

高羊茅雄性不育小孢子败育的细胞学及生理生化特性

陈伟, 付薇, 吴佳海, 钟理, 王小利, 韩永芬*, 舒健虹

贵州省草业研究所, 贵阳550006

摘要: 以高羊茅不育株 $ms6111$ 和可育株MF111为试验材料, 对其小孢子母细胞减数分裂和雄配子体发育过程及其相关的生理生化特征进行研究。结果表明, $ms6111$ 的小孢子母细胞从减数分裂前期I至单核靠边期明显存在着落后染色体、染色体桥和断片、微核、单价染色体、不均等分离、分裂不同步、游离染色体、三分体、五分体、60°纺锤体、染色体缺失、染色体减少等异常现象, 初步分析这些异常现象是导致 $ms6111$ 花粉败育的重要细胞学原因。造孢细胞期至散粉期, $ms6111$ 花药中的游离脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖含量、SOD、CAT活性显著低于同时期的MF111, 但MDA含量、POD活性却始终高于MF111, 随着小孢子发育, MDA含量和POD活性呈逐步上升趋势。体内糖类物质、抗氧化酶代谢紊乱、游离脯氨酸亏损及MDA积累可能是引起 $ms6111$ 小孢子败育的生理学原因之一。

关键词: 高羊茅; 雄性不育; 小孢子发育; 生理生化

植物雄性不育是在植物有性繁殖过程中, 由于生理上或遗传上的原因造成植物的雌性器官正常, 雄性器官不正常, 不能产生花粉或花粉败育而不能授粉的现象(Engelke和Tatlioglu 2000)。目前, 国内外在蔬菜、粮油作物上广泛利用雄性不育系制种(Chaubal等2000; 张永兵等2011; 杜士云等2012), 牧草及草坪草雄性不育的研究利用十分少见。由于牧草和草坪草主要利用对象是茎叶, 而不是子实体, 并可采用无性繁殖办法保存雄性不育植株, 对这类牧草及草坪草在没有找到保持系之前, 只要有雄性不育植株与杂交父本品种也可以制种。因此, 应用雄性不育系进行牧草杂交育种, 将是一条有效的途径, 比农作物利用雄性不育要简便得多, 优越很多。

高羊茅(*Festuca arundinacea* Scherb.)是禾本科羊茅属的一种多年生草本植物。根据不同选育目标, 可选育优良牧草及草坪草品种。目前, 高羊茅的研究主要集中在常规育种、栽培管理、抗性生理等方面(刘慧霞等2011; 马向丽等2015; 宋锐等2016), 有关高羊茅雄性不育小孢子败育的细胞学及生理生化动态研究国内少见。1998年, 贵州省草业研究所在贵州独山试验基地发现1株高羊茅天然雄性不育株, 并对该品系进行了形态学的初步鉴定, 1999~2001年连续三年对其套袋自交均未正常结实(吴佳海等2001), 将该原始不育株进行隔离分株扩繁, 得到 $A_1 \sim A_{10}$ 10份不育株。课题组以选育的高产优质牧草型高羊茅111为父本, 不育株 A_6 为母本进行杂交配对, F_1 群体并未出现性状分离, 育性正常, 其后, 将 F_1 群体自交, F_2 群体中可育株与不育

株的分离比例经卡平方检验复合3:1, 从中筛选出1份隐性核不育雄性不育(genic male sterility, GMS)材料 $ms6111$, $ms6111$ 比对照Fawn生育期长10 d以上, 鲜草产量比对照增产15%以上。为了尽早利用该份材料培育新的优良杂种, 项目拟以不育株 $ms6111$ 为研究对象, 通过小孢子败育的细胞学和生理生化特征研究, 探索高羊茅雄性不育发生机理, 为今后高羊茅雄不育花期细胞学鉴定及不育系选育利用提供科学依据。

材料与方法

1 试验材料

以贵州省草业研究所选育的高产优质牧草型高羊茅(*Festuca arundinacea* Scherb.) MF111为父本, 不育株 A_6 为母本进行杂交配对, 从 F_2 群体中筛选出1株GMS材料 $ms6111$, 以MF111为对照, 开展高羊茅花粉母细胞减数分裂及相关细胞生理学研究。试验材料均来自于贵州省草业研究所高羊茅育种圃。

2 试验方法

2.1 小孢子发育进程及染色体行为观察

采用连续取材观察的方法于早晨9:00至中午12:30, 选取 $ms6111$ 和MF111不同部位、生长健康的小穗, 用卡诺氏固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)于

收稿 2017-05-19 修定 2017-08-03

资助 贵州省科学技术基金(J20132151)和高层次创新型人才培养项目(RC20164024)。

* 通讯作者(E-mail: 442694189@qq.com)。

室温下固定3 h后, 95%的乙醇清洗3次, 转入70%乙醇中, 4°C冰箱保存。采用压片法制取减数分裂制片。用镊子夹取花药, 将其置于载玻片上, 加1滴卡宝品红进行染色, 然后用镊子夹破花粉囊, 挤出小孢子母细胞, 并尽可能地将其夹碎, 去残渣, 染色1~3 min后, 加盖玻片并紧压, 使小孢子母细胞进一步分散, 用吸水纸吸去多余的染色剂后于日本OLYMPUS公司BH-2型多功能光学显微镜下镜检, 并统计小孢子发育进程中染色体异常情况的频率。

2.2 生理生化指标测定

以不育株*ms6111*花蕾为材料, 可育株MF111为对照, 分4个时期进行生理生化指标测定(盛云燕等2016): 时期1, 造孢细胞期(花药长度<0.07 cm); 时期2, 减数分裂时期(花药长度0.07~0.18 cm); 时期3, 花粉粒成熟期(花药长度0.18~0.35 cm); 时期4, 散粉期(花药长度>0.35 cm)。可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝G-250法; 游离脯氨酸含量测定采用茚三酮比色法; 可溶性糖含量测定采用蒽酮法; 丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸反应法; 过氧化物酶(peroxidase, POD)活性测定采用愈创木酚法; 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定采用紫外吸收法; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性采用氮蓝四唑光化还原法。实验设3次重复, 利用Microsoft Excel 2003软件进行数据处理, SPSS软件进行统计分析。

实验结果

1 可育株MF111小孢子母细胞减数分裂及雄配子体发育

高羊茅的造孢组织是由孢原细胞分裂所产生的初生造孢细胞, 由几次有丝分裂后逐步形成, 并由造孢组织转化为小孢子母细胞进入减数分裂。通过2次减数分裂, 小孢子母细胞分裂成4个小孢子, 期内染色体数目减半成为单价体。最后, 单价体小孢子进一步发育, 形成成熟花粉粒。可育株MF111减数分裂时期染色体行为及雄配子体发育特征如下:

