

王惠利,赵晓明.二倍体与四倍体金银花减数分裂观察[J].江苏农业科学,2014,42(9):211-214.

二倍体与四倍体金银花减数分裂观察

王惠利¹,赵晓明²

(1.运城农业职业技术学院,山西运城 044000; 2.山西农业大学农学院,山西太谷 030801)

摘要:通过观察二倍体与同源四倍体金银花花粉母细胞减数分裂过程发现:与二倍体相比,同源四倍体减数分裂过程较复杂,双线期各细胞母细胞中出现单价体、二价体、三价体、四价体和多价体等多种情况,但主要以四价体(Ⅳ)和 2 个二价体(Ⅱ+Ⅱ)的形式联会;中期Ⅰ、中期Ⅱ出现游离染色体;后期Ⅰ、后期Ⅱ出现落后染色体和不均等分离等现象,但同源四倍体的染色体分离主要是 2/2 式的均衡分离;末期Ⅱ出现四分体。

关键词:金银花;二倍体;同源四倍体;花粉母细胞;减数分裂

中图分类号: S567.7⁺90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0211-03

多倍体植物在自然界中是普遍存在的,由于其在生理上较二倍体有更强的适应性,在遗传上有较大的可塑性,使得育种学家自 20 世纪 30 年代开始就热衷于多倍体诱导育种的研究^[1]。最近几年我国学者对多倍体药用植物也进行了研究报道^[2-4]。多倍体药用植物含有更高的药用成分,从而其品质较高。此外,多倍体药用植物的抗逆性、适应性较其二倍体都大大增强,体现了药用植物育种的巨大意义。本试验从细胞学的角度来验证四倍体金银花的染色体数目较二倍体增加 1 倍,并且在减数分裂过程中出现四价体,即联会成 $2n = 36 = 9Ⅳ$,证明多倍体诱变成功。

1 材料与方法

1.1 试验材料

金银花二倍体($2n = 2x = 18$)及其同源四倍体($2n = 4x = 36$)。其同源四倍体由山西农业大学天然药用植物研究所用秋水仙素诱导二倍体经染色体加倍获得。

1.2 试验方法

在盛花期,于晴天上午不同时间(09:00、09:30、10:00、10:30)摘取金银花花蕾(不同花蕾直径大小都作了尝试),将花蕾用卡诺固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)固定 24 h,转入 70%乙醇中于 4℃冰箱中保存待用。制片时,从 70%乙醇中取出花蕾,用镊子掰开,夹取花药于载玻片上,同时滴 1 小滴 70%乙醇于花药上,防止花药干瘪。用解剖针快速将花药纵向一分为二,再轻轻挤压出花粉母细胞,然后用镊子将载玻片上肉眼可见的花药残渣去除,操作时镊子必须直尖。用卡宝品红染色并压片^[5]。火烤(以不沸腾为原则)以便分色良好,然后立即用滤纸卡住,用大拇指重压并用 Olympus-BX51 显微镜观察,将好的片子光学树胶封片并摄影。

2 结果与分析

2.1 减数分裂时期观察

经过多次尝试,于不同时间对不同花蕾大小取材、固定、

制片,发现 09:30—10:30 之间取材最好。二倍体的减数分裂行为基本正常,而且表现出一定同步性,同一花蕾中基本以一个时期为主,部分细胞前后相差 1~2 个时期,且发现金银花花蕾直径大小与花粉母细胞减数分裂各期之间有一定关系(花蕾直径在 2.0~4.5 mm 时为减数分裂期)(表 1)。

表 1 二倍体金银花的减数分裂时期

花蕾直径 (mm)	分裂期
2.0~2.5	细线期,偶线期
2.6~3.0	粗线期,双线期
3.1~3.5	终变期,中期Ⅰ
3.6~4.0	后期Ⅰ,末期Ⅰ
4.1~4.5	二分体,四分体
>4.5	花粉粒

