

## 来自密阳 46 的粳型新不育胞质 H236A 的 育性鉴定和花粉粒败育形态观察

向珣朝, 张晓华, 徐艳芳, 龙小林, 张艳丽  
(西南科技大学植物分子遗传育种实验室, 四川绵阳 621010)

**摘要:**在以密阳 46 为母本的杂交后代中发现不育材料 H236A, 通过杂交和自交, 确定其不育类型和不育度; 通过碘染和徕卡荧光显微镜 DM2500 对成熟花粉粒观察, 确定花粉粒育性、败育形态和时期。结果表明: H236A 是胞质雄性不育, 不育度达 99.8% 以上; 花粉粒属典型型的达 83.17%, 圆败型占 16.83%, 没有染败型花粉粒, 为单核期败育。花粉粒败育形态多种多样, 有不规则形、梭形、圆形等。清晰观察到晚期小孢子细胞质定向移动形成细胞质桥现象。本文还讨论了成熟花粉粒败育时期和败育形态的划分。

**关键词:**水稻 (*Oryza sativa* L.); 胞质雄性不育; 花粉粒; 密阳 46 胞质

### Identification of A New Sterile Cytoplasmic Fertility Line H236A from *Indica* Miyang 46

XIANG Xun-chao, ZHANG Xiao-hua, XU Yan-fang, LONG Xiao-lin, ZHANG Yan-li

(Laboratory of Plant Molecular Genetics and Breeding, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010)

**Abstract:** Diversity of cytoplasmic male sterility is key measure for solving grain quality, resistance and yield of three line hybrids. Sterile plants H236A were found in offspring from Miyang 46 as female parent. Its sterile type and abortion degree were determined by hybridization and selfing. Its pollen grain fertility, abortion shape, and abortion stage were studied by 1% I<sub>2</sub>-KI staining and observation of Leica fluorescence microscope DM 2500 on mature pollens. Results showed that H236A was cytoplasmic male sterility, which abortive degree was above 99.8%. Pollen grains belong to typical abortive was 83.17% and round abortive was 16.83%, no stained abortive pollen grains. Abortive stage of H236A was in single nuclear development period. Abortive shapes of pollen grains were in varied forms, such as irregular, round and spindle etc. Phenomenon that cytoplasm of late microspore moved directionally and formed cytoplasm bridge was observed clearly. Division of mature pollens abortive stage and shape were also discussed in this paper.

**Key words:** Rice (*Oryza sativa* L.); Cytoplasmic male sterility; Pollen grain; Cytoplasm of Miyang 46

高等植物雄性不育现象在自然界普遍存在, 其中细胞质雄性不育 (Cytoplasmic Male Sterility, CMS) 和光温敏核雄性不育 (Photoperiod and Thermo-sensitive Genic Male Sterile, PTGMS) 是对人类生产最具重要意义的两种类型。水稻不育特性的发现历史并不长, 日本东北大学 Katsuo 等<sup>[1]</sup>发现中国的红芒野

生稻能导致 Fujisaka NO. 5 产生雄性不育。Sasahara 等<sup>[2]</sup>以中国红芒野生稻为母本, Fujisaka NO. 5 为父本, 通过连续回交培育出具有中国红芒野生稻细胞质的 Fujisaka NO. 5 不育系。日本琉球大学 Shinjyo<sup>[3]</sup>以 Chinsurah Boro II 为母本与台中 65 杂交, 育成 BT 型不育胞质台中 65A。1964 年, 袁隆平从洞

收稿日期: 2011-04-25 修回日期: 2011-06-08

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (07ZA130); 转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08001-001); 西南科技大学实验技术重点项目 (09syjs-03)