第1次减数分裂时期: 细线期是减数分裂的开始, 这一时期细胞核增大并出现细丝状染色体, 染色质浓缩缠绕成线团状, 在这一时期染色体长度

最大, 在核范围内簇拥到核的一边(图1-A)。偶线期同源染色体联会配对, 染色体开始分散, 染色体比细线期明显松散, 颜色较浅, 但仍为较长的细线(图1-B)。粗线期染色体进一步短缩加粗, 线性化明显, 细胞逐步由椭圆球体向圆球体转变(图1-C)。双线期染色体进一步螺旋缩短变粗, 非姊妹染色单体之间发生片段互换, 组成二价体的2条同源染色体发生互斥作用而彼此分离, 但不完全分离(图1-D)。终变期二价体高度浓缩, 交叉端化, 中间交叉数目减少, 呈现出“纽扣状”的形态, 在非同源染色单体交换的地方有一交叉点, 形成V状、X状、8状、O状的二价体(图1-E~G), 同时核仁变小并逐渐消失, 二价体分散于核膜内缘。到了中期I, 染色体高度凝缩, 二价体整齐地聚集在赤道板上, 纺锤体形成, 核膜、核仁消失, 从极面看, 全部染色体排列的数目和形态最为清晰(图1-H)。后期I联会的染色体在纺锤丝的牵引下逐步移向两极, 彼此分开, 父母的染色体重组, 发生基因组的变异, 同时染色体数目减半(图1-I)。末期I染色体移到两极后松散变细(图1-J), 核膜重建, 核仁重新出现, 逐渐形成2个子核, 是为二分体(图1-K)。至此, 第1次减数分裂完毕。

第2次减数分裂时期: MF111小孢子母细胞在第一次减数分裂完毕之后, 细胞核没有DNA复制, 间期短, 间期过后紧接着进入前期II(图1-L)和中期II时期, 这时可以看到每条染色体都有2条姐妹染色单体由着丝粒连接在一起, 随后集中在各自的赤道板上(图1-M)。后期II各条姐妹染色单体发生分离, 在纺锤丝的牵引下向细胞两极移动(图1-N)。此后, 染色体被拉向两极, 染色体解体螺旋, 纺锤丝消失, 核膜、核仁出现, 染色体又变细长, 形成4个圆形的新核, 是为末期II(图1-O)。随着分裂进行, 核周围形成细胞壁, 细胞质分裂, 各孢子之间形成胼胝质, 4个子细胞紧密相连发育成四分体小孢子(图1-P)。

雄配子体发育: 四分体初期细胞壁不明显、细胞质浓厚, 随着小孢子的发育, 孢子间的胼胝质溶解, 小孢子彼此分离, 释放出圆球形的小孢子, 接着细胞壁逐渐加厚, 细胞质变浓厚, 细胞核收缩位于细胞中央称单核居中期(图1-Q)。小孢子从绒毡层吸收水分和养分使得细胞质液泡化, 多个小

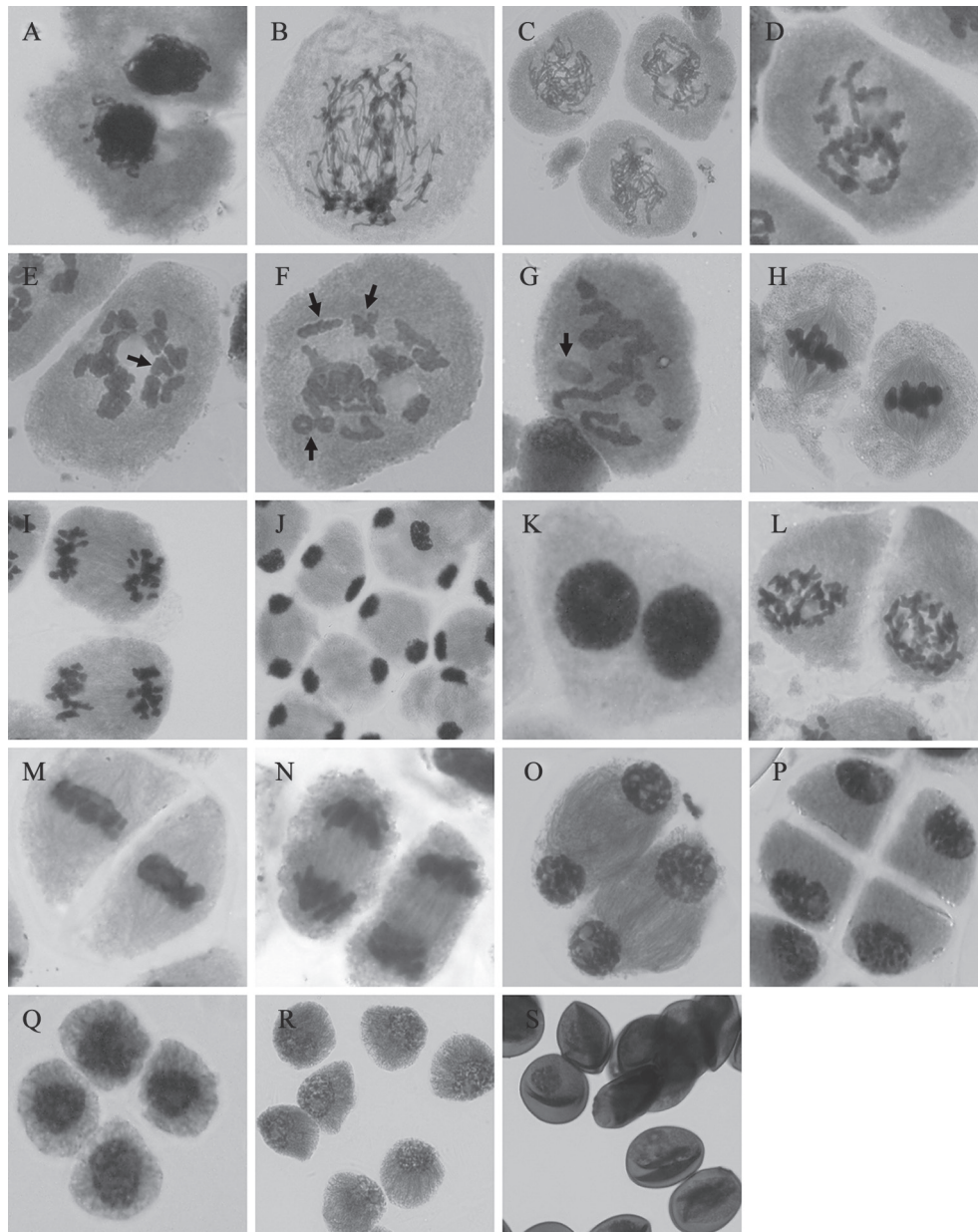


图1 高羊茅可育株MF111小孢子母细胞减数分裂及雄配子体发育过程

Fig.1 The microspore mother cell meiosis and male gametophyte development process of male fertile plant MF111

