

# 花药培养过程栽培稻花粉不育杂种 $F_1$ 与亲本台中 65 的细胞学研究

姚焱, 卢永根\*, 刘向东, 张志胜, 冯九焕, 张桂权

(华南农业大学广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642)

**摘要:**利用活体压片、半薄及超薄切片技术,对栽培稻(*Oryza sativa* L.)花粉不育杂种  $F_1$  及育性正常的亲本台中 65 离体培养前后的小孢子及花药壁进行细胞学研究。结果表明:与台中 65 相比,杂种  $F_1$  的花粉小孢子在发育至单核中-晚期,出现比例较高的胞质凝聚小孢子和少量星型小孢子,正常小孢子和淀粉化小孢子比例降低。在离体条件下,胞质凝聚小孢子、星型小孢子、正常小孢子、液泡化小孢子、淀粉化小孢子的发育主要沿着胞质凝聚败育过程、孢子体发育过程、配子体发育过程、液泡化过程和淀粉化过程进行;药壁组织在离体条件下,杂种  $F_1$  比台中 65 的绒毡层降解速度快,中层膨大程度高。杂种  $F_1$  与台中 65 在离体培养下小孢子发育及药壁细胞学的差异主要是受到 *S-a* 座位内等位基因互作及离体培养环境的影响。

**关键词:**水稻(*Oryza sativa* L.);  $F_1$  花粉不育基因座位 *S-a*; 花药培养; 异常花粉; 花药壁组织; 细胞学

中图分类号:Q942.4

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2008)02-0148-05

## Cytological Studies on Pollen Sterile Hybrid $F_1$ and Its Parent Taichung 65 (*Oryza sativa* L.) during the Anther Culture

YAO Yan, LU Yong-gen\*, LIU Xiang-dong, ZHANG Zhi-sheng,  
FENG Jiu-huan, ZHANG Gui-quan

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Using techniques of intact microspore, semi-thin section and ultra-thin section, the cytological differences in microspores and anther cell walls between pollen sterile hybrid  $F_1$  and its fertile parent Taichung 65 (*Oryza sativa* L.) were studied. When hybrid  $F_1$  microspores developed to the uninucleate middle and late stage, cytoplasm-condensed microspores had much more than those in Taichung 65, and star-like microspores appeared, but normal microspores and starch accumulated microspores decreased. when anthers of hybrid  $F_1$  were cultured *in vitro*, the development of cytoplasm-condensed microspores, star-like microspores, normal microspores, vacuole microspores and starch accumulated microspores would follow the microspore cytoplasm condensed process, sporophytic developmental process, gametophytic developmental process, vacuole process and starch accumulated process, respectively. Compared to Taichung 65, the degradation of tapetum layer in anther cell wall of hybrid  $F_1$  grew quickly and middle layer cell expanded larger under cultured *in vitro*. These differences in microspore and anther wall between hybrid  $F_1$  and Taichung 65 were probably caused by the interaction of alleles in pollen sterility locus *S-a* and culture environment *in vitro*.

**Key words:** Rice (*Oryza sativa* L.); Pollen sterility locus *S-a*; Anther culture; Abnormal pollen; Anther wall tissue; Cytology

收稿日期:2007-06-25

接受日期:2007-10-08

基金项目:国家自然科学基金项目(39970048); 广东省自然科学基金项目(990707); 霍英东教育基金项目(71021)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

栽培稻(*Oryza sativa* L.)粳亚种杂种不育性主要表现为花粉不育,花粉育性受到基因控制<sup>[1-3]</sup>。目前利用台中 65 与其 F<sub>1</sub> 花粉不育近等基因系,开展有关花粉发育及相关问题的细胞及分子水平研究,建立了花粉育性基因与花粉发育细胞学间的联系<sup>[4]</sup>。

*S-a* 是控制 F<sub>1</sub> 花粉不育的基因座位之一<sup>[5]</sup>。在活体(*in vivo*)条件下,该座位杂合 *S'S'* 时会导致 F<sub>1</sub> 中携带 *S'* 基因的花粉败育<sup>[3]</sup>;但在离体(*in vitro*)条件下 *S'* 基因花粉脱分化能力明显增强,造成 F<sub>1</sub> 花粉愈伤组织群体产生偏向 *S'* 基因的偏分离<sup>[6]</sup>。通过对活体条件下花粉败育的细胞学观察,张志胜报道了携带 *S'* 基因花粉在单核中期出现液泡化异常,细胞核不能正常移位,导致花粉发育的终止<sup>[4]</sup>;但对离体条件下相关的细胞学原因未见报道。因此,本文对离体培养下栽培稻花粉不育基因 *S-a* 座位内基因互作杂种 F<sub>1</sub> 和它的育性正常亲本台中 65 的花粉及花药壁进行细胞学观察,探讨在离体培养条件下的花粉发育规律,为进一步研究离体状态下花粉发育模式的多样性及其原因提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

