

碳离子辐照诱导的甜高粱花粉生活力及 花粉母细胞减数分裂的研究

刘瑞媛 董喜存 李文建 何金玉 曲颖 金文杰

(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

摘要 为研究重离子辐照突变株的细胞遗传学变化,以碳离子辐照选育出的甜高粱早熟突变株 KFJT-1 及其对照品种 KFJT-CK 为材料,比较研究了两者之间花粉生活力大小以及花粉母细胞减数分裂的差异。结果发现:KFJT-1 的花粉生活力以及花粉总数大于 KFJT-CK; KFJT-1 花粉母细胞减数分裂大多进入第二次减数分裂时, KFJT-CK 花粉母细胞集中在第一次减数分裂;在 KFJT-1 减数分裂末期 II,出现了两组分裂时期不一致、3 分体以及不均等分裂畸变状况,畸变率仅为 4.5%,说明 KFJT-1 在生长繁殖过程中修复了大部分由于物理诱变造成的染色体畸变,且能稳定遗传。这些结果从生殖细胞水平进一步说明碳离子辐照早熟突变株 KFJT-1 较未突变株 KFJT-CK 成熟期早,且各项指标均优于 KFJT-CK。

关键词 甜高粱, 碳离子, 花粉生活力, 减数分裂

中图分类号 Q691.5, Q944.42, S722.3+5

甜高粱 (*Sorghum bicolor*(L.) Moench) 也叫芦粟、糖高粱、甜秆和高粱甘蔗,是粒用高粱的一个亚种,起源于非洲。与普通高粱相比,其生物学产量高,不仅每亩能产出 150—400 kg 的粮食,而且能产 4 000—5 000 kg 富含糖分的茎秆^[1],其高光合作用特性使每公顷甜高粱每天合成的碳水化合物可以产生 48 L 乙醇,大大高于小麦和玉米^[2]。甜高粱具有抗旱、耐涝、耐盐碱、耐瘠薄、耐高温和耐干热风等特点,被称为是“作物中的骆驼”,适合我国大部分干旱地区的生长。因此,作为一种能源作物正逐渐受到人们的关注。

近年来,重离子辐照作为一种诱变育种手段,由于其传能线密度高、相对生物学效应大以及突变谱广等特点,越来越受到人们的重视^[3]。通过重离子辐照诱变育种技术已经成功获得了拟南芥、烟草、水稻、马鞭草、玫瑰以及康乃馨等的突变株^[4]。尽管国内外在重离子诱变育种方面对辐射细胞遗传学方面的研究很多,但是大多局限在 M1 代及 M2 代,关于稳定株的细胞遗传学研究的报道很少。本研究通过比较分析甜高粱早熟突变株 KFJT-1 及对照 KFJT-CK 之间花粉生活力、花粉母细胞减数分裂的

差异情况,以期为甜高粱辐射诱变育种提供细胞遗传学证据,进一步提高育种效率。

1 实验材料和方法

1.1 材料

甜高粱早熟突变株 KFJT-1 及其对照 KFJT-CK,其中 KFJT-1 是 KFJT-CK 经 80 Gy 碳离子辐照后筛选出的早熟突变株。

1.2 方法

1.2.1 花粉生活力的测定 两种甜高粱的花粉均采自中国科学院寒旱所皋兰站甜高粱试验田,9:00—10:00 AM 采集充分成熟将要开花的甜高粱花粉,分别利用 I-KI 法、过氧化物酶法以及氯化三苯基四氮唑法 (TTC 法) 3 种染色法对甜高粱花粉生活力进行检测。每种方法设 3 个重复,每次观察 5 个视野,计算平均花粉生活力。

花粉生活力=(活花粉粒数/观察的总花粉粒数)×100%

1.2.2 花粉母细胞减数分裂的检测 花粉的采集地

中国科学院“西部之光”项目 (0906040XBO)、方向性重点项目 (KJ CX2-YW-N34-3, KJ CX2-EW-N05-1)、西部行动项目 (Y110190XBX)、甘肃中青年基金 (099RJYA012) 资助

第一作者:刘瑞媛,女,1983年9月出生,2008年于陕西师范大学获生物化学与分子生物学专业硕士学位,现就职于中国科学院近代物理研究所,研究实习员,主要从事辐射育种及分子机理的研究

