

水稻雄性半不育突变体的细胞学观察

彭苗苗 陈发菊 张德春\*

( 三峡大学生物技术研究中心 宜昌 443002 )

**摘 要** TP-2 是由水稻品种台北 309 自然突变的雄性半不育突变体。解剖小花后观察发现 突变体花药细长 ,干瘪 ,白色透明状 ,雌蕊正常。花粉活力检测结果表明 突变体水稻平均花粉粒活力率为 57.599% ,1 个花粉囊里的花粉粒平均有 436 粒 ,正常材料台北 309 水稻平均花粉活力率为 94.177% ,1 个花粉囊里的花粉粒有 798 粒。组织切片观察发现 突变体水稻从小孢子母细胞发育到减数分裂结束 ,和正常株相比较在形态上无显著差异 ,小孢子形成初期出现异常 ,绒毡层快速消融 ,小孢子在其发育过程中因得不到营养不能正常发育 ,产生的小孢子干瘪 ,呈不规则状 ,同时部分小孢子产生破裂消融现象 ,绒毡层不能正常降解可能是导致 TP-2 水稻小孢子异常发育的主要原因。通过以上观察 ,对进一步揭示 TP-2 突变体的不育机制提供了基本资料 ,对该材料的组配奠定了基础。

**关键词** 水稻 雄性半不育 花粉 石蜡切片

中图分类号 S511.5 文献标识码 A 文章编号 1673 - 5102( 2012 )03 - 0266 - 04

Cytology Observation on the Male Semi-sterile Mutant of Rice

PENG Miao-Miao CHEN Fa-Ju ZHANG De-Chun\*

( Biotechnology research center of China Three Gorges University ,Yichang 443002 )

**Abstract** TP-2 is a spontaneous semi-sterile mutant of TP309 which is a variety of rice ( *Oryza sativa* ). The filaments of small flower are slender ,the anthers are shriveled in white and transparent ,the development of female organ is normal. Pollen viability shows that the pollen viability of mutant is 57.599% ,much lower than that of control group ( 94.177% ) ,the pollen grains in TP-2 pollensac 436 ,much lower than that of control group ( 798 ). Paraffin section shows that the development from microspore mother cell to the end of meiosis on TP-2 mutant rice is normal ,compared with the normal strains in the form. However ,in the early microspore formation ,rapid melting of tapetum ,the process of microspore development lack of nutrition can not develop normally ,resulting in a small dry spore. It has irregular shape ,while some small spores have broken ablation phenomenon. May be the main reasons of abnormal development of small spores on TP-2 rice is the tapetum does not degrade normally. The observation provides basic material to mutant infertility of TP-2 and lays the foundation of TP-2.

**Key words** rice male semi-sterility pollen paraffin section

杂种不育是种间和亚种间生殖隔离最为普遍的一种现象 ,利用杂种优势可能显著的提高水稻的产量 ,水稻亚种间杂种往往存在着部分或完全的不育性 ,成为了利用杂种优势的主要难题<sup>[1~3]</sup>。Camnaerus 在 1694 发现植物性别后 ,Coleman 在 1876 首先引入“ 植物雄性不育 ”的概念<sup>[4]</sup>。从此 ,在生物界对植物雄性不育进行了长达数百年的研究直至今日。雄性不育在植物界中很常见 ,迄今为止已在 43 科 ,162 属 ,320 个种发现了雄性不育现

象<sup>[5]</sup>。雄性不育主要是植物雄性器官异常 ,其表型特征有多重形式 ( 1 )雄性器官萎缩、畸形、消失或雄性器官雌性化 ( 2 )不能形成正常的小孢子或无花粉 ( 3 )小孢子发生异常 ( 4 )花粉不能成熟或无萌发能力 ( 5 )花粉有一定活力 ,但花药不开裂 , ( 6 )花粉在柱头萌发 ,不能识别<sup>[6~8]</sup>。

本研究以由水稻品种台北 309 自然突变的雄性半不育突变体为研究材料 ,进行了初步的表型鉴定、细胞层次分析、活力测定及花粉计数细胞学研

基金项目 :国家自然科学基金( 31071376 )

第一作者简介 :彭苗苗 ( 1988— ) ,女 ,硕士研究生 ,主要从事植物发育生物学研究。

\* 通讯作者 E-mail :zhangdc227@ 163. com

收稿日期 2011 - 09 - 22

究,在此基础上探究该不育材料胚胎发育过程及花粉活率低下的原因,阐明 TP-2 变异体雄性不育的特点,为进一步研究该突变体的分子机制奠定了基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

