

白菜细胞核雄性不育两用系的细胞学观察

叶纨芝 曹家树* 余小林 崔辉梅 黄 鹂 向 珣 陶 甦

(浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029)

摘要 对白菜细胞核雄性不育两用系进行了花粉母细胞减数分裂和小孢子发育的细胞学观察, 实验结果初步表明不育系小孢子败育时期在减数分裂末期II这一阶段, 败育方式是不能形成四分体, 随后小孢子内颗粒状的内含物不断外溢, 直至成为一个空壳, 药室萎缩, 导致花粉败育。

关键词 白菜细胞核雄性不育两用系; 花粉母细胞; 减数分裂; 小孢子

白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee)是我国周年栽培、人们终年喜食的大众化蔬菜, 它具有非常明显的杂种优势。白菜细胞核雄性不育两用系自20世纪80年代育成以来, 已在一代杂种生产应用中发挥了重要作用; 另一方面, 它的遗传背景比较简单, 不育株与可育株仅限于一对性状的差异, 即不育与可育, 所以也是研究核雄性不育分子机制的很好材料。

关于植物雄性不育花药发育的细胞形态学观察研究, 前人已做了大量的工作^[1]。这些研究的重点在于确定花粉败育的方式和时期。本研究以白菜细胞核雄性不育两用系为材料, 对不育株和可育株小孢子发生过程及染色体减数分裂行为进行了细胞学观察。在确定小孢子败育时期的基础上, 希望确定小孢子的败育方式及减数分裂过程中染色体有无异常行为, 从而能与本实验室目前通过cDNA-AFLP (cDNA-amplification fragment length polymorphism)方法获得的一系列可能与白菜核雄性不育有关的基因^[2,3]结合起来, 从分子水平来解释白菜小孢子发育过程中出现的这些异常现象, 并对后续研究中对基因的功能验证提供些证据, 为从分子水平进一步研究细胞核雄性不育机制打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验材料是经过多年测交, 自交观察测定获得的稳定的白菜核雄性不育两用系, 其育性差异为一对隐性基因控制, 是一个可育株与不育株的比例为1:1的兄妹交系统, 可育株自交后代为3:1分离。

1.2 方法

进行花粉母细胞染色体减数分裂行为观察时, 选择晴朗天气连续3天从早上9点至15点每隔1h取白菜两用系不育株和可育株幼小花蕾, 固定于卡诺固定液(无水酒精:冰醋酸:氯仿=6:1:3)中, 12~24h后, 转入70%酒精保存于4℃下冰箱。显微镜观察时, 将花蕾放置在1mol/L HCl 59~60℃解离10min, 蒸馏水清洗3~4遍, 用改良石炭酸品红染色3min, 敲片。在Leica DMLB显微镜观察染色体减数分裂相, 并用Leica数码相机进行拍照。

小孢子的细胞学观察时, 现蕾期前后取不育株和可育株花蕾, 固定于FAA中, 24h后, 转入70%的酒精置4℃冰箱保存。随后将固定材料用70%、80%、85%、90%、95%、100%酒精逐级脱水(各1h), 二甲苯透明, 取不同大小花蕾并按文献[4]的方法进行常规切片程序包埋, 制成厚度为5μm的连续切片, 用苏木精染色, 中性树脂干燥封片。Leica DMLB显微镜观察, 并用ZeissCCD系统拍照记录。

2 结果

2.1 植株性状和花器形态的比较

在幼苗期, 不育株与可育株两者的生长势差异很小; 在抽薹开花期, 不育株的生长势强于可育株, 基部侧枝优势增强, 呈“扫帚形”。不育株与可育株的花朵较易从表型上加以区分, 不育株的花丝短小, 花药小而干瘪, 其颜色发白, 无粉;

