

茄子雄性不育系花粉败育的细胞学观察

陈雪平, 罗双霞, 轩淑欣, 张成合, 申书兴

(河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要:以种间杂交创建的茄子雄性不育系为试材, 采用形态学和细胞学观察对其花药形态、败育发生时期和机理进行了研究。结果表明: 根据花药形态茄子雄性不育系材料可被划分为退化型、瓣化型和中间型 3 种类型; 前期 I 是 3 类不育系雄性败育发生的关键时期, 绒毡层结构与功能异常可能是导致 3 类材料雄性败育的共性原因, 减数分裂异常为败育的中间过程。花药瓣化类型不育材料在败育时期上表现出多样性, 多糖类营养物质转运受阻也可能是其发生雄性败育的原因之一。

关键词:茄子; 雄性不育; 细胞学

Cytological Observation of Pollen Abortion in Eggplant Male-Sterile Lines

CHEN Xue-ping, LUO Shuang-xia, XUAN Shu-xin, ZHANG Cheng-he, SHEN Shu-xing

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: The eggplant male sterile materials developed from advanced backcrossing of interspecific hybrid were used to study the anther morphology, the stage, and the mechanism of pollen abortion by morphological and cytological methods. The results showed that the eggplant male-sterile materials were grouped into three types including degenerative-anther type, petaloid-anther type, and intermediate-anther type, according to the anther morphological characters. Prophase I was the key stage that pollen abortion occurred. The abnormality of tapetum structure and function was probably the common reason that resulted the male sterility. Abnormal meiosis was the intermediate process of pollen abortion. The petaloid-anther type sterility materials displayed diversity in the abortion period. The transport disruption of polysaccharides might be one of the reasons for its occurrence of male sterility.

Key words: Eggplant; male sterile; cytology

花药结构与功能的细胞生物学研究是联系雄性不育的分子水平研究和个体调控育性变化研究的中间环节, 是全面认识不育基因调控花粉败育过程的基础^[1]。目前在小麦、水稻、高粱、油菜、棉花和枸杞等多种作物上开展了该方面的研究^[2-7]。茄子分布地区广, 栽培效益高, 是我国重要蔬菜作物之一。我国为茄子第 2 起源中心, 种质资源丰富。关于茄子雄性不育系的选育、应用及遗传生理等方面的研究国内外已有一些报道^[8-16], 但有关茄子雄性不育

的细胞学研究尚未见报道。本研究所用试材是通过野生赤茄与栽培茄远缘杂交创建的新类型, 与前人获得途径不同, 且至今未找到其恢复系。研究其败育发生时期和细胞学机理, 对新材料的开发利用、相应恢复系的筛选创新意义重大。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 3 个茄子雄性不育系 655A、679A

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-09 网络出版日期: 2013-06-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130619.1619.006.html>

基金项目: 河北省科技厅科技攻关项目(06220116D、11220102D); 十一五国家科技支撑计划项目(2008BA97B06-8)

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: chenxueping@hebau.edu.cn

通信作者: 申书兴, 教授, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: shensx@hebau.edu.cn

和 704A 及其相应保持系 655B、679B 和 704B,其中 3 个雄性不育系是笔者用赤茄 (*Solanum integrifolium*) 突变体不育株分别与 3 个栽培茄自交系进行多代回交选育获得,遗传性状稳定,655B、704B 为圆茄类型,679B 为长茄类型。

1.2 方法

于盛花期采集茄子不育系及其保持系相同节位、大小适宜的花蕾,分别于 FAA (Formalin-Acetic acid-Alcohol) 固定液 (70% 乙醇 90 mL + 冰醋酸 5 mL + 福尔马林 5 mL) 和 Carnoy 固定液 (3 份 95% 乙醇 + 1 份冰醋酸) 固定,前者用于石蜡切片^[20]研究,后者用于减数分裂观察。石蜡切片经 50% - 70% - 80% - 95% - 100% 酒精系列脱水,二甲苯透明,切片厚度 8 ~ 10 μm , PAS (Periodic Acid Schiff) 反应鉴定多糖物质,铁矾 - 苏木精染

