

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 006

廖菊够, 康洪梅, 代瑾然, 等. 温度对斯托克通氏烟草雄配子体形成和发育的影响 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 614-619

Liao JG, Kang HM, Dai JR, et al. Effects of temperature on *Nicotiana stocktonii* during microsporogenesis [J]. Guihaia, 2013, 33 (5): 614-619

温度对斯托克通氏烟草雄配子体形成和发育的影响

廖菊够¹, 康洪梅¹, 代瑾然¹, 索文龙², 马文广³, 陈穗云^{1*}

(1. 云南大学 生命科学学院 植物学系, 昆明 650091; 2. 玉溪中烟种子分公司, 云南 玉溪 653100; 3. 云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100)

摘要: 为探究低温对斯托克通氏烟草 (*Nicotiana stocktonii*) 花粉母细胞 (PMC) 减数分裂及其雄配子体发育过程的影响, 采用卡宝品红染色法, 研究不同温度条件下该材料雄配子体形成和发育的过程。结果表明: 种植于昼温 (31±0.5) °C、夜温 (11±0.5) °C 人工气候箱中的 *Nicotiana stocktonii* 花粉母细胞减数分裂过程异常现象较少, 出现微核的比率较低, 用新鲜成熟的花粉做萌发实验花粉萌发率较高, 为 (71±3)%; 而种植于昼温 (25±0.5) °C、夜温 (3±0.5) °C 条件下的 *Nicotiana stocktonii* 开花后花药大多干瘪, 用新鲜成熟花粉做萌发实验花粉萌发率低, 为 (13.67±3)%。花粉母细胞减数分裂过程出现染色体桥、染色体不同步、染色体断片、落后染色体等现象, 存在微核的细胞比率较高。因此, *Nicotiana stocktonii* 花粉母细胞减数分裂与小孢子发育过程易受温度影响, 从而影响花粉的可育性。

关键词: 斯托克通氏烟草; 温度; 雄配子体形成; 异常现象

中图分类号: Q945.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142 (2013) 05-0614-06

Effects of temperature on *Nicotiana stocktonii* during microsporogenesis

LIAO Ju-Gou¹, KANG Hong-Mei¹, DAI Jin-Ran¹, SUO Wen-Long², MA Wen-Guang³, CHEN Sui-Yun^{1*}

(1. College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Yuxi Zhongyan Tobacco Seed Co., LTD, Yuxi 653100, China; 3. Tobacco Research Institute, Yuxi 653100, China)

Abstract: In order to explore the influence of temperature on the meiosis of pollen mother cells and microsporogenesis in *Nicotiana stocktonii*, materials planted at different temperatures were observed by carbol fuchsin staining. The results showed that there was less abnormality and lower microkernel ratio during meiosis of pollen mother cells and microsporogenesis when *N. stocktonii* was planted at higher temperature. Anther of *N. stocktonii* planted at lower temperature withers and the pollen germination rate was low, 10%–15%, compared with the 65%–75% germination rate of materials planted in higher temperature. In addition, there were chromosome bridges, chromosome out of sync, chromosome fragment, laggard chromosome and higher micronucleus ratio during meiosis. It can be concluded that *N. stocktonii* meiosis of pollen mother cells is impressionable to low temperature and inevitably affected the fertility of pollen.

Key words: *Nicotiana stocktonii*; temperature; microsporogenesis; abnormality

收稿日期: 2012-12-18 修回日期: 2013-03-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31101416); 云南省烟草公司项目 (2011YN09)

作者简介: 廖菊够 (1988-), 女, 云南保山市龙陵人, 硕士研究生在读, 主要从事植物育种及生理学研究, (E-mail) liaojugoulove@126.com。

