

## 光(温)敏核不育水稻花药和小孢子发生的细胞化学

梅建峰 许秋生 梁承邨 陈宝源 陈建通

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 利用细胞化学方法, 对光(温)敏核不育水稻农垦 58S 和 W6154S 的花药和小孢子发生过程的观察结果表明, 在可育条件下, 其花药组织和小孢子发生过程不论形态结构还是细胞化学变化都基本一致。小孢子母细胞时期的药隔薄壁组织、药壁中层及药室内壁中分布了一些多糖颗粒, 但到进入减数分裂时多糖颗粒基本消失。绒毡层在解体前一直富含细胞质, 从染色反应看, 它表现为小孢子母细胞时期的蛋白质向减数分裂开始后的多糖物质的转变过程。在不育条件下, 农垦 58S 在小孢子母细胞时期就出现异常, 其败育时间比 W6154S 要稍早一些。两者最后都表现为败育, 但 W6154S 的花药壁解体较为彻底, 只剩下干皱的表皮和药室内壁, 而农垦 58S 的花药壁还有多层细胞结构。

**关键词** 雄性不育水稻; 花药; 小孢子; 细胞化学

## CYTOCHEMISTRY OF ANTHHER AND MICROSPORE DEVELOPMENT IN PHOTO-/THERMO-SENSITIVE GENIC MALE-STERILE RICE

Mei Jianfeng Xu Qiusheng Liang Chengye Chen Baoyuan Chen Jiantong

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

**Abstract** Cytochemical technique for staining lipids, polysaccharides and proteins in the same section from the tissue embedded in Epon 812 was used to observe the anther and microspore development of photo-/thermo-sensitive genic male-sterile rice Nongken 58S (NK58S) and W6154S. The results are as follows.

Under fertile condition, the development of the microspore and anther wall of NK58S was not different from that of W6154S. During the microsporocyte stage, there were some polysaccharide grains in the middle layer and endothecium, but not in tapetal cells. The tapetum was easily stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). As the microsporocyte went into meiosis, a few polysaccharide grains were present in anther wall. The tapetum was stained actively with Schiff reagent instead of with CBB. Lipid bodies were observed in mature pollen of both NK58S and W6154S.

Under abortive condition, although the distribution of polysaccharide grains in anther wall and the staining reaction in tapetum were the same as they were under fertile condition

1996-05-08 收稿; 1996-11-08 修回

until the separation of uninucleate microspore from tetrad, there existed some differences between NK58S and W6154S concerning the whole process of anther and microspore development. Abortion occurred in NK58S earlier than that in W6154S. Even before meiosis, the microsporocyte of NK58S had shown anomalous shape or adhering to the tapetum. At the stage of pollen maturation, the anther wall of W6154S degenerated more thoroughly and consisted of only epidermis and endothecium, however, that of NK58S consisted of epidermis, middle layer and endothecium.

**Key words** Male-sterile rice; Anther; Microspore; Cytochemistry

光(敏)核不育水稻的发现,吸引了许多科研工作者的兴趣,人们从不同角度探讨造成这种水稻小孢子败育的机理,在遗传、生理生化及细胞形态结构等方面已积累了不少研究资料。其中细胞形态结构方面有关小孢子发育的显微和亚显微水平的观察也已有一些报道<sup>[1-6]</sup>,但结果不尽一致,特别在小孢子发育的细胞组织化学方面还缺少系统的研究。本文初步报道这方面的实验结果。

## 1 材料与方法

试验材料为农垦 58S 和 W6154S,取自华南植物研究所实验田分期播种材料和人工气候箱控光温培养的材料,旨在取得可靠的可育与不育两类试材。取样时用碱性品红进行压片检查以确定小孢子发育时期,然后将相应花药用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸进行双固定,环氧树脂 Epon 812 包埋,以 2-3  $\mu\text{m}$  厚度行半薄切片。切片用 PAS 反应进行单染以及 PAS、苏丹黑 B、考马斯亮蓝三重染色进行复染<sup>[7]</sup>,以此分步及同时显示细胞内多糖、脂类和蛋白质的分布与消长规律。

