

水稻花药发育的细胞形态学精细分期^{*}

李 贵 节

(重庆教育学院 生物与化学工程系 , 重庆 400067)

摘要 本研究通过观察籼型杂交水稻“川优 9527”的花粉和药室壁的发育,对幼穗花药从雄蕊原基形成至花粉成熟的全过程进行了分期。选用不同发育时期的水稻幼穗(长度约 1.0 ~ 10.0 mm),以石蜡切片技术分别制作其花药装片,置于光学显微镜(Nikon DS-Ri1-U2)下观察并拍照。根据细胞及组织形态特征的显著变化,将花药的发育进程精细划分为:孢原细胞期、二层药室壁期、三层药室壁期、花粉母细胞形成期(以上 4 期对应小孢子母细胞形成期)、花粉母细胞减数分裂初期、花粉母细胞减数分裂中期、花粉母细胞二分体时期、花粉母细胞四分体时期(以上 4 期对应小孢子母细胞减数分裂期)、小孢子早期、小孢子中期、小孢子晚期、二胞花粉时期、成熟花粉时期等 13 个阶段。

关键词 水稻 ; 川优 9527 ; 花药 ; 发育分期 ; 花粉母细胞 ; 药室壁

中图分类号 : Q944.42

文献标识码 : A

文章编号 : 1672-6693(2011)03-0056-04

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,也是单子叶植物发育研究的模式植物^[1]。花的发育是显花植物生殖生长期最明显的特征,花药的形成过程则是植物的重要遗传特征之一。花药结构简单,易于离体操作,是研究细胞分化和器官发育较为理想的材料^[2]。花药发育是个复杂的过程,涉及到一系列相关基因的顺序表达以及相应的细胞进程,比如减数分裂、有丝分裂、花药壁的形成、绒毡层细胞的发育等等。丁颖等人曾将水稻的幼穗发育划分成 8 个时期^[3],该经典划分方法一直被广泛采用,为育种研究提供了极大的方便。“川优 9527”籼型杂交水稻作为一种适宜在重庆、云南、贵州等中低海拔籼稻区、四川平坝丘陵稻区和陕西南部稻区的稻瘟病轻发区种植的一季中稻,具有熟期适中、产量高、米质优等优点^[4]。本研究根据花药细胞的发生形态学观察结果,对“川优 9527”的花药发育进程进行较精细的阶段划分,旨在为该水稻品系的抽穗开花期田间管理以及雄性不育研究提供理论依据和参考辅助。

1 材料与方法

选用籼型三系杂交水稻“川优 9527”,从幼穗发育进入雌雄蕊原基形成期开始至开花为止进行取样,根据小穗长度选择处于不同发育期的小穗进行固定^[5]。FAA 固定液处理 16 h 后,以 50%、50%、

