

棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的形态学和细胞学特征研究

周仲华, 陈金湘*, 刘爱玉, 李瑞莲, 刘海荷, 朱四元

(湖南农业大学棉花研究所, 长沙 410128)

摘要:以温敏雄性不育系特棉 S-1 及其正常可育品种 D7 为实验材料, 对其形态学、细胞学特征进行了深入、系统的研究。结果表明: 形态学研究发现, 温敏雄性不育系特棉 S-1 的花器官明显较对照小, 但是其它形态学特征差异很少; 细胞学研究发现, 特棉 S-1 败育主要发生在四分体形成期, 花粉母细胞退化、花粉母细胞无荚膜、四分体质核分裂不同步、多分孢子、花粉粒畸形、花粉粒粘连、绒毡层提前解体及药隔组织薄壁细胞的退化等为棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的细胞学败育特征。

关键词:棉花; 温敏雄性不育; 形态学; 细胞学

中图分类号: S562.01 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807-(2008)06-0408-06

Studies on Morphological and Cytological Features of Thermo-sensitive Sterile Line Temian S-1 (*Gossypium hirsutum*)

ZHOU Zhong-hua, CHEN Jin-xiang*, LIU Ai-yu, LI Rui-lian, LIU Hai-he, ZHU Si-yuan
(Institute of cotton, HNAU, Changsha 410128 China)

Abstract: The thermo-sensitive male sterility and comparative line D7 were used as materials, and systemic studies on morphological and cytological characteristics were included in the paper. The main results are as follows: the floral apparatus of Temian S-1 is significantly smaller than that of D7, but all other morphological features of them are almost same. The results of cytological studies showed that the anther abortion of Temian S-1 occurred during the stage of tetrad formation, and the abortion has following characteristics: degenerative PMC, PMC without capsule, non-synchronous division of nucleolus and cytoplasm, multiple spores, abnormal pollen grains, linked pollen grains and dissolved tapetum.

Key words: cotton; thermo-sensitive male sterility; morphology; cytology

棉花具有十分明显的杂种优势, 优良的杂种 F_1 通常比常规品种增产 10%~20% 左右。随着棉花高产育种难度的增加, 利用杂种优势提高单位面积产量的途径愈来愈受到人们的重视。棉花杂种优势利用的途径一直是研究的重点和热点领域。

关于植物雄性不育花药发育的形态学研究已经有很多报道, 雄性不育系的花器形态有花冠退化、雄蕊萎缩和花粉败育等三种类型。一般不育基因若早期发生作用, 花药表现畸形, 不形成花

粉; 若后期发生作用, 则表现花粉败育。棉花雄性不育植株营养器官与正常棉株相比无明显差异, 一般花器略小, 花药干瘪, 花丝短, 无花粉粒或者花粉粒较少。但不同植物种类的雄性不育系甚至同一种类的不同雄性不育系的花粉败育的方式和时期也不相同。棉花花粉发育一般分为造孢细胞增殖时期、减数分裂时期、四分体时期、花粉发育时期、花粉成熟等五个时期, 是一个系统发育过程, 其中任何一个环节发生差错, 都可导致小孢子

收稿日期: 2007-07-25

作者简介: 周仲华 (1976-), 男, 博士, 助理研究员, zhouzhonghua1976@hotmail.com; * 通讯作者 jinxinage@163.com

基金项目: 国家 863 项目 (2003AA2410918)

的败育,从而表现雄性不育。雄性不育系败育过程中经常出现孢原细胞不分化、药室合并、造孢细胞粘连、花粉母细胞异常、花粉母细胞减数分裂异常、减数分裂后孢质不分裂、四分体异常、花粉粒异常等异常现象。

