

红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的形态解剖观察

摘 要

红麻的杂种优势率达到30%以上,长期以来,红麻杂种优势利用是国内研究的热点和难点。2001年3月,周瑞阳在红麻野生种UG93中发现了1株雄性不育突变体,并首次选育出高抗红麻炭疽病的UG93细胞质雄性不育系K03A及其保持系K03B。现已选育出9对同质异核的UG93型细胞质雄性不育系及其保持系。为了探讨该材料雄性不育发生的机理,加快其利用进程,本研究以不育系K03A、L23A、P03A、917A、763A、258A、722A、B19-1A、福3A和保持系K03B、L23B为试验材料,从形态学、细胞学等方面进行了研究。结果如下:

1. 根据是否有微量花粉可以将不育系分为少数花药有微量花粉和花药全部不开裂两类。根据小孢子败育的主要时期可以将不育系分为单核败育型、二核败育型、过渡型和多时期败育型四类。

2. 不育系花药瘦小干瘪,淡红色、白色或黄褐色,多不开裂,少数花药开裂并有微量花粉。花粉体积小,多畸形,表面没有覆盖物或覆盖物薄且不均匀。

3. 不育系在四分体时期均有小孢子出现异常,染色过深,呈镰刀形,单核期小孢子空瘪,并渐解体。单核中后期,一些不育系中出现数量不等的小孢子质核降解为近圆形、染色深的团块,小孢子壁也随之解体。一些

不育系的花粉在二核早期质壁分离，或是在积累一定量内含物后解体，花粉败育。

4. 不育系花药绒毡层最早在小孢子母细胞时期出现异常，单核期普遍出现液泡化、细胞融合、原生质流入药室腔等现象，影响小孢子的发育或直接导致小孢子的败育解体。

5. 9个同质异核不育系的最早败育时期大体相同，败育过程持续时间一般较长，多数不育系在相同时期的败育方式相似，但小孢子败育的主要时期有差异。

6. 南宁夏播不育系比海南冬繁不育系的小孢子败育过程有所延长，但败育的最早时期、败育方式和绒毡层的异常现象等基本相同，研究材料的不育性较稳定。

关键词：红麻 细胞质雄性不育 小孢子败育 形态解剖 分类 环境影响

OBSERVATION ON MORPHOLOGY AND ANATOMY OF MICROSPORE ABORTION OF CYTOPLASMIC MALE STERILE LINE IN KENAF (*Hibiscus cannabinus L.*)

ABSTRACT

Kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) is a fast growing bast fiber crop of great interest as a source of low cost natural fiber and feedstock for energy production as well. Utilization of hetrosis in kenaf that is more than 30% has been a research hot pot for a long time. Since Zhou Ruiyang discovered a cytoplasm male sterile (CMS) mutant in spices UG93 in Hainan province in 2001, CMS line K03A and its maintainer K03B had been selected fistly in 2003, which was highly resistant to anthracnose, and 9 CMS lines had been selected. To investigate the mechanism of microspores'abortion process and the classification of CMS lines in kenaf, morphological and cytological studies were conducted in K03A, L23A, P03A, 917A, 763A, 258A, 722A, B19-1A, and FU3A. The results were as follows:

- 1. The CMS lines in kenaf could be divided into dehiscence with trace pollens and non-dehiscence types on the basis of morphological characters of anthers. According to the main abortion period, CMS lines were classified into four types, mononuclear microspore abortion, binucleate pollen abortion, transitional, and mult-period abortion types.**
- 2. Anthers in CMS lines were small or withered in faint red, white, or snuff colour. Most didn't dehisce and others dehised with trace poorly developed pollens. Pollens were small size, malformation, and with less mulching material on pollen's surface.**
- 3. Some densely stained and sickle-shaped microspores which appeared in tetrad stage, developed abnormally and disappeared gradually in mononuclear stage in some CMS lines. At middle and late mononuclear microspore stage, microspores of some CMS lines disaggregated with protoplasm shrank and degraded into densely stained mass, as well**

as some gross distorted and degenerated generally. At binucleate pollen stage, plasmolysis and cytoplasm degradation of pollen were observed in some CMS lines.

4. Abnormalities were found in tapetum as early as mother microspore stage, while generally vacuolation and cell fusion and protoplasm' inflow into anther chamber appeared in tapetum at mononucleate microspore stage, resulting in breakage or bad effect of microspores' development.

5. Analysing the effect of different cell nucleus with the same male sterile cytoplasm, we found that methods and earliest time of abortion is similar, and the abortion always persisted for a long time, while main abortion period of microspores were different.

6. The abortion process of microspores of CMS lines cultivated in nanning in the summer persisted longer than that cultivated in hainan in the winter, whereas main abortion period and abortion methods and abnormalities of tapetum were similar. It is suggested that sterility of research material is relatively stable.

KEY WORDS: Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.); Cytoplasmic male sterility; Microspore abortion; Morphological Anatomy; Classification; Environmental effect

目 录

└─┬文摘

└─┬英文文摘

└─┬声明

└─┬前言

└─┬第一章材料和方法

└─┬┬1.1 材料

└─┬┬1.2 方法

└─┬┬┬1.2.1 形态特征观察

└─┬┬┬1.2.2 细胞学观察

└─┬第二章结果与分析

└─┬┬2.1 不育系与保持系的花药形态特征比较

└─┬┬┬2.1.1 保持系的花药的形态特征

└─┬┬┬2.1.2 不育系的花药的形态特征及其分类

└─┬┬2.2 不育系与保持系小孢子和花药发育的细胞学观察

└─┬┬┬2.2.1 保持系小孢子和花药发育过程

└─┬┬┬2.2.2 不育系小孢子败育过程及其分类

└─┬┬2.3 光温环境对雄性不育系小孢子败育的影响

└─┬第三章讨论

└─┬┬3.1 红麻细胞质雄性不育系的分类

└─┬┬3.2 红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞学机制

└─┬┬3.3 核背景对红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的影响

└─┬┬3.4 环境因素对红麻细胞质雄性不育系花药败育的影响

└─┬第四章结论

└─┬参考文献

└─┬图版缩写对照

└─┬┬图版 1

└─┬┬图版 2

└─┬┬图版 3

└─┬致谢

└─┬攻读学位期间发表论文情况

广西大学学位论文原创性声明和使用授权说明

原创性声明

本人声明：所呈交的学位论文是在导师指导下完成的，研究工作所取得的成果和相关知识产权属广西大学所有，本人保证不以其它单位为第一署名单位发表或使用本论文的研究内容。除已注明部分外，论文中不包含其他人已经发表过的研究成果，也不包含本人为获得其它学位而使用过的内容。对本文的研究工作提供过重要帮助的个人和集体，均已在论文中明确说明并致谢。

论文作者签名：朱丽梅

2007 年 6 月 14 日

学位论文使用授权说明

本人完全了解广西大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：
按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本；
学校有权保留学位论文的印刷本和电子版，并提供目录检索与阅览服务；
学校可以采用影印、缩印、数字化或其它复制手段保存论文；
在不以赢利为目的的前提下，学校可以公布论文的部分或全部内容。

请选择发布时间：

☐ 即时发布

☐ 解密后发布

（保密论文需注明，并在解密后遵守此规定）

论文作者签名：朱丽梅

导师签名：[Signature] 2007 年 6 月 14 日

前 言

红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)属锦葵科(*Malvaceae*)、木槿属(*Hibiscus*)，一年生韧皮纤维作物。红麻起源有原产印度和热带非洲两种观点^[1]。我国是目前世界上最大的红麻生产国^[2]。

1.1 我国红麻种植概况

我国红麻引进种植始于 20 世纪初，最早在台湾于 1908 年引入印度品种马达拉斯红麻试种和推广。1941 年引入杭州，到 20 世纪 50 年代后，相继引入广西、广东、福建、江苏、湖南等省种植。北方红麻以东北栽培最早，1945 年在华北各地推广，从 20 世纪 50 年代初开始在黄淮海地区种植^[1]。目前我国常年种植面积在 33 万 hm^2 左右，河南、安徽、四川三省栽培面积最大，其次为湖北、湖南、江西、广西、广东、福建、江苏、浙江等省、自治区。广西、广东、福建是全国三大红麻留种基地^[1,2]。

红麻纤维是我国传统的粗纺原料，其主要优点是纤维拉力大、吸湿性强、散水散热快、耐腐蚀磨损、可生物降解，是生产麻袋、麻布、绳索、粗帆布和地毯底布的主要原料。红麻种植成本低，具有多层次的附加值，并且拥有可再生能力、生物降解能力、增加土壤肥力、环保性能强、化学和机械性能优异的诸多优势，具有很高的经济价值。其开发前景广阔，市场潜力大。目前，红麻的综合利用和开发研究的产品主要有：

- a、纸浆和造纸
- b、作为塑料业中的强度加强剂
- c、纤维板（密度板）
- d、环保麻地膜
- e、红麻土工布
- f、吸附剂
- g、红麻纺织品精加工
- h、其他

红麻叶及茎秆还是动物饲料、食用菌培养基、动物窝的铺垫材料、堆肥的良好原材料。红麻种子还富含油分，可制工业用油^[2-4]。

红麻具有耐脊、耐旱、耐盐碱、易栽培等特点，适宜种植区域广，可以在江河、湖泊洲滩地、低洼易涝地和盐碱土地地区种植，缓解与粮棉争地的矛盾。将红麻引种到西北干旱、半干旱地区，可以充分利用当地丰富的土地、光能及热能资源^[4]。总之，大力发展红麻生产，对于保护生态环境和发展国民经济具有重要意义。

1.2 植物雄性不育概述

植物雄性不育是指由于生理或遗传上的原因造成植物花粉败育而雌蕊仍能正常接受外来花粉的特性。生理因素常指经过高温、干旱或化学药剂处理，由此引起的雄性不育性一般不会遗传后代。如果是由遗传因子决定的雄性不育性，则必然会世代遗传下去，通过一定的选育程序，可以育成不育性稳定的系统，称为雄性不育系(male sterile line)^[5,6]。

杂种优势是生物界的一种普遍现象，利用杂种优势可以显著提高作物产量，改善作物品质。近几十年来，杂种优势在农业生产上取得了举世瞩目的成就，杂种优势育种已成为许多作物的主要育种方法。二十世纪初广泛开展的作物杂种优势研究，特别是玉米杂种优势利用研究，极大地推动了植物雄性不育的研究和利用。利用雄性不育系生产杂交种最早的作物是洋葱，随后，细胞质雄性不育性被广泛用于玉米、高粱、蚕豆、甜菜、向日葵、胡萝卜、油菜、水稻、白菜等作物的杂交种种子生产^[4,5]。雄性不育是高等植物较为常见的一种生物学特征。据Kaul^[6] (1988)统计，已在43科、162属、617个物种中发现雄性不育现象并进行了研究。其中，细胞核雄性不育性发生于216个种和17个种间杂种。细胞质雄性不育性发生于20个科、50个属、150个种。

1.2.1 雄性不育的分类

植物雄性不育是细胞核基因或细胞质基因或两者互作的结果。导致雄性不育的因素是多种多样的，因此，在分类上也因标准不同出现不同的分类系统。Kaul^[6]将雄性不育分非遗传型和可遗传型两大类。非遗传型雄性不育指由于某些不良外界条件影响植物正常生理功能的暂时现象；可遗传型雄性不育指其雄性不育特性可在世代间传递，具有遗传物质控制的，它又分为核不育型 (genetic male sterility, GMS或nuclear male sterility,

NMS) 和核质互作型(cytoplasmic male sterility, CMS)。Gabelman^[5]根据花粉、雄蕊的形态将雄性不育划分为花粉型、雄蕊型和功能型3类。Heslop-Harrison^[5]按世代交替把雄性不育划分为孢子体不育和配子体不育2种类型。

1.2.2 雄性不育性的遗传机制

核质互作雄性不育类型是细胞质基因与细胞核基因共同作用的结果, 它们的遗传机制目前仅有一些假说^[7]。例如, 核质互补控制假说。这个假说认为, 细胞质不育基因在线粒体上。在正常情况下(N)线粒体DNA携带着能育的遗传信息, 能正常转录mRNA, 因而在线粒体的核糖体上能合成各种蛋白质(酶), 以保证雄蕊发育的正常进行, 最终形成功能正常的花粉。当线粒体DNA的某个(或某些)节段发生了突变, 胞质基因就进入了S状态, 通过转录形成不正常的mRNA, 不正常mRNA携带有不育性的信息, 这样的mRNA不能形成某些酶, 最终形成花粉的正常代谢过程被破坏, 导致花粉败育。需要注意的是, 当细胞质基因处于S状态后, 花粉是否败育, 还要取决于核基因的组成。当核基因为Rf时, 可通过mRNA的转录, 把可育的遗传信息转移到细胞质核糖体上。进而翻译成促使花粉正常发育的各种蛋白质(酶), 从而形成了可育花粉。由于核基因Rf能补偿细胞质不育基因S的不足, 所以当核基因Rf存在时, 线粒体DNA不论正常与否, 都可以形成正常可育花粉。当核基因为rf时, 由于它不能补偿细胞质不育基因S的不足, 从而形成不育花粉。另一方面, 当细胞质基因N存在时, 由于它能补偿核基因rf的不足, 因此, 不论核基因是Rf还是rf, 只要有N细胞质基因存在, 就都能形成正常的花粉。如果胞质基因N与核基因Rf同时存在, 由于N一方面可控制可育性, 同时还具有调节作用。通过调节作用能产生某种抑制物质, 使Rf处于阻遏状态。因此, 不会形成促进花粉正常发育的多余物质而造成浪费。细胞质基因S不能产生抑制物质, 所以S与Rf同时存在时, Rf能正常执行机能形成可育的花粉^[7]。

关于核基因不育性发生的机制问题, 有一个“核基因单独控制假说”^[7]。这个假说认为, 核不育型是由于核基因发生隐性突变造成的。这种突变所引起的代谢缺陷十分严重, 不能为细胞质基因所补偿, 只能由相同位点上的显性突变所恢复。由于细胞质携带的遗传信息很少, 所以核DNA控制的某种代谢途径的中断和改变, 是细胞质DNA所不能补偿的。但是, 这类核基因的作用和其他核遗传现象一样, 其性状表现是通过细胞质实现的。

从以上两个假说我们可以看出, 细胞质不育基因存在于线粒体中, 核不育基因可能通过线粒体而发生作用。

1.3 花粉发育过程与雄性败育机制

1.3.1 植物花粉的发育过程

1.3.1.1 细胞学水平

植物花粉的发育至成熟的过程很复杂,一般可分成3个阶段,小孢子发生期即造孢细胞的分化和减数分裂过程,雄配子体形成期即自由小孢子减数分裂后的发育和花粉成熟期。具体的发育过程大致如下:花药发育初期,雄蕊原基中大量未分化的孢原细胞进行平周分裂,产生2层细胞,即外层的周缘细胞和内层的造孢细胞。周缘细胞继续分裂,自外向内逐渐形成药室内壁、中层及绒毡层,与花药表皮共同构成花粉囊壁,将造孢细胞及其衍生细胞包围起来。另一方面,在周缘细胞分裂的同时,初生造孢细胞经多次有丝分裂产生花粉母细胞,再经减数分裂形成4个单核花粉粒(小孢子),即四分体时期。四分体其周围有一厚厚的胼胝质。在花粉发育过程中,绒毡层逐渐向外分泌胼胝质酶,分解胼胝质,使未成熟的4个小孢子互相分离,慢慢形成自由小孢子,然后小孢子进行第一次不对称有丝分裂,由此产生两个命运完全不同的细胞核:营养核和生殖核。因此这次分裂被认为是一次起决定性作用的分裂。小孢子发育到一定阶段,生殖细胞逐渐进入营养细胞的细胞质中,形成成熟花粉粒。成熟花粉粒内包含大量预先合成的mRNA,积累了大量营养物质,为以后的花粉萌发和花粉管伸长提供物质保证^[8-13]。

雄配子体在花药的花粉囊中发育。绒毡层是花粉囊壁最里面的一层细胞,其体积大,在发育初期为单核细胞,花粉母细胞开始减数分裂后,绒毡层细胞DNA开始复制,但细胞本身并不分裂,因此通常形成多核细胞。绒毡层细胞在四分体时期发育到达顶点,以后就开始退化^[5]。目前人们认为绒毡层在花粉发育中的作用至少表现在如下3方面:绒毡层细胞为小孢子发育提供营养物质;绒毡层细胞分泌胼胝质酶,使四分体的胼胝质壁溶解,单核花粉粒得以释放;绒毡层细胞合成花粉外壁的前体物质,保护花粉免受侵害^[8,15]。因此,绒毡层细胞的正常发育对于花粉正常发育必不可少在花粉成熟过程中花药绒毡层发育不完全,是导致植物雄性不育的原因之一^[5,15,16]。

1.3.1.2 分子生物学水平

随着分子生物学技术广泛应用于植物生殖生物学的各个领域,人们逐渐认识到花粉发育是受基因调控的复杂过程。在这个过程中,需要大量的基因协同表达。在花粉花药的发育过程中,约有20 000个基因在花药中特异表达,尽管在花粉发育过程中,涉及近

万种特异基因的表达,但是迄今所发现的花粉发育特异基因也不过几十种^[9,18]。花粉发育过程中的大多数基因的表达具有时间和空间的特异性。现在已知花粉发育中表达的基因可分为早、晚2个时期,早期基因的转录在减数分裂后即可检测到,在小孢子发育过程中逐渐被激活,在花粉成熟前达到高峰,然后迅速减少,在成熟花粉中它们的mRNA水平下降或检测不到。一般认为,早期基因可能编码细胞骨架蛋白和参与细胞壁形成、淀粉积累的蛋白质,而晚期基因在小孢子有丝分裂后启动,并随着花粉的成熟继续积累,在成熟花粉中表达程度最高。晚期基因转录和翻译出来的蛋白在花粉成熟、花粉萌发中起重要作用^[18]。目前利用分子生物学手段克隆得到的花粉基因主要来源于模式植物拟南芥、烟草,其次来源于水稻、玉米、油菜、矮牵牛等^[19-22]。

1.3.2 雄性不育系花药败育的细胞学机理

高等植物的雄性不育有多种类型,发生的原因复杂,近些年,关于雄性不育的细胞学机理研究主要集中在绒毡层、ATPase、 Ca^{2+} 、细胞骨架和细胞程序性死亡等方面^[32]。下面将着重从绒毡层发育和细胞程序性死亡方面介绍雄性不育机理研究新进展。

