

长穗颈温敏核不育水稻穗颈 节间长度及细胞学观察

肖辉海

(湖南文理学院生命科学系, 湖南 常德 415000)

摘要:以水稻培矮 64S 作对照, 对隐性长穗颈温敏核不育水稻(*Oryza sativa* L.) 长选 3S 幼穗各发育时期穗颈节间长度及细胞数量和长度进行比较分析。结果表明, 长选 3S 在幼穗分化的二核期至始花期穗颈节间伸长速度最快, 其节间伸长的长度是培矮 64S 的 2.1 倍; 在花粉母细胞减数分裂期至二核期及始花当天至始花后第 3 天两个时段, 穗颈节间伸长速度慢。穗颈节间的细胞个数和平均长度两者呈现相似的变化规律, 但从花粉母细胞减数分裂期至始花期, 长选 3S 穗颈节间薄壁细胞增加 3 759 个, 细胞平均长度为 72.9 μm , 培矮 64S 增加 3 134 个, 细胞平均长度为 38 μm , 长选 3S 穗颈节间的伸长主要是由幼穗分化的花粉母细胞减数分裂期至始花期细胞分裂和细胞伸长共同作用的结果, 其中后者的作用更显著。

关键词:温敏核不育水稻; 隐性长穗颈基因; 穗颈节间

中图分类号: Q944.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0224-05

Variations in Length and Cell Numbers of the Uppermost Internode of TGMS Rice with *eui* Gene

XIAO Hui-hai

(Department of Biology, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China)

Abstract: Changxuan 3S is a thermo-sensitive genetic male-sterile (TGMS) rice (*Oryza sativa* L.) with *eui* gene transferred from cultivar Pei'ai 64S. Variations in length and cell number of the uppermost internode were compared between the two cultivars during various stages of panicle initiation. The uppermost internode of Changxuan 3S elongated fastest during binucleate to anthesis stages, consequently it reached 2.1 times as long as that of Pei'ai 64S. Then it elongated slowly during pollen mother cell meiosis to binucleate stages and during 1 to 3 days after anthesis. During pollen mother cell meiosis to anthesis stages, parenchyma cells of the uppermost internodes of Changxua 3S and Pei'ai 64S increased by 3 759 and 3 134 in numbers, respectively, and with average cell lengths of 72.9 and 38 μm , respectively. The uppermost internode of Changxua 3S elongated due to cell division, especially cell elongation during pollen mother cell meiosis to anthesis stages.

Key words: Thermo-sensitive genetic male-sterile (TGMS) rice; *Elongated uppermost internode* gene (*eui* gene); Uppermost internode

杂交稻推广面积的扩大, 除了靠选育优质、高产、多抗新组合外, 很大程度上还有赖于杂交稻种

子生产成本的降低。目前生产上推广应用的杂交稻不育系普遍存在着较为严重的包颈现象, 生产上为

收稿日期: 2006-08-21

接受日期: 2006-11-27

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(06JJ5042); 湖南省教育厅项目(04C417)资助