本研究的棉花温敏雄性不育系是棉花中一种新型的不育类型,此前对其已经进行了初步的研究,发现该不育系具有染色体不能配对、四分体成球状分离、花粉无内含物或畸形、中期停止发育等异常现象^[1],但研究尚不系统、完全。本文从形态学的角度出发,考察温敏雄性不育系特棉 S-1 的植物学性状,期望能找到与温敏雄性不育性状紧密连锁的形态学标记;通过压片、石蜡切片等细胞学实验技术,观察棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的雄蕊各发育时期败育的情况,确定其败育的敏感时期及败育的细胞学特征,初步阐明其温敏雄性不育的细胞学机理。

1 材料和方法

1.1 材料

以棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 及其正常可育品种 D7 为试验材料,两个试验材料均由湖南农业大学棉花研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 形态学观察。考察的形态学性状包括茎、叶、花(苞叶、花萼、花瓣)、托叶、铃、种子及纤维特性等,重点观察不育系的花器形态,比较不育系与对照花瓣长×宽、柱头长度、花丝长度等指标的

表 1 花器官形态比较

Table 1 Morphological comparison of flower between Temian S-1 and D7

品种	鲜重/g	花瓣/cm	花瓣宽/cm	花瓣(长×宽)/cm ²	柱头长/cm	花丝长/cm	苞叶长/cm	苞叶宽/cm	苞叶(长×宽)/cm ²
特棉 S-1	1.24b	3.80b	2.89B	10.89B	1.67B	0.38b	4.17B	2.13B	8.89B
D7	2.66a	5.03a	4.67A	23.51A	2.13A	0.53a	6.57A	4.07a	30.93A

注:大写、小写字母分别表示差异达到极显著水平($P \leq 0.01$)或显著水平($P \leq 0.05$)

特棉 S-1 和对照 D7 的花器官在鲜重、花瓣长度、花瓣宽度、花瓣长×宽、花丝长度、苞叶长度、苞叶宽度及苞叶长×宽等植物学性状指标的差异,结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出,特棉 S-1 与对照 D7 的花器官,在鲜重、花瓣长度、花瓣宽度、花瓣长×宽、花丝长度、苞叶长度、苞叶宽度及苞叶长×宽等指标间差异明显。统计分析发现,其中,鲜重、花瓣长度及花丝长度的差异达到显著水平,而花瓣宽度、花瓣长×宽、苞叶长度、苞叶宽

差异。

1.2.2 细胞学研究。(1)醋酸洋红压片。按照改良的洋红染色的方法^[2,3],取植株各发育时期幼蕾于改良卡诺氏固定液(乙醇:冰醋酸=5:2)中固定 12~24 h 后,于 70% 的乙醇中保存备用。制片前幼蕾再用卡诺氏固定液固定 30 min,然后用 45% 冰醋酸解离 20 min,标准的铁-醋酸洋红染色制片,Olympus 显微镜观察,拍照。(2)石蜡切片。取植株各发育时期的蕾于改良卡诺氏固定液(乙醇:冰醋酸=5:2)中固定 12~24 h 后,于 70% 的乙醇中保存备用。采用常规石蜡切片法制片,系列浓度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚度 8 μm ,铁矾-苏木精染色,树脂封片,Olympus 光学显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 特棉 S-1 的形态学特征

在整个生育期,以可育品种 D7 为对照,对特棉 S-1 的茎秆、叶片、花、苞叶、花萼、托叶、铃、种子及纤维特性等植物学性状进行了调查,结果发现:在生长前期,特棉 S-1 的植株形态与对照相比无明显差异;现蕾后随着温度升高,特棉 S-1 的花器与对照相比,差异明显,主要表现为花器官明显比对照小(图 1-a)。当连续 3 d 日平均温度超过 26℃ 时,特棉 S-1 花粉开始减少,最后出现完全不育,其花药不开裂或者部分开裂,完全无花粉(图 1-b)。而在生长后期,特棉 S-1 还出现叶片皱缩果枝伸展缓慢,节间变短等异常现象。

度及苞叶长×宽等指标的差异更是达到了极显著水平。

2.2 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的细胞学机理研究

2.2.1 特棉 S-1 与对照 D7 的药隔维管组织。维管束连接着花药、花丝与花,起着吸收水分和运输养料的作用。在许多植物雄性不育系中观察到微管束发育不良或退化,直接导致不育植株花器官物质代谢发生障碍。对棉花温敏雄性不育系特棉

