

鹤望兰 $2n$ 配子诱导研究初报*

肖亚琼¹, 郑思乡^{1*}, 龙春林², 郑丽¹, 关文灵¹, 赵雁¹

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650204; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 以多年生开花鹤望兰植株为试验材料, 采用不同浓度秋水仙素 (0.05%, 0.10%, 0.20%) 对鹤望兰处于减数分裂 I 期的幼小花蕾进行诱导。结果表明: 0.20% 浓度的秋水仙素诱导效果最好。与对照相比, 在形态学上, 花瓣、萼片、柱头, 花粉粒大小等变化较明显。细胞学上, 配子出现了明显的加倍现象, 并检测到导致 $2n$ 花粉形成的异常减数分裂现象: (1) 中期 II 和后期 II 的小孢子母细胞中发生异常的纺锤体定位, 表现为平行、八字形、融合纺锤体; (2) 末期 II 4 个核呈两极分布, 每极 2 核, 或呈三极分布, 其中一极 2 核, 另两极单核; (3) 四分体时期观察到了二分体、三分体情况。并且 $2n$ 花粉频率的估测值 (20.30%) 与实测值 (17.30%) 相接近。因纺锤体定位异常而产生的 $2n$ 配子在遗传上等同于 FDR 型, 因而在有性多倍化育种中具有重要的利用价值。

关键词: 鹤望兰; 秋水仙素; $2n$ 配子; 减数分裂

中图分类号: S 682.31.035.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)04-0475-05

Initial Study on $2n$ -gametes Induction of *Strelitzia reginae*

XIAO Ya-qiong¹, ZHENG Si-xiang¹, LONG Chun-lin², ZHENG Li¹, GUAN Wen-lin¹, ZHAO Yan¹

(1. College of Horticulture and Landscape, YAU, Kunming 650204, China)

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract Perennial flowering plants of *Strelitzia reginae* are used as material. The first meiosis young flowers are induced with different concentration colchicines (0.05%, 0.10%, 0.20%). The result shows that on the condition of 0.20% the effects are best. Compare with control experiment. There are obvious differences on morphology from petal, calyx, stigma and pollen grain size and so on. Gametes are polyploid obviously on cytology, and the observed meiotic abnormalities resulting in the $2n$ pollen production revealed that (1) disoriented spindles including parallel triangle spindles and fused spindles were formed at metaphase II and anaphase II; (2) the nuclei at telophase II were arranged in two poles, each pole contained two nuclei or in three poles, one of which contained two nuclei, the other two contained one nucleus respectively; (3) dyads and tetrads were produced at the tetrad stage. The estimated frequency of the $2n$ -pollen (20.30%) agreed with that the fact (17.30%). The $2n$ pollen produced by this mechanism were genetically equivalent to FDR gametes and consequently had a potential value for sexual polyploidization.

Key words *Strelitzia reginae*; colchicine; $2n$ -gametes; meiosis

$2n$ 配子也称作未减数配子。 $2n$ 配子是在大小孢子发生过程中, 由于种种异常行为而产生的具有孢子体染色体数 ($2n$), 而不是一般正常地配子体

染色体数 (n) 的配子。 $2n$ 配子受精后形成的有性多倍体是植物多倍化的主要形式。 $2n$ 配子的发生在植物界较普遍 (veilleux, 1985)。据不完全统计,

