

水稻 PDER 品系的特点和二倍体孢子生殖 胚囊的形成和发育

叶秀麟 陈泽濂 黎垣庆

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 对水稻(*Oryza sativa* L.)早发生胚 PDER (pre-developed embryo of rice) 品系的特点和细胞胚胎学研究表明, PDER 是二倍体植物 $2n=24$, 约有 50% 胚囊的卵细胞未经受精能自行发育形成胚, 成熟种子的萌发和生长速度较常规正常水稻快。

PDER 的大孢子母细胞经有丝分裂产生未减数的胚囊, 即无融合生殖中的二倍体孢子生殖类型。在胚囊形成和发育过程中有如下几个特点: (1) 孢原细胞至大孢子母细胞分裂前的过渡期持续时间较长, 孢原细胞和大孢子母细胞的细胞质比周围的珠心细胞质稀淡。(2) 大孢子母细胞经二次有丝分裂后形成直线排列的三个细胞(三分体), 珠孔端的两个解体, 合点端的一个发育为功能细胞, 有少数胚囊的三个细胞全部解体形成败育胚囊。(3) 功能细胞经三次连续核分裂形成具八核七个细胞的成熟胚囊, 它的结构与常规正常水稻基本相同, 但助细胞呈长形而没有回抱着卵细胞。

关键词 水稻; 无融合生殖; 二倍体孢子生殖; 胚囊

THE CHARACTERISTICS OF APOMICTIC PDER RICE VARIETY AND THE DEVELOPMENT OF DIPLOID EMBRYO SAC

Ye Xiulin Chen Zelian Li Yuanqing

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Studies on the formation of the pre-developed embryo of rice (*Oryza sativa* L.) variety (PDER) indicate that PDER is diploid, with chromosome number $2n=24$. About 50% of the embryo sacs of this variety can give rise to embryo from unfertilized egg cells. The seeds so formed show higher germination rate and produce more vigorous plants. Some of the megasporocytes do not undergo meiosis but divide mitotically to give rise to diploid embryo sacs indicating that PDER is an apomictic type of plant showing diploid parthenogenesis (diplospory). The apomictic embryo sacs have the following characteristics: 1. The transition period from the archesporial cell to the megaspore mother cell is much prolonged. The cytoplasm of the archesporial cell and the megaspore mother cell appears less dense in

承蒙徐是雄教授提出宝贵意见, 邵耘同志参加制片及照片冲洗工作, 王学海工程师协助扫描电镜观察, 特此致谢。

1995-03-15 收稿; 1995-05-08 修回

comparison with that of the surrounding nucellus cells. 2. After the second mitotic division the megasporocytes give rise to three uniseriably arranged cells. Two cells near the micropylar end degenerate. The cell near the chalazal end becomes the functional megaspore. In some embryo sacs all three cells degenerate resulting in the formation of degenerated embryo sacs. 3. The functional megaspore divides three more times (mitotically) to give rise to an 8-nucleate embryo sac. The 8-nucleate embryo sac produces seven cells similar to those seen in normal (i. e. non-apomictic) embryo sacs. The morphology of the synergids is, however, slightly different. In the apomictic embryo sacs the synergids appear much elongated and they do not tightly surround the egg cell.

Key words Rice; Apomixis; Diplospory; Embryo sac

无融合生殖是植物无性生殖途径形成种子的一种生殖方式。至今有 35 科 300 多种植物存在无融合生殖^[1]，主要是蔷薇科、禾本科、云香科等。单倍体无融合生殖可加速常规育种世代稳定，缩短育种年限；二倍体无融合生殖可固定杂种优势，简化杂交制种程序，扩大杂种优势利用范围，大幅度提高产量，因此在植物育种中引起注意。自 1980 年以来我国水稻育种工作者在水稻多胚苗，单性生殖等水稻品系方面做了不少工作^[2-5]，但在细胞胚胎学方面尚未见到有说服力的无融合生殖证据^[6,10]。1994 年刘永胜^[11]报道了助细胞无配子生殖，但频率极低；姚家琳、蔡得田等^[12]报道了 HDAR 兼性无融合生殖材料，但对其胚囊和胚的发生和发育缺少系统的研究资料。我们通过杂交结合等离子束处理选育出早发生胚的水稻品系 PDER，在开花前 1-2d 未经受精有些胚囊的卵细胞能自行发育成胚，胚早发育的特性可以遗传。为弄清它的生殖特性，本文着重探讨其胚囊的形成和发育，以确定其生殖类型。胚和胚乳的发生将在另文报导。

