

小花盾叶薯蓣减数分裂与雄配子发育细胞学观察

董志渊, 郭华春*

(云南农业大学农学与生物技术学院薯类作物研究所, 昆明 650201)

摘要: 运用压片法对小花盾叶薯蓣 (*Dioscorea parviflora* C. T. Ting) 小孢子减数分裂与雄配子体发育进行研究。结果表明: 小花盾叶薯蓣细胞减数分裂中期 II 染色体排列主要有 4 种类型: 平行型、“八”字型、垂直(同面)、垂直(异面); 四分体有 3 种类型: 左右对称型、四面体型、交叉型; 小花盾叶薯蓣雄配子发育可分为 5 个时期: 单核居中期、单核靠边期、单核后期、双核初期和双核期。同时型胞质分裂和 2-细胞型花粉证实了小花盾叶薯蓣所在薯蓣科是较原始的被子植物; 小花盾叶薯蓣减数分裂中期 II 染色体排列多样性与 2n 配子发生无关。

关键词: 小花盾叶薯蓣; 减数分裂; 雄配子

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)01-0024-05

Cytological Studies on the Meiosis and Male Gametophyte Development of *Dioscorea parviflora*

DONG Zhi-yuan, GUO Hua-chun*

(Institute of Root and Tuber Crops, College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China)

Abstract: The meiosis and male gametophyte development of *Dioscorea parviflora* were studied using squash preparation. The results showed that there were four types of chromosome configuration at the metaphase II, such as parallel-type, triangle-type, vertical-type (one plate) and vertical-type (two plate). The microspores in tetrad stage showed three arrangements, such as isobilateral tetrad, decussate tetrad, and tetrahedral tetrad. The male gametophyte development of *D. parviflorata* could be divided into 5 stages, including unicleate central-located stage, unicleate side-located stage, late-unicleate stage, pre-bicleate stage, and bicleate stage. Cytokinesis of microspore mother cells during meiosis was simultaneous type, and pollen grains were 2-cell, it suggested that the Dioscoreaceae was rather primitive in Angiosperm. The diversity of chromosome configurations at the metaphase II had no relationship with the formation of 2n gametes.

Key words: *Dioscorea parviflora*; Meiosis; Male gametophyte

小花盾叶薯蓣 (*Dioscorea parviflora*) 又名苦良姜, 为云南省所特有的薯蓣科薯蓣属根状茎组植物, 它与湖北、陕西、四川等地所产的盾叶薯蓣 (*D. zingiberensis*) 形态相似, 但叶片呈卵形或卵圆形, 花小, 蒴果通常圆形。主要分布在云南泸水、永胜、开远、弥勒等县, 多生长在海拔 400~2 000 m 的石灰岩干热河谷地区的稀疏灌丛或竹林中。小花盾叶薯蓣的薯蓣皂甙元含量约 3.4%~3.9%, 是合成甾体避孕药和激素药的重要原料植物^[1-2]。薯蓣为雌

雄异株, 异花授粉植物, 植株间存在基因型差异, 导致植株间薯蓣皂甙元含量的差异^[3]。由于作为甾体药源的薯蓣属植物的利用时间较晚, 目前仍主要通过采挖野生资源以及野生植株人工引种栽培; 育种研究工作刚起步, 主要集中在单株选育和多倍体诱变方面^[4-7]; 杂交育种工作开展较少。杂交育种作为作物育种的主要途径和手段也必将是薯蓣新品系选育的重要途径, 20 世纪 60 年代 Matin 将美洲两种甾体含量较高的种类进行杂交 (*D.*

composita × *D. floribunda*), 能成功结实^[1]。因此可利用我国丰富的薯蓣属植物种质资源, 进行种内和种间杂交, 性状互补, 选育高产高含量的优良薯蓣新品种。但薯蓣胚胎学、遗传学等方面的基础研究较少, 不利于薯蓣育种工作的开展。本研究以云南特有的重要甾体药源薯蓣属植物小花盾叶薯蓣为材料, 观察研究小孢子与雄配子的发育过程, 为进一步的杂交育种、良种选育工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

云南农业大学薯类作物研究所从云南丽江地区引种栽培的小花盾叶薯蓣(*Dioscorea parviflora* C. T. Ting)株系。

1.2 花粉母细胞减数分裂的观察

在2005年6~11月和2006年3~6月期间, 采用压片法对小花盾叶薯蓣雄花花蕾进行减数分裂细胞学观察。上午9点至10点采集穗状花序, 卡诺氏固定液 I (无水酒精: 冰醋酸 = 3:1) 固定 12~24 h, 切取花蕾, 在解剖镜下取出花药, 然后用卡宝品红染液染色 5 min, 压片, 在光学显微镜下, 进行减数分裂细胞学观察, 主要观察减数分裂的基本过程、中期 II 染色体排列方式、四分体类型等。