## 2 观察结果

### 2.1 小孢子母细胞时期

农垦 58S 和 W6154S 的花药在这一时期不论在可育还是不育条件下,它们的细胞组织结构和物质变化是一致的。发育早期阶段,可见花药壁由四层细胞组成,由外往里分别是表皮层、药室内壁、中层和绒毡层(图版 I:1-3)。此时的药室内壁、中层和与药隔相邻的薄壁细胞中有一些多糖颗粒出现,但少见绒毡层中有多糖物质的分布,而是充满了蛋白质类物质(图版 I:2,3)。同样也少见小孢子母细胞中有多糖化合物颗粒出现,而只是有少量脂质颗粒(图版 I:3)。随着小孢子母细胞的发育,药壁组织及小孢子母细胞内的物质发生了明显的变化,特别是绒毡层,到小孢子母细胞进入减数分裂时,其细胞中原来含有的丰富的蛋白质类物质已基本消失,而充满了多糖物质,小孢子母细胞也有较明显的多糖物质出现。值得注意的是在农垦 58S 的不育花药中,已经出现畸形小孢子母细胞或小孢子母细胞呈管状紧贴于绒毡层的内切向壁(图版 II:9,10)。

### 2.2 减数分裂时期

从减数分裂开始到四分体形成,W6154S 的可育花药和不育花药以及农垦 58S 的可育花药还未显示出较大差异,它们的花药壁仍由四层细胞组成,组织内的物质类型和分布也与刚进入减数分裂时的状况比较一致。但花药组织除绒毡层富含多糖外,其它组成成分的多糖颗粒基本消失,药

室内的二分体及四分体与绒毡层相同也被 PAS 反应而成深红色。一些脂滴分布在二分体细胞内(图版 I:4,5)。虽然,小孢子都经过二分体到四分体的阶段,但农垦 58S 的不育花药在二分体阶段常常出现不均等的二分体,即二分体中的一个细胞内含物丰富,充满多糖物质,而另一个细胞内则只有稀疏细胞质或甚至呈没有内含物的空细胞状(图版 II:11)。

### 2.3 花粉发育时期

自小孢子从四分体分离开始,即进入花粉发育时期。此时农垦 58S 和 W6154S 的可育花药壁组织及小孢子细胞内的多糖物质随着四分体的分离、膨胀而逐渐减少直至消失。到单核靠边期,绒毡层已变得厚薄不均,在有小孢子附着的区域,绒毡层细胞被消耗而变得很薄;没有小孢子附着的区域,绒毡层细胞仍有一定的形态结构(图版 I:6)。此时在绒毡层中能观察到的是一些小的脂肪颗粒,然而药室内壁和中层仍没有退化迹象。随着小孢子的继续发育和绒毡层的退化解体,小孢子内逐渐积累多糖物质—淀粉粒。到花粉成熟时,花药壁只剩下干缩的表皮层和已变得不完整的药室内壁,而中层基本消失,绒毡层则完全消失,花粉粒充满淀粉粒(图版 I:7)。此外,在成熟花粉粒内,有少量被染成黑色的脂质小体(图版 I:8)。周一兵曾观察到这一现象<sup>[8]</sup>。

W6154S 不育花药到四分体分离、增大时,花药组织及小孢子内的多糖物质减少并逐步消失,此时中层及药室内壁开始发生退化,这与可育花药的中层及药室内壁的退化时间是明显不同的。绒毡层也发生明显退化,但切面上仍呈一个完整的圆环,环内出现了一些小的脂滴物质(图版 II:12)。随着小孢子的进一步发育,体积增加,到接近单核靠边期,药室内壁已不完整,中层基本解体,绒毡层变得残缺不全,或只在部分区域剩下被消化后没有内含物的细胞残迹,小孢子内则出现了少量脂质小体(图版 II:13)。此时小孢子已走向败育,最后在败育的花药组织中只存有皱缩的表皮和药室内壁及干瘪不规则的小孢子残壳(图版 II:17)。