S-1 及其对照 D7 的成熟花药的药隔组织进行了显微观察, 结果发现, 不育系微管组织与对照无明显差异, 但药隔组织中薄壁细胞排列紊乱, 细胞退化, 甚至出现药隔组织在花粉粒成熟时期完全裂解(图 1-c, d)。

2.2.2 特棉 S-1 小孢子发育过程。棉花的花药有四个小孢子囊, 现蕾后, 雄蕊原基突出, 其内部细胞的大小比较一致, 排列较紧密。随后在四个角隅的表皮层下各分化出一个孢原细胞, 孢原细胞大, 细胞质也较浓厚, 细胞核大, 核中有一个明显的核仁。孢原细胞发生一次平周分裂, 接着再发生一次径向分裂, 向外分裂形成壁层, 向内分裂形成造孢细胞, 造孢细胞经过不断有丝分裂形成小孢子母细胞, 小孢子母细胞细胞质浓厚, 液泡小, 细胞核大, 核中的核仁明显。之后每一个小孢子母细胞经减数分裂形成四分体, 不久就各自分离, 形成小孢子。对棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 及其对照 D7 的小孢子发育过程中进行了显微观察, 结果发现: 花粉母细胞形成过程中, 特棉 S-1 与对照 D7 基本上不存在差异, 但在少数制片中能观察到极少数不正常的花粉母细胞, 这些花粉母细胞出现无胼胝质膜(图 1-e)、大小不一(图 1-f)及退化(图 1-g)等异常现象; 减数分裂过程中, 特棉 S-1 与对照 D7 未发现明显差异, 其染色体构型也未见异常(图 1-h); 四分体形成过程中, 特棉 S-1 与对照 D7 间存在明显差异, 在特棉 S-1 中发现细胞质与核分裂不同步(图 1-i)、四分体不分离(图 1-j)及五分孢子(图 1-k)、七分孢子(图 1-l)等异常现象; 花粉粒发育至成熟过程中, 特棉 S-1 与对照 D7 间的差异也非常明显, 特棉 S-1 的花粉粒存在畸形(图 1-m)、粘连(图 1-n)、大小不一(图 1-o)及质壁分离(图 1-p)等异常现象。

2.2.3 特棉 S-1 花药发育过程。棉花雄蕊原基在里面形成造孢细胞的同时, 与表皮层紧贴在一起的周缘层也经过多次分裂, 形成花药的药壁。药壁细胞分化初期可以看到三层细胞: 最外面为表皮层, 中间为过渡层, 最内为绒毡层。随后, 过渡层经过平周分裂, 形成药室内壁和中层。到了花粉母细胞成熟时, 花药药壁即由表皮层、药室内壁、中层和绒毡层等四层细胞组成。棉花绒毡层的发育, 属于变形绒毡层类型。绒毡层在早期, 其

细胞形状和大小与花药壁的其他细胞相似, 且每一细胞只有一个细胞核。到小孢子母细胞进行减数分裂时, 绒毡层细胞体积逐渐增大成许多双核的细胞。等到小孢子形成以后, 绒毡层细胞的细胞壁逐渐解体、消失, 形成周缘质团。

通过石蜡切片观察发现, 花粉母细胞形成及减数分裂过程中, 特棉 S-1 花药药壁可以看到三层细胞, 此时不育系与其对照的绒毡层细胞无明显差异, 均为花粉药壁内一层致密结构(图 1-q, r)。四分体形成过程中, 特棉 S-1 的绒毡层已经开始出现解体的迹象(图 1-s), 而对照的绒毡层仍然未解体(图 1-t)。而到了花粉粒成熟时期, 特棉 S-1 的绒毡层已完全解体, 与对照相比差别不是很大(图 1-u, v)。

