

K型小麦雄性不育系诱导单倍体胚 的胚胎学观察*

孙善英¹ 杨天章² 刘晚苟¹

(1 西北农业大学基础部, 2 西北农业大学农学系, 陕西杨陵·712100)

摘 要 从胚胎学方面研究了粘果山羊草细胞质的小麦雄性不育系 K83(21)35A 与保持系 83(21)35B 杂交的双受精过程, 胚和胚乳的发育特点, 以及单倍体胚和李生胚发生的规律。结果表明: 双受精过程、胚和胚乳的发育与普通小麦自交相似。n 型单倍体胚来自助细胞的孤雌生殖; n-n 型双胚来自助细胞和卵细胞的孤雌生殖; 2n-n 型双胚中的单倍体胚来自助细胞, 二倍体胚来自受精卵。适当延迟授粉, 能提高单倍体发生的频率。

关键词 异质小麦雄性不育系, 粘果山羊草, 孤雌生殖, 单倍体, 李生胚, 延迟授粉

中图分类号 S512.103.52

植物雄性不育和杂种优势的研究及其应用, 已创造了巨大效益。但至今小麦雄性不育系却未能较大面积地应用于生产, 其主要原因是没有较好地实现三系配套。1988 年杨天章等培育出了具有粘果山羊草 (*Aegilops kotschy*) 细胞质的 1B/1R 易位小麦雄性不育系⁽¹⁾, 并初步实现了三系配套。但 K 型小麦不育系中很多品系与保持系或恢复系杂交均产生较高频率的单倍体, 降低了小麦杂种优势, 成为利用小麦杂种优势的重要障碍^(2~4)。

目前国内外对 K 型小麦不育系诱导单倍体的遗传学机理研究报道较多^(4~7), 而有关单倍体产生的胚胎学研究报道较少。本文试图从胚胎学角度初步阐明 K 型小麦不育系诱导单倍体的规律, 为抑制或促进单倍体的产生提供理论依据。

1 材料和方法

材料取自西北农业大学试验农场农作一站。K 型小麦雄性不育系 K83(21)35A 作母本; 保持系 K83(21)35B 作父本。

麦穗快要全抽出时套袋隔离, 分两批授粉, 分别于 1990 年 5 月 8 日及 1990 年 5 月 11 日起进行。每次授粉前取材一次, 授粉后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 18, 22 h 以及 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 d 各取材一次。材料用卡诺氏固定液先固定 10 min, 再转入冷多夫改良纳瓦兴固定液固定 24 h, 冲洗后用爱氏苏木精整体染色。

授粉后 3 d 前的子房切面与腹沟面垂直, 授粉 3 d 后的子房切面与腹沟面平行, 切片厚度 12 μ m, Qlympus 显微镜观察摄影。

2 结果与分析

2.1 成熟胚囊的结构

在所有观察过的胚珠中成熟胚囊的结构未见异常, 胚囊呈椭圆形(图版 I-1)。珠孔

收稿日期: 1992-11-02

* 国家自然科学基金资助项目。刘晚苟现在江苏省植物研究所工作(南京, 210014)

端有一卵细胞,呈洋梨形,核处于中央,具有一个明显的核仁,核周围有浓厚的细胞质,靠质膜内侧的细胞质中有较多的小液泡(图版 I-2)。两个助细胞并列着生在珠孔的两侧,基部有丝状器,核位于中部,顶部有许多小液泡(图版 I-3,4)。二极核受精前位于胚囊中上部靠近卵器,上下排列紧密接合,周围有细胞质带与胚囊中其他细胞相连(图版 I-1)。成熟胚囊中具有大量的反足细胞,集中成反足细胞群,排列在胚囊的合点端。(图版 I-1)。

2.2 双受精过程及胚的发育

授粉 1 h 后花粉管已从珠孔进入胚囊,穿入一退化助细胞释放出两个精子(图版 I-4),或者有的胚囊中一个精子已贴在卵细胞上(图版 I-5)。授粉 3 h 后精核已进入卵细胞。

