

西瓜隐性核型雄性不育两用系的细胞学研究^{*}

张 显, 王 鸣, 马建祥, 张进升, 杨建强

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对西瓜DT2-1 隐性核型雄性不育系的花药发育过程进行了细胞学观察。结果表明, 不育株花药发育在孢子母细胞减数分裂前期, 小孢子母细胞减数分裂异常, 不能形成四分体; 药室内壁、中层、绒毡层细胞无明显界限, 绒毡层细胞异常、多层、体积小、排列紧密, 影响绒毡层细胞与小孢子母细胞之间物质、能量和信息的传递, 导致四分体不能正常分离产生四分小孢子, 进而不能形成正常的花粉粒而导致败育。

[关键词] 西瓜; 隐性核型雄性不育; 花药发育

[中图分类号] S651.01

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)01-0071-04

核型雄性不育性在高等植物中广泛存在, 植物核型雄性不育在育种中具有重要的应用价值^[1]。据联合国粮农组织(FAO)统计, 1998 年我国西瓜总面积 131 万 hm^2 , 每年需杂交种子 131 万 kg ^[2], 而采用人工授粉、套袋等措施, 不仅费工、费时, 制种成本高, 而且种子纯度难以保证, 直接影响育种单位和生产者的利益。从 1962 年 Watts^[3] 用辐射法获得西瓜雄性不育株后, 西瓜雄性不育系的选育与利用引起了人们的关注。1986 年, Love 等^[4] 通过控制授粉将 Watts 辐射获得的光滑无毛不育性从二倍体转育到四倍体; 1988 年, 夏锡桐等^[5] 报道在龙蜜 100 号西瓜自交后代中发现了 1 对隐性基因控制的 G17AB 西瓜雄性不育材料; 1991 年, 刘寅安等^[6] 对 G17AB 进行了转育与利用; 李茜等^[7] 于 1993 年发现了由 1 对隐性基因控制的雄性不育材料; 王伟等^[8] 1996 年报道在从美国引进的品种 Mikylee 中, 发现了 S351-1 雄性不育材料, 并初步进行了细胞分析; 刘海河等^[9] 1997 年对西瓜 G17AB 雄性不育的小孢子发生进行了细胞观察。本研究以西北农林科技大学园艺学院蔬菜所从美国引进的种质资源材料“Sugarlee”中发现的雄性不育株, 经系统选育成的雄性不育两用系 DT2-1 为试材, 对其细胞学发育过程进行了观察比较, 并对其败育机制进行了探索, 以期对 DT2-1 的进一步研究和利用提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验用西瓜隐性核型雄性不育两用系为西北农

林科技大学选育的 DT2-1 西瓜雄性不育两用系。

1.2 方 法

2002-03-09 将材料浸种催芽后在温室育苗, 04-12 定植于大棚, 5 月上旬花开时根据田间形态学观察及雄花发育状态鉴别不育株与可育株, 分别从不育株和可育株的生长顶部采集幼小花蕾, 分类取样。将取样材料按大小分成 5 级, 用镊子剥掉花萼及花瓣, 露出花药, 放入卡诺固定液(酒精 15 mL/醋酸 5 mL)中, 用注射针管抽气 2~3 次, 装入洗净的青霉素小瓶中, 贴上标签, 注明可育或不育以及大小分级, 固定 24 h, 倒去固定液, 加入质量分数 0.5% 苏木精液染色 3 d, 以材料的颜色与染液的颜色相同为宜, 倒去染液, 用蒸馏水浸洗 3 次, 待洗液中无浮色时加入自来水使材料返蓝, 经蒸馏水脱水, 用体积分数 35%, 50%, 60%, 70%, 85%, 95%, 100% I, 100% II 梯度酒精脱水 1 h。用 1/2 100% 酒精+ 1/2 二甲苯、100% 二甲苯 I、100% 二甲苯 II 各 1 h 进行透明, 用 1/2 二甲苯+ 1/2 石蜡和石蜡 I、石蜡 II、石蜡 III 各 2 h 进行浸蜡。对材料与溶蜡进行包埋, 然后进行修块和切片、粘片, 用铁矾苏木精染色, 经脱蜡、复水、媒染、水洗、染色、水洗、分色、水洗、脱水、透明后用加拿大树胶封固。用 Olympus BH-2 光学显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 可育株与不育株的形态特征

