

云烟 85 胞质雄性不育烟草 雄蕊发生的细胞学观察

刘齐元^{1,2}, 刘飞虎^{1*}, 杨建兵¹, 侯玉平¹, 何 瀚¹

(1. 云南大学 生命科学学院, 昆明 650091; 2. 江西农业大学 农学院, 南昌 330045)

摘要: 雄性不育烟草 MS 云烟 85 的雄性败育发生在雄蕊原基分化后至孢原细胞形成前, 在开放花朵中常能见到败育的雄蕊, 其特征是花丝缩短, 花药畸形、内无花粉或花粉空瘪。与正常烟草(保持系)子房由 2 心皮组成不同, 雄性不育烟草 MS 云烟 85 子房都由 3 心皮组成。

关键词: 烟草; 胞质雄性不育系; 雄蕊败育

中图分类号: Q944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)02-0156-05

Cytological study on stamen development of cytoplasmic male sterile line "Yunyan 85" of tobacco (*Nicotiana tabacum*)

LIU Qi-Yuan^{1,2}, LIU Fei-Hu^{1*}, YANG Jian-Bing¹,
HOU Yu-Ping¹, HE Han¹

(1. College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The stamen abortion of male-sterile tobacco Yun-yan 85 happened from the differentiation of stamen primordial to the formation of sporogenous cell. The staminodes were visible in opening flowers, but the filaments of staminode were shortened and the anthers were abnormal without pollen or with empty pollen. The ovary of pistil in male-sterile tobacco Yunyan 85 had 3 carpels, but the counterpart of normal tobacco (maintainer line) had only 2 carpels.

Key words: tobacco; cytoplasmic male-sterile line; stamen abortion

通过野生种烟草和普通烟草杂交, 并将普通烟草作父本连续回交, 就能获得烟草种间胞质雄性不育杂种。用这种方法获得的雄性不育烟草, 其不育特性又能很方便地被转育至其它烟草品种。目前, 绝大部分烟草雄性不育系都是通过这种方法获得的, 仅云南就转育有烟草雄性不育系 30 多个(李永平, 2001)。目前, 有关雄性不育烟草开放花朵的外观描述已有不少, 其中很多是针对转基因雄性不育

烟草的(李胜国等, 1995, 1997; 耿飒等, 2000), 而报道雄性不育烟草的花器官分化发育的则不多(Rosenberg 等, 1983; Kofler 等, 1991; Spangenberg 等 1992)。对由野生种烟草提供胞质的雄性不育烟草的花器官发育则未见有报道。为此, 我们对由野生种烟草提供胞质的雄性不育烟草 MS 云烟 85 及其保持系云烟 85 的花器官分化发育进行观察, 期望揭示 MS 云烟 85 雄性败育的时期与特征。

收稿日期: 2005-12-05 修回日期: 2006-06-11

基金项目: 云南大学 211 工程二期建设项目; 云南大学遗传学博士点项目 [Supported by 211 Project Sponsored by Education Ministry of China, the 2nd Term Construction in Yunnan University; the Funds for Doctorship of Genetics of Yunnan University]

作者简介: 刘齐元(1962-), 男, 江西高安人, 博士, 副教授, 从事植物遗传育种与作物栽培研究和教学, (E-mail) qiyuanl@yahoo.com.cn.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: plantbreed2004@yahoo.com.cn)

1 材料与方 法

供试材料为带有野生种烟草 (*Nicotiana suaveolens*) 细胞质的胞质雄性不育系 MS 云烟 85 及其保持系云烟 85。开花期于田间观察供试烟株的花器构造并取样带回室内照相。于烟草盛花期取 MS 云烟 85 及其保持系云烟 85 顶端主分支花序,放入 FAA 固定液中,抽真空后保存。按发育时期取不同大小的花蕾,梯度酒精脱水,二甲苯透明,制成石蜡切片,连续切片,切片厚度为 6 μm ,番红-固绿复染法染色,中性树胶封存,烘干制成永久切片。在徕卡显微镜下观察并照相。



图 1 云烟 85 雄性不育系及其保持系花器官
Fig. 1 Flowers of male-sterile line and its maintainer line of tobacco Yun-yan 85

左为保持系,5 枚雄蕊明显可见;中和右为不育系,中间花朵可见到退化雄蕊,右边花朵无雄蕊。

Left: Flower of maintainer line, with 5 obvious stamens; Middle and right: Flowers of male-sterile line, with staminode (middle) or without stamen (right).

