

②

早发生胚水稻小孢子发生及花粉的萌发生长

183 288

许秋生 梁承邺 叶秀麟 黎垣庆
 陈泽濂 王学海 孙彩云

5511.01
 2944.55

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 实验结果表明, 早发生胚水稻(PDER)品系小孢子的发生发育与常规水稻品种相同, 常规 I-KI 镜检显示其成熟花粉育性达 87.4%。开花后, 少量花粉在柱头上能正常萌发, 并以短管形式进入柱头。大部分花粉在柱头上发生了异常行为: 不萌发花粉管, 但排放出大量内容物; 花粉管细小或畸形; 在柱头内或柱头外花粉管前端破裂; 花粉管在柱头上绕行不进入柱头; 花粉管在柱头内逆行生长; 花粉管进入柱头后又穿出柱头; 花粉管壁上粘有颗粒或被有一层膜等。文中就 PDER 的来源讨论了这些现象, 并提出“萌败”这一新概念。

关键词 早发生胚; 水稻; 花粉萌发; 萌败

中图分类号 Q944.58

MICROSPOROGENESIS AND POLLEN GERMINATION IN PRE-DEVELOPED EMBRYO RICE

Xu Qiusheng Liang Chengye Ye Xiulin Li Yuanqing

Chen Zelian Wang Xuehai Sun Caiyun

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

Abstract Microspore development and pollen germination in vivo in pre-developed embryo rice (PDER) were observed using light and scanning electron microscope. The results showed that the procedure of microspore development in PDER was the same as that in conventional rice strains, in which mature pollen grains were filled with starch grains. When flowering, only part of mature pollen could germinate well and get into stigmatic tissue by short tube, and most of them behaved abnormally: (1) Pollen did not germinate, but expelled mass of pollen content from the germinal aperture. (2) Pollen tube was very small. (3) Pollen tube swelled or broken outside or inside the stigma. (4) Pollen tube entered the stigma and then got out of it. (5) Pollen tube crawled (twisted) at the stigmatic surface. (6) Pollen tube was coated with pollen content. (7) Pollen tube growth direction was reverse inside the stigma. These abnormal phenomena were discussed.

Key words Pre-developed embryo; Rice; Pollen germination; Germination abortion

自八十年代中后期至今, 国内水稻无融合生殖研究十分活跃, 并且先后报道了 C1001, SAR,

国家自然科学基金(39570050)和中国科学院重大项目(KZ951-A1-101)资助。

1997-08-12 收稿; 1998-05-13 修回

HDAR、PDER、CYAR20 和 TAR 等无融合生殖材料^[1,2]。其中,早发生胚水稻(PDER)品系为华南植物研究所利用多苗水稻进行杂交并结合等离子注入技术处理选育到的具早发生胚性质的水稻无融合生殖材料^[3]。我们已报道过此品系进行二倍体孢子生殖的胚囊形成过程,并提及其花粉在柱头上萌发有异常现象^[4,5]。本文进一步报道对其小孢子发生及花粉萌发过程的显微及亚显微水平的研究结果。

1 材料和方法

实验材料为华南植物研究所实验田种植的早发生胚水稻 PDER 品系。(1)观察小孢子发生发育的材料自小孢子母细胞时期开始取样直到花粉成熟。取新鲜花药用醋酸洋红染色压片或将花药用 FAA 固定后石蜡包埋切片观察。(2)花粉育性检查,用 I-KI 染色方法,取 12 个视野观察,统计典败、圆败和染败的百分数。(3)研究花粉萌发行为的材料,自开花传粉后 3 min 开始到 5 h 为止共取样 8 次。方法是:开花时做记号,然后于不同时间摘下颖花放入 4% 戊二醛中进行前固定,4℃ 过夜,再用 1% 锇酸做后固定,4℃ 过夜,后经系列酒精脱水,临界点干燥,离子镀膜等程序处理。用日产 JSM-300 扫描电镜观察并拍照。每份样品 10-20 朵颖花,早晚造各进行一次。同时在相同时间取 5-10 朵颖花用 FAA 固定,整体染色透明,染液为铁矾苏木精或希夫试剂^[6]。材料用中性树脂封片后在光学显微镜下观察。此外,部分用戊二醛和锇酸双固定的样品也被用来做为光学显微镜观察的材料。用做对照的实验材料是常规水稻品种测 64。