1.3.2.1 绒毡层

绒毡层是花药壁的最内层体细胞,直接与花药药室中的花粉母细胞及以后发育中的花粉接触,是将孢子体组织的物质输往雄配子体的最后中转站,对花粉的正常发育具有十分重要的作用^[8,15]。许多学者都认为雄性不育的发生是与绒毡层正常的发育途径受干扰有关。以前的许多研究者报告过绒毡层发育异常会造成花粉的败育^[18,20,25-32]。近年来仍不断有类似的报告:Taylor等^[33]在拟南芥的ms7 雄性不育突变体中发现绒毡层提早降解影响了花粉发育,是导致花粉在单核靠边期败育的直接原因。Fei和Sawhney^[34]等在对拟南芥雄性不育突变体ms32超微结构的观察中发现绒毡层细胞在减数分裂前期就形成了合成和分泌胼胝酶的粗糙内质网,成垛叠状(而相应野生型的内质网则到了四分体时期才开始形成),这样就导致了包裹花粉母细胞和四分体的胼胝壁过早降解,致使花粉败育。Chaubal等^[35]对玉米两个雄性不育突变体ms23和ms32小孢子发育过程的研究中发现本应形成绒毡层的细胞又分裂形成了两层细胞t1和t2,且二者都不能正常分化,导致花粉母细胞在减数分裂前期I时就开始败育。Suzuki等^[36]在对高温胁迫下绒毡层细胞的超微结构观察中看到高温影响了绒毡层细胞的内质网膜结构,从而导致了绒毡层的提前降解并使花粉败育。Smith等^[37]在对大豆细胞质雄性不育花药的电镜观察中发现绒毡层细胞中线粒体内膜首先发生了降解,内腔异常扩大,接着内质网呈现出了不规则的同心环结构,这些异常变化使绒毡层细胞降解,最终影响了小孢子的发育,使花粉败育。

Zhang等^[38]在拟南芥雄性不育 $apt1-3$ 的花药中观察到起源于绒毡层的营养物质减少,推测绒毡层细胞生物合成活性的下降影响了小孢子发育,导致花粉败育。谢潮添等^[43,44]在白菜细胞核雄性不育系中发现:白菜花粉粒中的储存物质是脂类物质。但糖类物质是白菜运输的主要形式。在花药发育的早期,体内运输到花药中的糖类物质先以淀粉粒的形式储存在花药的药壁组织中。当花粉发育到小孢子晚期时,花药绒毡层细胞将其他药壁细胞中的糖类转化成脂类供给发育的花粉。不育花药的绒毡层细胞不将糖类物质转化成脂类物质。

用基因工程技术也证明了绒毡层细胞与小孢子发育的紧密关系:将在绒毡层细胞内特异表达的启动子与细胞毒素的mRNA 酶基因融合或 β -1,3-葡聚糖酶基因融合后,转入到正常植株中后导致绒毡层的正常发育受到干扰,从而诱导花药败育^[45,46]。

1.3.2.2 细胞程序性死亡

在高等植物的生活周期中,有些部位的器官、组织和细胞会在个体生活周期结束之前死亡,这种死亡是对外界环境变化的生理反应,是由外部信号引起的细胞自主死亡过程,称为细胞程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD)^[47]。细胞学研究表明,在花药成熟之前,作为正常有性生殖过程的前提,有些花药组织以精确的时间顺序经历细胞死亡过程,如果这些细胞的死亡过程发生了变化则往往导致不育。最典型的例子是花药绒毡层,它是花药壁的最内层体细胞组织,通常在花粉发育的特定时间内死亡,在成熟花药中已不存在^[48]。在光敏核不育水稻的可育花药中,与花粉粒接触的绒毡层细胞部位先发生凹陷现象,表明绒毡层细胞程序死亡过程受小孢子发育的影响;在不育花药中,由于小孢子的败育,绒毡层的细胞程序死亡不发生或推迟,从另一方面也证明了花粉发育与否对绒毡层细胞程序死亡的影响。但在白菜细胞核雄性不育花药中无论花粉是否败育绒毡层细胞都按时发生细胞程序死亡过程,在发育后期的不育花药中,绒毡层细胞依旧发生解体。到开花时,不育花药壁也是只剩表皮和药室内壁两层细胞。对该种白菜花药的超微结构观察发现,败育花药在花粉母细胞时期就表现出结构的异常。进一步用DNA电泳方法检测,不育花药在花粉母细胞时期就出现了细胞程序死亡的DNA梯状条带特征。这与超微结构观察结果相吻合。因此,白菜细胞核雄性不育的花粉是通过细胞程序死亡过程败育。在可育花药中,到小孢子发育早期才出现DNA梯状条带特征,这很可能是绒毡层细胞发生细胞程序死亡的结果。孙天恩等^[47]研究发现,水稻细胞质雄性不育系的小孢子因核行为异常引起败育,推测小孢子的败育过程是细胞程序性死亡过程。玉米CMS-S花药和花粉中均明显出现PCD过程的DNA片段化以及线粒体细胞色素C外渗的现

象,花粉败育与小孢子母细胞的程序性死亡有关^[48,49]。花药发育过程中绒毡层细胞发生退化的现象早已被发现,对绒毡层细胞的异常导致花粉败育也早被认识。如果用细胞程序死亡的观点探索绒毡层细胞的退化和花粉败育的过程,不仅为植物细胞程序死亡研究增加新内容,也在植物雄性不育机理研究中开辟了一个连接分子生物学研究和细胞生物学研究的新方向。

1.4 植物雄性不育性的应用

1.4.1 细胞核雄性不育的利用

1.4.1.1 细胞核雄性不育在作物群体改良中的应用

细胞核雄性不育材料,特别是显性核不育材料,是自花授粉作物通过轮回选择改良群体的理想材料。利用李树林等^[50,51]的双显性基因互作细胞雄性不育材料,周永明等^[52-54]开展了群体改良工作,杨光圣等^[55-60]也组建了波里马细胞质雄性不育恢复系的轮回选择群体。

1.4.1.2 细胞核雄性不育在作物制种中的应用

在杂交种选育中,可用两系法和三系法进行细胞核雄性不育杂交种制种。在以食用营养器官的蔬菜中,两系法制种只需用不育系与自交系配制一代杂种,这个自交系不一定非要具有恢复能力。在以生产种子榨油为目的的油菜中,需用不育系和恢复系配制一代杂种。目前,双隐性重叠基因核不育材料在生产上已走入应用阶段。由于该类不育材料不育性稳定,恢复源广,易于选配优势组合,作为胞质三系育种之补充,得到了一定地应用。细胞核雄性不育“三系法”制种,就是通过基因间的相互作用,利用临保系使核不育两型系中的不育株产生100%的不育系,再用该不育系和恢复系配制杂交种。目前只有双显性基因互作细胞核雄性不育和三隐性(隐性上位)基因细胞核雄性不育两类材料按照上述原理实现了三系配套^[61,62]。三隐性(隐性上位)材料具有传统核不育材料恢复谱广,育性稳定,易于转育,能避免不育胞质可能存在的负效应和细胞质单一化的潜在危害等众多优点,在杂交油菜特别是优质杂交油菜育种方面突显其优越性。而两对显性基因互作控制的核不育材料恢复源(-RfRf)极少,难以选择强优势组合,因而限制了在生产上的应用。

1.4.2 细胞质雄性不育的利用

细胞质雄性不育系是生产上利用最早、最广泛的雄性不育类型。目前,高粱、玉米、油菜、水稻、大白菜等作物已利用细胞质雄性不育系配制一代杂种,表现出明显的杂种优势,并在生产上大面积推广应用^[63]。

美国在上世纪60年代便开始在玉米杂种优势利用中广泛使用T型不育细胞质。但从1970年T型小斑病大流行后,T型细胞质就被迫停止使用,新的不育类型的选育受到重视。据不完全统计,已经发现了近百份不同来源的不育细胞质,绝大部分属于T组、S组、C组细胞质^[64]。

1956年徐冠仁由美国引进第一个高粱胞质雄性不育系TX3197A,开始了中国高粱杂种优势的研究利用^[65,66]。1958年中国科学院遗传研究所和中国农科院原子能利用研究所利用TX3197A培育成中国第一代高粱杂交种。1965年育成的晋杂5号,推广到山西、辽宁、河北等8个省市,并被引入阿尔巴尼亚、坦桑尼亚和朝鲜等国,种植面积达到100万 hm^2 ^[66]。

1970年李必湖^[31]在海南岛发现花粉败育型不育材料——野败型胞质雄性不育系,利用这一材料育成了一系列雄性不育系。1973年实现杂交水稻的三系配套,1976年开始大面积推广,实现了我国水稻育种的第二次突破。现在杂交水稻常年种植面积为1470万 hm^2 左右,占水稻总播种面积的50-55%,比常规稻增产20-30%^[31]。

傅廷栋等^[55]于1972年在甘蓝型油菜Polima盛花期发现19个雄性不育株,1976年湖南省农科院作物研究所崔德祈等利用Polima不育材料首先完成三系配套,1985年育成华杂2号及湘杂8号甘蓝型油菜品种,1988年育成甘蓝型双低杂交油菜华杂3号。此后PolCMS引进到加拿大、澳大利亚、波兰等国^[68]。该不育系不仅在油菜育种上被广泛利用,而且还被应用到其它十字花科作物雄性不育的选育中。同时,李殿荣等^[69,70]于1975年从甘蓝型油菜品种间杂交后代中发现不育株,后经选育于1983年育成陕2A三系配套,并育成杂交种秦油2号。该杂交种比常规对照品种秦油1号平均增产27.4%。目前秦油2号已在黄淮、长江流域大面积推广,年最大种植面积13万 hm^2 。

柯桂兰等^[72]以PolCM5油菜为母本,用大白菜3411为轮回父本连续回交,育成大白菜异源胞质雄性不育系CMS3411-7。用该不育系已育成大白菜雄性不育一代杂种杂13和杂14等优良品种,并大面积推广种植。

Kubo^[73]用花粉育性正常的父本与带有香甜烟草胞质的雄性不育系杂交,其中杂种F118和F119改善了评吸质量,提高了抗性。伶道儒等^[74]是用胞质雄性不育系MSG28与红花大金元杂交育成中烟9203,其综合性状优于双亲,并超过北方烟区的主栽品种

NC89。

十字花科作物存在明显的杂种优势，十字花科杂种一代利用有两条主要途径：一是利用自交不亲和系，目前国内外已在生产上广泛应用；二是利用雄性不育系，目前国内外在生产上有小范围应用。利用自交不亲和系生产一代杂种采用人工蕾期授粉，亲本种子成本高，同时多代自交易出现生活力衰退，以及杂交种杂交率难以达到100%的缺陷。为了解决以上问题，科研人员开始研究利用雄性不育系生产一代杂种。利用雄性不育系配制一代杂种能克服自交不亲和系所带来的亲本繁殖难度大，杂交率低等缺点。国内有关单位对油菜、大白菜、甘蓝等雄性不育性进行研究利用，尤其在油菜胞质雄性不育系利用方面比较突出。

1.5 本项研究的目的和意义

红麻以收获韧皮纤维或茎秆为栽培目的，杂种优势率达到 30%以上，长期以来，红麻杂种优势利用是国内外研究的热点和难点^[74-84]。印度的 Ugale^[85, 86]首先发现细胞质遗传的红麻雄性不育资源，但以后未见进一步的报道。世界各红麻生产国迄今尚未见在生产上利用的红麻雄性不育杂交种。为了解决红麻杂交制种问题，中国农业科学院麻类研究所^[8]对红麻化学杀雄法进行了大量的研究，已获得国家发明专利。但由于红麻是无限花序，花期长达 1 个月以上，需多次施药；植株高大，施药不便；且因施药后影响了昆虫传粉，需人工授粉。既污染环境，又增加成本。为节约成本，也利用了 F₂ 代。

1996 年，周瑞阳在卫星搭载红麻种子后代发现长花柱突变体^[89]。因其易于接受外来花粉而具有重要的杂种优势利用价值，但其直接应用于杂交制种需要解决假杂种的识别问题。

2001 年 3 月，周瑞阳在海南冬繁的红麻野生种 UG93 中发现了 1 株雄性不育突变体，经过与栽培品种饱和回交，于 2003 年首次选育出高抗红麻炭疽病的 UG93 细胞质雄性不育系 K03A 及其保持系 K03B，并组配出了强优势组合。该成果于 2004 年 10 月 14 日通过广西壮族自治区科学技术厅组织的专家鉴定，被评价为国际同类研究的领先水平（桂科鉴字[2004]第 152 号）。现已选育出 9 对同质异核的 UG93 细胞质雄性不育系及其保持系。

这一新发现的雄性不育材料花药败育细胞学机理方面的研究还是空白。因此，本研

究拟以UG93型细胞质雄性不育系K03A、L23A、P03A、917A、763A、258A、722A、B19-1A、福3A和保持系K03B、L23B为试验材料,探讨该不育材料雄性不育发生的细胞学机理;比较9个不育系败育过程的异同,对9个不育系进行分类研究;比较南宁夏播和海南南繁条件下不育系花药败育过程的异同,探讨环境对不育系败育的影响。为红麻细胞质雄性不育系的选育和利用提供依据。在理论研究和实际应用方面都具有重要的意义。

第一章 材料和方法

1.1 材料

试验用材料为广西大学农学院周瑞阳教授选育的 9 个红麻 UG93 型细胞质雄性不育系及其保持系。

保持系和不育系的形态特征观察与细胞学观察材料：2005 年夏播不育系 K03A、L23A、P03A 及相应保持系 K03B、L23B、P03B，2006 年夏播不育系 917A、722A、763A、258A、B19-1A 和福 3A，以上材料均种植于广西大学农场。

环境对雄性不育系小孢子败育过程的影响研究材料：2004 年海南冬繁不育系 K03A、L23A 及相应保持系 K03B、L23B，种植于海南陵水。

1.2 方法

1.2.1 形态特征观察

在红麻盛花期对保持系和不育系花药进行田间观察及体式显微镜下观察。

1.2.2 细胞学观察

分别于 2005 年 3 月、2005 年 10 月及 2006 年 10 月的红麻盛花期，按照花序上着生的顺序，取不同发育时期的花蕾。按照花蕾大小分为 4 级，分别归类。用镊子剥去花被，在卡诺液中固定 12~24 h 后转入 70% 酒精保存。之后依次经过 75%、80%、85%、90%、95%、100% 的梯度酒精脱水，再顺次转入 2/3 酒精+1/3TO、1/2 酒精+1/2TO、1/3 酒精+2/3 TO、TO I、TO II 中透明。42 °C 温箱中透蜡 7-20 天后包埋。旋转式切片机切片，切片厚度 6~10 μm ，铁矾-苏木精染色，Leica DMLB 显微镜观察并照相。

第二章 结果与分析

2.1 不育系与保持系花药的形态特征比较

2.1.1 保持系的花药形态特征

保持系成熟花药大而饱满，红褐色，背部开裂，散出大量黄褐色花粉。显微镜下观察发现，花粉大而圆，表面覆盖着厚厚的含油层，呈亮黄色。

2.1.2 不育系的花药形态特征及其分类

不育系成熟花药瘦小干瘪，一般呈淡红色、白色或黄褐色，多不开裂，但也有少数花药开裂并散出微量花粉。不育系花粉比保持系花粉体积小，多畸形，表面没有覆盖物或覆盖物薄且不均匀，白色或黄色泛白。尽管部分不育系能够散出微量花粉，但这些花粉却是败育的。

根据花药是否有微量花粉可以将不育系分为两类：一、少数花药开裂并散出微量花粉，包括不育系 258A、722A、P03A 和 K03A 等；二、花药全部不开裂，包括不育系 B19-1A、763A、917A、福 3A 和 L23A 等。其中，K03A 只在盛花初期有微量花粉，之后并不见花药开裂及微粉现象，这表明，不育系对环境变化敏感。

2.2 不育系与保持系小孢子和花药发育的细胞学观察

2.2.1 保持系小孢子和花药发育过程

造孢细胞不经分裂直接发育成为小孢子母细胞，具有大而明显的细胞核和浓厚的细胞质（图版I-a, b）。红麻小孢子母细胞的减数分裂（图版I-c）为同时型。经过减数分裂形成四分体（图版I-d），具有透明的胼胝质壁。四分体后期，随着胼胝质壁的逐渐溶解，可以看到小孢子表面的原外壁。小孢子从四分体中游离出来以后，在原外壁的基础上，形成真正的外壁。小孢子发育整齐，初始呈近圆形，壁薄，染色浅，核大并位于中央（图版I-e）。之后，小孢子外壁迅速增厚，壁表面的刺也随之形成（图版I-f）。小孢子逐渐变

圆,散生型萌发孔明显。随着大液泡的形成,细胞核移至周边位置(图版II-a, b)。经一次有丝分裂,成为二核,随着细胞内容物不断积累、充实(图版II-c),小孢子最终发育为成熟的花粉粒(图版II-d)。

小孢子母细胞减数分裂开始前,可见花药壁自外向内由表皮层、纤维层、中层及绒毡层四部分构成(图版I-b, c);表皮细胞1层,方形或矩形,小孢子发育后期,该层细胞切向压扁、变为扁平状;纤维层细胞1层,初始呈扁平状,二核花粉期渐向径向扩展而且细胞壁发生不均匀的径向条纹增厚(图版II-d);中层由2层切向延长的细胞组成,近药室的内层细胞一般在减数分裂时期和四分体时期退化解体,部分也可以维持到单核早期,而远离药室的外层细胞可以维持到二核花粉期,随着花粉的成熟逐渐解体;绒毡层细胞1层,体积大,排列整齐,1~多核,细胞质浓密;随着花粉母细胞的减数分裂、小孢子和雄配子体的发育进程,绒毡层发生了较明显变化,先是细胞体积增大,继而细胞壁径向延长(图版I-c, d),随后逐渐原位降解(图版I-e, f, 图版II-a),单核晚期,残余的绒毡层细胞逐渐离开花药壁向药室内移动,最后作为营养被吸收(图版II-b, c),到花粉粒成熟时消失殆尽(图版II-d)。

2.2.2 不育系小孢子败育过程及其分类

观察发现,UG93型细胞质雄性不育系小孢子的败育是一个比较复杂的过程。败育过程持续较长时间,早在减数分时期,少数小孢子母细胞就出现异常,但大量败育主要发生在四分体时期、单核期和二核期。小孢子/花粉的败育方式也有多种,有的小孢子四分体时期胞质出现异常,单核期小孢子壁能继续发育一段时间,之后小孢子解体;有的单核小孢子壁先解体,之后败育;有的单核小孢子发育到一定程度之后,胞质降解,小孢子随之败育;有的二核花粉质壁分离、胞质解体等。不育系小孢子败育的主要时期是有差异的,但它们在相同时期的败育方式相似。而在一个不育系中,多种败育方式相互嵌合,共同构成花药的败育。

根据小孢子败育的主要时期,可以将不育系分为四类:一、单核期败育型;二、二核期败育型;三、过渡型;四、多时期败育型。

2.2.2.1 单核期败育型

这类不育系的小孢子在单核后期大量解体,另外还有少量败育程度轻的小孢子能够继续发育到二核期,之后解体。花药成熟时,药室空或仅剩少量空、瘪花粉或花粉壁残体。不育系917A和B19-1A属于此类。

不育系 917A 小孢子和花药败育过程 能够正常形成小孢子母细胞。绝大部分小孢子母细胞能够正常减数分裂,但也有少数小孢子母细胞出现液泡,看不到明显的细胞核(图版 II-e)。减数分裂除形成正常的四分体小孢子外,还出现少量染色深,或严重收缩,难以辨别出细胞质与细胞核的四分体小孢子(图版 II-f)。小孢子从四分体中游离出来以后,内外壁逐渐形成,体积也能够正常增大,但与保持系相比,917A 小孢子外壁发育不良,还有少数小孢子变形严重,胞质染色深,且难以区分细胞质与细胞核。单核中、后期,小孢子内大液泡逐渐形成,但细胞核界限变得模糊,难以与细胞质区分,并逐渐与细胞质一起凝成染色深的团块,同时,小孢子外壁渐渐剥离或解体,小孢子走向败育(图版 III-a,b,c,d)。另外,在个别花药中,少数小孢子能够持续发育到二核期,并能够积累少量内含物。成熟花药中可见药室内剩余少量花粉壁残体(图版 III-e);还有极少数花药中尚存在个别带有少量内含物的花粉(图版 III-f)。