水稻粳型品种台中 65(以下简称 T65,在 F<sub>1</sub> 花粉不育基因座位 *S-a* 携带纯合等位基因 *S'S'*,育性正常),T65 与其花粉不育近等基因系杂交的 F<sub>1</sub>(以下简称 E<sub>14</sub>,*S-a* 携带杂合的 *S'S'*,花粉败育率 50%,主要为携带 *S'* 花粉败育<sup>[4]</sup>),于 2001 年早季种植在华南农业大学教学实验场,常规管理。

### 1.2 花药培养

依据穗的外部特征和镜检核对,在晴天露水干后采 T65、E<sub>14</sub> 单核小孢子晚期稻穗接种。培养基为 N<sub>6</sub> + 2,4-D 2 mg L<sup>-1</sup> + NAA 3 mg L<sup>-1</sup> + KT 1 mg L<sup>-1</sup> + 麦芽糖 5% + 水解乳蛋白 500 mg L<sup>-1</sup>,26 ~ 28℃ 下暗培养,诱导花粉愈伤组织。

### 1.3 活体观察

定期对 T65 和 E<sub>14</sub> 每个材料随机取 30 枚花药放入滴有 3% 蔗糖溶液的载玻片上压片。随机统计 5 个视野,每个视野 200 个左右小孢子。观察及拍照均在明场及微分干涉(DIC)显微镜下进行。

### 1.4 显微和超微结构观察

定期每个材料随机取 45 枚培养的花药,固定、

脱水、渗透、包埋、切片染色均参照冯九焕<sup>[7]</sup>的方法。Leica DMRXA 荧光显微镜下观察并拍照。对选定的合适材料制备超薄切片(每类样本选 3 ~ 5 枚花药),醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,TEM-1010 型透射电子显微镜下观察并拍照。

### 1.5 药壁组织形态评价

定期取 T65 和 E<sub>14</sub> 各 35 枚花药的显微切片进行绒毡层和 中 层 形 态 分 值 统 计:

绒毡层分值 = 绒毡层总得分/35 (总花药数);

绒毡层评分依据:单核晚期正常形态 2;残迹可见 1;消失 0;

中层分值 = 中层总得分/35 (总花药数);

中层评分依据:中层膨大明显 2;单核晚期正常形态 1;消失 0;

## 2 结果

### 2.1 离体培养条件下小孢子发育特征

培养前对 T65 花粉进行活体观察,大部分是具有单核晚期正常形态的小孢子(图版 I : 1),但也存在少量液泡化、淀粉化和胞质凝聚小孢子类型;经离体培养后,星型小孢子有一定比例出现(表 1)。在离体条件下正常形态的小孢子、星型小孢子、液泡化小孢子、淀粉化小孢子的发育主要沿着配子体发育过程、孢子体发育过程、液泡化过程和淀粉化过程进行<sup>[8]</sup>。

培养前对 E<sub>14</sub> 花粉进行活体观察,在小孢子发育至单核中-晚期,E<sub>14</sub> 小孢子类型和比例与 T65 存在差异:E<sub>14</sub> 中正常小孢子数量减少;胞质凝聚类型小孢子(图版 I : 2、3 短箭示,4)比例明显增加,其数量为 T65 的 6.06 倍;星型小孢子(图版 I : 2 长箭示,5,6,7)在活体下已有少量出现;液泡化小孢子数量相近;淀粉化小孢子明显减少;出现少量败育小孢子类型。经离体培养后,与 T65 相比,E<sub>14</sub> 正常小孢子数量有明显下降,胞质凝聚小孢子和败育小孢子数量增加明显,星型小孢子数量略高于 T65,而淀粉化小孢子数量较 T65 为低。E<sub>14</sub> 中的各类小孢子除了沿着 T65 离体小孢子发育途径进行之外,大量的胞质凝聚类型小孢子会随着胞质降解逐渐败育,因此增加了胞质凝聚小孢子的发育途径。E<sub>14</sub> 离体下小孢子发育类型及途径示意图见图 1。

