

# 玉米基因雄性不育系( $ms_2/ms_2$ )小孢子 败育的细胞学研究<sup>\*,\*\*</sup>

季良越 季洪强 罗福和 陈伟程  
刘宗华 胡彦民 黄西林 汤继华

(河南农业大学,河南郑州, 450002)

**提 要** 利用光镜和透射电镜对同一核背景的  $ms_2$  不育花药和正常可育花药进行了小孢子发育的细胞学比较观察。结果表明,  $ms_2$  不育花药小孢子在幼小孢子期至中小孢子期瓦解。小孢子从四分体释放后, 原外壁上没有孢粉素沉积, 花粉外壁不能发育。不育花药大多数绒毡层细胞在幼小孢子期显示出明显异常, 表现为质体、线粒体等细胞器退化, 内质网网络细而少, 液泡膜内陷吞噬细胞质, 细胞内侧没有乌氏体形成, 细胞质内出现大量沉积有浓染颗粒的大的囊泡状结构, 到中小孢子期绒毡层全面崩溃。本文还讨论了  $ms_2$  不育花药小孢子败育的可能原因。

**关键词** 玉米; 雄性不育; 小孢子; 绒毡层; 孢粉素; 花粉外壁

P. C. Cheng 等<sup>[4]</sup>报道用光镜和扫描电镜研究玉米  $ms_{10}$  基因雄性不育的小孢子败育过程, 指出在早液泡小孢子期绒毡层细胞液泡化, 细胞质降解, 从而导致小孢子在中液泡小孢子期败育, 药壁内层没有出现可育花药中的加厚现象。Greyson 等<sup>[5]</sup>报道用光镜、透射电镜和扫描电镜研究玉米  $ms_9$  雄性不育的花药发育细胞学, 结果表明, 不育小孢子的败育发生在减数分裂之前, 中胼胝质期花粉母细胞中出现吞噬液泡, 使母细胞完全失去细胞质。Albertsen 等<sup>[6]</sup>报道用光镜研究了玉米  $ms_1$ 、 $ms_2$ 、 $ms_{10}$  等 13 个基因雄性不育的小孢子败育特征, 指出  $ms_2$  雄性不育在减数分裂末小孢子染色体过早浓缩, 不形成小孢子壁, 绒毡层在四分体期后立即崩溃。由于只限于光镜观察, 对小孢子壁的发育、绒毡层降解等未作详细报道。

玉米  $ms_2$  不育基因与 T9—10a 易位引起的染色体重复缺失组建到一起, 育成了  $ms_2$  基因不育的双杂合保持系, 尽管双杂合保持系存在生活力弱等问题, 仍可望在生产上得到应用<sup>[2]</sup>。化学恢复是正在研究的保持核不育的另一途径, 即在不育系雄穗发育的特定时期, 喷撒复雄剂来达到保持核不育的目的, 因此, 本试验采用光镜和透射电镜对玉米  $ms_2$  雄性不育花粉败育的时期、特点以及败育的可能原因作深入研究。

## 1 材料和方法

将正常可育黄早四(MF)和回交六代并用双杂合体保持的黄早四  $ms_2$  不育系( $ms_2$ )分六期播于田间, 相邻两期间隔 4 天。第一期玉米雄穗成熟时, 把全部植株拔回室内, 固定花药。

\* 国家自然科学基金(批准号: 39270448)和省自然科学基金资助项目。

\*\* 电镜观察得到华中农业大学电镜室金小萍、瞿波的大力帮助。

收稿日期: 1995-03-14, 收到修改稿日期: 1996-09-25

固定前,从每朵小花中取1个花药,用醋酸洋红涂沫制片,镜检,以确定小孢子发育的时期。参照 Warmke(1977)<sup>[8]</sup>的分期标准,把小孢子发育分为九个时期:前胼胝质期、中胼胝质期、减数分裂期、四分体期、幼小孢子期、中小孢子期、单核小孢子晚期、双核花粉期和三核花粉期。一朵小花的另两个花药投入0.1M磷酸缓冲的3%戊二醛中固定,每个时期固定约10个花药。固定16小时后,用0.1M磷酸缓冲液漂洗花药,接着,用锇酸后固定,丙酮系列脱水,Epon 812树脂包埋,LKB V型超薄切片机切片,切片厚40~60 nm,切片用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,在JEDJ JEM-100CX I透射电镜下观察照相。