*通讯作者: 陈穗云, 博士, 教授, 主要从事植物生殖发育和生理研究, (E-mail) chensuiyun97@yahoo.com.cn。

Nicotiana stocktonii 起源于墨西哥 Revillagigedo 群岛, 隶属于碧冬烟亚属 (*Petunioides*) 残波烟草组 (Repandae), 体细胞染色体数目 $2n=48$, *N. stocktonii* 抗黑胫病、根黑腐病、白粉病、赤星病、蛙眼病及 TMV (许美玲等, 2009), 是栽培烟草品种改良的天然基因库。花粉母细胞减数分裂与小孢子发育是花粉形成的重要阶段, 该过程发生异常将直接影响花粉活力。减数分裂与小孢子发育过程中的异常现象包括滞后染色体, 染色体断片、染色体不同步、染色体提早分离、染色体桥, 微核 (microkernel) 等, 其中滞后染色体, 染色体断片、染色体提早分离等可能在减数分裂后期形成微核, 具微核的小孢子不育。在自然条件下, 外界环境条件如温度、土壤、降水、光照等的变化可能会在小孢子形成和发育的任何阶段影响花粉育性, 关于低温引起小孢子母细胞减数分裂异常的现象已有报道: 如低温造成西瓜花药发育过程细胞形态学水平上的变化 (刘林, 2007), 低温引起芒果减数分裂过程微核仁和双线期单价体与多价体数目增加等 (黄镜浩等, 2008)。经烟草多年大田育种实践发现, 西双版纳烟草种子繁育基地冬季种植 *N. stocktonii* 花药多干瘪, 花粉萌发率低, 严重影响了该种种子生产和育种工作, 而夏季种植该材料基本能正常生长繁育。夏季种植 *N. stocktonii* 期间西双版纳月平均最高温度 31.68°C , 月平均最低温度 11.5°C ; 冬季种植该材料期间月平均最高温度 25°C , 月平均最低温度 3.5°C , 不同季节种植 *N. stocktonii* 期间保证其水肥需求, 相关育种人员推断温度可能是导致 *N. stocktonii* 花药育性降低的主要原因。

本研究通过人工气候箱模拟大田栽培的温度条件种植 *N. stocktonii*, 观察该材料花粉母细胞减数分裂与小孢子发育过程, 探究温度对 *N. stocktonii* 花粉母细胞减数分裂与小孢子发育过程的影响, 以及造成西双版纳烟草种子繁育基地冬季种植 *N. stocktonii* 花粉活力低的原因。

1 材料和方法

1.1 材料

研究材料为烟草 *N. stocktonii*。根据大田栽培期间气象局记录的温度条件确定人工气候箱不同实验组的栽培温度, 实验组 A 和 B 在 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 的温室中统一育苗并移栽, 选取花芽即将分化生长

状况相似的植株并分为 A、B 两组, 置于温度不同的两个人工气候箱中栽培, 实验组 A 昼温为 $(31\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 夜温为 $(11\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$; 实验组 B 昼温为 $(25\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 夜温为 $(3\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 实验组 A 和 B 光周期 L:D=14:12, 相对湿度为 50%~70%, 光照强度为 2 500 lx。两个实验组花期采集直径 1 cm 以内的花蕾, 置于卡诺氏固定液 (无水乙醇:冰乙酸体积比为 3:1) 中 4°C 保存备用。

1.2 方法

小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察: 将固定的材料转入 45% 的冰乙酸中软化 20 min, 挑选不同大小的花蕾并分类, 按花蕾大小排列, 选取不同大小的花蕾取出花药, 分别置于洁净的载玻片中央, 滴加一滴卡宝品红, 用镊子挤出花粉粒, 盖上盖玻片, Olympus BX 51 显微镜下观察花粉母细胞减数分裂与小孢子发育过程, 统计微核、染色体桥、染色体不同步、落后染色体等的出现频率, 并把两个实验组的材料做对比。

花粉萌发率观察: 萌发用的培养基由 10% 蔗糖和 0.01% 的硼酸组成, 该培养基经试验为多个烟草种花粉萌发的最适培养基。取刚开裂的花药置于凹载玻片中, 滴加培养基挤出花粉, 在细胞培养皿中加入 2 mL 培养液, 滴加几滴花粉液, 置于 25°C 培养 3 h 后拍照统计花粉萌发率, 每组萌发实验 3 个重复, 每个重复取 3 个视野统计花粉萌发率。

