

甜椒胞质雄性不育雄配子发育的解剖学和超微结构研究

王述彬^{1,2}, 罗向东¹, 戴亮芳¹, 陈劲枫^{1*}, 刘金兵², 潘宝贵²

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 南京 210014)

摘要: 运用石蜡切片和电子显微镜超薄切片方法观察了甜椒(*Capsicum annuum* L.)细胞质雄性不育系8A和保持系8B雄配子发育过程。结果表明:不育系和保持系都能正常进行减数分裂,绒毡层细胞无明显差异,形成了正常的四分孢子。在四分体单核居中期后,不育系的绒毡层细胞异常膨大并伸进药室,挤压花粉粒,同时绒毡层细胞提前降解,不育系单核晚期花粉粒开始崩出内含物,致使不育系的雄配子在双核花粉粒形成之前就完全裂解,不能发育成正常的花粉粒。此外,超薄切片还观察到不育系花粉粒在单核早期绒毡层细胞线粒体空泡化,这种变化表明雄性不育的遗传缺陷包括在花药发育早期发生的线粒体结构变化。

关键词: 甜椒; 细胞质雄性不育; 解剖学; 超微结构; 雄配子发生

中图分类号: Q945.5; S641.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)06-0557-04

Anatomy and Ultrastructure of Male Gametophyte Development in Cytoplasmic Male Sterile (CMS) Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.)

WANG Shu-Bin^{1,2}, LUO Xiang-Dong¹, DAI Liang-Fang¹,
CHEN Jin-Feng^{1*}, LIU Jin-Bing², PAN Bao-Gui²

(1. National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Vegetable Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The male gametophyte development in a cytoplasmic male sterile (CMS) line 8A of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) and its maintainer line 8B were studied by optical and transmission electron microscope. The results showed that microsporogenesis could process normally and there was no difference in the tapetal cell between 8A and 8B lines before tetrad stage. Then, uninucleate pollen of 8A underwent a progressive process of rupture, owing to squeezing by abnormally swelled tapetal cells and to the premature degradation of tapetal cells. Male gametophytes in 8A ruptured before the first mitosis and became sterile. The results from ultrastructure observation revealed the presence of vacuolated mitochondria in the tapetum of 8A. This suggests that the genetic defects in male-sterility include gross morphological changes in mitochondria and occur on the early stage of anther development.

Key words: Sweet pepper (*Capsicum annuum* L.); Cytoplasmic male sterile; Anatomy; Ultrastructure; Male gametophyte development

甜椒(*Capsicum annuum* L.)是我国栽培的重要蔬菜之一,杂种优势非常显著。目前,除常规杂交以外,雄性不育系是一条重要的途径,利用细胞质雄性不育系生产一代杂交种子可提高生产效率,并能

确保一代杂交种子的纯度^[1]。因此,对甜椒雄性不育系的研究已受到国内外甜椒育种家们的高度重视。但目前国内外对甜椒细胞质雄性不育系的研究多侧重于不育系、恢复系的选育以及三系配套应用研究,

收稿日期:2004-02-19,修回日期:2004-06-07。

基金项目:国家“863”计划项目(2002AA207012,2002AA244021,2004AA241120)资助。

作者简介:王述彬(1963—),男,研究员,从事蔬菜育种和生物技术研究。

* 通讯作者(E-mail: jfchen@njau.edu.cn)。

而对其败育的理论研究较少。

自 1951 年 Martin 和 Crawford 首次报道辣椒细胞质雄性不育现象^[2]以来, Horner^[3]、Hirose^[4]、吴鹤鸣^[5]等对辣椒细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞学进行了研究, 可能由于选材或试验方法的不同导致其研究结果并不完全一致。笔者以甜椒不育系为研究对象, 采用石蜡切片技术和电子显微镜超薄切片技术相结合, 探明甜椒细胞质雄性不育的确切时期和方式, 为进一步揭示甜椒细胞质雄性不育机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以江苏省农业科学院蔬菜研究所辣椒课题组选育的甜椒细胞质雄性不育系 8A 和相应的保持系 8B 为试材, 于 2003 年春季和秋季种植于本所试验大棚和温室。取盛花期不同大小的花蕾进行实验。

