

甘蓝 CMS 不育系和保持系的电镜观察

高 营 营¹, 王 超¹, 张 智 杰²

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 鸡东县农业技术推广中心, 黑龙江 鸡东 230321)

摘 要:为研究甘蓝 CMS 不育系材料 PM 的败育机理,以甘蓝不育系 PM 和保持系 PF 为试材,用透射电镜观察其小孢子发育的整个过程。结果表明:不育系在花粉母细胞时期形状不规则,严重影响了减数分裂的正常进行;在单核小孢子期,绒毡层细胞不解体且异常膨大,挤压小孢子使其变形,粘连在一起,并出现了严重的质壁分离现象,最后降解的小孢子和绒毡层细胞充斥着整个花粉囊,导致花药败育。

关键词:甘蓝;胞质不育系;电镜;花药败育

中图分类号:S 635 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0015-05

结球甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)属十字花科芸薹属植物,为甘蓝的变种,是一种重要的蔬菜作物,具有很强的杂种优势,当前利用最为广泛的是雄性不育系制种。关于植物雄性不育花药及小孢子在细胞学水平上的观察,前人已做了大量的研究报道。Hirose 等^[1]认为,辣椒的雄性不育系败育时期发生在小孢子发育后期,小孢子减数分裂基本正常,四分孢子可以形成;许忠民等^[2]对甘蓝胞质雄性不育系 CMS158 的研究发现,不育系 CMS158 的败育时期发生在四分体时期至单核花粉期,绒毡层细胞高度液泡化,挤压小孢子;余凤群等^[3]对萝 AI 和萝 AII 的研究发现,其花药发育受阻于四分体至单核花粉期;危文亮等^[4]对甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 NCa 花药发育的研究发现,其不育时期发生在单核花粉晚期;王福青等^[5]研究表明,大白菜雄性不育两用系 88-3 的不育株败育从小孢子母细胞至二核花粉期均有发生。

为了深入认识甘蓝细胞质雄性不育系的败育机理,该试验利用透射电镜技术探讨甘蓝保持系 PF 和不育系 PM 花药及小孢子发育的亚细胞结构,从而明确甘蓝不育系 PM 的败育时期及方式,并与其它不育材料花药及小孢子的发育过程进行比较,以期今后更好的利用该不育材料提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以遗传性稳定的甘蓝保持系 PF 和细胞质雄性不育系 PM 为供试材料,2012 年冬,将处于结球期的 PF 和 PM 栽于温室内,经低温处理后,于次年春季抽薹开花。PM 的不育性稳定,不育率和不育度均达 100%。

1.2 试验方法

1.2.1 花器外部形态比较 2013 年 3 月 20 日,在甘蓝盛花期,用游标卡尺测量花冠直径,花瓣长、花瓣宽、长雄蕊、短雄蕊及花萼的长和宽,在显微镜下测量花药长。比较了甘蓝不育系 PM 和可育系 PF 花器的形态差异。

1.2.2 透射电镜样品的制备 在甘蓝盛花期,取主茎顶部整个花序,根据卞春松^[6]的花药发育时期与相应花蕾大小的对等关系,将花蕾从大到小进行分级,分别取出花药,配合醋酸洋红染色,光学显微镜镜检结果,处理不同发育时期的花药。(1)固定:前固定,将不同发育时期的花药放入离心管中,立即用 2.5%戊二醛进行前固定,固定 2 h 或更长时间,并置于 4℃ 下保存。漂洗,将进行前固定后的花药用 0.1 M 的磷酸缓冲液进行漂洗,漂洗 3 次,每次 15 min。后固定,将花药置于 1%的四氧钼酸(O_5O_4)固定液中固定 2.5 h。再漂洗,再用 0.1 M 的磷酸缓冲液进行漂洗,漂洗 3 次,每次 15 min。(2)脱水:分别用 50%、70%、90%、100%的乙醇进行脱水,每级停留 10~15 min,其中 100%乙醇 2 次。然后用 1:1 比例的 100%乙醇+100%丙酮脱水 10 min,以上操作在 4℃ 冰箱内进行。最后再用 100%丙酮脱水 10 min。(3)浸透处理:纯丙酮+包埋液(1:1)室温 1 h、纯丙酮+包埋液(1:2)室温 2 h、纯丙酮+包埋液(1:3)室温过夜。(4)包埋:次日上午包埋,在浸透若干小时。(5)聚合和修块:

