

光温敏核雄性不育小麦BS366花粉母细胞减数分裂的细胞学研究

樊建青^{1,2} 张立平^{1,2*} 赵昌平^{1,2*} 许晨光^{1,2} 王灵云^{1,2} 苑少华²

(¹北京市农林科学院北京杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097; ²首都师范大学生命科学院, 北京 100048)

摘要 以小麦光温敏核雄性不育系BS366为材料, 采用卡宝品红压片法研究花粉母细胞减数分裂的细胞学变化。结果表明: 不育环境下的BS366花粉母细胞减数分裂过程中染色体和细胞形态异常现象较多。染色体异常主要表现为: 染色体落后, 染色体桥, 染色体散乱排列, 微核、染色体分离不同步。细胞形态异常表现为: 二分体时期细胞质不完全分裂, 细胞板不平整; 四分体时期子细胞大小不一。花粉母细胞减数分裂后, 异常四分体的比例为62.88%; 成熟花粉粒中败育率为89.5%。推测减数分裂期间异常的染色体行为以及细胞形态可能是影响花粉育性降低的重要原因。

关键词 光温敏核雄性不育小麦; 减数分裂; 染色体

杂种优势是提高作物产量的重要途径。光温敏雄性不育小麦具有恢复谱广、配组自由、杂交种生产过程简单和成本较低等优点^[1], 在二系法杂交小麦中具有重要作用。小麦光温敏感型雄性不育有两种类型, 一是光温敏细胞质雄性不育, 如D²型不育系、A3314等; 二是光温敏核雄性不育, 如ES-14、C49S、BS210、BS20、BNS等^[2]。其中, 光温敏核雄性不育小麦在二系法杂交小麦中被广泛应用, 但在大面积推广应用中仍存在着一些关键性的理论问题急需解决, 主要表现在对其败育机制不完全了解。小麦光温敏核雄性不育为生态敏感型, 从细胞学层面深入了解其败育特征, 是解析其败育机理, 以及改良和充分利用不育系的重要基础。

花粉母细胞减数分裂是花粉发育过程的重要环节之一, 前人通过对水稻^[3,4]、兰州百合^[5]、王百合^[6]、玉米^[7]、大豆^[8]、木立芦荟^[9]、普通小麦^[10]、太谷核不育小麦^[11]、小麦胞质不育系CMS^[12]等研究表明, 花粉母细胞减数分裂期间染色体异常行为是导致花粉败育的重要原因之一。许多研究表明, 减数分裂过程中出现的染色体桥、落后染色体、微核等异常现象是影响花粉育性的细胞遗传因素^[5,13]。落后的染色体随着减数分裂的进行可能会随机移向细胞两极, 引起染色体的不均衡分配, 造成子细胞中部分染色体的缺失, 从而产生一定比率的败育花粉^[14]; 同时落后的染色体还是形成微核的主要原因, 形成

微核的细胞大多是不育的^[15]。另外, 染色体桥是一种常见的染色体变异, 它也能引起花粉败育^[5]。

探究不同的光温敏核雄性不育小麦花粉母细胞在减数分裂期间的异常特征是研究其败育机制的重要环节。前人对小麦光温敏不育系的相关研究也有少量报道, 如高东迎等^[16]研究发现, 早播的C49S减数分裂染色体异常, 最终导致其败育。周美兰等^[17,18]对光温敏核不育小麦ES-14、ES-10研究发现, ES系列虽然减数分裂时染色体出现异常现象, 但大多数花粉母细胞可以进行正常的减数分裂, 形成正常的四分体。可见, 不同小麦光温敏不育系的染色体异常特点可能存在差异, 而且上述研究缺乏减数分裂过程中细胞形态异常方面的报道。

BS366是杂交小麦“京麦7号”的母本, 是优良的小麦光温敏核雄性不育系, 本文拟从细胞学水平观察其花粉母细胞在减数分裂期间的染色体行为和细胞形态特征, 比较其在可育环境和不育环境下的异同, 以期明确其花粉败育的细胞学原因, 为进一步