A: 细线期, ×800; B: 偶线期, ×800; C: 粗线期, ×800; D: 双线期, ×800; E: 终变期V型染色体, ×800; F: 终变期8型、棒型、X型染色体, ×800; G: 终变期O型染色体, ×800; H: 中期I, ×800; I: 后期I, ×800; J: 末期I, ×800; K: 二分体, ×800; L: 前期II, ×800; M: 中期II, ×800; N: 后期II, ×800; O: 末期II, ×800; P: 四分体时期, ×800; Q: 单核居中期, ×800; R: 单核靠边期, ×800; S: 成熟花粉粒, ×800。

液泡融合后将细胞质和细胞核挤压到细胞的一侧紧贴细胞壁, 称为单核靠边期(图1-R)。此后细胞核经过1次有丝分裂后成为2个子核, 较小子核靠近花粉壁是为生殖核, 较大的子核处于细胞的近中央, 为营养核, MF111花粉授粉前生殖核停止分裂, 是二核花粉, 至此成熟花粉粒发育完成(图1-S)。

2 不育株 $ms6111$ 小孢子母细胞减数分裂及雄配子体发育

共观察 $ms6111$ 减数分裂前期I至花粉粒成熟时期的细胞758个, 异常细胞数量465个, 异常率为61.35% (表1), 与可育株MF111相比, 小孢子母细胞从减数分裂前期I就开始分裂异常, 主要存在落后染

表1 减数分裂各时期 $ms6111$ 小孢子母细胞分裂异常频率Table 1 Frequency of microspore mother cells of $ms6111$ in each stage of meiosis

异常现象	减数分裂时期	异常细胞数	异常细胞频率/%
落后染色体	中期I、后期I、末期I、中期II、后期II、末期II	132	17.41
染色体桥和断片	后期I、后期II	78	10.29
微核	间期、后期II、末期II、四分体时期、单核居中期、单核靠边期	164	21.64
单价染色体	前期I	9	1.19
不同步分裂	间期、中期II、后期II、末期II	45	5.94
不均等分离	后期I、末期I、中期II	10	1.32
60°纺锤体	中期II	5	0.66
三分体		3	0.40
五分体		1	0.13
染色体缺失		4	0.53
游离染色体		14	1.85

染色体、染色体桥和断片、微核、单价染色体、不同步分裂、不均等分离、三分体、五分体、游离染色体、染色体缺失、60°纺锤体等异常现象。

落后染色体: 小孢子母细胞减数分裂时, 有17.41%的染色体在减数分裂中期I、后期I、末期I、中期II、后期II、末期II, 因纺锤体被破坏, 导致染色体不同步移动或者不移动成为落后染色体(图2-A~C), 随着减数分裂的进行, 这些落后染色体或正常进入下一个分裂相, 或消失在细胞质中, 或停留在细胞板处最终形成微核, 造成了遗传物质分配的不平衡。

染色体桥和断片: 减数分裂后期I、后期II和末期II, 10.29%的染色体因为臂内倒位, 1条染色体同时具有2个着丝粒, 在减数分裂的后期2个着丝粒分别向两极移动, 从而导致染色体被拉紧形成染色体桥(图2-D和E), 随着分裂进行, 染色体桥被拉断, 虽然可以进入子细胞核内, 但最终因为有缺失很大导致配子死亡, 形成染色体断片(图2-F和G), 这些断片常常以微核的形式存在于以后的减数分裂中, 因某些染色体断片上面存在着重要的育性基因, 一旦染色体断裂, 基因功能丧失, 必然导致 $ms6111$ 形成的配子不育。

微核: 微核是由异常分裂细胞中的断片、落后染色体形成的。在 $ms6111$ 小孢子母细胞减数分裂中, 间期、后期II、末期II、四分体时期、单核居中期、单核靠边期都有微核出现(图2-H~J), 异常细胞频率高达21.64%, 在全部分裂异常现象中所占比例最大。雄配子体发育过程中, 4个小孢子都具微核的情况比较常见, 甚至1个小孢子里面同

时具有5个微核(图2-K)。

单价染色体: 减数分裂前期I共发现有5个小孢子母细胞在减数分裂中因为游离染色体没有同源染色体存在, 所以不能配对, 成为单价染色体(图2-L和M), 该异常行为发生频率为1.19%。这些单价染色体比配对的同源染色体行动迟缓, 有的在第一次减数分裂中期时偏离赤道板, 有的或成为静止染色体, 进而导致变异。

不同步分裂: 减数分裂的间期、中期II、后期II、末期II四个时期, 有5.94%的小孢子母细胞, 2个子细胞染色体分裂周期不一致, 有的子细胞内染色体仍处于间期, 但另一个子细胞染色体已经位于赤道板平面, 或是有的子细胞染色体还位于赤道板平面, 但另一个子细胞染色体已经开始向两极移动(图2-N~P)。

不均等分离: $ms6111$ 小孢子母细胞在减数分裂后期I、末期I、中期II, 1.32%的细胞因纺锤丝异常, 引起同源染色体各自向两极移动时发生不均等分离(图2-Q和R)。出现这一异常现象的原因有多种, 不配对的单价体随机分配、分裂时不发生分离的二价体被同时拉向一极, 或者双着丝粒染色体发生到位被拉向同一极, 从而导致2个子细胞或纺锤丝两极染色体数目不均, 花粉败育。

其他异常小孢子母细胞: 除落后染色体、染色体桥和断片、单价染色体、微核、不同步分裂、不均等分离等异常现象外, $ms6111$ 小孢子母细胞还存在有三分体(图2-S)、五分体(图2-T)、染色体缺失(图2-U和V)、游离染色体(图2-W)、60°纺锤体(图2-X)等异常现象。

