

对水稻“小孢子收缩期”的进一步观察

徐雪宾

B. S. Vergara, R. M. Visperas

韩惠珍

(农学系)

(国际水稻研究所植物生理系)

(农业生物系)

提 要

以水稻 (*Oryza sativa* L.) 新鲜花药蒸馏水或醋酸洋红压片, 和用Carnoy氏液等固定的同一小花的不同花药的醋酸洋红压片, 观察花粉形成过程, 比较不同处理四分体及小孢子的形态, 进一步证实所谓第一收缩期、第二收缩期均不是小孢子发育过程的自然形态与正常的发育时期。

关键词: 水稻, 小孢子收缩期, 细胞学。

前 言

对稻穗发育后一段生育进程的描述, 农业科学家通常采用花粉发育的进程为代表^[1] [2][3][4][5][6][7][8][9][10][11]。木原^[7] (1942)报道了第一收缩期和第二收缩期(图1)。尽管他曾怀疑第一、二收缩期可能是由于使用固定的花药, 认为进一步的研究应采用新鲜材料。但由于他绘制的花粉发育过程图, 清楚地描述了第一、二收缩期的形态, 因而以第一、二收缩期来说明水稻花粉发育过程, 多年来已被广泛应用^{[2][4][5][6][8][9][10][11]}。Satake^[16] (1974), 认为小孢子收缩的形象是固定剂引起的赝像 (Artifacts), 他用甲醛醋酸乙醇液 (FAA)、Carnoy氏液和戊二醛分别固定花药 (均固定24小时, 在最后一种方法固定前还切破花药, 固定期间进行抽气), 制成石蜡切片, 比较小孢子的形态。他认为FAA和Carnoy氏液均引起小孢子收缩, 而戊二醛则不会。这个结论与其所拍照片相矛盾, 照片显示戊二醛固定的花药所制的石蜡片中, 小孢子依然收缩(图版I)。

作者在教学和研究中, 经常用未经固定的新鲜水稻花药压片, 观察水稻花粉的发育过程, 所得到的小孢子的形象, 既不同于木原的图, 亦不同于Satake的照片。为了弄清水稻小孢子形成过程的准确形象, 特进行本试验, 对“小孢子收缩期”进一步观察。

材 料 与 方 法

品种IR36, 植株取自国际水稻研究所的“水稻园”, 选取叶枕距(剑叶叶枕与其前一叶叶枕之间的距离, 其值为0时, 即二者的高度平齐; 其值为正值时, 即剑叶叶枕已超出其前一叶叶枕的遮盖而露出, 从外可窥见) 0~0.5公分的主茎或分蘖茎, 从中剥取幼

1986年3月1日收稿

穗,再选取处于四分体至花粉成熟生育期的一系列小穗,取下每个小穗后,立即将同一小穗(小花)的六个花药分别进行四种处理:

1. 新鲜花药无菌蒸馏水压片,相差及普通显微镜下观察; 2. 新鲜花药醋酸洋红染色压片,相差及普通显微镜下观察; 3. Carnoy氏固定液(冰醋酸与无水乙醇的比例为1:8)固定花药(24小时或1小时,经95%乙醇逐级下降至70%乙醇或直接到70%乙醇中)醋酸洋红染色压片,普通显微镜下观察; 4. 戊二醛固定花药(浓度为8%或4%,用Polysciences Inc. USA. 电泳级的8%戊二醛,以0.025M的pH为6.8的磷酸缓冲液稀释而成,固定1小时,磷酸缓冲液冲洗2次,每次20分钟,保存于磷酸缓冲液中)⁽¹⁴⁾醋酸洋红染色压片,普通显微镜下观察。

本试验重复次数较多,利用“水稻园”随时均能取到生育时期适合的植株,1983年进行观察,得出初步结果,1984年再观察验证结论,并拍照,观察的压片数在500片以上,小花数在100朵以上。

试验结果

(一) 处理1及2表明,在水稻小孢子形成的过程中,不存在收缩期(图版II A—D)。新鲜花药蒸馏水压片后立即观察,小孢子没有收缩;新鲜花药醋酸洋红压片,小孢子亦没有收缩,仅偶见有少数孢子有轻微的质壁分离。从四分体到成熟花粉,小孢子体积从小到大,形状从扇形(平面观)到球状,细胞壁逐渐加厚,随着细胞壁加厚,萌发孔变得较易于见到,但并不突出,随着细胞壁的加厚,萌发孔逐渐外突。随着小孢子体积增大,液泡数减少而其体积增大,直至单核后期,中央大液泡形成。以后随贮藏营养物质的积累,中央液泡消失。当花粉内容物充实时,花粉粒不再透明。此时若仅以醋酸洋红染色,看不见花粉的营养核与生殖核。