作光镜观察的花药用卡诺氏固定液固定,经各级乙醇脱水,石蜡包埋,普通手摇切片机切片,切片厚5~7 μm,达氏苏木精染色,达氏苏木精蕃红双重染色或甲苯胺蓝染色,在Olympus CH型显微镜下观察照相。

## 2 结果

在花粉母细胞减数分裂前,ms<sub>2</sub>花药花粉母细胞和药壁的发育与MF花药没差异,药壁包含表皮、内层、中层和绒毡层四层细胞,花粉母细胞从中胼胝质期以后分散在药囊四周。

**2.1 减数分裂期** ms<sub>2</sub>花药的母细胞减数分裂正常,绒毡层细胞也与MF花药一样,大多为双核(图版I-1)。但是,ms<sub>2</sub>花药绒毡层开始显示出某些异常,其核膜下陷,细胞壁与质膜之间没有MF花药中存在的浓染颗粒(图版I-2),少数绒毡层细胞细胞质开始液泡化。

**2.2 四分体时期** ms<sub>2</sub>花药花粉母细胞正常完成减数分裂,四个小孢子处于共同的胼胝质中。小孢子细胞器正常,质膜外形成片层或管状结构的原外壁,这些特征与MF花药没有区别。这一时期,我们没有观察到Albertsen<sup>[6]</sup>报道的ms<sub>2</sub>花药小孢子染色体浓缩的现象。至四分体末期,四分体胼胝质开始降解时,ms<sub>2</sub>花药小孢子原外壁上有深染物质沉积,但是没有MF花药中出现的基粒棒外壁结构(图版I-4)。

ms<sub>2</sub>花药绒毡层此时出现异常的平周分裂和斜向分裂,造成细胞形状不规则(图版I-3)。伴随四分体胼胝质的分解,绒毡层细胞内切壁药囊一侧沉积大量深染物质,从花药横切面观察,深染物质沿细胞内切壁断断续续排列,与小孢子原外壁表面的深染沉积形态相似(图版I-5),这可能是ms<sub>2</sub>花药四分体胼胝质分解的特殊产物,在MF花药的绒毡层内表面不存在这一现象。ms<sub>2</sub>花药少数绒毡层细胞在四分体末期降解。

**2.3 幼小孢子期** MF花药小孢子从四分体一释放,胼胝质还未完全溶解时,立即就形成了外壁,外壁已显示出覆盖层、基粒棒和基足层的结构(图版I-8)。ms<sub>2</sub>花药小孢子释放后,核膜有些内陷,仍未发现小孢子细胞器有明显异常,但是,小孢子外壁没有发育,仍停留在四分体时期原外壁的状态(图版I-6,7)。部分药囊小孢子从四分体释放后立即崩溃。

这一时期,ms<sub>2</sub>与MF花药绒毡层细胞质差异十分显著。MF花药绒毡层内切质膜药囊一侧布满前乌氏体,部分前乌氏体已发育为乌氏体,其上覆盖有浓染的孢粉素,中心是电子透明区(图版I-9)。MF花药绒毡层细胞的质体、线粒体清晰,内质网和高尔基体发达,内质网和高尔基体池内有浓染物质沉积,还出现由数圈内质网包围细胞质形成的同心圆膜状体系,上述特点表明MF花药绒毡层处于活跃地合成和分泌物质的状态(图版II-10,11)。这一时期,ms<sub>2</sub>花药绒毡层径向壁和内切壁也已解体,细胞质深染,但是,细胞质中质体、线粒体退化,内质网网络细而少,没有观察到高尔基体,液泡膜内陷吞噬细胞质,细胞内切质膜药囊一侧只出现少量前乌氏体,其上没有孢粉素沉积,值得注意的是,ms<sub>2</sub>花药绒毡层细胞质中

出现大量沉积有浓染颗粒的大的囊泡结构(图版 I-12,13),用苏丹 III 染色作光镜观察表明,这一时期不育花药绒毡层比正常花药的绒毡层含更多脂类物质。因此电镜中的浓染颗粒沉积可能为脂类。