授粉后 6 h 精核已贴在卵核上(图版 I-6),或者有的精核染色质已在卵核中分散(图版 I-7),授粉 12 h 卵核中出现一个与卵核仁等大的雄性核仁(图版 I-8),或者二核仁合并而形成一个大核仁(图版 I-9)。这标志着精、卵受精过程结束。合子形成后即进入休眠期(图 I-9)。从图版 I-11 可以看出,合子第一次分裂为横裂,分裂后形成一个大的基细胞和一个较小的顶细胞。以后顶细胞和基细胞各分裂一次,分裂面均垂直于第一次的分裂面,到授粉后 3 d 形成四细胞原胚(图版 I-12),或已达八细胞原胚(图版 I-13),以后形成球形胚,到第六天部分胚开始进入器官分化期(图版 I-14)。

极核受精过程与卵核相似,授粉 1 h 后精子正向极核移动,或已进入极核(图版 I-1,2,3),授粉 3 h 极核中出现一个雄性核仁(图版 I-4)。授粉 6 h 后极核中出现 3 个几乎等大的核仁(图版 I-5),标志着极核受精即将完成。授粉后 7 h 初生胚乳核已进入分裂前期、中期或后期(图版 I-6,7,8)。

2.3 未授粉或延迟授粉条件下单倍体胚及双胚的发生

5 月 8 日固定的未授粉子房及授粉子房均未看到胚囊中有任何胚的发生。5 月 11 日固定的未授粉子房及授粉子房中都发现了许多异常胚的发生。

未授粉子房中出现单倍体胚 在未授粉的子房中观察到单倍体胚(图版 I-9~12),而未见胚乳细胞,两个极核多已移到胚囊中央紧靠反足细胞(图版 I-12),只有个别胚囊中极核离珠孔端较近。从图版 I-10~12 等切片中看,卵细胞已解体,个别胚囊中还可见一助细胞,但这一助细胞核已非常不明显,整个细胞正处于解体之中(图版 I-10,11)。反足细胞正常,未见解体的迹象(图版 I-10)。胚囊中的原胚从二细胞发育至 10 几个细胞时,呈椭圆球形,没有胚柄,基部紧靠内珠被(图版 I-1,2)。这些原胚从所处的位置及胚囊中其他细胞变化情况判断来自助细胞。

延迟 3 d 授粉子房中出现单倍体胚 延迟授粉子房中出现的单倍体胚与未授粉子房中描述的单倍体胚形态相似。图版 III-3,4,5,是延迟 3 d 授粉后 3 h-子房的连续切片,可以看出极核正在受精(图版 III-4,5),而另一个精子正贴在卵细胞顶端,原胚已是 10 多个细胞了(图版 III-3)。在另一子房的胚囊中,原胚已有 10 多个细胞,两个精子同时移到极核附近(图版 III-6)。从细胞形态及位置判断这些胚也来自未受精的助细胞。从以上结果分析延迟 3 d 授粉,卵细胞、极核均可受精,形成合子胚及胚乳,单倍体胚可发育成熟。

双胚现象 在未授粉子房中发现一个胚囊中有两个胚的现象(图版 III-7,8),它们的极核已移到胚囊中央靠近反足细胞。同时胚囊中均未见精子,仅有一正在解体的助细胞及

两个胚,这说明未授粉子房胚囊中的双胚均为单倍体胚。从位置判断原胚基部正对珠孔的一个来自卵细胞,偏离珠孔贴附内珠被的一个来自助细胞,均无胚柄。

在延迟 3 d 授粉子房中也观察到了双胚现象,图版 III-9,10 是延迟授粉 3 h 后胚囊的连续切片。可以看出反足细胞相当活跃,极核靠近反足细胞,胚囊珠孔端可见有两个原胚,基部正对珠孔体积较大的一个为卵细胞胚,另一个为助细胞胚,这两个胚均无明显的单细胞胚柄。胚囊珠孔端一侧有一正在解体的助细胞,卵细胞的合点端有两个精子,极核尚未发生受精。

此外,在延迟授粉的子房中还发现有一个单倍体胚及一个二倍体胚(图版 III-13),其中一个为助细胞胚,另一个为合子胚。从图版 III-11,12 的连续切片中可见卵核正在受精,一助细胞正在有丝分裂前期,初生胚乳核处于分裂中期。这一事实进一步证明上述双胚中,一为单倍体胚,来自未受精的助细胞;另一为合子胚,来自受精卵。

