

# K型和T型小麦雄性不育花粉粒形态 与细胞化学定位

姚雅琴, 张改生, 刘宏伟, 王军卫, 刘红梅

(西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100)

**摘要:**通过光镜、电镜和酶细胞化学定位技术,比较研究了T型和K型同核异质不育系及其保持系在小孢子发生、发育过程中的细胞学、ATP酶和细胞色素氧化酶活性反应变化。结果表明,T型不育系花粉粒败育主要发生在单核花粉粒后期,败育发生的形态学变化从液泡膜开始,花粉粒败育与单核花粉粒时期细胞核和核仁中ATP酶活性的缺乏有关。K型不育系花粉粒败育主要发生在二细胞后期和三细胞时期,败育发生的形态学变化从线粒体开始,花粉粒败育与花粉粒内壁的结构异常密切相关。

**关键词:**小麦;花粉;细胞质雄性不育;形态学;细胞化学

## Cytomorphology and Cytochemical Localization of K-type and T-type Cytoplasmic Male Sterile Pollens in Wheat

YAO Ya-qin, ZHANG Gai-sheng, LIU Hong-wei, WANG Jun-wei, LIU Hong-mei

(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100)

**Abstract:** By using the technology of microscopy, electron microscope, and enzyme cytochemical localization, cytomorphology and ATPase, cytochrome oxidase activity in pollens from K-type cytoplasmic male sterile (CMS) line, T-type CMS line, and their maintainer line on wheat were compared during the microspore forming and pollen development. The results indicated that the pollen abortion of T-type CMS was observed at mononucleate pollen later stage, cytomorphological changes of the abortion first began with vacuolar membrane, their abortion were related to lack of ATPase activity in nucleus and nucleolus during mononucleate pollen stage. Pollen abortion of K-type CMS was observed during binucleate latter stage and trinucleate stage, cytomorphological changes of the abortion first began with mitochondria, their abortion were related to intine disruption.

**Key words:** Wheat; Pollen; CMS; Cytomorphology; Cytochemistry

杂种优势的利用是提高作物产量的重要途径,细胞质雄性不育材料是作物杂种优势应用于生产的基础。尽管世界范围内已培育出几十种小麦细胞质雄性不育系,但由于这些不育系几乎都不同程度地存在恢复源少,或细胞质有害效应,或其它附加条件的限制<sup>[1,2]</sup>,致使这一蕴藏着巨大增产潜力的资源不能发挥其增产效益。因此,获得理想的雄性不育系,是杂种小麦突破生产应用难关的关键。研究各

种不育系花粉败育过程的细胞学和细胞化学变化,对于弄清雄性不育发生的机理,创建理想的雄性不育系具有重要的指导意义。有关小麦雄性不育花药发育过程的细胞学和酶活性的研究,20世纪80年代以前是以T型为材料进行的<sup>[3]</sup>。80年代以后随着新不育类型的出现,研究较多的为K型、V型不育系和化学杂交剂诱导的雄性不育<sup>[4~6]</sup>,但研究的内容主要局限在细胞学和生理生化方面。有关超微

收稿日期:2000-10-16

基金项目:国家自然科学基金项目(39770366)和杨凌农业生物技术育种中心资助项目

作者简介:姚雅琴(1957-),女,陕西澄城人,副教授,硕士,主要从事小麦雄性不育机理研究。Tel:029-7092379-8102,7092863;E-mail:yaoyaquin@263.net

水平的酶细胞化学定位,除我们对 K 型不育小麦花药组织中的 ATP 酶和细胞色素氧化酶活性进行过研究外<sup>[7]</sup>,还未见到有关这方面的报道。ATP 酶和细胞色素氧化酶是由线粒体基因编码部分亚基、核质共同决定的且与雄性不育密切相关的具重要生理功能的两种酶。本研究以 T 型和 K 型同核异质不育系及其保持系为材料,运用光学显微镜、扫描电镜、透射电镜和酶细胞化学定位技术,对小孢子发生、发育过程中的形态学变化和 ATP 酶、细胞色素氧化酶活性反应进行综合分析,探讨它们的变化与雄性不育发生的关系,了解 T 型与 K 型两种雄性不育系的特征。