作者简介: 向珣朝, 博士, 教授, 研究方向为植物遗传与分子育种。E-mail: antonxiang@126.com

庭早籼等籼稻品种中找到 6 株雄性不育株,并根据花粉败育情况分为无花粉型、败育型和退化型 3 种。但试验表明这些材料属于单基因控制的隐性核不育,找不到能完全保持其不育特性的品种,利用价值不大。20 世纪 70 年代,继李必湖发现野败型 CMS 后,先后育成了珍汕 97A、V20A 等一批野败型胞质不育系。先后筛选出 IR24 和泰引 1 号等一批强优恢复系,并选配出汕优 2 号、南优 2 号等系列强优势杂交稻组合。四川农业大学通过地理生态远缘杂交获得的用于培育冈 46A 等不育系的不育株,湖南杂交水稻研究中心获得用于培育印水型系列不育系的不育株,四川农科院水稻高粱研究所通过梗籼交获得用于培育 K 系列梗型胞质不育系的不育株。这些不育株均为核质互作型不育,比较容易找到保持系,是选育三系雄性不育系不育单株的主要来源,为我国乃至全世界粮食生产的持续发展发挥了重要作用<sup>[4,5]</sup>。不育胞质的发现和丰富是避免三系杂交稻胞质单一,解决品质、抗性和产量的主要措施,以避免美国 20 世纪 70 年代推广 T-CMS 玉米而造成的玉米小斑病大爆发。在杂交选育中,本研究发现了来自密阳 46 的不育材料,在查找相关发表文献时,未找到对败育花粉粒形态进行详细描述的论文,而败育花粉粒形态对准确鉴定不育材料为单核期、二核期还是三核期败育至关重要。因此,本文报到相关研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和测交

2009 年海南南繁时,从 a32 和特早熟中间材料 c219 杂交的 F<sub>3</sub> 中发现不育单株 5 株。a32 为蜀恢 955 (*Oryza sativa* ssp. *Indica*) × Kitaake (*Oryza sativa* ssp. *Japonica*) BC<sub>2</sub>F<sub>6</sub> 的花药培养株系,蜀恢 955 选自于韩国强恢复系密阳 46 和明恢 63 杂交的中间材料 6323 和梗稻天然杂交后代。因此,所发现不育材料的胞质源来自于密阳 46,该不育株被命名为 H236A。材料来源见图 1。将不育单株稻莠移植到四川绵阳正季种植,分蘖发生后,将分蘖各自分开,均按行穴距 2.67 cm × 1.67 cm 规格栽插。抽穗时,套袋自交 10 穗,观察育性状况。

### 1.2 形态与解剖学观察

开花前,将 H236A 的颖花结构在生物显微镜下进行观察,观察数量为 10 个。

### 1.3 不育类型鉴定

**1.3.1 雌性不育** 以 H236A 作母本,以正常的保

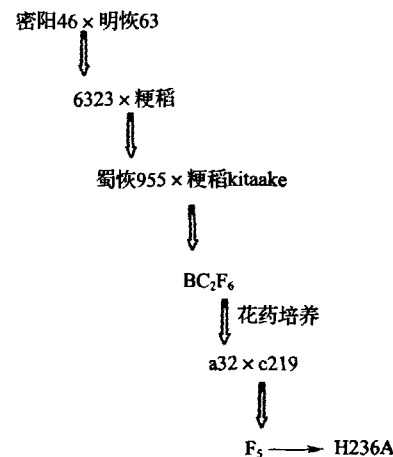


图 1 H236A 的来源

Fig. 1 Selective process of H236A

持系 G2480B、恢复系 3301R 作父本进行杂交授粉,分别人工杂交 3 袋,每袋 2 穗;作母本的圆锥花序仅保留中上部颖花,去除最先开花的顶端颖花和下部的弱势颖花,母本采用剪颖去雄的方法。25d 后收获考种,计算结实率。

**1.3.2 雄性不育** 以正常的保持系 G2480B、恢复系 3301R 作母本,以 H236A 作父本进行杂交授粉,分别人工杂交 3 袋,每袋 2 穗;作母本的圆锥花序仅保留中上部颖花,去除最先开花的顶端颖花和下部的弱势颖花,母本采用剪颖去雄的方法。25d 后收获考种,计算结实率。