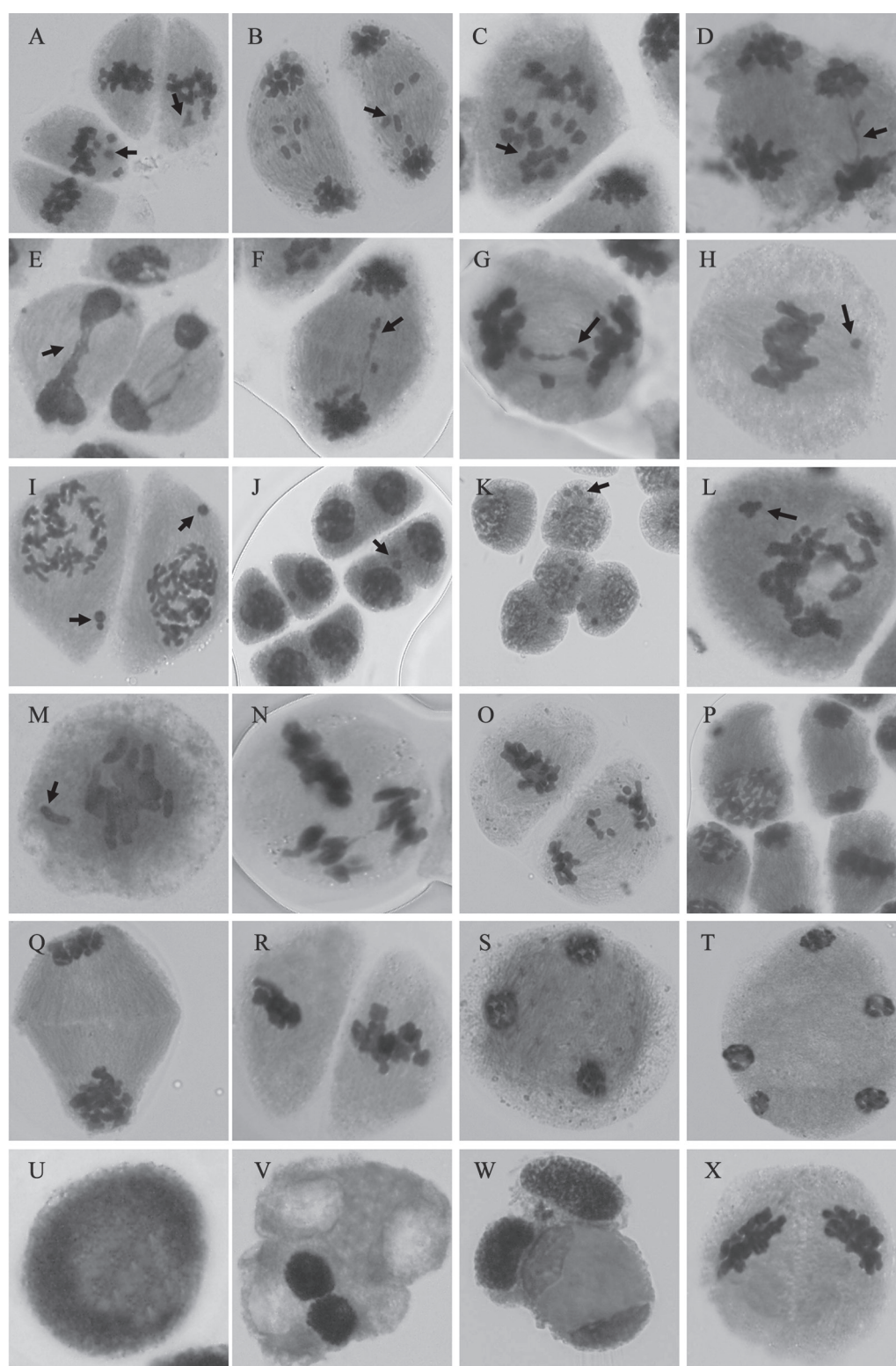


图2 高羊茅不育株 $ms6111$ 小孢子母细胞减数分裂及雄配子体发育异常现象

Fig.2 Abnormal behavior during microspore mother cell meiosis and male gametophyte development process of male sterile plant $ms6111$

A~C: 落后染色体, $\times 800$; D~G: 染色体桥和断片, $\times 800$; H~J: 微核, $\times 800$; K: 单核靠边期1个小孢子内5个微核, $\times 800$; L和M: 单价染色体, $\times 800$; N~P: 不同步分裂, $\times 800$; Q和R: 不均等分离, $\times 800$; S: 三分体, $\times 800$; T: 五分体, $\times 800$; U和V: 染色体缺失, $\times 800$; W: 游离染色体, $\times 800$; X: 60° 纺锤体, $\times 800$ 。

3 高羊茅小孢子发育各时期生理生化指标变化

3.1 游离脯氨酸含量

由图3可以看出,在小孢子发育过程中,可育株MF111花器官中脯氨酸一直处于持续积累的状态,含量一直平稳增加,到花粉粒成熟期游离脯氨酸含量达最高 $79.56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),而不育株 $ms6111$ 的游离脯氨酸含量4个时期都显著低于同时期MF111,尽管从造孢细胞期到减数分裂期有小幅增加,但减数分裂期至花粉粒成熟期含量增加缓慢,散粉期 $ms6111$ 游离脯氨酸含量仅 $28.99 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),不足同期MF111游离脯氨酸含量 $63.13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)的50%,几乎没有游离脯氨酸的累积。

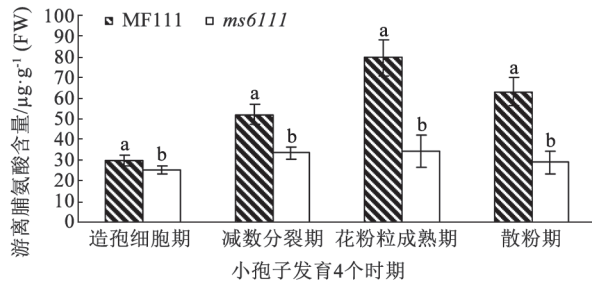


图3 高羊茅小孢子发育各时期花药游离脯氨酸含量
Fig.3 Free proline contents in microspore at different periods of tall fescue

图中不同的小写字母表示同一时期可育株MF111和不育株 $ms6111$ 的生理生化指标在0.05水平的显著性差异,下图同此。

3.2 可溶性蛋白含量

由图4可以发现, $ms6111$ 和MF111两份材料的可溶性蛋白含量都随着小孢子的发育出现下降趋势,两者从造孢细胞期的 $6.00 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)和 $7.89 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)分别下降至散粉期的 $2.02 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)和 $3.56 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),整个过程 $ms6111$ 花器官中可溶性蛋白含量始终显著低于同期的MF111,其中减数分裂期含量差距最显著,前者仅为后者的46.8%和48.0%。MF111在造孢细胞期至散粉期可溶性蛋白含量呈平缓下降趋势, $ms6111$ 从造孢细胞期至减数分裂期下降幅度较大,减数分裂期至散粉期下降趋势平缓。

3.3 可溶性糖含量

由图5可以看出, $ms6111$ 和MF111两份材料的可溶性糖含量从造孢细胞期至散粉期都呈现先上升而后下降的趋势,且4个时期 $ms6111$ 的可溶性糖含量