收稿日期: 2006-11-13

* 基金项目: 国家科技部项目 (2004DKA30430 2005DKA21006)。 ** 通讯作者 E-mail: zsx1996@tom.com

作者简介: 肖亚琼 (1978-), 女, 云南富源县人, 在读硕士研究生, 主要从事花卉遗传育种研究。

E-mail: yaqiongxia@ sina.com

已在 13 个科的 85 个种和种间中发现有 $2n$ 配子的存在。^[1]近年来,由于人们认识到杂合性对于多倍体成功的重要性,而又有研究表明, $2n$ 配子在传递杂合性和上位性方面具有特殊价值,因而 $2n$ 配子在植物多多倍体育种中的研究应用逐渐升温^[2,3]。 $2n$ 配子在马铃薯^[4],毛白杨^[5],桑树^[6],柿树^[7],大白菜^[8]上已经有人做过了大量的研究,在桃,李^[9],枇杷^[10],苹果^[11]和越桔等其它果树上也有关于 $2n$ 配子诱导的报道。但在花卉方面很少见报道。而对于鹤望兰的研究,多年来人们一直探索有关栽培方面的研究。大多采用种子繁殖或分株繁殖,但不能缩短其育种周期,提高切花产量和观赏价值。因此在鹤望兰多倍体育种方面未见报道过,也从未见 $2n$ 配子诱导方面的研究。本研究旨在找出使用秋水仙素诱导鹤望兰 $2n$ 配子的最适浓度,并以对照进行比较,了解其形态学和细胞学上的差异。以期缩短育种周期并实现鹤望兰人工三倍体育种的进一步研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以种植在云南农业大学实验大棚里的多年生开花鹤望兰植株作为研究材料。

1.2 方法

1.2.1 $2n$ 配子的诱导

以开花鹤望兰植株为材料,定期采鹤望兰小花蕾检查其小孢子母细胞减数分裂进度。当多数小孢子母细胞开始进入前期 I 时。采用不同浓度(0.05%, 0.10%, 0.20%)秋水仙素用注射法对鹤望兰幼小花蕾进行诱导,处理时间为早晨 8:00~9:00 下午 2:00~3:00 连续 3 d 处理后用无菌水冲洗 3 次。从中选择最适宜的处理浓度,并观察其形态学和细胞学变化。

1.2.2 $2n$ 配子的鉴定

鉴定 $2n$ 雄配子产生的依据可以一般通过下面 3 个方面来判断:① $2n$ 花粉与正常 n 花粉在大小、形态上均有差别^[12]。②配子形成过程中,观察减数分裂的细胞学特征,出现平行、八字形纺锤体或融合纺锤体^[13,14],中期较多的单价体,四分体时期出现二分体或三分体等被认为是 $2n$ 配子的形成证据^[15,16]。

1.2.3 形态学观察

对采用不同浓度处理后的花冠进行形态指标测量,分别从花瓣、萼片大小,柱头大小,颜色,质地,形态等方面与对照进行比较。对形态上变异明显的植株,取花粉粒制片,然后显微镜观察测量花粉粒直径大小,以花粉粒直径显著增大来作为变异的初步鉴定指标,并对 $2n$ 花粉频率进行估测。

1.2.4 细胞学观察

取经秋水仙素处理后约经 1 周生长的幼小花蕾进行固定液(无水乙醇:冰乙酸为 3:1)固定 30~40 min 水洗,再用 1 N 盐酸酸解 6~8 min 水洗进行卡宝品红染色压片,镜检观察其减数分裂动态变化,与对照进行比较。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素处理后外部形态的变异

鹤望兰小花蕾采用不同浓度秋水仙素处理开花后,与对照相比,在形态学上,不同浓度处理均出现不同程度的变化。通过对比,用 0.20% 浓度处理的花朵变化最显著,花瓣短而宽,下部缩短,颜色偏淡,部分出现畸形,萼片均短宽而厚,颜色深,柱头较短,部分柱头退化。

大部分花蕾经秋水仙素处理后,花瓣、萼片面积,柱头大小均出现不同程度的变化,但用 0.20% 浓度处理的变化最明显。

表 1 不同浓度秋水仙素处理花冠形态学指标测量

Tab 1 The measurement of the corolla morphology treated with the different concentration colchicines

浓度 concentration	萼片面积(长×宽)/ cm^2 sepal area(length×width)	花瓣面积(长×宽)/ cm^2 petal area(length×width)	柱头(长)/cm stigma(length)
对照(CK)	37.21	19.11	3.09
0.05%	32.45	14.53	2.36
0.10%	28.90	19.04	2.08
0.20%	26.98	12.01	1.37

