

转真姬菇热激蛋白 *HmHSP70* 基因 烟草花粉败育的细胞学观察

徐丽丽, 郭立忠, 陆秀华

(青岛农业大学生命科学学院, 山东省应用真菌重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘要: 采用扫描电镜和石蜡切片方法观察野生型烟草和转基因不育烟草的花药及其横切结构, 研究真姬菇热激蛋白 *HmHSP70* 导致烟草雄性核不育的机理, 结果表明: 转基因不育烟草花粉的小孢子和花药壁发育异常, 小孢子无法进行有丝分裂而降解, 而绒毡层细胞和中层细胞过度分裂不降解, 药室遭到严重挤压, 是导致花粉败育的主要原因。

关键词: 花粉败育; 转基因烟草; 石蜡切片; 扫描电镜

中图分类号: Q418

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2016. 01. 005

Cytological Observation of Pollen Sterility in Transgenic *HmHSP70* Gene Tobacco

XU Lili, GUO Lizhong, LU Xiuhua

(College of Life Science, Qingdao Agricultural University/Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao 266109, China)

Abstract: In order to research the mechanism of genic male sterility, scanning electron microscope and paraffin section method were adopted in this study to observe the structure of anther and its transverse section in transgenic sterile tobacco and wild-type control. Results showed that microspore of transgenic sterility tobacco development anomalies and non division, but the cells of anther tapetal and middle layer splitted excessively and non degradable, then the Pollen chamber was squeezed severely were the main reasons of pollen sterility.

Key words: pollen sterility; transgenic tobacco; paraffin section; electron microscopy

雄性不育系在生产、生活中具有重要的应用价值。根据遗传背景不同, 可以分为细胞核不育、细胞质不育以及核质互作不育^[1]。细胞核雄性不育是由细胞核内染色体基因控制的雄性不育类型, 细胞质雄性不育一般是植物在自然繁殖过程发生突变或者是通过品种间杂交而得到的不育性。雄性核不育系可以通过毒素基因的特异空间表达、借助反义基因、影响小孢子发育、破坏胼胝质壁、转座子突变、组成型表达等途径获得^[2]。

热激蛋白(Heat Shock Protein, HSP)又称热休克蛋白或热应激蛋白, 是细胞或生物体在受到高温等逆境刺激时新合成的或含量增加的一类蛋白

质, 根据其相对分子质量、结构及功能可以分为 5 大类: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 及小分子量热激蛋白 sHSP 家族^[3]。热激蛋白广泛分布于各种生物体内, 是生物对逆境胁迫短期适应的必需组成成分, 在抑制细胞凋亡^[4], 延缓衰老, 增强肿瘤免疫原性^[5], 以及植物非生物胁迫环境的应答、抗病性、育性转换及植物发育中起着重要作用^[6,7]。其中 HSP70 作为分子伴侣在大多数生物中存在, 是最为重要和保守的热激蛋白家族, 在细胞应激反应后表达最显著, 目前在动植物中研究深入, 但在真菌中的研究刚刚起步。陈建南等在研究高粱细胞质雄性不育过程中发现, 不育系线粒体中缺少 HSP70, 很可

收稿日期: 2015-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172012/C1506); 烟草行业烟草基因资源利用重点实验室开放课题(TB201110)

作者简介: 徐丽丽(1979-), 女, 山东诸城人, 讲师, 硕士研究生, 主要从事微生物和应用真菌研究工作

通讯作者: 郭立忠, 教授, E-mail: glz119@126.com

能是造成其雄性不育的原因^[8]。继而发现热激诱导的育性变化可能受 *HSP70* 基因的调控,且育性不能稳定遗传^[7]。

为进一步研究 *HSP70* 蛋白与植物细胞核不育的机理,青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室(以下简称“本实验室”)以珊西烟草(*Nicotiana tabacum* var. Xanthinc)为受体,将克隆得到的真姬菇(*Hypsizigus marmoreus*)热激蛋白 *HmHSP70* 基因(专利号 CN200910085438.3,全长 2308 bp,编码 666 个氨基酸),通过农杆菌介导的方法导入烟草受体中,最终获得多个抗性转化子,其中部分表现为雄性不育。通过对野生型烟草及转基因不育烟草的花药发育结构、花粉粒表面形态差异,尤其是绒毡层发育变化的观察,重建花粉母细胞的发育过程,研究花药败育的细胞学依据,将为转基因烟草的雄性不育研究提供一定理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