3 讨论

3.1 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的形态学特征

在整个生长期, 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 除花器明显比对照小、温敏不育特点外, 其形态学性状与对照大致无差异。而在生长后期, 特棉 S-1 还出现叶片皱缩、果枝伸展缓慢、节间变短等异常现象。并且在连续 8 年的回交过程中, 这些性状一直都与温敏不育性状保持紧密连锁。因此, 可以把这些植物学性状视为其与温敏不育性状紧密连锁的形态学标记。但这些性状是由温敏雄性不育基因直接导致产生, 还是由与温敏雄性不育基因紧密连锁的其他相关基因引起, 还有待深入研究。

3.2 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的败育时期

一般认为双子叶植物雄性不育系的雄性败育高峰多发生在造孢细胞至四分体时期, 单子叶植物则多发生在花粉的单核期至二核期^[4]。但由于不同的不育系控制花粉败育的基因不同, 雄性不育系小孢子的败育时期会因为基因的表达时期以及基因作用机制不同而不同。因此, 不同植物种类的雄性不育系甚至同一种类的不同雄性不育系的雄性败育的方式和时期也不相同。就棉花而言, 棉花雄性不育材料的小孢子败育从造孢组织到花粉成熟期都有可能发生。哈克尼西棉胞质雄性不育系的造孢组织在发育成熟前期就已解体, 只是偶尔形成少数花粉母细胞, 但在减数分裂前

期就退化了^[5]。而“**闽 A**”核不育系中相当多的造孢组织不能形成正常的花粉母细胞,有的药室所有的花粉母细胞都已退化,81A 中也发现少部分初生造孢细胞不能形成正常的花粉母细胞^[6]。而其他研究者发现“**闽 A**”、**洞 A**、**洞 A3**、**104-7A** 等不育系是在花粉母细胞时期败育^[7~12]。有学者对我国 6 个棉花胞质雄性不育系的小孢子发生细胞学特征研究和线粒体 DNA 的 RAPD 分析表明,不同不育系在雄性败育时期上存在明显分化。中棉所 12A 和 NM-1A 的败育时期与引进的 DES-HAMS277 的败育时期基本相同,是在造孢细胞增殖或小孢子母细胞形成时期,而 104-7A、湘远 4A、NM-2A 和 NM-3A 的败育时期是在减数分裂时期^[13]。棉花晋 A 胞质雄性不育系的细胞学研究表明,晋 A 不育系雄性败育的主要时期是在造孢细胞增殖—小孢子母细胞形成时期^[14]。

细胞学研究结果表明,特棉 S-1 败育主要发生在四分体形成期,虽然在花粉母细胞形成期和花粉粒发育至成熟期都有败育现象,但是花粉母细胞形成期发生的败育细胞毕竟是少数,而四分体形成期以后的败育可能都是因为四分体的败育而引起的结果。

3.3 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 小孢子败育特征

由于雄性败育的时期不同,败育发生时也就表现出不同的特点,主要包括孢原细胞不分化、造孢细胞相互粘连、花粉母细胞减数分裂异常、减数分裂后孢质不分裂、四分体不分离、小孢子壁的形成不正常、花粉没有功能等特点。细胞学研究结果表明,棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 具有花粉母细胞退化、花粉母细胞无荚膜、四分体核分裂不同步、多分孢子、花粉粒畸形、花粉粒粘连等败育特征。

3.4 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 花药的败育特征

绒毡层是药室的最内一层,它包围着小孢子母细胞或孢子,在花粉形成和发育中起着重要作用:运转营养物质,保证小孢子发生的需要,合成胼胝质酶,分解包围四分体的胼胝质壁;提供构成花粉外壁的孢粉素;输送成熟花粉粒外被的脂类的胡萝卜素;产生外壁蛋白;解体后的降解产物可

作为花粉合成 DNA、RNA、蛋白质和淀粉的原料。不育系花药中绒毡层细胞发育异常、绒毡层提前解体或推迟解体将使小孢子母细胞分化过程遭到破坏,致使小孢子母细胞停止发育、退化或解体。