**2.4 中小孢子期** MF 花药小孢子外壁迅速发育增厚,花粉孔发育完善,绒毡层细胞质保持深染,细胞器依然有功能,内切质膜药囊一侧布满乌氏体,小孢子外壁紧贴乌氏体,绒毡层和药囊腔液体的养分通过小孢子外壁上的间隙输入小孢子(图 I-14)。

$ms_2$  花药小孢子和绒毡层在这一时期全面崩溃。小孢子细胞质瓦解,原外壁结构仍清晰可见(图版 I-15,16)。绒毡层细胞瓦解,细胞质聚集成团,还可见到其中的浓染颗粒(图版 I-17)。

在以后的单核小孢子晚期和花粉粒发育时期, $ms_2$  花药完全停止发育,花药失水皱缩,整个药囊只剩下药壁,完全没有内含物,药壁包含表皮、内层以及横切面为一条深色线型的绒毡层和中层残余(图版 I-18)。

### 3 讨论

**3.1 玉米  $ms_2$  基因不育系小孢子在幼小孢子期至中小孢子期败育。**小孢子从四分体释放后,细胞器基本正常,但是,不能形成外壁。不育系小孢子因外壁不能发育而瓦解。不育系绒毡层的异常导致小孢子外壁不能发育。绒毡层从花粉母细胞减数分裂开始就出现异常,到幼小孢子期,表现为质体、线粒体退化,内质网细而少,看不到高尔基体,液泡膜内陷吞噬细胞质,内切质膜药囊一侧只有少量前乌氏体,没有乌氏体形成,细胞质内出现大量有脂类沉积的囊泡结构。不育系绒毡层细胞在中小孢子期全面崩溃,而可育花药的绒毡层一直维持到花粉粒发育期。尽管绒毡层的上述异常与小孢子败育的确切关系还不清楚,然而,这些迹象表明  $ms_2$  不育花药小孢子败育的可能原因是,绒毡层细胞器的异常使合成和运输孢粉素的功能受阻,导致不能形成乌氏体和小孢子外壁,同时,用于合成孢粉素的脂类在细胞质中大量积累。 $ms_2$  不育花药的上述败育特征和可能原因与 Herd 等报道<sup>[7]</sup>的大麦  $msfp$  基因不育的情况相似。

**3.2 构成花粉外壁和乌氏体的主要物质是孢粉素,它具有抗酸解的特性。**多数学者认为孢粉素是在绒毡层中合成的<sup>[1,12,13]</sup>,合成原料是脂类<sup>[7,13]</sup>,因此绒毡层在花粉外壁的发育中起重要作用。具分泌绒毡层的玉米,在小孢子发育的四分体期开始,绒毡层细胞分泌大量前乌氏体,从幼小孢子期至中小孢子期前乌氏体上沉积孢粉素,在绒毡层内切膜药囊一侧形成中心透明、四周电子浓染的乌氏体。乌氏体与花粉外壁形成的直接关系还未得到充分证实。但是,乌氏体与花粉外壁的结构十分相似,而且两者的发育是平行的,因而推测乌氏体与花粉外壁的形成有关,有人认为乌氏体是孢粉素从绒毡层合成后转运到花粉外壁的一种机制<sup>[1]</sup>。

在玉米 T 型、C 型胞质雄性不育和  $ms_{10}$  基因不育的小孢子败育细胞学研究中<sup>[3,4,8,10,11]</sup>以及本研究中,尽管不育的遗传机制不同,但都观察到不育花药绒毡层药囊一侧不形成乌氏体或只形成少量乌氏体的现象,这说明孢粉素的合成和转运是一个复杂的生化过程,必然受多基因控制;同时,也表明绒毡层合成孢粉素分泌到细胞外,形成乌氏体,对小孢子的正常发育是极其重要的,它不仅与花粉外壁的形成有关,而且,大量乌氏体组成的网状绒毡层膜在药囊腔四周,包围花粉粒,可能还起着“培养囊”的作用。