转 *HmHSP70* 基因不育系烟草 H15 由本实验室转化,含有潮霉素 B(hygromycin-R)筛选标记和真姬菇热激蛋白基因(*HmHSP70*),以野生型烟草为可育对照。

1.2 方法

1.2.1 固绿染色压片观察

将不育和对照烟草同时移栽,待盛花期时分别取转基因烟草 H15 株系、对照 CK 花粉尚未散出的花蕾,不经过固定液固定,剪取花药,用镊子捏碎后滴加固绿染液,盖玻片压片,于 OLYMPUS CKX41 型倒置显微镜下观察花粉形态,拍照记录结果。

1.2.2 石蜡切片观察

晴天上午分别取不同发育时期的花蕾,于 FAA 中固定、抽气后常规石蜡切片方法制片^[9],切片厚度 8 μm ,铁矾-苏木精染色后置于 OLYMPUS B \times 53 光学显微镜(相机型号 DP21)下观察并拍照。

1.2.3 扫描电镜观察

将采集的花药用硫酸纸袋盛装,充分干燥并分别破碎后粘于载物台上,经喷金处理后在 JSM-7500F 牛津电制冷能谱仪扫描电子显微镜下观察花药与花粉形状并拍照记录。

2 结果分析

2.1 转 *HmHSP70* 基因烟草花药的形态观察

由图 1 可见,野生型烟草和转 *HmHSP70* 基因

不育烟草的花均能正常开放,柱头几乎无差别。对照烟草花药高于柱头,形态饱满,花粉粒散出布满表面,而转基因烟草表现为雄性不育,花药萎缩,无成熟花粉,且生长短小低于柱头,无法完成自花授粉。



图 1 野生型烟草(左)与转基因烟草(右)花药的形态观察

2.2 转 *HmHSP70* 基因烟草花粉粒表面显微观察

2.2.1 倒置显微镜观察花粉粒

由图 2 可见,野生型烟草花粉粒形状规则,呈长椭圆形,内容物饱满,外壁清晰,萌发沟均匀分布,长度几乎达到了花粉粒的两个极点,状态清晰可见。转基因不育烟草的花粉粒不饱满,外壁薄,压片后多成圆形,有较大的明亮液泡。萌发沟染色较浅,外观不明显,形状不规则。



图 2 野生型烟草(左)与转基因不育烟草(右)花粉粒结构(放大倍数 400 \times)

2.2.2 扫描电镜观察花粉粒

烟草的花药具有四个花粉囊(图 3(1)),每个花粉囊内有一个药室,横切面呈四个裂瓣的形状,花药壁从外到内依次由表皮细胞、药室内壁、中层细胞和绒毡层组成。对花药的扫描电镜结果显示,野生型烟草的花药形状饱满,花粉近球形,表面沟纹分布均匀,内容物充实,有明显的 3~4 条萌发沟,延伸至两端极面(图 3(5),图 3(7))。花药壁表皮细胞薄而致密,外被许多凸起,紧邻表皮的一层为药室内壁,规则排列呈纤维状,中层细胞形状不规则,但排列紧密,内容物较少,而绒毡层消失(图 3(3))。

转基因烟草的花药外形萎缩(图 3(2)),花粉粒发育畸形,收缩干瘪,多为扁圆盘形或椭圆型,萌发沟已严重收缩(图 3(6),图 3(8))。组成花药壁的表皮细胞完整,与对照无较大差别,中层细胞层数较对照多,且有较多内容物填充其中,绒毡层仍然存在,