收稿日期: 2011-02-02 接受日期: 2011-03-07

北京市自然科学基金(No.5091001)、国家高技术研究与发展计划(863)(No.2009AA101102, No.2011AA10A106)、农业部948项目(No.2009-Z4)、科技部成果转化资金(No.2009GB2A000006)、院创新能力建设专项(No.KJCX201101007)和北京市农业育种基础研究创新平台(No.D08070500690801)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-51503765, E-mail: lp-zhang8@sohu.com; Tel: 010-51503104, E-mail: bjhwz2003@yahoo.com.cn

解析小麦光温敏雄性败育机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦光温敏核雄性不育系BS366由北京杂交小麦工程技术研究中心自主选育。在药隔后期, 平均温度低于10℃时表现为高度不育; 平均温度高于20℃时表现为高度可育; 该不育系已经在二系法杂交小麦组合选育中广泛应用。2009年9月30日将BS366种子种植于花盆, 花盆规格为26 cm×23 cm, 每盆留苗8株。2010年4月当小穗发育至药隔后期时, 将其放入人工气候箱(HPG-320型), 利用人工气候箱控温, 光照时间14 h/d, 光强12 000 Lx, 空气湿度50%, 15℃预处理3天, 然后, 将材料分别放入10℃人工气候箱(不育环境)和20℃人工气候箱(可育环境), 各处理7天。

1.2 方法

1.2.1 减数分裂观察 在材料高低温处理的过程中, 上午8:00~10:00, 选取减数分裂的幼穗, 用卡诺氏固定液(95%乙醇:冰醋酸=3:1)固定3小时, 然后用95%的乙醇冲洗, 再转入75%乙醇中, 4℃下保存

备用。取已固定好的幼穗上的颖花, 在解剖显微镜下, 用解剖针分离出花药。将花药置于载玻片上, 滴加200 μl卡宝品红溶液后, 用解剖针将花粉母细胞敲出来后, 静止3~5 min使细胞充分染色, 然后盖上盖玻片并用指甲油封边。将制好的片子放在Leica显微镜下观察和拍照; 并统计减数分裂时期染色体异常频率以及细胞形态异常频率。

1.2.2 花粉育性鉴定 小麦抽穗后, 选取当天抽出穗的中上部颖花, 用卡诺氏固定液(配方同上)固定。观察时, 用1%的I₂-KI溶液染色。将制好的片子放在显微镜下观察。统计可育花粉及败育花粉。棕黑色, 圆球状, 是正常的花粉; 不规则的畸形, 无棕黑色反应, 称为典败; 圆形, 无棕黑色反应, 是圆败。有花粉圆形部分呈浅棕黑色反应, 是碘败。花粉的黑染率(%)=花粉黑染粒数/总的粒数×100%。在小麦成熟后对结实率进行统计分析。