1 材料与方 法

试验材料为水稻胚早发生品系 PDER，栽种于华南植物所试验田中。取开花前颖花长 2-5mm 各个不同发育时期的材料固定于 FAA 固定液中并保存。爱氏 (Ehrlich) 苏木精整体染色，常规石蜡法制片，切片厚度 8-12 μ m。开花前 1-2d 的子房用整体透明方法制片，(方法见前报道^[1])。染色体制片用对二氯苯饱和水溶液预处理，卡诺固定液中固定，盐酸:95% 乙醇(1:1)离析液解离，乳酸醋酸地衣红染液染色并压片，树胶封边。扫描电镜样品经液氮冷冻法处理，JSM T-300 扫描电镜观察。

2 观察结果

2.1 水稻 PDER 品系的特点

PDER 是籼粳杂交后 F₁ 代经等离子束处理后选育出早发生胚类型，它在开花前 1-2d，未经受精，有些子房开始膨大，子房经整体透明方法处理后观察胚囊可见位于珠孔端的卵细胞已分

1) 叶秀麟, 陈泽霖, 黎垣庆, 喻诚鸿. 水稻雄性不育系 C1001 的胚胎学研究. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1995 年, 第 10 集(印刷中)

裂成多细胞原胚。随机取 100 粒 PDER 的成熟种子进行解剖观察,发现约有 65% 种子为实粒谷,约 35% 为空粒谷。把实粒谷浸水发芽计算约有 90% 能发芽,也就是说胚能生长发育成苗约占总数的 50%。把常规水稻种子与 PDER 的实粒谷在相同条件下作对照观察它们的萌发过程, PDER 明显比正常的常规水稻品种生长发育快。种子浸水 24h PDER 的种子便有部分谷壳开始破裂, 48h 有少数种子可见胚根, 6d 大多数种子已经长出胚根和胚芽, 胚芽长达 1cm, 种子萌发和生长速度快而整齐。常规水稻的种子萌发较迟, 生长速度较慢, 浸种 6d 胚芽只有 2mm 长(图版 II: 22)。取 PDER 品系的根尖压片观察其染色体 $2n=24$ (图版 I: 9)。把 PDER 的成熟种子播种种植后其后代同样有胚囊出现早发生胚的现象, 即早发生胚的特性能遗传。

PDER 开花时雌蕊的柱头与一般正常水稻品种的柱头有差异, 其柱头腺毛疏, 少分枝, 腺毛的细胞内含物不丰富。当自花的花粉粒落在柱头的腺毛上时, 花粉能萌发长出花粉管, 但花粉管不能进入柱头内, 只停留在柱头腺毛外或在柱头腺毛上旋绕, 花粉管的末端膨大(图版 II: 21)。这表现出自交不亲和的特点。