了提高杂交制种产量,不得不在抽穗时喷施赤霉素促进不育系抽穗。但赤霉素的施用将增加成本,加剧环境与稻米的污染及降低种子质量。Okuno 等^[1]首次报道了从诱变的“农林8号”中获得下部节间伸长型的隐性高秆突变体 LM1。Rutger 等^[2]报道了1个最上节间伸长型的高秆隐性突变体种质 76:4512,其主要特征是最上节节间伸长,属隐性单基因遗传,并把控制此性状的隐性高秆基因命名为 *eui* (elongated-uppermost-internode),同时提出把 *eui* 基因导入恢复系,作为杂交稻种子生产的第四遗传成分(相对于不育系、保持系、恢复系而言),以实现提高杂交稻制种产量、降低成本的设想。以后,由1对隐性高秆基因控制的突变体 *Grlc*^[3]、*Mh-1*^[4]、02428h^[5]、珍长 A^[6]、协青早 eB-1 和协青早 eB-2^[7]不断被报道。1999 年,湖南师范大学与福建农业大学合作,对从两用温敏核不育系培矮 64S 中选出的育性更稳定的 1 个株系双低 S 进行 γ 辐射诱变,在 M_2 代群体中选育出隐性长穗颈温敏核不育水稻双低培 eS,后命名为长选 3S^[8-9]。已有研究表明,长选 3S 的长穗颈性状为 1 对隐性基因(即 *eui* 基因)控制,它的 *eui* 基因与 *eui1* 等位,不育临界温度低(22℃左右)^[10],温度对 *eui* 基因作用的敏感期与温度对育性作用的敏感期同期^[11]。有关隐性长穗颈温敏核不育水稻幼穗不同发育时期穗颈节间伸长的动态变化及细胞学机制尚未见报道。本文以普通温敏核不育水稻培矮 64S 作对照,对隐性长穗颈温敏核不育水稻长选 3S 幼穗不同发育时期的穗颈节间的长度进行比较分析,并对其进行细胞学观察,为充分利用具有 *eui* 基因的隐性长穗颈不育系资源提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料

隐性长穗颈温敏核不育水稻(*Oryza sativa* L.)为湖南师范大学选育的长选 3S。对照材料为温敏核不育水稻培矮 64S,由国家杂交水稻工程中心供种。

不同发育时期穗颈节间长度观察 将长选 3S 和培矮 64S 于 2005 年 5 月 17 日播种,6 月 10 日移栽于盆栽桶中,每桶栽 15 株左右,常规肥水管理,按丁颖^[12]和杨文钰等^[13]的划分方法确定幼穗分化时期。当长选 3S 和培矮 64S 进入育性敏感期(即花粉母细胞形成期至减数分裂期)后分别在 25℃温度

人工气候条件下处理 6 d,每天光照 15 h,光照强度 $1\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,处理前后的材料置于自然长日高温下。在幼穗分化的花粉母细胞减数分裂期、二核期、三核期,始花当天、始花后第 3 天(穗颈节间停止伸长)等 5 个发育时期,用 2%碘-碘化钾溶液染色,在显微镜下检查花粉育性,分别取长选 3S 和培矮 64S 花粉败育率达 99%的单株各 30 个测量穗颈节间长及花后第 3 天材料的茎秆高度、剑叶鞘长、倒一至倒四节间长及穗颈伸出长度,然后进行统计分析。

1.2 不同发育时期穗颈节间细胞切片制备与观察

在幼穗分化的花粉母细胞减数分裂期、二核期、三核期,始花当天、始花后第 3 天(穗颈节间停止伸长)等 5 个发育时期,分别取长选 3S 和培矮 64S 的穗颈节间制片,制片时每段长 1.5 cm(不足 1.5 cm 时作为一小段),然后用 FAA 固定液固定,经酒精脱水、二甲苯透明及石蜡包埋后进行连续纵向切片,切片经 1.0%的番红和苯胺蓝染色。在显微镜下观察时,均取各发育时期穗颈节间切片中靠髓腔一侧的第 1 列薄壁细胞(内层薄壁细胞)和紧靠厚壁纤维细胞层的最外一层薄壁细胞(外层薄壁细胞)进行计数,并用显微测微计测量细胞的长度,统计两列细胞的个数(取其平均值)和平均长度。然后用 OLYMPUS BH-2 型显微摄影机对穗颈节间中部进行拍照。

2 结果和分析

2.1 穗颈节间长度的比较

长选 3S 与培矮 64S 在幼穗分化的花粉母细胞减数分裂期穗颈节间的长度无明显差异,到了二核期,长选 3S 的穗颈节间开始快速伸长,比同时期培矮 64S 的长 0.50 cm,可以用肉眼辨别出两者的差异。从二核期开始,长选 3S 穗颈节间的伸长速度快于培矮 64S,而由二核期至始花当天,长选 3S 穗颈节间的伸长速度显著快于培矮 64S,此时长选 3S 穗颈节间伸长 18.7 cm,伸长的长度占定长(即始花后第 3 天的穗颈节间长度)后穗颈节间总长度的 53.1%。而对照的培矮 64S 穗颈节间仅伸长 8.1 cm,伸长的长度占定长后穗颈节间总长度的 44.3%,从幼穗分化的二核期至始花期,长选 3S 穗颈节间伸长的长度是培矮 64S 的 2.1 倍(表 1),由此可知,长