2 实验结果

2.1 花粉的发育

光学显微镜观察结果表明,PDER 品系小孢子的发生发育与常规水稻品种测 64 相同,都由小孢子母细胞开始经过第一次减数分裂形成二分体(图版 I:1-3),二分体的每一个细胞再分裂一次而形成四分体(图版 I:4)。从四分体分开后的每个小孢子经过单核、双核到三核的发育过程成为成熟花粉(图版 I:5)。用 I-KI 镜检显示:测 64 的花粉育性达 95.6%;PDER 品系的花粉 87.4% 染色正常,为成熟饱满并充满淀粉粒的圆形花粉,只有少量花粉败育,包括 5.3% 为典败、1.9% 为圆败和 5.4% 为染败。

2.1 花粉在柱头上的萌发行为

PDER 品系和测 64 相同,花药散粉后,花粉粒几乎可以在雌蕊的任何位置:包括子房、花柱及柱头表面上萌发。但并不是同时萌发出花粉管,而是有快有慢,最快者约开花后 5 min 花粉管就从萌发孔伸出。此后,不断有花粉管萌发,在开花后 50 min 有的花粉才萌发。严重皱缩和凹陷的花粉一般不能萌发花粉管。然而对 PDER 来说,有些外表圆滑饱满的花粉粒在开花 5 h 仍不萌发。因而开花后一段时间内,柱头上的花粉形态各异,有的仍呈圆球形,有的凹陷皱缩呈不规则形(图版 I:12,13)。花粉管生长一段时间后就发生萎缩(图版 II:18)。一般萌发孔盖不脱落,并且不管花粉管的生长情况如何,它都连在萌发孔边缘,位于花粉管基部的一侧(图版 I:15;图版 II:18,23,26,29,30)。

花粉管从柱头进入的地方可以是柱头的基部、中间和柱头分枝的顶端。其进入位置是横向排列或上下排列的两个柱头细胞间的细胞壁处(图版 I:14,15),也观察到花粉管挤开柱头分枝顶端的两个细胞而进入柱头。在进入柱头处,花粉管与柱头细胞间的结合非常紧密(图版 II:16,19)。与测 64 不同的是, PDER 只有少量的花粉管能以短管形式直接进入柱头(图版 I:14,15;图版 II:16,31)。多数花粉管并不以短管形式进入柱头,它们或爬行于花粉粒上(图版 I:13;图版 II:17),或是旋绕于柱头羽状分枝上,然后进入柱头或迟迟不进入柱头(图版 II:17,21,24),这与我们曾报道的相同^[4]。有的花粉管进入柱头后在柱头内逆行生长,即从近子房端进入柱头然后向柱头分枝顶端方向生长,有的花粉管甚至从柱头分枝的一侧进入,从另一侧破柱头分枝而出,然后又进入柱头或不进入柱头(图版 I:7,9;图版 II:22)。还有的花粉管在未进入柱头之前其前端就发生膨大,不能进入柱头(图版 I:8),或在柱头内并不能正常生长,它们的前端常发生膨大或破裂(图版 I:6)。花粉管生长的另一异常现象是,花粉管细小,其前端也发生破裂(图版 II:23)。这些异常的花粉管都不能进入子房到达胚囊。

在光学显微镜下观察 PDER 的受粉柱头,常见有些花粉的周围或与柱头羽状分枝相接触处有一些粘液状物质,这些物质或成团出现,或分散存在,它们内部含有颗粒(图版 I:10,11)。在 PAS 反应染色整体封片标本上,颗粒呈暗紫红色,其大小和形态都与花粉粒内大量存在的颗粒一致。而用钨酸固定的材料,颗粒不被染成黑色。对测 64 的观察也发现相同现象,但较少见。

在扫描电镜下对 PDER 的受粉柱头进行观察,我们发现这些带有颗粒的粘液状物质是从花粉的萌发孔处排出来的内容物(图版 II:28)。内容物从形态上基本可分为二类,一类是无定形的,可为片状、膜状或絮状的基质;一类是大小不一,但形状较为一致的颗粒。颗粒最大者长达 4 μm ,宽达 1.6 μm ;小的长约 2 μm ,宽约 1 μm 。从形状、大小和染色反应可以断定,这些颗粒实质上为花粉的淀粉粒。有时数个花粉排出的内容物融汇在一起,充填于花粉之间或花粉与柱头之间的空隙(图版 I:13;图版 II:18,23-25),同时可见另一些花粉的花粉管在这些排出物内部生长(图版 II:24)。有趣的是,外表圆滑饱满的花粉粒并不一定能萌发出正常的花粉管,从萌发孔出来的可能是散开的或布袋状的花粉内容物(图版 II:26,28);而皱缩的花粉也并不一定是柱头上流出的花粉内容物的来源,有些外壁皱缩的花粉粒其周围布满内容物,但其自身的萌发孔盖仍完好地盖在孔口(图版 II:27)。在测 64 的样品上也观察到有的柱头上存在少量花粉内容物。