2 结果与分析

2.1 云烟 85 雄性不育系及保持系花器官形态构造

2.1.1 保持系云烟 85 花器官形态 保持系云烟 85 是正常的烟草,其花为两性完全花,有 5 个花萼、5 个花瓣、5 枚雄蕊,雌蕊 2 心皮、2 室、子房上位、中轴胎座、多数胚珠。5 个萼片愈合成钟形,包于花冠基部;花冠由 5 个花瓣构成管状,开花时先端展开成喇叭状。雄蕊 5 枚轮列与花瓣相间;花丝 4 长 1 短,顶端连在由 2 个花粉囊组成的花药的背部,基部着生在管状花冠的内壁上。雌蕊由柱头、花柱和子房 3 部分组成,形似一个长颈的细口瓶。子房由 2 个心皮组

成,子房基部的周围有一圈膨大的蜜腺(图 1),这与普通栽培烟草的花器官形态完全相同(陈瑞泰,1987)。

2.1.2 不育系 MS 云烟 85 的花器官形态 不育系 MS 云烟 85 的花器官形态在花萼、花瓣和雌蕊等方面与保持系云烟 85 没有差异,而雄蕊则有较大变化。MS 云烟 85 花的雄蕊花丝萎缩,花药畸形,花药内没有花粉粒;有些花朵中则没有雄蕊(图 1)。

2.2 云烟 85 雄性不育系及保持系雄蕊的发育特征

2.2.1 保持系云烟 85 雄蕊及小孢子发育特征 正常烟草花器官分化发育顺序为向心式分化,即从外向里逐步分化出花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊。其发育过程如图 2 所示:当烟草植株的顶芽分化成花芽以后,先在花芽原基的外侧分化出 5 个花萼原基,接着在 5 个花萼原基的内侧相间分化出 5 个花瓣原基,继而在 5 个花瓣原基的内侧相间分化出 5 个雄蕊原基(图 2:a),此时,花芽的生长点即为雌蕊原基(图 2:b),以后发育成雌蕊。其中,雄蕊原基分化后,生长速度较快,其大小很快超过花瓣原基(图 2:c)。此后,各花器官原基不断发育长大,逐渐形成一朵完整的花。在雄蕊的发育过程中,每个雄蕊原基又分化出花丝和花药原基两部分(图 2:c)。花药原基产生后,先在花药四角形成 4 组细胞核较大、原生质浓厚的孢原细胞(图 2:d,e),然后孢原细胞进行平周分裂,形成两层细胞,其中里面是初生造孢细胞。初生造孢细胞经几次有丝分裂,生成更多的小孢子母细胞(花粉母细胞),小孢子母细胞发育到一定时期就开始减数分裂(图 2:f)。减数分裂使每一个小孢子母细胞形成 4 个小孢子(四分体),四分体呈四面体排列(图 2:g)。然后,小孢子从四分体中分离,即成单核小孢子(图 2:h),单核小孢子再经一次核分裂,形成一大一小的二核小孢子,大的核为营养核,小的为生殖核。此期间,花粉粒经历一次收缩(图 2:i),形成成熟的花粉粒(图 2:j)。成熟花粉粒为淡黄色,极面观呈圆形或近四面体圆形,赤道面(侧面)观呈长椭圆形。云烟 85 雌蕊由 2 心皮组成(图 2:d)。

2.2.2 不育系 MS 云烟 85 雄蕊的败育特征 MS 云烟 85 为带有野生种烟草细胞质的雄性不育系,在花器官分化发育过程中,其花萼原基、花瓣原基、雄蕊原基及雌蕊原基的分化都和保持系的相似。但雄蕊分化后,有的即开始退化,不能伸长;有的能伸长,但伸长到一定时候即停止,并逐渐退化。雄蕊顶端很少能形成花药,偶有花药也只是畸形花药,因而在该雄性不育系的开放花中,有的没有雄蕊,有的能看到

退化雄蕊;退化雄蕊花丝短,花药畸形(图 1)。其发育特征如图 3 所示,可以看出,幼蕾分化出花萼和花瓣(图 3:a)后,接着也会分化出雄蕊原基和雌蕊原基(图 3:b),但雄蕊原基生长缓慢(图 3:b),有的较

早退化(图 3:c),有的退化稍晚(图 3:d)或形成畸形雄蕊(图 3:e-f),畸形雄蕊的花药不成型,或完全空心化,没有孢原细胞和造孢细胞的形成。和保持系云烟 85 雌蕊由 2 心皮组成不同,MS 云烟 85 的雌