延伸至药室内部,与畸形花粉粒混杂在一起(图 3(4))。

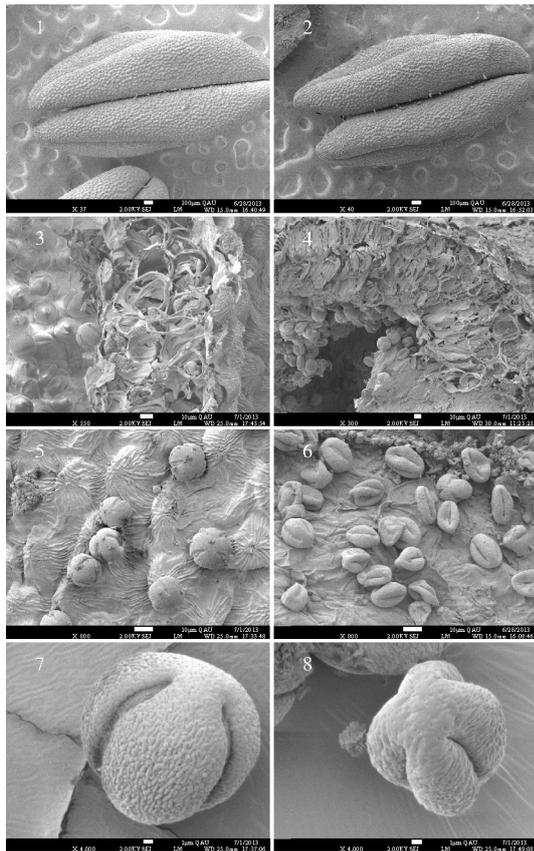


图 3 野生型烟草 CK(左)与转基因不育烟草 H15(右)花粉与花药扫描电镜观察
1. CK 花药;2. H15 花药;3. CK 花药壁;
4. H15 花药壁;5. CK 花粉粒;6. H15 花粉粒;
7. CK 萌发沟;8. H15 萌发沟

2.3 转 *HmHSP70* 基因烟草花粉粒石蜡切片显微观察

2.3.1 小孢子的发育

由图 4 可见,野生型烟草的药室均匀分布,内有多个近球形花粉粒,花药壁边缘清晰,细胞排列紧密(图 4(1))。转基因不育烟草的花药发育异常,药室形状不规则,体积变小甚至消失,绒毡层细胞侵入花药药室现象明显,严重挤压花粉粒,花粉形状不规则(图 4(2))。

野生型烟草的花粉母细胞经减数分裂后形成四分体,分散在药室中,被大量胼胝质包围(图 4(3)),小孢子之间亦有分隔,染色较深,可见细胞质浓厚,无明显液泡。随后四分体在绒毡层分泌的胼胝质酶作用下解体,小孢子游离出来,靠近药壁细胞获取营养,体积变大,内容物增多(图 4(5))。随着小孢子逐渐增大变圆,外壁增厚,形成球状花粉,绒毡层逐

渐消失(图 4(7))。

转基因不育烟草的小孢子形状不规则,细胞核不明显,染色较浅,可能外壁较薄或者有明显大液泡存在(图 4(4)),随后绒毡层继续加厚,小孢子没有继续发育,而是挤压在一起,胞质液泡化,细胞核消失,最终解体被吸收(图 4(6))。

