

大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 花粉败育的细胞学研究^{*}

丁德荣 盖钧镒^{**}

(南京农业大学大豆研究所; 农业部国家大豆改良中心 南京 210095)

摘要 利用光镜和透射电镜对(N8855×N2899)F₁不育株和(N2899×N8855)F₁可育株、BC₁F₁不育株、质核互作不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 进行小孢子发育的细胞学比较观察。结果表明,同一胞质在不同的回交世代败育途径和表现相似,主要发生在单核后期到二胞花粉早期:(N8855×N2899)F₁与BC₁F₁不育花药在小孢子单核靠边期细胞质产生不正常空泡,至近成熟花粉时细胞质部分解体、收缩;NJCMS1A 花粉败育发生在二胞花粉期,初期原生质内小液泡比保持系增多,原生质内未形成淀粉粒,在生殖细胞远离营养细胞后,胞质呈现紊乱,生殖核与营养核消失,外壁内层及内壁停止发育,液泡增大,原生质部分解体。分别与反交F₁及保持系比较,处于二胞花粉时期的正交F₁及不育系细胞色素氧化酶最快迁移活性带缺失,此特征带缺失与不育花药败育时期基本同步。

关键词 大豆; 质核互作雄性不育; 小孢子发育; 细胞色素氧化酶

中图分类号 S565.101 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)03-0167-05

大豆核雄性不育基因资源比较丰富,目前已发现并定名7个独立的隐性核雄性不育基因ms1—ms7,对其花药败育的细胞学机制作过详细研究,研究没有集中到花药的生化方面,仅研究了核雄性不育对整株特征的影响,主要应用于轮回选择等遗传育种^[1,2]。然而,对开发利用杂种优势有重要价值的质核互作型雄性不育材料尚发现不多。Davis(1985)首次在其申请的一项美国专利中提到其通过两个栽培大豆品种杂交获得细胞质不育系^[3],但至今未见进一步的研究报道。孙寰等(1994)利用栽培大豆与野生大豆杂交获野生型质核互作不育系及其保持系^[4]。盖钧镒等(1995)报道了来自两个栽培大豆品种杂交组合N8855×N2899的质核互作雄性不育,并由其研究组通过回交于1997年选育出一质核互作雄性不育系及其保持系^[5,6]。张磊等(1997)与许占友等(1999)通过两个栽培大豆杂交获另质核互作不育材料^[7,8]。以上报道均尚未涉及各不育材料花粉败育的细胞学及生化机制。本文在已有工作

基础上,利用已发现与选育的(N8855×N2899)不育F₁和(N2899×N8855)可育F₁、BC₁不育株、质核互作不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B,研究大豆同一胞质不同回交世代的花粉败育特点,研究其花粉败育过程的同工酶特征,为大豆质核互作雄性不育机制研究提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用南京农业大学大豆研究所已发现和选育的(N8855×N2899)F₁不育株、(N2899×N8855)F₁可育株料、BC₁不育株、质核互作不育系 NJCMS1A(回交4代)及其保持系 NJCMS1B。

1.2 细胞学观察

在花期通过形态学如茸毛色、叶形等特征并结合镜检标记(N8855×N2899)F₁不育株、(N2899×N8855)F₁可育株、BC₁不育株。取不同发育时期花

* 收稿日期:2000-07-19

** 通讯联系人: Author for correspondence

基金项目: 国家自然科学基金(9390013)和国家攻关项目(96-002-02-12-4)。

作者简介: 丁德荣(1967—), 博士, 现为复旦大学遗传研究所博士后研究人员。

蕾。卡诺氏液固定,石蜡切片法制片,厚 $6\sim 8\mu\text{m}$,海氏苏木精染色液片染,固绿复染,在OLYMPUS—BH2型生物显微镜下观察。

作透射电镜样品的制备采用不同发育时期的花蕾挑出花药于2%戊二醛和1%锇酸固定,系列酒精脱水后,由环氧丙烷过渡至环氧树脂Epon812中包埋,LKB—V型超薄切片机切片,切片厚约60nm,醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色,HITACHI—600型透射电镜下观察超微结构。

1.3 细胞色素氧化酶同工酶分析

据花蕾形态及大小,结合花药涂片镜检,分别取处于(1)四分体时期(2)单核小孢子时期(3)二胞花粉时期的(N8855 \times N2899) F_1 、(N2899 \times N8855) F_1 、 BC_1 不育株、 BC_2 不育株、NJCMS1A、NJCMS1B花蕾,取出花药,用于细胞色素氧化酶同工酶电泳分析,其方法参见戴尧仁等^[9]