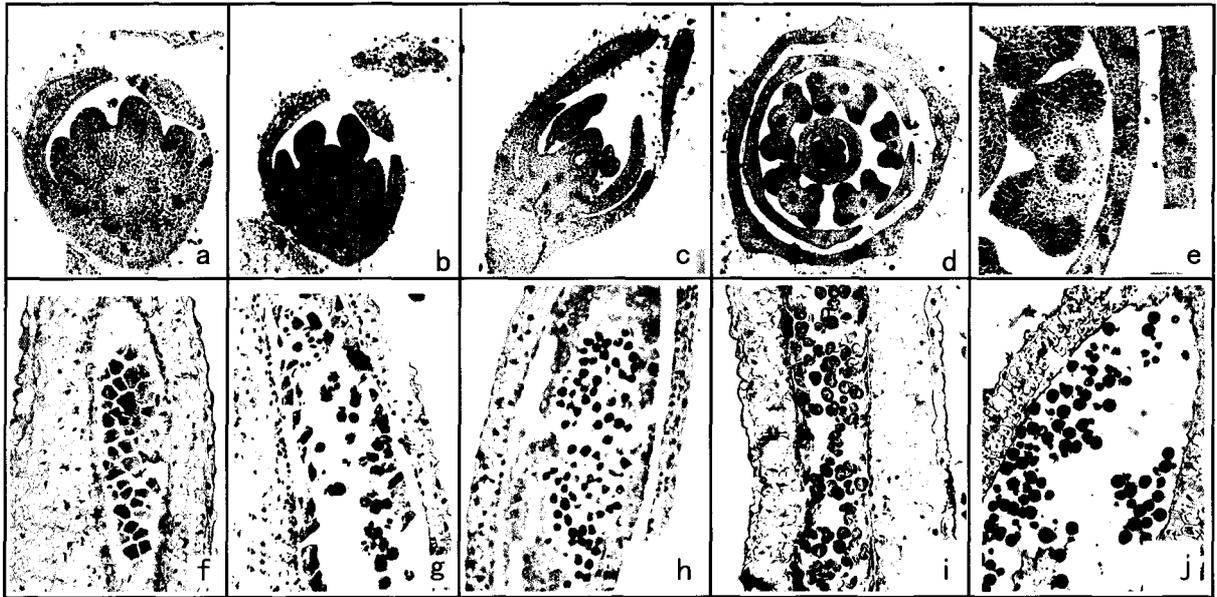


图 2 保持系云烟 85 花器官及小孢子发育解剖图

Fig. 2 Floral organs and microspore development of tobacco Yun-yan 85 (maintainer line)

a-b. 幼小花蕾的花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊原基; c. 雄蕊已分化出花药和花丝; d. 横切花蕾的雄蕊(5 个花药)和雌蕊(2 心皮); e. 花药横切, 示孢原细胞; f. 花粉母细胞减数分裂; g. 四分体; h. 单核花粉粒; i. 收缩花粉粒; j. 成熟花粉粒。

a-b. Sepals, petals, stamen and pistil anlage in young buds; c. Stamen with anthers and filaments; d. Transverse section of a bud, showing stamen with 5 anthers and pistil with 2 carpels; e. Transverse section of an anther, showing archesporial cells; f. Microspore mother cell meiosis; g. Tetraspore; h. Mononuclear pollens; i. Contracted pollen grains; j. Mature pollen grains.

蕊由 3 心皮组成(图 3:g-h)。

3 小结与讨论

关于植物雄性不育系败育的特点, Laser 等(1972)曾指出,败育几乎发生在花粉发育的所有阶段上,双子叶植物花药败育高峰多在四分体形成之前,而单子叶植物雄性败育多发生在花粉粒的单核期至二核期。如 D^2 型胞质雄性不育小麦花粉败育起始于单核—双核期,表现为败育期长和败育方式多样化(刘春光等,1995);玉米 cms-T 和 cms-C 在不同的核背景上表现不同的败育途径,而 cms-S 在所研究的核背景上表现出较稳定一致的小孢子发生、败育行为(夏涛等,1989);水稻的雄性败育在细胞形态学上更是有多种形式,按照花粉的败育时期及其形态特征,可以分为无花粉型(造孢细胞或花粉母细胞时期败育)、典型型(单核期败育)、圆败型(二核期败育)、染败型(三核期败育)和核增生花粉败育

