

唐红艳,崔群香,韩长奎,等. 荧光染色法研究茄子花粉母细胞减数分裂及其雄配子体发育[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):107-109.

荧光染色法研究茄子花粉母细胞减数分裂及其雄配子体发育

唐红艳¹, 崔群香¹, 韩长奎¹, 闫素芹², 王 倩¹, 刘卫东¹

(1. 金陵科技学院园艺学院, 江苏南京 210038; 2. 江苏省南京市金盛达种子有限公司, 江苏南京 210042)

摘要:应用 H33258 荧光染色法研究茄子花粉母细胞减数分裂、雄配子体发育过程。结果表明:茄子花粉母细胞中胞质分裂方式为同时型;成熟花粉粒为 2-细胞型,包括 1 个营养核、1 个精细胞;减数分裂中期 I 可观察到 12 个二价体,小孢子有丝分裂中期可观察到 12 条染色体,是染色体计数的最佳时期;四分体排列方式有平面型、四面体型,四分体细胞体积可作为单核中晚期小孢子的间接比较标准。

关键词:茄子;花粉母细胞;减数分裂;雄配子体发育

中图分类号: S641.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0107-03

茄子(*Solanum melongena* L.)是茄科茄属的重要蔬菜,染色体数 $2n=24$ 。茄子主要病害有黄萎病、褐纹病、青枯病、早疫病、病毒病、绵疫病等,以黄萎病危害最重。茄子近缘野生种含有多种优良抗病基因,通过远缘杂交创制新型异染色体系材料,开展染色体工程育种已成为茄子抗病育种的突破口^[1]。因此,开展细胞、分子遗传学研究对于茄子染色体工程育种具有重要意义。了解花粉母细胞中染色体的构型、比例及其动态变化,准确识别花粉母细胞减数分裂特征,是研究栽培茄与其野生种染色体互作的前提,也有利于提高各种异染色体系材料的创制效率^[2]。观察雄配子体的发育过程,有利于确定花蕾形态与雄配子体发育阶段之间的关系,提高花药、小孢子培养时供体材料花蕾选取的准确性。目前关于茄子的细胞学研究主要集中在染色体核型分析^[3-4]以及减数分裂上^[5],雄配子体发育研究很少。花粉母细胞减数分裂研究中常用的方法包括改良苯酚品红法(卡宝品红)、苏木精染色法、压片观察技术,雄配子体发育需要结合使用染色、冬青油透明技术^[6]。荧光染色结合透明技术用于观察染色体较小的不结球白菜二倍体、四倍体^[7-8],已应用于南瓜、向日葵等作物上^[9-10],但未见其应用于茄子减数分裂、雄配子体发育研究。本研究利用荧光染色法研究茄子减数分裂、雄配子体发育,以便快速确定植株染色体数目、配子体发育阶段,旨在为茄子分子生物学研究提供快捷有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试茄子品种为沪茄四号,2011 年 11 月上旬温室育苗,2012 年 3 月中旬定植于连栋棚内,4 月中旬晴天 10:00 左右

取不同大小的花蕾,用自封袋放入冰盒带回实验室,4℃冰箱中放置 24 h,然后将花蕾分成 4 个级别:(1)花萼未开及花萼刚张开,花瓣距花萼筒 >2 mm;(2)花萼张开,花瓣距花萼筒 ≤ 2 mm;(3)花萼张开,花瓣超过花萼筒 $0\sim 2$ mm;(4)花瓣超过花萼筒 2 mm 以上。

1.2 方法

将上述 4 个级别的花蕾剥去萼片挑出花药,分别用卡诺固定液进行固定,经 95%、85%、70%、50%、30% 梯度乙醇和蒸馏水各浸泡冲洗 20 min,然后转入 pH 值为 5.0 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液中放置 24 h 以上。25℃黑暗条件下,用 20 $\mu\text{g/L}$ H33258 染色数小时并过夜。捣碎花药并吸取含花粉母细胞或雄配子体的碎片,滴在载玻片上,盖上盖玻片,轻轻按压,用 Nikon80i 荧光显微镜在紫外激发的荧光下观察、统计并拍照。