## 1 材料与方法

以同核异质回交 12 代以上转育的小麦雄性不育系 K-77(2)、T-77(2)和保持系 77(2)为材料,分小孢子母细胞、四分体、单核花粉粒、二细胞花粉粒、三细胞花粉粒到成熟花粉粒 5 个时期取样。常规光学透射电镜和扫描电镜观察,用常规制样方法。ATP 酶定位采用姚雅琴报道的方法<sup>[7]</sup>,细胞色素氧化酶定位采用 Noda 的方法<sup>[8]</sup>。用日立 S-450 扫描电镜,日本电子公司 100CX II 型透射电镜观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 小孢子母细胞和四分体时期

从小孢子母细胞到四分体时期,小孢子的发生过程,胼胝质的分布变化及 ATP 酶和细胞色素氧化酶两种酶的活性反应,在两种不育系及其保持系之间均无大的差异。在减数分裂前,小孢子母细胞中央交界处开始出现胼胝质积累,且由少到多,呈辐射状,中央交界处最厚,辐向表面降低,在外周缺乏(图版 I-1)。随着花药的发育,小孢子母细胞向周围靠拢,中央胼胝质分开(图版 I-2),这时小孢子母细胞内含丰富的杯状小质体,初级线粒体和其它细胞器。没有观察到 ATP 酶和细胞色素氧化酶活性反应。小孢子母细胞经过减数分裂形成 4 个小孢子,中央胼胝质消失,而每个小孢子被胼胝质包裹,在质膜附近的细胞质中有明显的 ATP 酶活性反应(图版 I-3),这些 ATP 酶活性反应可能与花粉粒外壁的形成有关。

### 2.2 单核花粉时期

K 型不育系:花粉粒的发育与保持系基本相同,其表现为,随着包裹小孢子胼胝质的消失,小孢子变

成圆形,球形核位于细胞中央,细胞质充满整个细胞,细胞质中含有初级细胞器和杯状体(图版 I-4),花粉粒外壁开始形成。随着小孢子的发育,细胞质中开始出现小液泡,且由少到多、由小到大进而合并形成大液泡,将细胞质和细胞核挤向靠细胞壁周围分布。由于液泡的增大和细胞内容物的增多,小孢子的体积增长很快,细胞质中含有较多的内质网和高尔基体,细胞核中有少量的,而核仁中有显著的 ATP 酶活性反应(图版 I-5),但线粒体内嵴仍不发达,内嵴上没有细胞色素氧化酶活性反应。

T 型不育系:T 型不育系小孢子包裹的胼胝质消失正常,小孢子的外壁也能形成,但较保持系的稍薄。在单核早期,小孢子发育基本正常,细胞质中有相当于保持系同期发育的内容物。随着小孢子的发育,小液泡也产生,大多数小孢子也能联合形成大液泡,但大液泡形成过程中或形成后液泡膜破裂,内容物进入液泡,各种细胞器开始解体。细胞核的解体往往落后于其他细胞器的解体,常常能看到小孢子中细胞器已基本消失,但仍有较完整的细胞核(图版 I-6)。细胞核中没有 ATP 酶的活性反应(图版 I-7),线粒体中也未观察到细胞色素氧化酶活性反应,但细胞质中有 ATP 酶活性反应(图版 I-7)。在单核花粉粒后期花粉粒败育,败育后的花粉粒细胞器和细胞核均解体,只剩下花粉壁和极少具 ATP 酶活性的细胞质(图版 II-1,2,3)。

### 2.3 二细胞——花粉粒成熟期

保持系:伴随二细胞的形成,花粉粒内细胞质的活性发生了较大的变化,细胞器数量成倍增长。高尔基体和内质网数量在原来的基础上有所增加,高尔基体的囊泡更发达,内质网以粗面内质网居多。核糖体数量在增长的同时,由游离态变为聚合态。质体数量在增长的同时,开始积累淀粉粒。线粒体变化最大,不仅线粒体内嵴变得发达,而且内嵴上出现细胞色素氧化酶活性反应,并且由少到多,最后花粉粒被发达内嵴、内嵴具显著细胞色素氧化酶活性的线粒体和淀粉粒充满(图版 II-9)。二细胞花粉粒的细胞核有少量的,核仁中有显著的 ATP 酶活性反应(图版 I-8)。第一次有丝分裂完成后,花粉粒内壁开始产生,首先在花粉粒质膜围出现 ATP 酶活性反应(图版 II-1)。随着内壁加厚,质膜上的 ATP 酶活性逐渐增强(图版 II-2)。当内壁加厚到一定程度时,内壁中形成径向膜性结构的管状通道(图版 II-4)。在成熟内壁的管状通道和外壁的微通道中有显著的 ATP 酶活性反应(图版 II-3)。萌发孔区内壁