选 3S 穗颈节间伸长从二核期开始快于培矮 64S, 此后伸长速度不断加快, 由三核期至始花当天穗颈的伸长速度达到最大。

表 1 幼穗不同发育时期穗颈节间长度的比较

Table 1 Length of the uppermost internode during rice panicle development stage

幼穗发育时期 Panicle development stage	穗颈节间长 Length of the uppermost internode (cm)	
	培矮64S Pei'ai 64S	长选3S Changxuan 3S
减数分裂期 Meiotic stage	0.2±0.07	0.3±0.05
二核期 Binucleate stage	1.8±0.12	2.3±0.11
三核期 Trinucleate stage	7.5±0.45	12.5±0.81 *
开花 Anthesis	15.6±1.53	31.2±2.14 **
始花后第3天 The third day after anthesis	18.3±1.98	35.2±2.25 **

* 和 ** 分别为 *t* 测验达 0.05 和 0.01 显著水平。下同。* and ** represent significant differences at 0.05 and 0.01 levels by *t* test, respectively. The same as below.

2.2 秆高及各节间长度的比较

从表 2 可知, 穗颈节间停止伸长后, 长选 3S 的茎秆高度比培矮 64S 的高 26.4 cm, 倒一节间(即穗颈节间)比培矮 64S 长 16.9 cm, 倒一节间增长的长度占长选 3S 茎秆高度增加的 64.02%。倒二节间、倒三节间也有一定伸长, 倒四节间长度与对照基本一致。穗颈伸出度由倒一节间长度和剑叶鞘长度决定, 长选 3S 的剑叶鞘比培矮 64S 长 2.3 cm, 表明隐性长穗颈基因对叶鞘伸长有一定的促进作用, 但这种促进作用远小于对穗颈节间伸长的促进作用,

使隐性长穗颈不育系的稻穗都伸展在叶鞘以上, 而培矮 64S 的剑叶鞘比穗颈节间长 12.3 cm, 故相当一部分颖花被包在叶鞘中。

表 2 穗颈节间停止伸长后秆高及各节间长度的比较

Table 2 Culm and internode lengths after the uppermost internode ceased elongating

性状 Trait	培矮64S Pei'ai 64S	长选3S Changxuan 3S
茎秆高度 Culm length (cm)	52.3±1.30	78.7±4.44 **
剑叶鞘长 Leaf sheath (cm)	30.6±1.75	32.9±3.71
穗颈伸出长度 Panicle extention (cm)	-12.3±0.93	2.3±0.72 **
倒一节间长 The uppermost internode (cm)	18.3±1.98	35.2±2.25 **
倒二节间长 The 2nd internode from the top (cm)	14.7±1.11	20.4±1.62 *
倒三节间长 The 3rd internode from the top (cm)	9.2±0.58	11.1±1.45
倒四节间长 The 4th internode from the top (cm)	5.9±0.59	6.0±0.83

2.3 穗颈节间细胞数目和长度的比较

长选 3S 穗颈节间薄壁细胞个数和细胞平均长度在花粉母细胞减数分裂期时与培矮 64S 差异不明显。随着幼穗的发育, 细胞长度和细胞个数的差异越来越大, 到定长时(即始花后第 3 天)差异达到最大, 定长时长选 3S 穗颈节间薄壁细胞比培矮 64S 的平均长 31.9 μm, 细胞个数较培矮 64S 的多 664 个, 这主要是因为幼穗分化的花粉母细胞减数分

表 3 幼穗不同发育时期穗颈节间细胞数目和长度的比较

Table 3 Parenchyma cell numbers and lengths at different panicle development stages