### 1.4 花粉粒育性鉴定和花粉粒败育形态观察

由于凝固性固定剂和非凝固性固定剂均会造成小孢子收缩,影响败育形态鉴定的准确性,石蜡切片制作又费时多,手续麻烦,对以单细胞为观察目的的材料来说,臃像更难避免,因而用压片代替石蜡切片检查花粉发育进程更为适宜<sup>[6,7]</sup>。因此,选材时直接使用新鲜花药进行染色、压片观察,不再进行石蜡切片。鉴定花粉育性时从单株主穗或大分蘖穗的中上部枝梗中,选取当天要开放的颖花放在铺有湿滤纸的培养皿中,当日镜检。每株观察 5 朵颖花,共观察 5 株。采集的颖花,取出全部 6 枚花药置于洁净载玻片上一起压片,用 1% I<sub>2</sub>-KI 染色,在徕卡荧光显微镜 DM2500 下观察 5 个视野,并拍照记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 H236A 的形态特征及自交结实率

H236A 株高 59cm,较矮小,叶色较淡,穗有严重

包颈现象(图2-A)。通过对该小花的解剖观察发现,突变体内外稃、雌蕊正常,雄蕊虽为6枚花药,但花药细小,呈水浸状(图2-B、C)。雌蕊柱头外形正常,具有羽毛状柱头两个,子房一个(图2-D)。在生育后期,子房会有假膨大现象,没有其他内含

物,因此没有真正结实。

H236A套袋自交25d后,取回实验室考种,计数单穗空壳数、单穗实粒数,计算结实率。H236A总粒数达到244粒,属大穗类型,平均结实数为0,结实率也就为0。

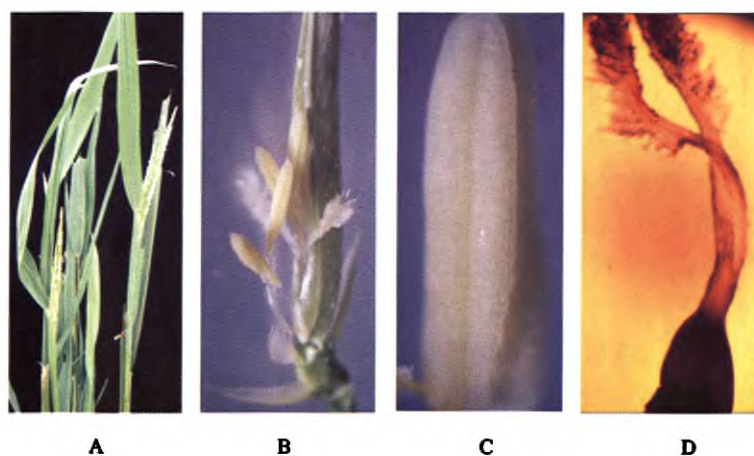


图2 H236A的形态及其颖花的解剖结构

Fig.2 Morphology of H236A and anatomical structure of glumous flower

A: 植株形态; B: 去掉外稃的颖花; C: 水浸状花药; D: H236A的正常雌蕊

A: plant morphology; B: glumous flower without coctonium; C: water-soaking anther; D: normal pistil of H236A

## 2.2 H236A杂交结实率观察

以H236A分别作为父本和母本与G2480B、3301R进行异交。当突变体作为雄性亲本时,结实率分别为0.13%、0.17%,表明H236A花粉绝大部分败育、极小部分可育;当突变体作为母本杂交时,结实率分别是19.04%、28.26%,表明H236A子房正常,可以正常接受花粉而受精。由于作母本杂交时选取仅抽出1/3的幼穗,去掉剑叶叶鞘和最先开花的顶端颖花以及下部的弱势颖花而当天进行套袋授粉,因此,大部分颖花还未发育成熟,授粉时并未开花,未完成授粉受精,导致异交结实率偏低。因此,H236A雌性器官正常,属于雄性不育植株。

## 2.3 H236A花粉粒育性观察

选取当天即将开花的颖花,经染色、压片后,在400倍显微镜下观察、统计花粉粒的染色反应,每个颖花计数3个视野,共计45个视野。H236A典型败型花粉粒占83.17%,圆败型花粉粒占16.83%,没有染败型花粉粒。

## 2.4 花粉粒败育形态观察

通过对从单株主穗或大分蘖穗的中上部枝梗中选取的当天要开放颖花的花粉粒染色观察,发现败育花粉粒形态多种多样。首先,对败育花药整体进行1% I<sub>2</sub>-KI染色,整个败育花药呈透明状,里边的花