收稿日期: 2004-02-27 接受日期: 2004-07-12

国家自然科学基金(No.30370975)和浙江省重大科技项目(No.021102536)资助

* 通讯作者。 Tel/Fax: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

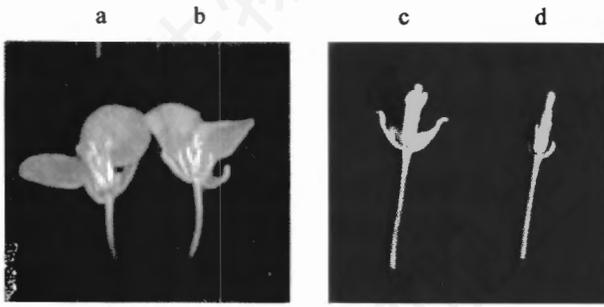


图1 白菜核不育两用系不育株与可育株花器形态比较
a和c为可育株花朵, b和d为不育株花朵。不育花花丝短小, 花药小而干瘪, 其颜色发白, 无粉; 可育花花丝发育正常, 花药饱满, 呈黄色。

雌蕊发育正常, 有受精能力。可育株花丝发育正常, 花药饱满, 呈黄色(图1)。

2.2 花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为的观察

可育株的花粉母细胞经过正常的减数分裂(图2)和两次有丝分裂, 形成成熟花粉粒。

终变期: 染色体浓缩粗短, 形状有交叉状、圆形和棒状, 10个二价体分散在整个核内, 是适宜进行染色体数目鉴定的时期(图2A)。

中期I: 从纺锤体的极面观察, 各二价体分散排列在赤道板近旁, 这也是适宜进行染色体数目鉴定的时期(图2B)。

后期I: 配对的同源染色体彼此分离, 分别走向细胞的一极, 因此在细胞两极可见各有10条染色体(图2C)。

末期I: 染色体移到两极后, 开始解螺旋转变为染色质, 在细胞两极形成新的核, 但并不进行胞质分裂, 不形成新的细胞壁, 形成二分体(图2D)。

中期II: 2个细胞核内的染色体都排列在细胞的赤道面上, 形成2个相互垂直或平行的赤道板(图2E和F)。

后期II: 每个染色体上的2个单体分开, 分别走向细胞一极, 在细胞内可看见4组染色体(图2G)。

末期II: 在细胞内形成4个新细胞核, 染色体又解螺旋转变为染色质(图2H), 紧接着进行胞质分裂, 同时形成新的细胞壁, 产生4个子细胞, 即四分体(图2I)。