注:以上数据为随机测量 12 组数据的平均值。

2.2 秋水仙素处理后花粉粒大小的检测与 2n 花粉频率的测定

取处理后开花的花朵花粉粒进行制片, 在显微镜下观察测量 (16×10倍) 并照相。0.05% 及 0.10% 处理过的花粉粒与对照相比相差不大, 而 0.20% 浓度处理后的部分花粉粒大小变化较对照明显。

从图 12 和表 2 可见: 0.20% 浓度处理的花蕾开花后的花粉粒直径显著增大。平均直径达 150.72 μm。可见采用高浓度诱导鹤望兰 2n 配子的机率最大。但浓度大于 0.20% 药害程度加重。

其中观察到 2n 大花粉 (图 12 细箭头所示) 所占的比例为 17.30%, 败育花粉 (粗箭头所示) 为 2.70% 左右。

表 2 不同浓度秋水仙素处理花粉粒直径大小测量 (16×10倍)

Tab 2 The measurement of the pollen diameter with the different concentration colchicines μm

	处理浓度 treatment concentration			
花粉粒直径 (平均值) pollen diameter (average)	对照 (CK)	0.05%	0.10%	0.20%
	120.96	124.32	133.20	150.72

表 3 秋水仙素诱导对 2n 花粉粒发生比例的影响

Tab 3 The effect of colchicines treatment on the 2n pollen proportion

浓度 concentration	观察总数 / 粒 total number	n 花粉粒大小 / μm npollen diameters	n 花粉数 / 粒 n number	2n 花粉粒大小 / μm 2n pollen diameters	2n 花粉数 / 粒 2n number	2n 花粉比例 % 2n pollen rates	败育率 % small pollen
对照 (CK)	1050	120.96	1049	0	0	0	0.60
0.20%	1040	124.8	860	150.72	180	17.30	2.70

2.3 秋水仙素处理后花粉减数分裂动态观察

观察结果表明, 小孢子母细胞减数分裂正常进行, 从中期开始检测到分裂异常现象。与对照 (n=14 图 1) 相比经 0.20% 秋水仙素处理后, 配子染色体出现了明显的加倍现象, 从 n=14 条增加到 2n=28 (如图 2) 条, 且在中期 II 观察到平行纺锤体 (图 3)、八字形纺锤体 (图 5-6) 和融合纺锤体 (图 7), 此阶段的部分小孢子母细胞的 2 个纺锤体位于 2 个不同的平面, 显微镜下观察呈极面观 (图 4); 末期 II 4 个子核呈

两极分布, 每极 2 核 (图 8); 同时末期 II 由于胞质分裂异常出现三极体 (图 10); 在四分体时期观察到二分体 (图 9) 和三分体 (图 11), 其中二分体可形成 2 个 2n 花粉, 三分体可形成 1 个 2n 花粉和 2 个 n 花粉。2n 花粉数目统计按 2n 花粉数目 = 2Dy + Tr 计算,^[16] 2n 花粉频率 F1 = 100% · (2Dy + Tr) / (2Dy + 3Tr + 4Te) 其中 Dy 代表二分体个数, Tr 代表三分体个数, Te 代表四分体个数^[17]。根据试验统计估算, 2n 花粉在此时期出现的比例为 20.70%。

表 4 秋水仙素诱导对 2n 配子发生比例的影响

Tab 4 The effect of colchicines treatment on the 2n-gametes proportion

浓度 concentration	观察孢子总数 / 个 total number	四分体 tetrads	三分体 terads	二分体 dyads	2n 花粉 2n gametes	2n 花粉比例 % 2n gametes rates
对照 (CK)	115	28	1	1	3	2.60
0.20%	153	29	3	14	31	20.30