2 结果与分析

2.1 花粉母细胞减数分裂

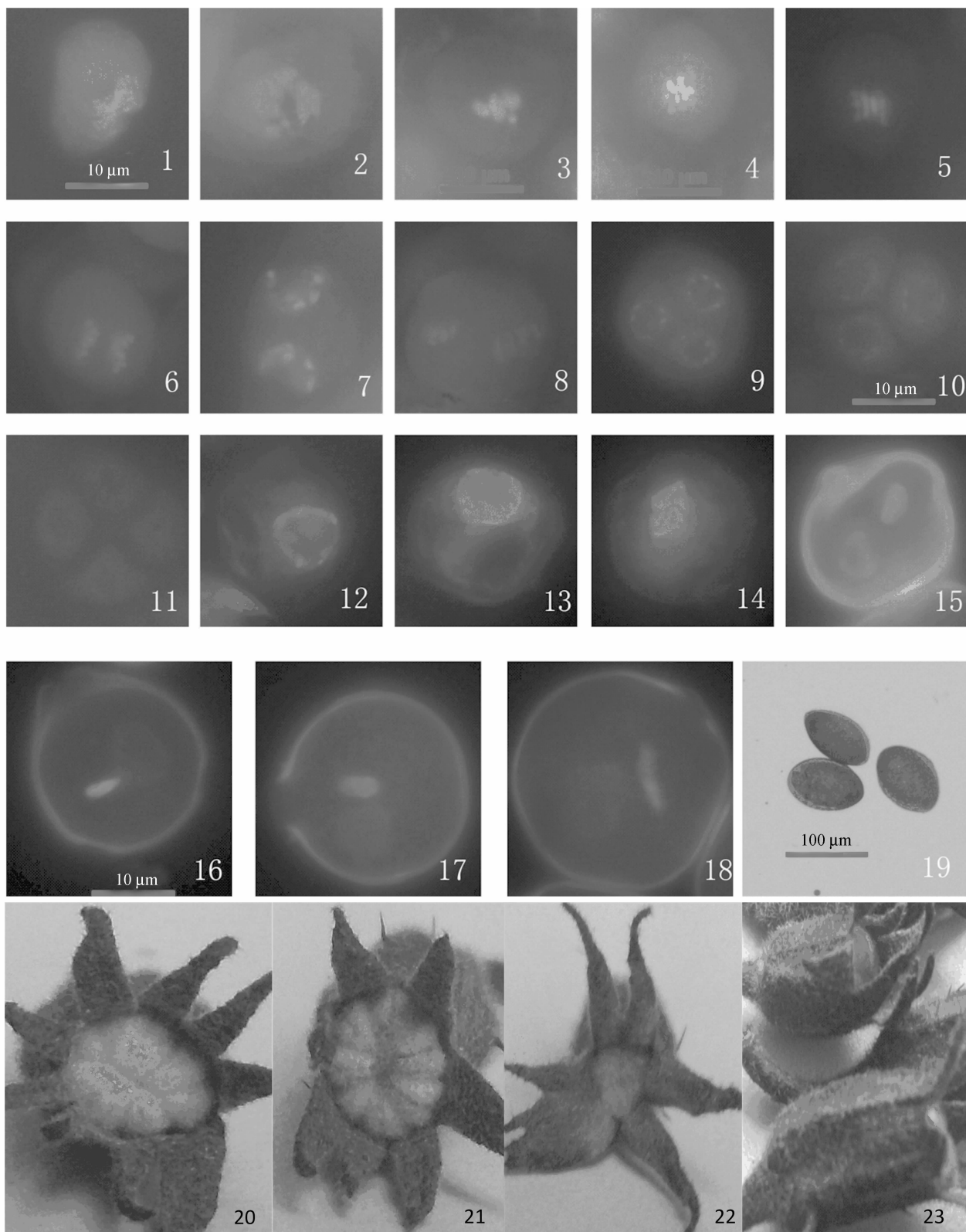
在萼片未张开的花蕾中,很多花粉母细胞处于减数分裂时期。进入减数分裂的花粉母细胞体积增大,原生质体浓厚,容易与周围的其他细胞区分开来。前期 I 持续时间较长,染色体形态变化较大。偶线期同源染色体开始联会,染色体呈花束状(图 1-1);粗线期联会已经完成,且染色体继续缩短变粗;双线期染色体进一步螺旋化并加粗,联会复合体已经解体,但各非姊妹染色体仍由交叉结连结在一起,表现为“X”等构型(图 1-2);终变期染色体进一步螺旋,达到最粗,并开始向细胞中央集中,逐步进入中期 I(图 1-3);完全进入中期 I 的细胞中,二价体排列在赤道板附近,极面观 12 个二价体清晰可计数(图 1-4),垂面观可见棒状、“E”形二价体,且二价体中的 2 条染色体有分开的趋势(图 1-5);由于纺锤丝的牵引,同源染色体分离,并且向两极移动,进入后期 I(图 1-6);染色体移至两极,核膜重新出现,此后直到染色体松散,进入前期 II,细胞质一直未见分裂(图 1-7);随着核膜消失,染色体凝缩至清晰可辨,进入减数分裂中期 II,垂面观可见二价纺锤面呈现一定角度(图 1-8);染色单体分离,核