色,固绿复染,中性树胶封片。减数分裂采用常规压片法制片,PIHCH (Propionic-Iron-Hematoxylin-Chloral-Hydrate, 丙酸-铁-水合三氯乙醛-苏木精) 染色液染色。二者均于 Olympus BH-2 或 Zeiss Axioskop 40 显微镜下观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 不育系雄蕊形态类型

茄子保持系花药饱满、排列紧密,色泽鲜黄(图 1A)。3 个雄性不育材料 (655A、679A、704A) 雄蕊形态不同。其中,655A 为花药退化型,其花药退化为褐色、干瘪的三角形薄片(图 1B);679A 为花药瓣化型,其花药部分瓣化(图 1C);704A 为中间型,其花药仅顶端瓣化呈裂片状(图 1D)。此外,保持系的花药数目多为 5 ~ 6 枚,而不育系多为 7 ~ 8 枚。



A: 保持系,花药正常;B:655A 不育系,花药退化;C:679A 不育系,花药瓣化;D:704A 不育系,花药顶端瓣化

A: Maintainer, with normal anthers, B: 655A sterile line, with degenerative anthers,

C: 679A sterile line, with petaloid anthers, D: 704A sterile line, with top-petaloid anthers

图 1 茄子不育系与保持系花药形态

Fig. 1 The anther morphology of eggplant male sterile lines and their maintainer lines

2.2 花药结构组织切片观察

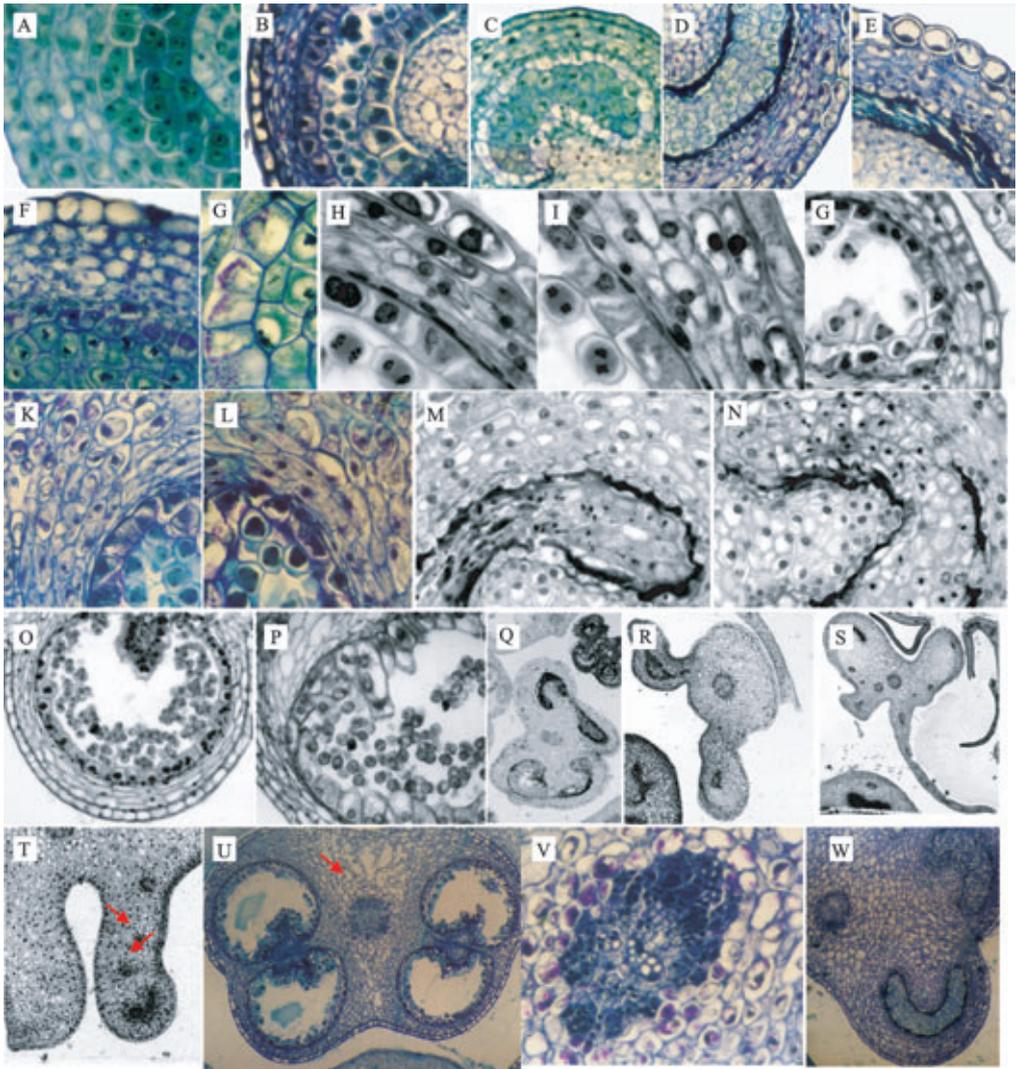
2.2.1 花粉母细胞时期 石蜡切片观察表明,在花粉母细胞时期,3 个不育系与其相应保持系间无明显差异,花药壁结构清晰,各层细胞内未见淀粉粒积累,704A(中间型)不育材料造孢细胞内偶见有丝分裂及多核仁现象(图 2A)。