2 结果与分析

2.1 *N. stocktonii* 减数分裂与小孢子发育过程观察

在前期 (prophase) I, 从细线期 (leptotene) 到终变期 (diakinesis), 核仁体积逐渐变小, 染色能力越来越弱。细线期细胞核和核仁都较大, 染色体呈长的细丝状 (图版 I: a); 偶线期 (zygotene) 细胞内的同源染色体两两成对靠拢形成二价体 (图版 I: b)。粗线期 (pachytene) 同源染色体完成配对, 染色体收缩 (图版 I: c); 双线期 (diplotene) 染色体进一步收缩变粗, 可见交叉结 (chiasmata), 能够识别棒状和环状二价体 (图版 I: d); 终变期 (diakinesis) 二价体更加超螺旋化, 染色体较小; 到了晚终变期时 (late-diakinesis), 核仁体积仅和二价体的大小差不多 (陈穗云, 2003) (图版 I: e)。

前期 I 结束后, 核仁开始解体, 核膜逐渐消失, 前中期 (pre-metaphase) I, 二价体随机分

布于花粉母细胞中,中期 I 二价体被纺锤丝定位于赤道板上(图版 I: f);后期 I (anaphase I) 二价体中的同源染色体通过纺锤丝的牵引相互分离,分别移向两极(图版 I: g);当相互分离的同源染色体被平均分配到两极时,进入末期(telophase I)(图版 I: h),此时,染色体开始解螺旋,但没有形成细胞板(cell plate),说明烟草减数分裂为同时型胞质分裂(simultaneous type),在末期还可观察到形成中的微核(图版 I: i)。

当每一极核仁融合至剩下 1 个核仁时,每个二分体染色体(dyad chromosome)的 2 个姊妹染色单体由于互相排斥而分开,只剩下着丝粒相连,形成了“X”型染色体,这就是前期 II(图版 I: j, k, l);在两极的核仁解体和核膜消失之后,进入前中期 II(图版 I: m),此时,每极随机分散着 24 个二分体染色体,中期 II 每一极二分体染色体由纺锤丝牵引在赤道板上互定向;后期 II 二分体染色体的姊妹染色单体发生分离,成为单分体染色体(monad chromosome),随后被平均分配到四极;单分体染色体到达四极后即开始解螺旋,形成新的核仁和核膜,进入末期 II(图版 I: n)。

在第二次减数分裂完成以后,进入四分体(tetrad)时期,开始了雄配子体的发育过程。*N. stocktonii* 四分体小孢子排列方式有左右对称型(bilateral symmetry type)(图版 I: o)、十字交叉型(decussate type)(图版 II: p)和四面体型(tetrahedron)(图版 I: q)。在单核居中期,观察到细胞核外存在颗粒状物质,可能为微核(micronucleus)(图版 I: r)。随着液泡的形成和体积的增大,细胞核被挤到细胞壁附近,为单核靠边期(uninucleate stage)(图版 I: s)。随后单核发生一次有丝分裂,形成一个生殖核(generative cell)和一个营养核(vegetative cell),即为两核靠边期(two nuclear stage)(图版 I: t)。此后,小孢子一直以二核状态存在,直到发育为成熟花粉粒(图版 I: u)。