绒毡层细胞在四分体时期即有小液泡出现(图版 II-f),部分提前脱离药壁,进入药室。单核期,绒毡层细胞愈益液泡化,并逐渐融合形成行状怪异的细胞团块(图版 III-b),随着小孢子的解体而逐渐解体(图版 III-c, d),另有部分花药内绒毡层原生质流入药室腔并提前解体(图版 III-a)。

药室内壁纤维加厚基本正常,但花药开裂时,裂口很小,或两相邻药室的壁仅与药隔拉断,而相互仍连在一起。

不育系 B19-1A 小孢子和花药败育过程 小孢子母细胞减数分裂基本正常,但在一些花药中,有少数小孢子母细胞染色深、质核不分,或解体成网状。四分体时期,多数小孢子表现正常,同时,部分花药中出现少量镰刀状、染色过深、难以辨别细胞质与细胞核的小孢子(图版 IV-a)。多数单核小孢子能够正常增大,同时也有一些小孢子出现异常,如:单核早、中期有少数镰刀状、染色深、质、核不能区分的小孢子;核中央期,个别药室内,小孢子与绒毡层全部解体;液泡增大期,小孢子外壁薄、不均匀且刺弱小、少数甚至剥落,部分单核小孢子不能正常变圆,有少量小孢子胞质稀薄,呈网状,还有少数小孢子原生质染色过深,难以辨别细胞质与细胞核(图版 IV-b, c);单核靠边期,发现少量小孢子的细胞核内有类似核仁、染色深且形状不规则的凝聚物(图版 IV-d, e)。到单核中后期,大量小孢子逐渐变形,并与流入药室腔的绒毡层原生质一起解体(图版 IV-d, e, f)。花药内壁细胞增大初期,药室多瘪,内含小孢子解体后的残余物或尚含少量粘聚在一起并严重变形的小孢子(图版 V-a),之后,随着药室内壁纤维加厚,瘪药室又逐渐恢复原来的形状,残存的少量小孢子还能够积累一些内含物。花药开裂时,多数药室

内可见少量空、瘪花粉（图版 V-b）。

小孢子母细胞减数分裂形成四分体之前，绒毡层基本正常。四分体时期，在部分药室内出现绒毡层脱离药壁、或收缩、或有少量小液泡等异常现象（图版 IV-a）。单核期，随着小孢子的增大，绒毡层愈益液泡化、变形（图版 IV-b, c）。单核中后期，绒毡层严重液泡化，之后，绒毡层细胞原生质流入药室腔，并很快解体（图版 IV-d, e, f）。花药重新恢复原来的形状后，部分药室内还可以看到少量绒毡层细胞的残余原生质，至花药开裂时，消失殆尽（图版 V-b）。

成熟花药不开裂，或药壁不能完全裂开，或裂口很小（图版 V-b）。

2.2.2.2 二核期败育型

不育系在四分体时期和单核期只有少量小孢子败育，大多数小孢子在二核期败育解体，花药开裂时，药室内剩少量空、瘪花粉。包括不育系 K03A、258A、福 3A 和 722A。

不育系 K03A 小孢子和花药败育过程 减数分裂时期，大多数小孢子母细胞表现基本正常，但少量小孢子母细胞液泡化或是收缩变形（图版 V-c, d）。四分体时期，少量四分体小孢子染色很深，无法辨别细胞质与细胞核，还有少量镰刀状的小孢子。单核期部分小孢子发育异常。少量单核早、中期小孢子质核降解、染深，液泡不能正常增大（图版 V-e, f），但小孢子壁还能够继续发育，直到单核后期解体（图版 VI-a, b），还有一些单核小孢子壁破损。二核期，花粉一般不能积累内含物或只能积累少量内含物（图版 VI-c），之后花粉解体（图版 VI-d）。成熟花药中仅剩少量空、瘪花粉或花粉残壁（图版 VI-e, f）。

减数分裂过程中，部分药室内绒毡层出现小液泡，个别花药中绒毡层原生质解体，几乎完全不能染色（图版 V-d）。四分体时期，绒毡层继续液泡化，另有部分花药内绒毡层染色很深或解体。单核早、中期，绒毡层愈益液泡化，一些绒毡层细胞相互融合在一起（图版 V-e, f, 图版 VI-a），少数药室内绒毡层原生质流入药室腔并解体。单核后期，绒毡层细胞解体剩少量原生质残体（图版 VI-b）。二核期，绒毡层解体消失（图版 VI-c, d）。

多数花药药室内壁能够正常纤维加厚，但也有少数花药中的部分药室内壁不能纤维加厚，还有少数花药药壁皱缩。花药不能开裂或花药开裂不完全，两相邻药室的壁仅与药隔拉断，而相互仍连在一起（图版 VI-e, f）。

不育系福 3A 小孢子和花药败育过程 小孢子母细胞期及减数分裂时期，少量小孢子母细胞严重液泡化（图版 VII-a, b）。四分体时期及单核早期，除大多数正常的小孢子

外, 还有少量染色深、镰刀形、质核不分、或严重收缩的小孢子 (图版VII-c)。单核期, 小孢子基本能够正常发育, 但同时也观察到一些异常现象, 如单核中期的一些花药中, 小孢子大小不一; 单核小孢子外壁普遍发育不良, 外壁薄、不均匀、刺小且萌发孔异常 (图版VII-d), 后期少量小孢子出现外壁剥落的现象; 还有少数花药的小孢子在单核晚期开始解体 (图版VII-e)。多数单核小孢子基本能够完成有丝分裂, 并且积累少量内含物。但随后逐渐出现花粉质壁分离、外壁剥离或解体、胞质收缩为一团的现象, 花粉渐渐解体 (图版VII-f, 图版VIII-a)。花药开裂时, 药室内仅剩少量花粉残壁、空花粉和个别瘪花粉 (图版VIII-b)。

减数分裂过程中, 少量绒毡层细胞出现收缩、或脱离药壁、或液泡化的现象 (图版VII-b)。四分体时期, 少量药室内绒毡层还出现解体。单核中后期, 绒毡层细胞逐渐液泡化, 并且部分相互融合成团块 (图版VII-d, e); 还有少数花药中绒毡层细胞原生质流入药室腔, 并迅速解体。大多数绒毡层细胞能够基本保持原位解体, 直至随着花粉的解体而消失 (图版VIII-a, b)。

药室内壁能够纤维加厚, 但成熟花药多数不能开裂或开裂不完全、两药壁间仍相连, 还有少数花药尽管能够开裂, 但裂口很小。

不育系 258A 小孢子和花药败育过程 观察发现, 减数分裂时期个别花药中小孢子母细胞液泡化 (图版VIII-c)。大多数四分体小孢子表现正常, 但少数呈镰刀状, 或过度收缩, 难以分辨细胞质与细胞核。单核期大部分小孢子发育基本正常, 但是, 在单核早、中期, 仍可看到少数镰刀状的小孢子 (图版VIII-d); 单核小孢子外壁发育不良, 薄且刺弱小 (图版VIII-f); 单核中、后期, 观察到少量小孢子的细胞质缩成染色较深的团块, 其中部分质、核不分 (图版VIII-f), 也有少量单核孢子的外壁剥落或者解体 (图版VIII-e, 图版IX-a)。进入二核期后, 花粉能够不同程度地积累一些内含物, 之后又渐渐解体 (图版IX-b, e), 至花药开裂时, 药室内仅剩少量空、瘪花粉、或个别基本充实但外壁发育不良的花粉 (图版IX-e, f)。

四分体时, 多数花药中绒毡层出现小液泡, 脱离药壁, 还有个别花药中绒毡层部分解体。单核期, 绒毡层渐渐形成大的原生质团块, 液泡化也愈益严重, 并逐渐解体 (图版VIII-e, f, 图版IX-a)。随着花粉的发育和解体, 绒毡层消失殆尽 (图版IX-e)。

二核期, 部分花药的药壁皱缩 (图版IX-d), 部分花药药室内壁能够正常纤维加厚 (图版IX-c)。成熟花药表皮多皱缩, 部分花药能够开裂, 还有部分开裂不完全、两药室壁仍有细胞相连。

不育系 722A 小孢子和花药败育过程 多数小孢子母细胞能够正常进行减数分裂,但也有少数小孢子母细胞液泡化(图版 X-a)。大部分四分体小孢子发育正常,只有少量过度收缩,或呈镰刀性形,质核不分。单核早、中期发育基本正常,但小孢子外壁发育不良,壁薄、发育迟缓、刺小(图版 X-b)。单核晚期,多数小孢子表现大体正常,但有少量小孢子外壁剥落或壁破损,还有少量小孢子解体(图版 X-c, d),另外还有一些小孢子不见核仁或核变为扁平状(图版 X-e)。二核期,随着药室内壁细胞伸长及纤维加厚,可以看到药室内大部分花粉都能够积累一些内含物,同时,花粉内出现液泡或质壁分离,花粉胞质渐解体(图版 X-f, 图版 XI-a)。花药开裂时,药室内多空、瘪花粉,还有个别花粉虽充实但壁发育不良(图版 XI-b)。

减数分裂过程中,少量药室绒毡层轻度脱离药壁。四分体时期绒毡层脱离药壁,同时出现小液泡,少量有轻微收缩的现象。单核期,绒毡层细胞逐渐相互融成团块,单核中期后逐渐液泡化,单核后期渐渐解体(图版 X-b, c, d, e),随着花粉的解体而消失(图版 X-f, 图版 XI-b)。药室内壁能够纤维加厚,但多数成熟花药开裂不完全,两药壁间仍相连,或是裂口很小(图版 XI-b)。

2.2.2.3 过渡型

这类不育系中,大部分小孢子败育发生在单核晚期和二核早期,花药开裂时,花药内剩余少量花粉残壁或空、瘪花粉。包括不育系 L23A 和不育系 763A。

不育系 L23A 小孢子和花药败育过程 大多数小孢子母细胞发育正常,但在减数分裂以前,个别药室中有小孢子母细胞降解(图版 XI-c);减数分裂过程中,少数药室中小孢子母细胞液泡化,呈网状(图版 XI-d)。四分体时期,除有少数镰刀形的小孢子外,基本正常。单核期小孢子发育出现了一系列的异常现象。小孢子壁普遍发育不良,外壁薄、不均匀且刺细小。单核早、中期,部分小孢子质核降解,成为染深的团块,小孢子不能正常增大变圆(图版 XI-e, f),并在单核中、后期解体(图版 XII-a, b)。单核中、后期,部分小孢子质核收缩为一团,核小且呈扁平状或是难以分辨(图版 XII-c);部分小孢子外壁剥落或是壁解体成碎粒(图版 XII-d);还有些小孢子同时出现上述两种状况。另外,还有部分小孢子能够继续发育到二核期,有些还能充实少量内含物,但之后也陆续解体(图版 XII-e),成熟花药内仅剩少量空花粉(图版 XII-f)。

减数分裂过程及之前,个别花药绒毡层细胞降解,染色深。四分体时期,绒毡层细胞中出现液泡。单核期,绒毡层脱离药壁,部分细胞相互融合形成原生质团块,并且液泡化愈益明显(图版 XI-e, f, 图版 XII-a, b, c, d),还有一些花药中绒毡层原生质流入药室

腔而提前解体消失。进入二核期，绒毡层完全消失（图版XII-e, f）。

药室内壁纤维加厚过程中，花药壁常有的某一段或几段不能正常加厚，成熟花药不能正常开裂（图版XII-f）。

不育系 763A 小孢子和花药败育过程 小孢子母细胞能够正常完成减数分裂。四分体时期基本正常，仅有少数小孢子呈镰刀形，染色深，难以辨别细胞质与细胞核。单核小孢子初始发育基本正常，但其外壁发育不良，壁薄且刺弱小（图版 XIII-a）。随着小孢子内液泡的增大，部分小孢子外壁剥落或解体，小孢子变形，还有少量小孢子解体（图版 XIII-b, c, d）。单核靠边期，大量小孢子外壁破损、变形，解体的小孢子也越来越多（图版 XIII-e）。单核小孢子解体时往往伴随着绒毡层原生质流入药室腔并迅速解体的现象（图版 XIII-b）。未解体的单核小孢子能够发育到二核期，但花粉内含物不能正常充实，二核早中期全部解体（图版 XIII-f），花药开裂时药室内只能见到少量残余的花粉壁（图版 XIV-b）。

减数分裂时期，在少量药室中，发现轻微的绒毡层收缩或脱离药壁的现象。四分体时期，除上述异常现象外，部分绒毡层细胞中出现液泡。单核期，绒毡层细胞脱离药壁进入药室腔，愈益液泡化，部分细胞相互融合成形状各异的团块（图版 XIII-a, c），随着小孢子的变形、解体，绒毡层原生质流入药室腔，充塞在小孢子之间，并与小孢子一同解体（图版 XIII-b, d, e）。二核期，绒毡层仅剩少量的残余胞质（图版 XIII-f），并逐渐解体。

药室内壁能够纤维加厚，但花药开裂时，两相邻的药室壁之间及其与药隔间细胞不能完全拉断，仍有少量细胞相连（图版 XIII-b）。一些药室中，中层不能正常解体。小孢子全部解体的药室中，各层药壁细胞体积异常膨大（图版 XIV-a）。

2.2.2.4 多时期败育型

以上各种败育类型以一个或两个败育时期为主，与此不同，多时期败育型不育系的雄性败育大量发生在多个发育时期，败育过程持续的时间长。试验所观察的9个不育系中，只有不育系 P03A 属于这一类型。

不育系 P03A 小孢子和花药败育过程 减数分裂期，观察到少量花药中小孢子母细胞出现液泡化（图版 XIV-c），或收缩、染色深且质核不分，或相互粘连，或提前解体等现象（图版 XIV-d, e）。四分体时期花药内普遍出现异常，有的四分体小孢子之间不能正常形成胼胝质壁（图版 XIV-f）；有的小孢子染色深、质核不分（图版 XIV-f）；有的小孢子胞质内有小液泡，并逐渐解体（图版 XV-a, b）。单核期，小孢子多瘪，或是质、

核收缩为染色深的团块,之后陆续解体(图版 XV-c, d)。也有一些花药中部分小孢子能够持续发育到二核期,但花粉不能正常充实或解体(图版 XV-e),花药成熟时见大量空、瘪花粉(图版 XV-f)。

减数分裂时期,个别花药内绒毡层严重液泡化,几乎染不上色。四分体时期,绒毡层脱离药壁,液泡化,或是细胞相互融合,还有部分花药内绒毡层细胞解体(图版 XV-a, b)。单核期,花药内绒毡层液泡化、相互融合成形状各异的团块(图版 XV-c),也有部分花药内绒毡层原生质侵入药室腔并提前解体(图版 XV-d)。二核期,部分花药中还剩少量绒毡层原生质,并渐渐解体(图版 XV-e)。

一些花药内小孢子和绒毡层解体时,中层及药室内壁也大多一同解体(图版 XV-d),仅剩药壁表皮。二核期花药药室内壁能够纤维加厚,但药裂不完全,两相邻药室壁不能完全断裂(图版 XV-e, f)。

2.3 光温环境对雄性不育系小孢子败育的影响

与南宁夏播红麻盛花期的气候相比,海南冬繁盛花期气温偏低,日照长。对海南冬繁红麻 CMS 系 K03A 和 L23A 花药的解剖观察发现,与南宁夏播材料相比,小孢子最早出现败育的时期大体相同,但败育过程持续的时间短,单核晚期全部败育,小孢子败育迅速而彻底。

海南冬繁不育系 K03A 小孢子和花药发育过程。小孢子母细胞减数分裂过程大多能够形成正常的四分体,但有的四分体也出现细胞收缩变形,染色过深,无法辨别细胞质和细胞核的现象。而大量败育发生在单核期。与保持系相比, K03A 的单核小孢子外壁发育严重不良,薄且质脆、易破损,刺发育迟缓且稀少细小(图版 XVI-c),有的小孢子还收缩变形(图版 XVI-d)。发育过程中,小孢子外壁破损并逐渐溶解,内容物随之降解,小孢子败育(图版 XVI-e, f)。

K03A 花药壁的发育也出现异常。一些花药中,表皮细胞和纤维层细胞没有切向压扁,而始终呈方形或近椭圆形;中层细胞也出现延迟解体的现象;小孢子母细胞减数分裂过程中,绒毡层细胞中已有液泡出现(图版 XVI-a),随着小孢子的发育,绒毡层液泡化愈益明显,细胞膨大变形或脱离药壁、相互融合(图版 XVI-b, c, d)。单核中期,绒毡层细胞壁解体,原生质流入药室中,逐渐溶解(图版 XVI-e, f)。

海南冬繁不育系 L23A 小孢子和花药败育过程 小孢子母细胞形成及减数分裂的特征与保持系基本相同，败育发生在四分体形成时及之后。一些药室中，四分体及其形成时的胼胝质壁被染为黄褐色。少量四分体小孢子收缩、变形，原生质染色过深，无法辨别出细胞核与细胞质（图版 XVII-a）。单核早中期，小孢子发育基本正常，但部分小孢子外壁上的刺比保持系的细小，还有的小孢子原生质收缩（图版 XVII-d）。单核后期普遍出现外壁解体现象。先是外壁上的刺逐渐解体，继而外壁也破裂、解体成念珠状，小孢子原生质收缩成为核、质不分的团块，最终导致小孢子败育（图版 XVII-e, f）。

在小孢子败育过程中，药壁也出现异常现象。有的表皮细胞和纤维层细胞没有正常切向压扁，而始终呈方形或近椭圆形（图版 XVII-e）；中层细胞解体延迟；绒毡层细胞出现更多异常现象，有的在四分体时期就强烈变形，或互融、粘连成形状怪异的团块，提前脱离花药壁进入药室腔中（图版 XVII-b），有的绒毡层细胞过度膨大或明显液泡化（图版 XVII-c）。一个药室中的绒毡层细胞可出现上述一种或几种异常现象。至单核中后期，绒毡层细胞壁全部解体，原生质融合，流入药室，并逐渐溶解（图版 XVII-e, f）。

第三章 讨 论

被子植物雄性不育现象早在一个世纪前就被描述过,后在农作物杂种优势利用中取得很大成功。与此同时,对雄性不育机理也进行了长期的探索,提出了一些理论解释或假说,认为导致雄性不育的原因是雄性器官或雄配子的功能性障碍。雄配子的发育是受遗传控制的,在各个不同的发育时期,受到许多基因的调控。近年来分子生物学的研究表明,植物花粉花药发育过程中,约有 20 000 个基因在花药中特异表达;花粉中是以数千至数万高拷贝的占多数,而营养植株中高拷贝数的很少;花粉发育过程中的大多数基因的表达具有时间和空间的特异性。本试验所用的不育系败育情况的差异,是控制花药发育的基因,在不同时期、不同位置出现表达上的差异造成的。