农垦 58S 不育花药到四分体分离后,小孢子开始增大时,绒毡层和小孢子中已没有能被 PAS 反应着色的多糖物质。此时小孢子走向败育,但与 W6154S 不同的是中层和药室内壁细胞结构还相当完整。随着败育的进行,绒毡层细胞壁完全解体,其细胞内含物释放到药室内(图版 II:14)。直到小孢子完全败育,绒毡层仍有一些细胞残留物,中层细胞解体不彻底,甚至与药室内壁一样仍保持得相当完整(图版 II:15,16)。

## 3 讨论

农垦 58S 和 W6154S 在各自可育的条件下,小孢子的发生发育虽然是一致的,但它们的不育株小孢子的败育过程则表现了明显差异。首先从败育时期看,W6154S 比农垦 58S 来得稍迟些,主要发生在单核中位后期,即接近单核靠边期,而农垦 58S 则主要发生在单核中位早期。这结果与梁承邨等<sup>[6]</sup>的观察结果基本上是一致的。农垦 58S 的花药败育不只比 W6154S 稍早,而且败育过程也较为复杂,比如在小孢子母细胞阶段就显示了一些异常现象。虽然我们没有观察到农垦 58S 在减数分裂时的偶线期和粗线期出现花粉母细胞粘连、细胞结构混乱和品字形及直线形的异常四分体,也没有观察到花粉母细胞时期绒毡层的解体<sup>[3,9]</sup>,但我们的实验结果进一步说明了农垦 58S 败育过程的多样性和复杂性。

其次,虽然农垦 58S 和 W6154S 败育的最终表现为败育,但两者药壁的退化与解体在时间

和程度上都不同。W6154S 的中层和药室内壁在小孢子从四分体分离、膨大时已经出现退化现象,而农垦 58S 的中层和药室内壁在绒毡层全面解体时仍保持完整的细胞结构。最后在完全败育的情形下, W6154S 的药壁只剩下皱缩的表皮和部药室内壁,而农垦 58S 则还含有多层药壁组织,连绒毡层也没有全部消失。由此可见 W6154S 与农垦 58S 在败育发生时期、花药组织的败育程度等方面都存在差异。

在光(敏)核不育水稻农垦 58S 花药的研究中,有人观察到其绒毡层在长日照下排列整齐不解体,在短日照下解体而消失<sup>[3]</sup>。也有人观察到其绒毡层增生和不解体现象<sup>[3,5]</sup>。张自国等<sup>[4]</sup>和孙俊等<sup>[10]</sup>则观察到不育株花药壁的中层细胞在花粉发育过程中没有及时被消化利用,绒毡层细胞消化较晚,到花药成熟时仍可见细胞形状,处于半消化状态。在这方面,本实验与他们的结果基本上是一致的。在农垦 58S 药壁退化解体的时间性问题上,王台等<sup>[1]</sup>观察到农垦 58S 的可育花药与败育花药绒毡层的内切向壁在减数分裂期就发生了解体,细胞开始彼此分离。田惠桥等<sup>[11]</sup>则报道了可育花药的绒毡层内切向壁在花粉单核中位期已消失,而到单核靠边期,这消失的细胞壁又重新合成。但不育花药绒毡层的内切向壁到单核靠边期仍未恢复成完整的细胞壁。本实验没有观察到类似现象。王台等<sup>[1]</sup>还观察到农垦 58S 的可育花药中层细胞在减数分裂时就开始解体,到单核晚期几乎全部解体。这与我们的结果存在较大差异。有趣的是对农垦 58S 花药维管组织的研究,田惠桥等<sup>[11]</sup>的结果与张自国等<sup>[4]</sup>和王台等<sup>[1]</sup>的结果也存在较大差异。因此,我们认为这正如光周期条件的变化可以诱导农垦 58S 产生典败、圆败和染败各种不育类型的花粉<sup>[3]</sup>一样,实验条件(可能包括光照长短、光质及温度高低等)的变化同样可以诱导可育或败育的花药壁在解体时间和方式等方面出现多种类型。