通讯作者:董喜存, Email: dongxicun@impcas.ac.cn

收稿日期:初稿 2011-12-26, 修回 2012-02-13

点同 1.2.1, 在孕穗期, 花序长度大约在 10—20 cm 时, 于 9:00—11:00 AM 田间采集两种甜高粱旗叶叶结与倒二叶叶结距离为 2—10 cm 之间的花序, 剥去叶及叶鞘, 用镊子夹取两种甜高粱花序上不同部位的小穗, 放入 Carnoy 固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中固定 24 h 后, 依次置于 95%乙醇、80%乙醇各 30 min 后, 最后固定于 70%乙醇, 置 4℃保存。制片时取保存好的甜高粱小穗, 用镊子剥去外稃, 去除雌蕊, 醋酸洋红与卡宝品红复染压片, Olympus 光学显微镜观察统计并照相, 计算出分裂率。

分裂率=(分裂期细胞数/细胞总数)×100%

1.2.3 数据统计分析 数据利用 SPSS18.0 软件分析处理, 组间显著性比较用 *t* 检验, *p*<0.05 表示差异显著, *p*<0.01 表示差异极显著。

2 结果和分析

2.1 甜高粱花粉生活力的测定

花粉是高等植物的雄配子体。花粉生活力是花粉具有存活、生长、萌发和发育的能力。因此, 研究重离子辐照诱变后代的花粉生活力是必不可少的基础性工作。

2.1.1 碘-碘化钾(I-KI)染色法对甜高粱花粉生活力的测定 I-KI 法常用于鉴定不含淀粉的不育花粉, 凡染成蓝紫色的为发育好、活力较强的花粉。发育不良的花粉常呈畸形, 不积累淀粉, 用 I-KI 染色, 不呈蓝色, 而呈黄褐色。用此法检测 KFJT-1 与 KFJT-CK 两种甜高粱花粉生活力。从表 1 中可以看出, KFJT-CK 平均花粉生活力(45.11%)大于 KFJT-1 平均花粉生活力(22.92%), 但是经过 *t* 检验, 差异不显著。

Table 1 Detection of pollen viability by the method of I-KI in sweet sorghum (n=3)

Variety	Deactivated pollen	Live pollen	Pollen viability / %	Average of pollen viability / %
KFJT-CK	72	38	34.54	45.11±15.44
	68	115	62.84	
	67	41	37.96	
KFJT-1	201	71	26.10	22.92±2.89
	144	37	20.44	
	91	26	22.22	

2.1.2 过氧化物酶法对甜高粱花粉生活力的测定 过氧化酶法其原理是: 具有生活力的花粉含有活跃的过氧化物酶, 此酶能利用过氧化氢使各种多酚及芳香族胺发生氧化而产生颜色, 依据颜色可知花粉的活性强弱。如果花粉粒为红色, 则表示有过氧化

酶存在, 花粉有活力; 如为无色或黄色, 则表示已失去活力。从表 2 中可以看出, 早熟突变株 KFJT-1 平均花粉生活力(89.28%)极显著的大于未突变株 KFJT-CK 的平均花粉生活力(49.14%), 表明 KFJT-1 的花粉生活力强, 育性高。

Table 2 Detection of pollen viability by the method of peroxidase in sweet sorghum (n=3)

Variety	Deactivated pollen	Live pollen	Pollen viability / %	Average of pollen viability / %
KFJT-CK	152	105	40.86	49.14±8.96
	55	78	58.65	
	100	92	47.92	
KFJT-1	36	220	85.94	89.28±3.37**
	20	253	92.67	
	27	224	89.24	

Note: ** Expressed the difference of average of pollen viability was extremely significant between KFJT-CK and KFJT-1, *p*<0.01.

2.1.3 氯化三苯基四氮唑法（TTC 法）甜高粱花粉生活力的测定 凡是有生命活力的花粉，在呼吸作用过程中都有氧化还原反应，而无生命活力的花粉则无此反应。当 TTC 渗入生活力强的花粉内，并作为氢受体被脱氢辅酶（NADH₂ 或 NADPH₂）上的氢还原时，便由无色的 TTC 变为红色的 TTF。因此凡

被染成红色的花粉粒活性强，无色者为没有活力的花粉或不育的花粉。从表 3 中可以看出，早熟突变株 KFJT-1 平均花粉生活力（48.03%）显著大于未突变株 KFJT-CK 的平均花粉生活力（15.89%），表明 KFJT-1 的花粉生活力强，育性高。

Table 3 Detection of pollen viability by the method of TTC in sweet sorghum (n=3)

Variety	Deactivated pollen	Live pollen	Pollen viability / %	Average of pollen viability / %
KFJT-CK	171	17	9.04	15.89±5.94
	196	46	19.01	
	303	74	19.63	
KFJT-1	210	143	40.51	
	162	108	40.00	
	126	220	63.58	

Note: * Expressed the remarkable difference of average of pollen viability between KFJT-CK and KFJT-1, $p<0.05$.

