄, 维管束发育正常(图版 I-11, 12)。败育花药最典型的特征是无花粉囊的分化。

2.2.2 533S 败育花药大小的变化 对 533S 花蕾横切面中的子房直径和雄蕊的最大长度、最大宽度进行测量, 结果见表 1。

表 1 533S 雄性败育花蕾中花药、子房横切面大小与对照的比较

Table 1 The comparison of 533S' male sterile bud with control in anther size and ovary's diameter of cross

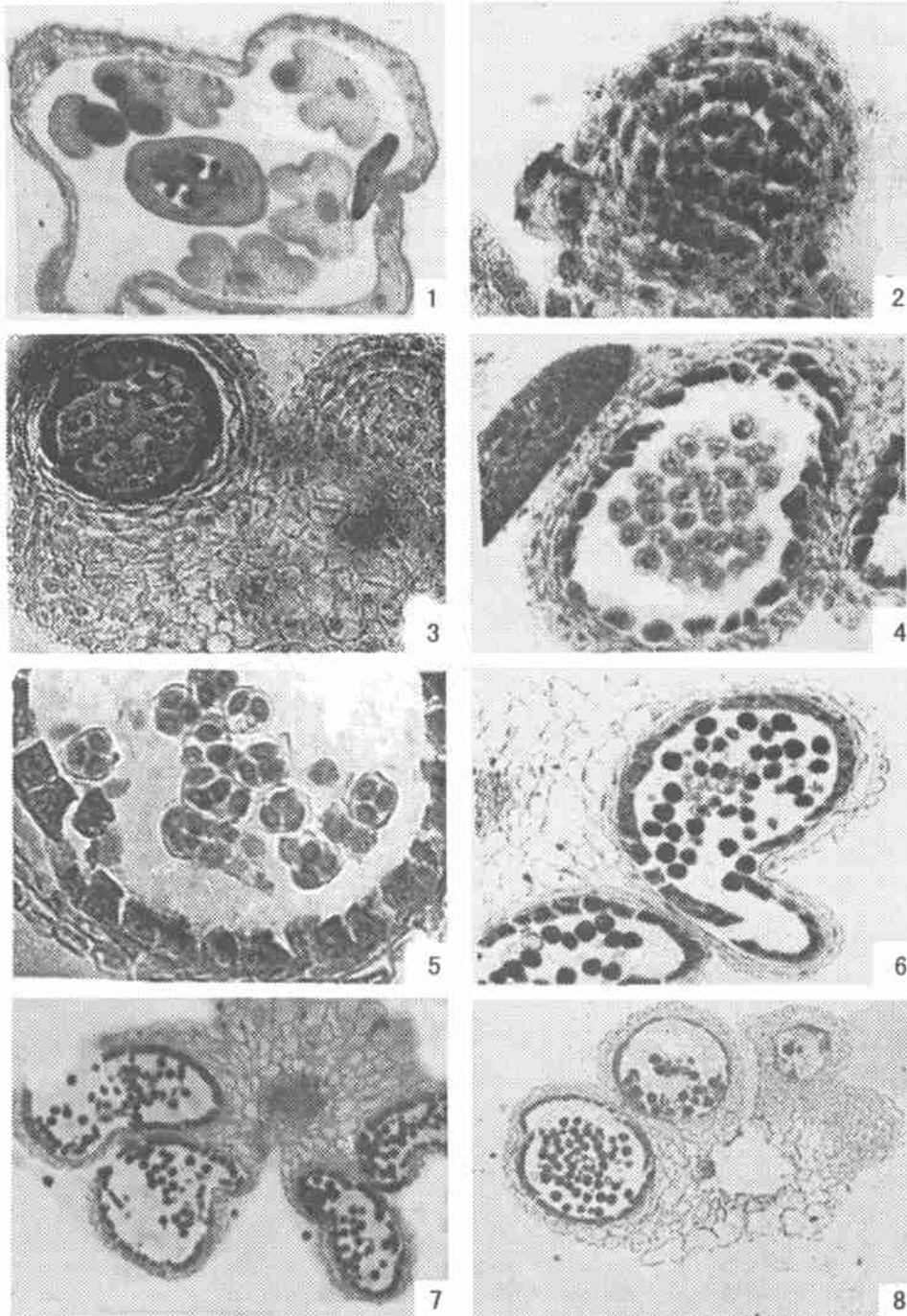
| 533S | | | 对照 Control | | |
|--|---|--|--|---|--|
| 子房 直径/ μm Ovary's diameter | 雄蕊 (长 \times 宽)/ μm Stamen (length \times width) | 花药发育时期 Stage of anther development | 子房 直径/ μm Ovary's diameter | 雄蕊 (长 \times 宽)/ μm Stamen (length \times width) | 花药发育时期 Stage of anther development |
| 180 | 200 \times 130 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |
| 220 | 290 \times 150 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 200 | 300 \times 270 | 造孢细胞时期 Sporogenous cell |
| 260 | 300 \times 180 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 210 | 330 \times 250 | 花粉母细胞时期 pollen mother cell |
| 270 | 290 \times 150 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 260 | 330 \times 300 | 减数分裂期 Meiosis |
| 330 | 300 \times 210 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 300 | 400 \times 270 | 减数分裂期 Meiosis |
| 340 | 340 \times 250 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |
| 360 | 340 \times 260 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |
| 380 | 410 \times 210 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |
| 400 | 450 \times 230 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 400 | 600 \times 370 | 单核期 Mono-nucleus microspore |
| 420 | 450 \times 220 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 430 | 630 \times 420 | 单核期 Mono-nucleus microspore |
| 440 | 430 \times 240 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |
| 480 | 420 \times 270 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | 480 | 720 \times 420 | 二细胞花粉期 Double nucleus |
| 490 | 460 \times 300 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |
| 510 | 460 \times 310 | 孢原细胞时期 A carchesporical cell | - | - | - |