2 结果

2.1 BS366花粉母细胞减数分裂过程

2.1.1 可育环境下花粉母细胞减数分裂过程 可育环境下, BS366花粉母细胞减数分裂过程大多是

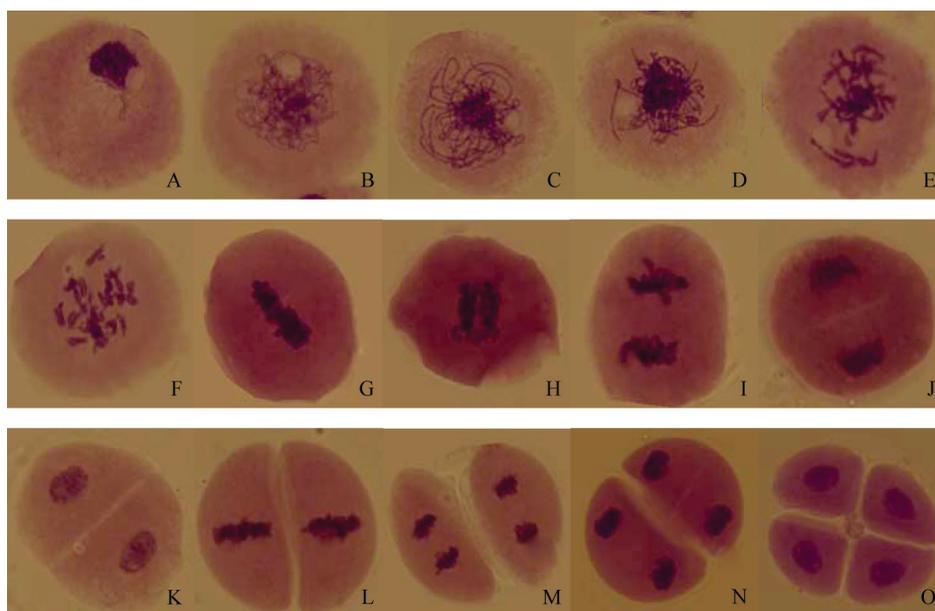


图1 可育环境花粉母细胞正常的减数分裂

A: 间期; B: 细线期; C: 偶线期; D: 粗线期; E: 双线期; F: 终变期; G: 中期I; H: 中后期I; I: 后期I; J: 末期I; K: 间期II; L: 中期II; M: 后期II; N: 末期II; O: 四分体时期。

Fig.1 Normal meiosis of pollen mother cells under fertile condition

A: interphase; B: leptotene; C: zygotene; D: pachytene; E: diplotene; F: diakinesis; G: metaphase I; H: early anaphase I; I: anaphase I; J: telophase I; K: interkinesis II; L: metaphase II; M: anaphase II; N: telophase II; O: tetrad stage.