粉粒清晰可见,多为不规则形,但左下部部分花粉粒染色较深(图3-A)。将一个颖花的6个雄蕊全部取出一一起压片、染色,花粉粒形态以不规则形最多,圆形次之(图3-B)。仔细观察各形态的花粉粒,在圆形花粉粒中有刚过四分体期的早期小孢子(图3-C),核位于中央,无液泡,小孢子壁很薄,隐约可见。在不规则形花粉粒中,有的处于第1次收缩期,小孢子外周边缘发生皱缩,皱缩很强烈时,呈放射状的多角形(图3-D),细胞强烈收缩后不久,细胞外周开始形成透明的花粉内壁,然后在内壁上出现外壁;外壁上出现一个萌发孔(图3-E,箭头)。在不规则形花粉粒中,有的处于第2次收缩期,整个花粉粒皱缩呈梭形或船形(图3-F、G)。处于第2次收缩期的单核小孢子以后逐渐恢复成圆形,并开始出现小液泡(图3-H)。然后,液泡增大,细胞核向萌发孔对侧移动(图3-I)。在圆形花粉粒中,当萌发孔的孔阜出现,花粉粒明显变圆,液泡变大但还未形成中央大液泡时,即为中期不育小孢子(图3-J)。当小孢子核移至萌发孔对侧后,细胞质定向移动形成细胞质桥现象(图3-K,箭头)。当中央大液泡形成,细胞质变成很薄的一层贴在花粉粒壁上,细胞核也被挤至花粉粒的一侧时,即为通常所说的单核靠边期(图3-L)。



