

四倍体萱草减数分裂观察与花粉育性研究

何琦,高亦珂

(北京林业大学 园林学院,北京 100083)

摘要:为研究四倍体萱草育性降低的原因,以四倍体萱草为材料,采用常规涂片法研究花粉母细胞减数分裂行为,并采用离体萌发试验测定花粉活力。结果表明:四倍体萱草花粉母细胞减数分裂过程存在较多的异常。主要表现在:前期出现少量多核现象,染色体的构型复杂,有单价体、二价体、三价体和四价体;中期 I 和中期 II 有赤道板外染色体;后期和后期 II 出现落后染色体、丢失染色体和染色体桥;中期 I 开始出现染色体分离不同步现象;四分体时期出现三分体、异常四分体及多分体。各时期减数分裂正常的花粉母细胞平均频率为 60.18%,异常频率为 39.82%,花粉离体培养萌发率为 55.42%,两者存在相关性,减数分裂异常是影响四倍体萱草花粉活力的最重要因素。

关键词:四倍体;萱草;减数分裂;花粉育性

中图分类号:S68.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)增刊-0047-04

Meiosis and Pollen Fertility of Tetraploid *Hemerocallis* Cultivars

HE Qi,GAO Yi-ke

(Landscape Architectural College of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to investigate fertility reduction of tetraploid *Hemerocallis*, the meiosis and chromosome behavior of pollen mother cells (PMCs) in tetraploid *Hemerocallis* were studied using chromosome preparation technique. And the pollen viability was determined by vitro germination experiment. The results showed that PMCs meiosis of tetraploid *Hemerocallis* was abnormal: In prophase I, bi-nucleoluses were observed. In diakinesis, quadrivalent, trivalent and univalent were observed. Some of the chromosomes were found not to rank at equatorial plate in metaphase I and metaphase II cells. In anaphase I and anaphase II cells, there were lagged chromosomes, lost chromosome and chromosome bridge. At tetrad stage, triad, tetrad with micronucleus and polyed appeared. In meiosis, the normal PMCs were 60.18% and abnormal PMCs were 39.82%. The abnormal meiosis was the most important reason of pollen fertility reduction of tetraploid *Hemerocallis*.

Key words: Tetraploid; *Hemerocallis*; Meiosis; Pollen viability

萱草 (*Hemerocallis* spp) 为百合科 (*Lilium*) 萱草属植物。萱草在我国有着两千多年的栽培历史,且花型优美,花色丰富,适应性强,是优良的观赏宿根花卉。现代萱草经过一百多年的选育,已经形成了 6 万多个品种^[1]。优良的观赏栽培特性和丰富的品种资源使得萱草在园林绿化中的应用越来越广泛。四倍体萱草花朵大型,色彩鲜艳,具有很高的观赏价值,已经成为了萱草育种的新趋势。但四倍体萱草自交和用其作为亲本杂交结实率非常低,现有的四倍体萱草品种基本都是通过染色体加倍获得,基因型的变异比较小^[2],这在一定程度上阻碍了四倍体

萱草育种的发展。

多倍体植物由于同源染色体较多,在减数分裂时容易形成异常,从而影响小孢子的形成和花粉活力^[3]。国内外对三倍体萱草减数分裂的观察较多,并发现不同程度的异常行为^[4,5]。四倍体食用黄花菜品种的减数分裂曾有报道^[6]。但有关四倍体观赏萱草品种的减数分裂行为及其与花粉活力和杂交结实率的关系尚未有报道。本研究对四倍体萱草品种花粉母细胞减数分裂行为和花粉活力进行了研究,探讨四倍体萱草品种部分不育性及结实率低的原因,以期能为培育优良的四倍体萱草新品种提供理

收稿日期:2011-03-10

基金项目:北京植物园萱草育种研究横向课题(2009-11-A01)

作者简介:何琦(1986-),女,浙江临安人,在读硕士,主要从事园林植物遗传育种研究。

通讯作者:高亦珂(1966-),女,黑龙江哈尔滨人,副教授,博士,主要从事园林植物遗传育种及园林植物应用设计研究。

论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

减数分裂观察材料为四倍体萱草品种芝加哥比黄。花粉活力材料为四倍体萱草品种草莓糖、芝加哥比黄和二倍体品种金娃娃、紫泉、红色海盗、儿童节。所有材料均引种于北京植物园苗圃,栽植于国家花卉工程中心基地。