第一作者简介:高营营(1987-),女,硕士,研究方向为蔬菜育种。E-mail:qhyy1314@126.com

责任作者:王超(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事蔬菜遗传与育种等研究工作。E-mail:wangchao504@126.com

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2012BAD02B01)。

收稿日期:2013-10-23

聚合 3 d 以上进行修块,然后在超薄切片机上将其修成 50~60 nm 的小块,最后用醋酸铀-枸橼酸铅双染色。(6)在 H-7650 透射电镜下观察,照相。

2 结果与分析

2.1 甘蓝保持系 PF 和胞质雄性不育系 PM 的花器外部形态比较

由图 1 可知,在形态上看,甘蓝不育系和保持系的花器外部形态基本相同,由外而内依次是萼片、花瓣、四

强雄蕊和雌蕊。蜜腺正常,由 1 对侧蜜腺和 1 对中蜜腺交叉组成。二者的区别在于花药和花蕾。

不育系的花蕾颜色偏黄色,饱满程度不如保持系,花药瘦小,干瘪,不开裂,开花后无花粉散出,花药稍高于柱头或与之齐平。保持系的花蕾饱满、圆润,微绿色。随着花蕾的不断增大,花药体积随之膨大,由早期的浅黄,逐渐变为黄色,再到金黄色;成熟后,有金黄的花粉散出。花药高于柱头(图 1、表 1)。

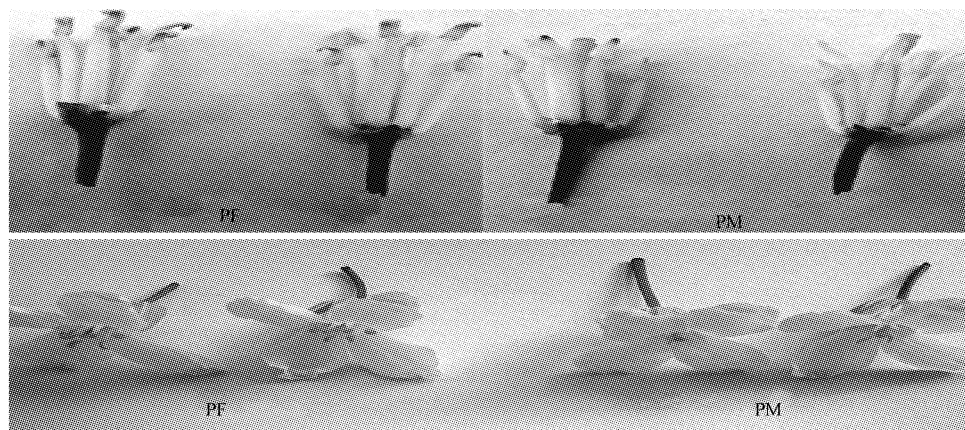


图 1 甘蓝保持系 PF 和胞质雄性不育系 PM 花器

Fig. 1 Floral organ of maintainer line PF and male sterile line PM

表 1 甘蓝不育系 PM 和可育系 PF 花器结构比较

Table 1 Comparison of floral organ structure of male sterile line PM and maintainer line PF mm

材料 Material	花冠直径 Corolla diameter	花瓣长 Petel length	花瓣宽 Petel width	花药长 Anther length	长雄蕊 Long stamen	短雄蕊 Short stamen	萼片长×宽 Sepal length× width
不育系 PM Male sterile line	18.26	17.55	6.83	1.77	9.05	7.45	7.55×3.36
可育系 PF Maintainer line	19.06	18.64	6.95	2.19	9.87	8.21	8.95×3.56

注:表中数据为 20 株的平均值。

Note: Datas were the average of 20 strains in the table.