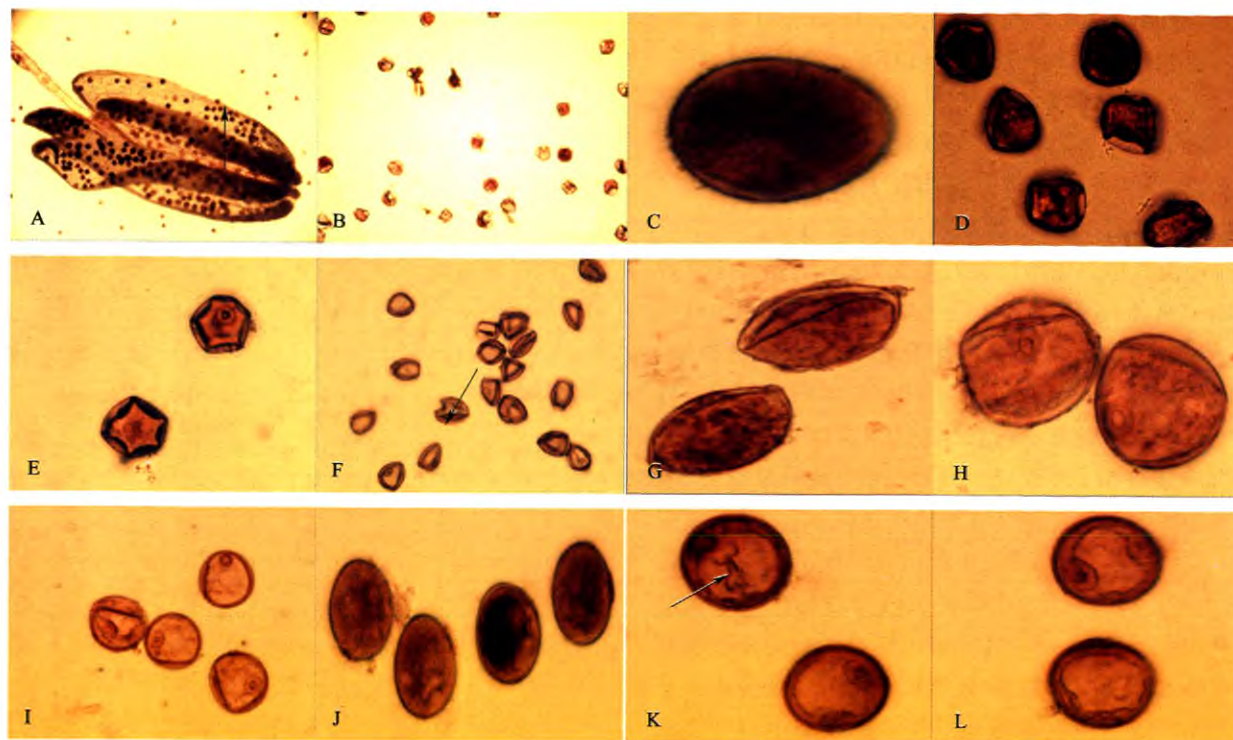


图3 H236A 败育花药和花粉粒形态

Fig. 3 Abortive anther and shape of abortive pollen grains

A: 败育花药( $\times 25$ ); B: 败育花粉粒( $\times 40$ ); C: 败育早期小孢子( $\times 400$ ); D、E: 第1次收缩期花粉粒( $\times 200$ ); F、G: 第2次收缩期花粉粒( $\times 100, \times 400$ ); H: 花粉粒逐渐恢复圆形, 开始出现小液泡( $\times 400$ ); I: 单核花粉粒, 细胞核向萌发孔对侧移动( $\times 200$ ); J: 中期小孢子(箭头示萌发孔,  $\times 400$ ); K: 晚期小孢子, 出现细胞质桥(箭头,  $\times 400$ ); L: 晚期小孢子, 为单核靠边期( $\times 400$ )

A: abortive anther( $\times 25$ ); B: abortive pollen grains( $\times 40$ ); C: abortive early microspore( $\times 400$ ); D、E: pollen grains on first contraction period( $\times 200$ ); F、G: pollen grains on second contraction period( $\times 100, \times 400$ ); H: gradual - changing - round pollen grains with small vacuoles( $\times 400$ ); I: mononuclear pollen, nucleus went astern direction of aperture moving( $\times 200$ ); J: middle microspores( $\times 400$ ); K: late microspore with cytoplasm bridge(arrow,  $\times 400$ ); L: late microspore on single - nuclear - side - step stage( $\times 400$ )

在对5株25朵颖花进行压片、染色观察时,所有视野的花粉粒均未染色。但是,对花药整体染色时观察到左下部部分花粉粒被染色,结合H236A作雄性亲本、G2480B、3301R作母本时其结实率分别为0.13%、0.17%的实际情况,H236A的不育度并未达到百分之百。从上述花粉粒败育形态来看,绝大多数败育花粉粒处于单核期,说明H236A的花粉粒败育时期较早,属于孢子体不育类型。

### 3 讨论

研究花粉粒败育一直使用1% I<sub>2</sub>-KI染色这种既直观又简便的方法,将结果分为典败、圆败和染败3种类型<sup>[8]</sup>,三者的区分在于:典败花粉皱缩,形态不规则,不染色,大小不一;圆败花粉圆形,很少或没有内含物,不染色,大小不一;染败花粉圆形,染色浅,大小不一。徐树华为了区分败育花粉粒中所含淀粉

粒的多寡,将染败类型进一步划分为深染、浅染两种亚类型。如果按花粉的发育过程划分,可分为单胞期、二胞期和三胞期败育三种类型。如果从花粉发育控制途径分,有孢子体不育和配子体不育两种类型<sup>[12]</sup>。由于花粉粒发育在单核期存在第1次收缩期和第2次收缩期<sup>[9-10]</sup>,因此,单核期小孢子形态就有不规则形和圆形。实际上,圆败花粉粒的败育时期既包括单核期败育<sup>[11]</sup>,也包括二核期败育;染败花粉粒既包括二核期败育,也包括三核期败育;只有典败花粉粒全是单核期这一个时期败育的。成熟花粉粒的碘染结果分类和花粉粒发育分类没有一一对应关系。以前的研究中,将圆败均划分为配子体不育类型,值得商榷,如果是单核期圆败,也应该是孢子体不育类型。从应用和实践角度,成熟花粉粒的碘染结果分类是很好的,一直受到广大育种工作者的普遍欢迎。但是,从研究角度,更应该按花粉粒的