胚及极核的解体现象 在很多胚囊中观察到有胚和极核解体的现象。解体时往往是胚囊中央的极核先开始解体(图版 III-14)然后胚表面细胞解体,最后整个胚解体(图版 III-15),并随着取材时间的推迟,解体的胚囊数越多。

3 讨 论

3.1 双受精过程及胚和胚乳的发育

小麦种间和小麦与禾本科植物其他属间杂交的研究很多^[7~10],这些报道普遍认为杂交双受精过程持续时间比普通小麦自交长 2~3 h,我们观察结果表明,K 型小麦不育系与保持系杂交的双受精过程没有延缓现象。授粉后精卵完全融合约为 6 h,合子休眠约 10~12 h,合子第一次分裂约在授粉后 16 h。极核受精过程比卵受精快,历程约 4 h,初生胚乳核第一次分裂在授粉后 6 h,这与申家恒^[11]、王耀芝^[12]及陈朱希昭^[6]所观察的结果一致。原因是由于该不育系与保持系间亲和性高。

关于胚和胚乳的发育,陈朱希昭^[6]在普通小麦和一粒小麦杂交中观察到,杂种胚和胚乳的发育前期与亲本自交接近,而后期过程有所减慢。本研究发现,胚的生长发育速度与普通小麦自交相似,合子从第一次分裂开始,至授粉后 24 h 已达二细胞原胚,3 d 达四或八细胞,6 d 已开始器官分化。胚乳的发育也与普通小麦自交一样,授粉后 6 h 初生胚乳核开始分裂,3 d 时胚的附近开始形成胚乳细胞,6 d 时胚乳细胞充满了整个胚囊。这一结果也证明小麦 K 型不育系与保持系的亲和力很高,是较为理想的配套材料。

3.2 单倍体胚及孪生胚的来源

单倍体胚的来源 在所有观察到的胚囊中,若出现单个胚而无胚乳时,是助细胞发育的单倍体胚,则该胚常位于原来助细胞处,基部与珠孔一侧内珠被相接;10 几个细胞时胚呈椭圆形无胚柄。这些特点与丘荣熙^[9]在小麦×大麦上观察到的助细胞发育成的单倍体胚一致。此外,这种胚产生在未授粉的子房中,或产生在授粉的子房中而发生在卵细胞受精之前。所以,我们认为这种胚是未受精助细胞形成的单倍体胚。

孪生胚的来源 关于双胚的来源,日本 Tsunewaki 等人在研究含尾状山羊草(*Ae. caudata*)细胞质的萨尔蒙(Salmon)核代换系单倍体及双胚的来源时,认为授粉是双胚产生的必要条件^[6]。我们观察到,在 K 型不育系中未受精的胚囊中也能产生双胚,显然是两

个单倍体应为 $n-n$ 型。分别来自未受精的助细胞和卵细胞。但 Tsunewaki 等人在上述同一报道中还认为双胚为 $n-2n$ 型,其中二倍体胚来自受精助细胞,单倍体胚来自未受精卵。我们在延迟授粉的子房中也看到了 $n-2n$ 型双胚,但来源正好与上述相反,延迟授粉的胚囊中精卵核染色质正在融合,同时,一个助细胞已进入有丝分裂后期的事实说明单倍体胚来自未受精的助细胞,二倍体来自受精卵。与 Tsunewaki 等人不一致的原因有一个方面,一则是所观察的材料不同;另则他们固定的材料都是经过授粉或延迟授粉后观察的。未观察到未授粉子房中的双胚。关于授粉条件下胚囊中产生的 $n-2n$ 型双倍的来源问题,根据小麦双受精规律及精子的特性,只要精子释放到胚囊内总是一个与卵融合,一个与极核融合,只要适当延迟授粉,肯定会形成 $n-2n$ 型双胚。所以,我们认为授粉是形成具有单倍体胚种子的促进因素,而不是产生单倍体的必要条件。