关于植物雄性不育的细胞化学研究, Joppa 等<sup>[12]</sup>对小麦花药的实验结果认为由于维管束组织的发育不良,减少了运入花药中的溶质,导致绒毡层中淀粉粒的形成减少。在水稻三系的研究中,已有不少关于不育系花丝或药隔维管束组织发育差而影响了物质运输的报道<sup>[13,14]</sup>。对农垦 58S 不育花药的研究也发现其药隔维管束发育比可育花药的差<sup>[1,11]</sup>。不过从本实验的结果看来,败育花药与可育花药中的物质分布和转化在小孢子从四分体分离以前是一致的,即能同样进行多糖物质的积累,而且与可育株相比,不育株花药绒毡层中多糖的含量并不少。因此,在四分体分离前,药隔中输导组织发育差异对育性的影响似乎未能表现出来。事实上,小孢子发育到单核晚期,细胞体积比刚从四分体分离出来时要增大数倍,而且由单核到二核到三核的分裂活动和大量营养物质的积累过程中,都需要源源不断的物质供应。中山大学生物系遗传组等<sup>[13]</sup>利用同位素对水稻三系雄性不育的几个类型的研究表明,物质代谢障碍主要发生在中花与老花阶段,即发生于小孢子从四分体分离之后。因此,我们认为药隔维管束组织发育不良对小孢子败育的影响应该主要发生于小孢子从四分体分离之后。

## 参考文献

- 1 王台, 童哲. 光周期敏感核不育水稻农垦 58S 不育花药的显微结构变化. 作物学报, 1992, 18(2):132-135
- 2 王台, 肖翊华, 刘文芳. 光敏核不育水稻不育花粉扫描电镜观察. 肖翊华主编. 光敏核不育水稻光周期及其生理学. 武汉: 武汉大学出版社, 1993, 241-243
- 3 朱英国, 杨代常. 光周期敏感核不育水稻研究与利用. 武汉: 武汉大学出版社, 1992, 97-102

- 4 张自国, 元朝生, 许传楨. 光照诱导光敏感核不育水稻育性转变的局限性及其在花药上的反应. 武汉大学学报, HPGMR 专刊, 1987, 81-86
- 5 利容千, 王建波, 汪向明. 光周期对光敏核不育水稻小孢子发生和花粉发育的超微结构的影响. 中国水稻科学, 1993, 7(2):65-70
- 6 梁承鄞, 梅建峰, 何炳森等. 光(温)敏核不育水稻小孢子败育发生主要时期的细胞学观察. 袁隆平主编. 两系法杂交水稻研究论文集. 北京: 农业出版社, 1992, 141-144
- 7 胡适宜, 徐丽云. 显示环氧树脂厚切片中多糖、蛋白质和脂类的细胞化学方法. 植物学报, 1990, 32(11):841-846
- 8 周一兵. 水稻成熟花药和花粉的结构和组织化学研究. 热带亚热带植物学报, 1993, 1(1):39-46
- 9 杨貌仙, 李坤季. 水稻雄性不育系花粉形成和发育的细胞形态学研究. 植物学报, 1984, 26(1):105-108
- 10 孙俊, 朱英国. 湖北光敏感核不育水稻发育过程中花粉及花药壁超微结构的研究. 作物学报, 1995, 21(3):364-367
- 11 田惠桥, 肖翊华, 刘文芳. 光敏核不育水稻农垦 58S 可育花药与不育花药的比较研究. 肖翊华主编. 光敏核不育水稻的光周期及其生理学. 武汉: 武汉大学出版社, 1993, 244-251
- 12 Joppa L R, McNeal F H, Welsh J R. Pollen and anther development in cytoplasmic male sterile wheat. Crop Science, 1966, 6:296-297
- 13 中山大学生物系遗传组, 同位素室, 广东省农作物杂种优势利用研究协作组. 作物“三系”生物学特征的研究 III. 几种水稻雄性不育类型的花粉形成与发育的细胞形态、代谢障碍和药隔维管束发育的比较研究. 遗传学报, 1976, 3(2):119-127
- 14 刘利华, 周天理. 水稻雄性不育系及其保持系雄蕊维管组织超微结构观察. 华南农业大学学报, 1992, 增刊:46-48

