

# 水稻小孢子发生过程中微管骨架的初步研究\*

冯九焕 刘向东 卢永根

(华南农业大学植物分子育种研究中心,广州,510642)

**摘要** 以正常水稻品种 IR36 和光温敏核雄性不育系培矮 64S 为材料,采用间接免疫荧光标记技术,观察了小孢子发生过程中微管构型的变化.两份材料均形成了前期的核周微管、中期的纺锤体微管和末期的成膜体微管等类型.但减数分裂前期不育系培矮 64S 的部分小孢子母细胞微管构型表现出一些细微变化,微管排列紊乱,粘成束状.推测这些变化可能与部分小孢子的败育有关.

**关键词** 水稻(*Oryza sativa* L.);光温敏核雄性不育系;小孢子发生;间接免疫荧光标记;微管

**中图分类号** Q 942.4

微管骨架是真核生物普遍存在的一种细胞器,参与细胞中多种功能活动的实现(翟中和, 1996).已往对微管骨架的研究多是取材于体细胞组织,对于雄性性细胞研究的较少.主要是由于这类细胞常常具有特殊的细胞壁(胼胝质壁或孢粉素外壁),阻止抗体的进入而无法进行有效的标记.Lammeren 等(1985)采用 PEG(聚乙二醇)包埋切片方法,观察了脂麻掌属(*Gasteria verrucosa*)小孢子发生过程中微管骨架变化.但包埋切片的方法操作繁琐,且得到的只是细胞局部的微管分布图象.在兰花(*Orchids*)(Brown et al, 1991)、茄(*Solanum melongena* L.)(Traas et al, 1989)和紫露草(*Tradescantia paludosa*)(Terasaka et al, 1990)等植物的小孢子发育过程中微管骨架的研究也已有成功的报道,但这一类常常是胞质分裂同时型或花粉具萌发沟类型的植物,可以采用部分酶解处理使抗体进入而进行标记.

水稻是重要的粮食作物及禾本科遗传研究的模式实验材料,然而有关水稻小孢子发生过程中的微管骨架研究,至今尚少见有报道.在已广泛开展的雄性不育机理的探索中,对微管骨架系统也尚未涉及.为此,本试验采用酶解切片法对水稻小孢子发生的微管骨架变化及其与不育性的关系进行了初步探讨.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以长日高温条件下生长的水稻品种 IR36 和光温敏核雄性不育系培矮 64S 为材料,剪取顶叶叶枕距约为 0 的幼穗的中部小穗(基本处于减数分裂期).

### 1.2 方法

参照 Lloyd 等(1979)的方法,根据水稻花药的特点,具体的操作步骤如下.

(1)固定处理.分别取减数分裂各个时期的小穗,小心用解剖针挑出花药,放入盛有固定液的小指管中.固定液为:0.4 g/L 聚甲醛 + 0.02 g/L 戊二醛(MTSB 缓冲液配制,包括:

1998-07-08 收稿 冯九焕,女,33岁,讲师,博士

\* 广东省自然科学基金(960422)和华南农业大学博士启动基金资助项目

50 mmol/L Pipes, 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L  $MgSO_4$ , 0.25 mol/L 甘露醇, pH 6.9), 附加  $\varphi$ (二甲基亚砜) = 10% 和  $\varphi$ (Triton X-100) = 1%, 振荡条件下固定约 1 h. 用 MTSB 冲洗 3 次, 每次停留 5 min. 取出花药, 放在涂有  $\varphi$ (多聚赖氨酸) = 0.1% 溶液的载片上, 用针轻压花药使药室内的细胞散出. 每一载片放置约 30 个相同发育期的花药.

滴加下列酶混合液: 0.15 g/L 纤维素酶 (Onozuka R-10, Tokyo Japan), 0.03 g/L 果胶酶 (Sheishin Pharmaceutical, Tokyo Japan) 和 0.03 g/L Novozym 234 (Novo Lab. Danbury, CT) (MTSB 配制), 37 °C 酶解 45 ~ 60 min, MTSB 洗 3 次.

$\varphi$ (Triton X-100) = 1% (MTSB 配制) 抽提 30 min, MTSB 冲洗. 0.1 g/L 牛血清清蛋白溶液 (MTSB 配制, pH 6.9) 中停留 1 h, MTSB 洗. 并用磷酸缓冲液 (以下简称为 PBS, pH 6.9) 洗 1 次.