1.2 石蜡切片程序

将 8A、8B 大小不同的花蕾固定于 FAA 固定液中备用, 真空抽气 30 min, 经过浸洗、脱水、透明、渗腊、包埋、切片(厚度为 8 μm)、干片(烤片)、脱腊、铁钒-苏木精-固绿对染、脱水、透明、中性树胶封片。Olympus(BX-51) 显微镜观察拍照。

1.3 超薄切片实验程序

从 8A、8B 植株上取大小不同的花蕾立即用

3% 戊二醛(pH 7.0) 固定; 在载玻片上滴上几滴冷 3% 戊二醛, 用解剖针和牙签小心地剥出花药, 然后用牙签将分离出的花药轻轻地拨入盛有新鲜的 3% 戊二醛的 1.5 mL 离心管中固定 3 h 或过夜; 再放入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中, 1 h 后用锇酸固定 2 h; 逐级浓度梯度的乙醇脱水, 每次脱水后移入环氧丙烷中 30 min; 样品包埋后作超薄切片, 然后电子显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

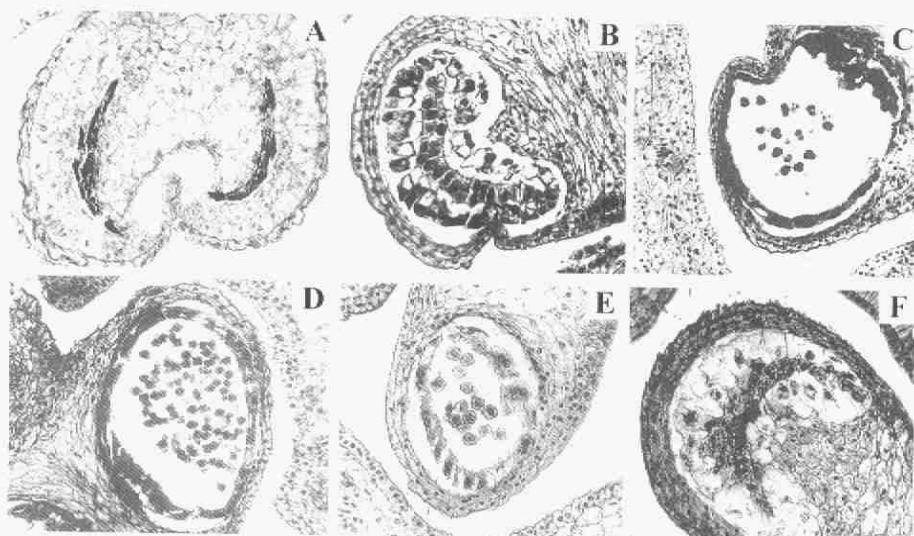
2.1 石蜡切片观察

2.1.1 保持系 8B 雄配子发育过程

造孢细胞时期: 孢原细胞经平周分裂形成初生周缘层和造孢细胞, 初生周缘层细胞继续进行平周分裂和垂直分裂形成花粉囊壁的纤维层、中层和绒毡层, 随后形成小孢子母细胞。绒毡层细胞初期为单核, 染色很深(图 1:A)。

减数分裂时期: 由外到内的各层细胞更加明显, 绒毡层细胞体积大, 核大, 着色深, 内含物丰富; 花粉母细胞呈双列式排列, 位于小孢子囊中央(图 1:B)。四分体时期, 中层细胞消失, 绒毡层细胞染色仍然很深, 并可观察到 1 个较大的核; 花粉母细胞经过 2 次同时型胞质分裂形成呈四面体的四分体, 每个小分体都有 1 个染色很深且体积较大的核(图 1:C)。

雄配子成熟期: 由于胼胝质壁的溶解, 单核花粉



A. 8B 造孢细胞时期; B. 8B 减数分裂时期; C. 8B 四分体时期; D. 8B 花粉粒成熟期; E. 8A 花粉粒单核早期; F. 8A 花粉粒单核晚期

A. Sporogenous cell stage of 8B; B. Mitosis stage of 8B; C. Tetrad stage of 8B; D. Mature pollen stage of 8B; E. Early uninucleate pollen stage of 8A; F. Late uninucleate pollen stage of 8A