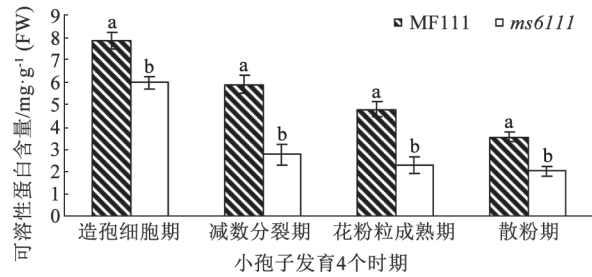


图4 高羊茅小孢子发育各时期花药可溶性蛋白含量
Fig.4 Soluble protein contents in microspore at different periods of tall fescue

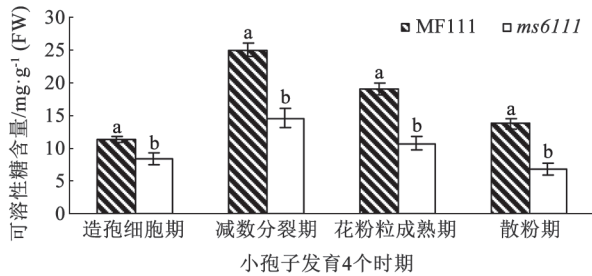


图5 高羊茅小孢子发育各时期花药可溶性糖含量
Fig.5 Soluble sugar contents in microspore at different periods of tall fescue

都显著低于同时期MF111的可溶性糖含量, MF111可溶性糖含量在减数分裂期最高达 $25.07 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),而 $ms6111$ 同时期仅为 $14.61 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。

3.4 MDA含量

由图6可知,在小孢子的发育过程中, MF111花器官中MDA含量的变化趋势为上升-下降-上升,在散粉期含量最高达 $12.36 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),而 $ms6111$ MDA含量则一直呈现上升趋势,其MDA含量均显著高于同时期的MF111,散粉期最高达 $23.83 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),是MF111的1.93倍。

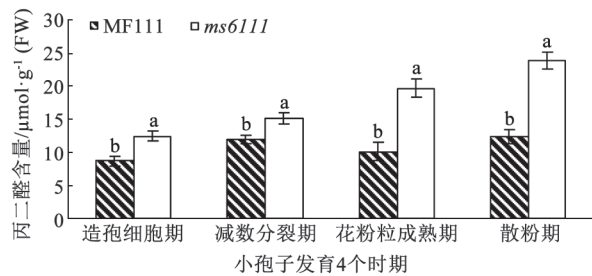


图6 高羊茅小孢子发育各时期花药MDA含量
Fig.6 Malondialdehyde contents in microspore at different periods of tall fescue

3.5 SOD活性

如图7可知, *ms6111*和MF111花器官的SOD活性随着小孢子的生长发育都是逐渐下降的, *ms6111* SOD活性在小孢子发育各阶段均显著小于MF111同期水平, *ms6111*的下降幅度大于可育株, 在造孢细胞期, *ms6111*的SOD活性为MF111的76.5%, 到了散粉期后, *ms6111*的SOD活性仅为MF111的31.5%。

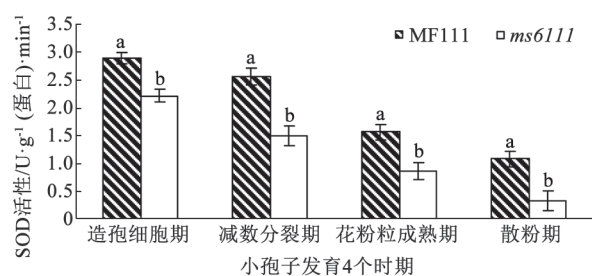


图7 高羊茅小孢子发育各时期花药SOD活性

Fig.7 SOD activity in microspore at different periods of tall fescue

3.6 POD活性

由图8可以发现, *ms6111*和MF111的花蕾在发育的4个时期, POD活性呈现相反的变化趋势, 可育株MF111的POD活性从造孢细胞期的 $2.36 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{蛋白}) \cdot \text{min}^{-1}$ 下降至散粉期的 $1.23 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{蛋白}) \cdot \text{min}^{-1}$, 不育株*ms6111*的POD活性则从造孢细胞期的 $1.86 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{蛋白}) \cdot \text{min}^{-1}$ 上升至散粉期的 $2.39 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}(\text{蛋白}) \cdot \text{min}^{-1}$ 。

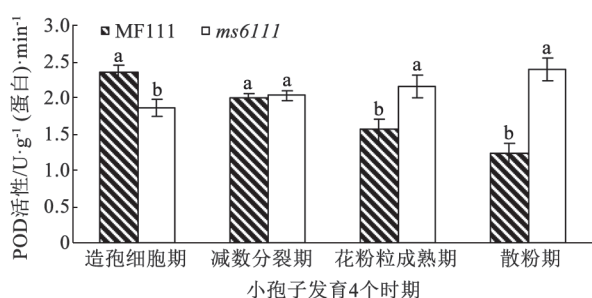


图8 高羊茅小孢子发育各时期花药POD活性

Fig.8 POD activity in microspore at different periods of tall fescue

3.7 CAT活性

如图9可知, 可育株MF111的CAT活性随着小孢子发育快速上升, 不育株*ms6111*的CAT活性整体呈缓慢上升的趋势, 且始终保持在较低的水平, 不

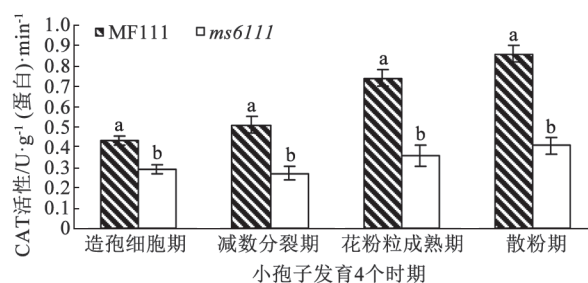


图9 高羊茅小孢子发育各时期花药CAT活性

Fig.9 CAT activity in microspore at different periods of tall fescue

育株*ms6111*的CAT活性在小孢子发育的各个阶段均显著低于MF111同期活性水平, 到散粉期, *ms6111*的CAT活性仅为可育株MF111的47.7%, 可见不育株*ms6111*的CAT代谢并不旺盛。