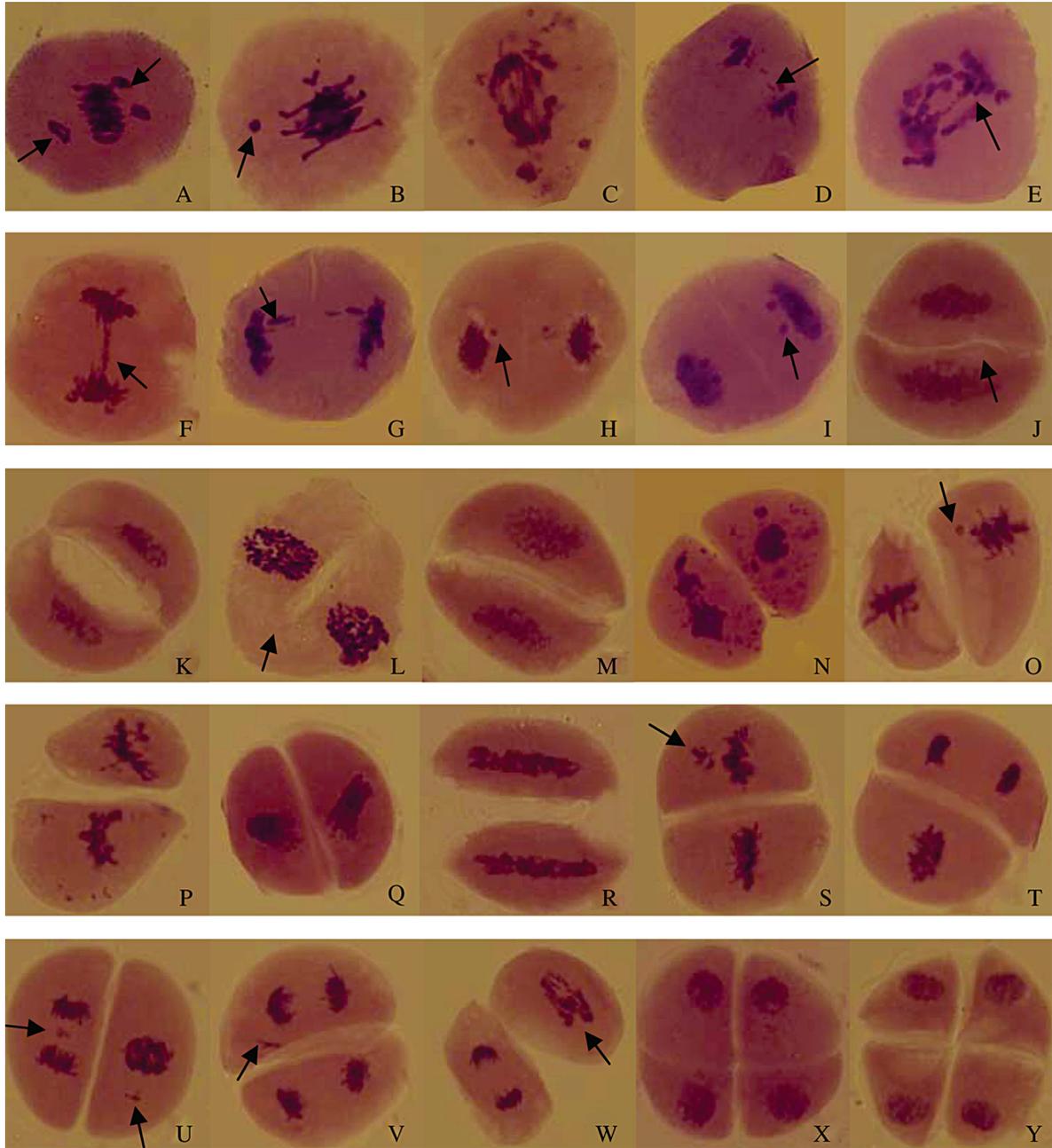


图2 不育环境下花粉母细胞异常减数分裂

A: 中期I染色体落后; B: 中期I出现微核; C: 后期I染色体散乱排列; D: 后期I多条染色体落后; E: 后期I出现染色体多桥; F: 后期I出现染色体单桥; G: 末期I多条染色体落后; H,I: 细胞中出现微核; J: 细胞板不平整; K,L: 细胞质不完全分裂; M: 子细胞呈月牙形; N~P: 子细胞染色体散乱排列, 且细胞形状异常; Q,R: 染色体错误排列; S: 子细胞存在落后染色体; T,U: 减数分裂不同步; V: 子细胞中一条染色体滞留在细胞板附近; W: 子细胞染色体散乱排列; X,Y: 子细胞大小不一样。

Fig. 2 Abnormal meiosis of pollen mother cells under sterile condition

A: abnormal metaphase I, laggard chromosomes; B: abnormal metaphase I, micronuclei; C: abnormal anaphase I, scattered chromosomes; D: abnormal anaphase I, laggard chromosomes; E: abnormal anaphase I, multi-chromosome bridges; F: abnormal anaphase I, single chromosome bridge; G: abnormal telophase I, laggard chromosomes; H,I: abnormal telophase I micronucleus; J: abnormal dyad without the flat cell plate; K,L: abnormal dyad with the undivided cytoplasm; M: crescent-shaped cell; N~P: scattered chromosomes and abnormal cell morphology; Q,R: abnormal meiosis II; mis-orientated chromosomes; S: abnormal anaphase II; lagged chromosomes; T,U: abnormal meiosis II, chromosomes separated asynchronous; V: abnormal meiosis II, one chromosome by the side of the cell plate; W: abnormal meiosis II, scattered chromosomes; X,Y: abnormal tetrad with different size.