图 1 甜椒胞质不育系与保持系雄配子发育过程的解剖结构特征
Fig. 1 The anatomical characteristics of male gametophyte development of the sterile and maintainer lines in sweet pepper

粒从四分体中游离出来, 释放到花粉囊中。刚游离出来的单核花粉粒细胞壁薄, 细胞质浓厚, 核位于细胞中央, 并能看到3个萌发沟。随着中央大液泡的出现, 细胞核被逐渐挤到一侧, 即单核靠边期。接着, 细胞核进行1次有丝分裂, 形成1个营养核和1个生殖核, 这时的绒毡层细胞明显变薄并有一定程度的空泡化(图1:D); 再经过一系列的变化, 形成具有3个萌发沟且表面带有乳突的成熟花粉粒, 此时绒毡层完全解体, 只剩下表皮和纤维层。

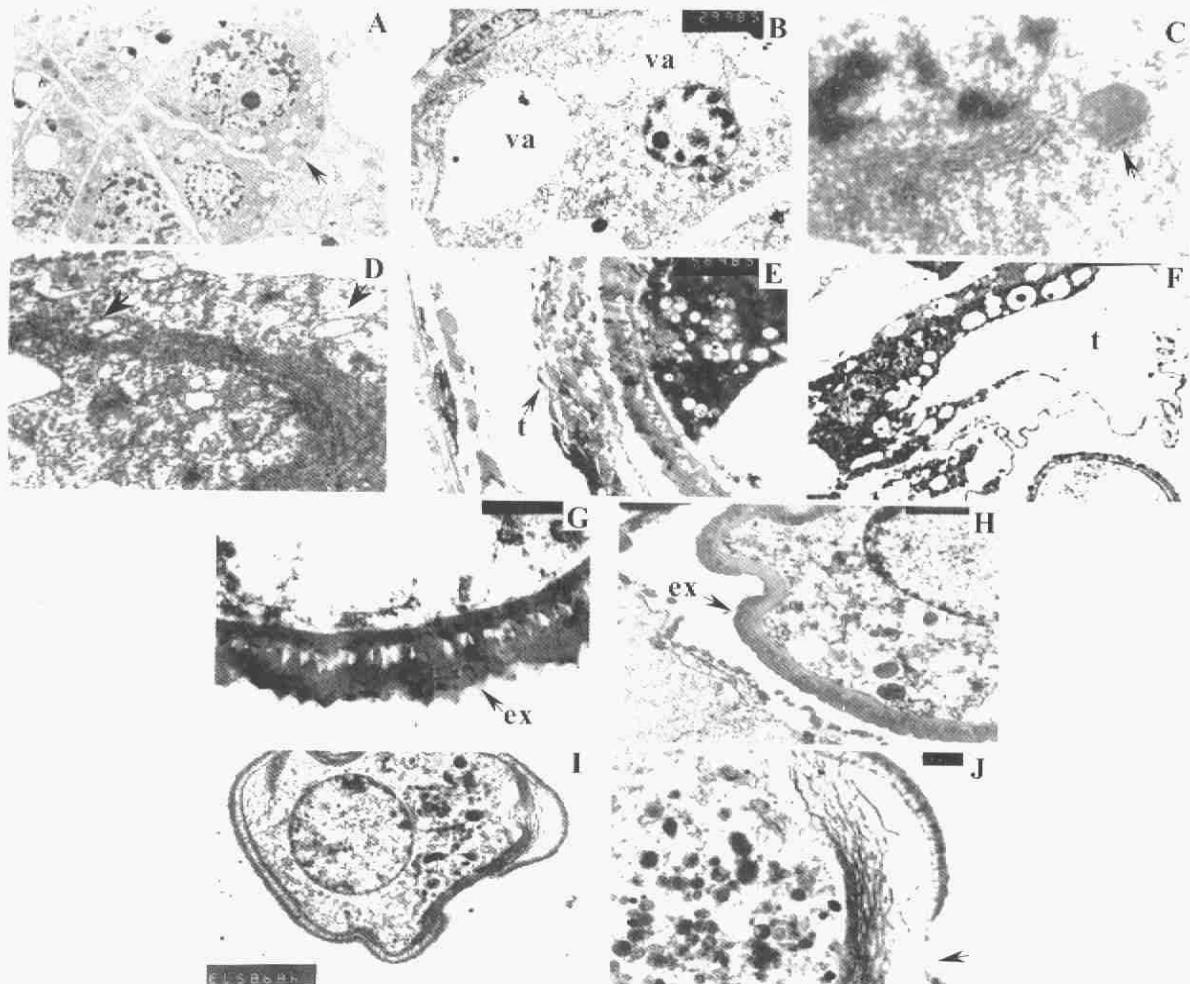
2.1.2 不育系8A雄配子发育过程

在四分体之前, 不育系与保持系无明显差异, 能进行正常减数分裂。四分体时期, 不育系绒毡层细胞开始膨大, 液泡化更加明显, 这在电镜观察时可得到

进一步证实。单核居中期, 不育系绒毡层细胞径向异常膨大, 高度液泡化并侵入药室, 此时绒毡层细胞染色能力很弱(图1:E)。单核靠边期开始, 不育系花药绒毡层细胞进一步径向膨大, 导致花药内膜收缩, 药室狭窄, 使小孢子受挤压呈不规则状, 被压缩成一团物质, 随后绒毡层细胞也解体, 同时花粉粒开始裂解(图1:F)。

2.2 不育系8A和保持系8B雄配子发育过程的超微结构特征比较

保持系8B和不育系8A在四分体之前没有发现明显差异, 绒毡层细胞和花粉母细胞能够正常发育, 它们的细胞质均比较稠密, 含有大量的细胞器(图2:A)。与保持系8B相比, 不育系8A的四分体



A. 8B减数分裂时期绒毡层细胞; B. 8A四分体时期绒毡层细胞, va为空泡; C. 8B花粉粒单核早期绒毡层细胞, 线粒体正常(箭头所指); D. 8A花粉粒单核早期绒毡层细胞, 线粒体空泡化(箭头所指); E. 8B花粉粒单核晚期绒毡层细胞; F. 8A花粉粒单核晚期绒毡层细胞异常膨大, t为绒毡层; G. 8B单核晚期花粉粒外壁, ex为花粉外壁; H. 8A单核晚期花粉粒外壁; I. 8B单核晚期花粉粒; J. 8A单核晚期花粉粒开始裂解(箭头所指)。