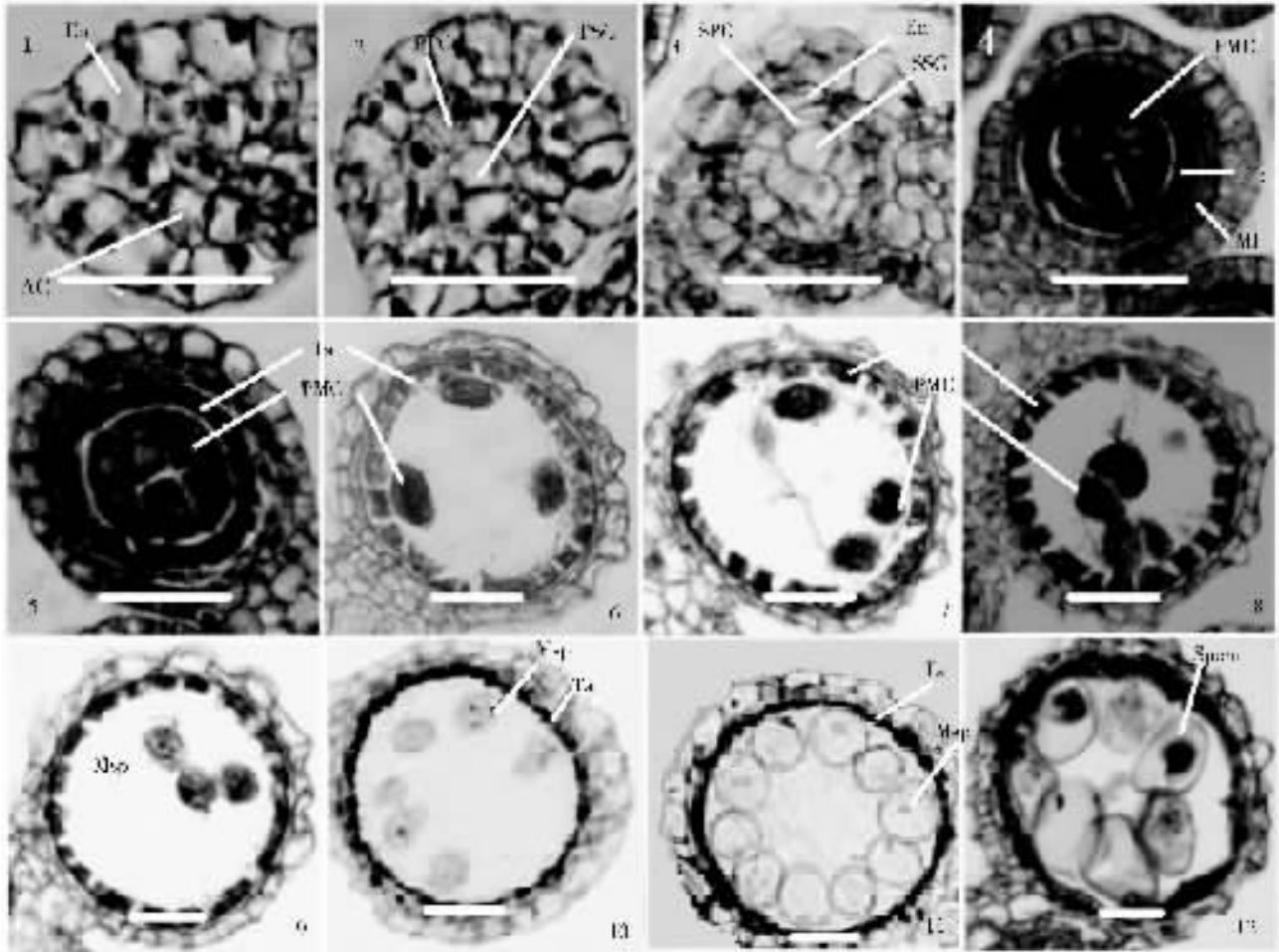
70%、80%、95%、100% 乙醇进行梯度脱水,每级 30 min。采用 1/4 二甲苯:3/4 乙醇、1/2 二甲苯:1/2 乙醇、3/4 二甲苯:1/4 乙醇(饱和番红)依次渗透,每级 30 min;90% 二甲苯:10% 氯仿连续 3 次,每次 60 min。浸蜡分为两个阶段:首先用 1/2 Paraplast Plus(Sigma):1/2 二甲苯/氯仿(90%:10%)处理 30 min;然后用 Paraplast Plus 处理过夜。用 Paraplast Regular(Sigma)包埋,放置 2 h。按 8 μ m 厚度切片,42 $^{\circ}$ C 展片 10 min 后,置 50 $^{\circ}$ C 恒温箱烤片 24 h 以上。脱蜡、染色、脱水各操作依次如下:100% 二甲苯处理两次,分别为 20、15 min;1/2 二甲苯:1/2 乙醇处理 5 min;100% 乙醇处理两次,各 2 min;95%、85%、70% 和 50% 乙醇处理各 1 次,均为 1 min;蒸馏水处理 1 min;甲苯胺蓝染色 3 ~ 5 h;70%、85%、95% 和 100% 乙醇处理各 1 次,均为 30 s;100% 乙醇处理 1 min;二甲苯处理两次,分别为 3、10 ~ 30 min。将标本封片后即在 Nikon DS-Ri1-U2 数码显微成像系统下观察及拍照。