1.2 方法

1.2.1 减数分裂观察 在6月中、下旬现蕾期,每天8:00-9:00采集长度为8~12 mm的花蕾,用卡诺固定液固定24 h后,换入70%酒精中在4℃条件下保存。制片时采用常规涂抹法,卡宝染色,显微镜观察、摄影。

1.2.2 花粉活力测定 采用离体萌发试验测定花粉活力。培养基配比为蔗糖 100 g/L + 硼酸 30 mg/L + 氯化钙 40 mg/L。于晴天上午采集新鲜花粉,置于含培养液的花粉小室中,在25℃条件下培

养2 h后在显微镜下观察。每种花粉3次重复,每次重复观察3个视野,然后计算平均值,每个视野的花粉粒总数不低于50粒。以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准。萌发率 = 已萌发的花粉粒数 / 花粉粒总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 四倍体萱草品种的减数分裂行为

以一个花药为单位,四倍体萱草减数第一次分裂在前期I基本同步,中期I开始出现不同步现象,最大跨度为3个分裂相。但大多数小孢子母细胞都集中在一个分裂期。中期II同一小孢子母细胞内的染色体分裂出现不同步。而同一花蕾中的不同花药分裂时期没有显著差异。各时期的主要特点如下:

前期I: 细线期到粗线期基本正常,有2.70%的细胞出现了多核现象(图1-A,表1)。终变期染色体配对出现了4种构型,即单价体(图1-B)、二价体、三价体(图1-C)和四价体(图1-D)。其中二价体占的比例最大,其次为单价体、四价体,三价体最少。

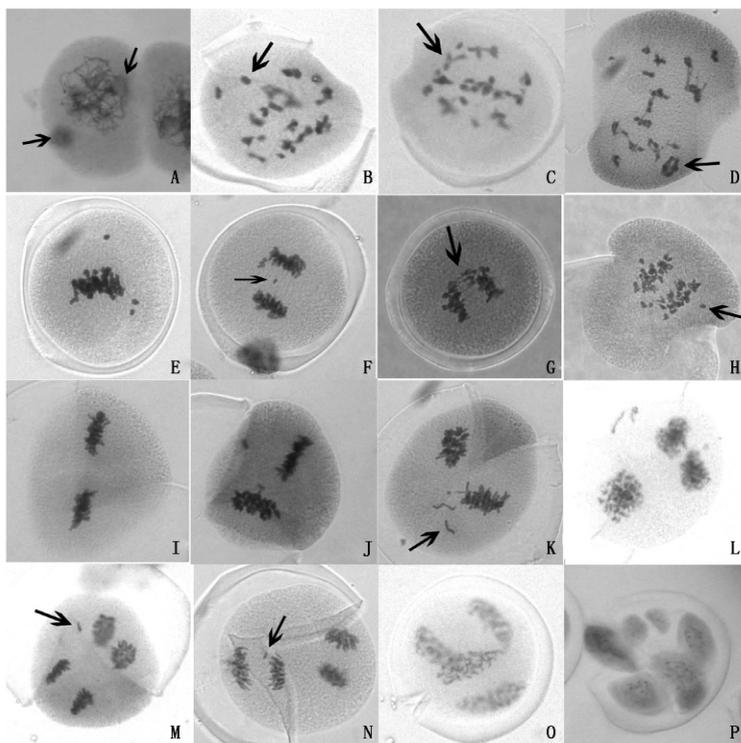


图1 四倍体萱草品种的减数分裂行为
A. 双核现象,箭头所示为核仁; B~D. 终变期, B中箭头所示为单价体, C中箭头所示为三价体, D中箭头所示为四价体; E. 中期I, 赤道板外染色体; F. 后期I 落后染色体; G. 后期I 染色体桥; H. 后期I 箭头所示为丢失染色体; I~K. 中期II, I为平行型赤道板, J为垂直型赤道板, K为八字型赤道板, 箭头所示为赤道板外染色体; L. 减II分裂不同步现象; M. 后期II, 箭头所示为丢失染色体; N. 后期II, 箭头所示为落后染色体; O. 末期II, 垂直型纺锤体; P. 多分体。

A. Bi-nucleoluses, the arrows showing nucleoluses; B-D. Diakinesis, arrow in B showing univalents, in C showing trivalent, in D showing tetravalent; E. Metaphase I showing chromosomes out side metaphase plate; G. Anaphase I, arrow showing lagging chromosome; H. Anaphase I, arrow showing chromosome bridges; I. Anaphase II, arrow showing lost chromosome; J. Metaphase II, J showing parallel equatorial plate, J showing vertical equatorial plate, K showing '8' like equatorial plate; L. Out-of-sync separation; M. Anaphase II, arrow showing lost chromosome; N. Anaphase II, arrow showing lagging chromosome; O. Telophase II, vertical spindle; P. Polyads.