2.2 透射电镜观察

2.2.1 甘蓝不育系 PM 花药及小孢子发育过程 采用透射电镜观察甘蓝不育系 PM 花药及小孢子的超微结构,结果表明,与保持系相比,不育系在花粉母细胞期形状不规则,排列不整齐(图 2-A)。但花粉母细胞仍可进行减数分裂形成二分体,进而形成四分体(图 2-B)。在花粉母细胞期,绒毡层细胞正常,细胞排列整齐,核仁清晰(图 2-C)。被释放出的单个小孢子,外被厚厚的胼胝质,可见绒毡层细胞不能及时分泌大量的胼胝质酶(图 2-D)。单核小孢子期,小孢子壁结构不完整,覆盖层,基柱层和基足层结构不明显(图 2-E)。发育不完全的单核小孢子,核膜扭曲呈波浪状(图 2-F)。绒毡层细胞进行性加厚,细胞间破裂形成一个整体,挤压小孢子,

单核小孢子严重变形,相互粘连,细胞器解体(图 2-G、J)。小孢子出现严重的质壁分离现象,呈碟状,胞质降解(图 2-H)。小孢子完全粘连在一起,小孢子内的细胞器解体,隐约可见核仁(图 2-I)。双核小孢子期,绒毡层细胞整体与中层细胞分开,挤压小孢子,花药外壁畸形、液泡化加剧,都呈现出败育的迹象(图 2-K)。成熟期花粉粒的花粉壁严重变形,无发育完全的花粉粒结构(图 2-L)。

2.2.2 甘蓝保持系 PF 花药及小孢子发育过程 采用透射电镜观察甘蓝保持系 PF 花药及小孢子的超微结构,结果表明,花粉母细胞期,细胞排列整齐,形状规则,核仁、核膜清晰(图 3-A)。四分孢子,外被一层厚厚的胼胝质(图 3-B)。绒毡层结构正常,细胞排列整齐,可见细胞核等细胞器(图 3-C)。单核小孢子期,绒毡层与小孢子结构,绒毡层细胞开始降解,较小孢子染色深(图 3-D)单核小孢子期,核仁、核膜清楚,胞质浓稠,内含线粒体,内质网,高尔基体等细胞器,可见 3 个萌发孔,以及发育完整的小孢子外壁结构,覆盖层,基柱层和基足层明显(图 3-E)。单核晚期形成大的液泡,将核挤向一边,从而进行减数分裂(图 3-F)。单核晚期,绒毡层细胞开始解体,内含大量的脂滴体(图 3-G)。双核小孢子期,绒毡层细胞以及进一步加厚的花粉粒壁,仍可见大量的脂滴体(图 3-H、I)。花粉粒成熟期绒毡层细胞完全降解,花药内壁和表皮层细胞液泡化(图 3-J)。发育成熟的花粉粒,花粉粒内均匀分布着大量的小液泡(图 3-K、L)。