(2) 间接免疫荧光标记. 经上述酶解处理后的细胞, 与第一抗体鼠抗微管蛋白 (Sigma T-9026, PBS 稀释 100 倍) 反应, 37 °C 于潮湿滤纸盒中振荡培养 1 h, PBS 冲洗. 加入第二抗体结合 FITC 的羊抗鼠 IgG (Sigma F-0257, 用 PBS 稀释 200 倍), 37 °C 培养 1 h, PBS 冲洗. 对照不加第一抗体.

为观察细胞核或染色体的位置, 滴一小滴 0.5 mg/L DAPI 水溶液, 随即用 PBS 冲洗. ATF (Molecular Probes, Eugene, OR) 封片. 首先在 Leica DMRXA 荧光显微镜下进行初步观察, 然后用 Leica 共焦激光扫描显微镜及其图象处理系统进行观察拍照.

## 2 观察结果

经过大量取材制片, 观察到 IR36 和培矮 64S 小孢子发生各个阶段微管骨架的变化规律. 减数分裂早前期, IR36 小孢子母细胞呈椭圆球形, 胞质内形成网状的核周微管 (perinuclear microtubule), 从核膜向周质辐射. 细胞核位于中央, 为无荧光的暗区 (图版 1). 在同期的培矮 64S 材料中, 观察到一部分小孢子母细胞具有上述相似的微管构型; 但在另一些细胞中, 出现了异常, 表现为核周胞质微管排列零乱, 分布不均匀粘成束状, 出现了一些大小不同的无荧光的暗区 (图版 2). 在这一阶段 IR36 和培矮 64S 均没有观察到早前期带 (preprophase band, 简称为 PPB) 形成.

随着进一步发育, 小孢子母细胞进入减数分裂中期 I, 核周胞质微管消失, 所有微管聚集成纺锤体微管 (spindle microtubule), 呈现极强的荧光. 在纺锤体中部赤道区, 由于染色体的存在形成了一个无荧光的暗区, 把纺锤体隔成两个半纺锤体. 纺锤体极较为狭窄, 使得此纺锤体不同于有丝分裂过程中常见的“冷杉树”状 (朱徽, 1996), 而是似伞状 (图版 3). 进入后期 I, 着丝粒微管将子染色体分别拉向两极, 纺锤体极区的荧光增强. 在两极区中间, 仍存在大量极丝微管 (图版 4). 至末期 I, 纺锤体极的荧光逐渐消失, 成为无荧光的黑洞, 子核形成. 极丝微管缩短并增加新的微管, 形成成膜体微管 (phragmoplast microtubule). 成膜体中部出现一个无荧光的狭缝, 即是将来细胞板的位置 (图版 5). 从中期 I 至末期 I, 培矮 64S 与 IR36 微管构型没有可辨的差异.

至中期 II, 胞质微管聚集成纺锤体, 2 个子细胞的纺锤体呈平行排列. 纺锤体中间仍因染色体的占据呈现无荧光的暗区, 把纺锤体分隔成 2 个相对的伞状构型 (图版 6). 在这一时期, 细胞中除纺锤体微管外没有其它的微管形式. 直到末期, 形成四分体, 微管又重新以核周胞质微管形式出现, 呈辐射状从核膜延伸至质膜, 核位于四分小孢子中央, 在核膜周围有较强的荧

光(图版 7)。从这一时期的观察结果来看,不育系与正常水稻没有表现出差异。

四分体释放后形成单核小孢子,细胞内微管逐渐由辐射状变成随机的网状排列,散布于整个细胞质内(图版 8)。这时的培矮 64S 未观察到与正常水稻的差异。

随着外壁的形成及胞质液泡的发育,小孢子进入单核中后期,后期的单核小孢子由于孢粉素外壁的存在较难进行有效的荧光标记,其方法还有待于进一步探索。

### 3 讨论

微管在细胞内处于动态变化之中,并具有低温解聚的特点,能否保持真实的微管构型与采用的方法密切相关。本试验采用的游离细胞酶解粘片法,对新鲜的性细胞组织进行短时固定及部分酶解处理,标记的荧光强,且能够观察到细胞内微管骨架的整体构型,不失为一种简便易行的方法。但要注意掌握适宜的酶解程度和粘片技术。

有关水稻小孢子发生过程中的微管骨架研究目前尚少见有公开报道。从本实验的结果看,水稻小孢子发生的各个阶段,微管的分布构型与玉米(Staiger et al, 1990)、脂麻掌(Lammeren et al, 1985)及一些低等苔藓植物(Brown et al, 1987)的基本相似,主要有 3 种微管类型:即减数分裂前期的核周胞质微管;中期的纺锤体微管及后期的成膜体微管。不同的微管构型在细胞中的功能不同:前期呈网络状的核周胞质微管参与了细胞核的定位及向细胞表面的物质运输作用(Dickinson et al, 1984);中期的纺锤体微管主要是细胞分裂时将染色体拉向两极;成膜体微管在胞质分裂时定位细胞板的位置,因此在一些胞质分裂同时型的植物中,由于中期 I 之后没有形成成膜体,因此末期 I 后未形成二分体,而在末期 II 后同时形成了四分孢子(Traas et al, 1989)。