3.1 红麻细胞质雄性不育系的分类

研究发现,9 个不育系花药的形态特征和小孢子败育过程是有一定差异的。根据成熟花药是否开裂并有微量花粉,可以将不育系分为少数花药开裂并有微量花粉和全部不开裂两类。根据小孢子败育的主要时期,可以将不育系分为单核败育型、二核败育型、过渡型和多时期败育型四类。比较发现,有微量花粉的不育系大多属于二核期败育型,花药成熟时,药室中一般可以见到少量空、瘪花粉,与形态观察结果一致。这表明,小孢子败育发生早,败育一般就比较彻底。

3.2 红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞学机制

周洪生等^[49]认为,雄性不育的细胞学实质是细胞的自我降解过程。穆蕊等^[48]研究发现玉米 CMS-S 花粉败育与小孢子母细胞程序性死亡有关。谢潮添等^[32, 44]的研究也表明白菜细胞核雄性不育的花粉是通过细胞程序死亡过程败育。在本研究中观察到,四分体时期不育系花药内有少量小孢子细胞质出现异常降解,小孢子呈镰刀形,胞质染色深,

无法分辨细胞核。单核期, 这些小孢子的壁可以继续增大的, 一般在单核中后期解体。一些不育系中, 单核中后期出现数量不等的小孢子质核降解为近圆形、染色深的团块, 小孢子壁也随之解体。一些不育系的花粉在二核早期质壁分离, 或是在积累一定量内含物后, 其细胞内又出现解体, 花粉最终解体。可以推测, 红麻 CMS 系小孢子的败育过程中存在一个细胞自我降解的过程, 发生早的降解较彻底, 发生晚的降解不彻底。这还需要进一步的研究来证实。

绒毡层对小孢子和花粉的发育具有重要的意义。除了在小孢子/花粉的发育中执行营养的功能外, 在绒毡层发育的不同时期的活动还起着多方面的作用: (1) 合成和分泌胼胝质酶; (2) 释放多糖到药室; (3) 形成小孢子/花粉外壁的前提物质; (4) 形成乌氏体; (5) 形成绒毡层膜; (6) 形成花粉外壁蛋白; (7) 形成花粉鞘和含油层。绒毡层发育早期具有浓厚的细胞质和丰富的细胞器, 通过自溶为发育中的花粉提供营养。绒毡层细胞解体是一种典型的细胞程序化死亡过程。红麻花药绒毡层属于腺质绒毡层, 在四分体后期至单核早期细胞绒毡层细胞壁解体, 在较长的时间内, 由质膜包围着细胞质, 避免原生质体发生融合, 保持原位降解。在红麻 CMS 系中, 绒毡层最早在小孢子母细胞时期出现异常, 单核期普遍出现液泡化、细胞融合、原生质流入药室腔等现象。一方面, 绒毡层正常的自溶过程遭到不同程度的破坏, 其原有功能受到影响, 直接造成单核小孢子的外壁发育不良等, 但小孢子一般还能继续发育; 另一方面, 观察到一些花药的绒毡层原生质流入药室腔后, 小孢子也迅速变形解体(如 763A), 这表明, 绒毡层异常解体可能这些花药中小孢子解体的直接和主要原因。

小孢子生活在药室腔中, 其败育是自身与生活环境共同作用的结果。为了阐明红麻 CMS 系败育的机理, 我们还需要从细胞水平、分子水平等方面做深入的研究。

3.3 核背景对红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的影响

陈伟程等^[95]认为, 胞质不育基因与核中相应不育主基因对小孢子败育起主导作用, 但小孢子的败育进程、绒毡层核分裂、细胞质液泡化程度受到核内有关修饰基因的影响。刘忠松等^[5]认为, 核基因型在遗传上影响线粒体基因组表达的结构和表达, 在表型上影响小孢子的败育时期和败育方式, 以及败育程度及其对生境条件的敏感性。观察发现, 不育系多在小孢子母细胞减数分裂时期或四分体时期开始出现异常, 小孢子败育过程持

续的时间一般比较长,但多数以某一段时期为主。不同核背景花药败育的主要时期是有差异的,根据败育发生的早晚及特点可以分为单核期败育型,二核期败育型,过渡型(单核晚期至二核早期败育型),多时期败育型。除 P03A 在四分体时期小孢子和绒毡层解体外,各不育系在相同时期出现的败育方式相似,只是严重程度不同。这与前人的研究基本一致。

3.4 环境因素对红麻细胞质雄性不育系花药败育的影响

质核互作雄性不育性比核雄性不育性容易受到环境条件的影响^[7],如高粱 3197A 不育系在高温季节开花的个体出现正常花药^[7],油菜 po1CMS 系对温度变化比较敏感,容易产生可育花粉等^[97-99]。在本研究中,南宁夏播盛花期比海南冬繁红麻盛花期气温偏高,日照短。比较两种条件下的不育系发现,败育最早出现的时期、败育的主要方式、以及绒毡层出现的异常现象并没有太大的变化,只是在南宁夏播时,不育系小孢子败育过程都有所延长。可见,光温环境对红麻细胞质雄性不育系小孢子的败育虽有一定影响,但影响并不大,不育性比较稳定。

第四章 结 论

根据成熟花药是否开裂并有微量花粉,可以将不育系分为少数花药开裂并有微量花粉和全部不开裂两类。根据小孢子败育的主要时期,可以将不育系分为单核期败育型、二核期败育型、过渡型和多时期败育型四类。

绒毡层异常是不育系小孢子败育的重要细胞学原因,但不同花药中绒毡层异常的严重程度不同,故在小孢子败育过程中的影响程度也不同。小孢子败育还可能与自身降解有关,这需要进一步研究证实。

9个不育系花药最早出现异常的时期大体相同,小孢子败育过程持续的时间一般比较长,但多数不育系中以某一段败育时期为主。不同核背景花药败育的主要时期是有差异的,但绝大多数不育系在相同时期出现的败育方式相似,只是严重程度不同。

光温环境对红麻细胞质雄性不育系小孢子的败育虽有一定影响,但影响并不大,不育性比较稳定。

参考文献

1. 李宗道. 麻作的理论与技术. 上海: 上海科技出版社. 1980: 575-598
2. 林培青, 祁建民, 林荔辉等. 加强红麻种业体制建设和产品综合开发的若干思考. 福建农业科技. 2000(6): 26-27
3. 何森. 红麻造纸与西部开发. 中华纸业. 2000(12): 21-26
4. 龙海超, 张木祥. 我国红麻制浆造纸探讨. 2000(3): 15-18
5. 刘忠松, 官春云, 陈社员等. 植物雄性不育机理的研究与应用. 北京: 中国农业出版社. 2001: 27-37
6. Kaul MLH. Male sterility in higher plants. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 1988: 5-13
7. 刘庆昌主编. 遗传学. 北京: 科学出版社. 2007: 261-268
8. 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社. 1982: 29-87
9. 吕世友, 李彦舫, 陈祖铿等. 花粉发育的研究进展. 植物学通报. 2001, 18(3): 370-346
10. 艾素云, 罗迪光, 马妙娟. 木薯的胚胎学研究 I. 小孢子的发生和雄配子的发育. 广西农业大学学报. 1995, 14(3): 207-212
11. Erika.D.Anderson, John N.Owens. Microsporogenesis, Pollination, Pollen Germination and Male Gametophyte Development in *Taxus brevifolia*. Annals of Botany. 2000, 86(5): 1033-1042
12. Carol A.Furness, Paula J. Rudall. Microsporogenesis in Monocotyledons, Annals of Botany. 1999, 84(4): 475-499
13. Carol A Furness, Paula J Rudall. Comparative structure and development of pollen and tapetum in pandanales, International Journal of Plant Sciences. 2006, 167(2): 331-348
14. 胡适宜, 朱澄. 被子植物有性生殖图谱. 北京: 科学出版社, 2000: 6
15. 张英涛, 杨海东, 陈朱希昭等. 绒毡层研究进展. 植物学通报. 1996, 13(4): 6-13
16. 利容千. 几种农作物雄性不育的细胞学研究. 武汉大学学报(自然科学版). 1978(1): 83-89
17. 北京大学生物系植物遗传育种专业. 雄性不育和雄性可育小麦花药和花粉发育的细胞学观察. 植物学报. 1976, 18(2): 141-149
18. 刘乐承, 张弢, 曹家树. 植物花粉发育的分子生物学研究进展. 长江大学学报(自然科学版). 2006, 3(3): 174-178
19. 邵寒霜, 李继红, 郑学勤. 烟草绒毡层特异启动子TA29、解淀粉芽孢杆菌Barstar基因的克隆与测

- 序. 华南热带农业大学学报. 1999, 5(3): 2-4
20. 刘大文, 谢友菊, 王守才等. 拟南芥菜花药绒毡层启动子的克隆和序列分析. 作物学报. 2000, 26(4): 15-21
21. 丁兆军, 吴孝槐, 王台. 水稻花药绒毡层特异表达基因RA39的克隆与表达特性分析. 植物学报. 2003, 45(2): 219-222
22. Caiyun Yang, Zhengyao Xu, Jie Song et al. Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 Regulates Secondary Thickening in the Endothecium and is essential for anther dehiscence. Plant Cell. 2007, 19(2): 534-548
23. 黄晋玲, 杨鹏, 李炳林, 安泽伟等. 棉花晋A细胞质雄性不育系小孢子发生的显微和超显微结构观察. 棉花学报. 2001, 13(5): 259-263
24. Strittmatter, Negrón-Ortiz, Hickey. Comparative microsporangium development in male-fertile and male-sterile flowers of *Consolea* (Cactaceae): When and how does pollen abortion occur. Grana. 2006, 45(2): 81-100
25. 田福发, 徐跃进, 袁黎等. 红菜薹雄性不育系花药败育的细胞形态学观察. 武汉植物学研究. 2004, 22(3): 269-272
26. 刘燕, 董振生, 张改生等. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育研究进展. 西北农业学报. 2004, 13(1): 114-119
27. 孙日飞, 吴飞燕, 司家钢等. 大白菜核雄性不育两用系小孢子发生的细胞形态学研究. 园艺学报. 1995, 22(2): 153-156
28. 余凤群, 傅廷栋. 甘蓝型油菜几个雄性不育花药发育的细胞形态学研究. 武汉植物学研究. 1990, 8(3): 209 -216
29. 粟翼玫. 普通小麦两种不育类型小孢子发育的形态学比较. 北京农业大学学报. 1985, 11(4): 209-212
30. 董庆华, 利容千, 王建波等. 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. 1996, 42(2): 207-212
31. 朱英国. 水稻雄性不育生物学. 武汉: 武汉大学出版社. 2000: 3-4, 234-243, 280-281
32. 秦泰辰, 刘大文. 玉米雄性不育系小孢子发生过程中的细胞学特性. 上海农业学报. 1990, 6(1): 9-14
32. 谢潮添, 魏冬梅, 田惠桥. 高等植物雄性不育的细胞生物学研究进展. 植物生理与分子生物学学报. 2006, 32 (1): 17-23

33. Taylor PE, Glover JA, Lavithis M, et al., Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analyses of postmeiotic developmental mutants. 1998, 20(5): 492-505
34. Fei H, Sawhney VK. MS32-regulated timing of callose degradation during microsporogenesis in *Arabidopsis* is associated with the accumulation of stacked rough ER in tapetal cells. Sex Plant Reprod. 1999(12): 188-193
35. Chaubal R, Zanella C, Trimnell MR, et al. Two male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall. Am J Bot. 2000(87): 1193-1201
36. Suzuki K, Takeda H, Tsukaguchi T, et al. Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heat stress. Sex Plant Reprod. 2001(13): 293-299
37. Zhang C, Guinel FC, Moffatt BA. A comparative ultrastructural study of pollen development in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and male-sterile apt1-3. Protoplasma. 2002(219): 59-71
38. Kaul C L, Singh S P. Studies in male sterile barely 11 pollen abortion. Crop Sci. 1966(6): 539-541
39. Kubo T. Studies on breeding F1 hybrids of flue-cured tobacco using cytoplasmic male sterility. Bulletin. Iwata Tobacco Experiment Station. 1985(17), 69-138
40. Laser KD, Listen N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Botany Review. 1972(38): 425-454
41. Laser K.D.. A light and abdelectron microscope study of the staman vascular bundle in cytoplasmic male sterile sorghum bicolor. Ph D Tesis Iowa State Univ Ames
42. Leavings CS, et al.. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and texas male sterile maize. Science. 1976: 193-158
43. 谢潮添, 杨延红, 朱学艺等. 白菜细胞核雄性不育花药的细胞化学观察. 实验生物学报. 2004, 37(4): 295-302
44. 谢潮添, 杨延红, 葛丽丽等. 白菜核雄性不育花药超微结构的研究. 实验生物学报. 2005, 38(6): 501-518
45. 罗玉英, 李怀军, 刘玉乐等. 转基因雄性不育烟草花药绒毡层及花粉发育的特点. 遗传. 1998: 20
46. 李杰, 朱碧岩, 张铭光. 植物发育过程中的细胞程序性死亡. 植物学通报. 2005, 22(增刊): 22-28
47. 田惠桥. 被子植物有性生殖过程中的细胞程序性死亡. 植物生理与分子生物学学报. 2002, 28(3): 161-168
47. 孙天恩, 叶梦伟, 王明全等. 三种细胞质雄性不育水稻小孢子发育过程的研究. 武汉大学学报(自然科学版). 1996, 42(6): 433-439

48. 穆蕊, 张祖新, 张方东等. 玉米CMS-S小孢子败育过程中的细胞程序性死亡. 作物学报. 2006, 32(5): 666-670
49. 周洪生, 孙荣锦, 蒋婉如等. 几种雄性不育玉米小孢子发育的显微荧光观察. 华北农学报. 1997, 12(2): 41-47
50. 李树林, 钱玉秀, 吴志华. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传规律探讨及其应用. 上海农业学报. 1985, 1(2): 1-12
51. 李树林, 钱玉秀, 吴志华. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传验证. 上海农业学报. 1986, 2(2): 1-8
52. 周永明, 吴江生, 魏泽兰等. 甘蓝型油菜轮回选择研究. 11LSi家系及后代选系的产量和抗性鉴定. 华中农业大学学报. 1996, 15(4): 322-327
53. 周永明, 吴江生. 甘蓝型油菜轮回选择研究Al基础群体的合成和选择效果的初步评价. 华中农业大学学报. 1995, 14(1): 26-32
54. 周永明. 甘蓝型油菜轮回选择研究I. 向不同细胞质来源的基因型中导入显性核不育基因. 作物学报. 1993, 19(1): 70-76
55. 刘后利, 傅廷栋. 甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育材料的首次发现和研究简况. 油菜研究年报. 1985: 17-18
56. 杨光圣, 傅廷栋. 油菜细胞核+细胞质雄性不育的遗传学理论. 华中农业大学学报. 1993, 14 (增刊): 8-5
57. 杨光圣, 傅廷栋. 油菜杂种优势利用的一条可能途径——细胞核+细胞质雄性不育. 华中农业大学学报. 1993, 14(4): 307-316
58. 杨光圣, 傅廷栋等. 甘蓝型油菜细胞核+细胞质雄性不育的研究利用. 作物学报. 1997, 23(2): 144-149
59. 杨光圣, 傅廷栋, 马朝芝等. 甘蓝型油菜显性细胞核+波里马细胞质雄性不育三系的创建. 华中农业大学学报. 1996, 15(3): 215-220
60. 杨光圣, 傅廷栋, Brown GO. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育的遗传分析研究. 中国农业科学. 1998, 31(1): 27-31
61. 陈凤祥, 胡宝成, 李成等. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育遗传研究I. 隐性核不育系012A的遗传. 作物学报. 1998, 24(4): 431-438
62. 侯树敏, 胡宝成, 陈凤祥等. 甘蓝型油菜隐性核不育单交种与三交种的比较. 安徽农业科学. 1999, (3): 308-309, 317

63. 胡滨, 陈观平, 施农农等. 植物细胞质雄性不育及其在育种中的应用. 浙江林学院学报. 2006, 23(6): 689-693
64. 李竞雄, 周洪生, 孙荣锦主编. 玉米雄性不育生物学. 北京: 中国农业出版社. 1998: 2-12
65. 程庆军, 张福耀, 平俊爱等. 高粱异胞质雄性不育研究进展与展望. 杂粮作物. 2005, 25(1): 14-18
66. 卢庆善, 高粱学. 北京: 中国农业出版社. 1999: 332-333
67. 傅廷栋, 杨小牛, 杨光圣. 甘蓝型油菜波里马雄性不育系的选育与研究. 华中农业大学学报. 1989, 8(3): 201-207
68. 刘后利. 油菜遗传育种研究的新成就和新进展. 中国农学通报, 1993, 9 (4): 1-5
69. 李殿荣. 甘兰型油菜细胞质雄性不育系陕2A及保持系、恢复系的选育研究. 见: 李殿荣, 杂交油菜秦油2号论文集. 北京: 农业出版社. 1993: 9-23
70. 李殿荣. 杂交油菜秦油2号在我国大面积推广. 见: 李殿荣, 杂交油菜秦油2号论文集. 北京: 农业出版社, 1993: 280-290
71. 刘忠松, 官春云, 油菜雄性不育性研究, 中国油料, 1990, (3), 1-4
72. 柯桂兰, 赵稚雅, 宋胭脂等. 大白菜异源胞质雄性不育系 CMS3411-7 的选育. 西北农业学报. 1994, 3(1):48
73. Kubo T. Studies on breeding F1 hybrids of flue-cured tobacco using cytoplasmic male sterility. Bulletin Iwata Tobacco Experiment Station. 1985, (17): 69-138.
74. 佟道儒, 刘洪样, 贾兴华等. 烤烟雄性不育一代杂种“中烟9203”选育及利用. 中国烟草. 1995, (2): 1-5
74. 汤永海. 红麻五个品种产量性状的配合力和遗传组成的分析. 中国麻作, 1990(1): 9-15
75. 龚友才, 郭安平, 刘伟杰. 红麻杂种一代及其亲本的遗传组成与配合力分析. 中国麻作. 1998, 20(3): 1-6
76. 陈安国, 李德芳. 红麻超高产型杂交组合的研究. 中国麻业. 2000, 22(3): 1-5
77. 祁建民, 陈幼玉, 周瑞阳等. 红麻产量和纤维品质性状的遗传效应与杂种优势分析. 作物学报. 2005, 31(4): 469-475
78. S. Pace, Piscioneri, Settanni. Heterosis and combining ability in a half diallel cross of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) in south Italy. Industrial Crops and Products. 1998(7): 317-327
79. Bhardwaj, H.L., Rangappa, M., Webber III, C.L.. Potential of kenaf as a forage, In: Proceedings of the International Kenaf Association Conference. Irving. 1995, TX 7, 9-10 March: 95-103
80. Kumar, D. Cost of manual hybrid kenaf seed production and possibility of its commercial utilization.