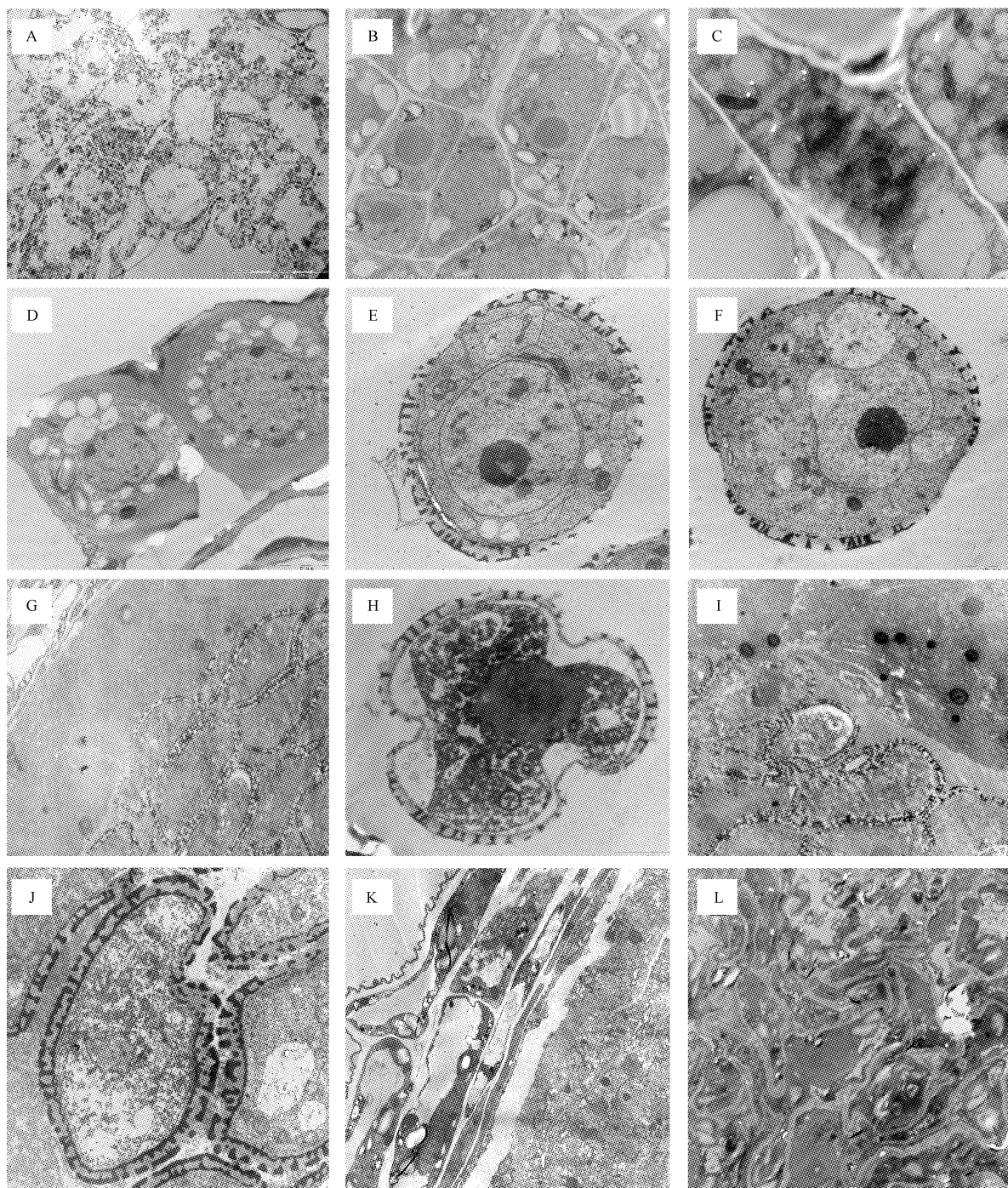


图2 甘蓝不育系花药及小孢子透射电镜图

A. 花粉母细胞形状不规则,细胞核大($\times 1\,500$);B. 花粉母细胞进行减数分裂,形成二分体及四分体($\times 10\,000$);C. 绒毡层细胞结构正常($\times 10\,000$);D. 单个小孢子($\times 12\,000$);E. 单核小孢子期,细胞核大,细胞器丰富($\times 12\,000$);F. 单核晚期核膜呈现不正常波纹状($\times 12\,000$);G. 单核小孢子期,绒毡层细胞径向膨大成一团,挤压小孢子($\times 2\,500$);H. 小孢子出现质壁分离现象($\times 12\,000$);I. 变形的小孢子和绒毡层细胞($\times 5\,000$);J. 形状不规则的小孢子($\times 12\,000$);K. 双核小孢子期,绒毡层与中层细胞分开($\times 4\,000$);L. 成熟花粉粒结构($\times 5\,000$)。

Fig. 2 Transmission electron micrographs of anther and microspore development in cabbage male sterile line