发育时期分类,以体现研究结果的准确和可靠。

成熟花粉粒败育时期和败育形态的详细描述不多。根据冯九焕等<sup>[13]</sup>对正常花粉粒发育的研究结果,水稻花粉粒发育过程可以分为8个时期;对不育株来说,这8个时期都有可能发生败育。朱英国<sup>[10]</sup>通过花粉粒形态结构的显微观察,按照花粉粒的败育时期及其形态结构特征的变化,在总结前人研究的基础上将水稻花粉粒败育途径分为无花粉型、典败型、圆败型、染败型和核增生花粉败育型5种类型。虽然各败育类型有对应的败育时期,如圆败型对应的是二核花粉期败育,但是该划分方法也不是很准确,其实质还是根据成熟花粉粒的碘染结果进行分类。因为圆败型花粉粒亦有可能是单核期败育,花粉粒在第1次收缩期后就变圆;第2次收缩期后至单核靠边期,小孢子均为圆形;如果将圆败型花粉粒均归为二核期败育,值得商榷。如果将圆败型细分为单核期圆败型和二核期圆败型,染败型细分为二核期染败型和三核期染败型则更准确。二核期染败型也等同于徐树华描述的浅染型,三核期染败型等同于其深染型。

来自于密阳46的籼型新不育胞质H236A已经被证明为孢子体败育,花粉粒败育发生在单核期;为了提高结果的可靠性,还将继续进行不同年度间的重复试验。该不育胞质与其他不育系相比,质源来自于强恢复系密阳46,其转育的不育系与恢复系质源相近或相同,将具有细胞质效应较小、可恢复性好的特点,所配组合将有较高的结实率和单株产量。王才林等<sup>[15]</sup>利用同核异质广亲和不育系真系秋光A,研究3种不育细胞质野败型(WA)、红莲型(HL)和BT型对杂交稻16个性状的遗传效应后认为,不育细胞质遗传效应的大小与细胞质的可恢复性有关,BT型细胞质的可恢复性较好,细胞质效应较小,WA型细胞质最难恢复,细胞质效应最大。不育系细胞质对F<sub>1</sub>的株高、每穗实粒数、结实率和单株产量等性状上有明显的负效应<sup>[14]</sup>,不育系细胞质的这种遗传效应随细胞质来源的不同表现明显的差异,D型和BT型细胞质在多数性状上的表现优于WA型和

WC型细胞质<sup>[15]</sup>。在不育系选育及改良某一特定异交性状时,质源的筛选仍然是有效的。要将H236A不育胞质转育成新不育系,则必须用多个保持系转育,以保证转育成的新不育系仍为孢子体不育系。因为孢子体不育系的形成,不决定于母本不育株的细胞质,而是决定于作父本核置换的细胞核。戚秀芳等<sup>[16]</sup>在转育孢子体不育株Basmati 370-1成不育系时,所得的不育系TRB370A为配子体不育型。

#### 参考文献

- [1] Katsuo K, Mizushima U. Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties (*Oryza sativa* L.) I. On the fertility of hybrids obtained reciprocally between cultivated and wild varieties [J]. *Jpn J Breed*, 1958, 8: 1-5
- [2] Sasabara T, Katsuo K. Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties (*Oryza sativa* L.) III. On the abortive pollen of Fujisaka NO. 5-type plants with cytoplasm of Chinese wild variety *O. sativa* L. spontanea [J]. *Jpn J Breed*, 1965, 15(3): 291-296
- [3] Shinjyo C. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) II. The inheritance of male sterility [J]. *Jpn J Genet*, 1969, 44: 149-156
- [4] 周坤炉. 籼型杂交水稻三系不育系选育[J]. *杂交水稻*, 1994 (S1): 22-26
- [5] 袁隆平. 杂交水稻学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 38-85
- [6] 徐雪宾, Vergara B S, Visperas R M, 等. 对水稻“小孢子收缩期”的进一步观察[J]. *华南农业大学学报*, 1987, 8(1): 19-24
- [7] 佐竹彻夫. 对花粉发育时期的划分及其术语的修订. 见冷害与水稻[M]. 北京: 农业出版社, 1979: 85-88
- [8] 张建奎, 董静, 宗学风, 等. 温光敏核雄性不育小麦雄性败育的细胞学观察[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(3): 411-418
- [9] 万邦惠. 对水稻质核雄性不育分类的初步意见[J]. *广西农业科学*, 1979(7): 4-5
- [10] 朱英国. 水稻雄性不育生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 153-187
- [11] 潘坤清. 水稻野败型雄性不育系花粉败育的解剖学和细胞学观察[J]. *遗传学报*, 1979, 6(2): 211-217
- [12] 张水金, 赵明富, 涂诗航, 等. 水稻SE21S育性败育期的植株性状和小孢子发育关系研究[J]. *福建农业学报*, 2010, 25(5): 558-562
- [13] 冯九焕, 卢水根. 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] 占小登, 曹立勇, 翟虎渠, 等. 水稻同核异质广亲和不育系的选育及主要农艺性状分析[J]. *作物学报*, 2003, 29(2): 241-244
- [15] 王才林, 汤述豪, 汤玉庚. 杂交粳稻同核异质不育系细胞质效应的研究[J]. *中国水稻科学*, 1998, 12(2): 65-71
- [16] 戚秀芳, 赵成章, 杨长登, 等. 水稻TRB型胞质雄性不育系的产生和特性[J]. *中国水稻科学*, 1997, 11(1): 11-15