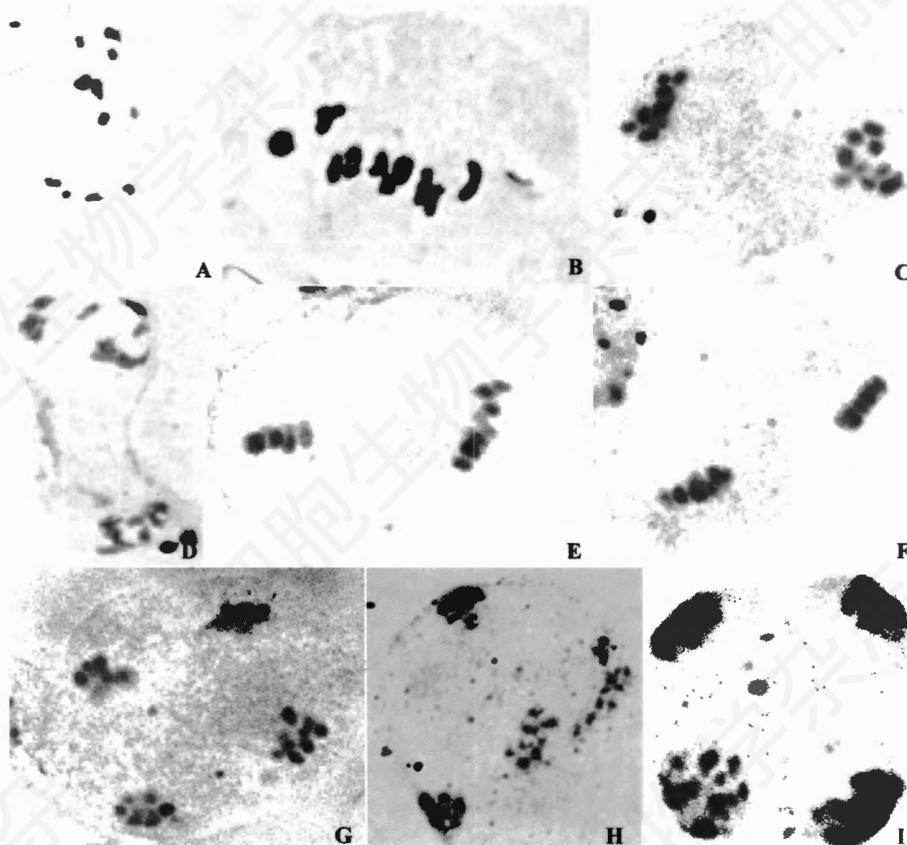


图2 可育株小孢子母细胞减数分裂过程

A: 终变期($\times 1000$); B: 中期I($\times 1000$); C: 后期I($\times 1000$); D: 末期I($\times 1000$); E和F: 中期II($\times 1000$); G: 后期II($\times 1000$); H: 末期II($\times 1000$); I: 四分体时期($\times 1000$)。

与可育株相比,不育株的花粉母细胞在减数分裂过程中也观察到终变期(图 3A)、中期 I(图 3B)、后期 I(图 3C)、末期 I(图 3D)、中期 II(图 3E)、末期 II(图 3F)的分裂相。但在终变期染色体出现不同程度的黏连现象(图 3G~K),并观察到有染色体桥现象(图 3L),没有观察到四分体时期。

2.3 可育株小孢子发生的细胞学观察

造孢细胞期:一个花药分化成 4 个药室,中间有药隔相连。每个药室中央是数个造孢细胞,外面有 4 层药壁细胞,从外到里依次是表皮、纤维层、中层和绒毡层。造孢细胞经过几次有丝分裂,

形成小孢子母细胞(图 4A)。

小孢子母细胞期:小孢子母细胞位于小孢子囊的中央,细胞体积大且染色浅,可清楚地观察到 4 层壁组织(图 4B)。

减数分裂期:减数分裂初期,小孢子母细胞体积较大,绒毡层细胞可清楚观察到二核(图 4C)。在减数分裂 I 时小孢子母细胞可观察到二核(图 4D),第一次减数分裂结束形成二分体(图 4E)。在减数分裂末期 II 时可以观察到同一平面上的三团核物质(图 4F),之后小孢子母细胞形状不规则,并可观察到四核(图 4G),减数分裂 II 结束后形成四分体。