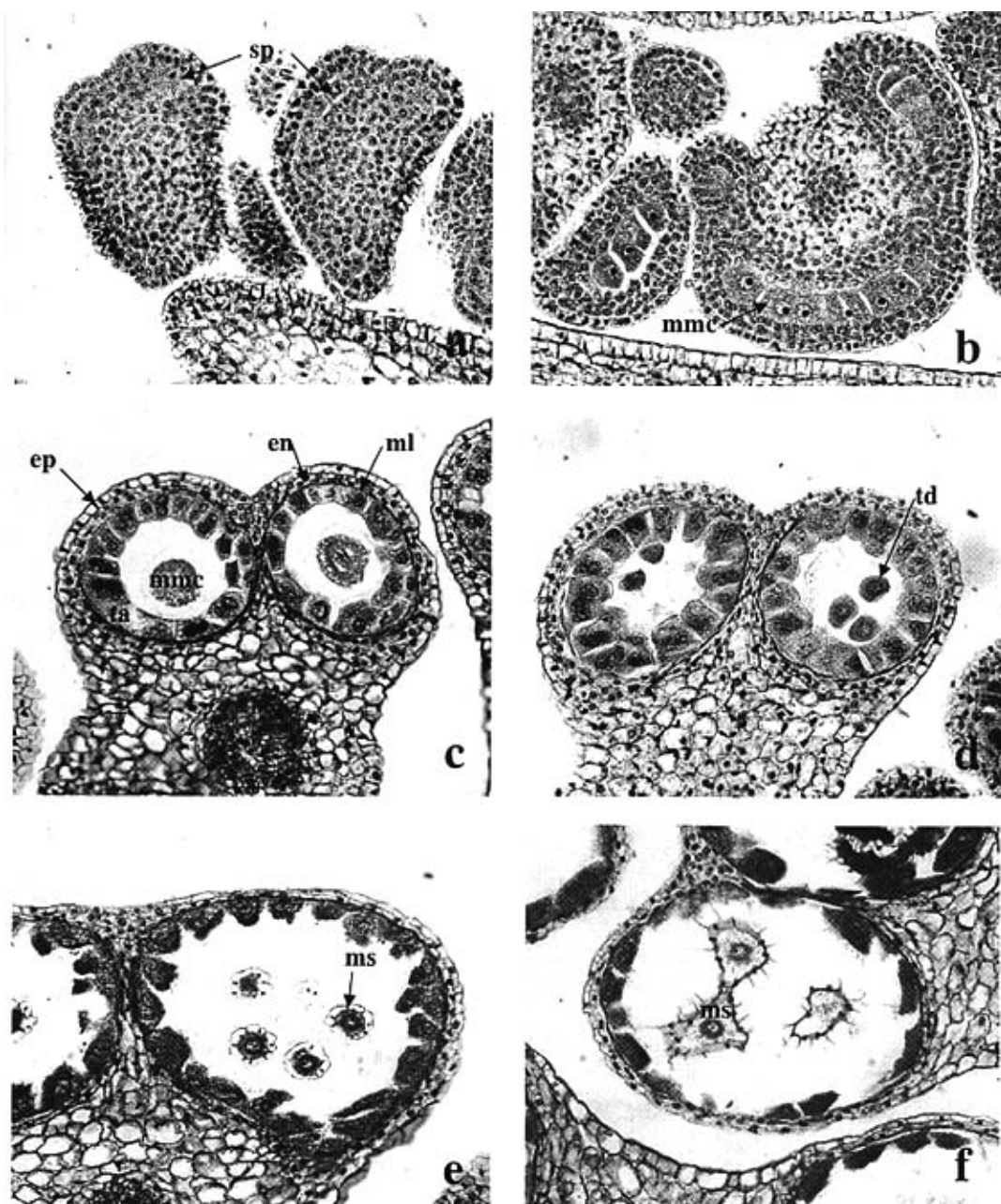
- Journal of Interacademia. 2003, 7(2): 228-229
81. Patil, R.C, Thombre.M. V. Generation mean analysis for fibre yield and its components in three intervarietal crosses of *Hibiscus cannabinus* (L.). Journal of Maharashtra Agricultural Universities. 1985, 10(3): 304-307
82. Sheriff, R.A, Bhat, B.V.. Combining ability, gene action and heterosis for fibre yield and its components in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). Mysore Journal of Agricultural Sciences, 1995, 29(4): 298-304
83. Thombre, M.V., Patil, R.C.. Genetic architecture of raw fibre yield and its components in *Hibiscus cannabinus* (L.). Journal of Maharashtra Agricultural Universities. 1985, 10(3): 307-310
84. Reichert, N. A., Baldwin, B. S...Potential for kenaf improvement via somaclonal variation. American Society for Horticultural Science. 1996: 408-411
85. Ugale, S. D., Khuspe, S. S., Use of male sterility in cross fertilization studies in *Hibiscus cannabinus* L., Journal of Maharashtra Agricultural Universities, 1977(2), 113-115
86. Ugale, S.D., Khuspe, S.S.. Cytoplasmic genetic male sterility in *Hibiscus cannabinus* L. Journal of Maharashtra Agricultural Universities. 1976(2): 102-106
87. 汤永海, 庄迪泉, 胡庆升等. 红麻化学杀雄杂交制种技术的研究. 作物研究. 1987 (1): 3-7
88. Kumar D. Possibility of commercial utilization of residual heterosis in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). Plant Breed Genet. 1999, 59(2): 227-232
89. 周瑞阳, 刘少伟, 冯长明. 卫星搭载红麻种子SP2代的变异研究. 空间科学学报. 1996, 16(增刊): 145-147
90. 周善滋, 雄性能育和雄性不育花药组织结构及其开裂内在因素的细胞形态学观察, 植物学报, 1979(6), 211-215
91. 王文明, 罗文志, 文宏灿. 作物细胞质雄性不育的分类研究方法概述. 西南农业学报. 1995(8)水稻专辑: 43-46
92. 张长宪. 作物细胞质雄性不育分类. 西北农业学报. 1996, 5(3): 83-86
93. 张洁夫, 傅寿仲, 盖均镒. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育MI CMS的育性归类. 中国油料作物学报. 1999, 21(4): 4-7
94. 张天真. 陆地棉1355A和104-7A不育系的细胞学研究. 棉花学报. 1995, 11(3): 73-75
95. 陈伟程, 段韶芬. 玉米C型细胞质雄性不育系花药发育的细胞学观察. 作物学报. 1988, 14(3): 177-181
96. 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育的细胞学研究. 作物学报. 1989(2): 97-103

97. 唐章林, 李加纳, 谌利等. 温度对甘蓝型油菜细胞质雄性不育系及其杂种一代育性的影响研究. 西南农业大学学报. 1997(5): 424-430
98. 杨光圣, 傅廷栋. 环境条件对油菜细胞质雄性不育的影响. 中国油料作物学报. 1987(3): 15-19
99. 侯国佐. 甘蓝型油菜质不育材料微量花粉问题研究. 贵州农业科学. 1991 (2): 17-21
100. Oscar N Ruiz, Henry Daniell, Engineering Cytoplasmic Male Sterility via the Chloroplast Genome by Expression of [beta]-Keto thiol ase1, Plant Physiology, 2005, 138(3): 1232-1247
101. 罗玉英, 刘玉乐, 李胜国等. TA29-Barnase嵌合基因导入对烟草花药绒毡层及花粉发育的影响. 植物学报. 1997. 39(10): 894-898

图版缩写对照

ep-表皮细胞; en-药室内壁; ml-中层; ta-绒毡层; rta-绒毡层解体残余物; sp-造孢细胞;
mmc-小孢子母细胞; td-四分体; ms-单核小孢子; p-二核花粉; rms-小孢子解体残余物
ep-epidermis; en-endothecium; ml-middle layer; ta-tapetum; rta-remainder of tapetum
degeneration; sp-sporogenous cell; mmc-microspore mother cell; td-tetrad; ms-microspore;
p-binucleate pollen; rms- remainder of microspore degeneration

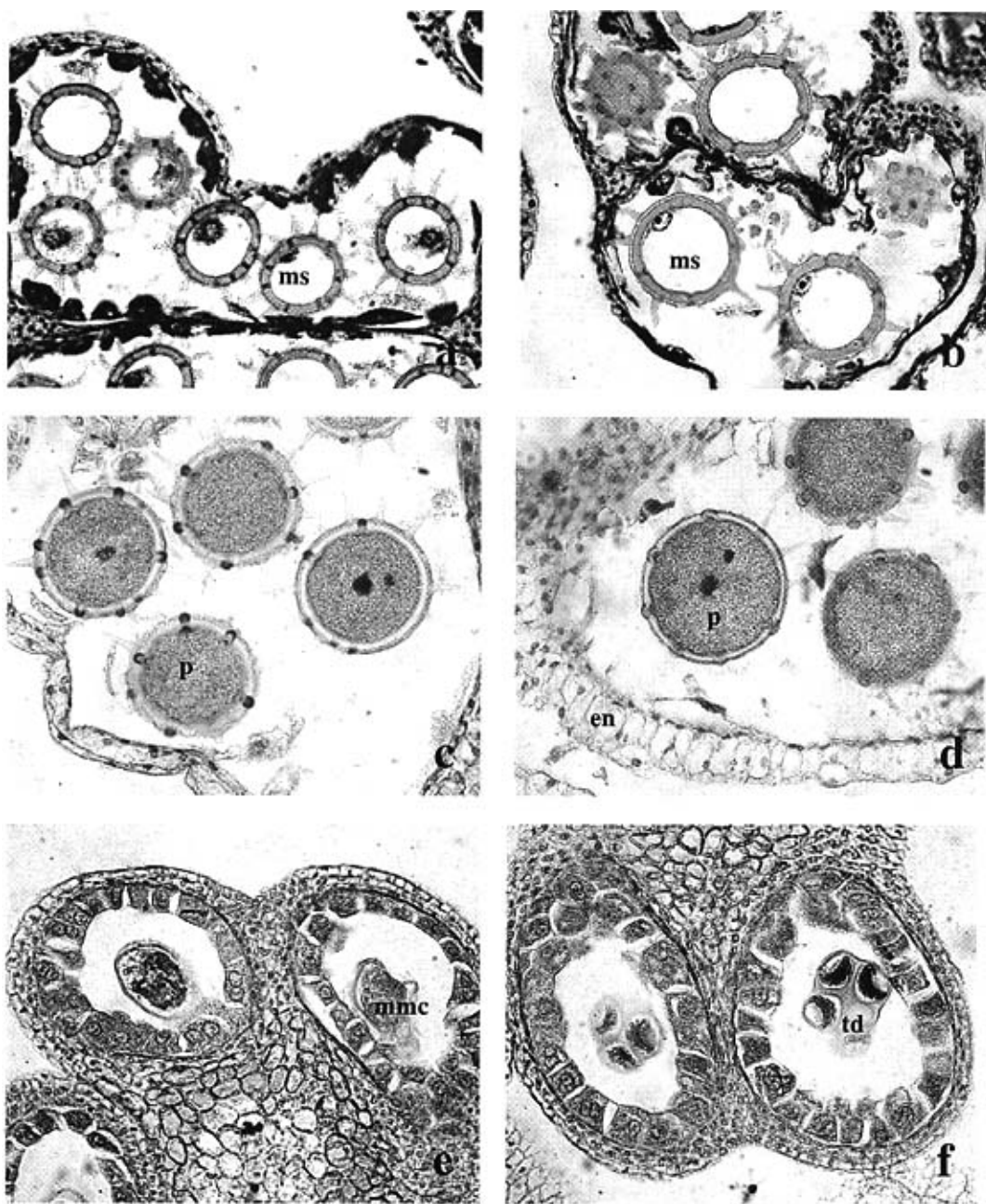
图版 I plate I



a-f 保持系 a. 造孢细胞时期 $\times 400$; b. 小孢子母细胞时期花药纵切面 $\times 400$; c. 减数分裂 I 中期花药横切面 $\times 400$; d. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; e. 单核小孢子早期花药横切面, 小孢子壁开始发育 $\times 400$; f. 单核小孢子早期花药横切面 $\times 400$

a-f maintainer line a. Sporogenous cell stage $\times 400$; b. Vertical section of an anther at microsporocyte stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at meiosis stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at early mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at early mononuclear stage $\times 400$

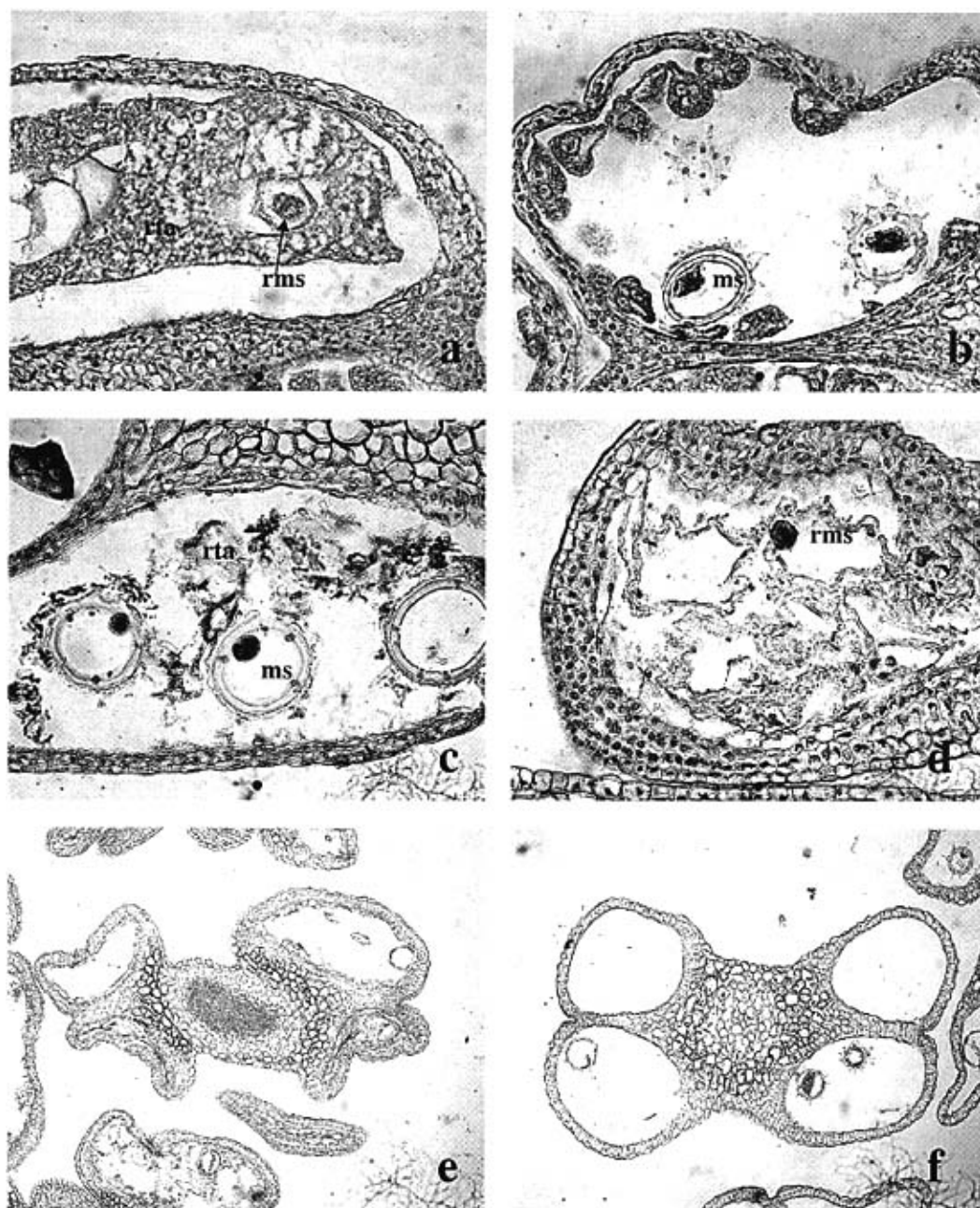
图版 II plate II



a-d 保持系 a. 液泡增大期花药横切面 $\times 400$; b. 单核靠边期花药横切面 $\times 400$; c. 二核期花药横切面 $\times 400$; d. 花粉成熟期花药横切面 $\times 400$; e-f CMS 系 917A e. 减数分裂时期花药纵切面 $\times 400$; f. 四分体时期花药纵切面 $\times 400$

a-d maintainer line a. Cross section of an anther at large vacuole stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at side-placed nucleus stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$; e-f CMS line 917A e. Vertical section of an anther at meiosis stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$

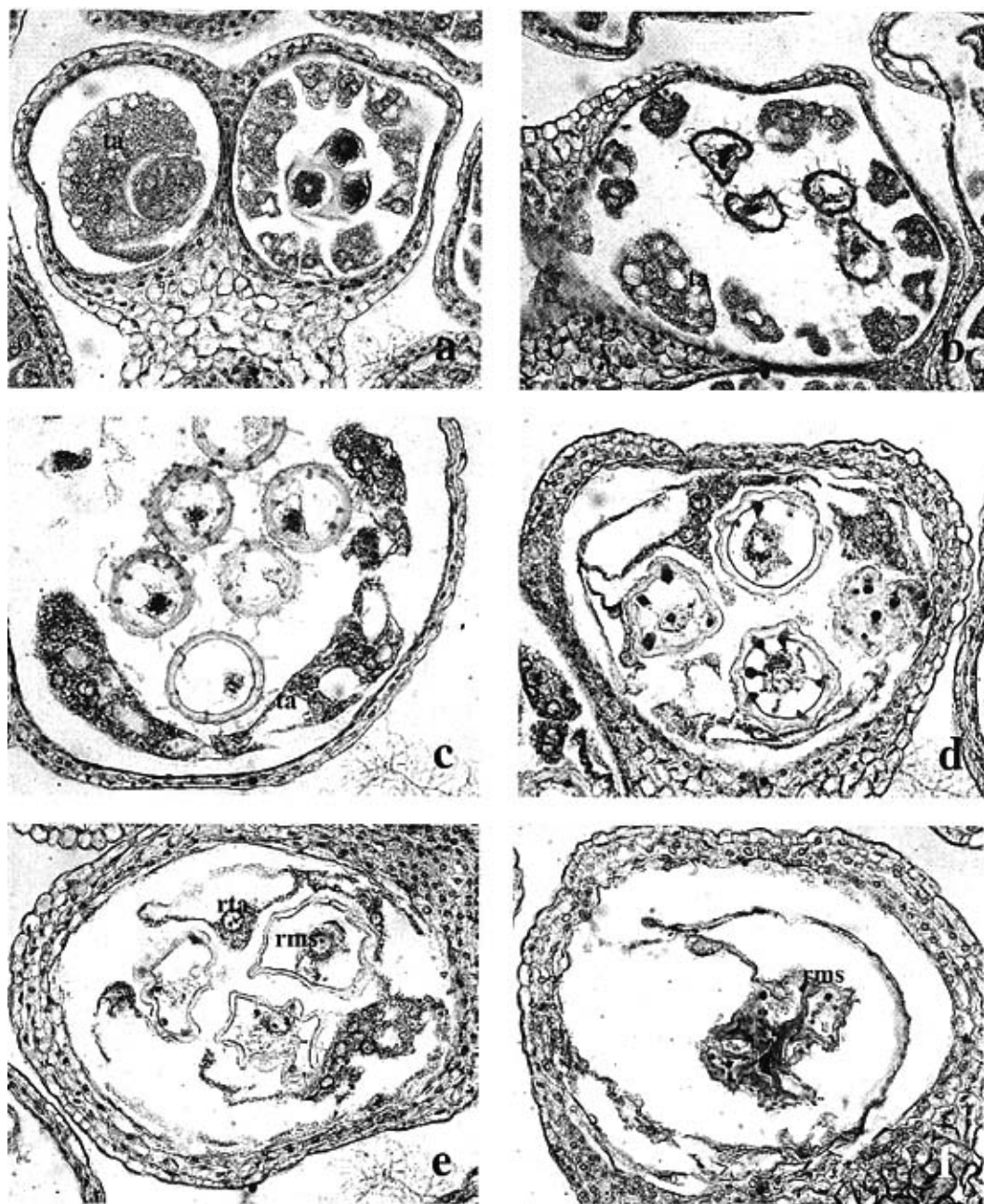
图版III plateIII



a-f CMS 系 917A a. 单核期花药横切面 $\times 400$; b. 单核期花药横切面 $\times 400$; c. 单核期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药纵切面 $\times 400$; e. 败育花药横切面 $\times 100$; f. 成熟花药横切面 $\times 100$

a-f CMS line 917A a. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an aborted anther $\times 400$; f. Cross section of an mature anther $\times 400$