2.2 胚囊的形成和发育

水稻 PDER 品系的颖花长 2.5mm 左右时, 它的珠心先端表皮下开始出现孢原细胞, 孢原细胞呈不规则的多边形, 细胞和细胞核比周围的珠心细胞大, 核仁明显, 但细胞质没有显示特别浓的特点, 而是较为稀淡(图版 I: 1)。在珠心基部先出现内珠被原基并向上生长, 随着珠心生长在珠心的外侧产生外珠被。内外两重珠被继续向上生长, 孢原细胞体积增大, 此时细胞质比周围珠心细胞更加稀淡(图版 I: 2)。当内珠被长至珠心顶端时, 孢原细胞直接发育形成长圆形的大孢子母细胞, 其细胞核呈椭圆形, 核仁大而明显, 细胞质仍然较周围的珠心细胞浅淡(图版 I: 3)。而后大孢子母细胞的体积继续增大并向珠孔和合点端方向拉长, 靠珠孔一端变得较宽, 合点端较窄, 此时它的细胞质开始变浓(图版 I: 4), 很快进入第一次分裂前期。从孢原细胞至大孢子母细胞进入第一次分裂前的这一段时间持续较长, 约 2d。大孢子母细胞分裂前染色体分散在纺锤体上, 看不出染色体配对的现象(图版 I: 5,6)。大孢子母细胞第一次有丝分裂, 纺锤丝呈菱形(图版 I: 7), 经第一次分裂后形成两个细胞, 合点端的一个细胞体积很快增大并进行第二次分裂(图版 I: 10)。大孢子母细胞经第一、二次分裂后形成直线排列的三个细胞即三分体(图版 I: 12)。在显微镜下观察时, 上下调整焦距可见第一、二次分裂过程其染色体数目没有减半, 仍然保持与体细胞的染色体数目一致 $2n=24$, 在一切面上可见染色体数超过 12 条(图版 I: 8, 11)。由此可见 PDER 的大孢子母细胞分裂是与体细胞相似的有丝分裂。三分体中靠珠孔端的一个细胞很快就开始解体(图版 I: 13), 接着中间的一个也解体, 剩下合点端的一个细胞继续生长发育为功能细胞。功能细胞的细胞质和细胞核染色特别深(图版 I: 14)。此时有少数胚囊的三个细胞都解体, 形成败育胚囊(图版 II: 18)。功能细胞向珠孔方向延伸, 体积增大, 在合点端出现液泡(图版 II: 15)。而后进行核分裂, 形成二核胚囊, 两核之间有一个大液泡, 合点端有一个较小的液泡(图版 II: 16)。胚囊继续生长发育, 再经两次分裂形成八核胚囊。从功能细胞开始至八核胚囊期间核周围的细胞质染色特别深(图版 II: 17)。八核胚囊进一步发育为八核七个细胞的成熟胚囊, 胚囊和胚珠迅速长大(图版 II: 19)。此时珠孔端由两个助细胞和一卵细胞组成卵器, 卵

细胞略呈梨形, 其核靠近珠孔, 卵的合点端有一个大液泡。助细胞呈长形, 细胞核位于细胞中间。中央细胞在胚囊中部, 两个极核紧靠在一起并靠近卵器, 核仁明显(图版 II: 20)。反足细胞位于合点端稍偏于胚囊中上部背侧, 三个反足细胞进一步发育为三个反足细胞团。每个反足细胞团均有多个核和核仁。反足细胞与戴伦焰等^[13]、吴素萱等^[14]观察的结果基本一致。此外 PDER 的反足细胞附近的一群珠心细胞比其他珠心细胞的体积大, 细胞内有小液泡(图版 II: 19 箭头)。在观察 PDER 的胚囊形成过程中, 未见有减数分裂的胚囊出现。

3 讨论

水稻 PDER 品系的体细胞染色体为 $2n=24$, 属二倍体植物。有些胚囊开花前卵细胞能发育成原胚, 开花时由于柱头上的花粉管不能进入胚囊, 表现出明显的自交不亲和的特点, 约有 50% 胚囊的卵细胞能自发形成胚。PDER 的成熟种子比常规水稻种子萌发和生长的速度快。

PDER 在胚囊形成过程中与正常常规水稻有很大的区别, 大孢子母细胞分裂时染色体分散在纺锤体上, 不发生染色体的配对, 纺锤丝呈菱形。大孢子母细胞经第一、二次分裂后每一个再组核的染色体数目是 24, 它与体细胞染色体数目相同, 即大孢子母细胞是经有丝分裂而产生未减数的胚囊, 其生殖方式属不减数无融合生殖中的二倍体孢子生殖(Diplospory)类型。这类型与胡适之^[15]、Crane, C. F.^[16]报道的蝶须菊属(*Antennaria*)、拂子茅属(*Calamagrostis*)、泽兰属(*Eupatorium*)和早熟禾属某些种的二倍体孢子生殖相似。水稻 PDER 品系二倍体孢子生殖与刘永胜等^[11]报道的水稻 SB-1 的助细胞无配子生殖(单倍体无融合生殖)不同。