2.2.2 减数分裂时期 前期 I: 3 个保持系药壁组织多由 4 ~ 5 层细胞构成,外侧绒毡层被染为较均匀的紫红色,其他药壁和药隔薄壁细胞内可见少量紫红色淀粉粒(图 2B)。3 个不育系花药组织结构及淀粉粒分布与保持系相似,但均可在三者的绒毡层和孢母细胞中观察到以下异常:(1) 绒毡层细胞液泡化,核被挤向一侧,最终解体坏死,药壁组织及薄壁细胞内可见大量淀粉粒积累(图 2C-D);(2) 绒毡层以外的药壁细胞增生,多由 7 ~ 8 层细胞构成,且排列不整齐,药室缢缩为条带状,孢母细胞被挤压变

形而败育(图 2D-E)。此外,679A(瓣化型)不育材料前期 I 可见在近药室外壁一侧的绒毡层内有大量体积较大的淀粉粒聚集(图 2F-G)。

中期 I 至四分体时期:保持系药壁组织结构完整(图 2H-J),各层药壁细胞及薄壁细胞内均有紫红色的淀粉粒存在(图 2K-L),可观察到各期分裂相。在 655A(退化型)中,仅见前期 I 分裂相;在 679A(瓣化型)的少量花药中可见中期 I 和后期 I 分裂相;在 704A(中间型)仅在极个别花药中偶见中期 I 和后期 I 分裂相。因而推测,前期 I 是雄性败育发生的关键时期。这 2 类不育系绒毡层细胞坏死,其余药壁组织结构完整与保持系相近(图 2M-N)。

2.2.3 小孢子至成熟花粉粒时期 保持系药室内单核小孢子量多而分散(图 2O),绒毡层细胞形态规则,排列整齐。成熟花粉粒被染为黑色。3 类不育类型中仅花药瓣化型可见小孢子,但绒毡层细胞