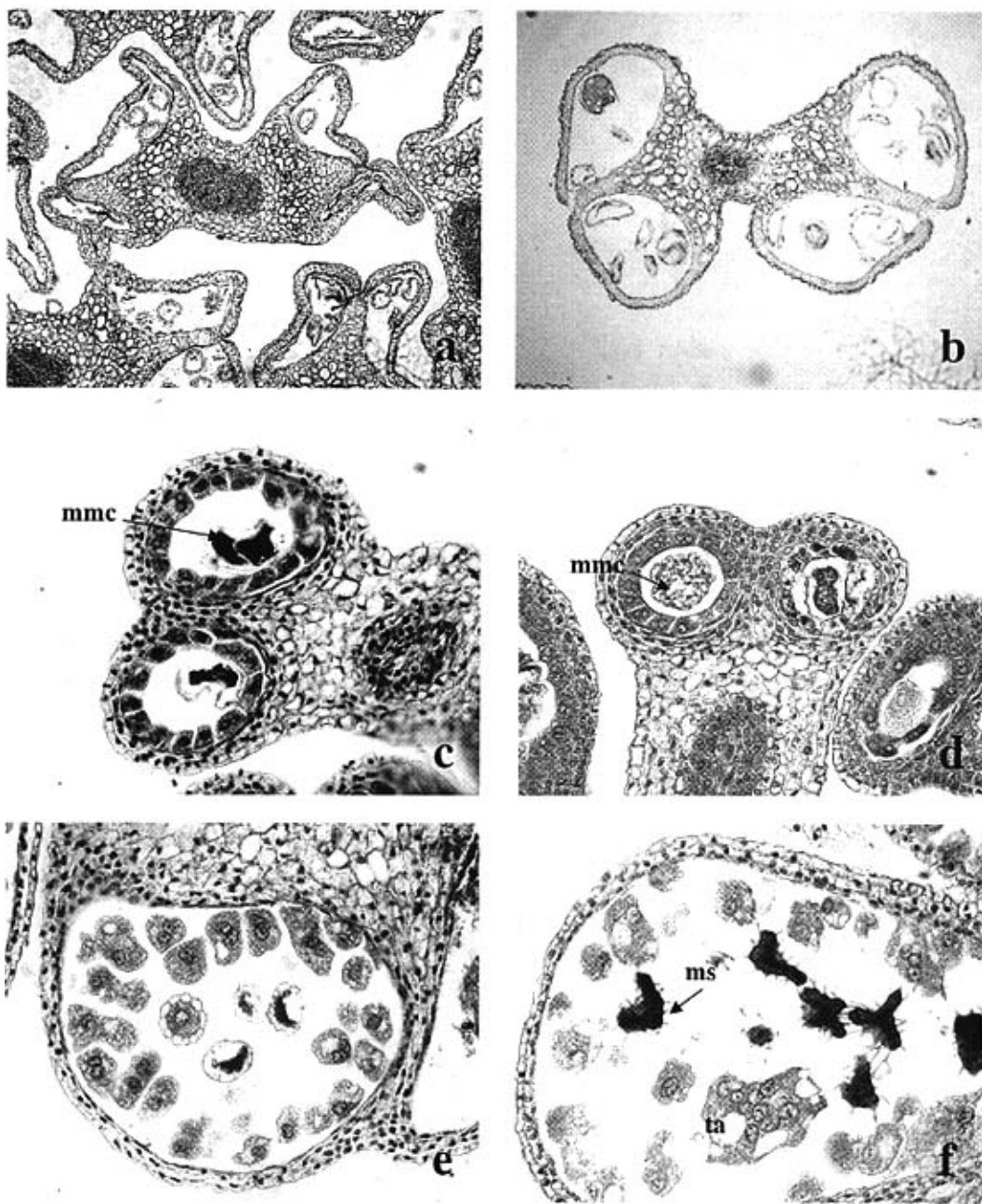
图版IV plateIV



a-f CMS 系 B19-1A a. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; b. 单核期花药横切面 $\times 400$; c. 单核期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 200$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$

a-f CMS line B19-1A a. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 200$; f. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$

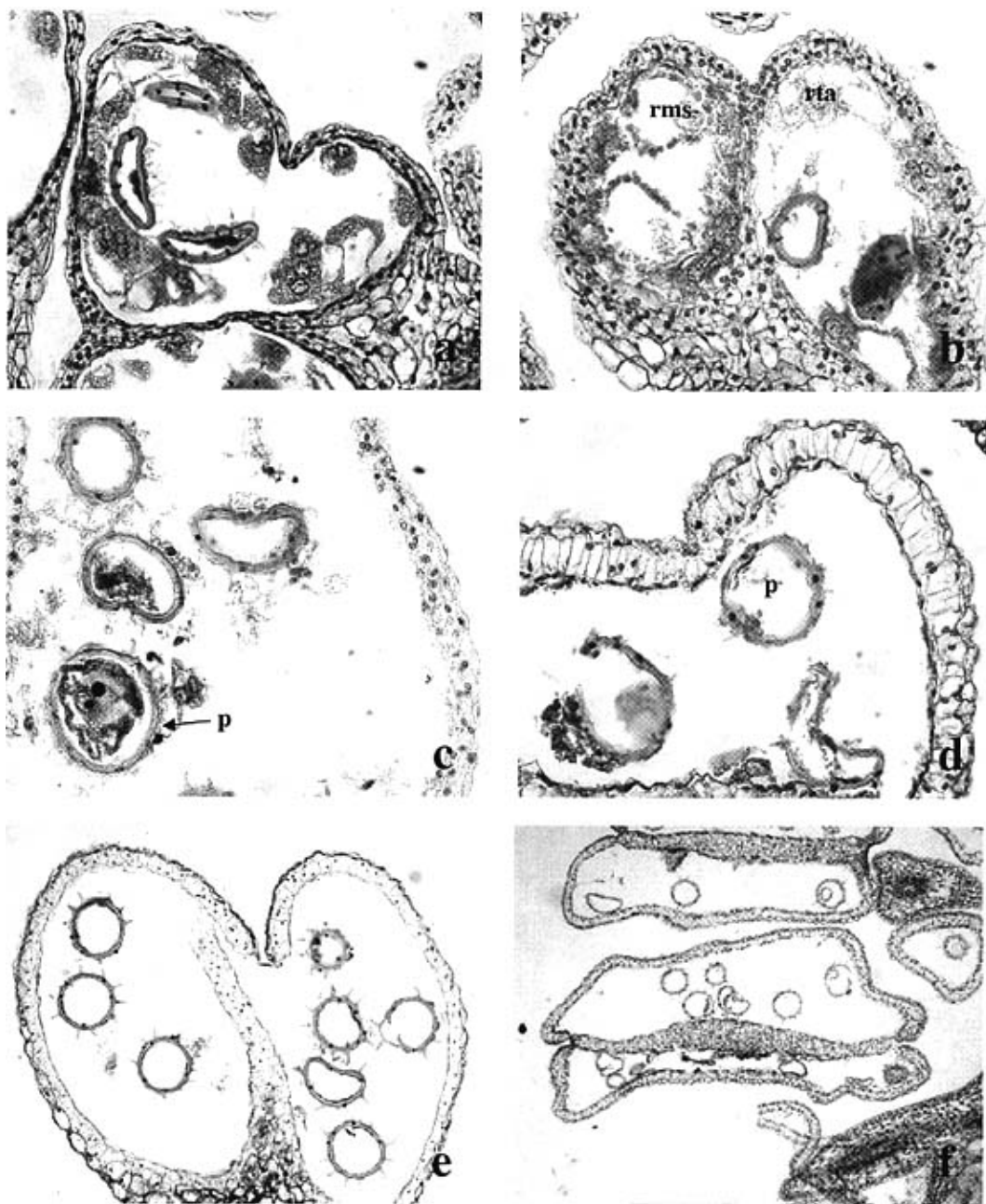
图版 V plate V



a-b CMS 系 B19-1A a. 败育花药横切面 $\times 100$; b. 花药开裂 $\times 100$; c-f CMS 系 K03A c. 减数分裂时期花药横切面 $\times 400$; d. 单核早期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 400$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$

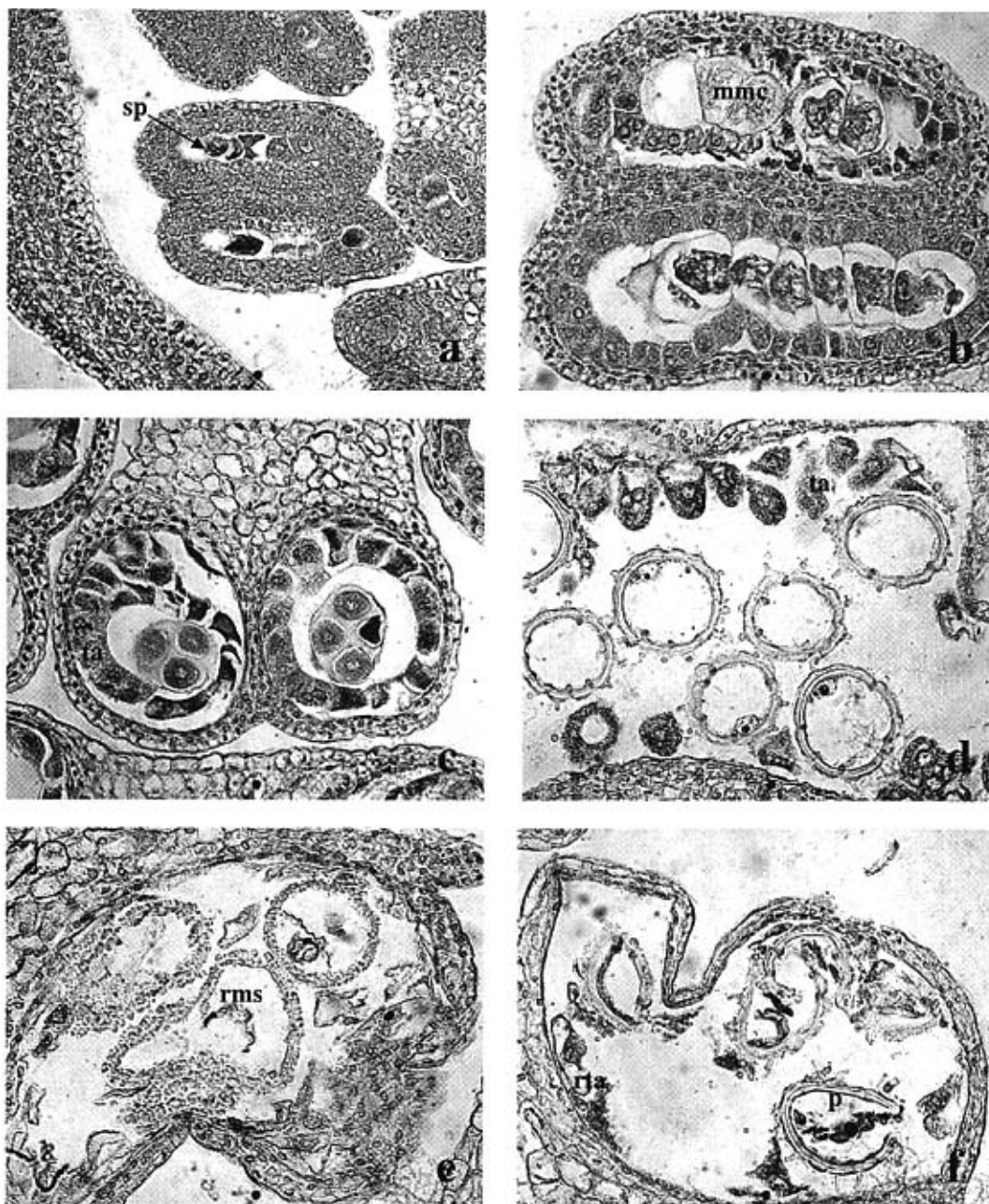
a-b CMS line B19-1A a. Cross section of an aborted anther $\times 100$; b. Cross section of an mature anther $\times 100$; c-f CMS line K03A c. Cross section of an anther at meiosis stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at early mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$

图版VI plate VI



a-f CMS 系 K03A a. 单核期花药横切面 $\times 400$; b. 单核期花药横切面 $\times 400$; c. 二核期花药横切面 $\times 400$; d. 二核期花药横切面 $\times 400$; e. 二核期花药横切面 $\times 200$; f. 二核期花药纵切面 $\times 100$
a-f CMS line K03A a. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 200$; f. Vertical section of an anther at binucleate pollen stage $\times 100$

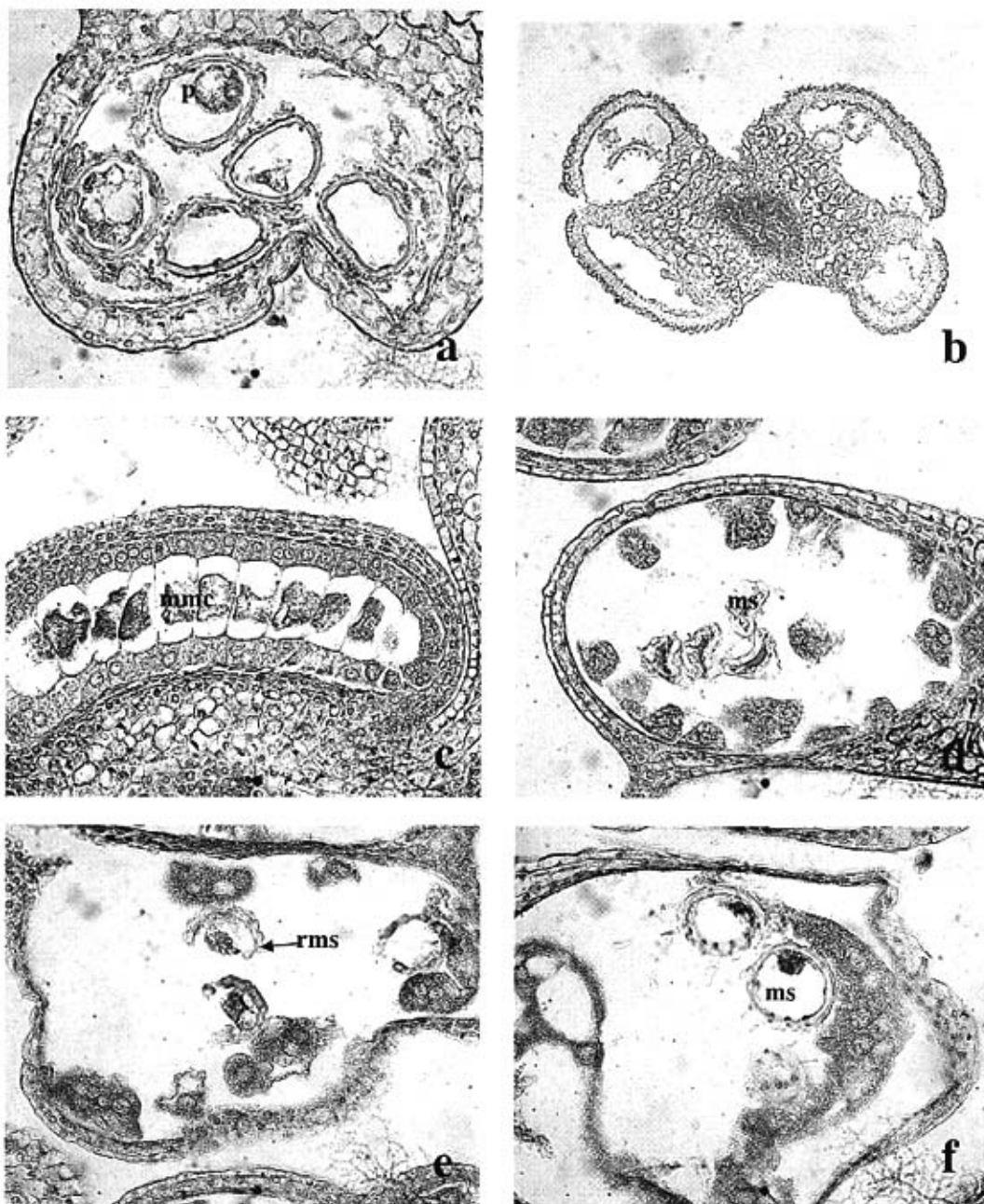
图版 VII plate VII



a-f CMS 系福 3A 花药 a. 小孢子母细胞时期花药纵切面 $\times 400$; b. 减数分裂时期花药横切面 $\times 400$; c. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药纵切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 400$; f. 二核期花药横切面 $\times 400$

a-f CMS line FU3A a. Vertical section of an anther at microspore mother cell stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at meiosis stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$