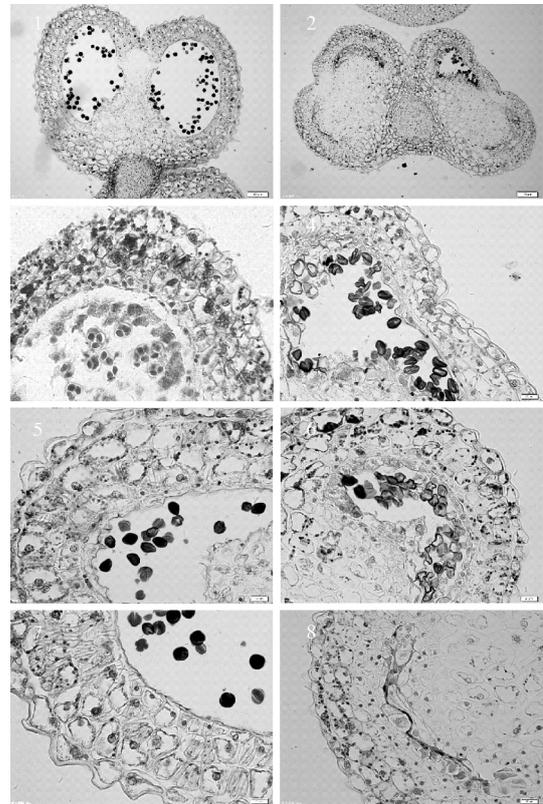


图 4 野生型烟草 CK(左)与转基因不育烟草 H15(右)花粉和花药壁发育的石蜡切片观察(标尺 $20\mu\text{m}$)
1. CK 药室;2. H15 药室;3. CK 四分孢子时期;
4. H15 单核小孢子时期;5. CK 单核小孢子时期;
6. H15 绒毡层过度分裂;7. CK 绒毡层消失;8. H15 药室消失

2.3.2 花药壁的发育

四分孢子时期,野生型烟草的花药壁细胞排列不规则,细胞内营养物质较多,绒毡层开始与中层细胞分离,体积增大,大部分进行有丝分裂变成双核细胞,中层细胞原生质浓厚,细胞核清晰(图 4(3))。随后小孢子继续分裂,绒毡层细胞逐渐解体以供小孢子发育所需的营养,此时小孢子移近花药壁,部分中层细胞开始退化,内壁细胞增大加长,表皮细胞分裂加剧(图 4(5))。花粉成熟时绒毡层已完全消失,剩余的中层细胞排列紧密,形成光滑的药室壁内层,内壁细胞纤维状排列,细胞内容物较少(图 4(7))。

在小孢子形成后,转基因不育烟草的绒毡层细

胞没有与中层细胞分离,也没有退化或降解,反而继续分裂,逐渐侵入药室(图 4(4)),中层细胞排列不规则,营养物质较多,数量也有增多的迹象(图 4(6))。最终绒毡层和中层细胞大量异常发育,致使药室被挤压消失,小孢子解体,表皮细胞萎缩(图 4(8)),造成烟草雄性不育。在此期间,整个药室内壁充斥大量颗粒物质,推测应该是淀粉粒,随着花药的成熟,野生型烟草花药壁中的淀粉粒逐渐消失,成熟花药壁中已很少看到淀粉粒的存在,而转基因不育烟草花药壁中的淀粉粒数量却没有减少。

3 讨 论

近几年的研究大多认为,绒毡层细胞功能失常可能是导致植物雄性核不育的主要原因。绒毡层细胞分泌胼胝质酶,在花粉母细胞分裂后期降解包裹在细胞外面的胼胝质壁,使单核花粉粒可以及时分离,进行正常的生长发育活动。另外绒毡层细胞具有将细胞中的淀粉粒吸收并转化成脂类的功能^[10],绒毡层细胞发育异常,可能使其在转化药室内壁、中层细胞,以及自身的营养物质时出现阻碍,导致细胞中营养物质积累,代谢异常,不能供给花粉发育的营养。郭慧等人在对光敏核不育型水稻的不育花药的研究中发现,败育花药的绒毡层细胞能够一直存在到花蕾的开花期,并且细胞的液泡化明显^[11],这与我们的观察结果相吻合。转基因烟草的绒毡层在小孢子发育过程中不仅不降解,反而继续分裂直至完全充满花药室,严重挤压花粉囊。而花药内壁和中层细胞的物质代谢活动始终旺盛,淀粉粒没有得到转化,致使小孢子的后期发育过程缺乏营养,花粉粒空瘪,萌发沟不明显,是导致烟草不育的重要原因。