四倍体的减数分裂行为情况复杂,而且表现出不同步性,同一花蕾中同时有几个时期的细胞存在,部分细胞前后相差 1~6 个时期,且发现花蕾直径大小与花粉母细胞减数分裂各期之间有一定关系(花蕾直径在 2.5~5.0 mm 时为减数分裂期)(表 2)。

表 2 四倍体金银花的减数分裂时期

花蕾直径(mm)	分裂期
2.5~3.0	细线期,偶线期
3.0~3.5	粗线期,双线期
3.6~4.0	终变期,中期Ⅰ
4.1~4.5	后期Ⅰ,末期Ⅰ
4.6~5.0	二分体,四分体
>5.0	花粉粒

2.2 二倍体金银花花粉母细胞减数分裂染色体行为观察

减数分裂包括 2 次连续发生的核分裂,分别称为减数分裂第 1 次分裂(减数分裂Ⅰ)和减数分裂第 2 次分裂(减数分裂Ⅱ)^[6]。下面分别就每一个分裂相做出相应的解释与分析。

2.2.1 减数分裂Ⅰ 前期Ⅰ可分为以下 5 个时期:(1)细线期:这是减数分裂开始的时期,染色体由染色质状态浓缩为细而长的细线状,只在局部区段可见染色粒,可观察到花束状结

收稿日期:2013-12-10

作者简介:王惠利(1977—),女,山西运城人,硕士,讲师,主要从事作物遗传育种的研究工作。E-mail:wanghui927@163.com。

构(图 1-1)。

(2)偶线期:各对同源染色体开始配对,二价体形成。染色体增粗并松散开来,有时可见尚未联会的染色体片段(图 1-2)。

(3)粗线期:染色体明显缩短变粗,染色较深。二价体逐渐缩短加粗,此时的二价体实际包含了 4 条染色单体,也称四合体。联会的 2 条同源染色体结合很紧密,以致界限不易分清,此期同源染色体非姊妹染色单体之间发生交换(图 1-3)。

(4)双线期:配对的同源染色体分离,有交叉现象,有的形成麻花状,有些部位连在一起,染色体呈高度螺旋化(图 1-4)。

(5)终变期:交叉向两端移动,二价体高度浓缩,中间交叉数目减少,核膜开始解体,染色体缩短呈点状,较均匀地分布在细胞内,可见二价体呈“X”、“O”、“V”形态,分散于核中(图 1-5)。