类型(具 4 核或多核)等五种败育途径(朱英国,2000)。

双子叶植物方面,菜薹细胞质雄性不育系小孢子败育有 59.6% 发生在孢原细胞分化之前(董庆华等,1997);秋冬萝卜雄性不育系 64A 呈现败育的时期是单核小孢子内开始出现小液泡(粟翼玫等,1995);辣椒雄性不育系雄性败育发生在四分小孢子形成以前和减数分裂末期 II 阶段(耿三省等,1994);大白菜细胞质雄性不育系花药发育受阻于孢原细胞阶段,不形成药室,属无花粉型(韩玉珠等,1999),而核不育大白菜花粉败育发生在四分体时期或四分体形成以后(张成合等,1993);棉花洞 A 型核雄性不育株花粉在发育的全过程中都会发生败育(刘金兰等,1994),而陆地棉洞 A 型衍生核不育雄性不育系 473A 小孢子主要败育时期是单核早期(张天真等,1991)。胞质雄性不育棉花的雄性败育有的发生在造孢细胞增殖或小孢子母细胞形成时期,有的在减数分裂时期(王学德等,1998)。

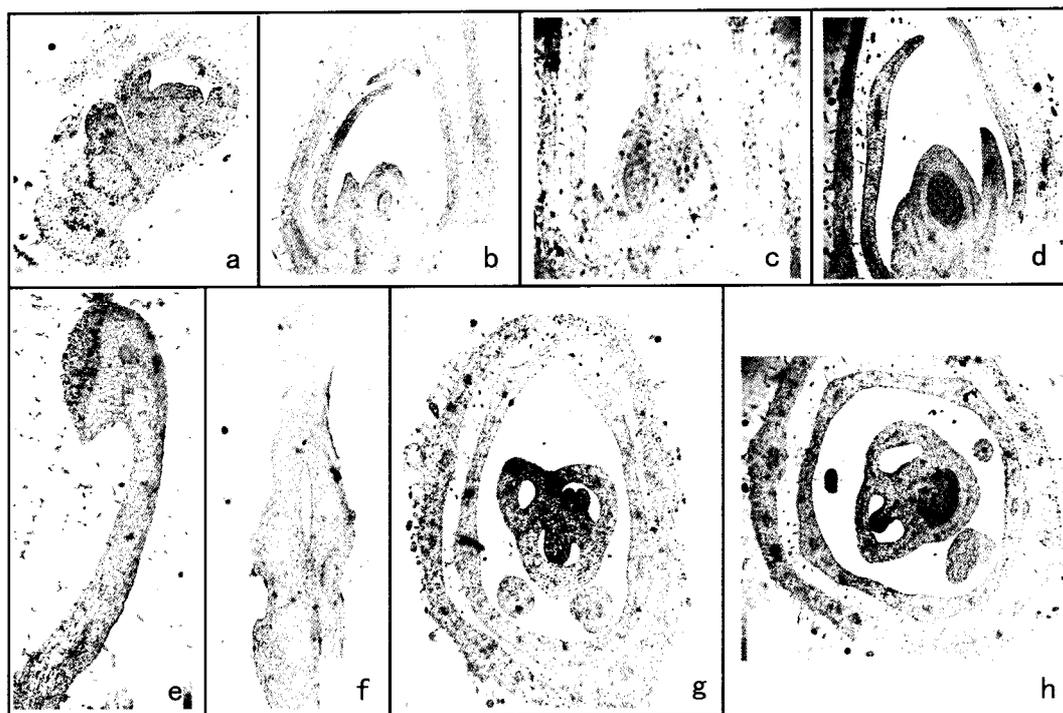


图 3 雄性不育烟草 MS 云烟 85 花器官及雄蕊发育解剖图

Fig. 3 Flower organs and stamen development of male-sterile line tobacco Yun-yan 85

a. 幼蕾, 示花萼和花瓣原基; b. 幼蕾, 示雄蕊原基生长缓慢; c. 花蕾, 示退化雄蕊; d. 幼蕾, 示雄蕊开始退化; e-f. 畸形雄蕊; g-h. 花蕾横切, 示退化花药和 3 室雌蕊。

a. Young bud, showing sepal and primordia of petal; b. Young buds, showing stamen primordia that growing slowly; c. Bud, showing staminode; d. Young bud, showing stamen beginning degenerating; e-f. Abnormal stamen; g-h. Transverse section of buds, showing degenerated anthers and pistils with 3 carpels.