A:704A 不育系,花粉母细胞时期的药壁结构,箭头示多核仁的造孢细胞;B:保持系,前期 I 正常的药壁结构;C:不育系,液泡化的绒毡层细胞;D:不育系,坏死的绒毡层细胞;E:不育系,变形的孢母细胞和缢缩的药室;F:679A 不育系,前期 I 在外侧绒毡层细胞内大量积累的淀粉粒;G:为图 6 的局部放大;H:保持系,后期 I 药壁结构;I:保持系,中期 II 药壁结构;J:保持系,四分体时期药壁结构;K:保持系,后期 I 药壁细胞及薄壁细胞内的淀粉粒;L:保持系,四分体时期药壁细胞及薄壁细胞内的淀粉粒;M:655A 不育系,中期 I 药壁结构;N:679A 不育系,中期 I 药壁组织结构;O:保持系,大量的小孢子和规则、整齐的绒毡层细胞;P:不育系,小孢子时期异常的绒毡层细胞;Q:679A 不育系,小孢子时期缩小的花粉囊腔;R-S:不育系,花粉粒时期异常的花药结构;T:不育系,箭头示花粉粒时期花药中增生的维管束;U:保持系,花粉粒时期的花药结构,箭头示中央药隔维管束;V:保持系,药隔维管束附近薄壁细胞内的淀粉颗粒;W:不育系,药壁组织结构的细胞中淀粉粒较密集

A:704A male-sterile line, anther wall structure at PMC stage, the arrow shows multi-nucleoli in sporogenous cells, B: Maintainer line, anther wall normal structure at prophase I, C: Male-sterile line, vacuolated tapetal cells, D: Male-sterile line, necrotic tapetal cells, E: Male-sterile line, amamorphic PMCs and shrinked anther chamber, F: 679A male-sterile line, mass starch grains accumulated in the outer tapetal cells at prophase I, G: 679A male-sterile line, a partial enlarged fig. of the sixth, H: Maintainer line, anther wall structure at anaphase I, I: Maintainer line, anther wall structure at metaphase II, J: Maintainer line, anther wall structure at tetrad stage, K: Maintainer line, the starch grains in anther wall cells and parenchyma cells at anaphase I, L: Maintainer line, the starch grains in anther wall cells and parenchyma cells at tetrad stage, M: 655A male-sterile line, anther wall structure at metaphase I, N: 679A male-sterile line, anther wall structure at metaphase I, O: Maintainer line, a great deal of microspores and regular tapetal cells, P: Male-sterile line, abnormal tapetal cells at microspore stage, Q: 679A male-sterile line, shrinked anther clinandrium at microspore stage, R-S: Male-sterile lines, abnormal anther structure at pollen grain stage, T: Male-sterile line, the arrows show the hyperplasia anther vascular at pollen grain stage, U: Maintainer line, anther structure at pollen grain stage, the arrow shows the central anther vascular, V: Maintainer line, the starch grains in parenchyma cells near anther vascular, W: Male-sterile line, the more dense starch grains observed in parenchyma cells

图 2 茄子不育系及其保持系花药组织结构

Fig. 2 The anther tissue structure of eggplant male sterile lines and their maintainer lines