中的管状通道不十分明显,但具显著的ATP酶活性反应,成熟花粉粒萌发孔区的细胞质隆起,萌发孔盖被顶出,内壁和周围组织具极显著的ATP酶活性反应(图版II-5)。成熟花粉粒结构见图版III7,8,9。

**K型不育系:**在二细胞时期,K型不育系花粉粒细胞质中的线粒体的内嵴上也有少量的细胞色素氧化酶活性反应,质体中也积累淀粉粒,大多数花粉粒细胞核和核仁中有比保持系少的ATP酶活性反应(图版I-9)。同样当二细胞形成时,花粉粒质膜上也出现ATP酶活性反应(图版II-6),但随着内壁的发育,质膜上ATP酶活性增加不明显。内壁加厚的程度虽比其保持系快,厚,但内壁中的管状通道不能正常形成,在内壁中几乎没有ATP酶活性反应(图版II-7),且往往在内壁中形成许多小泡,小泡有单个存在和成串存在(图版II-8)。萌发孔区的内壁和周围组织中没有ATP酶活性反应,许多花粉粒在萌发孔区Z层与内壁连接处断开(图版II-9),萌发孔区细胞质隆起不明显,萌发孔盖内陷。在二细胞后期,线粒体内嵴上的细胞色素氧化酶活性由开始降低到消失,线粒体和其它细胞器开始解体,细胞质收缩,细胞中出现大片大片的断区(图版III6),花粉粒败育。败育后的花粉粒内仍含有部分失去活性的,着色深的细胞质和淀粉粒,花粉粒变瘪的程度介于T型不育系花粉粒和保持系之间(图版III4,5,6)。

### 3 讨论

#### 3.1 T型雄性不育系花粉粒形态和酶细胞化学变化与雄性不育发生的关系

T型雄性不育系花粉粒败育发生的形态学变化开始于单核花粉粒中期,败育发生在单核后期。形态学变化首先从液泡膜破裂开始。由于液泡膜破裂释放分解酶促使各种细胞器和细胞质解体,细胞核的解体往往落后于其它细胞器。T型不育系花粉粒的败育很彻底,败育后的花粉粒仅存有极少量的细胞质和花粉粒外壁,这些与前人的报道相似<sup>[3,5]</sup>。我们在实验中还发现,单核花粉粒时期,保持系花粉粒细胞核中,尤其是核仁中具显著的ATP酶活性反应,而T型不育系花粉粒的细胞核和核仁中无ATP酶活性反应。核仁的主要功能是rRNA的合成、加工和核糖体亚单位的装配<sup>[9]</sup>。细胞核中的ATP酶对染色体组装时核小体之间生理空间的形成和稳定起重要作用<sup>[10]</sup>。保持系核仁中显著的ATP酶活性反应表明核仁中有丰富的rRNA合成。细胞核中的

ATP酶活性反应与染色体加倍、有丝分裂过程所需蛋白的合成有关。T型不育系花粉粒在单核时期,由于细胞核与核仁中缺乏ATP酶活性,使rRNA的合成与染色体加倍受阻,不能提供花粉粒第一次有丝分裂所需的物质而使花粉粒不能进入二核细胞,停止发育。