刚从花粉萌发出来不久的多数花粉管比较饱满,其表面比较干净,倍数较大时还能见网格状的花纹(图版 II:16,19)。不过 PDER 品系有少数的花粉管表面覆盖一层膜,膜上还分布一些颗粒,萌发孔盖在此层膜之外(图版 II:29)。有少数花粉管的表面则没有膜覆盖,但布满密集的颗粒,萌发孔盖也位于颗粒之外(图版 II:30,31)。很明显,花粉管外所披包膜和颗粒是随花粉管的生长从花粉粒内部带出来的花粉内容物。

3 讨论

目前仍没有水稻花粉萌发行为的专门研究报道,虽然徐是雄等^[7]曾对水稻花粉在柱头上的萌发做过观察,在他们的图片中也显示一些颗粒状物质分布在柱头上,但他们没有加以说明。本

研究观察到的特殊现象: 1. 花粉管不萌发而排出内容物; 2. 花粉管逆向生长和进入柱头后又穿破柱头而出; 3. 花粉管上披带颗粒等现象在水稻中都属首次报道。这些现象的发现对研究花粉与柱头的相互作用增添了新的内容。

常规 I-KI 染色检查结果表明, PDER 品系的花粉育性达 87% 以上, 而落在柱头上的花粉大部分发生了异常行为, 包括花粉萌发、花粉管形态和行为的异常等。而且有些外表皱缩的花粉并不排出内容物, 反而有些外表圆滑的花粉不萌发花粉管而排出内容物。它说明花粉育性检查与花粉的实际萌发能力存在较大差异。由此看来, I-KI 检验花粉育性的方法至少对 PDER 品系是不合适的。据记载, 杂交小麦无生活力的花粉与正常的成熟花粉同样易于染色, 而橡树花粉染色很差, 但却具高生活力^[6]。最近, 李自超等^[7]对 I-KI 溶液鉴别水稻花粉育性的可行性做了专门研究, 他们指出, 在籼粳交后代中, 用 I-KI 溶液来检验花粉的育性的可靠性较低, 很可能反映不出花粉生活力的真实情况。这些事实支持了用染色反应来检验花粉的生活力一般很不正确的观点^[8]。目前, 科研和生产上对水稻花粉育性的常规检验方法是 I-KI 染色法, 并且根据小孢子发育的程度和染色反应的结果, 把小孢子的败育分成典败、圆败和染败^[11]。从本实验的结果看, 育性检查结果为正常的花粉在柱头上萌发时可发生异常, 我们建议把这种现象称为“萌发败育”(简称“萌败”), 并做为检验花粉生活力的一个指标。

PDER 品系是利用等离子注入技术处理双苗水稻与籼稻和粳稻杂交后代的种子, 然后经数代选育所得的水稻无融合生殖材料^[1]。小孢子发生发育的石蜡制片观察和常规 I-KI 镜检表明, 它的小孢子能正常地发育为成熟的花粉, 但相当比例的花粉却不能在柱头上正常地萌发或花粉管行为异常, 这就从形态学及胚胎学方面暗示: 经等离子注入处理的种子可能发生了某种或某些遗传因素的变异或破坏, 导致花粉或柱头或两者的代谢功能紊乱, 因而花粉落在柱头上之后不能正常地识别, 并发生了一系列的异常表现——“自交不亲和”现象。Brewbaker^[12]总结认为, 被子植物开花时, 花粉的发育程度可分成两类, 二核花粉和三核花粉。二核花粉在不亲和的柱头上萌发时, 花粉管趋向于在柱头中受抑制, 而三核花粉则偏于在柱头表面受抑制。水稻成熟花粉属三核型, PDER 品系花粉管生长受抑制的现象兼有二核花粉的特征。