图1 四倍体萱草品种的减数分裂行为
Fig. 1 Meiosis of pollen mother cells in tetraploid *Hemerocallis*

中期 I: 配对的同源染色体排列在细胞中央的赤道板上, 此期有 32.04% 的细胞出现赤道板外染色体(图 1-E, 表 1)。

后期 I 和末期 I: 同源染色体彼此分开分别向两极移动, 有 53.12% 的花粉母细胞能够正常分离, 其余的花粉母细胞出现了不同程度的异常(表 1), 包括落后染色体(图 1-F)、染色体桥(图 1-G)和丢失染色体(图 1-H), 其中出现频率最高的异常为落后染色体, 落后染色体一般为 1~4 条。有少量的花粉母细胞同时出现两种异常。

中期 II: 两组染色体分别排列在各自的赤道板上, 赤道板的空间位置出现了平行(图 1-I)、垂直(图 1-J)和八字(图 1-K) 3 种类型, 其中平行类型最多, 其余两种类型一共不到 10%。另外, 39.42% 的

细胞出现了赤道板外染色体(图 1-K, 表 1)。

后期 II 和末期 II: 约有 10% 左右的花粉母细胞出现分裂不同步, 一侧细胞达到后期 II, 而另一侧仍停留在中期 II(图 1-L)。在分裂同步的细胞中有 53.62% 的细胞染色体能正常分向两极, 46.38% 的细胞出现异常(表 1), 主要表现在出现丢失染色体(图 1-M)、落后染色体(图 1-N), 偶见染色体桥。由于纺锤体的方向不同, 后期 II 和末期 II 形成了和中期 II 相对应的三种分裂类型(图 1-M-O)。

四分体时期: 四倍体萱草的胞质分裂为同时型, 在减 II 末期才开始胞质分裂, 形成正常的四分体为对称型和少量十字交叉型, 比例为 65.61%(表 1)。此外还存在 34.39% 的多分体(图 1-P)、三分体和带微核的四分体。

表 1 减数分裂各时期染色体行为异常的花粉母细胞比例

Tab. 1 Frequency of abnormal PMCs in each stage of meiosis

减数分裂时期 Meiotic stage	观察细胞数 No. of cells examined	异常细胞数 No. of Abnormal cells	异常细胞频率/% Abnormal cells	正常细胞频率/% Normal cells
前期 I Prophase I	296	8	2.70	97.30
中期 I Metaphase I	206	66	32.04	67.96
后期 I Anaphase I	256	120	46.88	53.12
中期 II Metaphase II	208	82	39.42	60.58
后期 II Anaphase II	276	128	46.38	53.62
四分体 Tetrad stage	410	141	34.39	65.61

2.2 花粉活力

由表 2 可知, 6 个萱草品种的花粉离体萌发率均在 50% 以上。二倍体萱草的花粉活力显著高于四倍体萱草, 均能达到 80% 左右。而两个四倍体萱草的花粉活力仅为 55% 左右。这说明染色体倍性对花粉活力有显著影响, 倍性增加会引起可育花粉的减少。

表 2 四倍体萱草与二倍体萱草花粉活力比较

Tab. 2 Pollen viability of tetraploid and diploid *Hemerocallis* cultivars

品种 Cultivar	倍性 Ploidy	花粉活力/% Pollen viability
草莓糖 Strawberry Candy	四倍体	55.82 B
芝加哥比黄 Chicago Royal Robe	四倍体	55.01 B
金娃娃 Stella De Oro	二倍体	81.02 A
紫泉 Purple Waters	二倍体	82.01 A
儿童节 Childrens Festival	二倍体	80.53 A
红色海盗 Crimson Pirate	二倍体	78.76 A

注: 数据采用 Duncan 多重比较检验, $P=0.01$, 表中数字后英文字母代表各品种的差异性。

Note: Data was tested by Duncan multiple comparison, $P=0.01$. The alphabet charm after the number in the table represented diversity of different cultivars.