以上 3 种染色方法所检测 KFJT-1 与 KFJT-CK 花粉活力间有显著性差异，也有极显著差异（见表 2 和表 3）。早熟突变株 KFJT-1 的花粉粒总数大于 KFJT-CK 的花粉粒总数，且 KFJT-1 花粉活力大于 KFJT-CK 花粉活力，初步说明早熟突变株 KFJT-1 的花粉育性高。

2.2 甜高粱花粉母细胞减数分裂的检测

2.2.1 甜高粱未突变株 KFJT-CK 减数分裂特征 从表 4 和图 1 可以看出，甜高粱未突变株 KFJT-CK

分裂期集中在第一次减数分裂，减数分裂率是 77.90%。在前期 I，其终变期（见图 1(a)）线性化明显，局部区域的染色体彼此相互缠绕，核仁染色不明显；双线期（见图 1(b)）染色体进一步螺旋化，缩短变粗，彼此分开，有些非姐妹染色单体间形成交叉结并有断化现象；终变期（见图 1(c)）染色体高度螺旋化，均匀散布在细胞中，核仁核膜消失。中期 I（见图 1(d)）染色体排列在赤道板上，纺锤体清晰可见。后期 I（见图 1(e)和图 1(f)）同源染色体分离并移向两极。

Table 4 The behavior of pollen mother cells' meiosis in sweet sorghum

	KFJT-CK	KFJT-1
Pachynema	94	6
Metaphase I	24	12
Anaphase I	23	32
Metaphase II	0	62
Anaphase II	0	30
Telophase II	0	15
Tetrad	0	82
Triad	0	12
Unequal separation of chromosome	0	1
Asynchronization of chromosomes segregation	0	1
Total of cells	181	311
Total of cells at mitotic phase	141	253
Division rate / %	77.90	81.35
Aberration rate / %	0	4.5

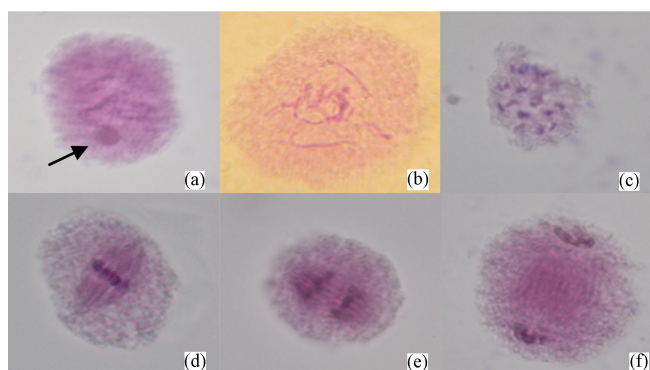


Fig.1 Meiosis of pollen mother cells in KFJK-CK: (a) Pachynema, arrow showing nucleolus; (b) Diplotene; (c) Diakinesis; (d) Metaphase I; (e) Anaphase I; (f) Anaphase I

2.2.2 甜高粱早熟突变株 KFJT-1 减数分裂特征
通过表 4 和图 2 可以得到,甜高粱早熟突变株 KFJT-1 既有减数第一次分裂,又有减数第二次分裂,减数