收稿日期:2013-06-06

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(11)1005]。

作者简介:唐红艳(1990—),女,江苏泗阳人,主要从事蔬菜种子繁育工作。

通信作者:崔群香,博士,副教授,从事园艺作物遗传育种教学和科研工作。E-mail: cqx@jlt.edu.cn。



1—偶线期；2—粗线期；3—终变期；4—中期Ⅰ（极面观）；5—中期Ⅰ（垂面观）；6—后期Ⅰ；7—前期Ⅱ；8—中期Ⅱ；9—末期Ⅱ；10—四分体（四面体型）；11—四分体（平面型）；12—单核中期；13—单核靠边期；14—单核有丝分裂中期；15~18—二核期；19—成熟花粉粒；20—花瓣平花萼筒花蕾；21—花瓣距花萼筒+2 mm的花蕾；22—花瓣距花萼筒-2 mm的花蕾；23—花瓣距花萼筒>2 mm的花蕾

图1 茄子花粉母细胞减数分裂、雄配子体发育及花蕾形态

膜形成,细胞壁尚未形成,进入末期Ⅱ,多数细胞中只见到 3 个细胞核(图 1-9);随后产生胼胝质壁,把 4 个细胞隔开,形成四分体,四分体也多为四面体型(图 1-10),极少数为平面型(图 1-11)。

2.2 雄配子体发育

花萼已张开的花蕾中,多数花粉母细胞已完成减数分裂,处于四分体及随后时期。四分体胼胝质壁解体,释放出小孢子,进入雄配子体发育过程。同大多数作物类似,刚释放出来处于单核早期的小孢子形状不规则,细胞质中没有液泡,小孢子体积小;随后细胞核位于细胞中央,细胞不同部位开始出现小液泡,为单核居中期(图 1-12);受液泡的挤压,细胞核向细胞壁靠近,核膜清晰,为单核靠边期(图 1-13);随后核膜消失,出现清晰可辨的 12 条染色体,进入单核有丝分裂中期(图 1-14);有丝分裂完成后,小孢子进入二核期,刚分裂产生的 2 个细胞核,除 1 个细胞核荧光较亮外,形状、大小差异不大(图 1-15);随后较亮的细胞形状由圆变扁、由短变长,小孢子体积也不断增大,但细胞不再分裂(图 1-16 至图 1-18)。成熟花粉粒多为椭球形,但不同花粉粒之间有一定差异(图 1-19)。