表 1 离体培养下 E<sub>14</sub> 与 T65 花粉小孢子的类型

Table 1 Microspore developmental types in E<sub>14</sub> and T65 *in vitro*

培养天数 Days of culture	正常小孢子 Normal microspore (%)		胞质凝聚小孢子 Cytoplasm-condensed microspore (%)		星型小孢子 Star-like microspore (%)		液泡化小孢子 Vacuole microspore (%)		淀粉化小孢子 Starch microspore (%)		败育 Abortive microspore (%)	
	T65	E <sub>14</sub>	T65	E <sub>14</sub>	T65	E <sub>14</sub>	T65	E <sub>14</sub>	T65	E <sub>14</sub>	T65	E <sub>14</sub>
	0	78.2	56.4	4.8	29.1	0	1.3	10.0	9.9	7.0	0.2	0
4	32.9	19.2	13.5	31.8	1.2	2.8	8.7	6.9	39.5	10.1	4.2	29.2
8	34.9	10.8	23.3	40.5	2.0	2.1	5.6	2.4	30.4	9.5	3.8	34.7

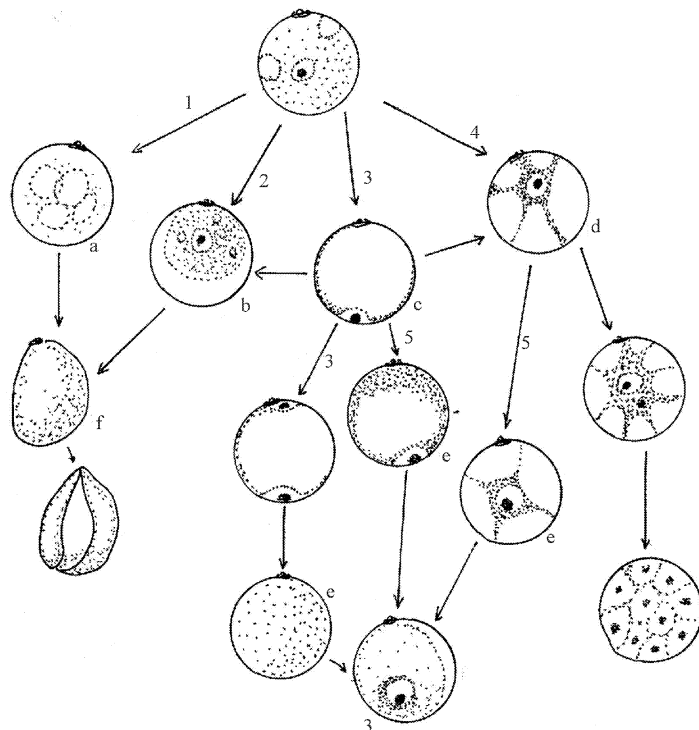


图 1 离体 E<sub>14</sub> 小孢子的主要类型及其发育途径示意图

Fig. 1 Diagrammatic sketch of microspores developmental types and paths of E<sub>14</sub> *in vitro*

1. 小孢子液泡化: a. 液泡化小孢子; f. 败育小孢子; The microspore vacuole process: a. vacuole microspore; f. abortive microspore;
2. 小孢子胞质凝聚: b. 胞质凝聚小孢子; The microspore cytoplasm condensed process: b. cytoplasm-condensed microspore;
3. 小孢子配子体发育过程: c. 正常小孢子; The microspore gametophytic developmental process: c. normal microspore;
4. 小孢子孢子体发育过程: d. 星型小孢子; The microspore sporophytic developmental process: d. star-like microspore;
5. 小孢子淀粉化过程: e. 淀粉化小孢子. The microspore starch accumulated process: e. starch accumulated microspore.

2.2 离体培养条件下绒毡层与中层的变化

培养前对 T65 与 E<sub>14</sub> 的花药壁组织进行比较, 药壁发育过程没有明显不同; 但在离体培养下, T65 与 E<sub>14</sub> 的绒毡层及中层变化上存在差异。为表现两材料间的花药壁差异, 对显微切片中的绒毡层及中层进行评分(表 2)。

在离体培养下, E<sub>14</sub> 药壁绒毡层呈现快速降解的趋势: 培养 1 d 后, E<sub>14</sub> 绒毡层分值为 0.86, 降解了 1.14; T65 绒毡层分值为 1.40, 降解了 0.60。培养第