幼穗发育时期 Rice panicle development stage	材料 Cultivar	穗颈节间长 Length of the uppermost internode (cm)	薄壁细胞数 Parenchyma cells	薄壁细胞平均长度 Average length of parenchyma cells (μm)
减数分裂期 Meiosis stage	培矮64S Pei'ai 64S	0.22	208	10.4±0.55
	长选3S Changxuan 3S	0.25	229	10.7±0.61
二核期 Binucleate stage	培矮64S Pei'ai 64S	1.85	1045	17.5±0.71
	长选3S Changxuan 3S	2.41	1283	18.7±0.69
三核期 Trinucleate stage	培矮64S Pei'ai 64S	7.85	2081	37.6±1.41
	长选3S Changxuan 3S	13.34	2687	49.5±1.52*
开花 Anthesis	培矮64S Pei'ai 64S	16.21	3342	48.4±1.21
	长选3S Changxuan 3S	33.41	3988	83.6±1.35**
始花后第3天 The third day after anthesis	培矮64S Pei'ai 64S	18.85	3525	53.4±1.61
	长选3S Changxuan 3S	35.78	4189	85.3±1.73**

裂期至始花期,长选3S穗颈节间薄壁细胞个数的增加及细胞平均长度的增长明显优于培矮64S,在此时段长选3S穗颈节间增加的薄壁细胞个数比培矮64S的多625个,薄壁细胞平均增长的长度比培矮64S的长34.9 μm (表3),其中以穗颈节间中部细胞伸长最显著(图1)。而到始花之后穗颈节间细胞个数增加的速度及细胞长度增长的趋势减慢,直至停止生长。综上所述,长选3S穗颈节间的伸长主要是由幼穗分化的花粉母细胞减数分裂期至始花期的细胞分裂和细胞伸长共同作用的结果,其中后者作用更显著。

3 讨论

eui 基因的表达体现在最上节间的伸长,它在杂交稻育种上的应用不仅可以解除不育系包穗的遗传缺陷,而且还可以选育利于授粉的高秆恢复系,从而使种子生产过程中可不用或少用赤霉素,提高种子产量和质量,降低种子生产成本,减少赤霉素对环境的污染^[14-16]。

长穗颈高秆隐性 *eui* 基因及其相应种质的发现,丰富了高秆隐性种质遗传资源。长选3S是1个通过辐射诱变获得的不育性稳定,配合力高的高秆隐性长穗颈温敏核不育新材料,已有研究表明,它的 *eui* 基因表达与温度有关,在日平均温度低于26℃时,*eui* 基因表达,在28℃高温下被抑制,温度对 *eui* 基因作用的敏感期与温度对育性作用的敏感期同期(即花粉母细胞形成期至减数分裂期)^[10-11]。本研究发现,虽然温度对 *eui* 基因与对温敏不育基因作用的敏感期相同,但穗颈节间(即倒一节间)伸长最快的时期却在幼穗分化的二核期至始花期,这一时段隐性长穗颈不育系长选3S穗颈节间伸长的长度是培矮64S的2.1倍,据此可推测控制长选3S穗颈节间伸长的1对隐性长穗颈基因(*eui* 基因)的表达或感受刺激启动的敏感时期应在幼穗发育的中后期阶段。通过对长选3S与培矮64S幼穗不同发育时期穗颈节间细胞数量和长度进行比较分析,发现长选3S穗颈节间的伸长可分为从幼穗分化的二核期至始花期的细胞快速分裂伸长期和从始花期

