

## 黄金梨雄性不育的细胞学研究

胡静静,赵静,沈向

(山东农业大学园艺科学与工程学院,山东泰安271018)

**摘要:**为研究黄金梨雄性不育的早期表现和细胞学特征;采用石蜡切片法,观察分析了黄金、爱宕和圆黄(对照)的花粉形成过程中,花药和小孢子发育过程的细胞学特征。黄金梨花粉败育主要发生在小孢子阶段单核晚期;花粉败育的主要原因是四分体分离后形成单核花粉细胞时期,绒毡层提前解体,花药维管束细胞木栓化,二者共同导致营养供应困难,致使花粉败育。而对照可育品种花粉经由小孢子阶段很快发育成熟。

**关键词:**黄金梨;雄性不育;小孢子;细胞学

中图分类号:S661.2

文献标识码:A

论文编号:2009-2408

### Cytological Study on Male Sterility In *Pyrus Pyrifolia* Naka

Hu Jingjing, Zhao Jing, Shen Xiang

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an Shandong 271018)

**Abstract:** Male sterility and cytological features of *Pyrus pyrifolia*(Burm. F.) Nakai 'Whangkeumbae' were studied. Cytological features of anther and microspore from Whangkeumbae, Atago and Wonhwang in the formation process were analyzed by paraffin sectioning. The results showed that abortion mainly occurred in the late microspore stage of monocyte. Both disintegration of tapetum in advance and cork-based vascular cells in the stage of monocyte after the separation of tetrasporophytes contributed to be short of nutrition coordination. That was the dominant reason that resulted in pollen abortion.

**Key words:** Whangkeumbae; male sterility; microspore; cytology

### 0 引言

梨是典型的配子体型自交不亲和果树,生产中必须配置授粉品种和人工辅助授粉,才能获得应有的产量和品质<sup>[1]</sup>,这就要求至少2个或2个以上优良品种互相进行授粉来保证生产效益<sup>[2]</sup>。加之梨的花粉直感现象明显,不同的授粉组合不仅对坐果率会产生显著影响,同时也会给果实品质带来本质性的变化,因此,了解梨品种的花粉数量、育性具有重要意义。

黄金梨(*Pyrus pyrifolia*(Burm. F.) Nakai 'Whangkeumbae')是由韩国园艺试验场罗州支场用新高('Niitaka')×二十世纪('Nijisseiki')杂交育成的品种,

1984年定名<sup>[3]</sup>。袁德义等<sup>[4]</sup>鉴定结果表明,黄金梨无正常花粉或花粉极少,雄性不育。雄性不育是被子植物中一种普遍的现象,它指雌性生殖器官正常,但雄性生殖器官丧失生育能力,不能产生功能性花粉的现象,包括花粉和孢子的败育,雄蕊群的畸形、抑制、消失、不开裂或转化等<sup>[5]</sup>。

花粉发育经历了孢原细胞、造孢细胞、小孢子母细胞、四分体、单核小孢子、花粉等阶段。在这一发育过程中任何一个阶段出现异常都将产生败育花粉,最终导致雄性不育<sup>[6-7]</sup>。目前,关于黄金梨花粉败育机制报道极少。作者以黄金梨为试材,与可育品种做对照,

基金项目:国家科技支撑计划项目(2008BAD92B08)。

第一作者简介:胡静静,女,1982年出生,山东青岛平度人,硕士,研究方向:果树生物学,通信地址:271018 山东农业大学园艺科学与工程学院, E-mail: tie-shu@163.com。

通讯作者:沈向,男,1966年出生,山东泰安人,教授,博士,研究生导师,研究方向:果树生物学。通信地址:271018 山东农业大学园艺科学与工程学院, Tel:0538-8249140, E-mail: shenx@sdau.edu.cn。

收稿日期:2009-11-18,修回日期:2009-12-08。

探讨黄金梨花粉败育的过程和途径,为分析不育材料的遗传背景及其稳定性提供细胞学依据,对不育材料的利用和授粉品种的选择,提高果实产量和品质都具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料采自曲阜吴村梨园内,位于东经117°3'5.9",北纬35°45'48.6",园土为沙壤土,树龄6年,定植株行距为2 m×3 m,管理良好。供试品种为黄金,对照品种爱宕和圆黄,配置比例4:1,自2009年3月7日花芽萌动前开始取样至4月6日初花期为止,定期采集短枝顶花芽,每7天取样一次,每次取花芽20个,剥除鳞片后,立即用FAA(70%酒精90 mL+冰醋酸5 mL+福尔马林5 mL)固定液固定,抽负压,24 h后,转入70%酒精低温保存备用,采用石蜡切片法制成永久切片。