A. Irregular PMC($\times 1\,500$);B. PMC performing meiosis and form the dyad and tetrad($\times 10\,000$);C. Normal tapetum cell($\times 10\,000$);D. A single microspore($\times 12\,000$);E. The bigger nucleus and abundant organelles during uninucleate microspores stage($\times 12\,000$);F. Nuclear membrane appeared unusual corrugated during the late uninucleate microspore stage($\times 12\,000$);G. Tapetum cells radial expansion extrusion microspore during uninucleate microspores stage($\times 2\,500$);H. Microspore appeared plasmolysis($\times 12\,000$);I. Abnormal microspores and tapetum cell($\times 5\,000$);J. Irregular microspore($\times 12\,000$);K. Separate tapetum and middle layer during binucleate microspores($\times 4\,000$);L. Mature pollen grains($\times 5\,000$).

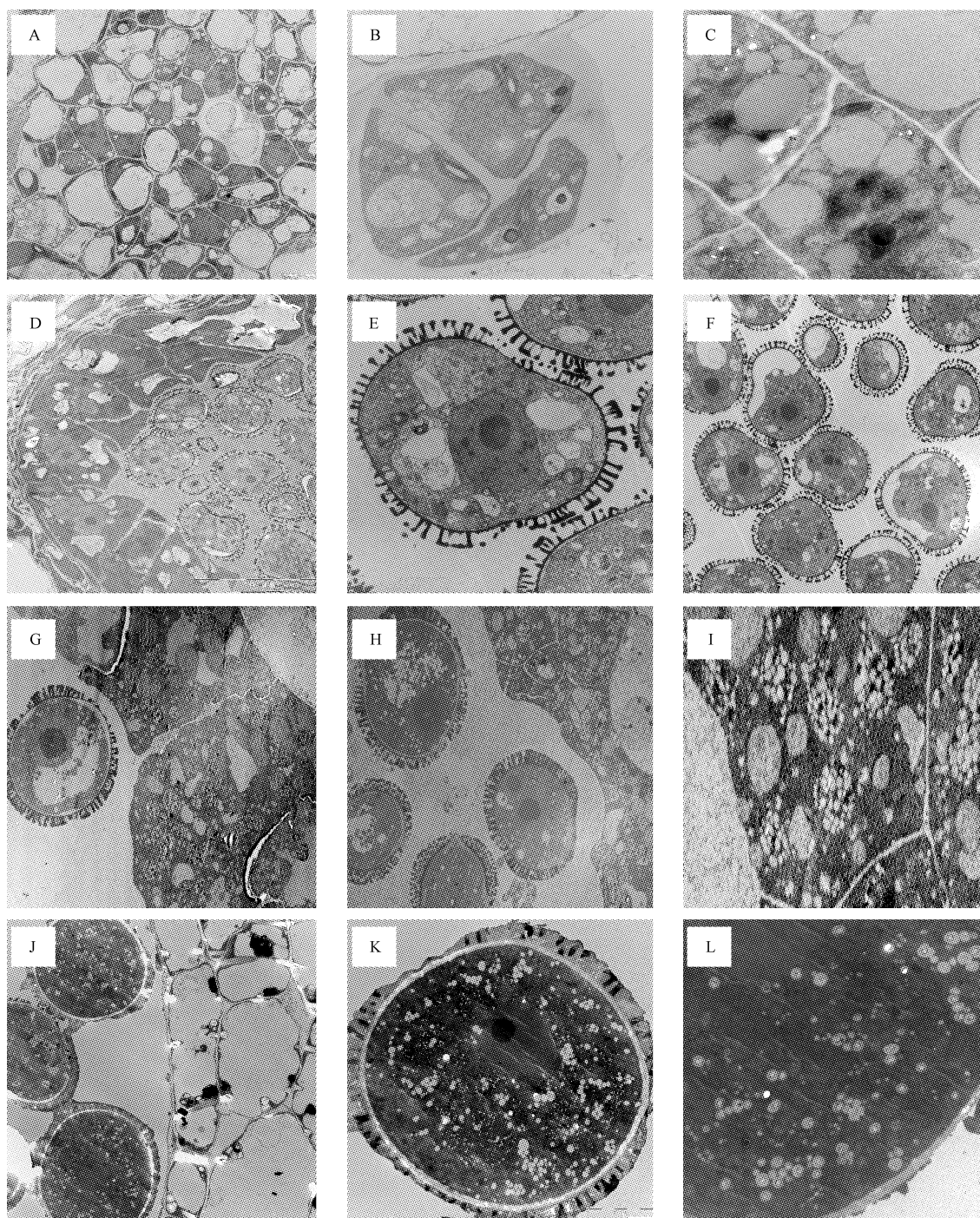


图3 甘蓝保持系花药及小孢子发育透射电镜图

A. 花粉母细胞排列紧密,细胞核大,居中($\times 4\,000$);B. 花粉母细胞进行减数分裂形成二分体,进一步形成四分体($\times 10\,000$);C. 绒毡层细胞($\times 12\,000$);D. 单核小孢子和绒毡层细胞($\times 1\,500$);E. 单核小孢子($\times 10\,000$);F. 单核晚期,小孢子形成大的液泡,将核挤向一边($\times 2\,000$);G. 单核小孢子晚期,绒毡层细胞富含脂滴体(箭头所指),细胞开始解体($\times 2\,000$);H. 双核小孢子期,绒毡层细胞和脂滴体($\times 1\,500$);I. 示脂滴体;J. 花粉粒成熟期,绒毡层细胞完全降解($\times 2\,500$);K. 发育成熟的花粉粒($\times 5\,000$);L. 成熟花粉粒中均匀分布着许多小液泡($\times 12\,000$)。

Fig. 3 Transmission electron micrographs of anther and microspore development in cabbage maintainer line