A. 8B tapetal cells (arrowhead) in mitosis stage; B. 8A tapetal cells in tetrad stage, many vacuolation (va); C. 8B tapetal cells in early uninucleate pollen stage, normal mitochondria (arrowhead); D. 8A tapetal cells in early uninucleate pollen stage, vacuolated mitochondria (arrowhead); E. 8B tapetal cells (arrowhead) in late uninucleate pollen stage; F. 8A tapetal cells (t) swelled abnormally in late uninucleate pollen stage; G. 8B pollen exine (ex) in late uninucleate stage; H. 8A pollen in late uninucleate stage; I. 8B pollen in late uninucleate stage; J. 8A pollen cell starting to rupture (arrowhead) in late uninucleate stage.

图2 甜椒胞质雄性不育系和保持系配子发育过程的超微结构特征

Fig. 2 The ultrastructure of male gametophyte development of the sterile and maintainer lines in sweet pepper

都很正常,无明显差异;不育系从四分体开始呈现特异组织的不正常,8A 的绒毡层细胞(图 2: B)比 8B 的绒毡层细胞空腔更明显,但结构还很完整。

单核小孢子时期,保持系 8B 和不育系 8A 之间不论是绒毡层细胞还是单核花粉粒都存在明显的差异。单核花粉粒早期,不育系 8A 的线粒体发生形态改变开始空泡化,内质网和细胞核不正常(图 2: D),而保持系 8B 的线粒体、内质网以及其它细胞器很正常(图 2: C)。单核花粉粒晚期,不育系 8A 绒毡层细胞径向膨大(图 2: F);而保持系 8B 的绒毡层细胞还比较正常,结构较完整(图 2: E)。