分裂率大于 KFJT-CK 的分裂率,为 81.35%,且有 26%进入到 4 分体时期。

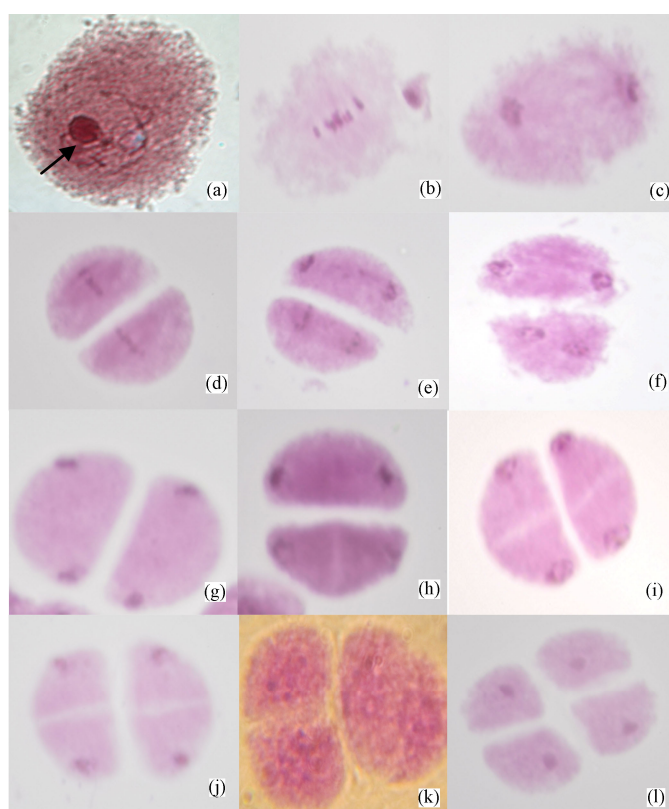


Fig.2 Meiosis of pollen mother cells in KFJT-1: (a) Pachynema, arrow showing nucleolus; (b) Metaphase I; (c) Anaphase; (d) Metaphase II; (e)-(g) Anaphase II ((e), (f) showing asynchronization of chromosomes segregation, (g) showing normal Anaphase II); (h)-(j). Telophase II (h. showing asynchronization of chromosomes segregation, the one is anaphase II and the other is telophase II); (k) Triad; (l) Tetrad

由于 KFJT-1 是 KFJT-CK 经 80 Gy 碳离子辐照后筛选出的早熟突变株,比较图 1 和图 2,发现 KFJT-1 未能观察到清晰的纺锤丝,说明其染色质较 KFJT-CK 浑浊,且其减数分裂特征也发生了变化,粗线期(见图 2(a))核仁染色较 KFJK-CK 明显。中期 I(见图 2(b))染色体排列在赤道板上,但是不

能观察到清晰的纺锤体。中期 II(见图 2(d)),可看到两组染色体整齐的排列在各自的赤道板上。后期 II(见图 2(g)),着丝粒一分二,两组赤道板上的姐妹染色单体分开,分别移向四极;后期 II 还出现了不均等分裂和分裂时期不一致等畸变现象。末期 II(见图 2(h)、图 2(I)、图 2(j))染色体分别到达四极,

解螺旋, 出现新的核膜核仁, 产生细胞壁, 形成四分体 (见图 2(l)); 由图 2 和表 4 可以看出, 在末期 II 出现了两组分裂时期不一致 (其中一组在后期 II, 另一组在末期 II)、3 分体 (见图 2(k)) 以及不均等分裂等畸变状况, 减数分裂畸变率仅为 4.5%。未发现微核、染色体桥、落后染色体等畸变类型, 由此可见, 植株在生长繁殖过程中修复了大部分由于物理诱变造成的染色体畸变。

3 讨论

重离子与 X 射线、电子束、 λ 射线相比, 具有传能线密度 (LET) 高、在能量沉积过程中存在尖锐的 Bragg 峰、与介质原子核的碰撞截面大、相对生物学效应 (RBE) 大、氧增强比 (OER) 较小和 DNA 损伤的可修复性较小等特点^[5,6], 近年来已广泛应用于植物诱变育种工作中。目前重离子辐照育种已成功应用于水稻、小麦、西红柿、棉花、油菜等的遗传改良, 并结合植物转基因技术、组织培养技术、分子标记技术及远缘杂交等生物学技术应用于植物育种中^[7]。

花粉是高等植物的雄配子体, 它在有性繁殖中起着传递传递雄性亲本遗传信息的作用。花粉生活力是花粉具有存活、生长、萌发或发育的能力^[8]。在育种工作中, 研究花粉的生活力和育性是必不可少的工作。因此, 研究重离子诱变株的花粉生活力具有重要的生物学意义。在本研究中, 分别利用 I-KI、过氧化物酶法和氯化三苯基四氮唑法 (TTC 法) 检测了甜高粱早熟突变株 KFJT-1 和未突变株 KFJT-1 花粉的生活力, 发现 I-KI 法检测结果与其他两种方法不同, 这可能与该方法在镜检中, 颜色判定是紫色和黄褐色, 故很难判定其花粉活力。经过过氧化物酶法和 TTC 法检测到 KFJT-1 的花粉生活力显著的大于 KFJT-CK 花粉生活力, 且花粉总数也大于 KFJT-CK, 说明早熟突变株 KFJT-1 的花粉育性高。