3 天, T65 和 E<sub>14</sub> 的绒毡层均消失; 由于绒毡层降解主要发生在培养的前期, 表明培养前期 E<sub>14</sub> 绒毡层降解速度明显快于 T65。

与绒毡层快速降解不同, 中层则表现出随培养时间的延长, 逐渐膨大然后缓慢降解的特点。T65 在中层膨大速度、程度上明显小于 E<sub>14</sub>; 培养 1 d 和 3 d, E<sub>14</sub> 中层分值为 0.06 和 0.34, T65 为 0 和 0.09; 培养 4 d 后, E<sub>14</sub> 中层膨大程度最大, 为 1.52, T65 仅为 0.41; 培养 8~12 d 内, T65 和 E<sub>14</sub> 的中层逐渐缩小(图版 I : 8), 差异消失。

表2 离体培养条件下 E<sub>14</sub> 与 T65 绒毡层与中层的变化Table 2 Changes in anther tapetum and middle-layer between E<sub>14</sub>and T65 *in vitro*

培养天数 Days of culture	绒毡层分值 Tapetum score		中层分值 Middle-layer score	
	T65	E <sub>14</sub>	T65	E <sub>14</sub>
	0	2.00	2.00	0.00
1	1.40	0.86	0	0.06
3	0.00	0.00	0.09	0.34
4	0.00	0.00	0.41	1.52
8	0.00	0.00	0.54	0.52
12	0.00	0.00	0.28	0.23

### 3 讨论

在活体条件下,当花粉发育至单核中-晚期, E<sub>14</sub> 与 T65 小孢子发育过程均存在正常形态小孢子、液泡化小孢子、淀粉化小孢子和胞质凝聚小孢子类型,但与 T65 相比, E<sub>14</sub> 中胞质凝聚小孢子数量明显增加,正常小孢子数量降低,淀粉化小孢子比例较少,而且星型小孢子在活体下已出现。这些均体现了 E<sub>14</sub> 与 T65 在活体下花粉小孢子发育中的细胞学差异。

在离体培养以后,与 T65 小孢子主要的 4 种发育途径相比, E<sub>14</sub> 中增加了胞质凝聚小孢子发育途径。随着离体培养时间的延长,各种类型小孢子分别沿着液泡化过程、胞质凝聚败育过程、配子体发育过程、孢子体发育过程和淀粉化过程进行发育,导致各种类型小孢子的比例变化。离体条件下 E<sub>14</sub> 与 T65 除了在小孢子发育中的不同,药壁结构也呈现差异: E<sub>14</sub> 的绒毡层降解和中层膨大的速度及程度上也明显快于 T65。

追溯离体下 E<sub>14</sub> 与 T65 两材料小孢子类型及比例的不同,主要原因是由于活体下的小孢子发育的差异,而造成小孢子发育差异的原因可能是由于两者的遗传差异: E<sub>14</sub> 与 T65 遗传背景相近,但在花粉不育基因座位 *S-a* 上等位基因纯合或杂合状态不同, E<sub>14</sub> 由于基因 *S'<sup>i</sup>S'* 杂合而导致大量胞质凝聚类型小孢子和少量星型小孢子产生,正常小孢子数量明显下降,淀粉化小孢子数量较少等。除了遗传因素的影响,离体下 E<sub>14</sub> 与 T65 几种小孢子发育途径应与离体培养环境有关。至于 E<sub>14</sub> 与 T65 药壁组织在离体下呈现的不同,可能也是受到基因座位 *S-a* 和培养环境的影响。

花粉不育材料 E<sub>14</sub> 中的星型小孢子具有在活体

条件下无法形成可育花粉,但在离体条件下却易形成花粉愈伤组织的特性。Heberle-Bors 曾报道在小麦细胞质雄性不育系中也存在此类型小孢子,与小麦等基因雄性可育系相比,这种小孢子在离体培养后更易获得高频率的花粉愈伤组织<sup>[9]</sup>。星型小孢子的产生主要在小孢子液泡化阶段:溶酶体对胞质液和细胞器进行水解,由于旧细胞组分的水解使细胞进程发生逆转,在细胞骨架的作用下,核移入细胞中央,大液泡分割为小液泡,形成星型小孢子,这一系列过程标志着配子体发育途径向孢子体途径的转化<sup>[10-11]</sup>。与星型小孢子同时存在的液泡化和胞质凝聚小孢子类型,其产生可能均与小孢子液泡化过程有关:液泡化小孢子可能是由于水解过度造成细胞组分的丧失;胞质凝聚小孢子可能是由于水解不足导致细胞器聚积,细胞无法进一步发育。但是对于造成这些差异的分子水平原因还未深入研究。