1.3 雄配子发育的观察

2006年6~11月期间, 采用压片法对小花盾叶薯蓣雄花花蕾进行雄配子发育细胞学观察。上午9点至10点采集穗状花序, 卡诺氏固定液 II (无水酒精: 冰醋酸: 氯仿 = 6:1:3) 固定 12~24 h, 用蒸馏水冲洗 5 次, 媒染剂 4% 硫酸铁铵染色 4 h, 蒸馏水冲洗 2 h, 0.5% 的苏木精染色 2 h, 蒸馏水冲洗后解剖镜下剥离花瓣取出花药, 45% 冰乙酸压片, 在光学显微镜下, 对雄配子发育进行细胞学观察。

2 结果

2.1 花粉母细胞的减数分裂

通过减数分裂细胞学观察, 观察到小花盾叶薯蓣减数分裂的各个主要时期。前期 I, 细线期细胞核核膜消失, 染色体相互紧密缠绕位于细胞一侧, 偶线期染色体逐步紧缩, 同源染色体开始联会, 位于细胞中央, 粗线期染色体进一步短缩, 双线期染色体继续收缩变粗, 终变期染色体更加短粗, 10 个棒状二价体更加清晰(图版 I: 1~5); 中期 I: 二价

体排列在赤道板上(图版 I: 6); 后期 I: 在纺锤丝的作用下, 同源染色体移向两极, 完成染色体数目减半(图版 I: 7~8); 末期 I: 染色体松开变细, 核仁和核膜重新出现, 形成两个子核(图版 I: 9); 前期 II: 染色体缩短(图版 I: 10); 中期 II: 染色体排列在赤道板上(图版 I: 11~14); 后期 II: 姐妹染色单体在纺锤丝的牵引下分别移向两极(图版 I: 15~18); 末期 II: 核仁和核膜重新出现, 1 个母细胞分裂成为 4 个子细胞(图版 I: 19~21); 减数分裂结束后, 进入四分体时期(图版 I: 然后 22~24)。

2.2 减数分裂中期 II 染色体排列的多样性

小花盾叶薯蓣中期 II 染色体排列一般包括以下几个类型: 平行型、“八”字型、垂直型(包括同面垂直和异面垂直)(图版 I: 11~14), 同一株系里, 可能存在两种或两种以上的类型, 但主要是以平行型和“八”字型为主, 分别占 69.53% 和 19.32%, 相应地在后期 II (图版 I: 15~18), 末期 II (图版 I: 19~21), 四分体存在多种类型, 四分体类型主要包括左右对称型、交叉型、四面型, 以左右对称型和四面型为主(图版 I: 11~14)。

2.3 减数分裂过程中的胞质分裂类型

在小花盾叶薯蓣绝大部分株系和单株, 其减数分裂过程中的胞质分裂类型为同时型, 即减数分裂第一次分裂后不形成细胞壁, 在第二次分裂中, 两个核同时进行分裂, 分裂完成时在四个核之间产生壁, 形成四分体。

2.4 雄配子发育

小花盾叶薯蓣雄配子发育可分为如下 5 个时期:

单核居中期: 胼胝质壁溶解, 单核花粉粒从四分体中游离出来, 释放到花粉囊中, 刚游离出来的花粉粒细胞壁薄, 细胞质浓厚, 核位于细胞中央(图版 I: 25)。

单核靠边期: 细胞质中前液泡形成许多小液泡, 随着小液泡的合并, 中央大液泡出现, 细胞核及细胞质被逐渐挤到一侧(图版 I: 26)。

单核后期: 液泡消失, 细胞核染色较深, 较清晰, 细胞核为圆形, 且较大, 核仁明显, 细胞质浓厚(图版 I: 27)。

双核初期: 细胞核进行一次有丝分裂(图版 I: 28~29), 有丝分裂结束后形成 2 个子核, 其中 1 个贴近花粉粒的壁, 呈凸透镜状, 即生殖核; 另 1 个占