从表 1 可以看出, 随着子房直径的增加, 533S 的花药大小一直在增加, 但不同花蕾之间存在差异。如子房直径为 260 μm 时, 花药横切面大小为 300 $\mu\text{m} \times$ 180 μm ; 子房直径为 270 μm 时, 花药横切面大小为 290 $\mu\text{m} \times$ 150 μm 。与对照相比, 子房大小相同时, 533S 的花药明显小于对照。如子房直径为 260 μm 时, 533S 的花药横切面大小为 300 $\mu\text{m} \times$ 180

μm , 而对照的花药横切面大小为 330 $\mu\text{m} \times$ 300 μm ; 子房直径为 400 μm 时, 533S 的花药横切面大小为 450 $\mu\text{m} \times$ 230 μm , 而对照为 600 $\mu\text{m} \times$ 370 μm 。

2.3 533S 半不育花药发育的细胞学特点

2.3.1 半不育花药发育的特点 在造孢细胞时期, 有个别花药有造孢细胞分化, 形成 1~ 2 个花粉囊(图版 II-1)。



图版 II 533S 部分恢复育性花蕾的显微结构

1. 造孢细胞时期, $\times 20$; 2. 花粉母细胞时期, $\times 200$; 3. 个别花药中有 1~2 个花粉囊, $\times 50$; 4. 减数分裂期, $\times 132$; 5. 四分体时期, $\times 200$; 6. 单核期, $\times 67$; 7. 单核期(花粉囊大小不一, 囊内花粉粒数目不等), $\times 50$; 8. 单核期(花粉囊畸形), $\times 50$

Plate II The microscopic structure of 533S semi-sterile anther

1. Cross section of a pollen sac at the stage of sporogenous cell, $\times 20$; 2. Cross section of a pollen sac at the stage of early pollen mother cell, $\times 200$; 3. Cross section of 533S' bud in which there are some anther with 1-2 pollen sac, $\times 50$; 4. Cross section of 533S' anther at the stage of meiosis, $\times 132$; 5. Cross section of 533S' pollen sac at the stage of tetrad, $\times 200$; 6. Cross section of 533S' pollen sac at the stage of mono-nucleus microspore, $\times 67$; 7. Cross section of 533S (anther which has abnormal pollen sac), $\times 50$; 8. Cross section of 533S (anther at the stage of mono-nucleus microspore which has different pollen sac in size), $\times 50$

在花粉母细胞减数分裂至四分体形成期, 部分 花药有 1~2 个药室, 药室内的花粉母细胞全部被染

色。绒毡层完整, 双核。其余的花药仍处于孢原细胞时期, 无花粉囊。所有花药的维管束均发育正常。随后药室内花粉母细胞分离为圆形单个细胞。花粉母细胞开始减数分裂, 形成四分体(图版 II-2~ 5)。