2.3 雄配子体发育时期及与花蕾形态特征之间的关系

由于单核中期细胞大小与四分体类似,而四分体之前的花粉母细胞体积小于四分体,且从结构上易与小孢子区分开来,因此可以根据细胞体积判断雄配子体发育阶段:小于四分体则为单核早期,等于或接近四分体则为单核中晚期,明显大于四分体则为二核期。据此对(2)至(4)级花蕾中细胞发育阶段进行统计,发现(2)级花蕾中约有 4% 细胞为四分体,其余多数为单核小孢子;(3)级花蕾中均为单核小孢子,且仅 3% 处于单核早期,其余为单核中晚期;(4)级花蕾中 80% 以上的细胞处于双核期。

3 结论与讨论

本研究首次用荧光染色观察法探讨了茄子花粉母细胞减数分裂及其雄配子体发育各个时期的主要特征,以及单核期小孢子所对应的花蕾形态特征。采用了 24 h 低温预处理、荧光染色方法,染色体在各个时期特征非常明显,染色体发出明亮的荧光,避免了细胞质中其他物质的干扰,对于茄子、白菜等花粉壁荧光不强烈的材料,即使观察雄配子体发育也不需要冬青油透明。适合茄属植物游离小孢子培养的花粉发育时期一般为单核期或单核中晚期^[11-14]。小孢子发育时期与花蕾形态特征密切相关,多数研究者用花蕾直径、花蕾长、花药颜色^[15],花蕾瓣长与萼裂比^[16],花瓣长与萼裂基部之差

等作为适宜培养的小孢子发育时期相关形态特征,并以此作为取样依据^[17]。本研究表明,花瓣长度与花萼筒长度之间的差值可以作为茄子小孢子培养的取材依据,这与马欣的结论^[17]类似。

参考文献:

- [1] Collonnier C, Fock I, Kashyap V, et al. Applications of biotechnology in eggplant[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2001, 65(2): 91-107.
- [2] 钱春桃, 陈劲枫, 娄群峰, 等. 黄瓜花粉母细胞减数分裂行为的研究[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(3): 193-197.
- [3] Ali M, Fujieda K. Cross compatibility between eggplant (*Solanum melongena* L.) and wild relatives[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1990, 58(4): 977-984.
- [4] 詹国凤, 党选民, 曹振木, 等. 3 种野生茄和 1 个栽培茄的核型分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(4): 456-460.
- [6] 万双粉, 张蜀宁, 张杰. 青花菜花粉母细胞减数分裂及雄配子体发育[J]. 西北植物学报, 2006, 26(5): 970-975.
- [7] 崔群香, 侯喜林, 肖木珠, 等. 不结球白菜花粉母细胞减数分裂及其雄配子体发育[J]. 西北植物学报, 2010, 30(9): 1804-1808.
- [8] 崔群香, 王倩, 唐红艳, 等. 同源四倍体普通白菜花粉母细胞减数分裂及其雄配子体发育研究[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2012, 33(4): 56-60.
- [9] 杨弘远. 用荧光染色与冬青油透明技术显示花粉细胞核[J]. 植物学报, 1988, 30(3): 242-247, 342.
- [10] 崔群香, 刘卫东, 吴敏, 等. 用荧光染色法观察南瓜雄配子体发育过程[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 135-137.
- [11] 刘独臣, 房超, 李跃进, 等. 茄子花药培养诱导胚状体成苗[J]. 西南农业学报, 2008, 21(6): 1643-1646.
- [12] 连勇, 刘富中, 陈钰辉, 等. 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 233-235.
- [13] 佟曦然, 顾淑荣, 朱至清, 等. 茄子游离小孢子培养中小孢子发育的细胞学观察[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 861-866.
- [14] 朱朝辉, 钟开勤, 黄建都, 等. 茄子游离小孢子培养初探[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1883-1887.
- [15] 李亚荣. 茄子 (*Solanum melongena* L.) 花药离体培养的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [16] 宋彦平, 申书兴, 王彦华, 等. 茄子游离小孢子培养获得愈伤组织的研究[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(3): 32-35.
- [17] 马欣. 茄子游离小孢子培养及其形态发育学观察[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.