2 试验结果

2.1 正常胞质材料保持系 NJCMS1B 与 (N2899 \times N8855) F_1 花药的发育过程

大豆雄蕊原基分化发育成4个小孢子囊。在胼胝质期,花药药壁组织已分化完全,药壁包含4层细胞,从外向内依次是表皮、药壁内层、中层和绒毡层,每个小孢子囊的造孢细胞分裂为花粉母细胞,胼胝质沉积在花粉母细胞的细胞膜和细胞壁之间(图略)。花粉母细胞经减数分裂形成4个子细胞,其被包围在一个共同的胼胝质中(图版I—1),四分体胼胝质解体,小孢子被释放到药室中,幼嫩小孢子体积饱满,细胞质较浓,细胞核位于中央,这一时期绒毡层细胞仍较发达(图版I—2)。单核靠边期:小孢子继续发育,细胞核移向一边,小孢子外壁沉积孢粉素物质,形成覆盖层、基粒棒、基足层和外壁内层,花粉孔发育完全,绒毡层明显退化(图版I—3,电镜图略)。二胞花粉期:小孢子进行有丝分裂形成一个营养核和一个生殖核,细胞质沿生殖核分开形成生殖细胞,初期生殖细胞靠近营养核,营养细胞内含大量线粒体、内质网等细胞器,淀粉粒开始形成(图版I—4);后期生殖细胞逐渐远离营养核,淀粉粒大量成簇积累,生殖核由圆形发育为长纺锤型,小孢子原生质膜和外壁内层之间形成内壁,形成包含外壁和内壁的花粉粒,外壁包含4层,即覆盖层、基粒棒、基足层和外壁内层,随后外壁内层纤维化,至此花粉壁发育完成(图版I—5)。

2.2 (N8855 \times N2899) F_1 与 BC_1 不育株败育的过程

与(N2899 \times N8855) F_1 正常可育花药小孢子的发育比较,(N8855 \times N2899) F_1 不育株早期的单核居中小孢子发育未见异常(图版II—1)。但单核靠边小孢子则发现异常,细胞质产生不正常的空泡,部分小孢子细胞质收缩,少部分游离的小孢子出现各种畸形(图版II—2);小孢子细胞质严重收缩,无正常生殖核结构(图版II—3)。

BC_1 不育株的花粉母细胞亦能经过减数分裂正常释放出单核居中小孢子,其败育主要发生在单核靠边期,部分小孢子内出现不正常空泡,胞质逐渐趋向解体(图版II—4),极少数小孢子经过延迟的单核晚期继续发育,但近成熟时原生质则部分解体(图版II—5)。发现个别小孢子内有2—3个核仁(图版II—6)。

2.3 质核互作不育系 NJCMS1A 小孢子的败育过程

NJCMS1A花粉从胼胝质到单核小孢子期均与保持系NJCMS1B一致。在单核小孢子晚期阶段,小孢子包含着一个位于细胞边缘的核和较致密的细胞质,可见覆盖层、基粒棒、基足层及外壁内层,外壁周围有孢粉素沉积,胞壁发育未见异常(图略)。在二胞花粉早期,生殖细胞靠近营养细胞核,原生质内有丰富的线粒体、脂质体等细胞器,原生质内出现不规则的小液泡,未见淀粉粒形成(图版III—1),而此时期的保持系有少量淀粉粒开始形成(图版I—4)。在生殖细胞移向花粉边缘远离营养细胞之后,生殖细胞停止发育,营养细胞移向花粉边缘,细胞质局部呈现紊乱,外层内壁及内壁没有进行纤维化发育,仍停留在二胞花粉的早期水平上(图版III—2),液泡增大,吞噬部分细胞质,生殖细胞核和生殖核消失,花粉粒壁内陷,呈现不规则形状,有的花粉粒细胞质颗粒化,线粒体等细胞器随之解体(图版II—3,4)。

2.4 不育花药败育过程中的同工酶特征

正交不育(N8855 \times N2899) F_1 与反交可育(N2899 \times N8855) F_1 花药在四分体时期细胞色素氧化酶同工酶区带不存在差异。此后随着花粉发育到单核时期细胞色素氧化酶同工酶区带未变。但处于二胞花粉时期不育(N8855 \times N2899) F_1 与正常可育(N2899 \times N8855) F_1 花药之间表现出差异,不育花药中与溴酚蓝指示剂重叠的迁移最快区带缺失。显然,不育花药败育时期与细胞色素氧化酶同工酶特