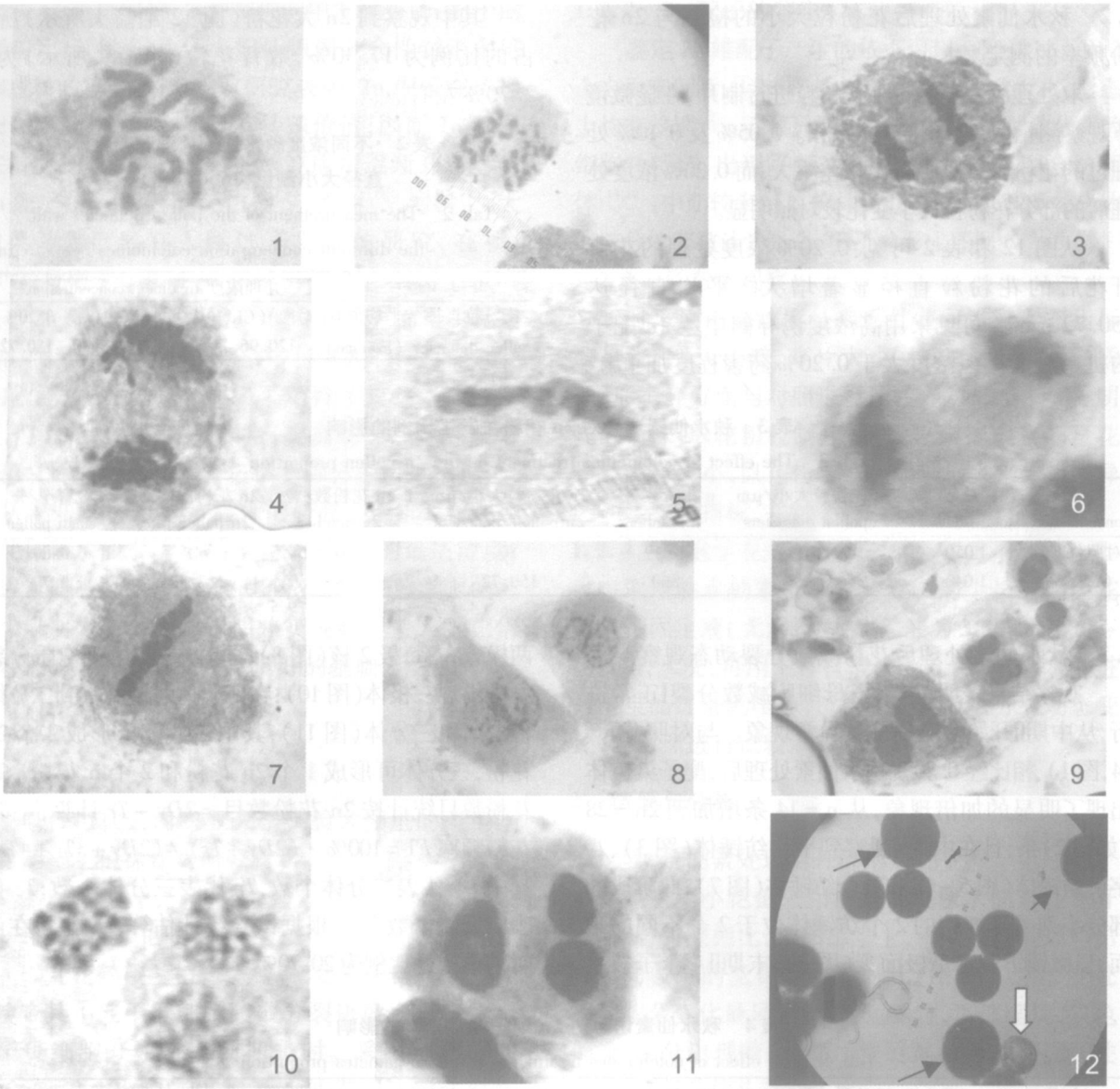
由表 3 和表 4 可见, 处理后从减数分裂动态观察估算到的 2n 花粉的比例与开花后检测到的大花粉粒比例相接近。

3 讨论

3.1 减数分裂过程中纺锤体的影响

本研究在四分体时期观察到四分体, 同时检测到二分体、三分体的存在, 对于胞质分裂的被子植物而言, 小孢子发生过程中二分体和三分体的产生是 2n 配子产生的依据之一。