**3.3 本试验结果支持了 Albertsen<sup>[6]</sup>报道的  $ms_2$  不育花药没有小孢子壁形成的结论,与 Al-**

bertsen 报道不同的是,我们没有观察到  $ms_2$  不育花药小孢子染色体过早浓缩的现象,而且,只观察到少数绒毡层细胞在四分体末期解体,大部分绒毡层细胞在中小孢子期全面瓦解。

本试验表明,当小孢子包围在四分体胼胝质中,与周围药壁还处于分隔状态时,可育花药和不育花药的小孢子原生质膜外都已形成了片层或管状结构的原外壁,原外壁是孢粉素沉积的模板<sup>[9]</sup>。 $ms_2$  不育花药小孢子释放后,因绒毡层细胞的异常,小孢子原外壁上始终没有孢粉素沉积,没有形成外壁结构,这一结果支持了 John J. Skvarla<sup>[9]</sup>的花粉原外壁的形成决定于小孢子细胞质,而外壁的发育与绒毡层关系密切的观点。在本试验中我们观察到伴随四分体胼胝质的分解,不育花药小孢子原外壁表面和绒毡层内切壁药囊一侧都有深染物质沉积,至幼小孢子期沉积消失,这种沉积的化学成分和意义还有待研究。

### 参 考 文 献

- 1 胡适宜, 1982, 被子植物胚胎学, 人民出版社, 北京, 28~29
- 2 季良越、罗福和、陈伟程等, 1993, 作物学报, 19(3), 262~267
- 3 陈伟程、李桂珍, 1987, 华北农学报, 2(1), 1~6
- 4 Cheng, P. C. et al., 1979, Can. J. Bot. 57, 578~595
- 5 Greyson, R. I. et al., 1980, Can. J. Genet. Cytol. 22, 153~166
- 6 Albertsen, M. C. and R. L. Phillips, 1981, Can. J. Genet. Cytol. 23, 195~208
- 7 Herd, Y. R. and M. W. Steer, 1984, Can. J. Bot. 62, 1127~1135
- 8 Warmke, H. E. and Shen-Ling Janet Lee, 1977, The Journal of Heredity, 68, 213~222
- 9 John, J. Skvarla and Donald A. Larson, 1966, Amer. J. Bot., 53(10), 1112~1115
- 10 Sheu-ling Janet Lee et al., 1979, Amer. J. Bot. 66(6), 656~667
- 11 Colhoun, C. W. and M. W. Steer, 1981, Ann. Bot. 48, 417~424
- 12 Risueno, M. C. et al. 1969, Protoplasma 67, 361~374
- 13 Dickinson, H. G. and Bell, P. R. 1972, Planta(Berl.)107, 205~215

## Cytological Studies on Microspore Abortion in Genic Male-Sterile Line( $ms_2/ms_2$ ) of Corn

Ji Liangyue      Ji Hongqiang      Luo Fuhe      Chen Weicheng  
Liu Zonghua      Hu Yanmin      Huang Xilin      Tang Jihua

(Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002)

**Abstract** Comparative observations on microspore development in  $ms_2$  genic male-sterile line and its fertile counterpart were made with light and transmission electron microscopy. The results showed the disintegration of microspore in sterile anther occurred from young microspore to intermediate microspore stage. On release of microspores from the tetrad, the subsequent development of exine was completely inhibited owing to failure of sporopollenin deposition. Most of tapetal cells in sterile anther showed obviously abnormality at young microspore stage. Their plastids and mitochondria degenerated, endoplasmic reticula were both delicate and sparse,

no dictyosomes were observed. Vacuole membranes sank down and engulfed cytoplasm, no orbicule was formed, and a number of large vesiculated structure containing densely stained deposits existed conspicuously in cytoplasm. Tapetal cells completely disintegrated at intermediate microspore stage. The reason of microspore abortion in sterile anther may be that the abnormality of tapetal organelles resulted in the failure of synthesis or transportation of sporopollenin, as a result, the formation of orbicules and pollen exine was completely inhibited and the accumulation of sporopollenin precursors in cytoplasm was accompanied.