讨 论

1 不育株小孢子败育的特点

研究表明, 植物基因组中80%的遗传信息可在配子体时期进行表达, 减数分裂不正常是导致雄性不育的主要原因之一(Noyes 2005)。减数分裂过程中染色体行为异常, 如落后染色体、染色体桥、微核, 均能造成遗传物质丢失及染色体的不均匀分配, 由于不能具有完整的染色体, 非整倍体配子部分基因丢失, 由此导致花粉败育(奚晓军等2015)。安洪周等(2013)、张小全等(2007)、赵艳等(2014)分别在小麦、棉花、百合的研究中发现, 雄性不育系小孢子母细胞减数分裂的各个时期都可观察到形态各异的染色体异常现象, 如落后染色体、染色体桥及断片、微核、单价染色体、游离染色体等。豆丽萍等(2009)在对不同类型的棉花雄性不育研究中发现, 在减数分裂前期I, 有少量的核仁穿壁现象, 同时存在小孢子母细胞多核仁、染色体行为异常等现象。本试验以优良牧草型高羊茅111为父本, 与雄不育株A₆为母本进行杂交获得了F₁, F₁自交筛选出1株GMS材料*ms6111*, 与可育株MF111相比, 不育株*ms6111*的小孢子母细胞从减数分裂前期I就出现染色体异常分裂现象, 落后染色体、染色体桥和断片、微核、单价染色体、不同步分裂、不均等分离、三分体、五分体、游离染色体、染色体缺失、60°纺锤体等异常现象出现频率高达61.35%, 其中落后染色体、染

染色体桥和断片、微核发生频率最高,分别高达17.41%、10.29%、21.64%。

2 不育株小孢子败育的关键时期

花药败育是一个过程,通常花粉或小孢子群体大量发生败育的时期被称为花粉败育时期,但不是唯一的时期(Park等2004)。不同类型的不育系,其控制花粉败育的基因数量较多,因此花粉败育的关键时期会因为基因的表达时期以及基因作用机制不同而异(Hanson和Bentolila 2004)。在对隐性核不育雄性不育植物小孢子败育关键时期的研究上,报道最多的是油菜和水稻的隐性核不育。张雪梅和董振生(2009)研究发现,受3对隐性基因互作控制的油菜核不育材料‘1665’,小孢子主要在四分体时期出现异常,因花粉母细胞分裂不均等或分裂异常,导致三分体、五分体大量存在发生败育;双隐性核不育材料‘11AB-1’所有雄蕊均可正常发育形成大而圆的花粉囊,但在花粉母细胞增殖期,花粉母细胞形成数量少,无法进行正常的减数分裂导致小孢子败育,属花粉母细胞败育型(张咏梅等2016),这一研究结果与聂明建等(2007)对油菜隐性核不育‘86A’花药细胞学观察结果较为一致;贺国良等(2001)对光敏核不育水稻‘农垦58s’研究发现,小孢子败育发生关键时期在单核晚期,败育前,小孢子大量液泡化,最后只剩空腔不能正常形成花粉外壁。本研究材料隐性核不育 $ms6111$ 花药败育则有别于‘11AB-1’、‘86A’和‘农垦58s’, $ms6111$ 花粉母细胞大量存在,但从减数分裂前期I至单核靠边期,存在大量染色体异常分裂现象,其中后期I至四分体时期最为集中,推测这一段时期为 $ms6111$ 小孢子发生败育的关键时期。

3 不育株小孢子败育的生理生化特征

很多学者在对植物雄性不育这方面的研究中发现,游离脯氨酸、糖、蛋白质的含量与花粉育性息息相关。游离脯氨酸为花粉萌发和花粉管伸长提供重要能源和氮源,脯氨酸的缺乏可能会影响代谢物质结构等变化,从而导致小孢子败育。蛋白质是小孢子发生过程中积累的营养物质,许多研究认为蛋白质代谢紊乱引起营养失调是败育的主要原因。糖类是花药发育物质合成的原料物质,为小孢子发育提供能量物质,糖类物质的亏缺也会导致花粉活力降低或雄性不育发生。本试验

研究表明,不育株 $ms6111$ 花药内的游离脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖含量从造孢细胞期至散粉期就显著低于同时期可育株MF111花药内含量。伊风艳等(2014)、高营营(2014)、高国训等(2013)在苜蓿、甘蓝、芹菜方面的研究中也指出,小孢子发育关键时期游离脯氨酸、蛋白质、糖类物质的缺乏会直接影响小孢子正常的新陈代谢进行,从而导致花粉败育。膜脂稳定是维持细胞正常生命活动的基本条件,丙二醛作为植物脂质过氧化的一个重要指标,在小孢子发育时期的大量积累会使细胞膜结构遭到破坏或损伤,从而引起细胞内生理生化代谢的紊乱。本研究的结果亦证实了这一结论,不育株 $ms6111$ 花药中丙二醛含量从造孢细胞期至散粉期均显著高于可育株含量,在花粉粒成熟期和散粉期含量约为MF111的1.9倍,这与盛云燕等(2016)、梁艳荣等(2006)、王晓林等(2013)分别在甜瓜、胡萝卜、辣椒方面的研究结果一致。

植物在利用氧的过程中,体内会形成一些有毒害作用的活性氧,这些活性氧会对植物产生伤害,从而引起相关组织的生理生化紊乱,SOD、CAT、POD等抗氧化酶可以帮助清除植物体内积累的过剩有氧自由基,防止活性氧过度积累而造成膜质受损。本试验结果表明, $ms6111$ 花药的SOD和CAT活性从造孢细胞期至散粉期都比其相应的可育株MF111低,这可能会影响到 $ms6111$ 花药中的活性氧不能及时分解,从而造成对细胞膜的伤害影响小孢子正常发育,与杜士云等(2012)和刘莉等(2016)在水稻方面的研究结果相似。POD是植物体内一种关键酶,在控制体内生长素含量水平方面起着关键作用,雄性不育株 $ms6111$ 的POD活性除减数分裂期同MF111活性差异不显著外,其他3个时期都显著高于同期MF111,整体呈缓慢上升趋势,这一研究结果同宋宪亮等(2003)对陆地棉双隐性核不育系(ms_5ms_6)花药发育的POD活性研究报道结果一致。刘金兵等(2006)在甜椒不育系抗氧化酶活性研究方面也发现,同时期不育系花药内POD活性均显著高于保持系POD活性,推测POD活性偏高将加速生长素的分解、降低生长素活性,导致生长素浓度偏低,对营养物质的竞争不利,影响小孢子正常发育

植物的不育机制是十分复杂的,文章仅从小

孢子母细胞减数分裂及生理生化部分指标上探讨不育的原因及变化特征远远不够,想更深入的掌握其不育机理并获得更为精确的研究成果,仍需在以后的工作中付出更多努力,充分借助分子生物学等技术,更好的认识不育特征并充分利用其杂种优势育种。