A. Pollen mother cells(PMC) arranged closely and nuclear center($\times 4\,000$);B. PMC performing meiosis and form the dyad and tetrad($\times 10\,000$);C. Tapetum cells($\times 12\,000$);D. Uninucleate microspore and tapetum cells($\times 1\,500$);E. Uninucleate microspore($\times 10\,000$);F. At the end of uninucleate microspore stage microspore forming large vacuoles and expelling nucleus to one side($\times 2\,000$);G. Tapetal cells contain lipid droplets and began to degrade at the end of uninucleate microspore stage($\times 2\,000$);H. Tapetal cells and lipid droplets during binucleate microspores($\times 1\,500$);I. Lipid droplets;J. Tapetal cells of complete degradation during mature pollen grain stage($\times 2\,500$);K. Mature pollen grains($\times 5\,000$);L. Mature pollen grains are uniformly distributed in the many small vacuoles($\times 12\,000$).

3 结论与讨论

关于胞质雄性不育系和保持系花器外部形态,花药及小孢子发育的比较,耿三省等^[7]已做了大量研究报道。Kaul^[8]研究发现,小孢子败育可能发生在小孢子发育过程中的任何一个时期,包括从孢原细胞之前到成熟花粉粒时期,而败育的高峰期是四分体至小孢子单核期。该研究发现,细胞质雄性不育材料 PM 的不育时期开始于花粉母细胞时期,主要表现为花粉母细胞形状不规则,但能进行正常的减数分裂形成四分小孢子,绒毡层细胞分泌较少的胼胝质酶,厚厚的胼胝质使小孢子不易分开,单核小孢子期核膜呈现不正常的波浪状,绒毡层细胞进行性加厚挤压小孢子,使其粘连。成熟花粉期,没有完整的花粉粒结构,花粉囊壁畸形,液泡化加剧,最终导致不育。可见甘蓝细胞质雄性不育材料 PM 的不育贯穿于花粉发育的整个时期,这与张德双等^[9]对于大白菜 CMS96 不育材料的研究结果相似。在前人研究过的甘蓝胞质雄性不育材料中,还未发现有败育时期发生在花粉母细胞至成熟花粉粒整个时期,这可能于采用的不育源的不同有关。其中,绒毡层细胞在花粉形成过程中起着极其重要的作用,许多学者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^[10-11]。它的任何异常都会使花药发育受阻^[12]。在该研究和观察过程中,不育系 PM 的绒毡层细胞进行性加厚挤压小孢子,延迟解体,最终导致花粉败育。