减数分裂前期,不育系培矮 64S 的小孢子母细胞出现两种微管类型:一类与正常品种相似;另一类表现出一些差异。而在减数分裂中期 I、中期 II,培矮 64S 微管构型基本正常。因此,培矮 64S 不育系减数分裂过程是正常的。这不同于玉米减数分裂突变类型 *dv*, 在 *dv* 这种突变类型中,由于中期 I 不能形成正常的纺锤体致使形成了多核细胞,导致花粉败育(Staiger et al, 1990)。而在培矮 64S 材料中,减数分裂前期部分小孢子母细胞的微管变化可能导致了一部分小孢子早期败育,使培矮 64S 的花粉败育呈现出复杂性。

以上的研究尚为描述性工作,积累的资料有限,相信随着快速固定、免疫组织化学和分子生物学等技术的应用,将会推动微管骨架及其功能的研究。

**致谢** 本实验所用材料培矮 64S 是由湖南杂交水稻研究中心罗孝和研究员提供;所用抗体由香港大学徐是雄教授惠赠,共焦激光显微镜观察及拍摄在香港大学植物学系完成,特此致谢!

### 参 考 文 献

- 朱 微. 1996. 植物体细胞的微管周期及微丝周期. 见:徐是雄,朱微主编. 植物细胞骨架. 北京:科学出版社, 60~83
- 翟中和. 1996. 细胞骨架体系、细胞核的体外装配(重建). 见:李宝健主编. 面向 21 世纪生命科学发展前沿. 广州:广东科技出版社, 231~238
- Brown R, Lemmon B. 1987. Division polarity, development and configuration of microtubule arrays in bryophyte meiosis: I Meiotic prophase to metaphase I. *Protoplasma*, 137: 84~99

- Brown R, Lemmon B. 1991. Pollen development in *orchids*. I. Cytokinesis control of division plane in irregular patterns of meiotic cytokinesis. *Protoplasma*, 163:9 ~ 18
- Dickinson H G, Sheldon J M. 1984. A radial system of microtubules extending between the nuclear envelope and the plasma membrane during early male haplophase in flowering plants. *Planta*, 161:86 ~ 90
- Lammeren A A M, Keijzer C J, Willemse M T M, et al. 1985. Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria errucosa* (Mill.) H. Duval. *Planta*, 1 ~ 11
- Lloyd C W, Slabas A R, Powell A J, et al. 1979. Cytoplasmic microtubules of higher plant cells visualised with anti-tubulin antibodies. *Nature*, 279:239 ~ 241
- Staiger C J, Cande W Z. 1990. Microtubule distribution in *dv*, a maize meiotic mutant defective in the prophase to metaphase transition. *Devel Biol*, 138:231 ~ 242
- Traas J A, Burgain S, Dumas R. 1989. The organization of the cytoskeleton during meiosis in eggplant (*Solanum melongena* L.); microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. *J Cell Sci*, 92:541 ~ 550
- Terasaka O, Tsuneyoshi N. 1990. Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. II. Microtubule dynamics associated with the unequal cell division. *Bot Mag Tokyo*, 103:133 ~ 142