### 1.2 制片方法

采用压片法制作镜检材料:参照李正理<sup>[8]</sup>的方法,配制醋酸—洋红溶液,45%醋酸水溶液50 mL煮沸后加入0.5 g洋红粉,再煮1~2 min,放入一小铁钉,使染液具铁质,可增进染色性能,经滤纸过滤后备用。

从固定液中取出花芽小心剥去花萼和花冠,用镊子取出花药,放入已滴有醋酸洋红的载玻片上,用镊子将花药轻轻压碎,盖上盖玻片,在盖玻片上再覆一张滤纸,用拇指缓慢用力压片,直至完全压平且均匀为止,这时将载玻片置于Olympus-BHS显微镜下观察。根据观察结果,确定花粉败育关键期,制作石蜡切片。

石蜡切片法:剥去花芽鳞片、花被,将花序中的单个花朵分离,将单花经不同浓度梯度的酒精脱水,二甲苯透明及石蜡包埋处理,用国产BCQ-202型手摇切片机切片,厚度为6 μm,番红-固绿对染<sup>[8]</sup>,中性树胶封固,制成永久切片。Olympus-BHS型显微镜观察,DP71摄影机照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄金梨花粉发育过程的观察

3月7日,黄金梨花芽鳞松动,芽尖稍开裂,进入萌芽期。3月15日,花芽鳞片绽开,鳞片间露白,鳞片变浅褐色,将采集的梨花芽制作压片,观察到黄金梨四分体外被胼胝质壁(图版9,10),与对照品种花粉发育形态(图版11,12)一致,此时期花粉发育形态正常。3月22日,黄金梨花芽膨大,芽鳞开裂,鳞片间露白,此时期四分体周围的胼胝质壁分解,分裂成为单核小孢子,黄金梨的单核小孢子体积较小,壁薄,呈多面球形,细胞质均匀,其染色比对照品种浅,细胞核居于中央,为单核花粉粒(图版13,14);两个对照品种的单核小孢

子体积较大,细胞质染色较深,细胞核居于中央(图版15,16)。3月31日,黄金梨进入花蕾期,处于小铃铛花期,此时期压片观察到花粉粒细胞质染色仍然很浅,细胞萎缩变小(图版17,18),而对照品种的花粉数量较多,细胞体积较大,比黄金梨花粉细胞染色深,细胞核居中,染成较深颜色(图版19,20)。4月7日黄金梨进入盛花初期,进入成熟花粉期,可以明显观察到黄金梨花粉细胞的细胞壁皱缩(图版21,22),而对照品种的花粉数量明显多,细胞体积仍较大,细胞核靠近边缘(图版23,24)。两个对照品种的成熟花粉的形状有所不同,爱宕花粉形状呈圆形,圆黄花粉形状大多呈三角形。从压片的观察结果看出,黄金梨花粉在3月31日时,已经败育,所以将3月15日和3月22日的梨花发育材料做常规石蜡切片。

### 2.2 黄金梨小孢子败育时期的细胞学特点

梨花含多枚雄蕊,每花药由4个花粉囊和药隔构成。从石蜡切片中可以看出,梨花花药横切面呈蝶形。黄金梨花粉在四分体时期(图版1),外面有胼胝质包围,并能观察到细胞核,发育形态正常。黄金梨绒毡层在整个发育过程中形态变化较大,在四分体时期和小孢子单核中期细胞(图版2)呈长方形,排列整齐,与对照品种的绒毡层细胞发育形态一致且正常(图版1~4)。绒毡层是发育中花粉的滋养组织,由于它包围着小孢子母细胞,任何代谢物都必需通过绒毡层细胞达到小孢子母细胞。绒毡层细胞本身解体后的物质也提供花粉发育之用。