**Key words** Corn; Male-sterility; Microspore; Tapetum; Sporopollenin; Pollen exine

### Explanation of Plates

Abbreviation: EP; Epidermis; EN; Endothecium; MI; Middle layer; T; Tapetum; N; Nucleus; P; Plastid; M; Mitochondria; ER; Endoplasmic reticulum; D; Dictyosome; V; Vacuole; C; Callose; U; Orbicule

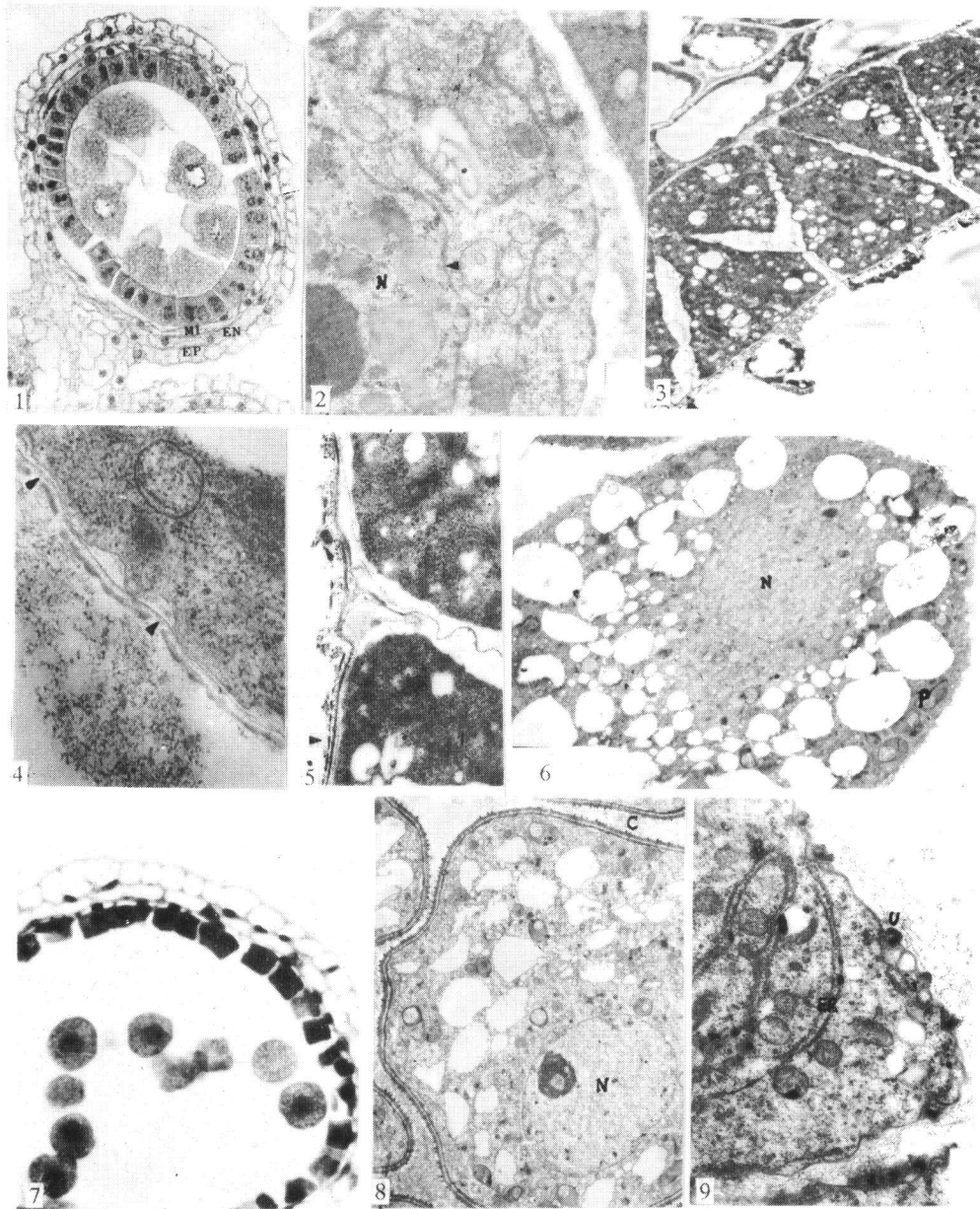
Except the pictures of MF anthers that they are noted others are pictures of  $ms_2$  anthers.