中期 I:染色体整齐排列于赤道板上,每对同源染色体的 2 个着丝点分别向着相对的一极,细胞质里纺锤体形成(图 1-6)。

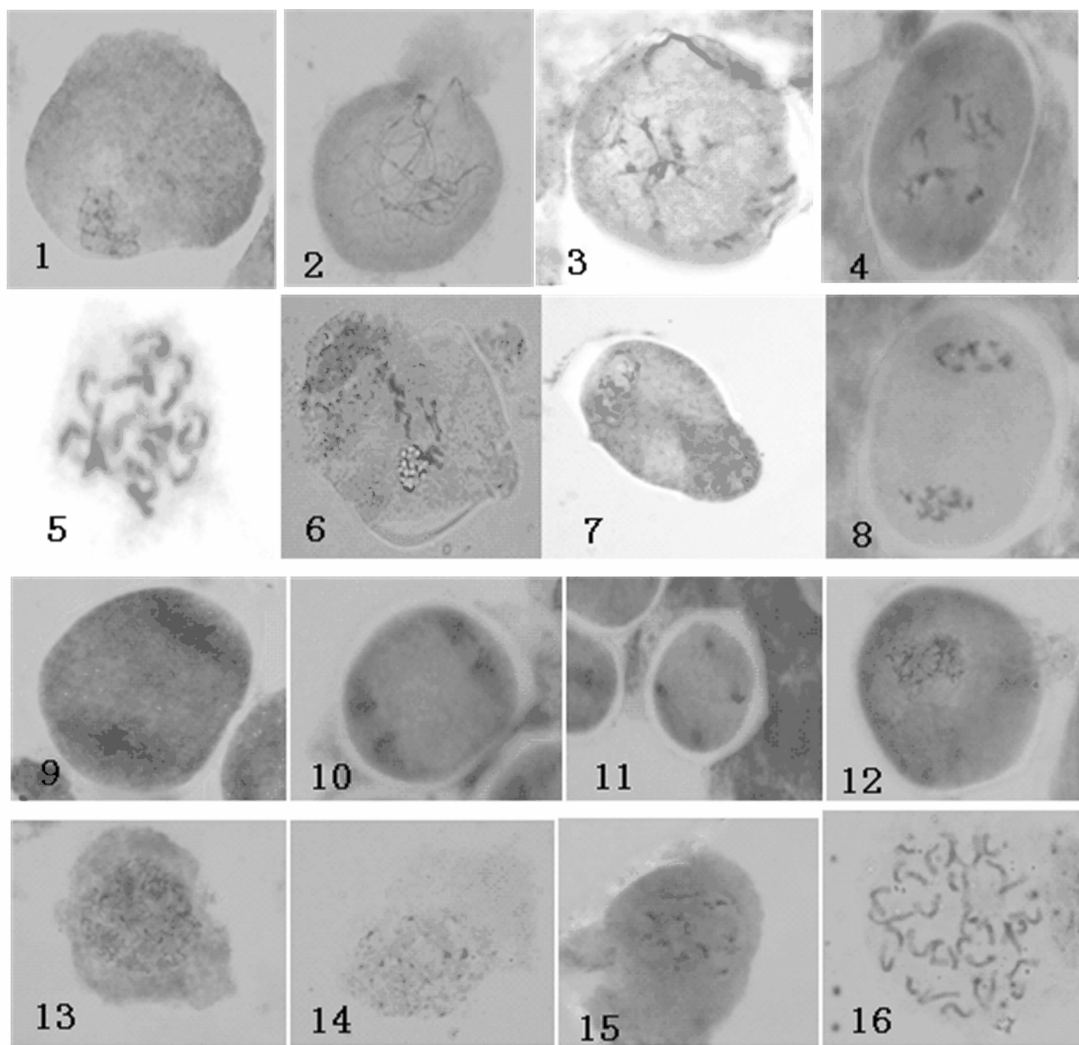
后期 I:在纺锤丝的牵引下,同源染色体按 9/9 均等分开,移向两极。染色体的形态不规则,但更为浓缩,染色很深。每条染色体具有 2 个姐妹染色单体,染色体数目减半(图 1-7)。