在小孢子阶段(图版2),观察到黄金梨花粉具有正常的细胞核,且大部分细胞核位于花粉粒中央,少数细胞核位于其边缘,花粉处于小孢子单核中期,从石蜡切片中观察到黄金梨花药维管束开始木栓化,而且从石蜡切片中看出黄金梨花药内小孢子的数量大约为12个左右,两个对照品种花药内小孢子的数量大约为24个,其数量明显比黄金梨花药内小孢子的数量多。从3月22日材料的石蜡切片中,观察到黄金梨小孢子的细胞核大部分处于边缘(图版5、6),少数小孢子细胞核消失,处于小孢子单核晚期,该时期绒毡层细胞出现退化现象,排列松散,形状变得不规则,明显液泡化,与对照品种(图版7、8)相比绒毡层破坏较早。这与边卫东研究黄金梨花药的绒毡层细胞在整个发育过程中未出现增生、体积明显增大、液化等异常现象,四分体细胞及四分体分离后的早期花粉细胞均无细胞核有明显差异。

绒毡层提早破坏不能提供适当营养物给发育中的花粉,或者由于营养从绒毡层到花粉间存在运输障

碍,或者营养不能运到绒毡层,使营养不协调,造成花粉败育。而对照品种的花粉很快发育成熟。从压片中,观察到黄金梨花药内花粉粒数量很少(图版9、10、13、14),表现出雄性不育的空囊花药,而观察到对照品种花粉成熟后的数量明显多(图版11、12、15、16)。