单核期时, 个别处于该时期的花药有 1~ 3 个大小不等的花粉囊, 花粉囊向内凹陷, 呈 V 字形。绒毡层开始解体。花粉壁加厚, 核处于中间(图版 II-6)。

表 2 533S 半不育花蕾中花药、子房横切面大小与对照的比较

| 533S | | | 对照 Control | | |
|--|---|---|--|---|---|
| 子房 直径/ μm Ovary's diameter | 雄蕊 (长 \times 宽)/ μm Stamen (length \times width) | 花药发育时期 Stage of anther development | 子房 直径/ μm Ovary's diameter | 雄蕊 (长 \times 宽)/ μm Stamen (length \times width) | 花药发育时期 Stage of anther development |
| 330 | 300 \times 210 | 花粉母细胞早期 pollen mother cell | 200 | 300 \times 270 | 造孢细胞分化期 Sporogenous cell |
| 340 | 340 \times 250 | 花粉母细胞早期 Pollen mother cell | 210 | 330 \times 250 | 花粉母细胞早期 Pollen mother cell |
| 380 | 430 \times 230 | 花粉母细胞早期 Pollen mother cell | 260 | 330 \times 300 | 减数分裂期 Meiosis |
| 400 | 550 \times 250 | 花粉母细胞早期 Pollen mother cell | 300 | 450 \times 270 | 减数分裂期 Meiosis |
| 420 | 650 \times 430 | 单核期 Mono-nucleus microspore | 400 | 600 \times 370 | 单核期 Mono-nucleus microspore |
| 430 | 430 \times 240 | 减数分裂期 Meiosis | 430 | 630 \times 420 | 单核期 Mono-nucleus microspore |
| 440 | 600 \times 380 | 四分体时期 Tetrad | - | - | - |
| 450 | 700 \times 410 | 单核期 Mono-nucleus microspore | 480 | 720 \times 420 | 二细胞花粉期 Double nucleus |

从表 2 可以看出, 半不育花蕾中的花药发育明显滞后于雌蕊的发育。如 533S 花药横切面大小为 600 μm \times 380 μm 时, 子房直径为 440 μm 。对照花药横切面大小为 600 μm \times 370 μm 时, 子房直径为 400 μm 。在花粉母细胞形成早期, 533S 花蕾中子房直径为 330~ 400 μm , 而对照为 210~ 260 μm , 处于此期的 533S 子房直径大小变化幅度较对照大。

2.4 533S 正常花药的细胞学特点

随着外界环境的进一步变化, 533S 花蕾的雄蕊发育完全正常, 其发育过程和各个时期的特点与对照材料相似, 可以分为孢原细胞时期、造孢细胞时期、花粉母细胞减数分裂至四分体形成期、单核期、二细胞和三细胞花粉期。

3 小结与讨论

生态不育系 533S 属于低温短日照不育类型, 开花初期为彻底不育, 中期为半不育, 后期为正常可育。从同一花序来看, 前期开的花不育, 中期开的花半不育, 后期开的花正常可育。对 533S 开花的育性变化和细胞学观察表明, 随着花蕾的发育, 败育的雄蕊一直处于孢原细胞时期, 不能形成花粉囊并产生花粉母细胞, 但雄蕊的大小一直在增加。因此, 533S 花药败育的时期为孢原细胞时期, 其主要特点是花药的发育受阻于孢原细胞时期, 无孢原细胞和药室分化, 属无花粉囊型不育系。

在二细胞花粉期、三细胞花粉期, 花粉囊呈不规则圆形, 大小不一, 花粉囊内花粉粒数目多少不一(图版 II-7, 8)。

2.3.2 533S 半不育花药大小的变化 对半不育花蕾横切面中子房直径和雄蕊大小进行测量, 结果见表 2。

前人^[6]对生态雄性不育水稻、小麦花药发育的细胞学观察表明, 此类不育系花药能形成造孢细胞, 进而产生花粉母细胞, 经减数分裂形成四分体, 四分体产生小孢子, 此后小孢子发育不正常, 导致雄性不育。这类不育系的败育发生在单核小孢子分裂前后。有些不育系败育发生较早, 在减数分裂过程中开始出现不正常, 产生不育^[7]。细胞学观察发现, 油菜雄性不育系可分为无花粉囊型、花粉母细胞败育型、单核败育型 3 种, 无花囊型不育系有陕 2A、波里马、湘矮 A 等, 这些细胞质雄性不育系已选育出一大批用于生产的杂交种, 因此, 这类不育系具有很高的应用价值。对油菜不育系的研究^[4]还发现, 许多不育系在特定条件下会出现微量花粉。533S 败育属无花粉囊型, 经作者研究, 533S 具有很高的配合力, 是一个有利用价值的生态雄性不育系。533S 在半不育阶段开始时花粉量不大, 与细胞质不育系的微量花粉株相似, 但随着生态环境的进一步变化, 533S 的微量花粉株很快转变为大量花粉, 花粉量远远多于细胞质雄性不育株的微量花粉株, 这说明 533S 半不育花药与细胞质雄性不育系的微量花粉花药不同。