正常的, 主要经历了以下几个时期。间期: 细胞核位于中间, 染色体凝集成团(图1A)。前期I [包括细线期: 细长的染色体互相缠绕布满于整个核(图1B); 偶线期: 同源染色体开始配对, 染色体靠核膜的一端集中成束, 另一端散成花朵状(图1C); 粗线期: 染色体明显缩短变粗, 同源染色体配对已完成(图1D); 双线期: 染色体进一步缩短变粗, 可清楚地观察到交叉的存在(图1E); 终变期: 染色体更为浓缩、粗短, 分散在细胞内(图1F)]。中期I: 染色体排列在赤道板上(图1G)。后期I: 同源染色体开始向两极移动(图1H和图1I)。末期I: 染色体浓缩成团, 细胞板逐渐形成(图1J)。前期II: 细胞板已经完全形成(图1K)。中期II: 染色体整齐地排列在分裂细胞的赤道板上(图1L)。后期II: 着丝点一分为二, 姐妹染色单体分别移向两极(图1M)。末期II: 染色体解旋成为细丝状(图1N)。四分体时期(图1O)。

2.1.2 不育环境下花粉母细胞减数分裂过程 不育环境下花粉母细胞减数分裂染色体行为和细胞形态出现诸多异常现象, 具体表现如下:

染色体落后: 减数分裂的多个时期都观察到染色体落后现象, 不同时期染色体落后表现不同。如: 中期I落后的染色体位于赤道板两极处(图2A); 后期I落后的染色体分散在细胞中(图2D); 末期I落后的染色体有些位于细胞板处, 有些远离细胞板(图2G); 中期II落后的染色体位于赤道板附近(图2S)。

染色体散乱排列: 后期I一些细胞中染色体分散于整个细胞(图2C); 减数分裂期II许多子细胞中染色体散乱排列(图2N~图2P和图2W), 有些子细胞的染色体排列与赤道板成一定的角度(图2Q), 个别子细胞中染色体排列方式与形成的细胞板平行(图2R)。

染色体桥形成: 后期I染色体向两极运动时, 一些细胞出现染色体桥, 包括单桥(图2F)、多桥(图2E)。

染色体分离不同步: 减数分裂期II许多子细胞减数分裂不同步。如: 两个子细胞, 一个处于分裂中期, 另一个处于分裂后期(图2T)。两个子细胞, 一个处于分裂早后期II, 在远离赤道板处存在染色体; 而另一个处于分裂后期II, 在赤道板处存在滞后染色体(图2U)。

微核形成: 减数分裂的多个时期都观察到微核的存在。中期I、中期II许多细胞中出现微核(图2B和图2O); 末期I细胞中也存在微核(图2H和图2I)。

细胞形态异常: 如二分体形成时细胞板不平整

(图2J); 细胞板处的子细胞大小不相同(图2O); 细胞质不完全分裂(图2K和图2L)。四分体形成时四个子细胞大小不同(图2X和图2Y)。在形态异常的细胞中, 一些细胞染色体也存在一定的异常(图2O和图2P)。

2.2 育性分析

2.2.1 碘染结果 可育环境下花药内的正常花粉粒数很多, 花粉黑染率为83.7%(图3A), BS366平均结实率为82.3%。不育环境下花药内的正常花粉粒数较少, 花粉黑染率为10.5%(图3B), BS366平均结实率为4.4%。由此可见, 低温使花粉发育受到严重影响, 从而影响了小麦的结实率。