参考文献

- 1 谭薇, 郭学兴, 孔繁伦. 遗传背景对水稻无融合生殖材料 C1001 无融合结籽频率影响的初步研究. 林建兴主编. 作物育种与育种新技术. 北京: 科学出版社, 1995, 118-122
- 2 刘永胜, 孙敬三. 从水稻同源三倍体中鉴定出无融合生殖种质 TAR. 植物学报, 1996, 38(11):917-920
- 3 黎垣庆, 叶秀麟, 陈泽源等. 水稻无融合生殖材料 PDER 选育的初步研究. 杂交水稻, 1995, (4):6-8
- 4 叶秀麟, 陈泽源, 黎垣庆. 水稻 PDER 品系的特点和二倍体孢子生殖胚囊的形成和发育. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(3):36-42
- 5 许秋生, 叶秀麟, 黎垣庆等. 早发生胚水稻 PDER 品系的近期研究进展. 中国学术期刊文摘(科技快报), 1997, 3(7): 887-888
- 6 孙敬三, 钱迎倩. 植物细胞学研究方法. 北京: 科学出版社, 1987, 134-137
- 7 徐是雄, 徐雪宾等. 稻的形态与解剖. 北京: 农业出版社, 1984, 138-143
- 8 Stanley R G, Linkens H F. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. Springer-Verlag, 1974, 67-86

- 9 李自超, 王象坤, 库尔班. I-KI 溶液鉴别水稻花粉育性可行性. 北京农业大学学报, 1993, 19(4):109-110
- 10 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 高等教育出版社, 1982, 56-58
- 11 徐树华. 水稻“红莲-华矮 15”不育系及其保持系的花粉发育细胞学观察. 武汉大学学报(自然科学版), 1979, (2): 79-85
- 12 Brewbaker J L, Majumder S. Cultural studies of the pollen population effect and the self-compatibility inhibition. Amer J Bot, 1961, 48:457-464

图版说明

图版 I

图 1-5, 石蜡切片, 示 PDER 品系小孢子的发生发育过程. 1. $\times 500$; 2-4. $\times 600$; 5. $\times 300$

1. 小孢子母细胞时期; 2. 第一次减数分裂中期; 3. 第二次减数分裂后期(二分体); 4. 四分体; 5. 成熟花粉粒.

图 6-11, 整体染色透明制片, 示 PDER 品系花粉萌发的异常行为. 6-10. $\times 300$; 11. $\times 550$

6. 在柱头中花粉管前端破裂(楔形); 7. 花粉管在柱头组织中逆行生长(楔形); 8. 花粉管前端膨大(楔形), 不能进入柱头; 9. 花粉管从柱头分枝的右边进入, 然后从左边穿出(楔形); 10. 花粉排出大量内容物(楔形); 11. 花粉排出大量淀粉颗粒分散于柱头上(楔形),

图 12-15, 扫描电子显微镜照片, 示 PDER 品系花粉在柱头上的分布及花粉管进入柱头的情形.

12. 开花 5 h 后的柱头, 示花粉在柱头上的分布, 注意有的花粉仍没有发生皱缩(箭头), $\times 75$; 13. 开花 10 min 后柱头上花粉的萌发状况. 有的花粉管已经进入柱头(箭头). 注意花粉排出的含淀粉粒的大量内容物(楔形), $\times 500$; 14. 花粉管以短管形式从左右并排的两个细胞间进入柱头, $\times 1750$; 15. 花粉管以短管形式从上下排列的两个细胞间进入柱头, 楔形示孔盖, $\times 1000$.

图版 II

扫描电镜照片, 示 PDER 品系花粉在柱头上萌发的各种现象.

16. 花粉管从柱头顶分枝顶端挤开相邻的细胞进入柱头. 注意花粉管与柱头细胞结合紧密(楔形), $\times 1000$; 17. 花粉管不是在萌发孔最近的地方进入柱头, 而是绕行到花粉的另一侧才进入柱头(楔形), $\times 750$; 18. 花粉和花粉管已经萎缩, 但萌发孔盖仍没脱落(楔形), 左下方为大量花粉内容物(箭头), $\times 2500$; 19. 花粉管从柱头分枝的顶端进入柱头组织. 注意花粉管在进入柱头处发生了膨大(楔形), $\times 1750$; 20. 已进入柱头的花粉管支撑起花粉粒, $\times 750$; 21. 一花粉管在柱头分枝的近顶端处扭转了 180° (楔形), $\times 750$; 22. 花粉管从柱头分枝穿出, 其前端仍完好(楔形), $\times 500$; 23. 花粉管细小, 其前端已破开(箭头), 一些粘稠状物连在花粉上(楔形), $\times 1750$; 24. 花粉管爬行近 $50 \mu\text{m}$ 仍不进入柱头, 一些花粉内容物盖在花粉管上, $\times 1000$; 25. 位于柱头分枝顶端的花粉排出大量内容物. 注意花粉外壁并不强烈皱缩, $\times 1000$; 26. 饱满圆滑的花粉粒从萌发孔流出内容物, 萌发孔盖仍在孔口处(楔形), $\times 1750$; 27. 皱缩的花粉, 注意萌发孔盖仍稳盖孔口(楔形), 花粉下方有来自其它花粉的内容物, $\times 1000$; 28. 饱满圆滑的花粉从萌发孔(楔形)排出大量内容物, $\times 1000$; 29. 花粉管外有一层皱缩的膜, 膜上有一些颗粒(箭头), 萌发孔盖位于膜的外侧(楔形), $\times 2500$; 30. 花粉管外有密布的颗粒(箭头), 萌发孔盖位于颗粒之外(楔形), $\times 1750$; 31. 外壁布满颗粒的花粉管以短管形式从相邻的四个柱头细胞间(楔形)进入柱头, $\times 1750$.