离、纺锤体形成、胞质分裂各环节的异常减数分裂行为产生, 但一般以联会消失 (desynapsis)、纺锤体定位异常 (disorientation of spindles) 和提前的胞质分裂 (premature cytokinese) 为主^[13]。CONICE11A 等^[18] 在研究马铃薯 2n 配子形成时发现二分体和三分体形成总是与纺锤体定位异常有关。在纺锤体定位发生异常的小孢子母细胞中, 后期 II 染色单体分开后的走向也随之改变, 并使末期 II 重建的 4 个子核的空间排布位置发生变化, 部分或全部子核进行核重组, 从而形成 2n 花粉。研究中观察到, 鹤望兰减数分裂前期的粗线期到中期的细胞, 同源染色体配对



图版说明: 1.对照 $n=14$; 2.处理 $2n=28$; 3.中期II平行纺锤体; 4.中期II平行纺锤体极面观; 5-6: 中期II八字形纺锤体; 7.中期II融合纺锤体; 8.末期II每极双核的小孢子母细胞; 9.四分体时期的二分体; 10.三极体; 11.四分体时期的三分体; 12. $2n$ 花粉(箭头所示)和 n 花粉。

Explanation of plates: 1. Comparison $n=14$; 2. Treatment $2n=28$; 3. Parallel spindles at metaphase; 4. Parallel spindles with two polar views; 5-6. Triangle spindles at metaphase II; 7. Fused spindles at metaphase II; 8. Pollen mother cell with restitutional nuclei; 9. Dyads at the tetrad stage; 10. Tripolar spindles at anaphase; 11. Triads at the tetrad stage; 12. Unreduced pollen (arrows) and normal pollen.

正常,因此不可能存在联会消失突变,而纺锤体定位异常是导致 $2n$ 花粉发生的主要原因。

3.2 各减数分裂行为对二分体、三分体及四分体的影响

正常的小孢子母细胞后期II染色单体分开为4组,每2组处于同一平面,末期II重建的4个子核呈四面体排列,随后在两个分裂沟分隔下形成1个四分体,并发育成4个 n 花粉。在中期II观察到

平行纺锤体(图3)和平行纺锤体极面观(图4),末期II时由之重建形成的2个子核分布于细胞的同一极,整个花粉母细胞内的4个子核呈两极分布,每一极含双核(图8),随后的胞质分裂只形成1个分裂沟,产生1个二分体(图9),实现了核重组,二分体最终发育成2个 $2n$ 花粉;含有八字形纺锤体(图5~6)的细胞,则只在细胞的一极发生核重组,从而形成三极体(图版),而三极体(图10)细胞的

出现, 在末期 II 三极体胞质分裂后产生 1 个三分体 (图 11), 并发育成 1 个 2n 花粉和 2 个 n 花粉。相似的三极体在马铃薯、苜蓿等纺锤体定位突变型中常见报道^[19]; 融合纺锤体 (图 7) 的出现, 可根据分裂的同步化特点来确定, 其发展类似于平行纺锤体, 导致二分体的产生, 从而形成 2n 花粉。

3.3 不同减数分裂行为形成的 2n 花粉的遗传效应
一般认为, 同一物种 2n 配子的发生受多种机制控制, 形成的是 FDR 型和 SDR 型配子的混合体^[20]。本研究从中期 II 开始检测到平行、八字形和融合纺锤体的异常定位, 在以后的减数分裂过程中观察到一系列的相应改变, 故鹤望兰 2n 配子属于 FDR 型。因纺锤体定位异常而产生的 2n 配子在遗传上等同于 FDR (第 1 次分裂重组) 型。根据遗传效应, 可将 2n 配子分为 FDR (first division restitution) 和 SDR (second division restitution) 两种类型。SDR 型能传递约 40% 亲本的杂合性给后代, 而 FDR 型能传递约 80% 的杂合性 (heterozygosity) 和高比例的上位性 (epitasis)^[19]。

4 结论

鹤望兰 2n 花粉的形成主要受 3 种不正常的减数分裂行为控制: 平行纺锤体, 八字形纺锤体和融合纺锤体。由于纺锤体的异常定位而形成三分体和二分体, 最终发育成 2n 花粉, 2n 花粉的估测值与实测值相接近。由于 FDR 型 2n 配子在传递亲本杂合性及上位性方面比 SDR 型高, 并且经 2n 配子实现的有性多倍化能克服体细胞加倍活力降低及不育性增高的不足^[21], 因而在有性多倍化育种中具有重要的利用价值。