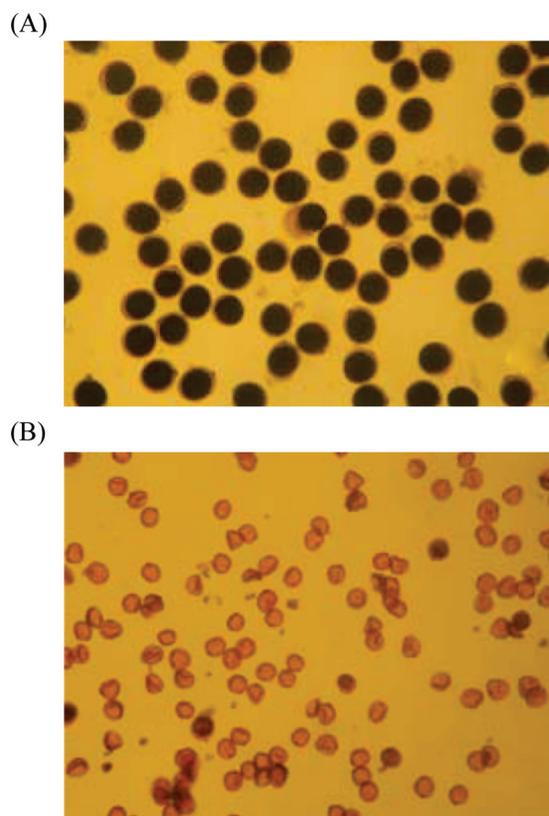


图3 碘染结果

A: 可育环境下BS366碘染结果; B: 不育环境下BS366碘染结果。

Fig.3 Stained with I₂-KI

A: stained with I₂-KI under fertile condition; B: stained with I₂-KI under sterile condition.

2.2.2 BS366花粉母细胞减数分裂过程异常频率与育性关系的分析 由表1可知: 不育环境下的BS366减数分裂各时期染色体异常频率较高, 染色体平均异常频率为46.53%; 而在可育环境下, 只有减数分裂不同步异常频率较高, 且异常频率为23.79%。由此可见, 减数分裂期间出现的微核、染色体桥、染

染色体滞后、染色体散乱排列等异常现象是影响花粉育性降低的重要原因,而对于减数分裂期II染色体不同步现象可能不是造成花粉育性降低的主要原因。

由表2可知:不育环境的BS366花粉母细胞在减

数分裂时细胞形态异常主要表现为细胞板不平整和细胞质不完全分裂。在不育环境出现的异常频率高于可育环境的异常频率,因此异常的细胞形态可能也是影响花粉育性降低原因。

表1 不育环境减数分裂各时期染色体异常的细胞百分率

Table 1 Percentage of cells with aberrational chromosome during meiosis under sterile condition

时期	细胞总数	染色体落后 细胞百分率(%)	染色体散乱排列 细胞百分率(%)	染色体桥 细胞百分率(%)	染色体分离不同步 细胞百分率(%)	微核形成 细胞百分率(%)
Phases	Total number of cells investigated	Percentage of cells with laggard chromosome (%)	Percentage of cells with scattered chromosome (%)	Percentage of cells with chromosome bridge (%)	Percentage of cells with asynchronous chromosome (%)	Percentage of cells with micronuclei (%)
Metaphase I	939	(340) 36.21	—	—	—	(94) 10.01
Anaphase I	760	(9) 1.18	(44) 5.79	(294) 38.68	—	(32) 4.21
Telophase I	1 186	(202) 17.03	—	—	—	(211) 17.79
Metaphase II	972	(189) 19.44	(209) 21.50	—	—	(69) 7.10
Anaphase II	893	(101) 11.31	(173) 19.37	—	(252) 28.22	—

—代表异常频率为0。

— Representing the percentage of abnormality is zero.

表2 花粉母细胞减数分裂时期细胞形态异常百分率

Table 2 The percentage of abnormal cell morphology during meiosis in BS366

组别	可育环境异常频率(%)	不育环境异常频率(%)
Groups	The percentage of abnormality under fertile condition (%)	The percentage of abnormality under sterile condition (%)
The cell plate with unflatness	996(13) 1.31	1 186(214) 18.04
The incomplete divided cell	—	1 186(103) 8.68
The tetrad cells with different in size	800(84) 10.5	1 250(786) 62.88

—代表异常频率为0。

— Representing the percentage of abnormality is zero.