**Plate I** Fig. 1,7 are photomicrographs, others are electron micrographs.

1. Cross section of a locule at meiosis stage.  $\times 380$  2. A tapetal cell at meiosis stage, showing nuclear membrane depressed (arrowhead).  $\times 14000$  3. Irregular tapetal cells at tetrad stage.  $\times 2900$  4. A portion of microspore at late tetrad stage, showing the structure of primexine (arrowhead).  $\times 29000$  5. Deposition of darkly stained substance on inner surface of tapetal wall at late tetrad stage.  $\times 10000$  6. Just released young microspore, showing the normal plastid, depressed nuclear membrane and failing to form exine.  $\times 2900$  7. A locule at young microspore stage.  $\times 400$  8. Just released young microspore of MF anther, showing initially developmental exine and remnants of callose.  $\times 2900$  9. A portion of tapetal cell of MF anther, showing proorbicules and orbicules on inner surface and the secretion of vesicles.  $\times 19000$

**Plate I** Fig. 15,18 are photomicrographs, others are electron micrographs.

10, 11. Parts of tapetal cell of MF anther at young microspore stage, showing extensive endoplasmic reticulum, dictyosome, concentric membrane system (arrowhead) formed by endoplasmic reticulum and the deposits of densely stained granules in endoplasmic reticulum cisternae.  $\times 10000$ ,  $\times 29000$  12, 13. Parts of tapetal cell at young microspore stage, showing delicate endoplasmic reticulum, a number of large vesiculated structure containing densely stained deposits (arrowhead) failing to form orbicules, vacuole membranes sinking down and engulfing cytoplasm.  $\times 29000$ ,  $\times 29000$  14. A portion of locule of MF anther at intermediate microspore stage, showing a microspore upon tapetal orbicules.  $\times 2900$  15. Cross section of a locule at intermediate microspore stage.  $\times 380$  16. A portion of disintegrated microspore at intermediate microspore stage, showing completely vacuolated cytoplasm and remained primexine (arrowhead).  $\times 10000$  17. Disintegrated tapetal cells at intermediate microspore stage.  $\times 3600$  18. Cross section of a locule before anthesis.  $\times 100$