2.2 *N. stocktonii* 减数分裂与小孢子发育过程异常行为分析

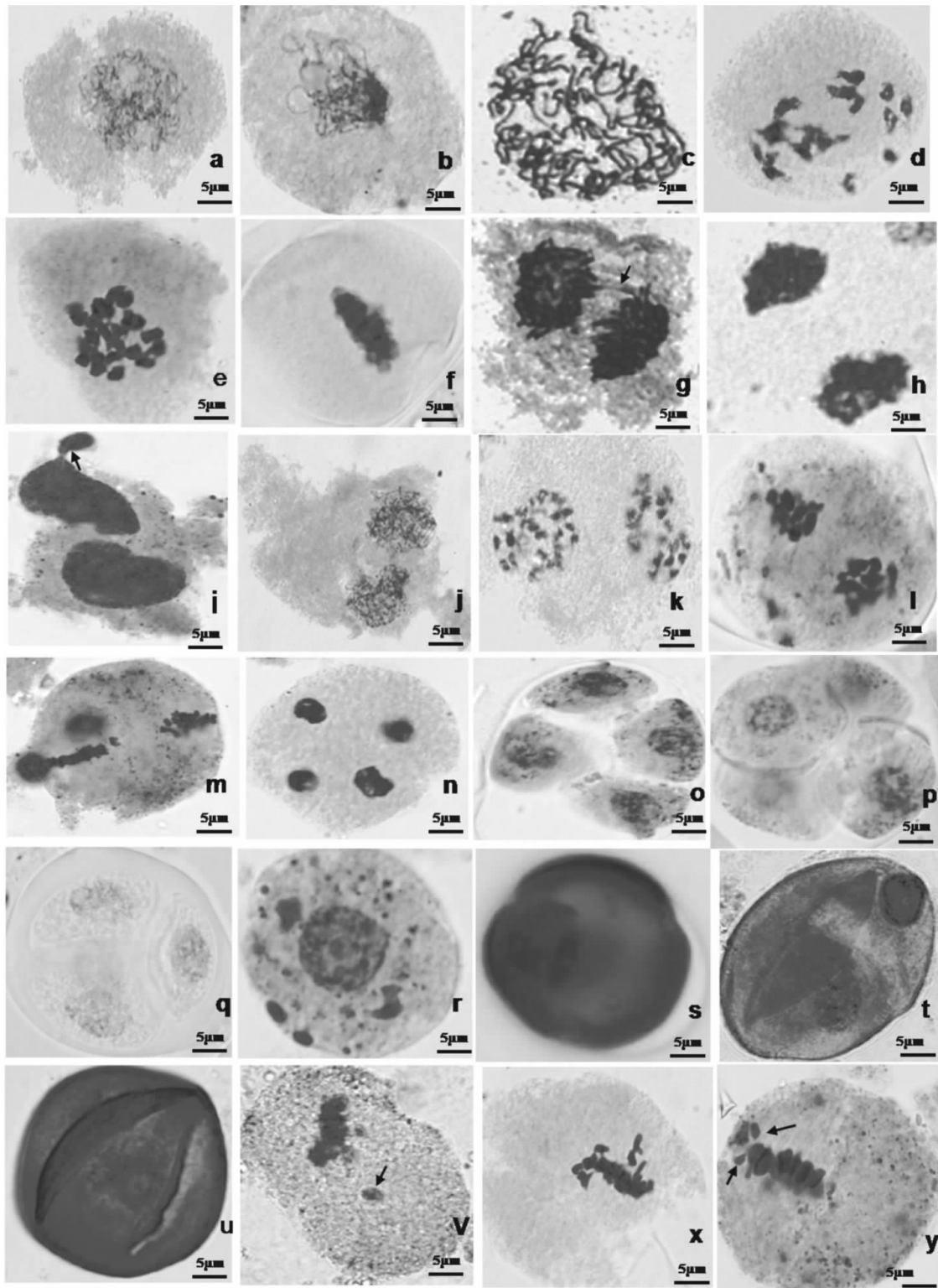
通过观察两个实验组的 *N. stocktonii* 小孢子母细胞减数分裂与小孢子发育过程,发现实验组 B 的 *N. stocktonii* 小孢子母细胞减数分裂末期存在微核的比例高于实验组 A 的材料,且观察到存在多个微核的现象。在细胞间期,微核呈圆形或椭圆形,游离于主核之外,大小应是主核的 1/3 以下