所用材料为本实验室保存的水稻品种。将不同发育时期的穗子材料固定于 FAA 固定液( 50% 酒精 90 mL:冰醋酸 5 mL:福尔马林 5 mL )中 24 h 转入 70% 酒精保存备用。

1.2 实验方法

常规石蜡切片法,切片厚度为 8 μm,番红—固绿( Safranin-Fast Green )对染,逐级脱水透明封片, Olympus BH2 显微镜观察并照相。

采用碘—碘化钾染色法和 TTC 染色法检测花粉活力,并统计计数。花粉计数:用解剖针将即将开花 的穗子拨开,挑取其中的饱满的花粉,在 2 mL

的 EP 管中放入 100 μL 的 TTC 溶液,然后挑取 1 个花粉囊,用解剖针挑破,每个样品做 3 个重复。将 EP 管放到漩涡混合器上充分振荡,使混合均匀,然后取 10 μL 放入细胞计数板中计数,所得结果扩大 10 倍。

2 观察结果

2.1 花药壁的发育

水稻的花药具有 4 个花粉囊( 图 1 :A )。当小穗的刚开始发育时,花药呈四棱柱形。发育初期,花药壁最外层为单层表皮细胞,在 4 个角隅处分化出胞原细胞( 图 1 :A,图 2 :A )。随后胞原细胞进行平周分裂,形成初生壁细胞和初生造孢细胞,初生壁细胞进行多次分裂形成中层细胞和绒毡层细胞( 图 1 :B,图 2 :B )。至小孢子母细胞形成时,药壁分化出四层,从外到内依次为表皮、药室内壁、中层和绒毡层( 图 1 :C,图 2 :C )<sup>[5]</sup>。