3 讨论

减数分裂是影响花粉育性的重要过程之一,正常的减数分裂可以保证染色体有规律地分配到配子中,使得世代之间的遗传物质恒定^[19,20]。前人对小麦不育系A3314^[21]、CS49^[16]、ES系列^[17]研究表明:A3314、CS49减数分裂染色体异常行为是导致花粉败育的重要原因,而ES-10、ES-14减数分裂出现的少量异常并不是引起花粉败育的主要原因。目前,对于BS系列不育系减数分裂期间染色体异常行为与育性关系的研究尚未见报道。

本研究表明,小麦光温敏核不育系BS366在不育环境下,花粉母细胞减数分裂出现染色体落后、染色体排列异常、染色体桥以及微核异常的频率较高,染色体平均异常频率为46.53%;花粉母细胞经

过减数分裂后,四分体异常频率为62.88%。而在可育环境下上述异常现象极少,且四分体异常频率为10.5%。由此推测,上述染色体异常现象可能是造成花粉育性降低的主要原因。而对于染色体分离不同步现象,在可育环境下出现的频率也较高,因此推测这可能不是造成花粉育性降低的主要原因。

本研究发现,不育环境下BS366花粉母细胞在形成二分体时细胞板不平整以及细胞质不完全分裂的异常频率高于可育环境下的异常频率。因此,细胞异常形态可能也是影响花粉育性的细胞学原因。前人通过对玉米^[22]、普通小麦^[23]等的研究表明,异常的细胞骨架结构能够引起形成异常的细胞板等异常现象。推测BS366减数分裂过程中出现的细胞板异常情况可能与细胞骨架异常相关。可见光温敏雄

性不育小麦花粉败育的原因除了与染色体异常行为相关外, 还可能与细胞骨架以及其它生理变化相关, 其机理还有待于进一步研究。

参考文献(References)

- 1 赵昌平, 王 新. 杂种小麦的研究现状与光温敏二系法. 北京农业科学 1999; 17(2): 3-5.
- 2 江红梅, 张立平. 小麦光温敏雄性不育遗传研究进展. 种子 2009; 28(5): 56-9.
- 3 何金华, 程杏安, 陈志雄, 郭海滨, 刘向东, 卢永根. 同源四倍体水稻花粉母细胞减数分裂期间微管骨架组织和结构变化. 作物学报 2010; 36(10): 1777-85.
- 4 代西梅, 黄群策, 李国平, 秦广雍. 同源四倍体水稻花粉的发育特征. 中国水稻科学 2006; 20(2): 165-70.
- 5 李 雪, 陈丽梅, 杜 捷, 梁万福, 幸亨泰. 兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察. 西北植物学报 2003; 23(10): 1796-9.
- 6 张克中, 赵祥云, 梁 励, 黄善武, 张启翔. 王百合雄性不育突变体小孢子败育的细胞学研究. 北京林业大学学报 2003; 25(3): 124-6.
- 7 Maguire MP, Riess RW, Paredes AM. Evidence from a maize desynaptic mutant points to a probable role of synaptonemal complex central region components in provision for subsequent chiasma maintenance. *Genome* 1993; 36(5): 797-807.
- 8 Bione NC, Pagliarini MS, De Almeida LA. A new and distinctive male-sterile, female-fertile desynaptic mutant in soybean (*Glycine max*). *Hereditas* 2002; 136(2): 97-103.
- 9 吕 琳, 何聪芬, 董银卯, 刘家熙. 木立芦荟小孢子母细胞减数分裂与花粉育性关系的初步研究. 遗传 2005; 27(2): 429-34.
- 10 付道林, 孔令让, 肖艳梅, 张学勇, 杨欣明. 普通小麦与瓦维洛夫山羊草属间杂种的产生及其育性的细胞学研究. 西北植物学报 2000; 20(4): 511-8.
- 11 李祥义, 邓景扬. 太谷核不育小麦雄性败育过程的细胞形态学研究. 作物学报 1983; 9(8): 151-6.
- 12 徐祖元, 周玲革, 姜金波, 徐乃瑜. 新型小麦胞质不育系花粉败育的细胞学观察. 武汉植物学研究 1998; 16(3): 193-6.
- 13 Brown RC, Lemmon BE. The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda* (Cyperaceae). *Am J Bot* 2000; 87(1): 1-11.
- 14 康向阳, 毛白杨. 花粉败育机制的研究. 林业科学 2001; 37(3): 35-9.
- 15 张仲鸣, 苏都莫日根, 李正理. 银杏小孢子中的微核形成及其在进化过程中的意义. 植物学报 1997; 39(2): 97-101.
- 16 高东迎, 李正玮. 温敏雄不育小麦C49S不育性表达研究. 西南农业学报 1998; 11(3): 31-5.
- 17 周美兰, 程尧楚. 光温敏核不育小麦ES-14花粉败育的细胞学研究. 作物研究 1996; 10(4): 20-6.
- 18 周美兰, 唐启源, 何觉民, 程尧楚. 光温敏核不育小麦ES-10雄性败育机制研究. 湖南农业大学学报 1997; 23(2): 117-22.
- 19 Bruce S. The genetic control of meiosis. *Ann Rev Genet* 1976; 10: 53-134.
- 20 Hanson MR, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 2004; 16: S154-69.
- 21 宋喜悦, 马翎健, 胡银岗, 李宏斌, 何蓓如. YS型小麦温敏不育系A3314的细胞学研究. 干旱地区农业研究 2007; 25: 15-9.
- 22 Qinqin Liu, Inna Golubovskaya W, Zacheus C. Abnormal cytoskeletal and chromosome distribution in p0, ms4 and ms6; mutant alleles of polymitotic that disrupt the cell cycle progression from meiosis to mitosis in maize. *J Cell Sci* 1993; 106(4): 1169-78.
- 23 Shamina NV, Gordeeva EI, Kovaleva NM, Seriukova EG, Dorogova NV. Formation and function of phragmoplast during successive cytokinesis stages in higher plant meiosis. *Cell Biol Int* 2007; 31(6): 626-35.