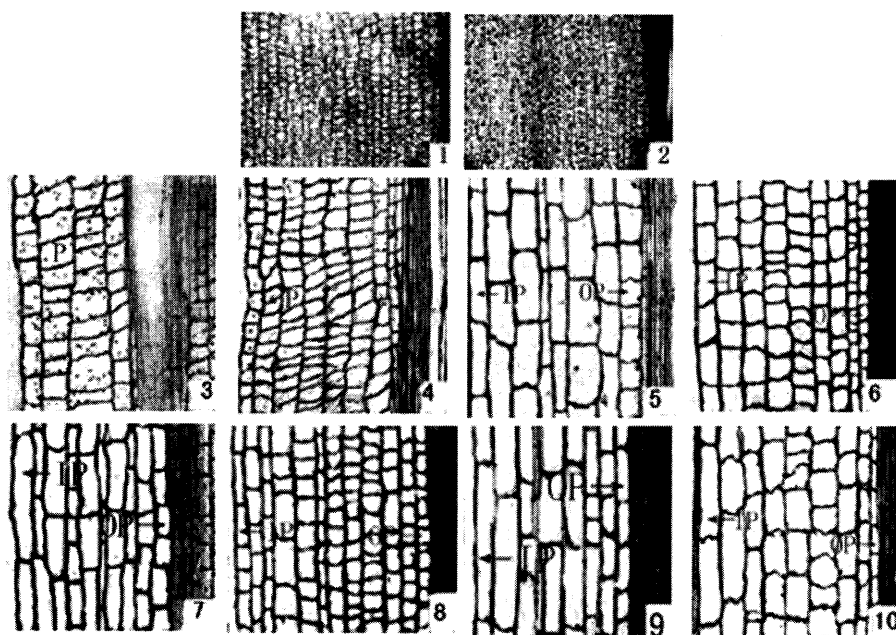


图1 幼穗不同发育时期穗颈节间中部细胞的比较($\times 120$)

Fig. 1 Parenchyma cells in the middle of the uppermost internodes of Changxuan 3S and Pei'ai 64S at rice panicle development stage ($\times 120$)

P: 薄壁细胞 Parenchyma cells; IP: 内层薄壁细胞 Innermost parenchyma cells; OP: 外层薄壁细胞 Outermost parenchyma cells; 1, 3, 5, 7, 9 分别为长选3S花粉母细胞减数分裂期、二核期、三核期、始花当天和始花后第3天的穗颈节间中部细胞; 2, 4, 6, 8, 10 分别为培矮64S花粉母细胞减数分裂期、二核期、三核期、始花当天和始花后第3天的穗颈节间中部细胞。1, 3, 5, 7和9 show parenchyma cells in the middle section of the uppermost internode of Changxuan 3S at pollen mother cell meiosis stage, binucleate stage, trinucleate stage, anthesis and the 3rd day after anthesis, respectively. 2, 4, 6, 8 and 10 show parenchyma cells in the middle section of the uppermost internode of Pei'ai 64S at pollen mother cell meiosis stage, binucleate stage, trinucleate stage, anthesis and the 3rd day after anthesis, respectively.

至定长的细胞缓慢分裂伸长期。在细胞快速分裂伸长期内,长选 3S 穗颈节间细胞分裂和细胞伸长(尤其是节间中部细胞的伸长)明显优于培矮 64S;在细胞缓慢分裂伸长期内,两者穗颈节间增加的细胞个数基本一致,而培矮 64S 的细胞平均增长的长度则稍大于长选 3S 的,但定长后长选 3S 穗颈节间仍比培矮 64S 的长,且长于其自身的剑叶鞘长,不包颈;而对照的培矮 64S 则有相当一部分稻穗被包在剑叶鞘中。这说明 *eui* 基因在穗颈节间中的作用具有位置和时间差异,穗颈节间中部是该基因作用的主要部位,幼穗分化的二核期至始花期是其促进穗颈节间细胞分裂和细胞伸长的主要作用时期。但这只是从微观的角度去解释了部分宏观现象,而其在超微结构以及生理生化方面的机制还没有弄清楚。因此在下一步有关穗颈节间伸长的细胞学机制的研究可以通过特异的荧光染色定位法^[17],弄清细胞壁上纤维素微纤丝的取向及其特异蛋白(如伸展素和膨胀素等)的分布,为进一步揭示其细胞学伸长原理提供可靠的证据。同时还可以通过对细胞内促进细胞生理代谢的物质进行定量比较,从生理生化方面揭示其机理。