Explanation of plates

Plate I

Fig. 1-5. Paraffin section, showing the microspore development of PDER. 1. $\times 500$; 2-4. $\times 600$; 5. $\times 300$

1. Microsporocytes; 2. Microsporocytes at metaphase of meiosis I; 3. Diad at anaphase of meiosis II; 4. Tetrad, 5. Mature pollen grains.

Fig. 6-11. Wholly mounted PDER stigma, showing abnormal behavior of pollen germination. 6-10. $\times 300$; 11. $\times 550$.

6. Tip of pollen tube broken inside the stigma (wedge); 7. The direction of the growing pollen tube was reverse inside the stigma branch (wedge); 8. Swelling at the end of pollen tube (wedge); 9. Pollen tube got into the stigma at one side and then got out of it from the other side (wedge); 10. Exudate of pollen grain (wedge); 11. Lots of starch grains (wedge) from pollen dispersed at the stigmatic surface.

Fig. 12-15. Photographs of scanning electron microscope, showing pollen distribution and pollen tube growth on the stigma of PDER.

12. State and distribution of pollen grains at the stigma after 5 h of flowering. Note some pollen grains were still spherical (arrows), $\times 75$; 13. Pollen tube got into the stigma (arrow), and lots of starch grains at the stigma and on pollen surface were observed (wedges), $\times 500$; 14. Pollen tube penetrated the stigma between two parallel stigmatic cells, $\times 1750$; 15. Pollen tube penetrated the stigma between two up and down arranged stigmatic cells. Note germinal lid (wedge) at one side of the tube base, $\times 1000$.

Plate II

Photographs of scanning electron microscope, showing pollen germination in PDER.

16. Pollen tube entered stigma at the tip of stigma branch. Note pollen tube was closely engaged to stigmatic cells (wedges), $\times 1000$; 17. Pollen tube entered the stigma not at the nearest side, of the germinal aperture, it crawled to the other side of the pollen and where it got into the stigma (wedge), $\times 750$; 18. Pollen and pollen tube had shriveled after 3.5 h of flowering. Note germinal lid (wedge) remained at the edge of germinal aperture and mass of pollen exudate at the lower-left side of the picture (arrow), $\times 2500$; 19. Pollen tube expanded and entered the stigma (wedge), $\times 1750$; 20. Pollen grain was propped up by its own pollen tube, $\times 750$; 21. Pollen tube took a big turn at the surface of stigma (wedge), $\times 750$; 22. Pollen tube got out of the stigma (wedge), $\times 500$; 23. Small pollen tube. Note that it had broken (arrow) and some sticky material adhered to the pollen surface (wedge), $\times 1750$; 24. Pollen tube twisted at the stigmatic surface. Note some pollen exudates covering the pollen tube, $\times 1000$; 25. One pollen grain and its exudate at the tip of stigma branch. Note most of the exudate were starch grains, $\times 1000$; 26. Pollen content streamed down from its germinal aperture. Note the pollen was still spherical, and the germinal lid was still at the aperture (wedge), $\times 1750$; 27. Not germinated pollen grain. Note germinal lid (wedge) still covered the germinal aperture and pollen exudate from other pollen was underneath it, $\times 1000$; 28. Pollen content exudated from germinal aperture (arrow). Note pollen shape was still spherical, $\times 1000$; 29. Pollen tube was covered with a layer of coat on which some grains appeared (arrows). Note germinal lid (wedge) was outside the coat, $\times 2500$; 30. Pollen tube covered with lots of grains (arrow). Note the position of the germinal lid was still at the base of pollen tube (wedge), $\times 1750$; 31. Pollen tube covered with lots of grains. Note the position (wedge) where pollen tube got into the stigma, $\times 1750$.