本研究中发现, 育性部分恢复的花药产生的花粉囊一般都处于内侧, 即靠近雌蕊一侧, 这与人^[4]对细胞质不育系的研究结果一致。这一现象的生物学意义可能有利于后期自花结实, 因为甘蓝型油菜花药开裂时是内向开裂, 即花药沿着雌蕊的一侧纵

向开裂, 以更利于自花结实。但这一现象的机制目前 还不清楚。

[参考文献]

- [1] 石明松, 邓景扬 湖北光敏感核不育水稻的发现、鉴定及其利用途径[J]. 遗传学报, 1986, 13(2): 107- 112
- [2] 魏忠芬 甘蓝型油菜生态雄性不育系研究进展[J]. 贵州农业科学, 2001, 29(4): 59- 61.
- [3] 董军刚, 董振生, 刘创社 甘蓝型油菜生态型雄性不育系 533st 的选育研究[J]. 陕西农业科学, 2001, (7): 8- 9
- [4] 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, 1988, (4): 23- 25
- [5] 杨光圣, 瞿 波, 傅廷栋 三个甘蓝型油菜隐性核不育系小孢子发生的细胞学研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(6): 520- 523
- [6] 贺国良, 贺浩华, 刘宜柏 光敏核不育水稻农垦 58S 细胞学研究[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(1): 24- 27.
- [7] 高东迎, 杜春光 温敏雄性不育小麦 C49S 小孢子的细胞学研究[J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(1): 16- 18

Cytological studies on anther development of ecological male sterile line 533S in *B. rassica napus* L.

DONG Jun-gang, DONG Zhen-sheng, LIU Xuan-xia, LIU Chuang-she, LI Hong-bing

(Institute of Cash Crops, College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Microscopic observations on anther development process of ecological male sterile line 533S showed that 533S' anther development was hindered at the stage of archesporial cell differentiation. It could not form normal archesporial cell and not differentiate pollen sac, so 533S was regarded as male sterile line which had no pollen sac. During bud development, the size of the aborted anther was increasing but did not differentiate pollen sac. 533S' anther could restore and produce 1- 2 pollen sac when ecological factors are fit for development of anther. At last, the anther's development was completely normal as ecological factors changed further.

Key words: *B. rassica napus* L.; ecological male sterile line; anther development; cytology

(上接第 60 页)

Studies on synergism of laurocapram to several insecticides

HU Zhao-nong¹, JI Zhi-qin¹, DONG Xue-juan¹, LI Zhi-wen², LAN Qi¹, WU Wen-jun¹

(¹ Institute of Pesticide Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi, Yangling 712100, China;

² Institute for the Control of Agrochemical Department of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710001, China)

Abstract The synergism of laurocapram which mixed into several insecticides has been investigated by the bioassay and field testing. When taking the fifth instar armyworm larvae as experimental insect, the study of synergism of laurocapram indicated that laurocapram had different synergism to all tested pyrethroid insecticides, such as cypemethrin, fenpropathrin, cyhalothrin; but has no obvious synergism on organophosphate profenofos, parathion-methyl, chlorpyrifos, except trichlorphon which had antagonist apparently. The laurocapram has obvious synergism to acetaniprid, but no synergism to imidacloprid when taking *Macrosiphum avenae* as tested insect and it has synergism to both imidacloprid and acetaniprid when taking *Aphis gossypii* as treated insect. The results of field trials applied for *Aphis gossypii* showed that the efficacy of the concentration of high penetration imidacloprid 2.5% emulsifiable concentrates (EC) diluted 10, 16, 7, 25 mg/L have no remarkable difference with that of check insecticide. According to bioassay and field test results, we obtained preliminary conclusion that laurocapram has synergism to highly penetrative imidacloprid 2.5% EC.

Key words: laurocapram; insecticide; synergism; armyworm; aphid