有大部分细胞质,体积大,核位于花粉中央,为营养核。两核之间有明显的细胞壁(图版 I:30~33)。

双核期:生殖细胞脱离花粉内壁,游离在营养细胞的细胞质中,形成 2-细胞型成熟花粉(图版 I:34)。

3 讨论

薯蓣不但显示出单子叶植物的一些原始性状,而且还具有双子叶植物的某些原始性状,被认为是较原始的被子植物之一^[8]。本研究对小花盾叶薯蓣雄花小孢子与雄配子发育过程进行了观察,为探讨小花盾叶薯蓣及其分类群在植物界中的地位具有一定价值。一般来说,胞质分裂连续型存在大多数的单子叶植物中,同时型常出现在双子叶植物中^[9];系统发育原始的种均为 2-细胞型^[10]。本研究的小花盾叶薯蓣胞质分裂为同时型,花粉为 2-细胞型。徐静等^[11]的研究也表明同属植物盾叶薯蓣(*D. zingiberensis*)的胞质分裂为同时型,成熟花粉为 2-细胞型。上述两种较原始的薯蓣属植物小孢子和雄配子发育特征进一步证实了其在薯蓣科可能发生于被子植物进化的较早时期。

本研究表明小花盾叶薯蓣细胞减数分裂中期 II 的染色体排列存在多种形式,即平行型、“八”字型、垂直型(包括同面垂直和异面垂直)等。在青花菜(*Brassica oleracea*)、萝卜(*Raphanus sativus*)中存在平行型、垂直型和“八”字型 3 种类型^[12-13]。本文对小花盾叶薯蓣减数分裂进行研究主要是为 2n 配子形成细胞学机制研究和 2n 配子人工诱导做一些前期工作。2n 配子也称作未减数配子,即具有孢子体染色体数目的配子。减数分裂四分体时期的二分体、三分体等变异类型的产生是 2n 配子发生的重要细胞学证据。在一些植物中,减数分裂中期 II 染色体呈平行型排列,后期 II 同一纺锤丝牵引方向的染色体融合形成 2n 配子。在 *Trifolium pratense*、草莓(*Fragaria vesca*)、甜柿(*Diospyros kaki*)、甘薯(*Ipomoea batatas*)、苜蓿(*Medicago sativa*)中发现中期 II 染色体平行型排列导致二分体的形成^[14-18]。小花盾叶薯蓣中期 II 染色体虽以平行型排列为主,但在四分体时期却未发现相应比例的二分体,这可能是在中期 II,同一花粉母细胞的两染色体组距离较远,很难产生染色体的融合。Ramama 等^[19]认为马铃薯中平行型染色体排列与 2n 配子的形成无必然的联系,而纺锤体融合即染色体融合对 2n 配子

的发生起关键作用。本研究在小花盾叶薯蓣中未发现染色体融合现象。另外,*Trifolium pratense*、甘薯、甜柿、草莓中期 II “八”型的染色体排列也与 2n 配子的发生有着密切的联系^[14-18,20]。中期 II 的两组染色体呈“八”字型排列在赤道板上,在后期四组染色体移向 3 极,其中 1 极包含两组染色体,另两极分别包含 1 组染色体,最终产生三分体。本研究表明在小花盾叶薯蓣中期 II 存在一定比例的“八”字型染色体排列,末期 II 时同一极的两个细胞核相互靠近,但未发现染色体的融合,仍为独立的两个细胞核,在四分体时期未发现相应比例的三分体,这可能是两染色体组不位于同一平面,形成了四面体型四分体。但本研究在一些株系中也发现少量的二分体、三分体和一分体等四分体时期变异类型,因此,关于小花盾叶薯蓣 2n 配子形成的细胞学机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 丁志遵,唐世蓉,秦慧贞. 甾体激素药源植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 14-108.
- [2] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 6 (3) [M]. Beijing: Science Press, 1985: 64-66. (in Chinese)
- [3] Xue Y (薛焱), Qin T C (秦天才), Zhang Y D (张有德). RAPD analysis of genetic relationship among *Dioscorea zingiberensis* with different disgenin [J]. Chin Trad Hereal Drug (中草药), 2006, 37(1): 115-118. (in Chinese)
- [4] Wang Z A (王志安), Wang R Z (王日照). Selecting new species of *Dioscorea zingiberensis* contained high saponin by tissue culture [J]. Chin Trad Hereal Drug (中草药), 2002, 33(4): 361-363. (in Chinese)
- [5] Liu X M (刘选明), Li G M (李光明), Qin Y Z (秦玉芝), et al. Studies on the technique to induce polyploid of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright *in vitro* [J]. J Hunan Univ (Nat Sci) (湖南大学学报: 自然科学版), 2004, 31(3): 19-22. (in Chinese)
- [6] Li Y H (李运合), Hu C G (胡春根), Yao J L (姚家玲), et al. Inducement of tetraploid *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chin Trad Hereal Drug (中草药), 2005, 36(3): 434-438. (in Chinese)
- [7] Zheng S X (郑思乡), Wu F C (吴福川), Xie S Q (谢世清), et al. Polyploidy induction of *Dioscorea parviflora* and its cytological observation [J]. SW China J Agri Sci (西南农业学报), 2005, 18(6): 822-824. (in Chinese)
- [8] Coursey D G. *Dioscorea* spp. (Dioscoreaceae) [M]// Simmonds N G. Evolution of Crop Plants. London: Longman Group Ltd., 1976: 70-73.
- [9] 胡适宜. 被子植物胚胎学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1982: 20-37.
- [10] Brewbaker J K. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms [J].