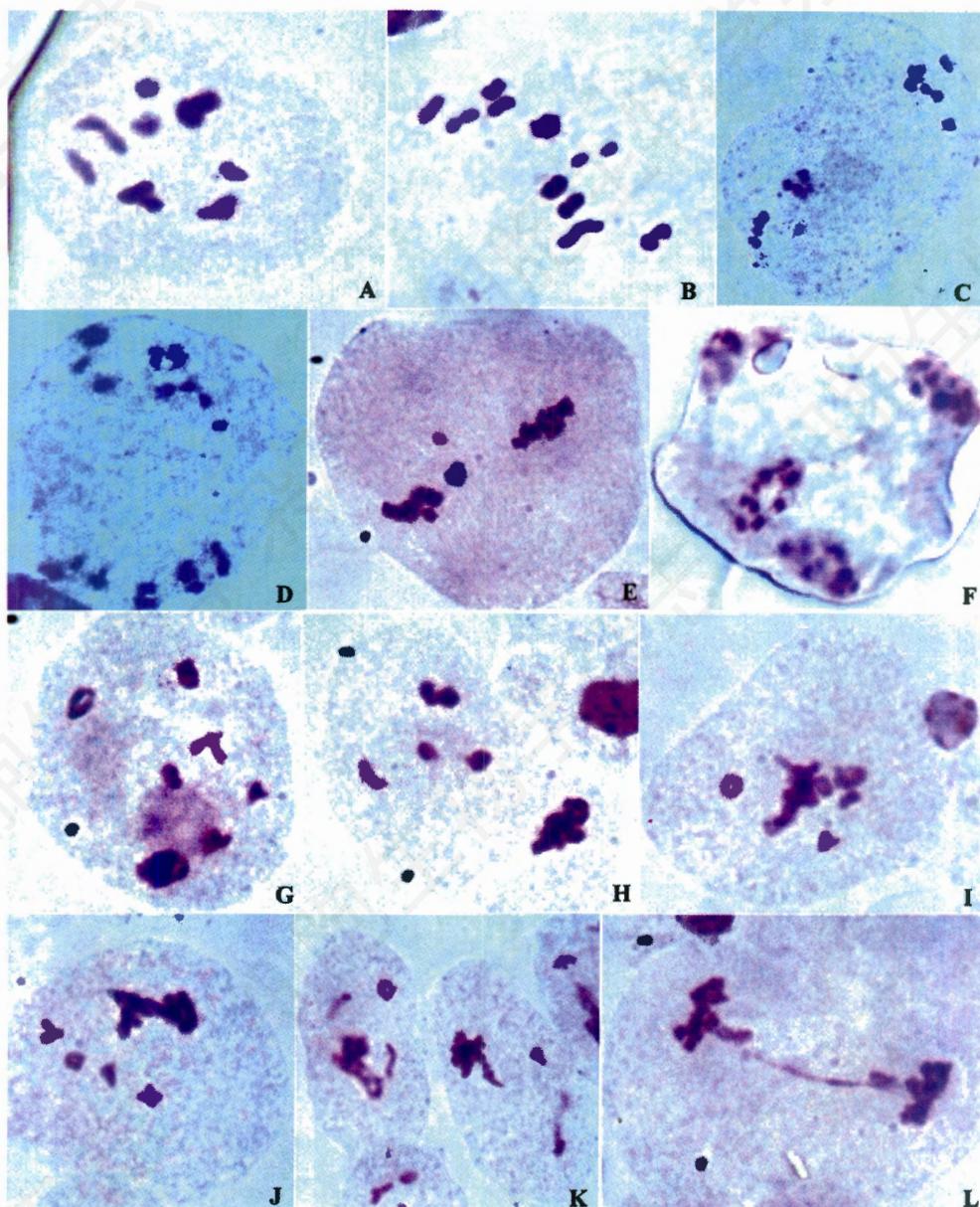


图 3 不育株小孢子母细胞减数分裂过程

A: 终变期($\times 1000$); B: 中期 I($\times 1000$); C: 后期 I($\times 1000$); D: 末期 I($\times 1000$); E: 中期 II($\times 1000$); F: 末期 II($\times 1000$); G~K: 染色体不同程度的黏连现象($\times 1000$); L: 染色体桥($\times 1000$)。