以上研究表明,不同植物雄性不育材料其雄蕊(小孢子)败育发生的时期及特点各不相同,即使是同一植物材料的不同雄性不育类型,其雄性败育时期和特点也不一样。烟草方面,胡日华等(1999)曾报道胞质来源于晒烟的雄性不育烟草的雄蕊败育有 4 种类型:(1)雄蕊完全退化;(2)花丝萎缩畸形,无花药;(3)花药萎缩,无花粉囊;(4)花药颜色变淡,花粉囊合并,花粉粒为无内含物的空瘪粒。由 *N. tabacum* 与 *N. glauca* 融合产生的雄性不育胞质杂种的花冠筒比普通烟草细,解剖花冠筒则可以发现其雌蕊发育正常,雄性器官发育不正常,表现为花丝极短;无花药;或虽有花药,但花药中无花粉粒;或只有少数干瘪的花粉粒(孙玉合等,1999)。而转基因雄性不育烟草由于带有花药特异启动子,其雄性败育多发生在花药发育阶段(李胜国等,1995,1997;耿飒等,2000),属核不育类型,类似于核不育大白菜和陆地棉洞 A 型核不育雄性不育系 473A 的败育特征(张成合等,1993;张天真等,1991)。

Rosenberg 等(1983)曾报道,由普通烟草提供

细胞核、野生种烟草(*N. glauca*)提供细胞质的雄性不育烟草的败育特征是:5 个雄蕊原基出现后就停止了生长,一直到整个花发育成熟,退化雄蕊都没有发生变化;而由普通烟草提供细胞核、野生种烟草(*N. plumbaginiifolia*)提供细胞质的雄性不育烟草的败育特征是:与正常可育烟草花器官发育比较,在心皮出现之前,该雄性不育烟草花器官发育就有差异,其雄蕊异常地小,并且为非圆柱形。虽然在心皮出现后,该不育烟草的雄蕊还继续发育,但只是发育成更象花瓣而不象雄蕊的尖尾船状结构。由普通烟草和野生烟草(*N. bigelovii*, *N. undulata*, *N. debneyi*, *N. suaveolens*)杂交而形成的胞质雄性不育烟草的雄蕊多为畸形,有的雄蕊雌蕊化,有的雄蕊花瓣化(Kofer 等,1991;Spangenberg,1992)。

据本实验观察,由野生烟草(*N. suaveolens*)与普通烟草杂交产生的雄性不育烟草(MS 云烟 85)的雄蕊败育特征与 Rosenberg 等报道的结果较为类似。与由转基因形成的雄性不育烟草雄性败育发生较晚不同,由普通烟草和野生烟草杂交形成的雄性

不育烟草的雄性败育一般发生得较早,败育较彻底。雄性不育烟草 MS 云烟 85 的雄性败育时期发生在雄蕊原基分化后至孢原细胞形成前,在开放花中常能见到败育的雄蕊,其特征是花丝缩短,花药畸形、内无花粉或花粉空瘪。

另外,本研究还发现,与正常烟草(保持系)雌蕊中子房由 2 心皮组成不同,雄性不育烟草 MS 云烟 85 雌蕊中子房都由 3 心皮组成。这一现象是否与烟草的雄性不育有关还有待于进一步研究。

参考文献:

- 朱英国. 2000. 水稻雄性不育生物学[M]. 武昌: 武汉大学出版社
- 陈瑞泰. 1987. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社
- Dong QH(董庆华), Li RQ(利容千), Wang JB(王建波). 1997. Cytological studies on microsporogenesis of the male sterile *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee(菜薹细胞质不育系小孢子发生的细胞形态学研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 24(2): 150-154
- Geng S(耿飒), Ma M(麻密), Li GF(李国凤), et al. 2000. Effects on fertility in transgenic tobacco by localized expression of *ipt* gene(*ipt* 基因定位表达对转基因烟草育性的影响)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 42(2): 217-220
- Geng SS(耿三省), Wang ZY(王志源), Jiang JZ(蒋键箴), et al. 1994. Cytological studies on microsporogenesis of the male sterile lines of pepper(辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学观察)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 21(2): 165-169
- Han YZ(韩玉珠), Li CL(栗长兰), Zhang HQ(张汉卿). 1999. Anther development in cytoplasm male sterile line and maintain line of Chinese cabbage(大白菜细胞质雄性不育系及保持系的花药发育)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), 21(1): 52-55
- Hu RH(胡日华), Huang YJ(黄英金), He KX(何宽信), et al. 1999. The preliminary report on breeding and applying study of the new cured tobacco sterile line germplasm resource(烤烟新质源雄性不育系的选育及应用研究初报)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), 21(1): 22-24
- Kofer W, Glimelius K, Bonnett HT. 1991. Restoration of normal stamen development and pollen formation by fusion of different cytoplasmic male-sterile cultivars of *Nicotiana tabacum* [J]. *Theor Appl Genet*, 81: 390-396
- Laser KD, Lersten NR. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms[J]. *Bot Rev*, 38: 427-454
- Li SG(李胜国), Liu YL(刘玉乐), Zhu F(朱峰), et al. 1995. Male sterile tobacco plants obtained by genetical-engineering(基因工程雄性不育烟草的获得)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 37(8): 659-660
- Li SG(李胜国), Liu YL(刘玉乐), Zhu F(朱峰), et al. 1997. Genetical engineered male sterile tobacco plants and their sensitivity to temperature(基因工程雄性不育烟草及其温度敏感)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 39(3): 231-235
- Li YP(李永平). 2001. Recent advances and development strategies of tobacco breeding in Yunnan Province(云南省烟草育种进展及发展对策)[J]. *Chin Tobacco Sci*(中国烟草科学), 22(3): 19-21
- Liu CG(刘春光), Wu YW(吴郁文), Zhang CL(张翠兰), et al. 1995. Studies of cytomorphosis during development of pollen grains and isozymes in D2-type CMS line(小麦 D2 型细胞质雄性不育系雄配子发育的细胞形态学特征和同工酶的研究)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 22(3): 199-205
- Liu JL(刘金兰), Nie YC(聂以春), Huang GW(黄观武), et al. 1994. A cytological study on pollen development of nuclear male sterile line "Dong A" of cotton(棉花洞 A 型核雄性不育材料花粉发育的细胞形态学观察)[J]. *Acta Gossypii Sin*(棉花学报), 6(2): 70-73
- Rosenberg SM, Bonnett HT. 1983. Floral organogenesis in *Nicotiana Tabacum*: A comparison of two cytoplasmic male-sterile cultivars with a male-fertile cultivar[J]. *Ame J Bot*, 70(2): 266-275
- Spangenberg G, Perez Vicente R, Oliveira MM, et al. 1992. CMS system in *Nicotiana*; flower development, patterns of mitochondrial DNA and mitochondrial gene expression. I. Analysis of parental *Nicotiana* species and alloplasmic CMS analogs of tobacco[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 5: 13-26
- Sun YH(孙玉合), Ding CM(丁昌敏), Zhang LL(张历历), et al. 1999. The creation and application of new tobacco cytoplasmic male sterile(CMS) line 86-6(烟草新胞质雄性不育系 86-6 的创造及其利用)[J]. *Acta Tabacaria Sin*(中国烟草学报), 5(1): 20-23
- Su YW(粟翼玟), Zhao SY(赵双宜), Zhang YJ(张燕君), et al. 1995. Study on cytomorphology of microsporogenesis in male sterile line of radish(*Raphanus sativus* L.)(萝卜雄性不育系小孢子发生的细胞形态学研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 22(4): 348-352
- Wang XD(王学德), Zhang TZ(张天真), Pan JJ(潘家驹). 1998. Cytological observation of microsporogenesis and RAPD analysis of mitochondrial DNAs for cytoplasmic male-sterile cotton lines(细胞质雄性不育棉花小孢子发生的细胞学观察和线粒体 DNA 的 RAPD 分析)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 31(2): 70-75
- Xia T(夏涛), Liu JL(刘纪麟). 1989. The cytological study of cytoplasmic male sterility in maize(玉米细胞质雄性不育的细胞学研究)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), 15(2): 97-103
- Zhang CH(张成合), Liu SX(刘世雄), Shen SX(申书兴), et al. 1993. Observation of pollen abortion in nuclear male sterile Chinese cabbage(核不育大白菜花粉败育观察初报)[J]. *J Hebei Agric Univ*(河北农业大学学报), 16(4): 9-13
- Zhang TZ(张天真), Pan JJ(潘家驹). 1991. A cytological study on pollen abortion of 473A genic male-sterile line of upland cotton(陆地棉 473A 核雄性不育系小孢子败育的细胞学研究)[J]. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报), 14(3): 7-11