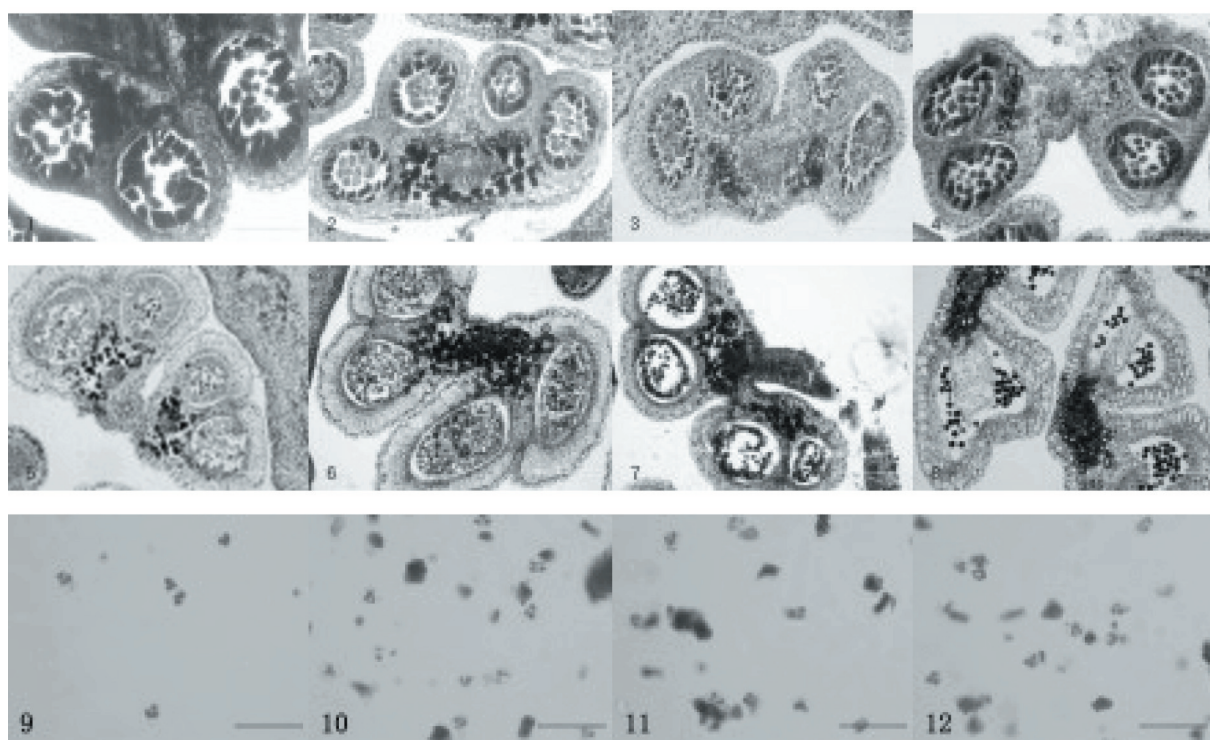
### 3 讨论

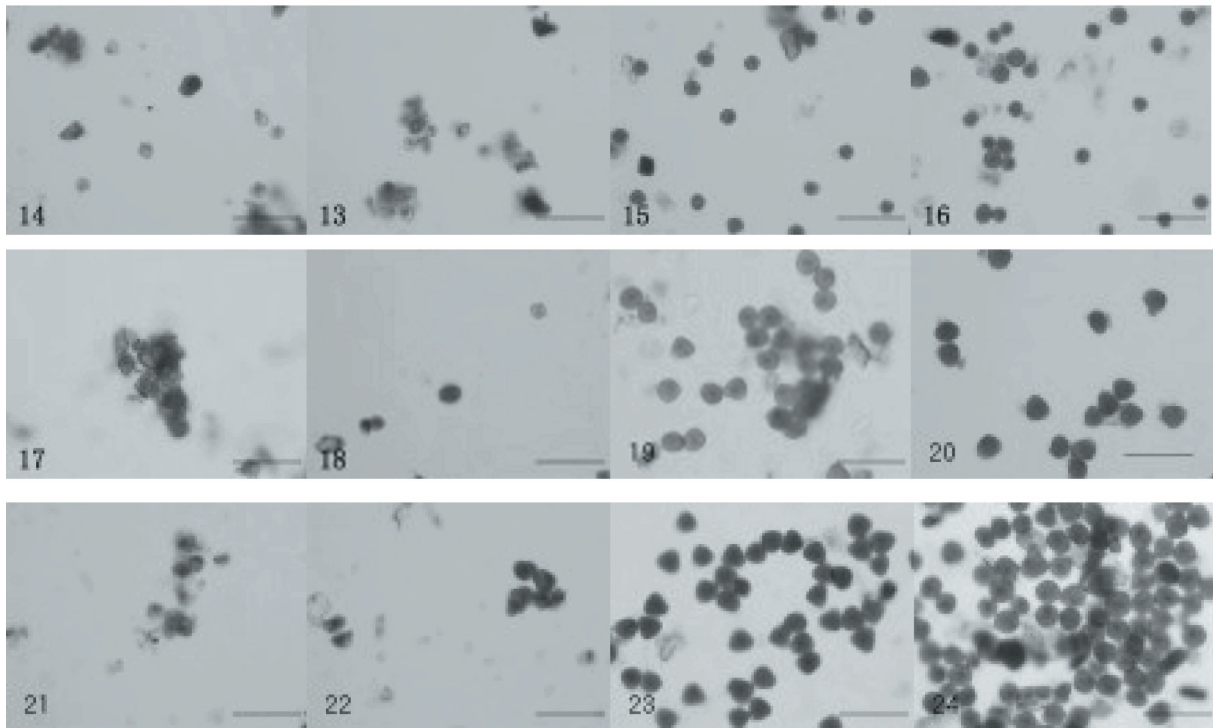
目前大量研究已表明,雄性不育是由基因或染色体控制,植物雄性不育性状是育性基因在一定时空上表达以及内外因子对这种表达综合影响的结果<sup>[4]</sup>。植物的育性是由一系列基因控制的生理过程、生化反应、形态构建的最终结果<sup>[9]</sup>。该试验观察到的形态解剖结果是不育基因表达的产物。Laser<sup>[10]</sup>等在其被子植物雄性不育的综述文章中指出,被子植物的花粉败育主要发生在四分体以前,单子叶植物多数在单核至双核期,双子叶植物多发生在四分体至数在单核至双核期小孢子形成期。试验结果表明,黄金梨花粉败育开始于小孢子单核晚期,在双子叶植物中应该较为罕见。

对于雄蕊发育来说,在发育的任何阶段如果发生败育都将导致雄性不育,植物雄性败育大致可以分为以下几种类型<sup>[11]</sup>:花药退化型,即在胞原细胞分化期产生异常,不能形成花粉囊或花药畸形高度退化;花粉败育型,即在花粉母细胞期发生异常,不能正常进行减数分裂形成小孢子;单核败育型,即在四分体至单核花粉期时发生异常;绒毡层结构异常类型,即在绒毡层发育

过程中产生异常。不同植物导致雄性不育的原因通常是由一到两种发育异常所引起<sup>[12-13]</sup>。作者通过大量观察认为,黄金梨雄蕊败育的主要类型是绒毡层发育异常类型。这与边卫东等<sup>[14]</sup>研究黄金梨花药的绒毡层细胞在整个发育过程中未出现增生、体积明显增大、液化等异常现象的结果有明显差异。