水稻 PDER 品系在胚囊形成和发育过程中还有如下特征: (1) 孢原细胞至大孢子母细胞分裂前的持续时间较正常水稻长, 孢原细胞和大孢子母细胞的细胞质较稀淡, 核大, 核仁明显, 只有在大孢子母细胞拉长, 珠孔端变宽, 合点端较窄时, 细胞质才变浓。孢原细胞的细胞质较稀淡的特征与一般植物有性过程有明显的区别。通常植物有性生殖的孢原细胞区别于珠心的其它细胞, 它的体积大, 细胞质浓厚及具显著的细胞核^[15]。而戴伦焰和曾子申^[13]在介绍常规水稻胚囊发育过程没有描述到孢原细胞和大孢子母细胞的细胞质变化。PDER 品系的孢原细胞和大孢子母细胞的细胞质稀淡的特征与常规水稻有没有区别。如果有区别, 它是否是水稻由有性生殖转向无融合生殖途径的标记之一, 值得进一步深入研究。(2) 水稻 PDER 品系的大孢子母细胞经二次有丝分裂后形成直线排列的三个细胞即是三分体, 这与常规水稻形成四分体不同^[13]。(3) 功能细胞在分裂前细胞质和核染色深, 位于合点端形成一个大液泡, 在功能细胞经三次连续分裂形成八核的过程, 细胞核和核仁染色特别深。(4) 水稻 PDER 品系的成熟胚囊与正常水稻一样有八核七个细胞组成, 基本上与戴伦焰和曾子申^[13]、吴素萱和蔡起贵^[14]、董健和扬弘远^[17]报道的正常水稻相同。戴伦焰等^[13]推断, 在常规水稻的成熟胚囊中, 助细胞延展并回抱着卵细胞, 并与极核周围的原生质相连, 这现象在受精时起作用, 或与雄配子的运送有关。但在水稻 PDER 品系中, 助细胞呈长形没有回抱着卵细胞, 这可能与 PDER 品系不需经过受精就可自发形成胚的特点有关。(5) 大孢子母细胞经二次有丝分裂后形成三个细胞时, 有些胚囊的三个细胞均解体, 形成败育胚囊, 这可能是造成 PDER 有 35% 的种子是空粒的原因之一。

PDER 品系在胚囊形成过程未见有减数分裂的胚囊形成,能生长发育的种子其胚的生长特性一致。看来 PDER 二倍体孢子生殖胚囊纯度高,没有兼性的现象。二倍体孢子生殖是遗传育种中很有价值的无融合生殖材料,它可固定杂种优势。水稻 PDER 品系属于这一类型的无融合生殖材料,其中有效胚囊约达 50%,即无融合生殖频率高,它将是很有前途的育种新材料,对它的胚,胚乳发生及无融合生殖机理的进一步深入研究是很必要的。

参考文献

- 1 Bashaw E C, Hanna W W. Apomictic reproduction. "Reproductive versatility in the Grasses" (G P Chapman), 1990, 101-130
- 2 邓鸿德等. 多胚水稻胚位与苗位的观察研究. 中国水稻无融合生殖研究进展. 四川科学技术出版社, 1991, 57-60
- 3 刘向东等. 水稻多胚苗的初步研究 I. 胚胎学的观察. 福建农学院学报, 1990, 19(2):131-137
- 4 周开达等. 四川无融合生殖水稻 (SHR-1) 研究. 四川大学学报(自然科学版), 1991, 28(3)
- 5 郭学兴主编. 中国水稻无融合生殖研究进展. 四川科学技术出版社, 1991
- 6 赵炳然等. 水稻 (*Oryza sativa* L.) 双胚苗无融合生殖胚胎学研究初报. 武汉植物学研究, 1992, 10(2):213-218
- 7 姚家琳等. 多胚水稻不定胚起源及胚胎发育中的异常现象. 华中农业大学学报, 1991, 10(3):233-237
- 8 蔡得田等. 高频率无融合生殖水稻的研究. 华中农业大学学报, 1991, 10(3):223-227
- 9 叶秀麟, 陈泽源, 黎恒庆. 水稻“双-3”多胚发生的研究. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(4):67-72
- 10 刘永胜, 孙敬三, 王伏雄等. 多胚水稻品系 SB-1 的细胞胚胎学研究: 多胚及其起源. 植物学报, 1994, 36: 821-827
- 11 刘永胜, 孙敬三, 王伏雄等. 多胚水稻品系 SB-1 的细胞胚胎学研究: 助细胞无配子生殖. 植物学报, 1994, 36:828-832
- 12 姚家琳, 蔡得田等. 无融合生殖水稻 HDAR002 的胚胎学研究. 华中农业大学学报, 1994, 13(4):339-343
- 13 戴伦焰, 曾子申. 水稻胚囊的形成与发育. 武汉大学学报, 1964, (2):97-110
- 14 吴京莹, 蔡起贵. 水稻 (*Oryza sativa* L.) 双受精过程的细胞学观察. 植物学报, 1965, 13:114-122
- 15 胡适宜. 被子植物胚胎学. 人民教育出版社, 1982, 74-75, 220-222
- 16 Crane C F, Carman J G. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisems* from Eastern Australia and New Zealand. Amer J Bot, 1987, 74:477-496
- 17 董健, 杨弘远. 水稻胚囊超微结构的研究. 植物学报, 1989, 31:81-88