末期 I:染色体解螺旋,变成细丝状,染色变浅,核膜重新形成,胞质分裂为二分体(图 1-8)。

2.2.2 减数分裂 II 中期 II:每个染色体的着丝点整齐地排列在赤道板上,着丝点开始分裂(图 1-9)。

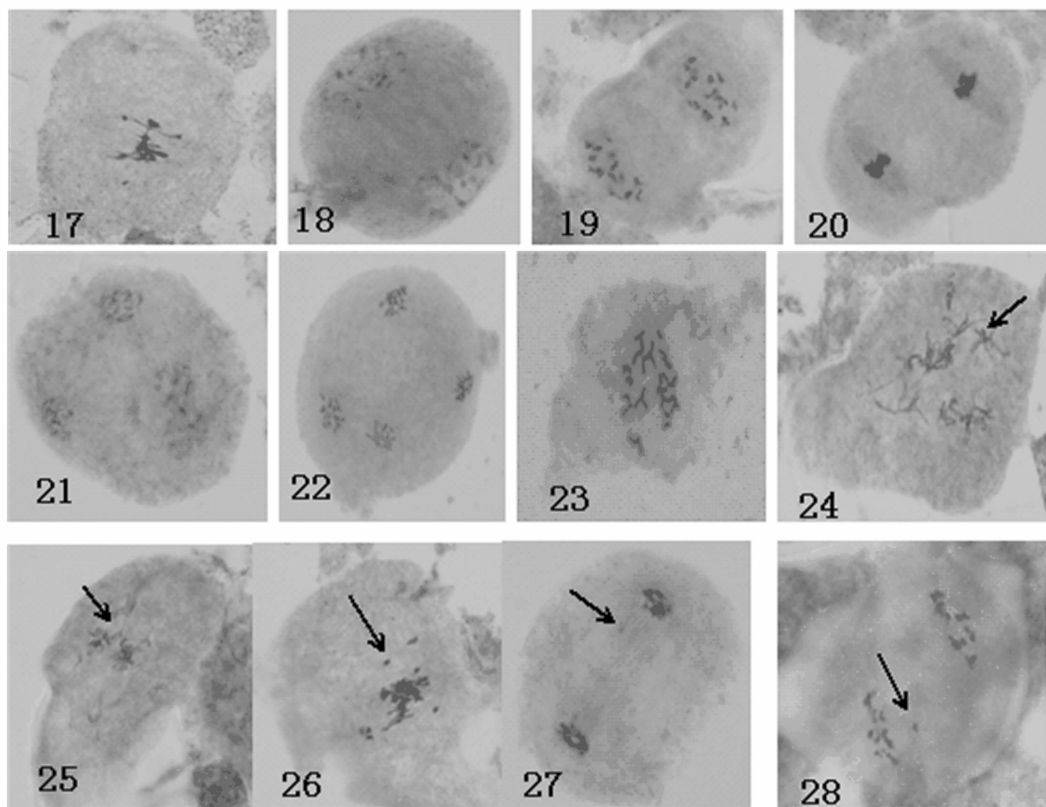
后期 II:各染色单体由纺锤丝分别拉向两极,着丝粒分裂(图 1-10)。

末期 II:经过 2 次分裂,形成 4 个子细胞,每个子细胞内有 9 条染色体。四分体进一步发育为四分孢子,以后发育为成熟花粉粒。至此,整个减数分裂结束(图 1-11)。



1~11—二倍体减数分裂;12~22—四倍体减数分裂。1.细线期;2.偶线期;3.粗线期;4.双线期;5.终变期;6.中期 I;7.后期 I;8.末期 I;9.中期 II;10.后期 II;11.末期 II;12.细线期;13.偶线期;14.粗线期;15.双线期;16.终变期;17.中期 I;18.后期 I;19.末期 I;20.中期 II;21.后期 II;22.末期 II;23.双线期(染色体36条);24.双线期,开始联会为9组,箭头所指为四价体;25.双线期,箭头所指为多价体;26.中期 I,箭头所指为游离染色体;27.后期 I,箭头所指为落后染色体;28.末期 I,箭头所指为落后染色体。

图1 二倍体与四倍体金银花花粉染色观察



续图 1

2.3 金银花同源四倍体花粉母细胞减数分裂染色体行为观察

由图 1 可以看出,四倍体花粉母细胞减数分裂过程与其二倍体基本相同,但四倍体的减数分裂过程较复杂,具有以下特点。

双线期:四倍体染色体构型复杂,全部配成 9 组四价体的情况极为罕见,98% 的细胞含有单价体、二价体、三价体、四价体和多价体,且类型变化很大,但主要以四价体(Ⅳ)和 2 个二价体(Ⅱ+Ⅱ)的形式联会,并且观察到染色体交叉。

中期Ⅰ:配对的同源染色体排列在细胞中央的赤道板上,有 40% 的细胞出现赤道板外染色体,数目为 1~3 不等。染色体整齐排列于赤道板上,二价体的着丝点分别向着相对的一极,绝大部分二价体为具有一个交叉的棒状二价体,少数为具有 2 个交叉的环状二价体。中期Ⅰ染色体构型相对复杂,表现出多种类型,出现多个单价体(Ⅰ)、二价体(Ⅱ)、三价体(Ⅲ)、四价体(Ⅳ)和多价体。