参考文献

- An HZ, Hu M, Zheng HM, Zhang SQ, Zhang QQ (2013). Chromosome behavior of pollen mother cell meiosis in the hybrid progenies from *Triticum timopheevi* × *Avena fatua* L. var. *glabrata* Pat. *Acta Bot Bor-Occident Sin*, 33 (2): 295–300 (in Chinese with English abstract) [安洪周, 胡梅, 郑会敏, 张素勤, 张庆勤 (2013). 提莫菲维小麦与光稃野燕麦远缘杂交后代花粉母细胞减数分裂行为分析. *西北植物学报*, 33 (2): 295–300]
- Chaubal R, Zanella C, Trimnel MR, Fox TW, Albertsen MC, Bedinger P (2000). Two male-sterile mutants of *Zeamays* (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall. *Am J Bot*, 87: 1193–1201
- Dou LP, Wang QY, Tang CM (2009). The anther development research on double recessiveness nuclear male sterile line $ms_5 ms_6$ of *Gossypium hirsutum* L. *Cott Sci*, 21 (4): 265–270 (in Chinese with English abstract) [豆丽萍, 王庆亚, 唐灿明(2009). 陆地棉双隐性核雄性不育 $ms_5 ms_6$ 花药发育过程的研究. *棉花学报*, 21 (4): 265–270]
- Du SY, Wang DZ, Wu S, Wang H, Wang SH (2012). Changes of antioxidant enzyme activities in anthers and leaves from three types of rice male sterile lines. *Plant Physiol J*, 48 (12): 1179–1186 (in Chinese with English abstract) [杜士云, 王德正, 吴爽, 王辉, 王守海(2012). 三类雄性不育水稻花药和叶片中抗氧化酶活性变化. *植物生理学报*, 48 (12): 1179–1186]
- Engelke T, Tatlioglu T (2000). Mitochondrial genome diversity in connection with male sterility in *Allium schoenoprasum* L. *Theor Appl Genet*, 100: 942–948
- Gao GX, Wang WT, Wu F (2013). Analysis on physiological and biochemical characteristics of cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in celery. *J Tianjin Agric Sci*, 19 (8): 1–4 (in Chinese with English abstract)[高国训, 王武台, 吴锋(2013). 芹菜胞质雄性不育系与保持系生理生化特性分析. *天津农业科学*, 19 (8): 1–4]
- Gao YY (2014). Analysis on cytological physiological and biochemical of cytoplasmic male-sterility in cabbage (*Brassica oleracea* L.) (Master's thesis). Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese with English abstract) [高营营(2014). 结球甘蓝细胞质雄性不育系细胞学及生理生化分析(硕士论文). 哈尔滨: 东北农业大学]
- Hanson MR, Bentolila S (2004). Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell*, 16 (1): S154–S169
- He GL, He HH, Liu YB, Xiao DX (2001). The cytological study of photoperiod-sensitive genic sterile rice Nongken 58S. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 23 (1): 24–29 (in Chinese with English abstract) [贺国良, 贺浩华, 刘宜柏, 肖德兴(2001). 光敏核不育水稻农垦58S细胞学研究. *江西农业大学学报*, 23 (1): 24–29]
- Liang YR, Hu XH, Chen MY, Wang Y, Zhang YP, Zhang SY (2006). Studies on the physiological and biochemical characters in carrot male-sterile lines. *Acta Agric Boreali-Sin*, 21 (3): 19–22 (in Chinese with English abstract) [梁艳荣, 胡小红, 陈源闽, 王勇, 张艳萍, 张少英(2006). 胡萝卜雄性不育系生理生化特性研究. *华北农学报*, 21 (3): 19–22]
- Liu HX, Guo XH, Guo ZG (2011). Effect of silicon supply on Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) growth under the salinization conditions. *Acta Ecol Sin*, 31 (23): 7039–7046 (in Chinese with English abstract) [刘慧霞, 郭兴华, 郭正刚(2011). 盐生环境下硅对坪用高羊茅生物学特性的影响. *生态学报*, 31 (23): 7039–7046]
- Liu JB, Hou XL, Chen XF, Zhang JY, Wang SB, Pan BG (2006). Studies on biochemical characters in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) CMS line and its maintainer line. *Acta Horticult Sin*, 33 (3): 629–631 (in Chinese with English abstract) [刘金兵, 侯喜林, 陈晓峰, 张静宜, 王述彬, 潘宝贵(2006). 甜辣椒胞质雄性不育系和保持系生化特性研究. *园艺学报*, 33 (3): 629–631]
- Liu L, Jiang Y, Ma J, Gao ZP, Chen GX (2016). Metabolism of reactive oxygen species in anthers and leaves of cytoplasmic male-sterile rice. *Chin Agric Sci Bull*, 32 (12): 6–12 (in Chinese with English abstract) [刘莉, 蒋苑, 马静, 高志萍, 陈国祥(2016). 水稻细胞质雄性不育花药和叶片中的活性氧代谢研究. *中国农学通报*, 32 (12): 6–12]
- Ma XL, Xu WH, Lan GX, Yang W, Bi YF, Ren J, Kuang YB, Jiang YC (2015). Comparison of appearance quality of three kinds of mixed turf. *Chin Agric Sci Bull*, 31 (34): 129–132 (in Chinese with English abstract) [马向丽, 许文花, 兰国湘, 杨蔚, 毕玉芬, 任健, 匡彦蓓, 江元昌(2015). 3种混播草坪外观质量比较研究. *中国农学通报*, 31 (34): 129–132]
- Nie MJ, Wang GH, Zhu WP (2007). Cytology research on the anther abortion of three male sterility lines in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Sci Agric Sin*, 40 (7): 1543–1549 (in Chinese with English abstract) [聂明建, 王国槐, 朱卫平(2007). 甘蓝型油菜3种类型雄性不育系花药败育的细胞学研究. *中国农业科学*, 40 (7): 1543–1549]
- Noyes RD (2005). Inheritance of apomeiosis (diplospory) in fleabanes (*Erigeron*, Asteraceae). *Heredity*, 94: 193–198
- Park SO, Crosby KM, Huang RF, Mirkov TE (2004). Identification and confirmation of RAPD and SCAR markers linked to the *ms-3* gene controlling male sterility in melon (*Cucumis melo* L.). *J Amer Soc Hort Sci*, 129: 819–825
- Sheng YY, Chang W, Jiao SQ, Dai DY (2016). Stamen structure development and physiological and biochemical characteristics in male sterile melon. *Plant Physiol J*, 52 (7): 1028–1034 (in Chinese with English abstract) [盛云燕, 常薇, 矫士琦, 戴冬洋(2016). 甜瓜雄性不育植株雄蕊发育结构及生理生化特征. *植物生理学报*, 52 (7): 1028–1034]
- Song R, Lin LG, Wang KY, Song HR, Jiang YB, Liu HX (2016). Effects of silicon supply on the biomass and physiochemical features of tall fescue seedlings under different salinization