排列不齐,体积增大,径向伸长(图 2P),花粉囊腔缢缩变小,小孢子败育(图 2Q)。

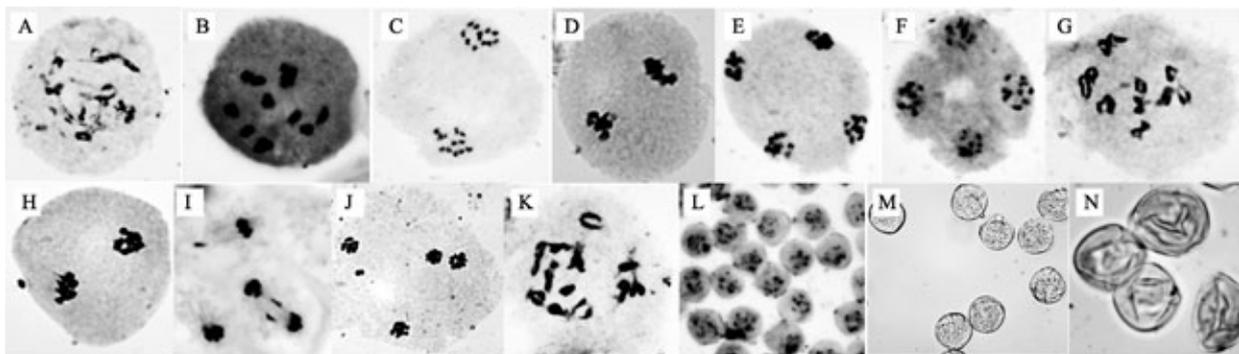
2.2.4 其他异常现象 此外,3 种类型的不育花药中出现结构异常、维管束增生等现象(图 2R-T)。保持系只在花药中央存在药隔维管束,药隔维管束附近的薄壁细胞内有形态清晰的淀粉颗粒(图 2U-V)。但不育系药壁组织结构的细胞中淀粉粒较保持系密集(图 2W)。

2.3 花粉母细胞减数分裂观察

2.3.1 减数分裂期染色体行为观察 保持系花粉母细胞分裂时期随花蕾体积大小呈规律变化,从前期 I 到四分体各个时期染色体行为正常(图 3A-F)。不育系则存在 2 种情况:679A(瓣

化型)中可见各个时期的分裂相(图 3G-I),且在后期 II 细胞中可见落后染色体(图 3I-J);655A 仅观察到前期 I 分裂相(图 3K);与石蜡切片观察结果一致。704A 在石蜡切片中偶见中期 I 和后期 I 分裂相,但在压片中亦仅观察到前期 I 分裂相,这可能与观察材料数目较少有关。此外,处于前期 I 分裂相的不育系花蕾在体积大小上表现出较大差异,但其染色体行为与保持系未见差异。

2.3.2 花粉粒形成与发育 保持系可见大量小孢子和成熟花粉粒(图 3L-M),不育材料中仅 679A 不育系(瓣化型)偶见游离小孢子或干瘪变形的未成熟花粉(图 3N)。



A-F 保持系减数分裂过程:A:终变期早期;B:中期 I;C:后期 I;D:中期 II;E:后期 II;F:四分体;G-J 679A(瓣化型)不育系减数分裂过程:G:终变期;H:中期 II;I-J:后期 II,含落后染色体;K:655A(退化型)不育系终变期;L:保持系,大量的游离小孢子;M:保持系成熟花粉粒;N:679A(瓣化型)不育系,花药中偶见干瘪或变形的未成熟花粉

A-F Meiosis of maintainer line;A:the eaily diakinesis,B:metaphase I,C:anaphase I,D:metaphase II,E:anaphase II,F:tetrad,G-J Meiosis of 679A (petaloid-anther type) anther male-sterile line,G:diakinesis,H:metaphase II,I-J:anaphase II,containing lagged chromosomes,K:655A (degenerative-anther type) male-sterile line:diakinesis,L:Maintainer line;a great deal of microspores,M:Maintainer line:mature pollen grains,N:679A (petaloid-anther type) male-sterile line:abnormal and immature pollen grains

图 3 茄子不育系及其保持系减数分裂观察

Fig. 3 Meiosis observation in eggplant male-sterile lines and their maintainer lines

3 讨论

3.1 茄子雄性不育败育时期

败育是一个过程,小孢子败育时期通常是指花粉(或小孢子)群体大量发生败育的时期,但不是唯一的时期^[13]。由于不同的不育系控制花粉败育的基因不同,其花粉的败育时期会因为基因的表达时期以及基因作用机制不同而异。因此,即使是同一种作物,其不同类型、不同来源的雄性不育花粉败育时期也不尽相同^[14]。辣椒、番茄的雄性不育在败育时间上表现出多样性^[15-16]。本研究对所用不育材料进行花药组织切片及孢母细胞减数分裂观察发