3.3 单倍体胚的发生频率

我们在延迟 3 d 授粉处理的胚囊中看到有较多单倍体胚发生,而在正常授粉观察双受精过程约 200 个胚囊切片中未看到单倍体胚。Kihara^[5],Tsunewaki^[6]也都报道过延迟授粉能促进单倍体胚的发生,还认为延迟 3~5 d 授粉单倍体胚大量增加,再延迟授粉则单倍体胚锐减。所以,从胚胎学方面分析单倍体胚发生的高峰是在花后延迟授粉 3~5 d 的时间内,早于或迟于这一时间发生频率则锐减。因此,利用适时授粉或适当延迟授粉可以控制单倍体胚的发生频率。因为雌配子体初成熟时内部各细胞正处在需要受精状态下,此时期不授粉或授粉都不会产生单倍体胚,只有胚囊内部失去或即将失去受精活性时, n 型, $n-n$ 型单倍体胚才能发生,延迟授粉 $n-2n$ 型双胚才能发生。至于 3 种类型能否形成种子,决定于极核是否受精,极核受精可以产生胚乳,胚有了营养都可以发育成熟,最后形成种子。随着时间推移,由于无营养来源,未授粉胚囊内部各细胞先后解体,就是已产生的单倍体胚也完全解体,最后不形成种子,所以,适当延迟授粉可以增加单倍体胚形成的频率。

参 考 文 献

- 1 杨天章,刘庆法,张改生.利用粘果山羊草细胞质 IB/IR 易位系诱导小麦单倍体频率的研究.西北植物学报,1989,9(2):63~69
- 2 张改生,杨天章.偏型、粘型和易型小麦雄性不育系的初步研究.作物学报,1989,15(1):1~10
- 3 黄铁成,孙其信,张爱民.近期我国杂交小麦研究进展.中国农学通报,1988,6:32~34
- 4 刘庆法,杨天章,张晓庆等.外源细胞质诱导小麦单倍体的机理与应用研究.西北农业大学学报,1992,20(1):17~22
- 5 Kihara M, Tsunewaki K. Use of alien cytoplasm as a new method producing haploids. *Jap J Genet*, 1962,37:310~313
- 6 Tsunewaki K, Nada K, Fujisawa H. Haploid and twin formation in a wheat strain Salmon with Alien Cytoplasm. *Cytologia*, 1968,33:526~538
- 7 Mukai Y, Yakanish S. Genetic mechanism of pathenogenesis in common wheat with alien cytoplasm. *Jap J Genet*, 1983,58(6):665~671
- 8 陈朱希昭.普通小麦×硬粒小麦种间杂交的胚胎学观察.中国农业科学,1987,20(3):39~42
- 9 丘荣熙.小麦与大麦杂交的受精过程及胚胎发育的观察.华中农学院学报,1982,(2):9~12
- 10 魏秀玲,曹化林,胡启德等.普通小麦与球茎大麦杂交受精及胚胎发育的细胞形态学研究.遗传学报,1985,12(4):275~280
- 11 申家恒,王谱,李慧蓉等.春小麦受精过程及各阶段相应的时间研究.作物学报,1983,9:79~83
- 12 王耀芝,郑国钊.春小麦早期胚胎发育进程及细胞融合.植物学报,1983,2:115~119



图版 1

1. 成熟胚囊, 示卵细胞(EC), 极核(PN), 反足细胞(AT), $\times 160$; 2. 卵细胞放大, $\times 160$; 3. 示二助细胞(SY), $\times 640$; 4. 授粉后 1 h, 示二精子(个), $\times 160$; 5. 示一精子贴在卵细胞上, $\times 160$; 6. 授粉后 6 h 精核已进入卵核, $\times 160$; 7. 授粉后 6 h 精核染色质在卵核内分散, $\times 160$; 8. 授粉后 12 h 卵核中出现二大核仁(个), $\times 320$; 9. 授粉后 12 h, 示合子(Z), $\times 640$; 10. 授粉后 24 h, 合子分裂后期及一助细胞(SY), $\times 200$; 11. 授粉后 24 h, 示二细胞原胚(EM), $\times 160$; 12. 授粉后 3 d 示八细胞原胚, $\times 640$; 13. 授粉后 3 d 示细胞原胚, $\times 160$; 14. 授粉后 6 d 示器官分化期胚, $\times 40$