- Amer J Bot, 1967, 54: 1069–1083.
- [11] Xu J(徐静), Qin T C(秦天才), Zhang Y D(张友德). Study on the microspore genesis and the development of male-gametogenesis of *Dioscorea zingiberensis* [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2006, 34(6): 1195–1197, 1237.(in Chinese)
- [12] Wan S F(万双粉), Zhang S N(张蜀宁*), Zhang J(张杰). Pollen mother cell mitosis and male gametophyte development in *Brassica oleracea* L.var. *italica* Plenck [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin(西北植物学报), 2006, 26(5): 970–975.(in Chinese)
- [13] Zhang W(张伟), Zhang S N(张蜀宁*), Zhang H L(张红亮). Pollen mother cell mitosis and male gametophyte development of *Raphanus sativus* L. [J]. J Nanjing Agri Univ(南京农业大学学报), 2007, 30(1): 38–41.(in Chinese)
- [14] Parrote W A, Smith R R. Reproduction of 2n pollen in red clover [J]. Crop Sci, 1984, 24: 469–472.
- [15] Tavoletti S, Mariani A, Veronesi F. Cytological analysis of macro- and microsporogenesis of a diploid alfalfa clone producing male and female 2n gametes [J]. Crop Sci, 1991, 31: 1258–1263.
- [16] Becerra L L A, Orjeda G. Occurrence and cytological mechanism of 2n pollen formation in a tetraploid accession of *Ipomoea batatas* (sweet potato) [J]. J Hered, 2002, 93(3): 185–192.
- [17] Shi C P(时翠平), Ge H B(葛会波), Zhang C H(张成合), et al. Cytological studies on unreduced gamete formation of strawberries (*Fragaria*) [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 2002, 35(10): 1260–1263.(in Chinese)
- [18] Tang X Y(唐仙英), Luo Z R(罗正荣). Cytology of 2n pollen formation in nonstringent persimmon [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 2002, 35(5): 585–588.(in Chinese)
- [19] Ramarna M S. A re-examination of the mechanisms of 2n gamete formation in potato and its implications for breeding [J]. Euphytica, 1979, 28: 537–561.
- [20] Gu X F(谷小峰), Luo Z R(罗正荣). Studies on abnormal meiosis producing 2n pollens in nonstringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2003, 30(2): 135–140.(in Chinese)