2 结果与讨论

花药发育全程如图 1 所示。发育初期,表皮层(Epidermis, Ep)内包含一群薄壁组织细胞。横切观察时可见花药表层下的不规则细胞,内含浓厚的胞质和明显的核,此即孢原细胞(Archosporial cells, ACs)。孢原细胞径向分裂为内外两层,外层细胞称

为初级壁细胞(Primary parietal cells ,PPCs),内层细胞称为初级造孢细胞(Primary sporogenous cells ,PSCs)。初级壁细胞经两次平周分裂由外到内形成中间层(Middle layer ,MI)和绒毡层(Tapetum ,Ta),而初级造孢细胞经有丝分裂后形成次级造孢细胞(Secondary sporogenous cells ,SSCs)。次级造孢细胞经一次有丝分裂后发育为小孢子母细胞(Microsporo-cytes ,MSCs),亦称花粉母细胞(Pollen mother cells ,PMCs)。小孢子母细胞经减数分裂形成由胼胝质包裹的二分体和四分体 ,此时绒毡层细胞质浓

缩深染。胼胝质壁解体后 ,小孢子(Microspores ,Msp)彼此分开 ,绒毡层胞质退化 ,并逐渐变薄成带状。小孢子核经不对称有丝分裂形成一个大的营养细胞和一个小的生殖细胞 ,生殖细胞进行第二次分裂形成两个成熟的精细胞(Sperms) ,在萌发时进入花粉管顶部的孢子囊中 ,从而完成花粉发育的全过程。据此 ,将研究材料花药的发育按显微形态特征分为 13 个阶段 ,归纳在表 1 中 ,其中除发育最末期的成熟花粉期外 ,前 12 个阶段与图 1 的小图 1 ~ 12 一一对应。



注 Ep 表皮层 ,AC 孢原细胞 ,PPC 初级壁细胞 ,PSC 初级造孢细胞 ,SPC 次级壁细胞 ,En 药室内壁 ,SSC 次级造孢细胞 ,PMC 花粉母细胞 ,Ta 绒毡层 ,MI 中间层 ,Msp 小孢子 ,Sperm 精细胞 ,以上各小图均为单个药室横切片 ,底部短线示 30 μm 长度标尺

图 1 花药发育的细胞发生过程

幼穗的雌雄生殖系统分别为胚囊和花药。对于胚囊的发育 ,刘向东等人已作过系统的研究并进行了分期^[6]。对于花药及花粉的发育 ,前人虽有大量报道 ,但已有的报道往往缺乏系统全面性 ,出于不同的实验目的而着重对小孢子发育的特定阶段进行研究^[7-10]。McCormick 根据 Owen 和 Makaroff 对同是模式植物的拟南芥花粉超微结构的分析 ,对花粉发

育的过程进行了详细的描绘^[11]。Sanders 将拟南芥花药发育过程分为了 15 个时期 ,其中从第 5 到第 12 共 8 个时期是花粉母细胞发育到成熟花粉粒的过程^[12]。冯九焕^[13]等人曾采用类似的方法 ,将水稻花药发育分成 8 个时期 ,即小孢子母细胞形成期、小孢子母细胞减数分裂期、小孢子早期、小孢子中期、小孢子晚期、二胞花粉早期、二胞花粉晚期及成熟花