可育株雄花花瓣大, 花药大且饱满, 成熟时表面明显可看到有花粉散出, 有蜜腺。不育株雄花很小,

^{*} [收稿日期] 2004-02-23

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2000SM13); 国家“863”高技术发展计划项目(2001AA241174)

[作者简介] 张 显(1961-), 男, 陕西扶风人, 研究员, 主要从事蔬菜作物育种及生物技术研究。

花丝很短,花药小而干瘪,无花粉散出,无蜜腺。

2.2 可育株小孢子的发育过程

2.2.1 造孢细胞期 取幼小花蕾纵切,由外到内依次可看到萼片、花瓣和雄蕊突起,雄蕊突起最外层是表皮细胞,以内是几个体积较大的孢原细胞。孢原细胞平周分裂外层形成周缘细胞,内层形成造孢细胞。周缘细胞经平周分裂形成纤维层、中层和绒毡层。造孢细胞经几次分裂形成小孢子母细胞(图1)。

2.2.2 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,核仁着色深,由外向内可清晰看到表皮、纤维层、中层和绒毡层。表

皮纤维层和中层细胞体积小、扁平、核小、着色浅,绒毡层细胞体积大,染色深,富含营养(图2)。

2.2.3 四分体时期 小孢子母细胞减数分裂形成的四分小孢子聚在一起,由胼胝质包被,每个小孢子有一个着色深且体积大的核,小孢子母细胞减数分裂不同步,同一花药小孢子母细胞在发育上也不完全同步,绒毡层细胞开始退化,中层细胞开始解体(图3)。