(陈凯峰等, 2011)。另外,在两个温度条件下种植的该材料中还观察到染色体桥,染色体不同步、中期染色体落后、染色体断片和染色体提早分离等现象。

2.2.1 染色体桥 染色体桥是由于染色体倒位形成的细胞学构相,造成后期染色体缺失,由此形成的配子往往不育。实验组 B 的 *N. stocktonii* 减数分裂后期 I 多数细胞中同源染色体均等分离,表现正常,在观察到的 45 个后期 I 细胞中有 5 个细胞出现染色体桥(chromosome bridge),主要是单体桥(图版 I: g)。根据细胞遗传学原理,这类桥是倒位圈内只有一次交换或者是由倒位圈内发生三线双交换所致,产生双着丝粒和无着丝粒的染色单体,在后期 I 形成单染色单体桥和断片,所形成的配子只有 50% 可育;实验组 A 的该材料没有观察到染色体桥。

2.2.2 染色体断片、滞后染色体 染色体断片(chromosome fragment)是指染色体断裂后产生的无着丝粒区段,染色体断片可能由倒位引起,也可能由非倒位片段形成,非倒位片段可能是由于部分染色体缺失引起的,具断片的小孢子母细胞造成配子部分不育,在以后的分裂中以微核存在(Li, 1981)。两个实验组的 *N. stocktonii* 减数第一次分裂中期都可观察到染色体断片(图版 I: v),其中实验组 B *N. stocktonii* 观察到的 45 个减数第一次分裂中期细胞中有 3 个细胞具有染色体断片,占 6.67%,实验组 A 该材料观察到的 45 个减数第一次分裂中期细胞中有 4 个细胞具有染色体断片,占 8.89%;滞后染色体(laggard chromosome)是指在减数分裂中期落后的染色体,滞后染色体在后续的分裂过程中形成微核。两个实验组的 *N. stocktonii* 减数第一次分裂中期都可观察到滞后染色体(图版 I: x)。

2.2.3 染色体不同步、染色体早分离 实验组 B 的 *N. stocktonii* 减数第二次分裂中期观察到了染色体不同步的现象,在观察到的 45 个减数第二次分裂中期细胞中有 6 个细胞出现不同步现象,实验组 A 的材料没有观察到该现象。同源染色体提早分离在小孢子母细胞减数分裂双线期到中期 I 都可能出现,染色体提早分离后形成 2 个单价体,在中期 I 之前同源染色体提早分离多形成不定向的单价体对,可能随机分离或落后于其它二价体而在末期 I、末期 II 形成微核,而中期 I 同源染色体联会不紧密提早解离多形成定向的单价体对,在后期 I 正常分离。在两个实验组的 *N. stocktonii* 中,只在实验组 B 小孢子母细胞减数第一次分裂中期观察到染色体提早



图版 I *N. stocktonii* 减数分裂和小孢子发育各时期图 a-I, v-y. 减数第一次分裂 a. 细线期; b. 偶线期; c. 粗线期; d. 双线期; e. 终变期; f. 中期; g. 后期, 箭头示染色体单桥; h. 前末期; i. 末期, 箭头示一个正在形成中的微核。j-u. 减数第二次分裂与小孢子发育 j. 细线期; k. 双线期; l. 终变期; m. 中期; n. 末期; o. 四分体, 左右对称型; p. 四分体, 十字交叉型; q. 四面体型; r. 单核居中期, 箭头示微核; s. 单核靠边期; t. 二核靠边期, 箭头示生殖核和营养核; u. 成熟花粉粒; v. 中期, 箭头示染色体断片; x. 中期, 箭头示落后染色体; y. 中期, 箭头示提早分离的染色体。