(二) 处理3及4与来自同小花的花药处理1、2比较,可以见到因Carnoy氏液和戊二醛引起的小孢子的各种不同形状的收缩(图版II A'—D', A''—D'')。但四分体时期,Carnoy氏液引起的收缩似轻于戊二醛所引起的(图版II A'与A''),而小孢子时期,戊二醛引起的收缩,似轻于Carnoy氏液所引起的(图版II B'、C'、D'与B'、C'及D'')。

(三) Carnoy氏液固定花药,固定时间方面,不论24小时或1小时,不论固定后是否按不同浓度的乙醇系列顺序,降至70%乙醇中,再用醋酸洋红染色压片,小孢子均出现收缩,但收缩情况无大区别。

(四) 3%或4%戊二醛固定花药,在约24℃的室温中,固定1小时或24小时,花药

• 制片后若放置时间过长才镜检,死亡的四分体及幼小孢子不再保持细胞的形状,仅见一团圆不规则的原生质体与破碎的细胞壁,二者难以区分;在蒸馏水中,细胞存活时间虽比在磷酸缓冲液中长,为了获得这些细胞的真实形象,迅速制片及镜检是必要的。

入固定液前经切割及在固定期间进行抽气或省去此二项手续，效果均无大区别。

结 论 和 讨 论

(一) 沿用四十多年的水稻花粉发育的“小孢子收缩期”（第一收缩期和第二收缩期）不是小孢子的自然形态和正常发育时期。过去用凝固性固定剂^[10]，如Navaschin氏液、FAA、Carnoy氏液等固定，然后用石蜡切片，得出第一、二收缩期的结论，并非真像。即使用非凝固性固定剂^[10]，如戊二醛固定，但在石蜡切片过程中，免不了大量接触乙醇等凝固性化学药物，因而Satake的切片中，小孢子产生收缩是必然的，不能抹煞的事实。本实验用非凝固性固定剂，用压片代石蜡切片，虽进一步避免接触凝固性药品，但看来由于小孢子是薄壁的单细胞，随着细胞壁和胼胝质的厚度、液泡的数目及其大小等，在其成长过程中，不断变化，一律用3%或4%戊二醛固定花药，小孢子产生收缩，仍不能完全避免。从处理3和4的同龄花药，在处理1和2中，小孢子不收缩，可以认为历来所称的第一、二收缩期，不是小孢子在自然状态下的真实形态和正常发育时期。

(二) 各种压片法的优缺点及应用上的选择。新鲜花药蒸馏水压片，在制片后立即镜检，在相差显微镜及普通显微镜下，小孢子的形状清楚，但细胞器不清楚。新鲜花药醋酸洋红染色压片，细胞壁、细胞形状与细胞核，在普通显微镜下，较用蒸馏水压片者，易于观察。Carnoy氏液固定者，存在小孢子收缩的臆像，但此法可保存花药，且染色体的行为在普通显微镜下，可清楚看到，以准确识别减数分裂期，故此法仍不失其使用价值。戊二醛固定花药，醋酸洋红染色压片，在普通显微镜下，四分体及小孢子收缩的臆像存在，细胞核可见，液泡则较之以上各片更为清楚。

石蜡切片制作费时多，手续麻烦，对以单细胞为观察目的的材料来说，臆像更难避免，因而用压片代替石蜡切片，来检查花粉发育进程，更为适宜。

(三) 对大麦、小麦等谷类作物小孢子形成过程存在收缩期的报道^{[12][17]}，同样值得进一步检验。

引 用 文 献

- [1] 丁颖、李乃铭、徐雪宾、陈沛钦、何崇钧：水稻幼穗发育和谷粒充实过程的观察，《农业学报》，10（2）1959：59—85。
- [2] 刘天伦：水稻花粉母细胞减数分裂的时期，《中国农业科学》（1）1981：38—42。
- [3] 吴一民：双季后作稻幼穗发育观察初报，《植物学报》，17（3）1975：204—212。
- [4] 何国藩、张志宇、林月婵：水稻（*Oryza sativa* L.）雄蕊发育的亚显微结构研究——花药绒毡层孢粉体的起源和发育，《中山大学学报》（自然科学版），（3）1983：75—82。
- [5] 林明华：水稻叶龄指数与幼穗发育及分蘖之关系，《台湾农业研究》，23（3）1974：176—187。
- [6] 凌启鸿、蔡建中、苏祖芳：叶龄余数在稻穗分化进程鉴定中的应用价值，《中国农业科学》，（4）1980：1—11。
- [7] 木原均、平吉功：稻花粉粒の发达，《农业及园艺》，17（6）1942：685—690。