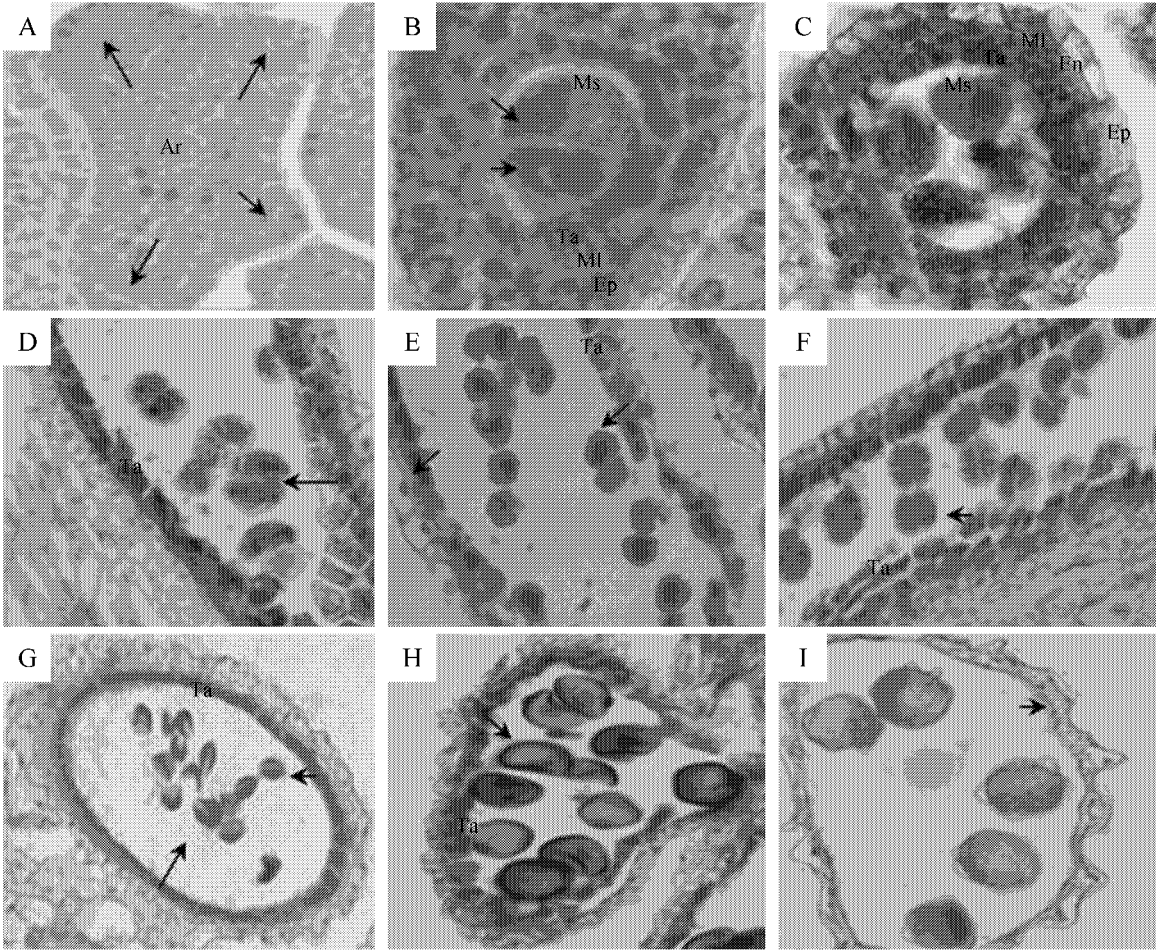
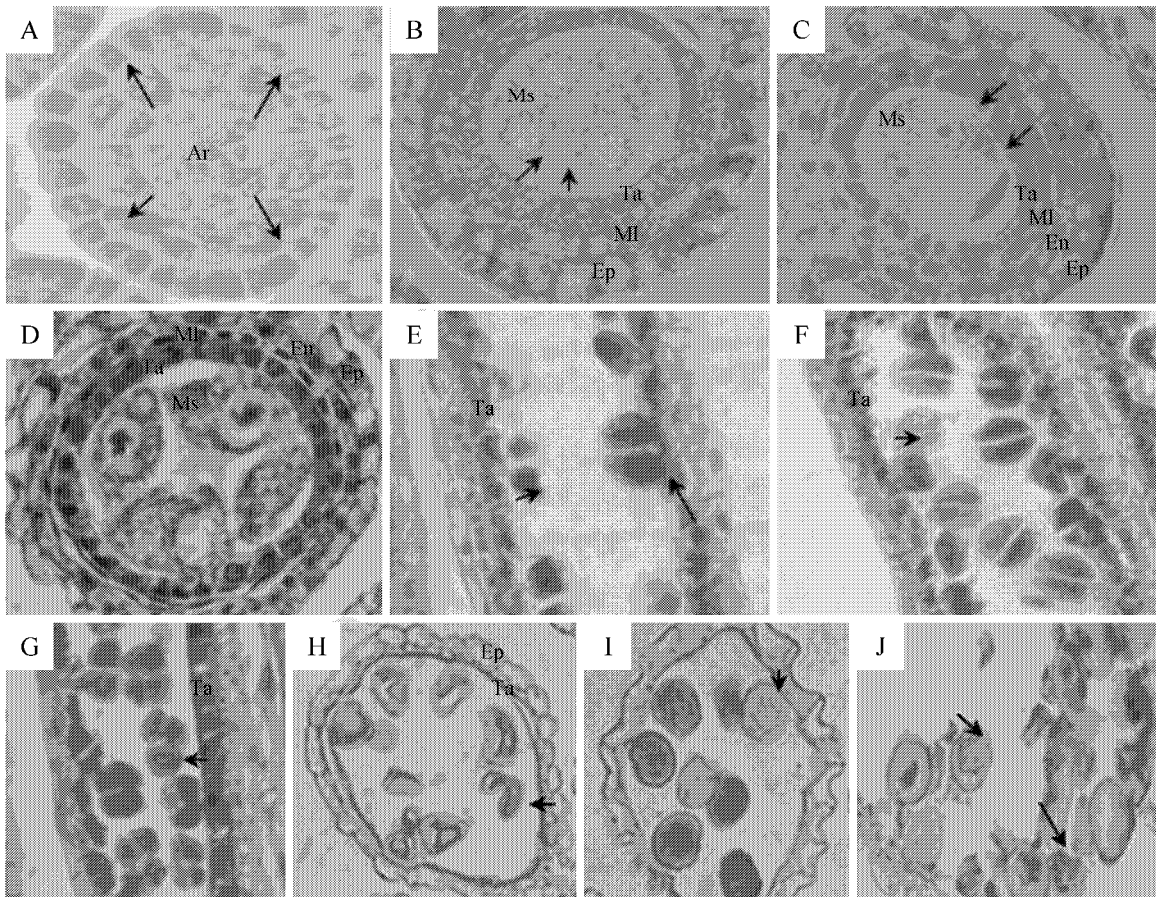


图 1 台北 309 水稻花药发育及小孢子的形成 A. 孢原细胞 B. 3 层壁细胞和绒毡层 C. 小孢子母细胞及 4 层壁细胞 D E. 二分体 F. 四分体细胞 G. 小孢子早期 H. 小孢子晚期 I. 成熟花粉期 Ta. 绒毡层 MI. 中层 En. 药室内壁 Ep. 表皮 Ms. 小孢子母细胞