不育系 8A 在形成双核之前,绒毡层细胞基本裂解,花粉粒外壁比较光滑,无孢粉素物质包围(图 2: H),有些花粉粒能被观察到从乳突处裂解的迹象(图 2: J)。保持系 8B 在花粉粒双核期,绒毡层细胞明显变薄并出现空腔,但结构还较完整;此时的花粉粒外壁粗糙,覆盖一层孢粉素等物质(图 2: G),最终形成形态正常的成熟花粉粒(图 2: I)。

3 讨论

细胞学研究表明,不同作物的细胞质雄性不育系的花粉败育时期和方式多种多样^[6]。已有的辣椒胞质雄性不育雄配子发育研究结果存在明显分歧。吴鹤鸣^[5]、耿三省^[7]等用石蜡切片技术研究辣椒细胞质雄性不育系的结果表明败育发生在四分小孢子形成以前,由于绒毡层细胞高度液泡化挤压小孢子母细胞,致使小孢子母细胞不能正常进行减数分裂,不能形成正常的四分小孢子。而 Horner^[3]、Hirose^[4]的研究结果则认为辣椒细胞质雄性不育系小孢子母细胞能正常进行减数分裂,可以形成四分小孢子,败育发生在小孢子发育后期,但没有明确败育的具体时期和特征。笔者观察到甜椒细胞质雄性不育系雄配子败育发生在四分体之后,单核居中期不育系的绒毡层细胞异常膨大并伸进药室,挤压花粉粒,同时绒毡层细胞提前降解,致使不育系的雄配子在双核花粉粒形成之前就完全裂解。

很多研究表明绒毡层在花粉发育过程中扮演重要的角色,它为花粉成熟提供各种蛋白和营养。在小孢子发育进程中,当绒毡层发育出现异常,如提前裂解时,小孢子不能正常发育。正如 Ku 等^[8]观察水稻温敏型雄性不育雄配子发育的超微结构时发现,由于不育系花粉粒表面没有来自绒毡层分泌的孢粉

素,致使不育系花粉粒外壁发育受阻,花粉粒因不能抵抗内部的压力而崩裂,本文结果与此一致(花粉粒在单核期就开始裂解)。另外,我们通过超薄切片电镜观察发现甜椒胞质雄性不育系绒毡层细胞线粒体在花粉粒形成双核之前就出现不规则的空泡化,而同时期保持系绒毡层细胞线粒体结构正常,两者存在明显差异,类似线粒体结构的改变, Hernould 等^[9]研究烟草雄性不育工程突变株和 Ku 等^[8]研究水稻雄性不育系雄配子发育过程也都观察到,这说明细胞质雄性不育的遗传缺陷可能与线粒体形态的改变有关。

参考文献:

- [1] 王述彬,赵华渝,刘金兵,孙洁波,丁犁平. 辣(甜)椒胞质雄性不育系杂种优势利用及其制种技术[J]. 江苏农业学报, 2002, 18(3): 143—146.
- [2] Martin J, Crawford J H. Several types of sterility in *Capsicum frutescens* [J]. *Pro Am So Horti Sci*, 1951, 57: 335—338.
- [3] Horner H. Microsporogenesis in normal and cytoplasmic male sterile pepper [J]. *Am J Bot*, 1973: 60.
- [4] Hirose T, Fujimc 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]. *J Jpn Soc Hortic Sci*, 1981, 50: 66—70.
- [5] 吴鹤鸣,余建明,周邢扬,陆维忠,赵华渝.羊角椒雄性不育系保持系的细胞学观察[J].江苏农业学报,1988,4(2): 35—38.
- [6] 李桂花,张衍荣,曹健,黎国喜.雄性不育在十字花科蔬菜中的研究进展[J].江西农业大学学报,2003,25(2): 181—186.
- [7] 耿三省,王志源,蒋健箴,沈火林.辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学观察[J].园艺学报,1994,21(2): 165—169.
- [8] Ku S J, Yoon H J, Suh H S, Chung Y Y. Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum [J]. *Planta*, 2003, 217: 559—565.
- [9] Hernould M, Suharsono, Zabaleta E, Carde J P, Litvak S, Araya A, Mouras A. Impairment of tapetum and mitochondria in engineered male-sterile tobacco plant [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 499—508.