后期Ⅰ:同源染色体彼此分开,分别向两极移动,此期出现许多异常情况。能正常分离的细胞只有 60%,40% 的细胞出现染色体桥或落后染色体。有些细胞中可以看到染色体趋向两极,但很不同步,一些启动快的已到达两极,另一些启动慢的落后,甚至尚未启动,形成连续的染色体长带。有些细胞中分散到两极的染色体并不解聚,而是散布于两极,直接进入第 2 次分裂。

中期Ⅱ:2 组染色体分别排列在各自的赤道板上,30% 的细胞出现没有排列在赤道板上的落后染色体。

后期Ⅱ:着丝粒一分为二,姐妹染色体分别移向相反的两极,此期只有 63% 的细胞染色体能正常分向两极,37% 的细

胞出现异常,主要表现在:出现数量不等的落后染色体、染色体桥,染色体不均等分离;2 个二分体分裂很不同步,表现为 1 个二分体中染色体已经开始分向两极,另 1 个二分体的染色体尚未启动。但同源四倍体的染色体分离主要是 2/2 式的均衡分离。

染色体制片观察显示,四倍体金银花减数分裂过程与二倍体金银花的减数分裂过程相比不仅细胞增大、染色体数目加倍,而且过程复杂,变化较大,出现多种情况。双线期出现单价体、二价体、三价体、四价体和多价体;中期Ⅰ、中期Ⅱ出现游离染色体;后期Ⅰ、后期Ⅱ出现落后染色体和不均衡分离等现象。

3 讨论与结论

观察发现,二倍体金银花花粉母细胞减数分裂中期Ⅰ都为 9 个二价体,而同源四倍体则表现复杂,有多价体、四价体、三价体、二价体和单价体多种形式。四倍体金银花这种复杂的配对构型势必比二倍体产生更多的落后染色体及染色体不均等分离等异常情况。落后染色体向两极的移动速度较慢,最终形成微核^[7]或消失在细胞质中,其结果是导致四倍体金银花四分体时期各分体基本遗传物质的不平衡和丢失,使其不能发育为正常的花粉粒而败育。因此,四倍体金银花的遗传稳定性比二倍体金银花差,二倍体化是提高同源四倍体结实率的有效途径^[8]。染色体次级联会经常在多倍体中观察到,次级联会形成多价体是多倍体的特点之一^[9-10]。

从形态上看,多倍体具有巨大性、抗旱性、耐寒冷和次生代谢物增加等特点^[11],具有很强的选择优势。同源多倍体在近期遗传效应来看,有使个体形态变化减少的趋势。但从长

何荆洲,卜朝阳,黄昌艳,等. 金线莲的结实特性和无菌播种培养[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):214-217.

金线莲的结实特性和无菌播种培养

何荆洲, 卜朝阳, 黄昌艳, 闫海霞

(广西农业科学院花卉研究所, 广西南宁 530007)

摘要:观察金线莲的结实性情况,比较其蒴果采收期 4 种基本培养基、NAA 与 6-BA 激素组合及水果添加物对金线莲无菌播种膨大率及萌发率的影响。结果表明:(1)不同杂交组合的结实率存在明显差异,结实率变化范围为 0~100%;(2)蒴果在授粉后 45 d 采收最好,种子的膨大率、萌发率均较高;(3)不同基本培养基对金线莲种子的膨大萌发效果不同,种子在 WPM 培养基上的膨大萌发率最高,膨大率最高达 73%,萌发率最高为 79%;(4)不同生长激素组合对金线莲种子的膨大萌发影响差异显著,以 1/2MS+0.5 mg/L NAA 的效果最好;(5)不同水果有机添加物都对金线莲种子的膨大萌发有促进作用。