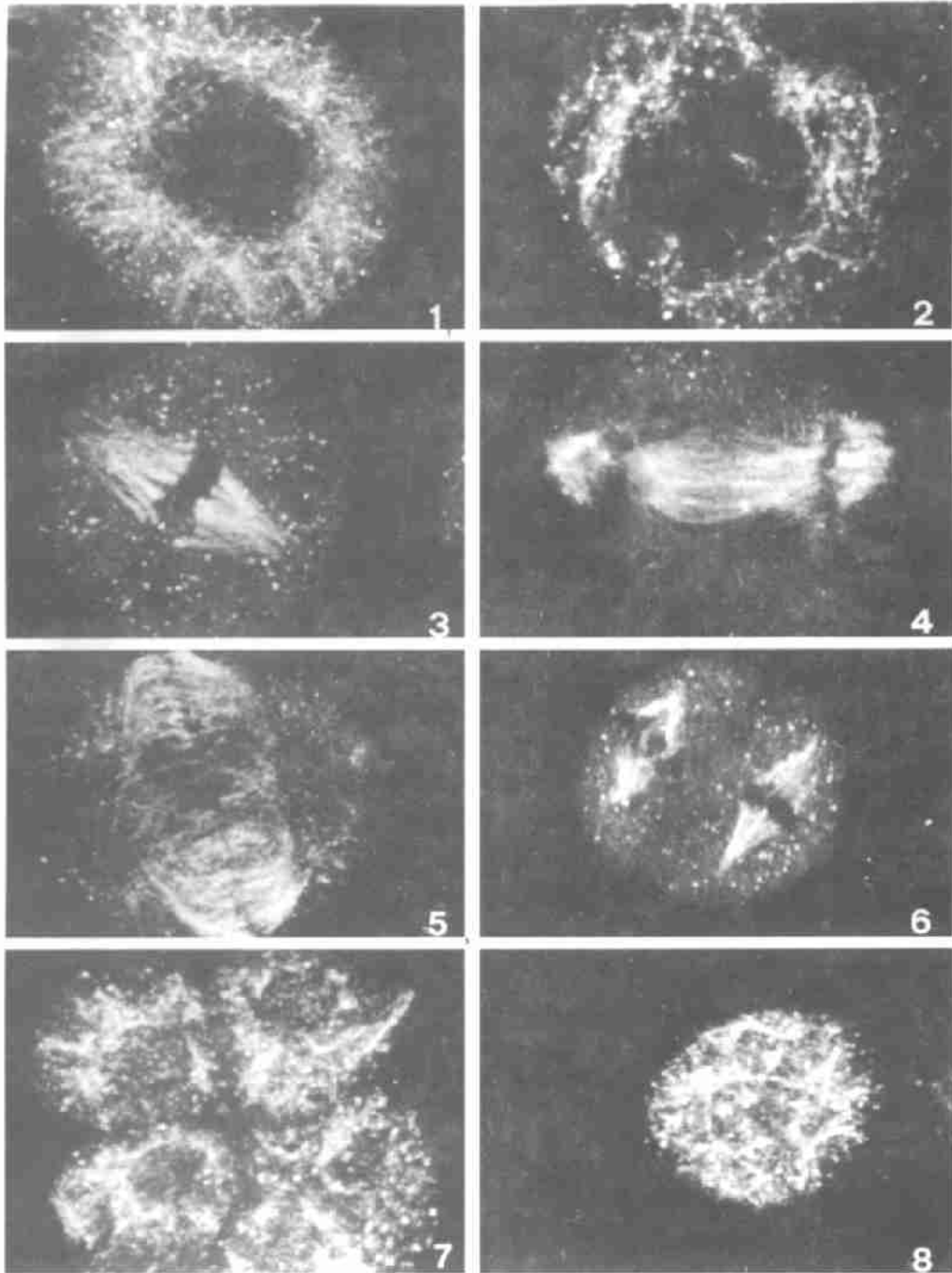
## A Preliminary Study on Microtubular Cytoskeleton During Microsporogenesis of Rice

Feng Jiujuan    Liu Xiangdong    Lu Yonggen

(Plant Molecular Breeding Research Center, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

**Abstract** By using the technique of indirect immunofluorescence labeling, some changes of microtubular configuration in the microsporogenesis were observed in IR36, a fertile normal cultivar and Peiai 64S, a photoperiod and temperature sensitive genic male sterile line. All types of microtubule arrays were formed in the two materials, namely, interphase or prophase perinuclear microtubule, metaphase spindle microtubule and anaphase phragmoplast microtubule, etc. Fine variations, however, were detected in distribution pattern of some Peiai 64S microsporocyte microtubule. Microtubules were disorderly arranged and sticking bundle. It is tentatively proposed that microtubular distribution variations are perhaps associated with some microspores abortion.

**Key words** rice (*Oryza sativa* L.); photoperiod and temperature sensitive genic male sterile line; microsporogenesis; indirect immunofluorescence labeling; microtubule



1. 减数分裂前期 I, 小孢子母细胞辐射状的核周微管; 2. 减数分裂前期 I, 培矮 64S 小孢子母细胞核周微管排列紊乱; 3. 减数分裂中期 I, 示纺锤体微管; 4. 减数分裂后期 I, 形成纺锤体极微管及中部的极丝微管; 5. 减数分裂末期 I, 形成成膜体微管; 6. 减数分裂中期 II, 示 2 个平行的纺锤体微管; 7. 四分体呈辐射状排列的微管; 8. 早期单核小孢子具网状的胞质微管。(×1 000)

图版 IR36 及培矮 64S 小孢子发生过程中微管骨架变化

【责任编辑 张 砾】