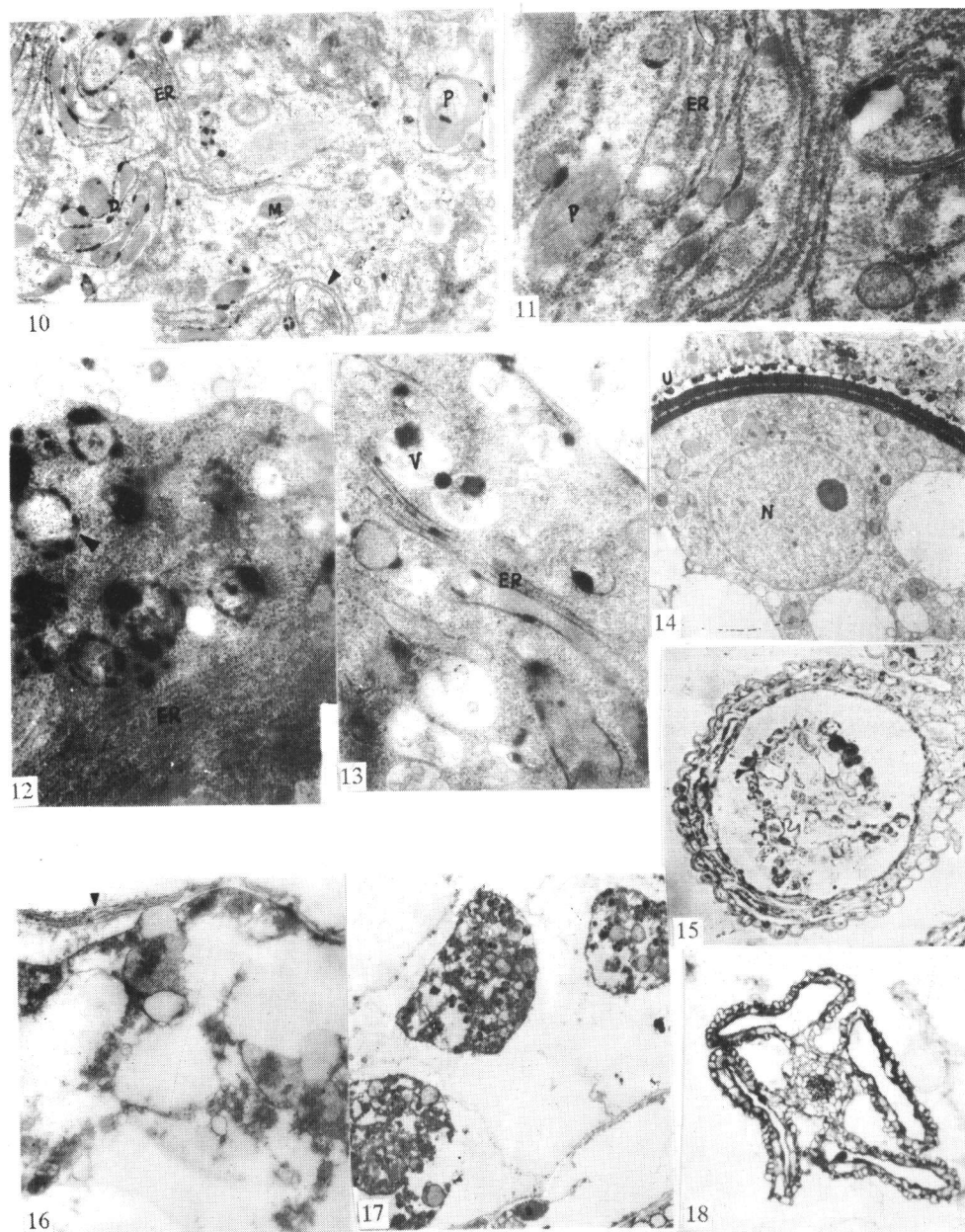
图版说明

缩写：EP：表皮 EN：内层 MI：中层 T：绒毡层 N：细胞核 P：质体 M：线粒体 ER：内质网 D：高尔基体  
 V：液泡 C：胼胝质 U：乌氏体

图版照片除注明为正常可育花药照片外，其余均为  $ms_2$  不育花药照片。

图版 I 图 1、7 为光镜照片，其余为电镜照片。

1、减数分裂期药囊横切面。 $\times 380$  2、减数分裂期花药绒毡层细胞，示核膜下陷(箭头)。 $\times 14000$  3、四分体期不规则的绒毡层细胞。 $\times 2900$  4、四分体末期小孢子的一部分，示原外壁结构(箭头)。 $\times 29000$  5、四分体末期绒毡层细胞壁内侧的深染物质沉积(箭头)。 $\times 10000$  6、释放的幼小孢子，核膜下陷，质体正常，没有外壁形成。 $\times 2900$  7、幼小孢子期的药囊。 $\times 400$  8、正常可育花药释放的小孢子，示三层外壁结构和未完全分解的胼胝质。 $\times 2900$  9、正常可育花药幼小孢子期绒毡层细胞的一部分，示囊泡的分泌和内表面的前乌氏体和乌氏体。 $\times 19000$



图版 II 图 15、18 为光镜照片，其余为电镜照片

10、11、正常可育花药幼小孢子期的绒毡层细胞，示发达的内质网、高尔基体和内质网形成的同心膜系(箭头)，内质网和高尔基体池内有较多浓染物质。 $\times 10000$ ， $\times 29000$  12、13、不育花药幼小孢子期的绒毡层细胞，示内质网网络细而少，细胞质内出现大量沉积有浓染物质的大的囊泡结构(箭头)，液泡膜内陷吞噬细胞质，以及内切质膜内表面只有少量前乌氏体，没有乌氏体形成。 $\times 29000$ ， $\times 29000$  14、中小孢子期，正常可育花药的小孢子外壁紧贴乌氏体。 $\times 2900$  15、中小孢子期  $ms_2$  药囊横切面。 $\times 380$  16、中小孢子期败育小孢子的一部分，示小孢子原外壁结构(箭头)和崩溃的细胞质。 $\times 10000$  17、中小孢子期瓦解的绒毡层细胞。 18、抽雄前的药囊横切面。 $\times 100$