### 参考文献

- [1] Zhang G Q(张桂权), Lu Y G(卢永根). Genetic studies on the hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa*). I. Diallel analysis of the hybrid sterility among isogenic F<sub>1</sub> sterile lines [J]. Chin J Rice Sci(中国水稻科学), 1989, 3: 97-101.(in Chinese)
- [2] Zhang G Q(张桂权), Lu Y G(卢永根). Genetic studies on the hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa*). II. Gene model for F<sub>1</sub> pollen sterility [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 1993, 20(3): 222-228.(in Chinese)
- [3] Zhang G Q(张桂权), Lu Y G(卢永根), Yang J C(杨进昌), et al. Genetic studies on the hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa*). IV. Genotypes for F<sub>1</sub> pollen sterility [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 1994, 21(1): 35-42.(in Chinese)
- [4] Zhang Z S, Lu Y G, Liu X D, et al. Nuclear and cell migration during pollen development in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Sex Plant Reprod, 2005, 17: 297-302.
- [5] Zhuang C X(庄楚雄), Zhang G Q(张桂权), Mei M T(梅曼彤), et al. Molecular mapping of the *S-a* locus for F<sub>1</sub> pollen sterility in cultivated rice (*Oryza sativa*) [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 1999, 26(3): 213-218.(in Chinese)
- [6] Yao Y, Lu Y G, Liu X D, et al. Detection of distorted segregation in genotype of pollen calli derived from hybrid F<sub>1</sub> of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers [J]. Agri Sci Chin, 2006, 5(6): 101-105.
- [7] Feng J H(冯九焕), Lu Y G(卢永根), Liu X D(刘向东), et al. Pollen development and its stages in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chin J Rice Sci(中国水稻科学), 2001, 15(1): 21-28.(in Chinese)
- [8] Yao Y(姚焱), Lu Y G(卢永根), Liu X D(刘向东), et al. Cytological studies on the pollen and anther of Taichung 65 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) during the anther culture [J]. Chin J Rice Sci(中国

水稻科学), 2004, 18(2): 113-118. (in Chinese)

[9] Heberle-Bors E. *In vitro* haploid formation from pollen: A critical review [J]. *Theor Appl Genet*, 1985, 71: 361-374.

[10] Ari I, Iouliia B. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo [J]. *Planta*, 2001, 212(2): 163-174.

[11] Clément C, Sangwan R S, Sangwan-Norreel B. Microspore Embryo Induction and Development in Higher Plants: Cytological and Ultrastructural Aspects [M]//Biotechnology in Agriculture and Forestry, Haploids in Crop Improvement II Vol.56. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005: 53-72.

## 图版说明

### 图版 I

1. 培养前 T65 正常单核小孢子;  $\times 1\ 000$
2. 培养前 E<sub>14</sub> 中细胞质凝聚小孢子(短箭)和星型小孢子(长箭);  $\times 1\ 000$
3. 活体下正常小孢子(长箭)和细胞质凝聚小孢子(短箭)形态;  $\times 4\ 00$
4. 细胞质凝聚小孢子超微结构, 内有小液泡(V);  $\times 3\ 000$

5. 小孢子星型结构;  $\times 1\ 000$

6. 小孢子星型结构;  $\times 4\ 00$

7. 星型小孢子内细胞质被液泡(V)分割;  $\times 2\ 500$

8. 中层(箭头)消失的花药壁。  $\times 1\ 000$

## Explanation of plate

### Plate I

1. The normal microspore of T65 before anther culture;  $\times 1\ 000$
2. The cytoplasm-condensed microspores (short arrow) and star-like microspore (long arrow) of E<sub>14</sub> before anther culture;  $\times 1\ 000$
3. The normal microspore (long arrow) and cytoplasm-condensed microspore (short arrow);  $\times 4\ 00$
4. The ultra-structure of cytoplasm-condensed microspore, little vacuolus (V);  $\times 3\ 000$
5. The star-like microspore structure;  $\times 1\ 000$
6. The star-like microspore structure;  $\times 4\ 00$
7. The cytoplasm of star-like microspore was segmented by vacuolus (V);  $\times 2\ 500$
8. The middle-layer (arrow) disappeared.  $\times 1\ 000$