现,染色体分裂相集中在前期 I,因而,推测前期 I 为 3 种不育材料发生败育的关键时期。但在花药瓣化和中间类型中可见其他时期分裂相,瓣化类型的孢母细胞败育还可发生于小孢子时期,表现出败育时期的多样性。

3.2 败育特征与原因

绒毡层具有转运营养物质,合成胍胍质酶,为成熟花粉发育提供构成物质原料等功能^[13,17]。绒毡层细胞结构与功能异常均会引起雄性不育^[14-16,18-21]。本研究所用不育材料存在着绒毡层细胞体积增大、液泡化及解体坏死等现象,从而阻碍了营养物质流向小孢子母细胞,引起败育。

花药瓣化类型不育材料在单核小孢子时期绒毡层细胞肥大,向内径向伸长,挤压小孢子,导致小孢子败育。

王学德^[22]在研究棉花细胞质不育材料中发现,缺乏淀粉积累和淀粉酶同工酶的缺失及活性下降与孢母细胞败育有关。宋宪亮等^[23]在研究棉花 ms5ms6 核雄性不育材料中与其取得了相似结果。文李等^[24]通过对红莲型水稻细胞质雄性不育花药的蛋白质组学研究也认为不育系中与淀粉合成相关酶缺失及能量缺乏是引起雄性不育的主要原因。本研究发现,花药瓣化型不育材料在前期 I 近药室外壁一侧的绒毡层细胞有大量体积较大的淀粉粒聚集,绒毡层细胞形态正常,但液泡体积明显增大。说明绒毡层的功能发生了异常,不能将多糖类营养物质转运到孢母细胞,这也可能是导致雄性败育的原因之一。

植物基因组中 80% 的遗传信息可在配子体时期进行表达,减数分裂不正常是导致雄性不育的主要原因之一^[25]。张建奎等^[3]研究温光敏核雄性不育小麦中发现,减数分裂中期 I 可观察到少量的异常现象,如染色体落后现象。前人在对不同类型的棉花雄性不育研究中发现,在花药母细胞时期,有少量的核仁穿壁现象^[26-27],以及造孢细胞核仁增大、细胞质液化和细胞形状畸形,小孢子母细胞多核仁、染色体行为异常等现象^[28]。本研究对所用不育材料的细胞学观察中发现,造孢细胞内偶见有丝分裂及多核仁现象,在花药瓣化类型后期 I 至后期 II 中可见染色体落后现象。但减数分裂异常发生在绒毡层结构与功能出现异常之后,因而推测减数分裂不是导致雄性不育的原因,而是中间过程的具体表现。

药隔维管束是花药吸收水分和运输养料的通道,其结构分化、生长发育的异常,会直接影响花器官的物质代谢,从而导致小孢子败育。本试验发现,不育材料中发生了维管束增生、数目增加等异常现象。此外,还存在除绒毡层外其他药壁细胞增生,以及药隔薄壁细胞中淀粉粒较保持系密集的现象,但这究竟是绒毡层结构与功能异常所致,还是药隔内维管束增生导致营养物质输送短期过剩所致,还有待进一步研究。