2.2.4 单核小孢子期 包被于四分体外的胼胝质壁溶解消失,释放出4个单核小孢子。小孢子有一个较大的液泡,呈不规则形状,绒毡层解体(图4)。

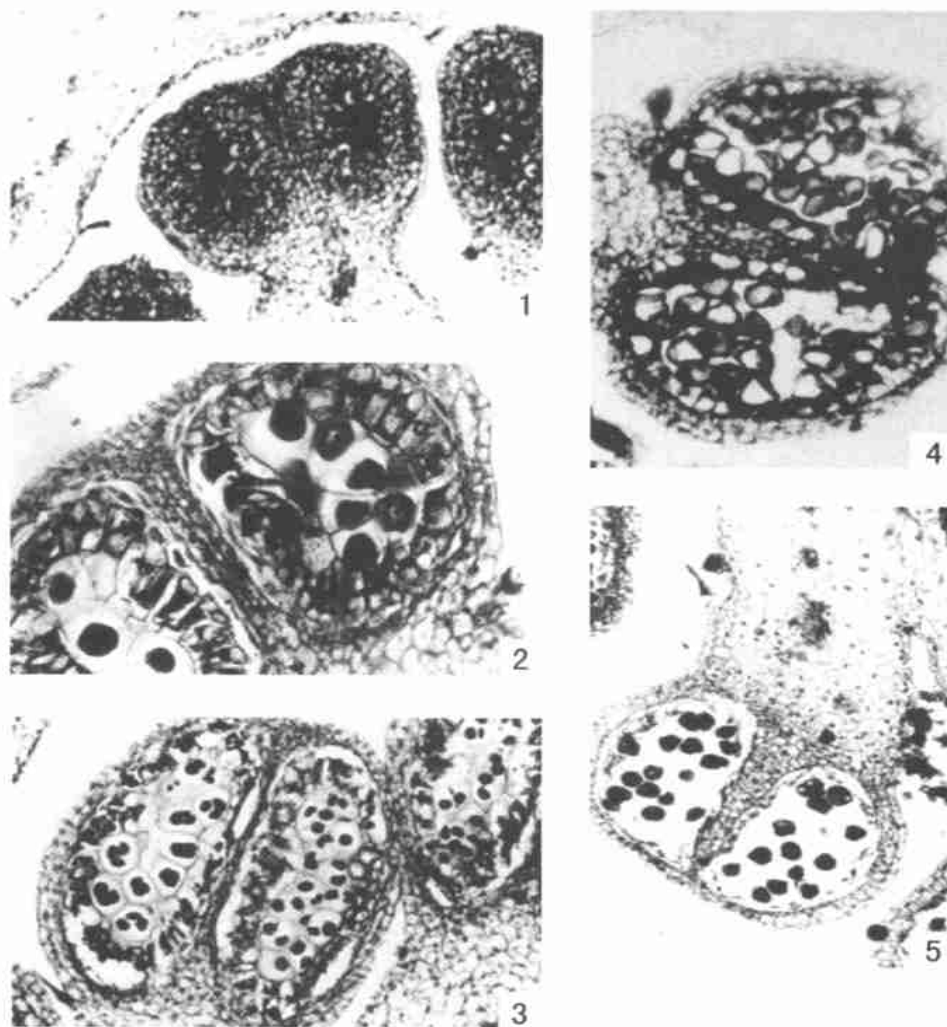


图1~5 可育株小孢子的发育过程

1. 造孢细胞期, ×330; 2. 小孢子母细胞期, ×660; 3. 四分体时期, ×660; 4. 单核小孢子期, ×660; 5. 花粉粒成熟期, ×330

Fig 1-5 Normal plant microspore development process

1. Sporogenous Cell Stage, ×330; 2. Microsporocyte Stage, ×660; 3. Tetrad Stage, ×660; 4. Monokaryon Microspore Stage, ×660;

5. Pollen grain Middle dough stage, ×330

2.2.5 花粉粒成熟期 单核小孢子进行一次有丝分裂,形成二核细胞花粉,其中一个形成生殖细胞,

另一个形成营养细胞,小孢子囊壁只剩下表皮和内层,相邻孢子囊壁交接处开裂,为花粉的散出打开通

道(图5)。

2 3 不育株小孢子的发育过程

2 3 1 造孢细胞期 不育株与可育株花药细胞结构特征相似, 无明显差异(图6)。

2 3 2 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, 核仁着色深。表皮、纤维层、中层和绒毡层之间界限不明显, 绒毡层细胞多层、体积小、形状不规则, 也不径向伸长(图7)。

2 3 3 多核细胞期 小孢子母细胞减数分裂异常,

只进行核分裂, 而不进行细胞质分裂, 形成多核现象。此期多核细胞周围的多层绒毡层细胞核消失, 细胞质稀薄不着色, 开始退化(图8)。

2 3 4 多核细胞解体期 位于小孢子囊中央的多核细胞开始解体, 不能形成单核孢子, 小孢子囊内的绒毡层细胞退化, 表皮和纤维层细胞变圆且大, 排列不规则, 小孢子囊向内收缩(图9)。

2 3 5 花药败育终期 小孢子囊内的多核细胞完全解体消失, 小孢子囊也凹陷向内收缩, 解体的绒毡层细胞和多核残骸形成一条染色极深的带(图10)。

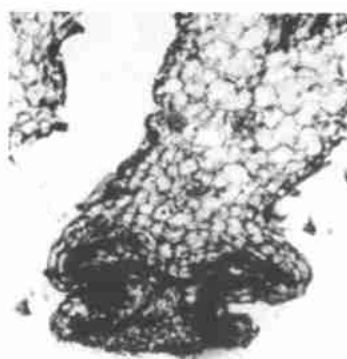
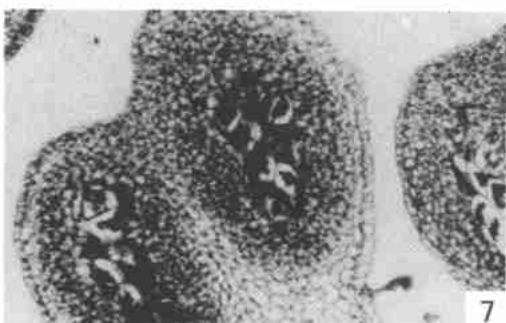


图6~10 不育株小孢子的发育过程

6 造孢细胞期, $\times 330$; 7 小孢子母细胞期, $\times 660$; 8 多核细胞期, $\times 330$; 9 多核细胞解体期, 同一花药裂瓣中2个败育的花粉囊呈“ $\times$ ”型, $\times 330$; 10 花药败育终期, 同一花药的2个裂瓣横切, 各裂瓣均已解体, $\times 330$

Fig 6- 10 Dysgenesis plant microspore development process

6 Sporogenous Cell stage, $\times 330$; 7 Microsporocyte Stage, $\times 660$; 8 Apocyte stage, $\times 330$; 9 Apocyte disintegration stage, the two abortion Pollen Sacs are arranged in the shape of “ $\times$ ” in the same anthe, $\times 330$;
10 Pollen abortion diakinesis lobe in the same anther shows the degeneration of each lobe, $\times 330$