关键词:金线莲;蒴果;无菌播种;膨大率;萌发率

中图分类号: S567.23+9.04

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)09-0214-04

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.] 为兰科开唇兰属多年生草本植物,是我国传统的珍稀名贵药材,全草可入药,性甘、味平,具有清热凉血、祛风除湿、解毒等功效,有“金草”“药虎”“乌人参”等美称,特别是在我国台湾地区,金线莲被称为“药中之王”^[1-2]。此外,金线莲叶型优美,叶脉金黄色,呈网状排列,具有极高的观赏价值。由于对生态环境条件要求较严,因此金线莲植株矮小、分布零散、根系不发达、生长缓慢、适应性差^[3];金线莲的种子极为细小,由未成熟的胚及数层种皮细胞构成,在自然环境中需要与真菌共生才能萌发,且萌发率极低^[4],但通过无菌播种及人工培育可在短期内获得大量幼小植株。

收稿日期:2013-11-04

基金项目:农业部专项(编号:13RZZY-25);广西农业科学院项目(编号:桂农科 2013YM30、桂农科 2012GW03)。

作者简介:何荆洲(1981—),女,广西南宁人,硕士,助理研究员,主要从事生物技术、植物组培等方面的研究。Tel:(0771)3246429; E-mail:he5141@sina.com。

通信作者:卜朝阳,女,研究员,主要从事生物技术、植物组培等方面的研究。Tel:(0771)3276924; E-mail:yangnv@126.com。

远来看,多倍体使作物遗传储备资源增加,其另外增加的染色体组就像基因重复一样,具备了转变成新基因的潜在优势。对于金银花这种药用植物来说,四倍体金银花的选育成功对于提高产量和品质、满足市场需求、增加农民收入和扩大金银花的种质资源等都有重大意义。

参考文献:

- [1] 国信. “九丰一号”金银花通过鉴定[J]. 西南园艺, 2005(6):18.
- [2] 路易斯 W H. 多倍体在植物和动物中的地位[M]. 鲍文奎,译. 贵阳:贵州人民出版社,1984.
- [3] 陈素萍,王莉,宋清秀. 党参多倍体育种的研究[J]. 中草药, 1991,22(5):224-227.
- [4] 王俐,郑思乡,顾志建. 同源四倍体库拉索芦荟的离体培养[J].

目前国内对金线莲的组织培养研究主要集中在原球茎培养^[5-6]和丛生芽培养^[7-8]方面,在种子培养方面,伍成厚等报道了金线莲种子培养过程中类原球茎的诱导及其分化^[9],罗安雄等则探讨了不同培养基对金线莲种子萌发以及幼苗生长的影响^[10]。本研究对 2 个金线莲品种进行了自交及正反交,并观察了结实情况、蒴果采收时间和培养基成分等因素对金线莲非共生萌发的影响,以期建立金线莲无菌播种繁殖技术,为金线莲育种提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2 个金线莲品种材料均取自广西农业科学院花卉研究所观赏植物研发中心的育苗温室,其编号和品种的主要性状、形态分别见表 1、图 1。

1.2 试验地概况

广西南宁位于北回归线以南,平均海拔 74 m,年均降水量 1 304.2 mm,平均湿度 79%,年平均气温 21.6℃,极端最高气温 40.4℃,极端最低气温 -2.1℃,全年无霜期高达 365 d,属亚热带季风气候。

园艺学报,2002,29(2):176-178.

- [5] 朱徽. 植物染色体及染色体技术[M]. 北京:科学出版社,1982:42-83.
- [6] 季道藩. 遗传学[M]. 2 版,北京:中国农业出版社,1984.
- [7] 张仲鸣,苏都莫日根,李正理. 银杏小孢子中的微核形成及其在进化过程中的意义[J]. 植物学报,1997,39(2):97-101.
- [8] Ramsey J, Schemske D W. Neopolyploidy in flowering plants[J]. Annu Rev Ecol Syst,2002,33:589-639.
- [9] 蓝泽蓬,梁学礼. 遗传学实验原理和方法[M]. 成都:四川大学出版社,1990:183-184.
- [10] 庄东红. 石田雅士. 柿树减数分裂和小孢子形成过程的观察[J]. 武汉植物学研究,2000,18(5):356-358.
- [11] 艾建国,高山林. 丹参同源四倍体的诱导、鉴定及有效成分的含量测定[J]. 药物生物技术,2003,10(6):372-376.