Fig.1 Anther development and microspore formation of Taipei 309 A. Archesporial cell ;B. Three-layer wall cells and the tapetum cell ;C. Tapetum and middle layer ;D E. Dyad cells ;F. Tetrad cell ;G. Early microspore stage ;H. Late microspore stage ;I. Mature pollen stage Ta. Tapetum ;MI. Middle layer ;En. Endothecium ;Ep. Epidermis ;Ms. Microspore mother cell



**图2 TP-2 水稻材料花药发育及小孢子形成** A. 孢原细胞 B. 初生造孢细胞及3层壁细胞 C. D. 小孢子母细胞及完整的4层壁细胞 E. F. 二分体 G. 四分体细胞 H. 小孢子早期 I. 成熟花粉期 J. 细胞出现消融现象 Ta. 绒毡层 ;MI. 中层 ;En. 药室内壁 ;Ep. 表皮 ;Ms. 小孢子母细胞

**Fig.2 Anther development and microspore formation on TP-2** A. Archesporial cell ;B. Three-layer wall cells surround the primary sporogenous cell ,the tapetum cell just occurs ;C. D. Tapetum ,middle layer ,endothecium and epidermis surround microsporocytes ;E. F. Dyad cells ;G. Tetrad cell ;H. Early microspore stage ;I. Mature pollen stage ;J. Cells appear ablation phenomenon Ta. Tapetum ;MI. Middle layer ;En. Endothecium ;Ep. Epidermis ;Ms. Microspore mother cell

小孢子母细胞减数分裂前,四层药壁发育完全。正常水稻台北 309 材料在减数分裂二分体到四分体时期,中层细胞完全降解,绒毡层仍呈浓缩状态,开始降解(图 1:D,E,图 2:E)。从四分体刚分离小孢子到小孢子发育成熟,绒毡层逐步降解(图 1:F)。随着小孢子的发育,绒毡层的胞质逐步降解,逐渐变薄似带状(图 1:H)进入小孢子晚期,绒毡层仅残留部分胞质,花粉成熟时,仅残存部分表皮细胞,药室内壁加厚,中层和绒毡层降解消失(图 1:I)。而 TP-2 水稻在小孢子形成之初,绒毡层已基本降解完全,只剩下薄薄一层(图 2:G)(图 2:J)。

2.2 小孢子发生及雄配子体形成

花药发育早期,在花药 4 个角隅表皮下的孢原细胞进行平周分裂,形成初生壁细胞和初生造孢细胞。初生造孢细胞进行多次有丝分裂形成次生造

孢细胞,次生造孢细胞进一步发育为小孢子母细胞(图 1:C,图 2:C)。

随着花药的发育,小孢子母细胞进一步发育,体积增大,出现大液泡,细胞质浓厚,核仁明显,进入减数分裂。(图 1:C,图 2:C)(图 2:D)。减数分裂二分体时期,细胞间分化出细胞壁形成二分体(图 1:E,图 2:F),随后二分体分裂形成四分体细胞(图 1:F,图 2:G)。整个减数分裂间期的小孢子母细胞、二分体及四分体均被胼胝质壁包围(图 1:F,图 2:G)。随着胼胝质壁的解体和新细胞壁的形成,四分体彼此分开,产生小孢子。早期小孢子呈现不规则状,小孢子“壁”隐约可见(图 1:G),随后小孢子体积增大,细胞质相对稀少(图 1:H)。形成中央大液泡,小孢子核靠近边缘,形成单核靠边期,单核靠边期小孢子进一步发育,核增大,孢壁

增厚,发育为成熟花粉粒(图 1 I)。而 TP-2 材料小孢子壁不明显,染色较浅,内容物较少(图 2 : H),部分小孢子形成末期,小孢子呈透明状,内无填充物,形状干瘪(图 2 J)。同时小孢子存在破裂降解现象(图 2 J)。

### 2.3 花粉的活力测定

从表 3 可知,从开花的第一天开始利用碘—碘化钾染色和 TTC 染色法进行测定,一共测定 11 天。统计数据计算台北 309 正常材料花粉可育率高,平均活力率为 94.177%;TP-2 材料虽有花粉,但是花粉活力率低,为 57.599%。