图版说明

所有照片的胚囊珠孔在上方, 合点端在下方。

e — 卵细胞 Egg cell; s — 助细胞 Synergid

图版 I

1. 示孢原细胞, 细胞质较稀淡(箭头); ×800
2. 孢原细胞体积增大, 细胞质稀淡(箭头); ×1000
3. 示大孢子母细胞; ×800
4. 大孢子母细胞向两端拉长; ×800

- 5,6. 同一胚珠的两个不同切面, 示大孢子母细胞分裂时染色体分散在纺锤体上; $\times 1200$
7. 大孢子母细胞第一次有丝分裂; $\times 1200$
8. 压片示大孢子母细胞第一次有丝分裂后, 再组核的染色体没有减半(箭头); $\times 1200$
9. 示二倍体根尖细胞 24 条染色体; $\times 3300$
10. 合点端的一个细胞有丝分裂(箭头); $\times 800$
11. 第二次有丝分裂后中间的一个再组核的染色体(箭头); $\times 800$
12. 大孢子母细胞经二次有丝分裂后形成直线排列的三个细胞; $\times 800$
13. 三个细胞中珠孔端的一个细胞开始解体; $\times 800$

图版 II

14. 三个细胞靠珠孔端的两个细胞解体, 合点端的一个细胞体积增大发育为功能细胞; $\times 800$
15. 功能大孢子合点端出现液泡; $\times 800$
16. 功能大孢子核分裂为二核胚囊; $\times 800$
17. 功能细胞核经三次连续分裂后形成八核胚囊, 示一切面的六个核; $\times 800$
18. 三分体全部解体, 形成败育胚囊; $\times 800$
19. 成熟胚囊与正常水稻相似; $\times 400$
20. 成熟胚囊示一卵细胞、一助细胞和两个极核; $\times 800$
21. 扫描电镜示柱头上萌发后的花粉管末端离开腺毛向外生长(箭头); $\times 800$
22. 左为水稻 PDER 品系, 右为正常常规水稻浸种后第六天萌发情况.

Explanation of plates

All figures are arranged by the chalazal ends to the down side.

Plate I

1. The cytoplasm of the archesporial cell appears less dense in comparison with that of the surrounding nucellus cells (arrow); $\times 800$
2. Showing increase volume of the archesporial cell and the cytoplasm less dense (arrow); $\times 1000$
3. Showing the megaspore mother cell; $\times 800$
4. The megaspore mother cell elongating toward both ends; $\times 800$
- 5,6. Serial sections of one ovule, showing the megaspore mother cell enters mitotic. The chromosomes remain scattered over the whole spindle; $\times 1200$
7. The megaspore mother cell enters first mitosis; $\times 1200$
8. Nucleus with unreduced chromosome number after the megasporocyte first mitosis (arrow); $\times 1200$
9. 24 chromosomes of a diploid root tip cell; $\times 3300$
10. The chalazal one cell enters second mitosis (arrow); $\times 800$
11. Nucleus with unreduced chromosome number after second mitosis (arrow); $\times 800$

12. After the second mitotic division the megasporocyte gives rise to three uniseriably arranged cells; $\times 800$
13. One cell near the micropylar end degenerates; $\times 800$

Plate II

14. Two cells near the micropylar end degenerate. The cell near the chalazal end becomes a functional megaspore; $\times 800$
15. The functional megaspore with vacuole located at the chalazal end; $\times 800$
16. The functional megaspore divided into a 2-nucleate embryo sac; $\times 800$
17. 8-nucleate embryo sac, showing six nuclei; $\times 800$
18. Three cells degenerate resulting in the formation of degenerated embryo sac; $\times 800$
19. Mature embryo sac similar to those seen in normal embryo sac; $\times 400$
20. Showing one egg cell, one synergid and two polar nuclei in the mature embryo sac; $\times 800$
21. Scanning electron microscope, showing the pollen tube tip grew out side the glandular hair on the stigmatic surfaces (arrow); $\times 800$
22. The seedling after six day germination, PDER rice variety (left), normal rice variety (right).