[参考文献]

- [1] 孟金陵, 张金发. 2n 配子在植物育种中的应用 [A]. 植物生殖遗传学 [M]. 北京: 科学出版社, 1995
- [2] 丛佩华, 吴禄平, 景士西. 2n 配子的发生及在果树育种中的应用 [J]. 果树科学, 1998 15(4): 347-353
- [3] 唐仙英, 罗正荣, 蔡礼鸿. 植物未减数配子及其应用研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 1999 17(增): 1-7
- [4] 屈冬玉. 2n 配子在马铃薯育种中的应用 [J]. 马铃薯杂志, 1988 2(2): 102-105
- [5] 李云. 杨树三倍体选育研究进展 [J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 451-458
- [6] 杨今后, 杨新华. 桑树雄配子人工二倍化培育优良三倍体的研究 [J]. 桑业科学, 2001 27(3): 177-180
- [7] 谷晓峰, 罗正荣. ‘禅寺丸’甜柿 2n 花粉形成机制的研究 [J]. 园艺学报, 2003 30(2): 135-140
- [8] 张成合, 田书兴. 大白菜 2n 配子发生的遗传分析 [J]. 园艺学报, 2000 27(4): 295-296
- [9] 张新忠, 刘国俭. 热激处理对桃、李离体花枝 2n 花粉产生的影响 [J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 292-293
- [10] 汪卫星, 郭启高, 向素琼, 等. 热激处理对枇杷 2n 花粉发生率的影响 [J]. 果树学报, 2003 20(4): 284-286
- [11] 李斌, 石荫坪, 束怀瑞. 利用苹果花粉粒形态进行倍性鉴定 [J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 133-138
- [12] 吕文河, 王亮, 陈伊里, 等. 二倍体马铃薯主要农艺形状及 2n 花粉频率的表现 [J]. 马铃薯杂志, 1999 13(2): 67-70
- [13] CARPUTO D, BARONE A, FRUSCIANTE L. 2n gametes in the potato: essential ingredients for breeding and gemplasm transfer [J]. Theor Appl Genet 2000 101: 805-813
- [14] VEILLEUX R E. Diploid and polyploid gamete in crop plant: mechanisms of formation and utilization in plant breeding [J]. Plant Breeding Reviews 1985, 3 255-288
- [15] VORSA N, ORTIZ R. Cytology of 2n pollen formation in a blueberry aneuploid (2n = 4x + 9 + 57) [J]. Hered 1992 83: 346-349
- [16] ORTIZ R, BRUEDERLE L P, LAVERTY T, et al. The origin of polyploidy via 2n gamete in Vaccinium section Cyanococcus [J]. Euphytica 1992 a 61 241-246
- [17] SUGIURA A. Pollen nuclear number in bur Dispyros species [J]. HortScience 1998 33(1): 149-150
- [18] CONCIELLA C G, ERICO A. Meiotic restitution mechanisms and 2n pollen formation in a Solanum tuberosum dihaploid and in dihaploid x wild species hybrids [J]. Plant Breeding 1996 115: 157-161
- [19] 唐仙英, 罗正荣. 甜柿 2n 花粉形成的细胞学机理研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 585-588
- [20] MENDIBURU A O, PELOQUIN S J. Bilateral sexual polyploidization in potatoes [J]. Euphytica 1977, 26 573-583
- [21] HUSSAN S W. Evidence of functional unreduced gametes in *Trifolium repens* L. [J]. Euphytica 1997, 97 21-24
- [22] 肖亚琼, 郑思乡, 赵雁, 等. 马利筋多倍体诱导研究初报 [J]. 云南农业大学学报, 2006 21(2): 263-266
- [23] 郑思乡, 向仕华, 章海龙, 等. 东方百合 2n 雌配子诱导及三倍体多样性研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005 20(3): 309-312