减数分裂是细胞分裂两次, 而染色体只复制一次。因此经减数分裂后, 其细胞内的染色体数目减少一半, 变成单倍体 (Haploid)。精细胞和卵细胞结合后, 后代个体又恢复染色体数目的双倍性。减数分裂是维持物种世代间染色体数目稳定、使物种得以保存的重要生物学机制。因此, 了解重离子诱变株的减数分裂情况具有重要的生物学意义。通过比较 KFJT-CK 与 KFJT-1 花粉母细胞减数分裂, 发现 KFJT-1 的减数分裂末期 II 出现了两组分裂时期不一致 (其中一组在后期 II, 另一组在末期 II)、3 分体以及不均等分裂等畸变状况, 减数分裂畸变率

仅为 4.5%, 且减数分裂率为 81.35%, 大于未突变株 KFJT-CK 的分裂率 77.90%。说明植株在生长繁殖过程中修复了由于物理诱变所造成的染色体突变, 同时也证明辐射所造成的部分影响可以遗传到子代。甜高粱早熟突变株 KFJT-1 细胞质出现浑浊现象, 可能是染色体变异合成的成分遗传到子代所造成的。

这些结果从生殖细胞水平进一步说明碳离子辐照早熟突变株 KFJT-1 较未突变株 KFJT-CK 成熟期早, 且各项指标均优于 KFJT-CK。碳离子诱变造成早熟的原因是否是某些特定基因造成的, 仍需进一步深入的研究。

参考文献

- 谷卫彬, 黎大爵. 甜高粱, 高效太阳能转化器[J]. 太阳能, 2004, 1(4): 12-14
GU Weibin, LI Dajue. Sweet sorghum, high efficient converter of solar [J]. Solar Energy, 2004, 1(4): 12-14
- 石龙阁. 我国甜高粱产业发展前景分析[J]. 杂粮作物, 2007, 27(3): 242-243
SHI Longge. The development of sweet sorghum industry in our country [J]. Rain Fed Crops, 2007, 27(3): 242-243
- Sachiko Arase, Yoshihiro Hase, Jun Abe, et al. Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants [J]. Plant Biotechnology, 2011, 28(3): 323-329
- Tanaka A. Establishment of ion beam technology for breeding [M]. Induced Plant Mutations in the Genomics Era, 2009, 243-246
- Atsushi Tanaka, Naoya Shikazono, Yoshihiro Hase. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants [J]. J Radiat Res, 2010, 51(3): 223-233
- 董喜存, 李文建, 余丽霞, 等. 用随机扩增多态性 DNA 技术对重离子辐照大丽花花色突变体的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(1): 62-64
DONG Xicun, LI Wenjian, YU Lixia, et al. J Radiat Preliminary study on flower color mutant induced by 80 MeV/u $^{12}\text{C}^{+6}$ ions in *Dahlia pinnata* Cav using RAPD technique [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2007, 25(1): 62-64
- 周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 重离子束辐照育种研究进展及发展趋势[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 165-170
ZHOU Libin, LI Wenjian, QU Ying, et al. Progress and

- Tendency in Heavy Ion Irradiation Mutation Breeding [J]. Nuclear Physics Review, 2008, 25(2): 165-170
- 8 Dafni A, Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications [J]. Plant Systematics and Evolution, 2000, 222(1): 113-132

Study on pollen viability and meiosis of pollen mother cells in sweet sorghum induced by carbon ion beam irradiation

LIU Ruiyuan DONG Xicun LI Wenjian HE Jinyu QU Ying JIN Wenjie

(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT To investigate the change of mutated cytogenetics, KFJT-1 irradiated by carbon ions and KFJT-CK were used and the difference of pollen viability and pollen mother cells meiosis were comparatively studied. The experimental results showed that the total number of pollens and pollen viability of KFJT-1 were more than that of KFJT-CK. When the meiosis of pollen mother cells were mostly turned into the second meiotic division for KFJT-1, the meiosis of KFJT-CK was being at the stage of the first meiotic division. Triad, unequal separation of chromosome and asynchronization of chromosomes segregation were found in KFJT-1 meiosis II, and the aberration rate of KFJT-1 was only 4.5%, which indicated that the most of chromosomal aberrations induced by carbon ions were repaired and the genetic characteristics were stabilized during the growth of reproduction and might be stable genetic. These results show that KFJT-1 maturity is earlier than KFJT-CK, and all of indexes are better than the KFJT-CK.

KEYWORDS Sweet sorghum, Carbon ion beam, Pollen viability, Meiosis

CLC Q691.5, Q944.42, S722.3+5