征带的缺失基本同步。

与正常可育 NJCMS1B 及可育 (N2899 × N8855)F₁ 比较, NJCMS1A、BC₁ 不育株、BC₂ 不育株的花药均缺失迁移最快区带, 而 N8855 与 BC₂ 可育株花粉出现最快区带, 因此质核互作雄性不育材料 NJCMS1 可能与细胞色素氧化酶有关。

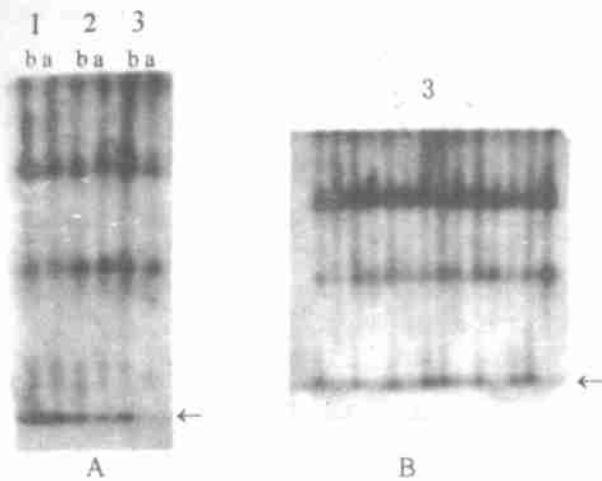


图 1 花药发育过程中的细胞色素氧化酶同工酶图谱
Fig. 1 Cytochrome oxidase isozyme pattern of anther development
A: (1). tetrad stage; (2). mononucleate stage; (3). binucleate stage a. (N2899×N8855)F₁, b. (N8855×N2899)F₁
B: 1 (N2899×N8855)F₁; 2 (N8855×N2899)F₁; 3 5 8 10 NJCMS1B; 4 BC₁ male-sterile plant; 6 14 BC₂ male-sterile plant; 7 N8855; 9 11 NJCMS1A; 12 13 BC₂ male-fertile plant(from left to right; 1→14)

3 讨论

3.1 大豆质核互作雄性不育材料小孢子败育发生的细胞学依据

对被子植物 13 个科 26 个属的 38 种植物的 小孢子败育的研究, 发现约 70% 的植物败育发生在四分体形成之前, 多数双子叶植物的败育发生在四分体形成之前, 多数单子叶植物的败育发生在到达或接近二核花粉粒期^[10]。大豆属双子叶植物, 但质核互作不育系 NJCMS1A 及其来源世代 F₁、BC₁ 的小孢子败育却分别发生在四分体期之后的单核靠边期至二胞花粉期, 并且本大豆质核互作不育系小孢子的败育在较短的时间内完成。

大豆核不育材料如同多数双子叶植物的败育发生在造孢组织至四分体阶段, 但不局限于某一个特别时期, 变异幅度较大, 大致可分为三个阶段: 1. 造

孢组织一小孢子母细胞时期 (msp)。2. 减数分裂时期, 如 ms1、ms4、ms6、st2、st3、st4、st5、NJ89—1、NJ89—2。3. 四分体时期, 如 ms2、ms3。在这三个阶段中, 又以减数分裂时期最常发生败育。13 个突变体其中有 10 个突变体是在此时期发生败育的^[11]。而所发现的具有质核互作雄性不育机制的 (N8855×N2899)F₁ 与 BC₁ 不育株小孢子败育主要发生在单核靠边期之后。经回交选育的质核互作雄性不育系 NJCMS1A 败育发生在二胞花粉时期, 其明显特征发生在生殖细胞远离营养细胞期。其败育时期迟、败育特征均异于已报道的核不育材料^[1, 2, 11]。红芒野生稻莲塘早的 6 个回交世代 (B₂F₁~B₇F₁) 的花粉败育现象没有明显差异^[12], 而本文同一胞质不同世代的 F₁、BC₁、NJCMS1A 出现观察结果不完全一致的花粉败育细胞学现象, 可能与固定材料时的环境差异、各世代核背景不一致及光镜与电镜观察不好作比较有关, 这种随回交世代败育略有差异的现象是否由于回交次数还是环境的原因尚待进一步验证。