## 图版说明

### 图版 I

图 1-8 表示可育条件下花药及小孢子的发育。×610

1. 农垦 58S 小孢子母细胞时期, PAS 反应, 示多糖颗粒(楔形)的分布及不被 PAS 反应着色的绒毡层;
2. W6154S 小孢子母细胞时期, PAS 反应, 以负片更清楚地显示多糖(明亮部分)及花药壁的 4 层结构。注意小孢子母细胞中的亮点为蛋白质;
3. 农垦 58S 小孢子母细胞进行减数分裂前时期. 三重染色, 示较易被染成蓝色的绒毡层和小孢子母细胞中的少量脂质颗粒(箭头)及药壁中的多糖颗粒(楔形);
4. W6154S 二分体时期, PAS 反应, 示被染得较深的绒毡层和二分体. 二分体中可见少量脂滴(箭头);
5. 农垦 58S 四分体时期, PAS 反应, 以负片清楚地显示多糖(明亮部分)的分布;
6. W6154S 单核靠边期, PAS 反应, 绒毡层处于解体状态;
7. 农垦 58S 的成熟花粉, PAS 反应;
8. W6154S 的成熟花粉, 三重染色, 注意花粉中有脂质小体(箭头)。

### 图版 II

图 9-17 表示败育条件下花药及小孢子的发育。×610

9. 农垦 58S 小孢子母细胞时期, PAS 反应, 示小孢子母细胞的形状及多糖颗粒(楔形);
10. 农垦 58S 小孢子母细胞时期, PAS 反应, 小孢子母细胞附于绒毡层内壁. 注意药壁中存在多糖颗粒(楔形)而小孢子母细胞出现蛋白颗粒(箭头);

11. 农垦 58S 二分体时期, PAS 反应, 示二分体中的一个细胞胞质稀疏;
12. W6154S 单核中位期, PAS 反应, 示解体中的环状绒毡层及其中出现的许多小脂滴(箭头);
13. W6154S 单核靠边期, 三重染色, 示绒毡层近于完全消失, 中层也将完全解体, 败育的小孢子出现一些脂质小体(箭头);
14. 农垦 58S 小孢子已败育, PAS 反应, 注意解体中的绒毡层及完好的中层和药室内壁;
15. 农垦 58S 的败育花药, PAS 染色, 示少量绒毡层残存物(箭头)、部分未被消化的中层和尚较完整的药室内壁;
16. 农垦 58S 的败育花药, 三重染色, 示典败花粉及仍有完整细胞结构的中层和药室内壁;
17. W6154S 的败育花药, PAS 反应, 示典败花粉及解体较为彻底的花药壁。

## Explanation of plates

### Plate I

Fig. 1-8. Anther and microspore development under fertile condition.  $\times 610$

Fig. 1-3. Microsporocyte stage, showing the four layers of anther wall, the distribution of polysaccharide grains (wedges) and lipid bodies (arrows)