3 讨论

四倍体萱草四倍体花粉育性降低的原因很多, 小孢子母细胞减数分裂异常是主要原因之一。小孢子母细胞减数分裂异常与花粉育性的相关性已经在六倍体黑小麦^[7]、羊草^[8]、向日葵^[9]、甜瓜^[10] 等多种植物的研究中得到证实。

本研究中四倍体萱草减数分裂存在较多的异常行为, 包括分裂不同步、落后染色体、染色体桥、赤道板外染色体, 并观察到了四价体、三价体和单价体等异常构型以及多核现象, 这和前人在同源四倍体黄花菜^[6]、四倍体甜瓜^[10]、四倍体青花菜^[11] 上的研究一致。但本研究中观察到染色体配对构型以二价体为主, 而同属植物同源四倍体黄花菜则以四价体构型为主^[6]。另外, 观察中发现的多核现象出现的频率也远远低于四倍体黄花菜。这可能是由于试验所用的四倍体萱草由长期杂交形成的园艺品种加倍而来, 并不是真正意义上的同源四倍体, 因此四价体出现的频率较低。

四倍体萱草花粉母细胞减数分裂在各个时期都

存在高频率的异常现象。各时期分裂正常的细胞频率平均仅为 60.18%。而四倍体萱草花粉离体培养的平均萌发率为 55.01% , 这两者的差异不大。另外, 花粉萌发的试验中还观察到了较多的畸形小粒花粉, 可能由异常四分体和多分体形成。说明减数分裂异常是影响四倍体萱草花粉活力的最重要因素。四倍体萱草减数分裂前期配对的异常导致了分离不均衡, 分裂后期染色体“桥”断裂很可能产生重复或缺失染色体, 而单价体则随机移向两级或者形成落后染色体, 这都会导致最终形成的配子得不到全套染色体, 降低甚至丧失生活力。但分裂正常细胞频率略高于花粉萌发率, 因此不排除花粉活力低还存在其他原因。

尽管四倍体萱草的花粉离体萌发率能维持在 55% 以上, 杂交实践中发现, 以四倍体萱草为父本的杂交结实率极低, 绝大多数组合不能结实。说明减数分裂和花粉活力不是影响结实率的最主要因素, 这和徐雁飞^[12]在菊花以及潘国富^[8]在羊草中的研究一致。还有其他因素影响四倍体萱草的杂交育性, 包括父母本倍性差异、遗传差异、环境条件等。具体原因还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] AHS (2011) Online daylily cultivar database: <http://www.daylilydatabase.org/>. Am Hemerocallis Soc.
- [2] Li Z, Pinkham L, Campbell N F, et al. Espinosa, Rumen Conev. Development of triploid daylily (*Hemerocallis*) germplasm by embryo rescue [J]. *Euphytica* 2009, 169: 313–318.
- [3] 李树贤. 植物染色体与遗传育种 [M]. 北京: 科学出版社 2008: 245–250.
- [4] Belling J. Chromosomes of canna and of *Hemerocallis* [J]. *Proc Nat Acad Sci* 1921 7: 197–201.
- [5] Dark S O S. Meiosis in diploid and triploid *Hemerocallis* [J]. *New Phytologist* 1932 31(5): 310–320.
- [6] 李爱华, 何立珍. 同源四倍体黄花菜减数分裂行为及其育性的探讨 [J]. *湖南农业大学学报* 1998 24(1): 51–71.
- [7] Merker A. Cytogenetic investigations in hexaploid *Triticale* I. Meiosis, aneuploidy and fertility [J]. *Hereditas* 1971, 68: 103–112.
- [8] 潘国富, 孙振雷. 羊草花粉母细胞减数分裂、花粉育性及结实性的研究 [J]. *中国草地学报* 1986 3(29): 7–15.
- [9] Atlagic J, Dozet B, Skoric D. Meiosis and pollen grain viability in *Helianthus mollis*, *Helianthus salicifolius*, *Helianthus maximiliani* and their F₁ hybrids with cultivated sunflower [J]. *Euphytica* 1995 81: 259–263.
- [10] 贾媛媛, 张永兵, 刁卫平, 等. 四倍体甜瓜花粉母细胞减数分裂的观察 [J]. *中国瓜菜* 2009(2): 7–9.
- [11] 张蜀宁, 万双粉, 张伟, 等. 同源四倍体青花菜花粉母细胞的减数分裂 [J]. *园艺学报* 2007 34(2): 387–390.
- [12] 徐雁飞, 陈发棣, 陈素梅, 等. 5 个菊花品种自交结实特性及减数分裂行为与花粉育性研究 [J]. *西北植物学报* 2009 29(3): 469–474.