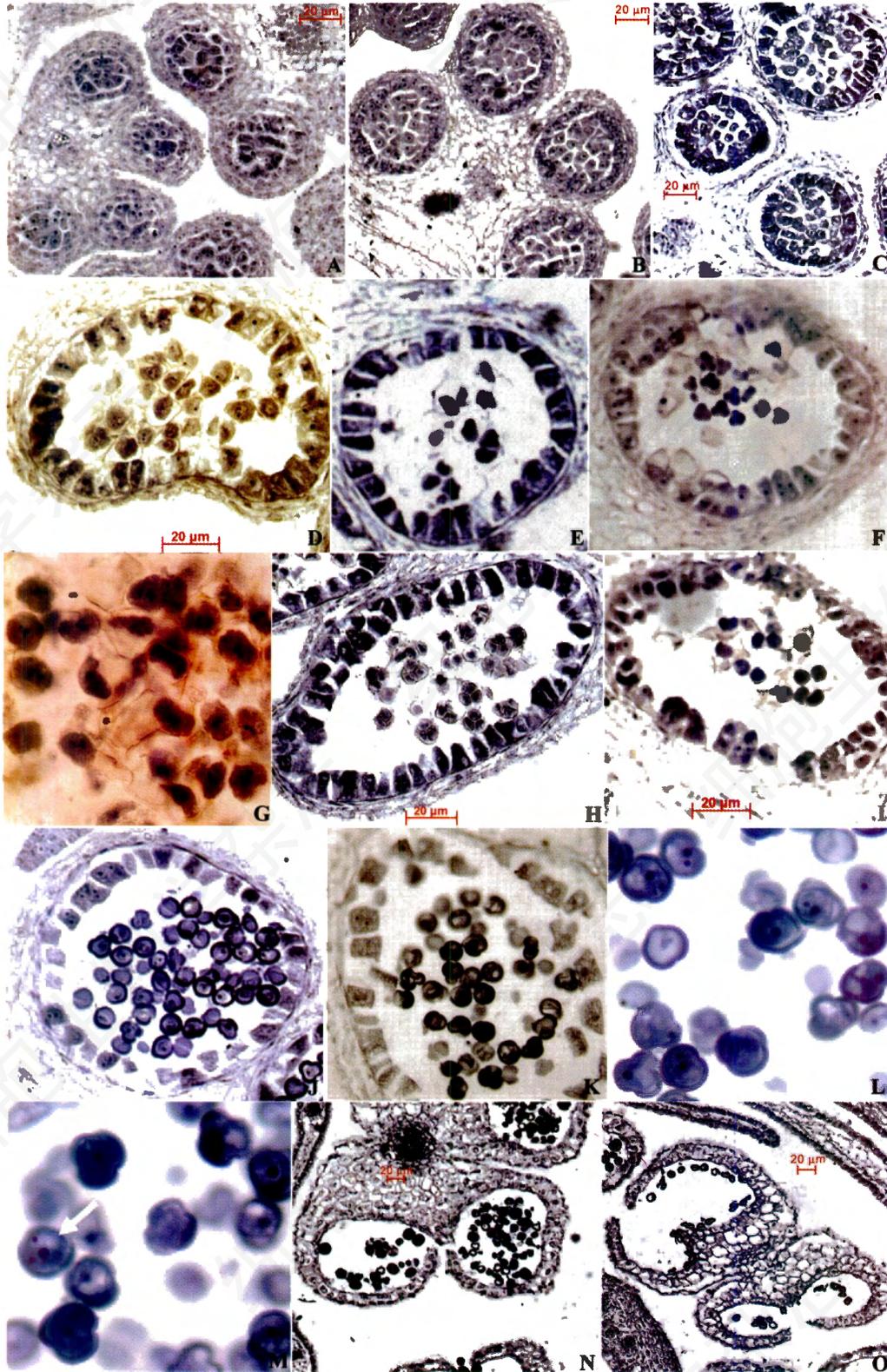


图4 可育株小孢子发育过程

A: 造孢细胞期($\times 400$); B: 小孢子母细胞期($\times 400$); C: 减数分裂初期($\times 400$); D: 减数分裂 I 小孢子母细胞内有二核($\times 400$); E: 二分体时期, 减数分裂 I 结束形成二分体($\times 400$); F: 减数分裂 II 末期, 在同一平面上小孢子母细胞内可见三团核物质($\times 400$); G: 减数分裂 II 结束, 同一平面小孢子母细胞内可观察到二核和三核($\times 1000$); H: 四分体时期($\times 400$); I: 小孢子释放期($\times 400$); J: 单核小孢子($\times 400$); K: 小孢子液泡化期($\times 400$); L: 二核花粉($\times 1000$); M: 三核花粉($\times 1000$); N: 成熟花粉, 开始散粉($\times 200$); O: 散粉($\times 200$)。