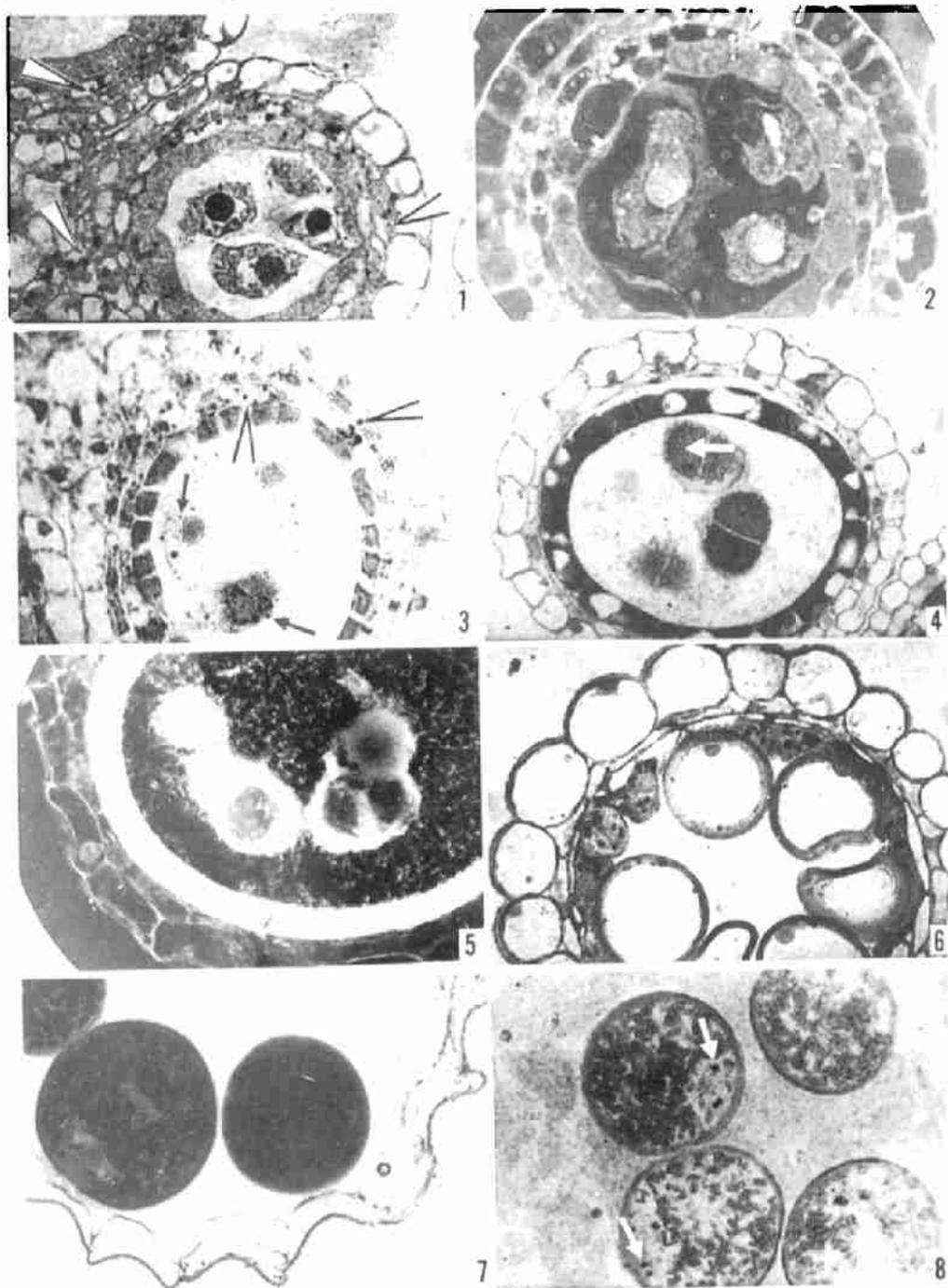
1. NK58S, PAS reaction;
2. W6154S, PAS reaction. Figure in negative. Note polysaccharide grains (bright spots) in anther wall and protein bodies (bright spots) in microsporocytes;
3. NK58S, triple staining. The tapetum was more easily stained with Coomassie Brilliant Blue;
4. Diad of W6154S, PAS reaction. Tapetum and diad were easily stained with Schiff reagent. Note some lipid drops (arrow) in the diad;
5. Tetrad stage of NK58S, PAS reaction. Figure in negative showing the active staining with Schiff reagent (bright portion);
6. Uninucleate microspore stage of W6154S, PAS reaction. Note the degeneration of the tapetum;
7. Mature pollen of NK58S, PAS reaction;
8. Mature pollen of W6154S, triple staining. Note few lipid bodies (arrows) in pollens.