参考文献

- [1] Okuno K, Kawai T. Variations of internode length and other characters in induced long-culm mutants of rice [J]. Jpn J Breeding, 1978, (28): 242–250.
- [2] Rutger J N, Carnahan H L. A fourth element to facilitate hybrid cereal production — a recessive tall in rice [J]. Crop Sci, 1981, (21): 373–376.
- [3] Liao C L(廖昌礼), Ni K Y(倪克鱼), Liu Y K(刘远坤), et al. Study on heredity and utilization of *Grlc* recessive tall type in rice: I. Characters of plant and culm type of *Grlc* and its testcross F_1 [J]. SW China J Agri Sci (西南农业学报), 1988, 1(1): 41–46. (in Chinese)
- [4] Wu S B(吴世弼), Zhang Q H(张琦华). Study on induced mutation leading to obtaining a recessive tall-culm gene in Rice [J]. J Fujian Acad Agri Sci (福建省农科院学报), 1988, 3(1): 41–45. (in Chinese)
- [5] Sun L H(孙立华), Wang Y F(王月芳), Jiang N(蒋宁), et al. A recessive tall culm somatic mutant with wide compatibility in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 1994, 21(1): 67–73. (in Chinese)
- [6] He Z H(何祖华), Shen Z T(申宗坦). Inheritance of panicle exertion and improvement of male sterile line in rice [J]. Chin J Rice Sci (中国水稻科学), 1991, 5(1): 1–6. (in Chinese)
- [7] Huang R H(黄荣华), Zhang Q Q(章清杞), Zhang S B(张书标), et al. A preliminary study on the development of *eui*-CMS line in rice by radiation-induced mutation [J]. J Fujian Agri Univ (福建农业大学学报), 2001, 30(2): 133–137. (in Chinese)
- [8] Xu M L(徐孟亮), Chen L B(陈良碧), Zhou G Q(周广洽). Selecting a new P(T)GMS line with low critical temperature from Pei'ai 64S [J]. Life Sci Res (生命科学研究), 1999, 3(2): 168–174. (in Chinese)
- [9] Zhou G Q(周广洽), Chen L B(陈良碧), Liang M Z(梁满中), et al. Development of TGMS rice with *eui*-gene coincide with double low critical temperature [J]. Life Sci Res (生命科学研究), 2000, 4(4): 290–294. (in Chinese)
- [10] Liang M Z(梁满中), Zhong W H(钟卫华), Xu M L(徐孟亮), et al. Genetic analysis of TGMS rice with *eui* gene Shuangdi Pei Es [J]. Acta Agron Sin (作物学报), 2004, 30(8): 811–815. (in Chinese)
- [11] Xiao H H(肖辉海), Zhong W H(钟卫华), Liang M Z(梁满中), et al. Effect of temperature on the *eui* gene expression of TGMS rice [J]. Sci Agri Sin (中国农业科学), 2005, 38(2): 222–227. (in Chinese)
- [12] Ding Y(丁颖). Rice Cultivation of China [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1961: 81–83. (in Chinese)
- [13] Yang W Y(杨文钰), Tu N M(屠乃美). Individual Introduction to Crop Production [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 14–17. (in Chinese)
- [14] Virmani S S, Dalmacio R D, Lopez M T. *eui* gene for elongated uppermost internode transferred to *indica* rice [J]. Inter Rice Res Newsl, 1988, 13(6): 6.
- [15] Shen Z T(申宗坦), Yang C D(杨长登), He Z H(何祖华). Studies on eliminating panicle enclosure in WA-type MS line of rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*) [J]. Chin J Rice Sci (中国水稻科学), 1987, 1: 95–99. (in Chinese)
- [16] Liang K J(梁康迳), Wang N Y(王乃元), Yang R C(杨仁崔). Inheritance and breeding utilization of panicle exertion of rice [J]. J Fujian Agri Coll (福建农学院学报), 1992, 21: 380–385. (in Chinese)
- [17] Yue L L(岳莉莉), Qi Y P(齐义鹏). Green fluorescent protein as a new tag in molecular and cell biology [J]. Progr Biotechn (生物工程进展), 1997, 17(4): 40–45. (in Chinese)