Studies on Meiosis of Pollen Mother Cells in Photoperiod-temperature Sensitive Genic Male Sterile Wheat Line BS366

Jian-Qing Fan^{1,2}, Li-Ping Zhang^{1,2*}, Chang-Ping Zhao^{1,2*}, Chen-Guang Xu^{1,2}, Ling-Yun Wang^{1,2},

Shao-Hua Yuan²

(¹Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing 100097, China;

²School of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract In this paper, cytological studies were conducted on pollen mother cells meiosis of photoperiod temperature sensitive genic male sterile wheat line BS366 by using carbol fuchsin and chromosome squash technique. Some abnormalities of meiosis were observed in sterile condition. They were lagged chromosomes, chromosome bridges, scattered chromosomes and micronucleus. During meiosis II, chromosome segregations were not synchronous. At dyad stage, the cell plate was out of flatness and the cell was incomplete divided. At tetrad stage, the tetrad cells were not coincident with each other in size. The percentage of abnormal tetrad was 62.88%, and 89.5% of matured pollen grains were sterile. Abnormal chromosome behavior and cell morphology during meiosis may be the important reason for fertility reduction of photoperiod-temperature sensitive genic male sterility wheat pollen.

Key words photoperiod-temperature sensitive genic male sterility wheat; meiosis; chromosome

Received: February 2, 2011 Accepted: March 7, 2011

This work was supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (No.5091001), Grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2009AA101102, No.2011AA10A106), Academy Innovation Ability Construction of Program (No.KJCX201101007) and Innovation Platform Program for Basic Research of Agricultural Breeding in Beijing (No.D08070500690801)

*Corresponding author. Tel: 86-10-51503765, E-mail: lp-zhang8@sohu.com; Tel: 86-10-51503104, E-mail: bjhwz2003@yahoo.com.cn