### Plate II

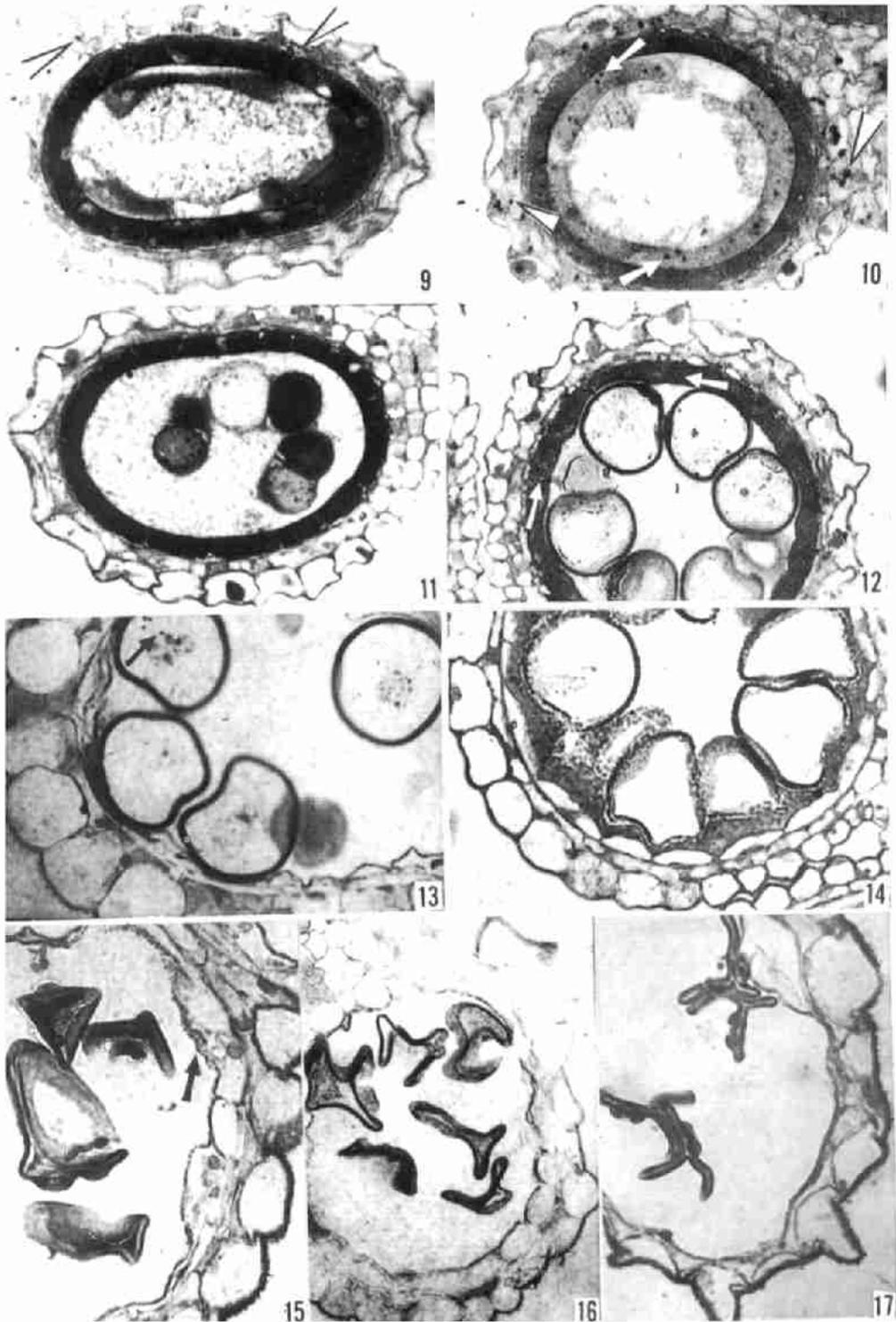
Fig. 9-17. Anther and microspore development under abortive condition.  $\times 610$

Fig. 9-10. Microsporocyte stage, showing the shape of microsporocyte, polysaccharide grains (wedges) and protein bodies (arrows).

9. NK58S, triple staining;
  10. NK58S, PAS reaction;
  11. Diad stage of NK58S, PAS reaction. Dark colour showing the active staining with Schiff reagent. Note one half of a diad being empty;
- Fig. 12-14. Uninucleate stage, showing the degeneration of anther wall;
12. W6154S, PAS reaction. Note lots of lipid drops in the tapetal ring;
  13. W6154S, triple staining. Note the complete degeneration of the tapetum, and some lipid bodies (arrows) in the abortive microspore;
  14. NK58S, PAS reaction. Note the disintegrating of the tapetum, and other three wall layers in good condition;
  15. Abortive anther of NK58S, PAS reaction. Note partially digested middle layer, and remaining trace of tapetum (arrow).
  16. Abortive anther of NK58S, triple staining. Note middle layer and endothecium in good shape;
  17. Abortive anther of W6154S, PAS reaction. Note endothecium and epidermis being dry and shrivelled.



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text