#### 3.2 K型雄性不育系花粉粒形态和酶细胞化学变化与雄性不育发生的关系

K型不育系较T型不育系具有恢复源广、种子饱满、发芽率高等优点,是一个比较理想的不育系。到目前为止,有关K型不育系小孢子发生、发育过程的细胞学研究主要限于光镜<sup>[4,5]</sup>。李传友和孙兰珍用透射电镜观察了K型不育系[K83(21)]小孢子发生、发育过程的超微结构变化,结果除在花粉粒细胞内观察到呈同心圆复合膜状结构不育系多于保持系外,没有发现K型不育系与其保持系之间的差异<sup>[11]</sup>。从我们的试验结果来看,K型不育系小孢子的发生,四分体和单核花粉粒时期的发育与其保持系比较,不论形态学变化还是ATP和细胞色素氧化酶两种酶的活性变化均无大的差异。但伴随二细胞的形成,两者之间开始出现差异。差异主要表现为两方面:(1)花粉粒内壁的结构与ATP酶活性反应。保持系花粉粒在二细胞形成后,细胞质膜上出现ATP酶活性反应,且随着内壁的加厚,ATP酶活性逐渐增强。当内壁加厚到一定程度,内壁中出现径向的管状通道,在内壁的管状通道和外壁的微通道中有显著的ATP酶活性反应。内壁的管状通道和外壁的微通道形成了花粉粒内、外物质运输的机械通道<sup>[12]</sup>。Carretero等在花粉粒内、外壁通道中看到了正在运输的镧离子<sup>[13]</sup>。孟祥红发现 $Ca^{2+}$ 从花粉粒外进入花粉内是通过内、外壁通道传输的<sup>[14]</sup>。花粉粒内壁不仅具有传输功能,而且越来越多的研究表明,花粉粒内壁还具有合成花粉粒萌发、花粉管管壁形成、伸长所需物质的功能。可见花粉粒内壁结构正常与否对花粉粒的萌发至关重要。K型不育系花粉粒虽然在内壁形成初期,质膜上也有ATP酶活性反应,但内壁膨胀、径向的管状通道不能正常形成,且在内壁中出现一些小泡,缺乏ATP酶活性反应,这些均使花粉粒后期发育和萌发所需物质的供给与合成受阻,直接阻止花粉粒的发育与萌发。(2)线粒体结构与细胞色素氧化酶活性。保持系花粉粒在二细胞形成后,细胞质活性发生了较大的变化,各种细胞器数量成倍地增长,尤其是线粒体和质体。线粒体不仅内嵴变得发达,而且内嵴上

的细胞色素氧化酶活性逐渐增强。质体开始积累淀粉粒,到花粉成熟前夕被充满内嵴、内嵴具显著的细胞色素氧化酶活性的线粒体和淀粉粒填满。而 K 型不育系花粉粒二细胞形成后,各种细胞器的数量增长和活性都较保持系的低,线粒体内嵴上的细胞色素氧化酶活性也没有保持系的强。到二细胞后期,线粒体内嵴上的细胞色素氧化酶活性不但不再增强,而且出现降低,至败育前消失。细胞色素氧化酶是呼吸链电子传递系统具重要功能的一种酶,细胞色素氧化酶的缺乏,不仅影响了花粉粒内 ATP 和合成发育所需中间物质的供给,阻碍了内壁的正常发育,而且使正常的呼吸途径受阻,引起呼吸链结构与功能发生异常,导致在 NADH-黄素蛋白(组分 I)和 UbQ-CytB(组分 III)部位进行活跃的单电子还原产生  $O_2^{[15]}$ 。细胞内  $O_2$  的增加可以促进 MDA 的积累,MDA 可使膜蛋白和酶分子发生凝聚和交联,引起生理功能完整性的破坏。K 型雄性不育花粉粒中 ATP 酶和线粒体内细胞色素氧化酶活性的缺乏,与决定这两种酶的线粒体基因 *atpA*、*atp9* 以及 *cox II* 组织结构存在的差异<sup>[16]</sup>有关。有关这些基因影响酶活性的作用机理,我们正在通过电子显微镜核酸原位杂交技术,从超微结构水平上寻找基因、转录与表达过程的变化。以上研究表明,T 型和 K 型雄性不育系是完全不同的两种不育类型。两者不仅败育时期不同,而且败育过程也不同。T 型不育系败育主要发生在单核花粉粒后期,败育的发生首先从液泡膜开始,单核花粉粒时期细胞核和核仁中 ATP 酶的缺乏可能是造成败育的主要原因之一。K 型不育主要发生在二细胞后期或者三细胞时期,败育的发生首先从线粒体开始,花粉粒内壁正常结构不能形成可能是造成花粉粒败育的主要原因之一。花粉粒的发育可能受多基因控制,不同发育时期受不同的育性基因影响,影响育性的不同基因所表现的败育过程不同;败育的严重程度不同;使不育系的易恢复性也可能不同。