- [8] 松岛省三、真中多喜夫: 水稻幼穗の发育经过とその诊断, 14—15, 农业技术协会, 东京, 1957.
- [9] 星川清亲: イネの生长 (中译本《稻的生长》, 上海科技出版社, 1980) 226—227. 农山渔村文化协会, 日本, 1979.
- [10] Baker, J. R. 1958 *Principles of Biological Microtechnique*. Methuen & Co. Ltd. London. 间接引用
- [11] Chaowanayothin, W., S. Kantararom, S. Isaranurug, K. Jakwichien and Y. Yjng-giwat. 1973. Differentiation process of rice panicles. Dep. Agric. Hortic. Div. Agron. Div. Res. Div. Rep. pp. 744—765.
- [12] Kihara, H. 1937. Genomanalyse bei Triticum und Aegilops. VII. Kurze Ubersicht uber die Ergebnisse der Jahre 1934—36. Mem. Coll. Agr. Kyoto Imperial Univ. 41P. 间接引用
- [13] Nagai, I. 1959. *Japonica Rice its Breeding and Culture*. Yokendo Ltd. Tokyo, p. 202.
- [14] O'Brien, T. P., J. Kuo, M. E. McCully, and S. Y. Zee. 1973. Coagulant and non-coagulant fixation of plant cells. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 1231—1250.
- [15] Sakai, K. 1949. Cyto-histological and thremmatological studies on sterility of rice in northern parts of Japan, with special reference to abnormal hypertrophy of tapetal cells due to low temperatures. *Rep. Hokkaido Natl Agr. Expt. Sata.*, 43, 1—46.
- [16] Satake, T. 1974. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. IX. Revision of the classification and terminology of pollen development stages. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan*, 43: 31—35.
- [17] Takagi, F. 1936. Development of pollen grains in rye. *Japanese J. Genetics*, 12, 69. 间接引用

FURTHER OBSERVATIONS ON THE “CONTRACTION STAGE
OF MICROSPORE” IN RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

Xu Xue-Bin B.S.Vergara,R.M.Visperas Han Huizhen

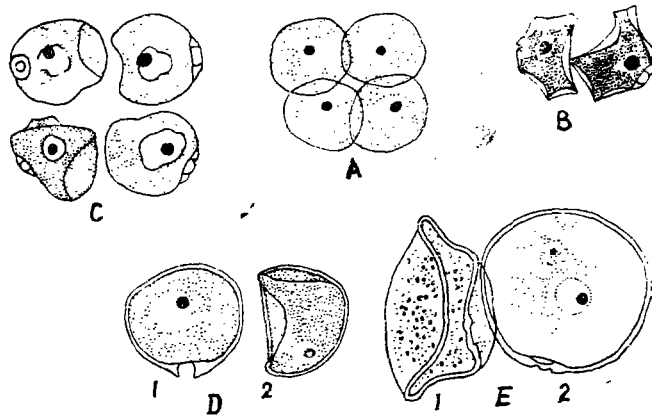
(Department of Agronomy) (Plant Physiology Department IRRI) (Department of Biology)

ABSTRACT

In a study of the rice microspore, anthers from the same spikelet were used in the following methods of preparing anther squash slides: 1) fresh anther squash slides were prepared using distilled water, 2) fresh anther squash slides were prepared using aceto-carmine, 3) anthers were fixed in Carnoy's fluid for 24 hours and transferred to 70% ethyl alcohol for 15 minutes before being stained with aceto-carmine, and 4) anthers were fixed in 3% glutaraldehyde for 1 hour and rinsed twice with phosphate buffer before being stained with aceto-carmine.