但我们也发现,转基因不育烟草的单核小孢子在形成时已经发生异常,小孢子外壁薄,液泡大,细胞核不明显,胞质染色浅。有研究认为,不育花药中绒毡层细胞的异常不是导致花粉败育的原因,而是花粉异常的结果^[12]。李凤霞等对不同胞质来源雄性不育烟草的研究发现,绒毡层异常是两种类型不育系败育的主要原因,但败育高峰发生在小孢子发育的不同时期^[13]。Worrall 等认为小孢子母细胞的胼胝质壁过早解体使转基因烟草小孢子外壁形成受到影响,产生雄性不育^[14]。我们在烟草中的研究尚不能确定是否是花药绒毡层分泌的胼胝质酶导致小

孢子外壁发育异常,但可以肯定的是绒毡层发育异常与花粉败育密不可分。杨晓丽等在对芝麻核雄性不育的研究中发现,不育系 ms86-1 花药中小孢子母细胞的外壁发育异常早于绒毡层,因此推测可能是小孢子母细胞先释放某种信号导致绒毡层细胞的程序化降解过程推迟,而绒毡层的异常发育进一步促进了小孢子的败育^[15]。要想对花粉败育机理有更清楚的了解,则应对小孢子母细胞的发育做进一步研究,确定花粉败育开始发生的时期。

参考文献:

- [1] 张德双,张凤兰,徐家炳,等. 大白菜 CMS96 不育系和保持系电镜观察[J]. 华北农学报,2012,27(2): 133-139
- [2] 李祥. 利用 HSP70 基因人工创造植物雄性不育系的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2003
- [3] Lincoln T, Eduardo Z. 植物生理学[M]. 宋纯鹏,王学路,译. 北京:科学出版社,2009:601-607
- [4] Mosser D D, Caron A W, Bourget L, et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress - induced apoptosis[J]. Mol Cell Biol,1997,17(9):5317-5327
- [5] IGOR M. Immunity, Tumors and Aging: The Role of HSP70 [M]. Berlin:SpringerBriefs, 2013:70-113
- [6] SU Paihsiang, LI Hsoumin. Arabidopsis stromal 70 - kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds[J]. Plant Physiology, 2008,146(3):1231-1241
- [7] 陈建南,傅鸿仪,路子显,等. 高粱细胞质雄性不育与 HSC70mRNA 的关系[J]. 科学通报,1998,43(23):2525-2530
- [8] 陈建南,傅鸿仪,路子显,等. HSP70 反义 RNA 对高粱花粉正常形成的影响[J]. 科学通报,1997,42(18):1993-1997
- [9] 李正理. 植物制片技术 [M]. 北京:科学出版社,1978
- [10] 谢潮添,杨延红,朱学艺,等. 白菜细胞核雄性不育花药的细胞学观察[J]. 实验生物学报,2004,37(4):295-299
- [11] 郭慧,李树杏,向关伦,等. 水稻不同细胞质雄性不育系花粉败育的细胞生物学比较研究[J]. 种子,2012,31(5):30-33
- [12] 谢潮添,杨延红,葛丽丽,等. 白菜核雄性不育花药超微结构的研究[J]. 实验生物学报,2005,38(6):501-506
- [13] 李凤霞,崔萌萌,杨爱国,等. 烟草不同胞质来源雄性不育系小孢子发育的细胞学观察[J]. 中国烟草学报,2011,17(4):37-42
- [14] D Worrall, DL Hird, R Hodge, et al. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco[J]. Plant Cell,1992, 4(7):759-771
- [15] 杨晓丽,张海洋,郭旺珍,等. 芝麻核雄性不育系 ms86-1 小孢子败育过程的超微结构[J]. 作物学报,2008, 34(11): 1894-1900