表 1 花药发育的细胞形态学分期及各期主要特征

| 期号 | 分期 | 英文名及缩写 | 主要特征 | 起止点 |
|----|-------------|--------------------------------|--|----------------------|
| 1 | 孢原细胞期 | Archeporial Cell stage , AC | AC 在 Ep 中致密排布 | AC 出现到第 1 次平周分裂开始 |
| 2 | 二层药室壁期 | Bi-parietal stage , BP | AC 经过一次平周分裂 形成 PSCs 和 PPCs ,PPCs 与 Ep 组成 2 层药室壁 | 形成 2 层药壁到第 2 次平周分裂开始 |
| 3 | 三层药室壁期 | Tri- parietal stage , TP | PPCs 平周分裂成 SPCs 与 En 与 Ep 组成 3 层药室壁 ,PSCs 分裂成为 SSCs | 形成 3 层药壁到第 3 次平周分裂开始 |
| 4 | 花粉母细胞形成期 | PMCs forming stage , PF | SSCs 分裂成 PMCs 呈多面体形 ,彼此相互紧贴。SSCs 分化成 Ta 和 MI 药室壁四层细胞分化完成 | 形成 4 层药壁到 PMCs 减数分裂前 |
| 5 | 花粉母细胞减数分裂初期 | Early PMCs meiosis stage , EPM | PMCs 被胼胝质隔开 ,各 PMC 逐渐向四周药室壁移动 ,Ta 胞质开始浓缩 | PMCs 开始减数分裂到呈椭圆球形 |
| 6 | 花粉母细胞减数分裂中期 | Mid PMCs meiosis stage , MPM | PMCs 呈椭圆球形 紧贴 Ta 分散生长 | PMCs 从椭圆形到形成二分体 |
| 7 | 花粉母细胞二分体时期 | PMCs dyad stage , PD | PMCs 被横隔成 2 个未分开的细胞 | 二分体形成到四分体形成前 |
| 8 | 花粉母细胞四分体时期 | PMCs Tetrad stage , PT | PMCs 再次有丝分裂形成 4 聚体 ,4 个细胞共平面 ,都与 Ta 接触生长 | 四分体形成到四聚体分散开 |
| 9 | 小孢子早期 | Early Msp stage , EM | Msp 逐渐分开 ,仍呈深染状态 ,无明显液泡及孢子壁 ,Ta 细胞开始退化 | 四分体相互分离至孢壁出现之前 |
| 10 | 小孢子中期 | Mid Msp stage , MM | Msp 进一步分散 染色程度降低 ,说明孢壁成分可能发生变化 ,Ta 继续退化 | 染色程度降低至孢子壁明显可见 |
| 11 | 小孢子晚期 | Late Msp stage , LM | Msp 体积增大 ,孢子壁加厚 ,胞质透明度增加 ,出现较明显的液泡 ,Ta 呈浓缩状 | 孢子壁明显可见至大液泡的形成 |
| 12 | 二胞花粉时期 | Bi-cellular pollen stage , BCP | Msp 体积进一步增大 ,分裂形成体积较大的营养细胞和体积较小的生殖细胞 ,萌发孔明显可见 ,Ta 进一步浓缩 | Msp 开始有丝分裂至形成两个细胞 |
| 13 | 成熟花粉时期 | Mature pollen stage , MP | 生殖细胞分裂形成 2 个精细胞 ,Ta 最终消失 | 二胞花粉未至成熟花粉粒形成 |

粉期等。该划分方式较完整的呈现了从小孢子母细胞或花粉母细胞到成熟花粉的发育过程 ,但花粉母细胞成熟前的较早期阶段并未得到体现 ,即从孢原细胞期到花粉母细胞形成之前。本研究观察到该阶段的主要特点为 :将要形成药室壁的前体细胞通过平周分裂分化为若干细胞层次。Ken-Ichi 等^[14]对该时期的发育研究显示 :花药原基横切面最初呈卵圆形 ,并且孢原细胞在 4 个角上分化出现 ;孢原细胞分裂形成 PSCs 和 PPCs ,PPCs 继续分裂和增大 ;而后 PPCs 开始平周分裂并持续一段时间 ,最后 ,大多数花药的次级壁细胞(Secondary parietal cells , SPCs)形成。这一结论基本与图 1 中小图 1 ~3 所示吻合。类似地“小孢子母细胞减数分裂期”的提法也较为笼统。依照小孢子的形态变化及其在药室内着生位置等特征 ,本研究将这一时期细化为“减数分裂初期、中期、二分体、四分体”共 4 个阶段。Wada 在对花粉母细胞到四分体的过程研究中 ,也提出过类似的划分

方式^[8]。

虽然水稻花药发育是一个连续不间断的过程 ,但为了便于研究该进程中的众多事件及其发生机制 ,人为对其进行不同阶段的划分是必要的 ;同时 ,对正常水稻花药发育阶段进行科学划分也是研究水稻雄性不育性的重要资料。水稻的育性是通过一系列复杂有序过程来调控的 ,要准确定位雄性不育突变发生的时间和空间 ,对野生型植株的花药发育作出精确地分期是必要的前提。因此本研究认为 ,在广泛应用分子生物学对发育调控基因进行探究的同时 ,细胞学、组织形态学等经典生物学方法仍发挥着重要的作用。

参考文献：

[1] Yu J ,Hu S N ,Wang J ,et al. A draft sequence of the rice genome(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. Science , 2002 , 296 : 79-92.