Plate I Observation of the meiosis and development of microspore in *N. stocktonii* a-I, v-y. Observation of the meiosis a. Leptotene; b. Amphitene; c. Pachytene; d. Diplotene; e. Late-diakinesis; f. Metaphase; g. Anaphase, arrow shows the single chromosome bridge; h. Telophase; i. Telophase, arrow shows the emerging microkernel. j-u. Observation of the second meiosis and development of male gametophyte; j. Leptotene; k. Amphitene; l. Diakinesis; m. Metaphase; n. Telophase; o. Tetrad, bilateral symmetry type; p. Tetrad, decussate type; q. Tetrad, tetrahedron; r. Uninucleate microspore in center, arrow shows the microkernel; s. Uninucleate microspore in periphery; t. 2-celled stage, arrow indicating generative nucleus and vegetative cell; u. Mature pollen grains; v. Metaphase, arrow shows the chromosome fragment; x. Metaphase, arrow shows the laggard chromosome; y. Metaphase, arrow shows the chromosome separated early.

分离(图版 I: y) 在实验组 B 统计染色体断片的 45 个细胞中有 2 个细胞出现这种现象。

2. 2. 4 微核 细胞分裂后期, 无着丝粒断片或滞后染色体不能向细胞的两极运动, 而是残留在细胞中央的赤道板附近, 当子代细胞形成时, 游离于细胞质中形成微核。减数第一次分裂末期: 根据统计, 实验组 B 的 *N. stocktonii* 减数第一次分裂末期观察到的 80 个细胞中有 20 个细胞出现 1 个微核(图版 II: a), 比率为 25%, 有 5 个细胞出现 2 个微核(图版 II: b), 比率为 6. 25%, 有一个细胞出现 5 个微核(图版 II: c), 比率为 1. 25%; 实验组 A 的该材料末期统计的 80 个细胞中有 7 个出现 1 个微核, 比率达 8. 7%, 没有出现多个微核的细胞。

减数第二次分裂末期: 实验组 B 的 *N. stocktonii* 减数第二次分裂末期观察到的 45 个细胞中有 8 个出现一个微核(图版 II: d), 比率为 17. 8%, 有 2 个细胞出现 2 个微核(图版 II: e), 比率为 4. 44%, 有 1 个细胞出现 3 个微核(图版 II: f), 比率为 2. 22%; 实验组 A 的该材料末期统计的 50 个细胞中没有细胞出现微核。

小孢子发育过程: 两个实验组的 *N. stocktonii* 小孢子发育过程中都可能存在微核, 在实验组 B 中, 小孢子发育的单核居中期观察到细胞中具有颗粒状物质可能为微核, 统计的 65 个细胞中有 10 个细胞出现这种现象, 比例达 15. 38%, 在实验组 A 中, 统计的 65 个细胞中有 4 个细胞出现颗粒状物质, 比例达 6. 15%。

2. 3 花粉萌发率统计

分别统计两个实验组的 *N. stocktonii* 新鲜成熟花粉萌发率, 结果见表 1, 从表 1 中可以看出实验组 A 的 *N. stocktonii* 新鲜成熟花粉萌发率要高于实验组 B。

表 1 两个实验组 *N. stocktonii* 新鲜成熟花粉萌发率比较
Table 1 Mature pollen germination ratio of *N. stocktonii* in different treatments