参考文献

[1] 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

- [2] 向珣朝,张晓华,徐艳芳,等. 来自密阳 46 的籼型新不育胞质 H236A 的育性鉴定和花粉粒败育形态观察[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(6):1014-1018
- [3] 张建奎,董静,宗学风,等. 温光敏核雄性不育小麦雄性败育的细胞学观察[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(3):411-418
- [4] 梁小红,仪治本,邓小敏,等. 高粱 A₆ 型细胞质雄性不育系花粉母细胞减数分裂行为的观察和分析[J]. 作物学报,2010,36(4):709-712
- [5] 聂明建,王国槐,朱卫平. 甘蓝型油菜 3 种类型雄性不育系花粉败育的细胞学研究[J]. 中国农业科学,2007,40(7):1543-1549
- [6] 陈富成,祁建民,陶爱芬,等. 棉麻纤维作物雄性不育研究进展及展望[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):197-202
- [7] 田英,李云翔,秦垦,等. 宁夏枸杞雄性不育材料小孢子发生的细胞形态学观察[J]. 西北植物学报,2009,29(2):263-268
- [8] 方木壬,毛瑞昌,谢文华. 茄子胞质雄性不育系的选育[J]. 园艺学报,1985,12(4):261-265
- [9] 刘进生,Phatak S C. 茄子功能性雄性不育的遗传及其与果紫色基因连锁关系的研究[J]. 遗传学报,1992,19(4):349-354
- [10] 田时炳,黄斌,罗章勇,等. 茄子功能性雄性不育系及恢复系配合力分析[J]. 西南农业学报,2001,14(2):58-61
- [11] 张先清. 茄子功能性雄性不育系的利用研究[J]. 西南农业大学学报,2002,24(3):263-265
- [12] 郭丽娟,申书兴,张成合,等. 茄子雄性不育系的可溶性糖、淀粉、氨基酸分析[J]. 河北农业大学学报,2004,27(4):34-36,92
- [13] 刘富中,连勇,陈钰辉,等. “十五”期间我国茄子遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2006(3):31-34
- [14] 郭丽娟,申书兴,陈雪平,等. 茄子雄性不育系花蕾内源激素研究[J]. 植物遗传资源学报,2006,7(4):434-436
- [15] 李冰,申书兴,陈雪平,等. 茄子雄性不育系苗期植株生长特性与光合作用的研究[J]. 河北农业大学学报,2006,29(6):13-16
- [16] 李冰,申书兴,陈雪平,等. 茄子雄性不育系与保持系生理生化特性比较分析[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(1):46-50
- [17] 刘志松,官春云,陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用[M]. 北京:中国农业出版社,2001:21
- [18] 周仲华,陈金湘,刘爱玉,等. 棉花温敏核雄性不育系特棉 S-1 的形态学和细胞学特征研究[J]. 棉花学报,2008,20(6):408-413
- [19] 邱义兰,刘珠丽,李红,等. 辣椒细胞质雄性不育花药败育及淀粉粒分布的细胞学观察[J]. 分子细胞生物学报,2008,41(4):283-293
- [20] 毛秀杰,刘婷,孙中峰,等. 番茄雄性不育系 JL-2 小孢子发育的细胞学观察[J]. 种子,2009,28(5):1-3
- [21] 袁亦楠,朱德蔚,连勇,等. 番茄雄性不育突变体小孢子发育的细胞学研究[J]. 华北农学报,2000,15(3):61-65
- [22] 王学德. 棉花细胞质雄性不育花药的淀粉酶与碳水化合物[J]. 棉花学报,1999,11(3):113-116
- [23] 宋宪亮,孙学振,刘英欣. 棉花 ms5ms6 核雄性不育花药中碳水化合物和游离氨基酸的变化[J]. 棉花学报,2001,13(6):334-336
- [24] 文李,刘盖,张再君,等. 红莲型水稻细胞质雄性不育花药蛋白质组学初步分析[J]. 遗传,2006,28(3):311-316
- [25] 李雅轩. 植物减数分裂研究进展[J]. 生物学通报,1999,16(5):526-529
- [26] 张小全,王学德,朱云国,等. 细胞质雄性不育海岛棉的选育和细胞学观察[J]. 中国农业科学,2007,40(1):34-40
- [27] 豆丽萍,王庆亚,唐灿明. 陆地棉双隐性核雄性不育系 ms5ms6 花药发育过程的研究[J]. 棉花学报,2009,21(4):265-270
- [28] 李悦有,王学德,徐亚浓. 棕色棉细胞质雄性不育花药的细胞学观察[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2002,28(1):11-15