- [2] 卢庆善,孙毅,华泽田. 农作物杂种优势[M]. 北京:中国农业科技出版社,2002:240-269.
- [3] 丁颖,李乃铭,徐雪宾,等. 水稻幼穗发育和谷粒充实过程的观察[J]. 农业学报,1959,10(2):59-85.
- [4] 国家水稻数据中心. 川优 9527[DB/OL].[2011-03-20] <http://www.ricedata.cn/variety/varis/602135.htm>.
- [5] 张虹. 水稻雄性不育突变体 *osms7* 的形态观察和基因定位[D]. 上海:上海交通大学,2007:24-25.
- [6] 刘向东,徐雪宾,卢永根,等. 水稻胚囊形成过程与分期[J]. 中国水稻科学,1997,11(3):141-150.
- [7] Raghavan V. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa*) [J]. Amer J Bot,1988,75(2):183-196.
- [8] Wada T, Ogawa K, Ito T, et al. Light microscopic observations on pollen and anther development in rice (*Oryza sativa* L.) stages from pollen mother cells to tetrads[J]. Japan J Crop Sci,1990,59(4):769-777.
- [9] Wada T, Ito T, Ito M, et al. Light microscopic observations on pollen and anther in rice (*Oryza sativa* L.) stages from early microspore to mature pollen[J]. Japan J Crop Sci,1992,61(1):136-144.
- [10] 周一兵. 水稻成熟花药和花粉的结构和组织化学研究[J]. 热带亚热带植物学报,1993,1(1):39-46.
- [11] McCormick S. Control of male gametophyte development [J]. Plant Cell,2004,16(Suppl):142-153.
- [12] Sanders P M, Anhthu Q B, Weterings K. Anther developmental defects in arabidopsis thaliana male-sterile mutants [J]. Sex Plant Reprod,1999,11:297-322.
- [13] 冯九焕,卢永根,刘向东,等. 水稻花粉发育过程及其分期[J]. 中国水稻科学,2001,15(1):21-28.
- [14] Ken-Ichi N, Kazumaru M, Mitsugu E, et al. The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice[J]. The Plant Cell,2003,15:1728-1739.

Fine Division of Rice Anther Development by Cytological Morphology

LI Gui-jie

(Dept. of Biological and Chemical Engineering, Chongqing Education College, Chongqing 400067, China)

Abstract : A cytological and morphological study was conducted on the anther of a hybrid rice (*Oryza Sativa* L. indica) strain, *Chuan You 9527*. To study the growth procedures of pollen and anther wall, their development processes from stamen primordia initiation to pollen maturation were observed and divided into stages. Rice spikelets ranging from approx. 1.0 millimeter to approx. 10.0 millimeter were chosen; loading films of anthers were prepared by using the techniques of paraffin section, and they were observed and then photographed with digital camera system for optical microscopy (Nikon DS-Ri1-U2). The results showed that the whole development process of anther could be divided into thirteen fine stages, based on the significant alterations in the morphological characteristics of cells and tissues. The thirteen stages are archesporial cell stage, bi-parietal stage, tri-parietal stage, pollen mother cell forming stage (the above four stages together are known as microsporocyte forming stage), early pollen mother cell meiosis stage, mid pollen mother cell meiosis stage, pollen mother cell dyad stage, pollen mother cell tetrad stage (the above four stages are known collectively as microsporocyte meiosis stage), early microspore stage, mid microspore stage, late microspore stage, bi-cellular pollen stage, and mature pollen stage.

Key words : *Oryza Sativa* L. ; *Chuan You 9527* ; anther ; development stages ; pollen mother cell ; anther wall

(责任编辑 方 兴)