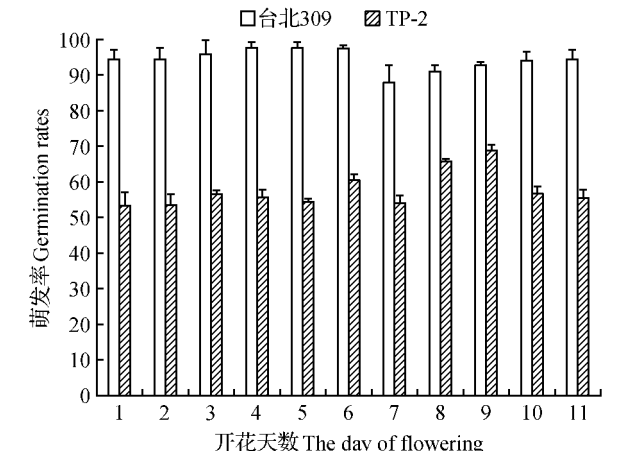


图 3 台北 309 水稻和 TP-2 水稻花粉萌发率比较  
Fig. 3 Comparison of the pollen germination rates of Taipei 309 rice and TP-2

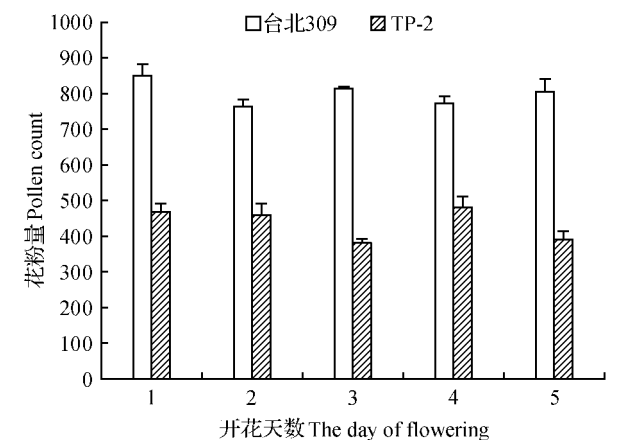


图 4 台北 309 水稻和 TP-2 水稻花粉粒数量比较  
Fig. 4 Comparison of the pollen grain amounts of Taipei 309 rice and TP-2

### 2.4 花粉粒计数

如图 4 所示,从开花的第一天开始进行花粉粒计数,为期 5 天。数据统计计算得 TP-2 水稻 1 个花粉囊的花粉粒平均数为 436 粒;台北 309 水稻的 1 个花粉囊的花粉粒平均数为 798 粒。

## 3 讨论

TP-2 水稻是一个源于水稻品种台北 309 的自然突变的不育突变体。组织切片观察在小孢子形成前期 TP-2 突变体材料出现明显异常,绒毡层已经完全降解,后期形成的小孢子部分内部无填充物,还发现破裂消融现象,花粉活力为 57.599%,远低于对照水稻花粉活力 94.177%,突变体单个花药的花粉粒数量的统计平均值仅为对照组的一半,结果与活力测定结果相符,说明突变体花粉量少且活力率低。

组织切片结果表明 TP-2 突变材料在小孢子形成前期绒毡层降解出现异常,绒毡层过早快速降解,因营养缺乏,导致部分小孢子发育不正常,形成雄性半不育现象。几百年来,不同学者将雄性不育分成各种类型,目前普遍接受从不育性的基因型组成角度上划分,分为细胞核雄性不育(Genic male sterility)和细胞质雄性不育(Cytoplasmic Male Sterility)。细胞核雄性不育引起的原因有:绒毡层及其他壁细胞相关基因、胼质层沉积相关基因、减数分裂相关基因、花药开裂及其他相关基因<sup>[9-11]</sup>。根据划分特征,笔者认为本材料属于由绒毡层不正常降解所引起部分雄性不育。目前在水稻中,绒毡层在花粉发育过程中起到了很重要的作用<sup>[9]</sup>。已发现的 MSP1(multiple sporocytel)突变体表现为影响早期小孢子母细胞的发育,花药壁细胞混乱,不能形成中层和绒毡层,花粉母细胞在减数分裂期停止,最终造成雄性不育<sup>[10]</sup>;水稻中 UDT1 突变体表现为在减数分裂中二分体转为四分体时期,绒毡层变大且空泡化,小孢子不正常降解,不能产生正常的小孢子导致不育<sup>[11]</sup>;王莹已证明 MSP1 是 UDT1 的上游基因,并且两者之间有紧密的联系<sup>[12]</sup>。而本材料 TP-2 突变体的表现性状与已发现的突变体基因表型有区别,可能是由另外的基因引起的,因此我们将对引起 TP-2 材料突变的基因进行进一步的定位和机理研究,这将为我们的了解水稻雄性不育的机制奠定了良好的基础。

## 参 考 文 献

1. 卢庆善,孙毅,华泽男,等. 农作物杂种优势[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2002: 240-269.
2. 丁效华. 籼粳杂种不育的遗传模式及亲和基因的研究进展[J]. 江西农业学报, 2000, 12(2): 45-52.