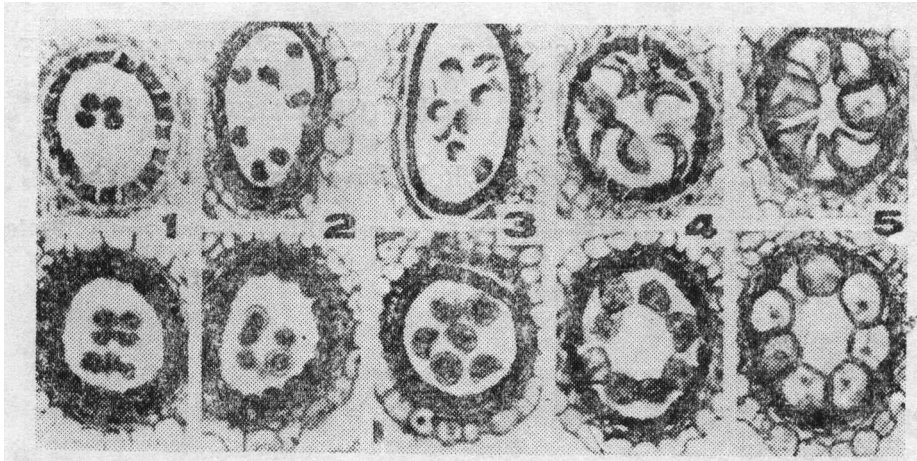
The experiment showed that contraction is not a normal feature of the microspore in its formative process but rather an effect of the fixatives on the young microspores. Hence, contraction could not be designated as part of the developmental stage of the microspore, as reported in the literatures. Carnoy's fluid caused less contraction at tetrad stage while glutaraldehyde showed less contraction at young microspore stage. No contracted microspores were observed in Treatment 1 when the squash slides were examined immediately. Plasmolysis occasionally appeared in some microspores in Treatment 2.

Key words, Rice, contraction stage of microspore, Cytology.



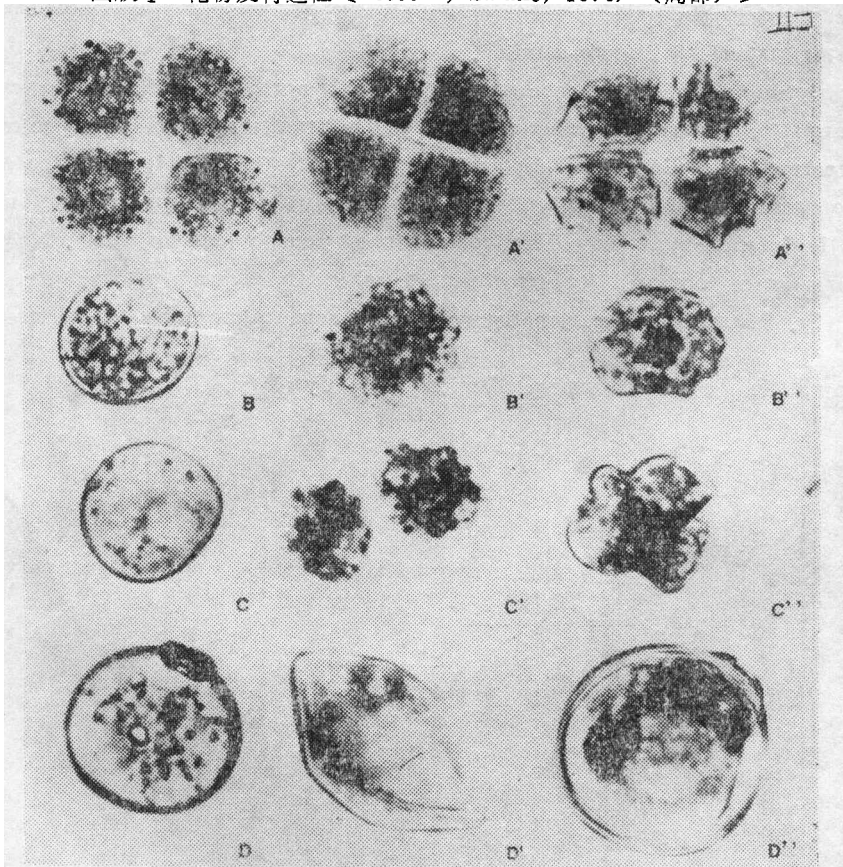
A. 发育程度稍高的花粉粒四分体；B. 第一收缩期；C. 第一收缩期后，恢复原来球状，其中一个仍处于收缩过程中；D. 进入第二收缩期之前1，第二收缩期2；E. 第二收缩期末1，恢复原来球状的花粉粒2。

图1 水稻花粉粒的发育过程〔(100×, 木原均、平吉功, 1942) (局部)〕



1. 四分体; 2. 第一收缩期; 3. 第一恢复期; 4、5. 第二收缩期; (上行是Carnoy氏液固定花药所得图像, 下行是戊二醛固定花药所得图像)

图版 I 花粉发育过程 [(300×, Satake, 1974) (局部)]



A—D 新鲜花药蒸馏水 (B、C、D) 或醋酸洋红 (A) 压片; A'—D' Carnoy氏液固定花药, [1小时 (A'、B'、C'), 24小时 (D')] ; A''—D'' 3% 戊二醛固定花药 [1小时 (A''、B''、C''), 24小时 (D'')] 。A、B及C、D分别为内稃长5.5mm与6.4mm的4个小花。

图版 II 同一小花各花药不同处理下小孢子的形态比较 (目镜6.7×, 物镜40×)