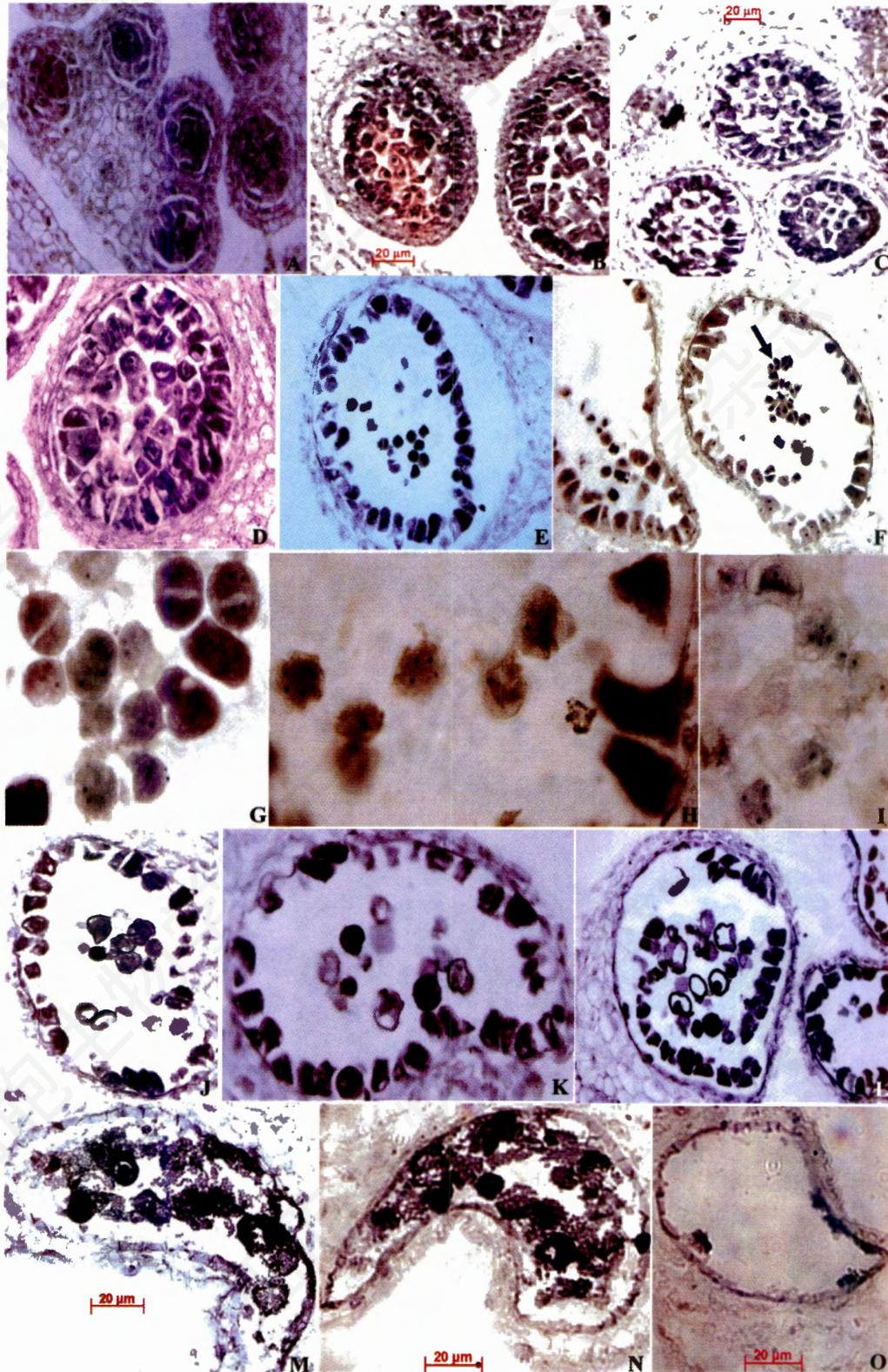


图5 不育株小孢子败育过程

A: 造孢细胞期($\times 400$); B: 小孢子母细胞期($\times 400$); C: 减数分裂初期($\times 400$); D: 减数分裂 I, 小孢子母细胞内有二核($\times 400$); E: 二分体时期, 减数分裂 I 结束形成二分体($\times 400$); F: 减数分裂 II 末期, 在同一平面上小孢子母细胞内可见三团核物质($\times 400$); G: 减数分裂 II 结束, 小孢子母细胞内可观察到四个核($\times 400$); H 和 I: 含有四核的小孢子母细胞, 性状不规则, 细胞已经比较松散, 绒毡层细胞也比较散乱($\times 1000$); J, K: 含四核的小孢子母细胞开始败育($\times 400$); L: M 小孢子母细胞内的颗粒状内含物已经开始外溢, 药室内充满了颗粒状物质($\times 400$); N: 药室萎缩($\times 400$); O: 药室已成为一个空壳($\times 400$)。