3.2 花粉败育过程的细胞色素氧化酶同工酶

大豆雄性不育的花粉败育过程中, 细胞色素氧化酶区带数目减少, 迁移最快区带缺失, 说明大豆的育性可能与花粉粒形成时和败育时基因的表达或调节有关。因取材所限, 细胞色素氧化酶活性变化未测。对玉米雄性不育系幼苗和花药的线粒体研究时, 发现不育系的细胞色素氧化酶活性降低和区带数减少^[13]。戴尧仁等^[9]研究了水稻不育系的过氧化物酶, 细胞色素氧化酶和游离组蛋白, 认为对于质核互作型的水稻不育系在花粉败育的关键时刻, 花药中过氧化物酶总活性和同工酶数都有所提高, 而细胞色素氧化酶的活性下降, 区带数减少。本实验结果与上述一致。细胞色素氧化酶由线粒体 DNA 编码的 cox I、cox II、cox III 和核基因编码的大小亚基组成, 其活性和区带是由线粒体基因组和核基因组联合表达的结果。正交组合 (N8855×N2899)F₁ 与反交组合 (N2899×N8855)F₁ 的核完全一致, 不育系 NJCMS1A 及保持系 NJCMS1B 的核也基本一致, 二胞花粉时期细胞色素氧化酶最快活性带的缺失可能与线粒体基因组有关, 7 个探针 cox I、cox II、atp A、atp6、atp9、rm18S、rrn26S 中仅 cox I、rrn26S 在不育系与保持系 mtDNA 间检测到多态性 (结果另文发表), 其与线粒体有关的不育机制尚待研究; 二胞花粉时期的 N8855、BC₁ 不育株、BC₂ 不育株及可育株、不育系 NJCMS1A 及保持系 NJCMS1B 花药,

其中不育株均缺失细胞色素氧化酶最快活性区带,从另一个侧面说明大豆 NJCMS1 可能与细胞色素氧化酶有关。

参考文献

- 1 戴尧仁,孙振荣,徐月荣,等.水稻二九南一号雄性不育系及相应保持系花药中某些呼吸酶和游离组蛋白的比较研究[J].遗传学报,1978,5(3):227~233.
- 2 丁德荣,盖钧镒,崔章林,等.大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 及其保持系 NJCMS1B 的选育与验证[J].科学通报,43(17):1901~1902.
- 3 孙襄,赵丽梅,黄梅.大豆质核互作不育系研究[J].科学通报,1994,38(16):1535~1536.
- 4 武汉大学遗传研究室,红芒野稻—莲塘早不育系花粉败育过程的细胞形态学观察[J].植物学报,1978,20(2):150~155.
- 5 许占友,李磊,邱丽娟,等.大豆三系的选育及恢复基因的 SSR 初步定位研究[J].中国农业科学,1999,32(2):32~38.
- 6 杨守萍,盖钧镒,徐汉卿.大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的遗传

- 与细胞学研究[J].大豆科学,1998,17(1):32~38.
- 7 张磊,戴瓯和.大豆质核互作雄性不育系 W931A 的选育[J].中国农业科学,1997,30(6):90~91.
- 8 Davis W. H. Route to hybrid soybean production[J]. U. S. Patent. 1985, 4 545 146.
- 9 Gai Junyi, Cui zhanglin, Ji Dongfeng, et al. A report on the nuclear cytoplasmic male sterility from a cross between two soybean cultivars [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1995, 22: 55~58.
- 10 Jin Wei, Horner H T, Padmar R G. Genetics and cytology of a new genic male-sterile soybean[*Glycine max* (L) Merr] [J]. Sexual Plant Reproduction. 1997, 10(1): 13~21.
- 11 Lasek K. D. N. R. Lersten. Anatomy and cytology of microsporangogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms[J]. Bot. Rev., 1972, 38(3): 425~454.
- 12 Robert A. Grayboach, Palmer R. G., Male sterility in soybean: an overview[J]. American J. Bot. 1988, 75(1): 144~156.
- 13 Watson, C. V., J. Possible mitochondrial involvement in mechanism of cytoplasmic male sterility in maize (*Zea mays* L.) [J]. Nath and Dave Nanda. Biochem Genetics. 1977, 15: 1113~1124.