在**高粱**、**小麦**、**大麦**、**甜菜**、**亚麻**、**胡萝卜**等许多植物中,都曾观察到雄性不育小孢子发育过程中常伴随有绒毡层的异常现象,其主要表现为绒毡层细胞膨大或液泡化,提前解体、延迟解体或不解体。晋 A 不育系的细胞学研究发现大多数绒毡层细胞严重液泡化,且含有大量不正常的线粒体,线粒体肿胀破裂,膜及内部结构模糊不清,基质呈半透明或透明状态,内峭溶解或外渗,绒毡层细胞过早退化,绒毡层细胞体积小,与中层细胞大小相近,少有双核^[14]。

本实验研究发现,棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的绒毡层在四分体形成期即已经开始解体,与对照相比明显提前,而且也跟小孢子败育大都是发生在四分体时期相对应,很有可能是因为绒毡层的解体、退化导致小孢子发育的营养供应发生中断,花粉母细胞及小孢子不能得到足够的营养供应,小孢子内含物没有得到充实,从而导致小孢子的败育。至于绒毡层提前解体、基因调控与信息传递过程以及小孢子败育是否与线粒体、高尔基体等其它细胞期有关,还有待进一步的研究。此外,本实验还对出胼胝质以外的药壁组织进行了研究,结果发现,药隔组织组织中薄壁细胞排列紊乱,退化,最终导致了花药药壁的裂解,这也是棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的一个重要的细胞学败育特征。

参考文献:

- [1] 余筱南,陈金湘,李瑞莲,等. 棉花温敏雄性不育系培育和利用初报[J]. 棉花学报,2003,15(6):360-362.
- [2] ZHOU Z H, Yu P, Liu G H, et al. Morphological and molecular characterization of two G. somalense monosomic alien addition lines (MAALs) [J]. Chinese science bulletin, 2004,49(9):910-914.
- [3] 周仲华,何鉴星,陈金湘. 陆×索棉异附加单体系的形态学及细胞学鉴定[J]. 湖南农业大学学报,2004,30(4):316-318.

- [4] LASER K D, Leisten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms[J]. Bot Rev, 1972, 38:425-454.
- [5] MURTHI A N, Weaver J B. Histological studies on five male-sterile strains of upland cotton [J]. Crop Sci, 1974, 14:658-663.
- [6] 张天真,潘家驹. 陆地棉 msc3, msc7 核雄性不育系花粉败育的细胞学观察[J]. 棉花学报, 1991, 3(1):9-14.
- [7] 汤泽生. 新海棉雄性不育系的细胞学研究[J]. 中国棉花, 1989, 10(4):7-9.
- [8] 杨亚东. 几个棉花雄性不育系的遗传分析[J]. 遗传, 1982, 4(1):18-20.
- [9] 王祖秀, 汤泽生. 棉花湘远 A41 和湘远 A42 小孢子败育的细胞学研究[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1992, 13(1):14-18.
- [10] 姚长兵, 胡绍安. 棉花细胞质雄性不育小孢子母细胞败育的细胞学研究[J]. 棉花学报, 1994, 6(1):25-27.
- [11] 刘金兰, 黄观武. 棉花洞 A 型雄性不育材料花粉育的细胞形态学观察[J]. 棉花学报, 1994, 6(2):70-73.
- [12] 刘金兰, 黄观武. 洞 A 型核雄性不育材料花粉不同发育时期的超微结构观察[J]. 棉花学报, 1994, 6(4):193-195.
- [13] 王学德, 张天真, 潘家驹. 细胞质雄性不育棉花小孢子发生的细胞学观察和线粒体 DNA 的 RAPD 分析[J]. 中国农业科学, 1998, 31(2):70-75.
- [14] 黄晋玲, 杨 鹏, 李炳林, 等. 棉花晋 A 细胞质雄性不育系小孢子发生的显微和超微结构观察[J]. 棉花学报, 2001, 13(5):259-263. ●