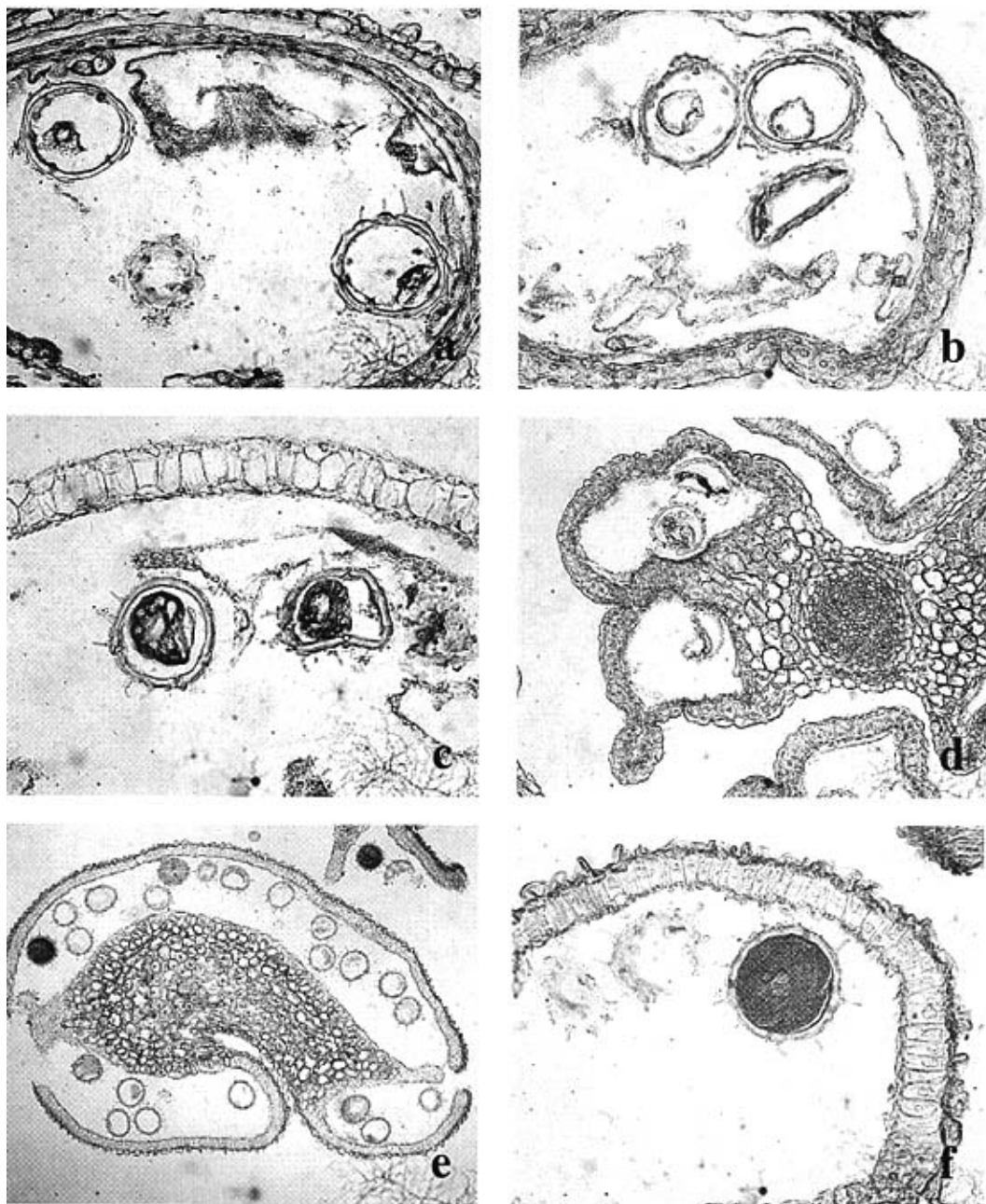
图版VIII plateVIII



a-b CMS 系福 3A a. 二核期花药横切面 $\times 400$; b. 花药开裂 $\times 100$; c-f CMS 系 258A c. 减数分裂时期花药纵切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 400$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$

a-b CMS line FU3A a. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$; b. Cross section of an mature anther $\times 100$; c-f CMS line 258A c. Vertical section of an anther at meiosis stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$

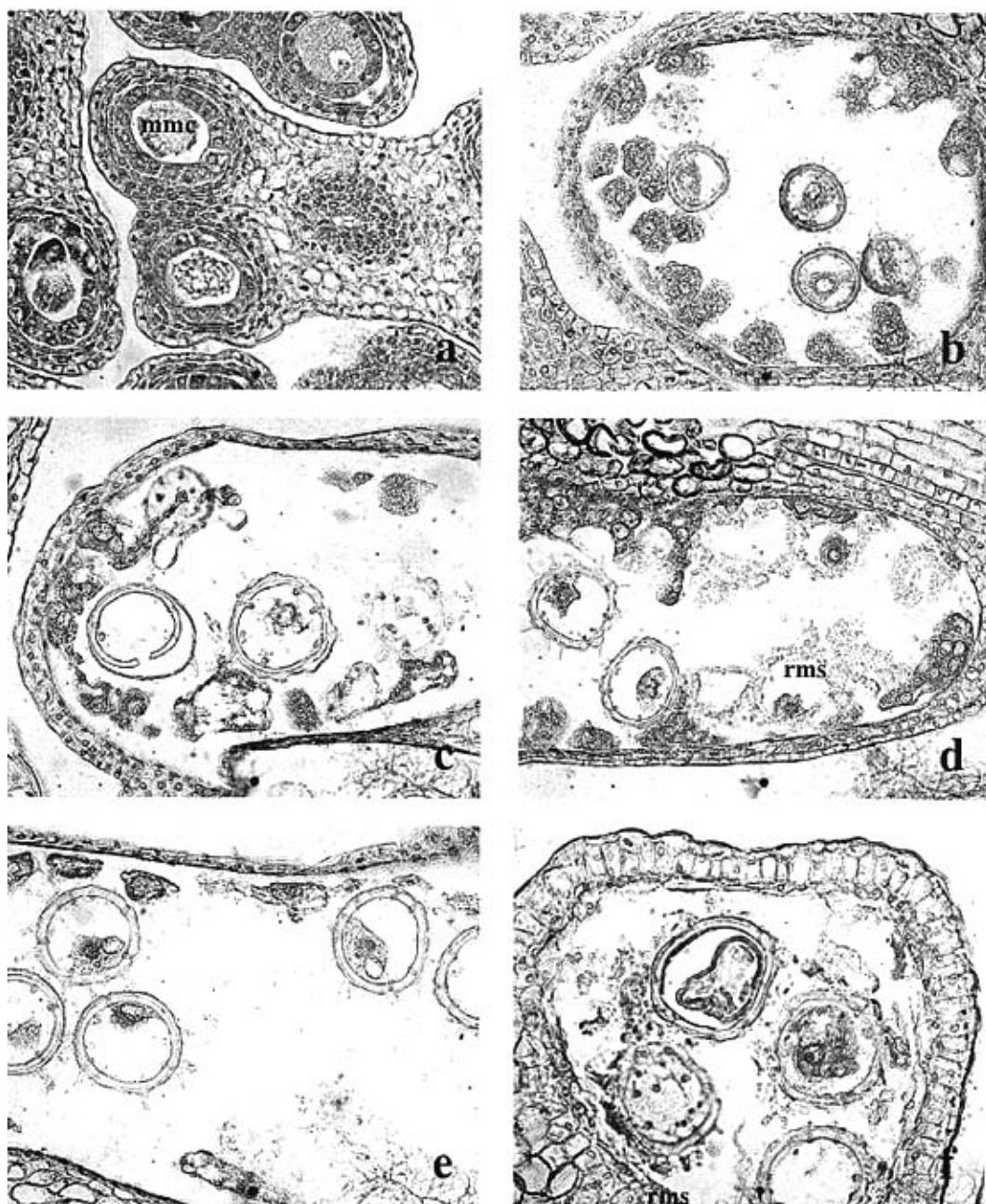
图版IX plateIX



a-f CMS 系 258A a. 单核期花药横切面 $\times 200$; b. 二核期花药横切面 $\times 400$; c. 二核期花药纵切面 $\times 400$; d. 二核期花药横切面 $\times 200$; e. 花药开裂 $\times 100$; f. 成熟花粉 $\times 400$

a-f CMS line 258A a. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 200$; b. Cross section of an anther at binucleate stage $\times 400$; c. Vertical section of an anther at binucleate stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at binucleate stage $\times 200$; e. Cross section of an mature anther $\times 100$; f. Mature pollen grain $\times 400$

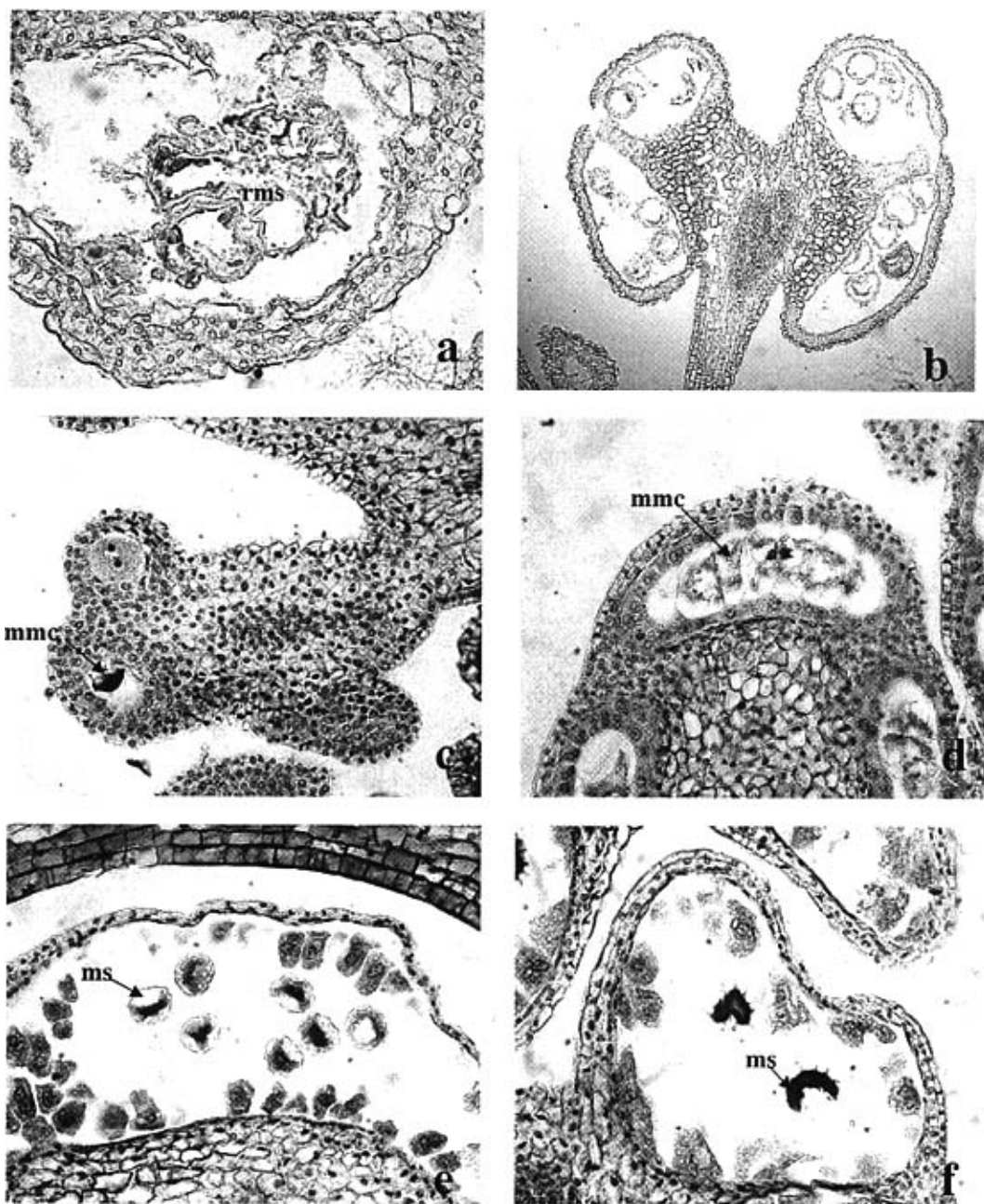
图版 X plate X



a-f CMS 系 722A a. 减数分裂时期花药纵切面 $\times 400$; b. 单核期花药横切面 $\times 400$; c. 单核期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 400$; f. 二核期花药横切面 $\times 400$

a-f CMS line 722A a. Vertical section of an anther at meiosis stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at binucleate stage $\times 400$

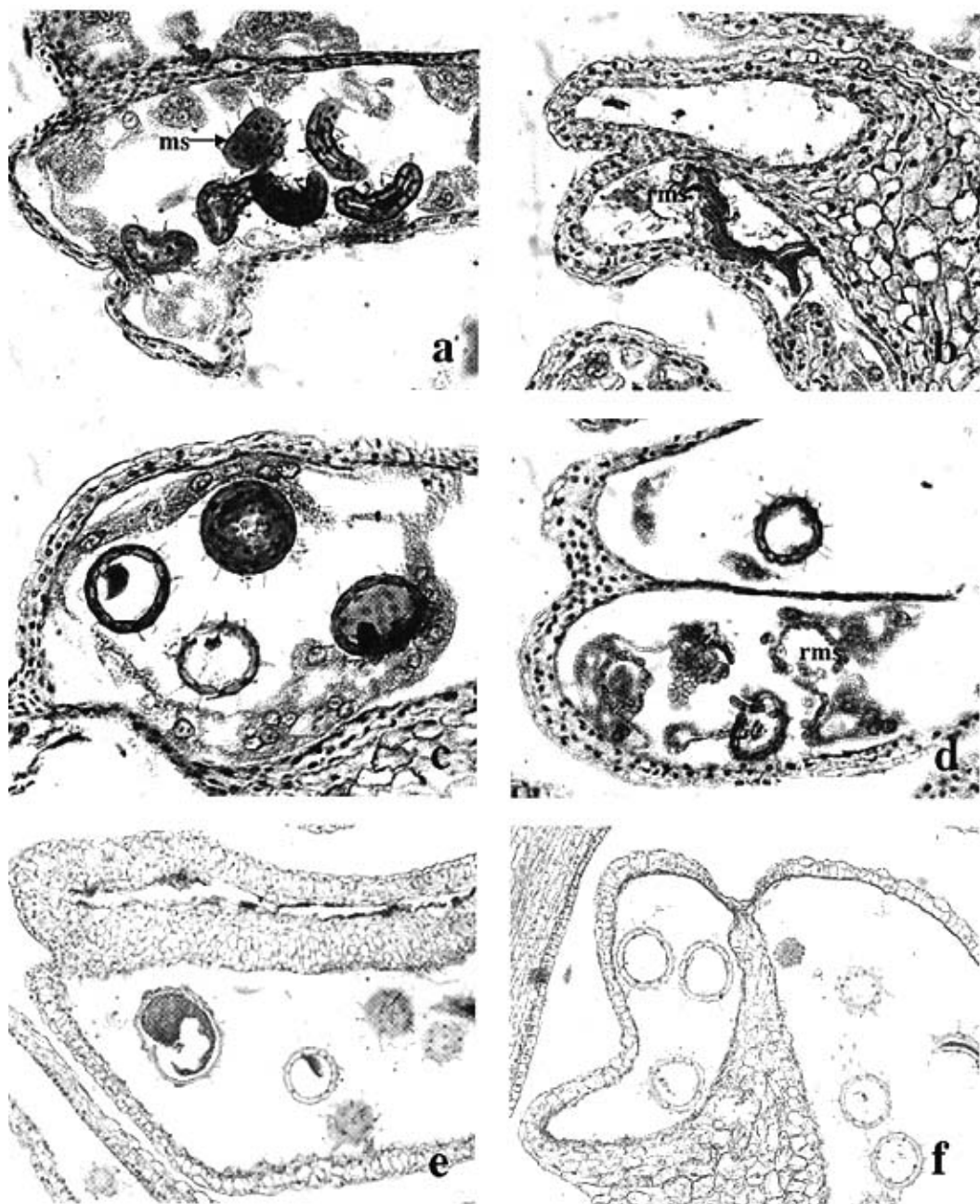
图版XI plate XI



a-b CMS 系 722A a. 二核期花药横切面 $\times 400$; b. 二核期花药横切面 $\times 100$; c-f CMS 系 L23A c. 小孢子母细胞时期花药横切面 $\times 400$; d. 减数分裂时期花药纵切面 $\times 400$; e. 单核期花药纵切面 $\times 400$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$

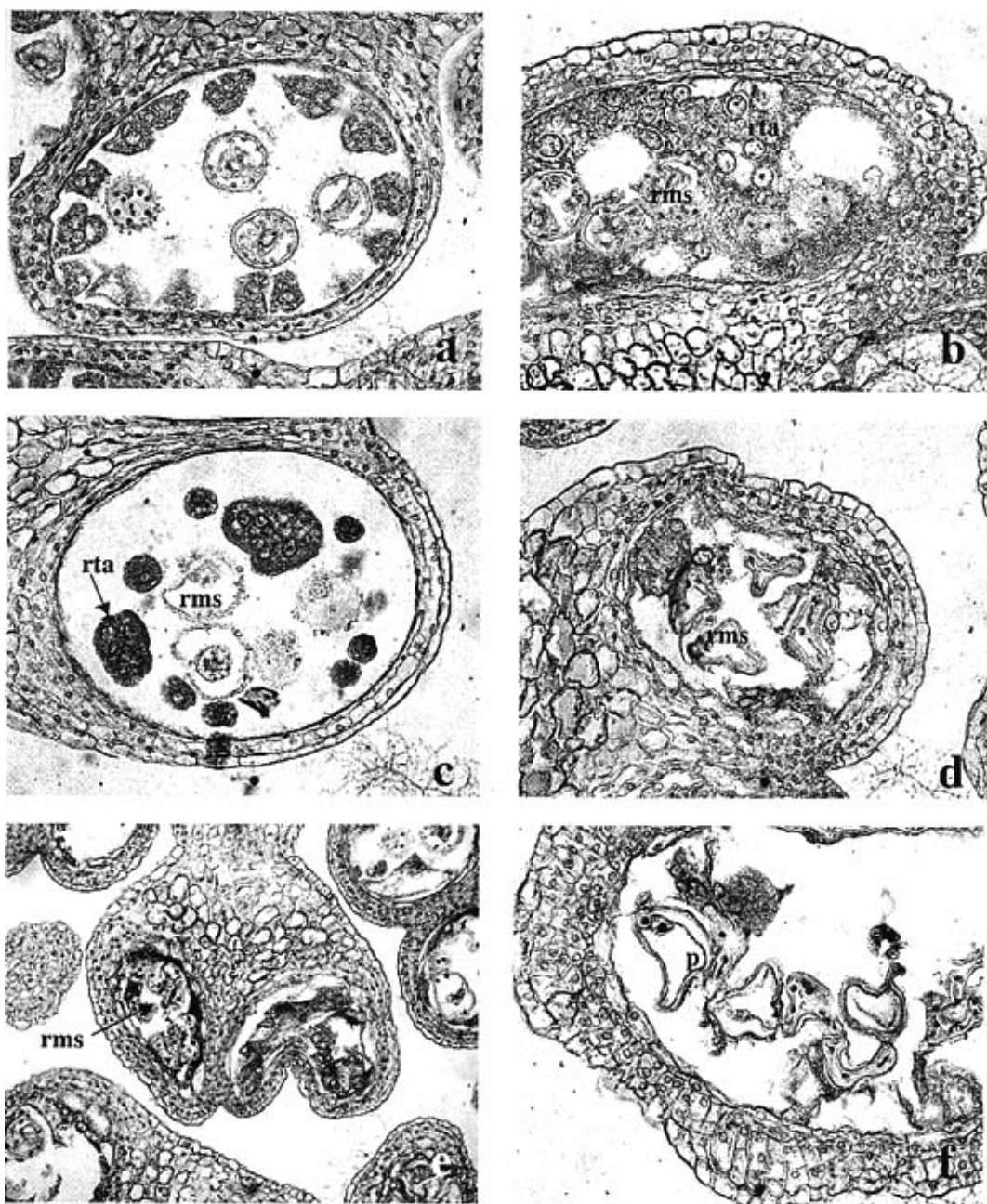
a-b CMS line 722A a. Vertical section of an anther at binucleate stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at binucleate stage $\times 200$; c-f CMS line L23A c. Cross section of an anther at microspore mother cell stage $\times 400$; d. Vertical section of an anther at meiosis stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$