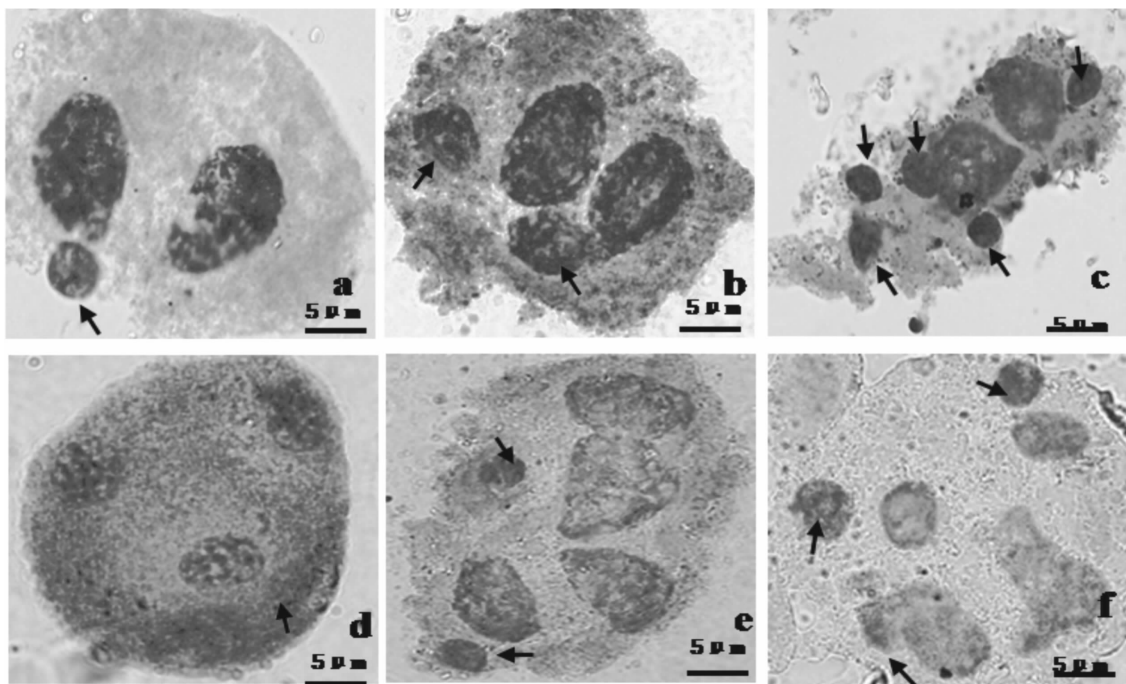
处理 Treatment	花粉萌发率 (%) Pollen germination ratio			
	重复 1	重复 2	重复 3	平均
实验组 A Experimental Group A	68	71	74	71±3
实验组 B Experimental Group B	12	15	14	13. 67±1. 53

3 结论与讨论

生物的减数分裂过程受一系列基因精确控制,

其中任何一个基因发生突变, 将使减数分裂过程出现异常, 产生遗传变异。在自然条件下, 外界因素或个体细胞内某些生理、生化过程所产生的物质的作用都可诱发染色体结构变异、影响减数分裂与小孢子发育过程的正常进行, 降低花粉可育性(李雪等, 2003)。通过观察人工气候箱中不同温度条件下种植的烟草野生种 *N. stocktonii* 减数分裂与小孢子发育过程, 发现较低温度下种植的该材料减数分裂与小孢子发育过程出现的异常行为更多, 比率更高, 新鲜成熟花粉萌发率更低。两个处理组实验过程中保证了光照、湿度、土壤、施肥等的一致性, 实验结果初步表明低温影响了 *N. stocktonii* 减数分裂与小孢子发育过程, 减数分裂过程出现的染色体断片, 滞后染色体、提早分离染色体等都可能在后续的减数分裂和小孢子发育过程中形成微核, 低温条件下种植的材料减数第一次、第二次分裂末期和小孢子发育阶段出现微核的比率和数目都高于种植于较高温度条件下的材料, 而微核直接导致花粉败育, 因此推断较低温度下种植的 *N. stocktonii* 出现高比例微核可能是造成花粉活力低的原因之一。但是, 在实践栽培过程中, *N. stocktonii* 的生殖与发育过程还受到其它因子与环境因子的互作影响, 而这些环境因子还可能通过其它方面如绒毡层的发育等影响花粉活力(邹长松等, 2010)。