### 欢迎订阅 2012 年《特种经济动植物》

《特种经济动植物》(原名《国外特种经济动植物》)是由中华人民共和国农业部主管、中国农业科学院特产研究所主办的全国唯一的特种经济动植物专业性国家级科技类期刊,为中国农业核心期刊。

月刊,定价4.00元,全年48.00元(含邮费)。邮发代号12-183,全国各地邮局(所)均可订阅。

地址:(132109)吉林省吉林市左家镇鹿鸣大街15号 中国农业科学院特产研究所《特种经济动植物》编辑部

电话:0432-66512069; E-mail: tzjdz@126.com

# 来自密阳46的籼型新不育胞质H236A的育性鉴定和花粉粒败育形态观察

作者: 向珣朝, 张晓华, 徐艳芳, 龙小林, 张艳丽, XIANG Xun-chao, ZHANG Xiao-hua, XU Yan-fang, LONG Xiao-lin, ZHANG Yan-li  
作者单位: 西南科技大学植物分子遗传育种实验室, 四川绵阳, 621010  
刊名: 植物遗传资源学报 ISTIC PKU  
英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources  
年, 卷(期): 2011, 12(6)

## 参考文献(16条)

1. 张建奎;董静;宗学风 温光敏核雄性不育小麦雄性败育的细胞学观察[期刊论文]-植物遗传资源学报 2009(03)
2. 佐竹彻夫 对花粉发育时期的划分及其术语的修订. 见冷害与水稻 1979
3. 徐雪宾;Vergara B S;Visperas R M 对水稻“小孢子收缩期”的进一步观察 1987(01)
4. 周坤炉 籼型杂交水稻三系不育系选育 1994(z1)
5. Shinjyo C Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) II. The inheritance of male sterility 1969
6. Sasabara T;Katuso K Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties(*Oryza sativa* L.) III. On the abortive pollen of Fujisaka NO.5-type plants with cytoplasm of Chinese wild variety *O. sativa* L. *spontanea* 1965(03)
7. Katsuo K;Mizushima U Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties (*Oryza sativa* L.) I. On the fertility of hybrids obtained reciprocally between cultivated and wild varieties 1958
8. 戚秀芳;赵成章;汤长登 水稻TRB型胞质雄性不育系的产生和特性[期刊论文]-中国水稻科学 1997(01)
9. 王才林;汤述鑫;汤玉庚 杂交粳稻同核异质不育系细胞质效应的研究[期刊论文]-中国水稻科学 1998(02)
10. 占小登;曹立勇;翟虎渠 水稻同核异质广亲和不育系的选育及主要农艺性状分析[期刊论文]-作物学报 2003(02)
11. 冯九焕;卢永根 水稻花粉发育过程及其分期[期刊论文]-中国水稻科学 2001(01)
12. 张水金;赵明富;涂诗航 水稻SE21S育性败育期的植株性状和小孢子发育关系研究[期刊论文]-福建农业学报 2010(05)
13. 潘坤清 水稻野败型雄性不育系花粉败育的解剖学和细胞学观察[期刊论文]-遗传学报 1979(02)
14. 万邦惠 对水稻质核雄性不育分类的初步意见 1979(07)
15. 袁隆平 杂交水稻学 2002
16. 朱英国 水稻雄性不育生物学 2000

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201106029.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201106029.aspx)