图版说明

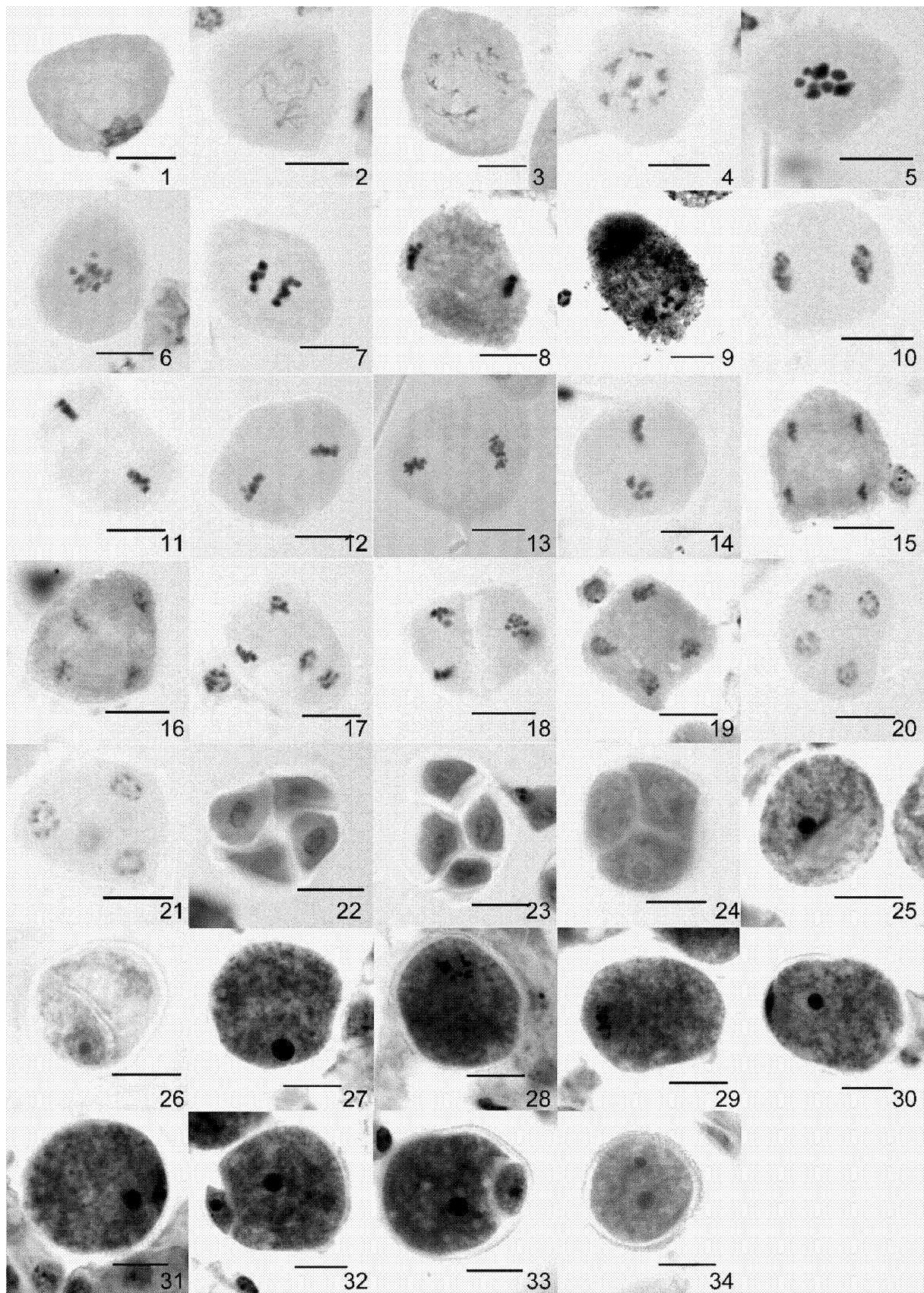
图版 I

1~24: 小花盾叶薯蓣减数分裂过程; 1. 细线期; 2. 偶线期; 3. 粗线期; 4. 双线期; 5. 终变期; 6. 中期 I; 7~8. 后期 I; 9. 末期 I; 10. 前期 II; 11~14. 中期 II; 11. 左右对称型; 12. “八”字型; 13. 垂直型(同面); 14. 垂直型(异面); 15~18. 后期 II; 19~21. 末期 II; 22~24. 四分体时期; 22. 左右对称型; 23. 交叉型; 24. 四面体型; 25~34: 小花盾叶薯蓣雄配子发育过程; 25. 单核居中期; 26. 单核靠边期; 27. 单核后期; 28~29. 有丝分裂; 30~33. 双核初期; 34. 双核期。标尺 = 10 μm

Explanation of plate

Plate I

1 ~ 24. The meiotic process of *D. parviflora* C. T. Ting; 1. Leptonene; 2. Zytonene; 3. Pachytene; 4. Diplotene; 5. Diakinesis; 6. Metaphase I; 7 ~ 8. Later-anaphase I; 9. Telophase I; 10. Prophase II; 11 ~ 14. Metaphase II; 11. Parallel-type; 12. Triangle-type; 13. Vertical-type(one plate); 14. Vertical-type (two plate); 15 ~ 18. Anaphase II; 19 ~ 21. Telophase II; 22 ~ 24. Tetrad; 22. Isobilateral tetrad; 23. Decussate tetrad; 24. Tetrahedral tetrad; 25 ~ 34. The basic male gametophyte development of *D. parviflora* C. T. Ting; 25. Uniclete central-located stage; 26. Uniclete side-located stage; 27. Late-uniclete stage; 28 ~ 29. Mitosis; 30 ~ 33. Pre-bileate stage; 34. Bileate stage. Bar = 10 μm



董志渊等:图版 I

DONG Zhi-yuan, et al.: Plate I