此外,该试验还发现,在保持系单核小孢子晚期的绒毡层细胞内存在大量的脂滴体,在不育系的绒毡层细胞内没有观察到。这与 Vizcay-Barrena 等^[13]在拟南芥突变体 ms1 上的研究以及赵会芳^[14]对新型大白菜 Ogura 细胞质雄性不育系 RC₇ 的研究结果一致。脂滴体又叫造油体,造油体的主要作用可能是为花粉壁的形成提供所需的固醇,推测可能是在花粉表面形成一个防水层^[15]。当绒毡层细胞裂解后,这些脂质和蛋白质被释放到小孢子表面,形成花粉外被^[14]。这也是不育系在单核小孢子期,花粉外被发育不完整的一个重要原因。

Electron Microscopic Observation on Male Sterile CMSPM and Maintainer Line of Cabbage

GAO Ying-ying¹, WANG Chao¹, ZHANG Zhi-jie²

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Jidong County Agricultural Technology Promotion Center, Jidong, Heilongjiang 230321)

Abstract: Using transmission electron microscopy techniques, the anther and microspore development were studied, in order to obtain differences between CMSPM and its maintainer line of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. The results showed that pollen mother cells (PMC) of CMSPM was irregular. Thus meiosis of PMC was influenced seriously. During mononuclear stage, the tapetal cells did not degenerated and expand abnormally, pressing the microsporocyte made to be out of shape, and microspore appeared serious plasmolysis phenomenon. Finally degradation of microspore and tapetal cells was full of the whole pollen sac which caused the anther abortion.

Key words: cabbage; CMS; electron microscopy; anther abortion

参考文献

- [1] Hirose T, Fujime Y. Studies on the hybrid seed production by using a new male sterile line in pepper (*Capsicum annuum* L.) II. On the process of pollen degeneration[J]. Jap Soc Hort Sci, 1981, 50(1): 66-70.
- [2] 许忠民, 张恩惠. 甘蓝胞质雄性不育系 CMS158 小孢子发生的细胞学研究[J]. 西北农业学报, 2012, 21(3): 118-121.
- [3] 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[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8(3): 209-216.
- [4] 危文亮, 王汉中, 刘贵华. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 NCa 花药发育的细胞学观察[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1232-1237.
- [5] 王福青, 王翠兰, 宋再华. 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[J]. 西北植物学报, 2001, 22(3): 570-574.
- [6] 卞春松. 几份不同遗传类型甘蓝雄性不育花药发育的细胞形态学研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 1994.
- [7] 耿三省, 王志源, 将健箴, 等. 辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学观察[J]. 园艺学报, 1994, 2(2): 165-169.
- [8] Kaul M L H. Male sterility in higher plants[D]. Berlin: Springer verlag, 1988: 211-256.
- [9] 张德双, 张凤兰. 大白菜 CMS96 不育系和保持系电镜观察[J]. 华北农学报, 2012, 27(2): 133-139.
- [10] Aarts M G, Hodge R, Kalantidis K, et al. The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes[J]. The Plant Journal, 1997, 12(3): 615-623.
- [11] Jin W, Horner H T, Palmer R G. Genetics and cytology of a new genic male-sterile soybean [*Glycine max* (L.) Morr.] [J]. Sex Plant Reprod, 1997, 10(1): 13-21.
- [12] 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[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(1): 17-23.
- [13] Vizcay-Barrena G, Wilson Z A. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(11): 2709-2717.
- [14] 赵会芳. 新型大白菜 Ogura 细胞质雄性不育系 RC₇ 不育机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [15] 罗鑫娟, 刘旭昊, 王新宇. 绒毡层小体, 一种在花药绒毡层细胞中新发现的含油细胞器[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(1): 61-65.