## References :

- [ 1 ] Huang T C. Hybrid Wheat Research. Beijing : Beijing Agriculture University Press ,1990 .(in Chinese)  
黄铁城. 杂种小麦研究. 北京 :北京农业大学出版社,1990 .
- [ 2 ] Rai R L. Influence of the male sterility ( *Triticum timopheevii* Zhuk. cytoplasm ) on  $F_1$  seed in common wheat . Prec. of 5th Intern Wheat Genet ,Symp.1978 :299 - 305 .
- [ 3 ] Hu S Y, et al. Electron microscope observations on the microsporogenesis in male-sterile and its maintainer-lines of wheat . Acta Botanica Sinica , 1977 , 19(3) : 167 - 171 .(in Chinese)  
胡适宜,等. 小麦雄性不育系和保持系的小孢子发育的电子显微镜研究. 植物学报,1977,19(3) :167 - 171 .
- [ 4 ] Wang J H, et al. Selection of restorers and comparative study on pollen abortion in cytoplasmic male sterility with cytoplasm *Ae. kotschyi* . Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis , 1993 , 19 ( Suppl. ) : 91 - 97 . (in Chinese)  
王继华,等. K 型不育系恢复系筛选及花粉败育机理比较研究. 北京农业大学学报,1993,19(增刊) :91 - 97 .
- [ 5 ] Li C Y, et al. Cytological studies on pollen abortion mechanisms of cytoplasmic male sterile line of T, V and K types in wheat . Acta Agriculturae Boreali - Sinica , 1996 , 11(2) : 1 - 8 . (in Chinese)  
李传友,等. 普通小麦 T 型、V 型和 K 型细胞质雄性不育系花粉败育机理的细胞学研究. 华北农学报,1996,11(12) :1 - 8 .
- [ 6 ] Mizelle M B, et al. Development of the pollen grain and tapetum of wheat ( *Triticum aestivum* ) in untreated plants and plants treated with chemical hybridizing agent RH0007 . Sex Plant Reprod. 1989,2 :231 - 253 .
- [ 7 ] Yao Y Q, et al. Comparative studies of ATPase activity of K-type cytoplasmic male sterile wheat line and its maintainer . Scientia Agricultura Sinica , 2000 , 33(3) : 97 - 99 . (in Chinese)  
姚雅琴,等. K 型雄性不育系及其保持系花药小孢子不同发育期 ATP 酶活性变化. 中国农业科学,2000,33(3) :97 - 99 .
- [ 8 ] Noda K, et al. Cytochrome C oxidase activity on osteoclasts appeared in an early stage of parathyroid hormone treatment . J. Electron Microsc. 1994 , 43 : 168 - 172 .
- [ 9 ] Zhai Z H. Cell Biology . Beijing : Higher Education Press , 1995 : 208 - 215 .(in Chinese)  
翟中和主编. 细胞生物学. 北京 :高等教育出版社,1995 :208 - 215 .
- [ 10 ] Almouzni G, et al. Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity . EMBO . 1988 , 7 : 4355 - 4365 .
- [ 11 ] Li C Y, et al. Ultrastructure of pollen development in isonuclear alloplasmic male sterile wheat lines . Acta Agriculturae Boreali - Sinica . 1998 ,13(1) :24 - 29 . (in Chinese)  
李传友,等. 小麦同核异质雄性不育系花粉发育的超微结构. 华北农学报,1998,13(1) :24 - 29 .
- [ 12 ] EL-Ghazaly G, et al. Studies of the development of wheat ( *Triticum aestivum* ) pollen : I . Formation of pollen wall and U-bisched Bodies . Grana , 25 :1 - 29 .
- [ 13 ] Carretoro B, et al. The pollen grain wall as a site for passage of lauthanum in tomato . Am. J. Bot . 1995 , 82(1) :31 - 36 .
- [ 14 ] Meng X H, et al. Effect of photoperiod on calcium distribution in photoperiod-sensitive cytoplasmic male-sterile wheat during anther development . Acta Botanica Sinica , 2000 , 42(1) : 15 - 22 . (in Chinese)  
孟祥红,等. 光周期对光敏细胞质不育小麦花药发育过程中  $Ca^{2+}$  分布的影响. 植物学报,2000,42(1) :15 - 22 .
- [ 15 ] Rich P R, et al. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria . Biochem. Biophys. 1978 , 188 :206 - 213 .
- [ 16 ] Li C Y, et al. Mitochondrial DNAs of cytoplasmic male sterile lines of K and V-type in wheat . Acta Phytophysiologica Sinica , 1998 , 24(2) : 153 - 158 .(in Chinese)  
李传友,等. 小麦 K 型及 V 型细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的比较分析. 植物生理学报,1998,24(2) :153 - 158 .