在花药造成花粉败育的原因除了小孢子发生和花粉发育过程出现问题外,提供营养的整个系统包括花丝和花药壁的各种组织出现问题也是极其重要的原因<sup>[15]</sup>。Kumar<sup>[16]</sup>等报道了(34±2)°C和(44±2)°C的高温导致了 *Tecomastans* 花粉不育是由于高温抑制了维管的分化,从而破坏了花药中生化途径使绒毡层发育不正常。可对多数植物来说绒毡层发育不正常是导致花粉败育的一个主要原因,绒毡层的主要功能是产生和输送给小孢子正常发育所必需的酶、生长素和营养物质,为花粉粒的发育和形成提供代谢所需要的物质,被称为小孢子发育的营养“供给者”<sup>[17]</sup>。此试验结果说明造成黄金梨花粉败育的原因是四分体分离后形成的早期花粉细胞,因绒毡层提前解体,花药维管束木栓化,造成营养不协调,致使花粉败育。袁德义<sup>[4]</sup>也指出新高系品种的雄性育性和绒毡层组织的发育与解体状况、花器官内的氨基酸及酶代谢三者之间有着密切关系。因此,进一步探讨研究花粉的营养物质传导形式以及其绒毡层败育的基因控制,从发育生物学的角度方面的了解梨花败育的原因。





1.黄金梨四分体小孢子2.黄金梨单核小孢子前期;3.圆黄单核小孢子前期;4.爱宕单核小孢子前期;5.6.黄金梨单核小孢子后期;7.圆黄成熟花粉;8.爱宕成熟花粉,2.个相邻的花粉囊连通;9.10.黄金梨四分体时期;11.圆黄四分体时期;12.爱宕四分体时期;13.14.黄金梨小孢子单核期;15.圆黄小孢子单核期;16.爱宕小孢子单核期;17.18.21.22.黄金梨成熟花粉;19.23.圆黄成熟花粉;20.24.爱宕成熟花粉。

图版说明1~8花药石蜡切片图(40×100),9~24花粉压片图(40×100)

### 参考文献

- [1] 郭艳玲,刘招龙,张绍铃.新高及爱宕梨雄性不育特性及其败育的细胞学研究.果树学报,2007,24(4):433-437.
- [2] 闰忠业,王升.梨授粉品种的选择与配置.北方果树,2002(3):21-21.
- [3] Shin L S, Kim W C, Hwang H S, et al. Achievements of pear breeding in Korea. Acta Hort ( ISHS), 2002,596:247-250.
- [4] 袁德义,谭晓风,张琳,等.新高系梨雄性不育的鉴定.园艺学报,2007,34(2):289-294.
- [5] 郭英超,朱美秋,孟永红,等.毛白杨雄株-D花药败育的细胞学观察.东北林业大学学报,2007,35(9):33-35.
- [6] 王艳杰,申家恒.柴胡大小孢子发生及雌、雄配子体发育.植物学通报,2007,24(3):425-432.
- [7] 白惠磊,张素丽,胡建芳.巨峰葡萄(*Vitis Labruscana* BAILEY)闭花受精机理的研究.中国农业大学学报,2007,12(2):27-33.
- [8] 李正理.植物切片技术.2版.北京:科学出版社,1987.
- [9] 袁德义,谭晓风,段经华,等.新高系梨雄性不育的生化分析,2008,28(3):6-10.
- [10] Laser K D, Lersten N K. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile ( CMS ) angiosperms. Botev, 1972, 38(3):425-454.
- [11] 梁春莉,刘孟军,赵锦.植物种子败育研究进展.分子植物育种,2005,3(1):117-122.
- [12] 郝晨,李云,姜金仲,等.四倍体刺槐大小孢子发生和雌雄配子体发育.北京林业大学学报,2007,29(5):12-17.
- [13] 康向阳,毛白杨.花粉败育机制的研究.林业科学,2001,37(3):35-40.
- [14] 边卫东,邓艳华,朱育贤,等.黄金梨胚珠、花粉发育及花粉败育过程的显微观察.果树学报,2006,23(2):290-292.
- [15] 郭艳玲,张绍铃,李六林,等.“新高”梨雄性不育与碳水化合物代谢研究.上海农业学报,2007,23(2):68-71.
- [16] Kumar R, Singh G. Investigation into the cause of sterility *Tecomastans* L.. Bull Soc Bot Fr Lett Bot, 1988:131-136.
- [17] 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观察.园艺学报,1994,21(2):165-169.