四分体时期: 小孢子母细胞经过减数分裂 I 和 II 形成四分小孢子聚在一起, 外面包裹着胼胝质(图 4H)。

小孢子释放期: 从四分体分离出来的小孢子呈规则的圆形(图 4I)。

小孢子液泡化期: 初期的小孢子有一单核(图 4J), 随后小孢子中有一液泡, 小孢子形状不规则(图 4K)。

花粉粒成熟期: 小孢子经过有丝分裂形成一个生殖核和一个营养核(图 4L), 生殖核再经过一次有丝分裂形成两个生殖核(图 4M), 形成成熟的花粉粒。此时, 绒毡层完全解体, 只剩下表皮和纤维层, 相邻两个孢子囊的隔壁解体破裂, 为花粉的散出打开通道, 此时绒毡层细胞已解体(图 4N 和 O)。

2.4 不育株小孢子发生的细胞学观察

与可育株相比, 在不育株的造孢细胞期(图 5A)、小孢子母细胞期(图 5B)、减数分裂初期(图 5C)、减数分裂 I 时(图 5D)以及末期 I 结束后形成的二分体时期(图 5E)并没有观察到异常现象, 异常现象出现在减数分裂 II 结束后, 我们只能观察到减数分裂末期 II 时(图 5F)以及末期 II 后的含有四核的小孢子母细胞(图 5G、H 和 I), 没有观察到紧接着末期 II 进行胞质分裂后的四分体时期, 而且处于这一时期的小孢子母细胞内物质比较松散(图 5J 和 K), 随后处于减数分裂末期 II 的小孢子颗粒状内含物开始外溢(图 5L 和 M), 直至最后小孢子成为一个空壳, 花粉败育, 药室也随着萎缩(图 5N 和 O)。

3 讨论

3.1 白菜小孢子母细胞减数分裂观察的最佳时期

植物花粉母细胞减数分裂过程历时较短, 一般只有几十小时, 且各种植物减数分裂期植株茎叶特征、幼蕾和花药的大小都不相同, 如果把握不准确, 取回的材料很可能是未到期或已过期。据我们的观察结果, 白菜植株中直径为 0.7~0.9 mm 的花蕾含的分裂相很多, 直径为 0.4~0.7 mm 或 0.9~1.0 mm 的花蕾中一般能找到分裂相, 但数目比较少, 直径小于 0.4 mm 或大于 1.0 mm 的花蕾几乎没有分裂相, 可能小花蕾还没有进行减数分裂而大花蕾中的减数分裂已完成的缘故, 所以要观察白菜花粉母细胞减数分裂一般可以选取直径大小为 0.7~0.9 mm 花蕾来进行。

3.2 不育株花粉母细胞的减数分裂过程中染色体

的异常行为

根据我们的观察结果认为, 白菜细胞核雄性不育两用系中不育系的花粉母细胞能进行减数分裂的第一次和第二次分裂, 从前期 I 一直能进行到减数分裂 II 中的末期 II, 但没有观察到四分体时期。在终变期, 不育株染色体有不同程度的黏连现象, 在后期 I 中并有染色体桥的现象发生。

据相关文献报道, 不育植株的花粉母细胞减数分裂异常行为常表现为单价体、染色体落后、染色体片段、染色体桥、染色体数目不等、二分体或四分体异常以及染色体黏连等现象^[5~7]。本研究材料中只观察到染色体黏连、染色体桥异常行为, 没有观察到四分体时期。在终变期虽然存在染色体黏连现象, 但白菜核不育两用系不育株的花粉母细胞能进行减数分裂一直持续到末期 II 这一阶段, 对于染色体黏连及染色体桥对白菜花粉母细胞减数分裂是否有影响及产生哪些影响还有待于进一步研究和探讨。