3 讨 论

3.1 西瓜核型雄性不育小孢子的败育时期与方式

Laser 等^[10]根据大多数被子植物的雄性不育研究结果指出,双子叶植物的小孢子败育多发生在造孢细胞时期到四分体时期。许多雄性败育的研究中都发现绒毡层细胞畸形肥大,充塞药室,挤压小孢子,最终导致小孢子败育^[11,12]。刘海河等^[9]报道,西瓜核型雄性不育的小孢子发生于小孢子母细胞减数分裂末期,因小孢子母细胞只能进行核分裂而不能进行胞质分裂,故不能形成四分孢子。本试验观察结果与刘海河等的报道类似。

3.2 绒毡层发育与小孢子败育的关系

绒毡层细胞的主要生理功能是产生和运输小孢子发育所必需的酶、生长素和营养物质,为小孢子发

育提供营养物质。多数研究者认为:由于绒毡层畸形肥大,充塞药室,挤压小孢子,导致小孢子败育。刘海河等^[9]在西瓜雄性核不育小孢子发育过程中发现,绒毡层细胞多层、体积小,这必然会影响绒毡层细胞与小孢子母细胞之间营养物质的传递,由此导致小孢子败育。

本试验对DT2-1不育株与其同系可育株的绒毡层细胞进行了观察发现,不育株绒毡层细胞多层、体积小,与正常可育株明显不同,不仅影响绒毡层细胞与小孢子母细胞之间的营养物质传递,同时影响绒毡层合成和分泌胼胝质酶。此外,分解四分体时包被在小孢子外的胼胝质导致小孢子细胞减数分裂异常,这些因素都会引起雄性不育。绒毡层异常是小孢子败育的主要原因,但可能还受其他生理因素或遗传因素影响,这尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kaul M L H. Male sterility in higher plants[M]. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988
- [2] 吴进义, 陈璞华, 谢锡林. 西瓜雄花退化系华知A的育成在西瓜育种上的应用前景[J]. 中国西瓜甜瓜, 2001, (2): 8-9
- [3] Watts V M. A marked male-sterile mutant in watermelon[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1962, 81: 498-505
- [4] Love S L, Rhodes B B, Nugent P E. Controlled pollination transfer of a nuclear male-sterility gene from a diploid to a tetraploid watermelon line[J]. Euphytica, 1986, 35: 633-638
- [5] 夏锡桐, 刘寅安. 西瓜G17AB雄性不育两用系选育[J]. 沈阳农业大学学报, 1988, 19(1): 9-13
- [6] 刘寅安, 陈安邦. G17AB雄性不育两用系的转育和利用[J]. 中国西瓜甜瓜, 1991, (2): 6-10
- [7] 李茜, 黄河勋. 短蔓雄性不育西瓜利用研究初报[J]. 广东农业科学, 1993, (5): 23-24
- [8] 王伟, 林德佩, 谭敦炎, 等. S351-1西瓜雄性不育的研究初报[J]. 新疆农业大学学报, 1996, 19(1): 15-18
- [9] 刘海河, 马德伟, 张彦萍, 等. 西瓜核型雄性不育小孢子发生的细胞学观察[J]. 中国西瓜甜瓜, 1998, (2): 12-15
- [10] Laser K D, Iersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperm s[J]. Botany Review, 1972, 38: 425-454
- [11] 孙日飞, 吴飞燕, 司家钢, 等. 大白菜核型雄性不育两用系小孢子发生的细胞形态学研究[J]. 园艺学报, 1995, 22(2): 153-156
- [12] 耿三省, 王志源, 蒋健箴, 等. 辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(2): 165-169

Cytological studies on recessive nuclease male sterile lines in watermelon

ZHANG Xián, WANG Ming, MA Jiàn-xiàng, ZHANG Jīn-sheng, YANG Jiàn-qìàng

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Cytological process of anther development of recessive nucleus watermelon male sterile line accession DT2-1 was studied by using microscopy. The results showed that the microsporecyte meiosis was abnormal and fail to form microspore tetrad. There was no evident boundary between tapetum cell, middle lamella and inner wall of PMC. In addition, the tapetum was abnormal with multiple layer and the size became smaller and pressed tightly. This abnormal deposition influenced the exchange of material, energy and information between tapetum and microsporecyte and caused degeneration of meiocytes in sterile anthers.

Key words: watermelon; recessive nucleus male sterile; anther development