图版说明

vc. 营养细胞 gc. 生殖细胞 sg. 淀粉粒 gp. 萌发孔 v. 液泡

图版 I 1—3、6—8 与图版 II 1—3 为石蜡切片图像;图版 I 4—5 与图版 II 4—7 为透射电镜照片

图版 I 1. 四分体期, 示四分体包被在胼胝质中。×600 2. 单核早期小孢子。×400 3. 单核晚期, 胞质稠密。×400 4. 二胞花粉初期, 淀粉粒开始形成。×5000 5. 二胞花粉后期, 生殖细胞由圆形发育为梭型, 淀粉粒大量成簇积累, 内壁形成, 外壁内层纤维化。×6000 6. 单核早期, 核仁位于小孢子中央。×400 7. 单核晚期, 小孢子发生质壁分离, 细胞质产生不正常的空泡, 部分小孢子细胞质收缩。×400 8. 二胞花粉期, 小孢子细胞质解体。×400

图版 II 1. 单核晚期, 小孢子发生质壁分离, 小孢子细胞质收缩。×400 2. 二胞花粉期, 小孢子细胞质解体。×400 3. 个别小孢子出现 2 个核仁。×800 4. 二胞花粉初期, 原生质内出现不规则小液泡, 未见淀粉粒形成。×4000 5. 二胞花粉后期, 生殖细胞停止发育, 细胞质局部呈现紊乱, 外层内壁及内壁停止发育。×3500 6. 液泡增大, 吞噬部分细胞质。×10000 7. 生殖核及营养核解体, 外层内壁未纤维化。×4000

Explanation of Plates

gc. Generative cell vc. Vegetative cell v. vacuole sg. Starch grain Plate I Fig. 1—3, 6—8 and Plate II Fig. 1—3 are micrographs of candle section, Plate I Fig. 4~5 and Plate II Fig. 4—7 are electron micrographs Plate I Fig. 1. tetrad stage with thick callose around tetrads ×600 Fig. 2. early microspore stage showing released, individual microspores ×400 Fig. 3. late microspore stage with thick cytoplasm ×400 Fig. 4. binucleate pollen, starch grains begin forming ×5000 Fig. 5. late binucleate pollen, generative cells become spindle shape, mature pollen grains are filled with globular starch grains, endexine becomes fiber ×6000 Fig. 6. early mononucleate micropore stage ×400 Fig. 7. late mononucleate microspore stage, with contraction cytoplasm ×400 Fig. 8. vacuolization of microspore ×400

Plate II Fig. 1. late mononucleate microspore stage, cytoplasm segregate from microspore wall ×400 Fig. 2. cytoplasm disintegrated ×400 Fig. 3. 2—3 nucleus in cytoplasm ×800 Fig. 4. binucleate stage showing more number of small irregular vacuoles in pollen cytoplasm and no starch grain formation ×4000 Fig. 5. generative cells stop developing, part of cytoplasm disordered ×3500 Fig. 6. vacuoles expanded ×10000 Fig. 7. disappear

ing of generative cell and vegetative cell, no fiber of endexine (arrow) $\times 4000$

CYTOLOGICAL STUDIES ON POLLEN ABORTION IN CYEOPASMIC—NUCLEAR MALE STERILE SOYBEAN LINS NJCMS1A

Ding Derong Gai Junyi

*(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University; National Center of
Soybean Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095)*

Abstract Comparative observation on microspore development in cytoplasmic—nuclear male sterile soybean material, such as (N8855 \times N2899) F_1 , BC_1 male sterile plants, NJCMS1A and its fertile counterpart (N2899 \times N8855) F_1 , maintainer line, was made with light and transmission electron microscopy. The result showed the abortion appearance of the different generations with the same cytoplasm was similar, pollen abortion occurred majorly from late mononucleate stage to binucleate stage. The abnormal vacuoles in microspore in (N8855 \times N2899) F_1 male sterile anther occurred at late mononucleate microspore stage. Plasmodium shriveled at mature pollen grain. The partial cytoplasm disintegrated, and 2—3 nucleus were found in some microspores in BC_1 sterile plants. Pollen abortion of NJCMS1A occurred at the stage of binucleate pollen. There appeared more small vacuoles in microspore cytoplasm of NJCMS1A than that of its maintainer line at the stage that generative cell closed to vegetative cell, starch grains not being produced in cytoplasm. After generative cell was away from vegetative cell, part of cytoplasm disordered, generative and vegetative nuclei further degenerated, vacuoles expanded, part of cytoplasm disintegrated, and the development of endexine was completely inhibited. Isozyme analysis indicated that the fastest cytochrome oxidase active band missed at binucleate stage, which was consistent with the result of the pollen abortion phase. Thus, the mechanism of the cytoplasmic—nuclear male sterility was probably associated with cytochrome oxidase.

Key words Soybean; Cytoplasmic—nuclear male sterility; Microspore development; Cytochrome oxidase