- conditions. *Acta Pratac Sin*, 25 (8): 91–97 (in Chinese with English abstract) [宋锐, 林丽果, 王康英, 宋浩然, 蒋勇斌, 刘慧霞 (2016). 不同盐生境下硅对高羊茅生物量及生理生化特征的影响. *草业学报*, 25 (8): 91–97]
- Song XL, Sun XZ, Wang ML, Liu YX, Liu JH (2003). Preliminary study on the changes of POD activity and phytohormones in anthers of double recessive genetic sterile line of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci Agric Sin*, 36 (7): 861–863 (in Chinese with English abstract) [宋宪亮, 孙学振, 王明林, 刘英欣, 刘继华 (2003). 陆地棉双隐性核不育系(ms₁ms₂)花药发育过程中POD活性和内源激素动态变化初探. *中国农业科学*, 36 (7): 861–863]
- Wang XL, Wang LL, Chen LZ, Zhang R, Wei BQ (2013). A comparison of biochemical characters between male sterile line and maintainer lines of pepper. *J Gansu Agric Univ*, 48 (6): 64–67 (in Chinese with English abstract) [王晓林, 王兰兰, 陈灵芝, 张茹, 魏兵强 (2013). 辣椒胞质雄性不育系与保持系的生理生化特性. *甘肃农业大学学报*, 48 (6): 64–67]
- Wu JH, Liu ZS, Mu Q, Tang CB, Wen KJ (2001). Discovery and preliminary identification of male sterile line in tall fescue. *Seed*, 5: 78, 80 (in Chinese with English abstract) [吴佳海, 刘正书, 牟琼, 唐成斌, 文克俭 (2001). 高羊茅雄性不育系的发现及初步鉴定. *种子*, 5: 78, 80]
- Xi XJ, Zha Q, Jiang AL, Tian YH (2015). Meiotic chromosome behavior of pollen mother cells and gamete fertility in triploid grape 'Summer Black'. *Acta Bot Bor-Occident Sin*, 35 (12): 2422–2427 (in Chinese with English abstract) [奚晓军, 查倩, 蒋爱丽, 田益华 (2015). 三倍体葡萄'夏黑'的花粉母细胞减数分裂行为观察及其育性研究. *西北植物学报*, 35 (12): 2422–2427]
- Yi FY, Shi FL, Gao CP, Xiong M, Ye RH, Cai LY (2014). A comparative analysis of physiological and biochemical characteristic between alfalfa male sterile plants and male fertile plants. *Chin J Grassland*, 36 (6): 60–65 (in Chinese with English abstract) [伊风艳, 石凤翎, 高翠萍, 熊梅, 晔蕾罕, 蔡丽艳 (2014). 苜蓿雄性不育株与可育株生理生化特性的比较. *中国草地学报*, 36 (6): 60–65]
- Zhang XM, Dong ZS (2009). Cytology research of a nuclear sterile recessive epistatic interacted material 1665 in *Brassica napus* L. *Acta Bot Bor-Occident Sin*, 29 (1): 43–48 (in Chinese with English abstract) [张雪梅, 董振生 (2009). 甘蓝型油菜隐性上位互作核不育材料1665花药败育的细胞学研究. *西北植物学报*, 29 (1): 43–48]
- Zhang XQ, Wang XD, Zhu YG, Zhu W, Jiang PD (2007). Breeding of cytoplasmic male sterile line in *G. barbadense* and microsporogenesis cytological observation. *Sci Agric Sin*, 40 (1): 34–40 (in Chinese with English abstract) [张小全, 王学德, 朱云国, 朱伟, 蒋培东 (2007). 细胞质雄性不育海岛棉的选育和细胞学观察. *中国农业科学*, 40 (1): 34–40]
- Zhang YB, Chen JF, Yin HP, Qian CT, Wu MZ (2011). Cytological studies on meiosis of pollen mother cells and development of male gametophyte in melon. *Acta Bot Bor-Occident Sin*, 31 (3): 446–450 (in Chinese with English abstract) [张永兵, 陈劲枫, 伊鸿平, 钱春桃, 吴明珠 (2011). 甜瓜花粉母细胞减数分裂及雄配子体的细胞学研究. *西北植物学报*, 31 (3): 446–450]
- Zhang YM, Wang KF, Zhang JW (2016). Cytology of anther development of genic-cytoplasmic and double recessive genetic sterile in *Brassica napus*. *J Gansu Agric Univ*, 51 (4): 61–68 (in Chinese with English abstract) [张咏梅, 王开芳, 张金文 (2016). 甘蓝型油菜核质不育与双隐性核不育花药发育的细胞学研究. *甘肃农业大学学报*, 51 (4): 61–68]
- Zhao Y, He WL, Lei JJ (2014). Meiosis observation of pollen mother cells and determination of pollen viability of tetraploid asiatic lily cultivars. *Acta Agric Nucl Sin*, 28 (10): 1806–1810 (in Chinese with English abstract) [赵艳, 贺卫丽, 雷家军 (2014). 四倍体亚洲百合品种花粉母细胞减数分裂行为观察及花粉生活力测定. *核农学报*, 28 (10): 1806–1810]

Cytology, physiological and biochemical characterization in microspore abortion of male sterile plant in *Festuca arundinacea*

CHEN Wei, FU Wei, WU Jia-Hai, ZHONG Li, WANG Xiao-Li, HAN Yong-Fen*, SHU Jian-Hong
Guizhou Institute of Prataculture, Guiyang 550006, China

Abstract: The study was conducted to investigate the microspore's mitosis, male gametophyte development process and the abortive physiological and biochemical characters of male sterile plant *ms6111* and male fertile plant MF111 of *Festuca arundinacea*. Results indicated that abnormal chromosome behaviors existed in PMCs from prophase I stage to late uninucleate stage, including a mass of lagging chromosome, bridge fragments, micronucleus, univalent chromosome, unequal separation, asynchronous division, free chromosomes, triad, pentads, triangle spindles, chromosome deletion and reduction, which were important cytological reasons for abortive pollen of tall fescue. From sporogenous cell period to pollinating period, the contents of free proline, soluble protein, soluble sugar and the activity of SOD and CAT in anther of male sterile plant *ms6111* were markedly lower than those in anther of male fertile plant MF111. The contents of malondialdehyde and the activity of POD in anther of *ms6111* were always higher than those in anther of MF111. As microspore's growth and development, the contents of malondialdehyde and the activity of POD showed an increasing tendency. Soluble sugar and antioxidant enzyme metabolic disorder, free proline loss and malondialdehyde accumulation may lead to male sterility of *ms6111*.

Key words: tall fescue; male sterile; microspore development; physiological and biochemical character

Received 2017-05-19 Accepted 2017-08-03

This work was supported by the Science and Technology Foundation of Guizhou (Grant No. J20132151), and Higher-level New Type of Talent Training Project (Grant No. RC20164024).

*Corresponding author (E-mail: 442694189@qq.com).