图版 I

1. 授粉后 1 h 示精子(SM)向极核移动, $\times 500$; 2. 授粉后 1 h 精子(个)即将进入极核, 一退化助细胞及一未退化助细胞, $\times 500$; 3. 授粉后 1 h 示精子进入极核, $\times 500$; 4. 授粉后 3 h 极核中出现雄性核仁(个), $\times 500$; 5. 授粉后 6 h 极核中雄性核仁增大, $\times 500$; 6~8. 授粉后 6 h 示初生胚乳核分裂前期、中期、后期, $\times 125$; 9. 授粉后 3 d 沿胚囊外围形成游离胚乳核环, 在胚附近开始形成胚乳细胞(个), 反足细胞仅留残迹, $\times 150$; 10. 未授粉胚囊示助细胞原胚(SE), $\times 250$; 11. 未授粉胚囊示助细胞胚(SE)及另一助细胞, $\times 250$; 12. 未授粉胚囊示助细胞胚发育成球形胚(SE), 无胚柄, 极核尚在, $\times 250$



图版 I

1. 未授粉胚囊示助细胞胚和反足细胞, $\times 125$; 2. 图 1 助细胞胚放大, $\times 500$; 3~4. 延迟授粉后 3 h 示助细胞胚 (SE), 精子贴在卵细胞上 (个), 另一精子已进入极核, $\times 250$; 5. 延迟授粉后 3h 示助细胞胚, 精子已进入极核, $\times 250$; 6. 延迟授粉后 3 h 示助细胞胚, 极核、反足细胞 (AT) 及一精子 (个), $\times 250$; 7. 未授粉胚囊示助细胞胚 (个) 及卵细胞胚 (EGE), $\times 250$; 8. 未授粉胚囊示助细胞胚及卵细胞胚 (EGE), $\times 250$; 9. 延迟授粉后 3h 示助细胞胚 (SE) 及卵细胞胚 (EGE), 二精子 (SM) 及一助细胞 (个), $\times 500$; 10. 图 9 的另一切面示极核及反足细胞, $\times 250$; 11~12. 延迟授粉后 11 h 同一胚囊的连续切片, 示助细胞有丝分裂后期, 卵核内出现雄性核仁 (个), 初生胚乳核有丝分裂中期 (PE), $\times 500$, $\times 250$; 13. 延迟授粉后 6 d 示助细胞胚 (SE) 及合子胚 (EM)。胚乳已充满胚囊, $\times 40$; 14. 延迟授粉后 3 d 的胚囊示极核 (个) 解体, 助细胞表面解体, $\times 250$; 15. 延迟授粉后 3d 的胚囊示胚正在退化, $\times 250$

The Embryological Observation of Haploid and Twin Seedlings Induced by *Ae. Kotschy* Cytoplasm Male-Sterile Line in Common Wheat

Sun Shanying¹ Yang Tianzhang² Liu Wangou¹

(1 Department of course, Northwestern Agricultural University, Yangling Shaanxi, China 712100)

(2 Department of Agronomy, Northwestern Agricultural University, Yangling Shaanxi, china 712100)

Abstract This paper embryologically deals with the process of double fertilization, the traits of embryo and endosperm development and the genetic rules of haploid and twin seedlings in cross of alloplasmic male-sterile wheat K83(21)35A with maintenance line 83(21)35B. The results indicate the followings; The process of double fertilization and the development of embryo and endosperm are similar to those of common wheat. N type haploid comes from the parthenogenesis of synergid, N-N type twins are derived from non-fertilized synergid and egg cell. In (2n-n) type twins, haploid is derived from a nonfertilized synergid and the diploid from the fertilized egg. Properly delayed pollination can increase the frequency of the haploid and twin seedlings. And, the inembryonate traits can be used in judging the morphological indices of the haploid embryo.

Key words alloplasm wheat male-sterile line, *aegilops kotschy*, parthenogenesis, haploid, twin seedlings, delayed pollination