一般来说, 在光照和温度等生态因子方面, 各种植物的雄配子体都形成了较宽的耐受极限, 而其中往往有一些对温度特别敏感的类型, 当环境温度高于或低于其最适生长温度时就会影响雄性生殖器官功能, 有关这方面的报道较多(Barnabas *et al.*, 2008; Thakur *et al.*, 2010)。两个实验组花粉萌发活力相差较大的实验结果初步表明低温影响了 *N. stocktonii* 的雄配子体形成过程, Issara-kraisila & Considine (1994) 研究表明夜晚温度低于 10 °C 时芒果实验组的花粉活力比对照降低 50%。因此, 实验组 B 的栽培温度条件可能已经超出 *N. stocktonii* 对低温的耐受范围。另外, 即使在大田夏季种植或较高温度培养箱栽培过程中, *N. stocktonii* 花粉萌发率为 70% 左右, 减数分裂过程中也出现了部分异常现象, 分析这可能与该材料的起源地有关, Revillagigedo 群岛位于墨西哥以南, 属于热带雨林气候, 全年平均气温 27 °C 左右, *N. stocktonii* 在进化过程中可能更好地适应了热带气候, 在引种栽培于温带亚热带过程中适应性较差, 在花粉母细胞减数分裂



图版 II 实验组 B *N. stocktonii* 减数第一次分裂和减数第二次分裂末期微核的显微观察 a-c. 减数第一次分裂末期 a. 1 个微核; b. 2 个微核; c. 5 个微核 箭头示微核。d-e. 减数第二次分裂末期 d. 1 个微核; e. 2 个微核; f. 3 个微核; 箭头示微核。

Plate II Microscopic observation of the first and second meiosis of *N. stocktonii* in experimental Group B a-c. Telophase of the first meiosis a. One microkernel; b. Two microkernels; c. Five microkernels, arrow shows the microkernel. d-e. Telophase of the second meiosis

d. One microkernel; e. Two microkernels; f. Three microkernels, arrow shows the microkernel.

与小孢子发育过程中容易受到环境因素如低温的影响。该实验启示我们在生产栽培和育种实践中应该避免在温度低的季节种植 *N. stocktonii* 以提高育种效率，加快该烟草种育种进程。

参考文献：

- 许美玲, 李永平. 2009. 烟草种植资源图鉴 [M]. 北京: 北京科学出版社: 786-786
- 陈穗云. 2003. 小麦与长穗偃麦体胞杂种后代的遗传特征与基因组分析 [D]. 济南: 山东大学
- Barnabas B, Jager K, Feher A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals [J]. *Plant*, **31**: 11-38
- Chen KF (陈凯峰), Den Y (邓妍), Guo JJ (郭建军), et al. 2011. Effects of IAA and NAA on micronucleus in the rip cells of *Vicia faba* root (吲哚乙酸、萘乙酸对蚕豆根尖细胞微核的诱导作用) [J]. *J Huazhong Norm Univ: Nat Sci Edit* (华中师范大学学报·自然科学版), **45** (4): 607-611
- Huang JH (黄镜浩), Wu HX (武红霞), Wang SB (王松标), et al. 2008. Effect of low temperature on nucleolus and

chromosomes' behavior of mango (*Mangifera indica* L.) PMC during meiosis (低温对杜果花粉母细胞减数分裂过程中核仁及染色体行为的影响) [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), **35** (8): 1 101-1 108

- Issarakraisila M, Considine JA. 1994. Effects of temperature on pollen viability in Mango cv. Kensington [J]. *Ann Bot*, **73**: 231-240
- Liu L (刘林). 2007. Effect of low temperature oil anther development in watermelon (低温对西瓜花药发育的影响) [J]. *Northern Hort* (北方园艺), **4**: 16-19
- Li X (李雪), Chen LM (陈丽梅), Du J (杜捷), et al. 2003. Observation on abnormal meiosis of pollen mother cells in *Lilium davidii* var. *unicolor* (兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察) [J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin* (西北植物学报), **23** (10): 1 796-1 799
- Li MX. 1981. The microspore mother cell meiosis and pollen development of *Paeonialactiflora* Pall [J]. *Acta Hort Sin*, **8** (49): 49-55
- Thakur P, Kumar S, Malik JA, et al. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops; an overview [J]. *Environ Exp Bot*, **67**: 429-433