图版XII plateXII



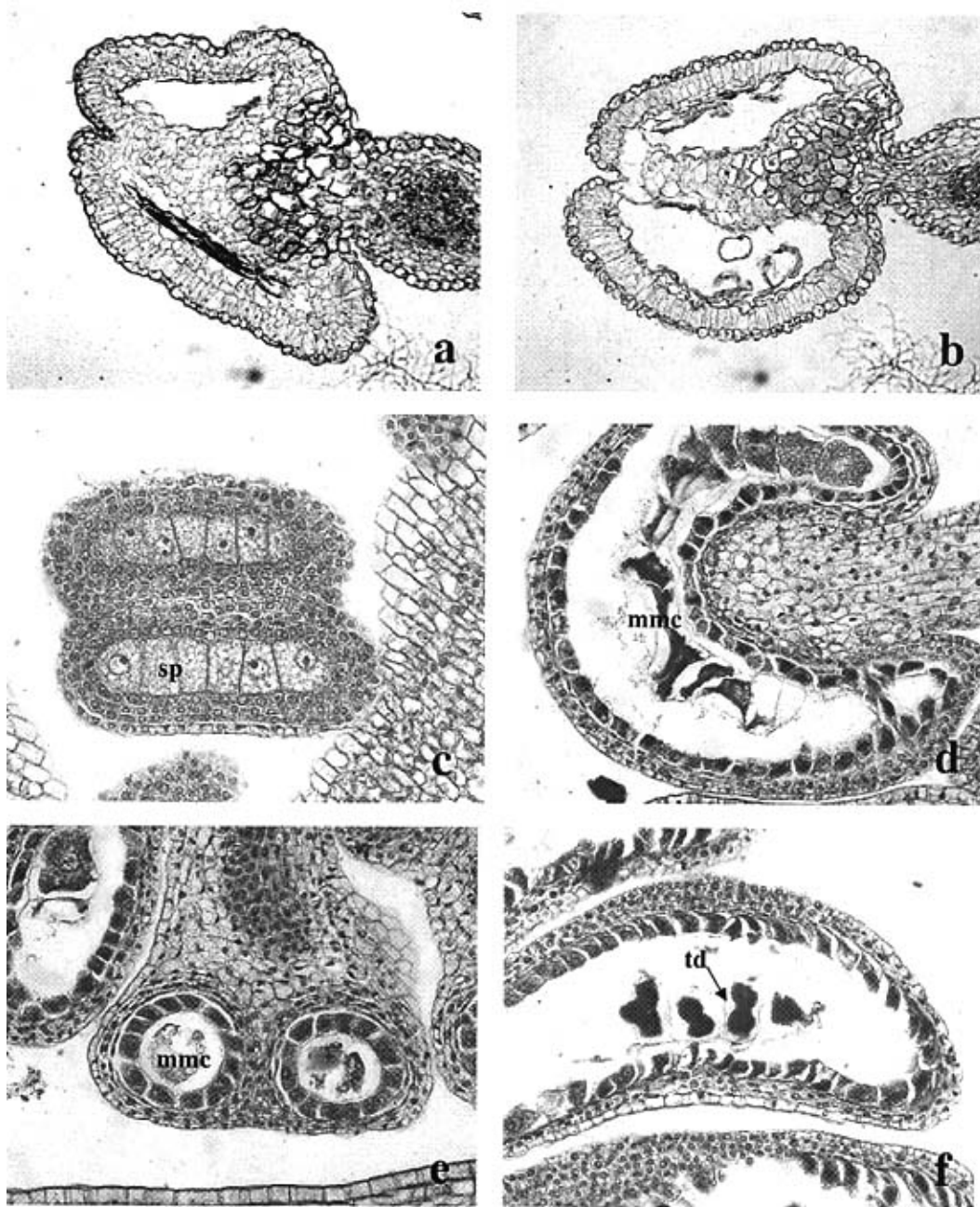
a-f CMS 系 L23A e. 单核期花药纵切面 $\times 400$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$; g. 单核期花药横切面 $\times 400$; h. 单核期花药纵切面 $\times 200$; i. 二核期花药纵切面 $\times 200$; j. 二核期花药横切面 $\times 200$
a-f CMS line L23A e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at early mononuclear stage $\times 400$; g. Cross section of an anther at early mononuclear stage $\times 200$; h. Vertical section of an anther at mononuclear pollen stage $\times 200$; i. Vertical section of an anther at binucleate pollen stage $\times 200$; j. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 200$

图版 XIII plateXIII



a-f CMS 系 763A a. 单核期花药横切面 $\times 400$; b. 单核期花药横切面 $\times 400$; c. 单核期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 200$; f. 二核期花药横切面 $\times 400$
a-f CMS line 763A a. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 200$; f. Cross section of an anther at binucleate stage $\times 400$

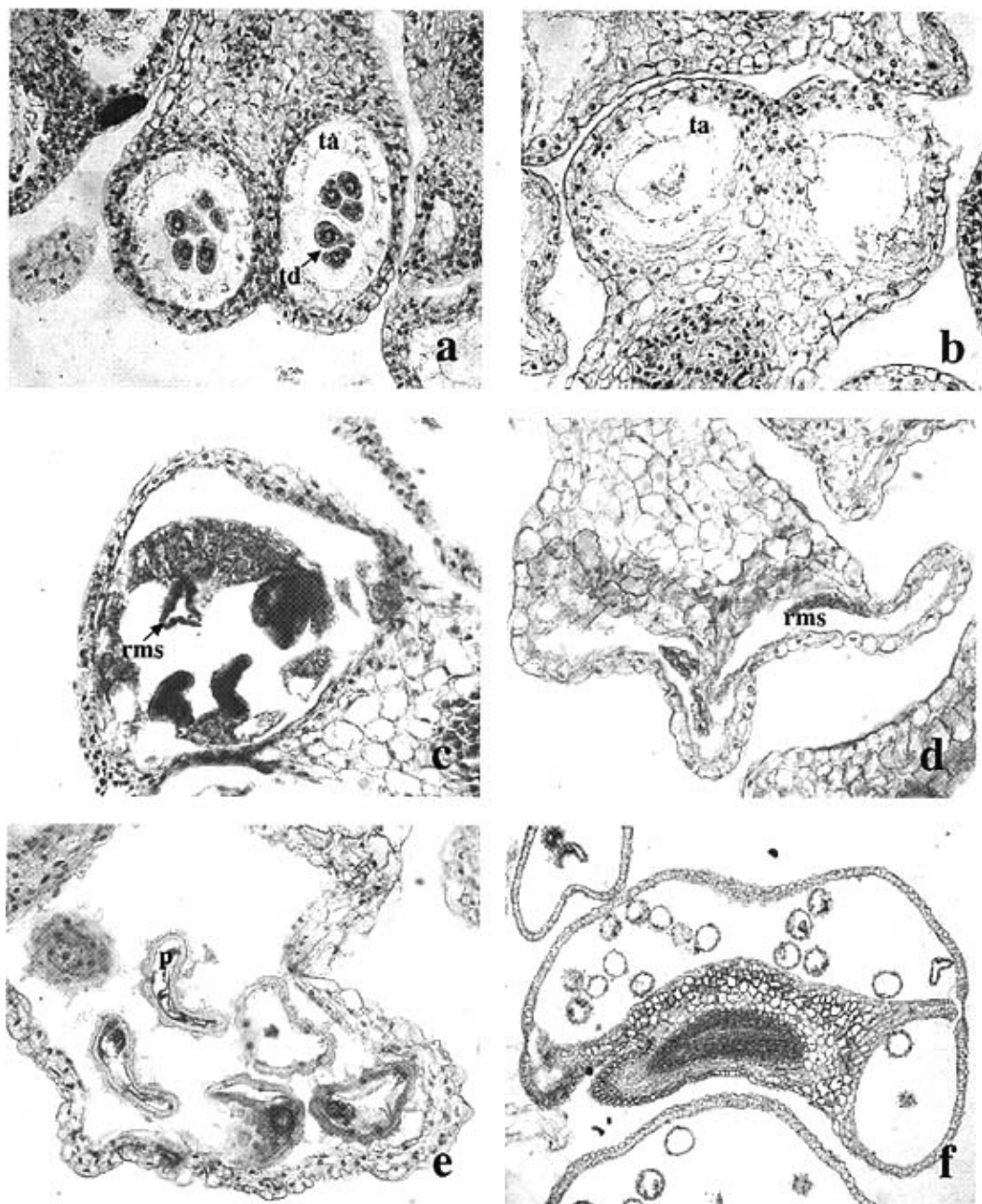
图版 XIV plateXIV



a-b CMS 系 763A a. 败育花药 $\times 200$; b. 花药开裂 $\times 200$; c-f CMS 系 P03A c. 小孢子母细胞时期花药纵切面 $\times 400$; d. 减数分裂时期花药纵切面 $\times 400$; e. 减数分裂时期花药横切面 $\times 400$; f. 四分体时期花药横切面 $\times 400$

a-b CMS line 763A a. Cross section of an aborted anther $\times 200$; b. Cross section of an mature anther $\times 200$; c-f CMS line P03A c. Vertical section of an anther at mother microspore cell stage $\times 400$; d. Vertical section of an anther at meiosis stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at meiosis stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$

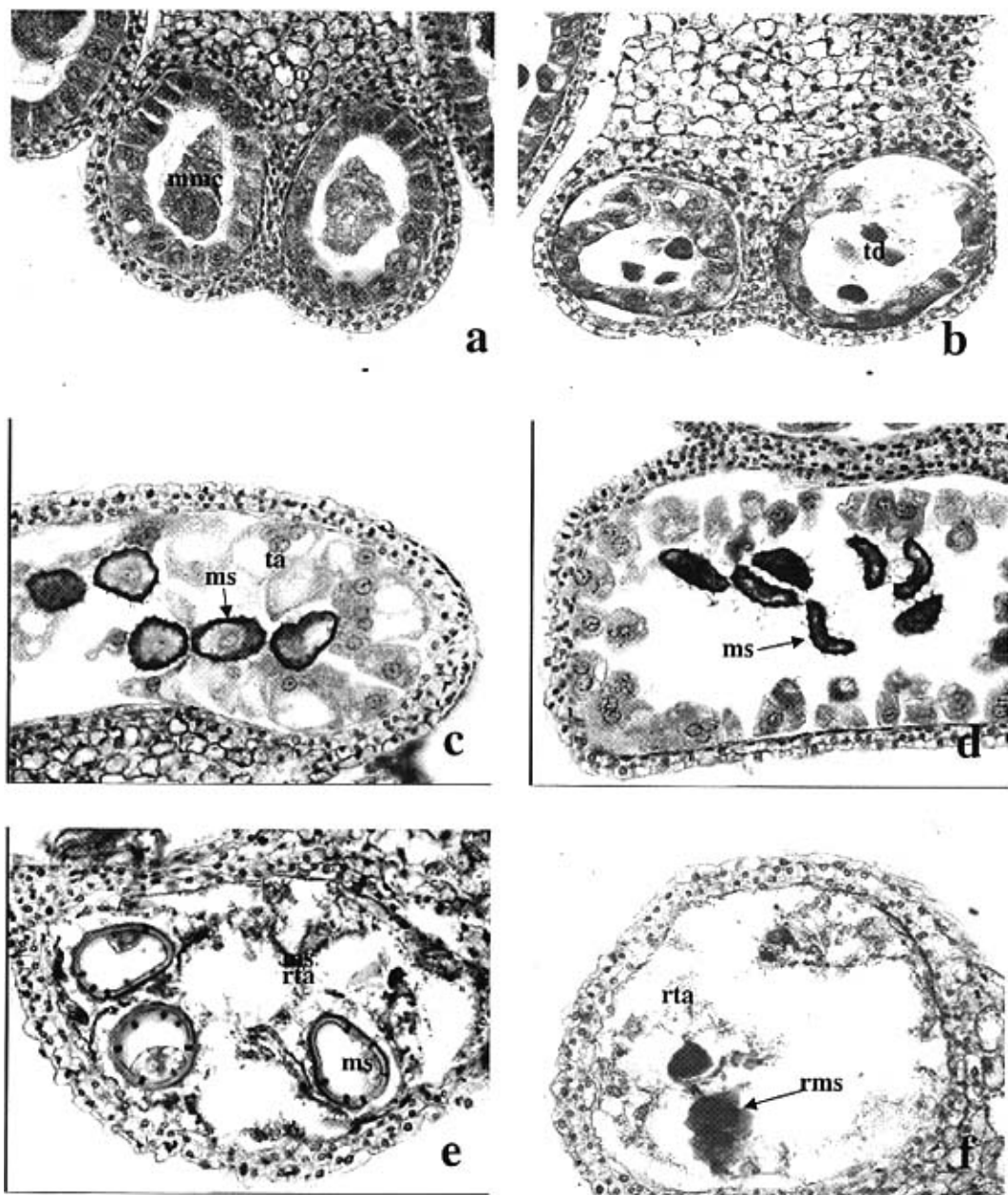
图版 XV plate XV



a-f CMS 系 P03A a. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; b. 四分体时期花药纵切面 $\times 400$; c. 单核期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 二核期花药横切面 $\times 400$; f. 二核期花药纵切面 $\times 100$

a-f CMS line P03A a. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at binucleate pollen stage $\times 400$; f. Vertical section of an anther at binucleate pollen stage $\times 100$

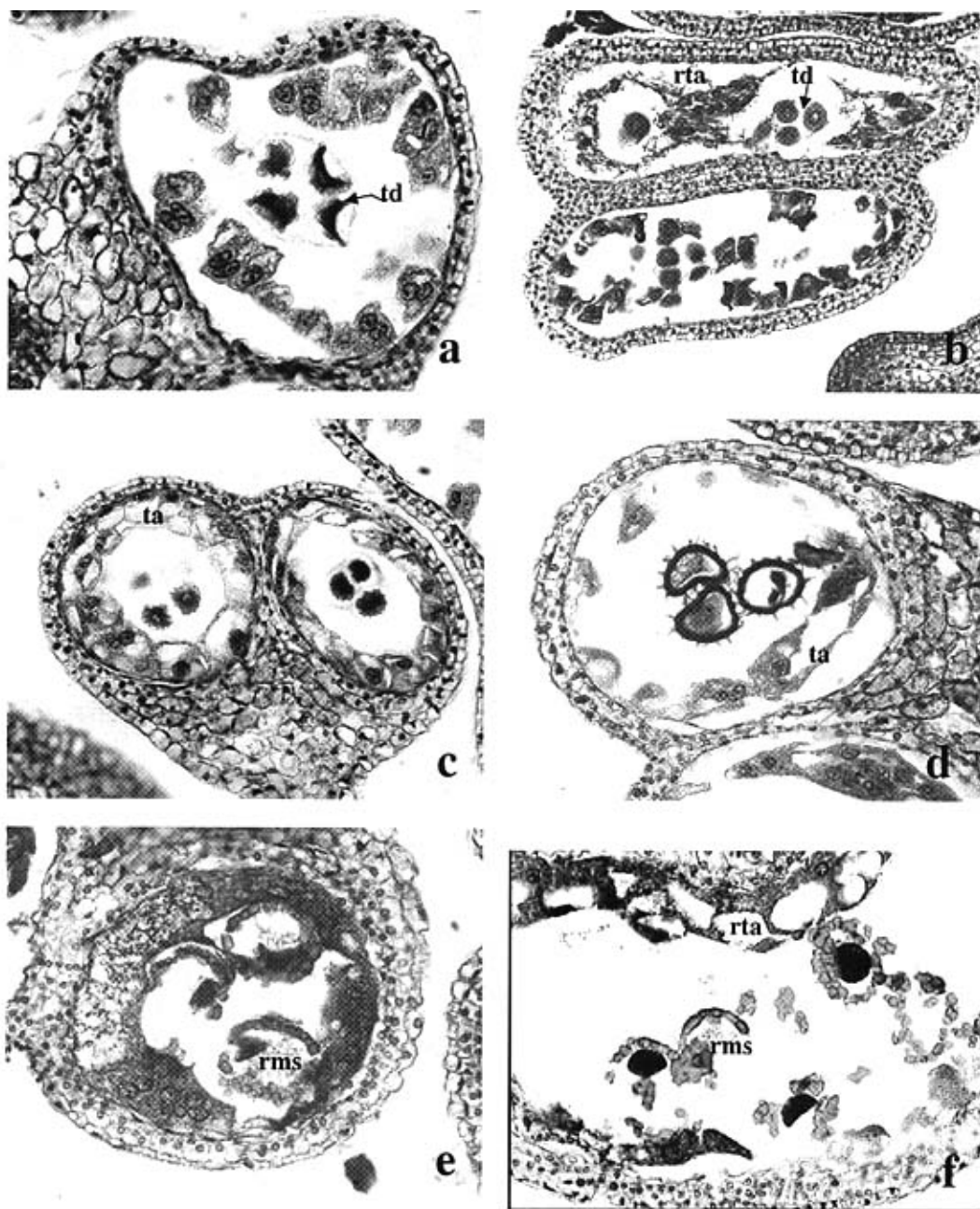
图版 XVI plateXVI



a-f 海南冬繁 CMS 系 K03A a. 减数分裂时期花药横切面 $\times 400$; b. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; c. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 400$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$

a-f CMS line K03A grown in hainan a. Cross section of an anther at meiosis stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$

图版 XVII plateXVII



a-f 海南冬繁 CMS 系 L23A a. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; b. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; c. 四分体时期花药横切面 $\times 400$; d. 单核期花药横切面 $\times 400$; e. 单核期花药横切面 $\times 400$; f. 单核期花药横切面 $\times 400$

a-f CMS line L23A grown in hainan a. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; b. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; c. Cross section of an anther at tetrad stage $\times 400$; d. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; e. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$; f. Cross section of an anther at mononuclear stage $\times 400$

致 谢

本论文是在恩师周瑞阳教授的悉心指导和亲切关怀下完成的。三年来,导师在学习、科研和生活上给予我无微不至的关心和帮助,使我顺利完成学业。同时,还得到植物教研室艾素云高级工程师的热情关怀、大量指导和无私帮助。老师们广博的学识,严谨的治学态度,开阔的科研思路,实事求是的科学态度,开阔创新的进取精神,团结合作的科研作风,辛勤耕耘的奉献精神 and 爱生如子的高尚师德使我受益终生,并永远是我学习的楷模。值此论文付梓之际,衷心感谢老师们对我的辛勤培育、谆谆教诲、热情关怀和无私帮助。

三年来,还得到了植物学教研室、本课题、以及本专业的老师和同学的热情帮助和大力支持,是他们的共同参与,使本研究顺利进行。植物学教研室的周琼老师和黎桦老师给予了热情的关怀、支持与帮助。2004 级硕士研究生丁锦平、冯锐、蓝碧秀、张新、张新成、王佳卓、范业庚、詹洁、刘明、李荣峰等,2005 级硕士研究生田树云、邱长玉、刘百龙、张加强、刘大强、蔡忠全、高清等,2006 级硕士研究生李雁群等同学在试验和论文撰写过程中给予了大力支持与帮助。同时,还得到了牛英和李刚博士的热情关怀与帮助,以及业已毕业的李鸿莉、李覃艺、伍映辉、邓全湘等同学的指导与帮助。此外,还得到了工人施祖耀师傅的热情帮助。在此,一并表达我深深的谢意!

最后,由衷感谢我的家人,是他们的理解、关爱、鼓励与支持,使我的学业得以顺利进行!

朱丽梅

2007-4-29

攻读学位期间发表论文情况

朱丽梅, 艾素云, 周瑞阳, 红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞学观察, 作物学报, 2007, 33(6): 999-1003