3.3 不育株小孢子的败育时期及特点

利容千^[1]曾指出植物雄性不育花药的败育可以发生在小孢子发育的每一个时期, 单子叶植物花药败育多数在单核—双核期, 双子叶植物中大多数发生在四分体和小孢子形成期; 在细胞质雄性不育系中, 败育可以发生在小孢子发育的每一个时期, 但大多数发生在四分体和小孢子液泡化期之间。白菜型油菜核雄性不育系的败育发生在减数分裂期, 大白菜核雄性不育系的败育发生在四分体时期, 但在四分体之前已出现花粉母细胞排列松散等现象^[8]。本实验中, 白菜核雄性不育系的花粉母细胞在减数分裂进行到末期 II 这个阶段时, 不能进行胞质分裂形成四分体, 就停止在含有 4 个核的小孢子阶段, 随后小孢子内的颗粒状内含物开始外溢, 到最后只剩下一个空壳, 导致花粉败育。但在第一次减数分裂结束后, 我们也观察到绒毡层细胞已经出现松散、混乱的现象, 所以不育系的败育可能在减数分裂的初期就已经开始了。在其他核雄性不育材料相关文献报道中, 还没有这样类似的败育特点, 在大白菜核雄性不育系中小孢子母细胞也是不能形成四分体, 但由于它是绒毡层细胞的膨大挤压造成的^[8], 白菜核雄性不育系四分体不能形成以及后来小孢子母细胞的颗粒状内含物外溢可能与壁不能合成或不完整有关。

在减数分裂 II 阶段, 与可育系相比, 我们还观察到不育系中小孢子周围的胼胝质明显偏少, 这

是不是造成不育系不能形成四分体的原因还值得进一步研究。小孢子败育时不断外溢的颗粒状的内含物是否是淀粉粒,这也需要用组织化学染色法进一步证实。

本实验中花粉母细胞减数分裂行为观察和小孢子发育的细胞学观察的这两者的结果基本能相互对应,从实验结果基本可以确定白菜核雄性不育两用系不育系败育时期在减数分裂末期 II 这一阶段,败育方式是不能形成四分体,随后小孢子内含物不断外溢,导致花粉败育。

3.4 细胞学的观察结果与白菜核雄性不育分子机制

白菜核雄性不育系中的不育系与可育系的育性差异是由一对核隐性基因控制的,受这对关键基因正调控和负调控就可能涉及到一系列基因,在分离到的与白菜核雄性不育相关的基因中,结合本实验

的细胞学观察,初步认为要重点寻找与小孢子发生败育相关的关键基因,如与胞质分裂相关的基因、与绒毡层发育相关的基因或与胼胝质合成相关的基因等。但本实验只是一个初步的观察结果,要更细致地了解小孢子的败育方式还需结合小孢子的超微结构和组织化学染色后的观察结果,从而为分子水平的研究提供更为准确可信的实验数据。

参考文献 (References)

- [1] 利容千. 武汉大学学报, 1978, 83
- [2] Ye WZ et al. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2003, 78: 319
- [3] 王永勤等. *中国农业科学*, 2003, 36: 557
- [4] 孙敬三等. *植物细胞学研究方法*, 北京: 科学出版社, 1987, 133
- [5] 李宗贤等. *华北农学报*, 1994, 9: 26
- [6] 杨景成等. *核农学报*, 2001, 15: 1
- [7] 杨守萍等. *作物学报*, 1999, 25: 663
- [8] 孙日飞等. *园艺学报*, 1995, 22: 153

The Cytomorphology of Microsporogenesis in Genic Male Sterile A/B Line of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee)

Wan-Zhi Ye, Jia-Shu Cao*, Xiao-Lin Yu, Hui-Mei Cui, Li Huang, Xun Xiang, Su Tao

(*Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract Cytological morphology studies were made in the development of anther and microsporogenesis in A line and B line of Chinese cabbage-pak-choi. In A line, pollen abortion happened in pollen mother cell meiosis stage. The tetrads couldn't be formed in the anther of A line plant, and then the pollen mother cells spread from the center of the anther chamber. With the development of pollen mother cells, the content of the cells leaked, and in the end the pollen mother cells became empty.

Key words genic male sterile A/B line of Chinese cabbage; the pollen mother cell; meiosis; the microspore

Received: February 27, 2004 Accepted: July 12, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370975) and the Key Sci-technology Project of Zhejiang Province (No. 021102536)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn