

石竹花粉母细胞减数分裂的观察

魏跃^{1,2}, 陈啸寅^{1*}, 张蜀宁^{2*}, 李玉进¹

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400; 2. 南京农业大学, 南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 采用常规压片法对石竹(*Dianthus chinensis* L.)花粉母细胞减数分裂进行了细胞学观察。结果表明, 减数分裂过程中存在二价体提前分离、赤道板外染色体、落后染色体、染色体不均等分离等异常现象, 各时期的畸形率都低于3%, 石竹的减数分裂过程基本正常, 石竹染色体数目 $2n=2x=30$ 。

关键词: 石竹; 花粉; 染色体; 细胞学

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.02.003

Observation of Pollen Mother Cell Meiosis in *Dianthus chinensis* L.

WEI Yue^{1,2}, CHEN Xiao-yin^{1*}, ZHANG Shu-ning^{2*}, LI Yu-jin¹

(1. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China; 2. Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetics Improvement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The meiotic process of pollen mother cells in *Dianthus chinensis* L. was observed by traditional squash method. The results showed that abnormal phenomena, such as bivalent separated in advance, chromosomes scattered outside equatorial plate, lagging chromosomes and chromosome uneven separation, occurred in the process of meiosis. The meiotic process of *D. chinensis* was generally normal due to abnormality rate at different development stages below 3%. The chromosome number of *D. chinensis* was $2n=2x=30$.

Key words: *Dianthus chinensis* L.; Pollen; Chromosome; Cytology

石竹(*Dianthus chinensis* L.)别名中国石竹, 为石竹科(Caryophyllaceae)石竹属多年生宿根草本, 茎直立或基部呈现匍匐状, 单叶对生线状披针形, 花单生或数朵组成聚伞花序, 花瓣为5, 先端有锯齿, 花色以白色、红色为主, 稍有香气。石竹适应性强、栽培管理容易, 花期较长, 5-10月开花不断, 花色艳丽, 为花坛、广场绿地等常用绿化植物和重要的观赏花卉。

目前国内对石竹的研究多集中在形态分类^[1-2]、引种^[3]、组织培养^[4]以及新品种选育^[5]等方面, 而有关其细胞学研究还未见报道。本研究采用常规压片技术, 对石竹的花粉母细胞减数分裂进行细胞学观察, 以期完善其染色体相关资料, 为其小孢子培养单倍体育种、细胞遗传学、染色体工程

和系统进化研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为石竹(*Dianthus chinensis* L.)品种地锦, 引自江苏省镇江丘陵地区农业科学研究所, 种植于江苏农林职业技术学院园艺试验基地。

1.2 方法

于2010年5-6月间取长度为7~13 mm的幼蕾, 用卡诺固定液(无水乙醇: 冰醋酸=3:1)固定24 h, 经95%、80%乙醇冲洗后转入70%乙醇中于4℃保存备用。采用1%醋酸洋红溶液进行染色压片, 火焰微烤分色^[6], 用德国ZEISS.Imager.A₁光学显微镜镜检并照相。减数分裂各时期分别选取30

收稿日期: 2011-04-11 接受日期: 2011-06-19

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(SBK20082174)资助

作者简介: 魏跃(1970~), 男, 博士, 副教授, 主要从事园艺花卉遗传与育种研究。E-mail: weiyue12170059@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenxy08@126.com; snzhang@njau.edu.cn

个视野,至少观察 200 个细胞,统计各时期的染色体行为异常率,异常率(%) = 染色体异常的细胞数/各时期观察的细胞总数 × 100%。

2 结果和分析

2.1 第一次减数分裂

2.1.1 前期 I

细线期 减数分裂开始,细胞核增大,核内染色质浓缩,细丝状染色体缠绕成线团状且染色较深,常游离于核膜的一侧(图 1:1)。

粗线期 核内同源染色体联会配对,染色体开始分散,稍有缩短和增粗,可以看清线条状染色体,但染色体仍为较长的细线,光镜下无法辨认染色单体(图 1:2)。粗线期后期染色体明显缩短变粗且染色较深,二价体仍然交错缠绕在一起,不易辨别(图 1:3)。

终变期 染色体超螺旋化长度缩至最短,二

价体显著变粗变短并向核周边移动,此期可清晰辨认出核内有 15 个二价体,证实石竹染色体数目为 $2n=2x=30$,可见终变期有利于进行染色体计数(图 1:4)。二价体构型主要为棒状,部分二价体结构较松散不紧密。

2.1.2 中期 I

配对的二价体聚集排列于赤道板上(图 1:5),从侧面可见纺锤体(图 1:6,7),此时染色体重叠不利于计数。有少数同源染色体提前分离(图 1:7),还有少数细胞出现没有排列在赤道板上的染色体,数目为 1~2 不等(图 1:8),此期染色体行为异常率约为 1.9%。

2.1.3 后期 I

二价体分离,大多数细胞中同源染色体能够均等分向两极(图 1:9),少数细胞中出现落后染色体(图 1:10,11),此期染色体行为异常率约为 1.6%。

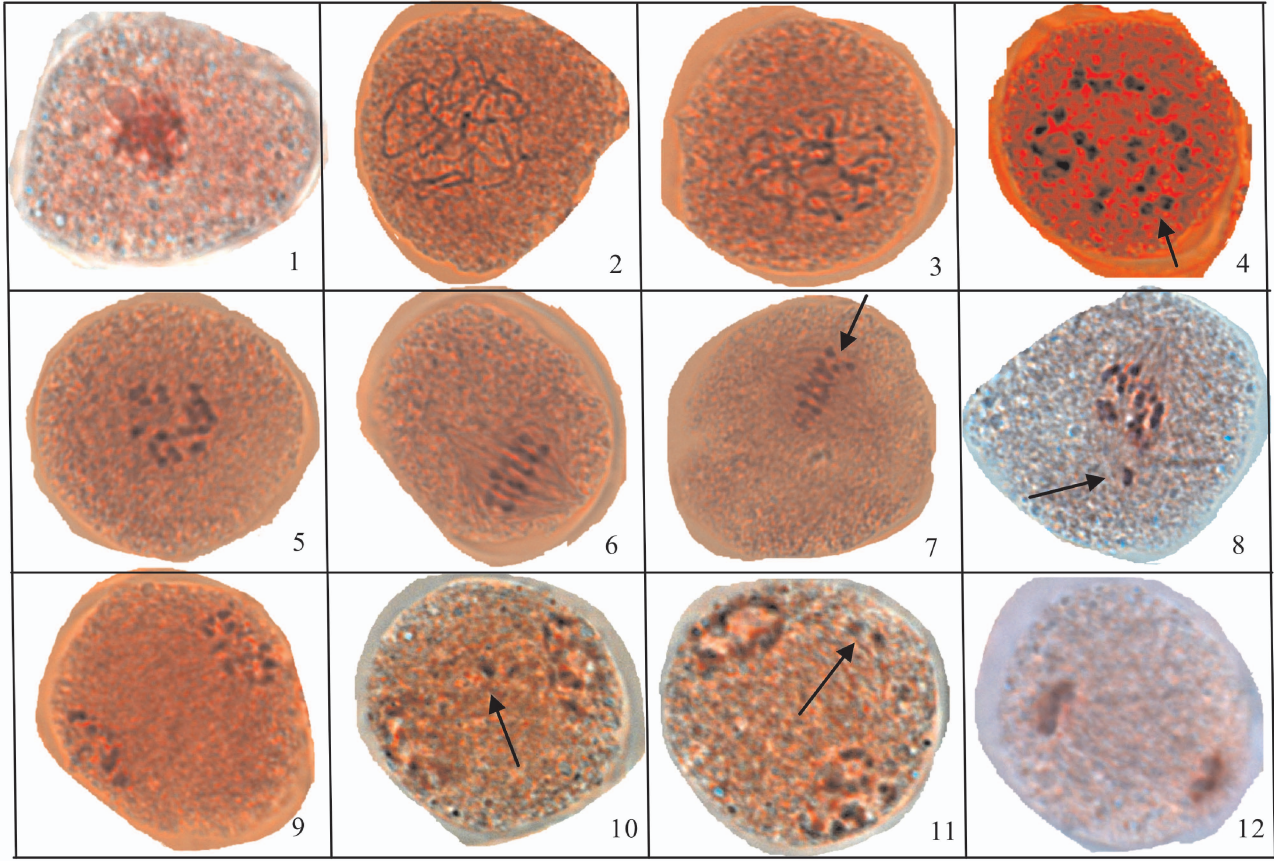


图 1 石竹第一次减数分裂过程。1. 细线期;2. 粗线期;3. 粗线期后期;4. 终变期,箭头示二价体结构不紧密;5~8. 中期 I,5. 极面观;6~7. 侧面观;7. 箭头示二价体提前分离;8. 箭头示赤道板外染色体;9. 后期 I;10~11. 后期 I,箭头示落后染色体;12. 末期 I;1~12. ×1230

Fig. 1 Meiosis I process of pollen mother cells in *Dianthus chinensis*. 1. Leptonene; 2. Pachytene; 3. Late stage of pachytene; 4. Diakinesis, showing loose structure of bivalents (arrow); 5~8. Metaphase I, 5. Polar view; 6~7. Side view; 7. Showing bivalents separated in advance (arrow); 8. Showing chromosomes outside metaphase plate (arrow); 9. Anaphase I; 10~11. Anaphase I, showing lag chromosome (arrow); 12. Telophase I; 1~12. ×1230

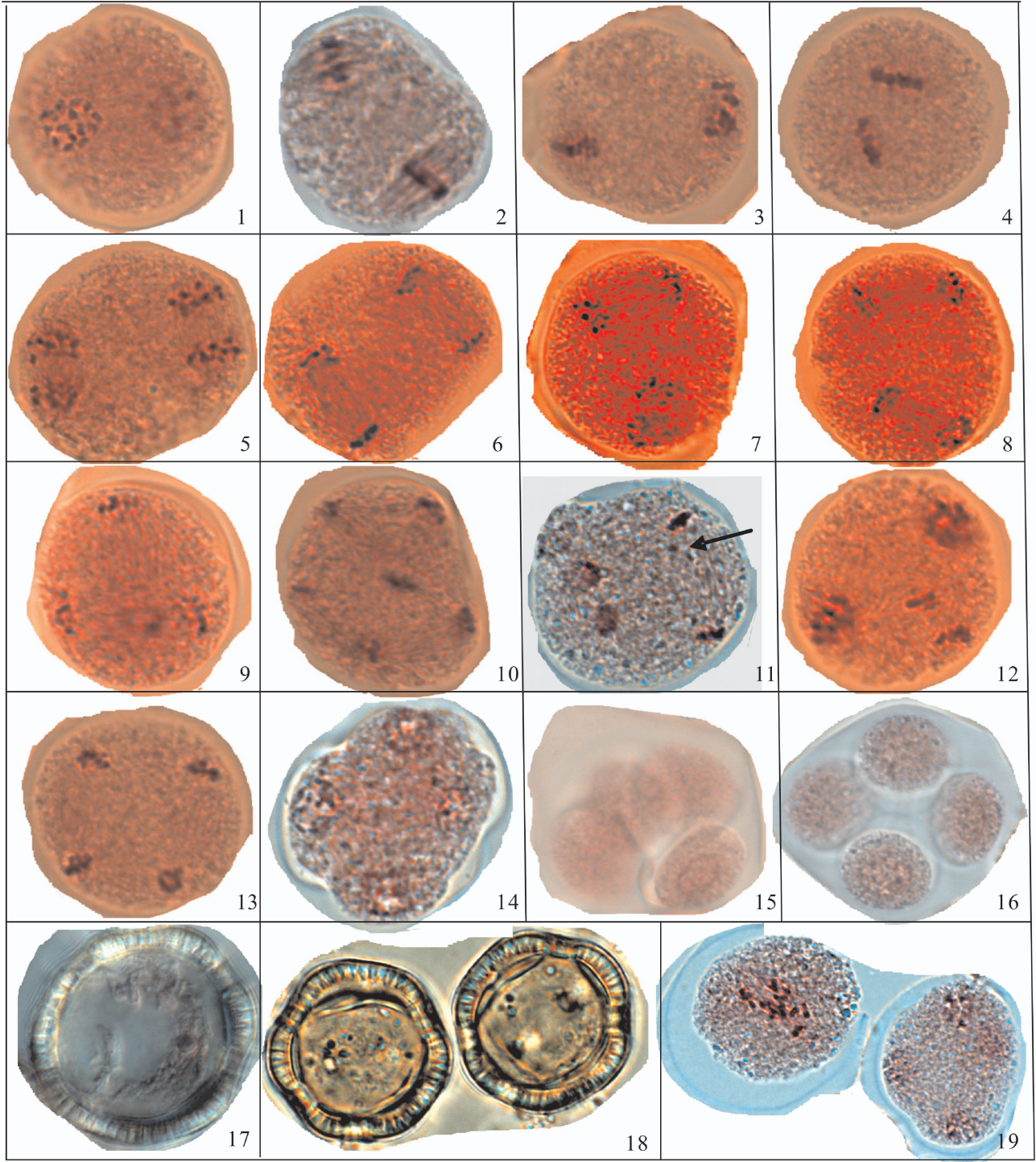


图2 石竹第二次减数分裂过程。1~4. 中期Ⅱ, 1. 极面观; 2. 赤道板相互平行; 3. 赤道板相互垂直; 4. 赤道板呈“八”字形; 5~12. 后期Ⅱ, 5~6. 纺锤体平行; 7. 纺锤体垂直型; 8~9. “八”字形纺锤体; 10. 多极; 11. 箭头示落后染色体; 12. 染色体不均等分裂; 13. 末期Ⅱ; 14~16. 四分体时期, 14. 胞质分裂; 15. 正四面体型四分体; 16. 十字交叉型四分体; 17. 单核靠边期; 18. 成熟花粉; 19. 中期Ⅰ和后期Ⅱ共存于同一花药内。1~17. ×1230; 18. ×960; 19. ×850

Fig. 1 Meiosis II process of pollen mother cells in *Dianthus chinensis*. 1~4. Metaphase II, 1. Polar view; 2. Parallel equatorial plate; 3. Vertical equatorial plate; 4. Eight-shape equatorial plate; 5~12. Anaphase II; 5~6. Parallel spindle; 7. Vertical spindle; 8~9. Eight-shape spindle; 10. Multipole; 11. Lag chromosome (arrow); 12. Uneven separation of chromosome; 13. Telophase II; 14~16. Tetrad stage; 14. Cytokinesis; 15. Tetrahedral tetrad; 16. Decussate tetrad; 17. Late uninucleate stage; 18. Matured pollen; 19. Metaphase I and anaphase II coexist in the same anther. 1~17. ×1230; 18. ×960; 19. ×850

2.1.4 末期 I

同源染色体分别到达两极并解螺旋,细胞质不发生分裂、不形成二分体(图 1:12)。

2.2 第二次减数分裂

前期 II 这个时期很短暂,很快进入到中期 II。

中期 II 核内染色体逐渐重新凝缩和螺旋化,在核内分散分布,在极面观也可进行染色体计数,观察到一极中有 15 个单价体(图 2:1),表明石竹配子体的染色体数目为 $n=15$ 。从侧面观察到两组染色体分别聚集排列在各自的赤道板上,2 个赤道板的空间取向复杂,有平行(图 2:2)、垂直(图 2:3)和“八”字型(图 2:4)。

后期 II 姊妹染色单体在纺锤体牵引下正常分离,分别移向两端形成四极(图 2:5~12),纺锤体构型除了平行型(图 2:5,6)、垂直型外(图 2:7),还有“八”字型(图 2:8,9)。少数细胞出现多极(图 2:10)、落后染色体(图 2:11)和染色体不均等分离(图 2:12)等异常现象,染色体行为异常率约为 2.3%。

末期 II 染色单体分别到达 4 个极,染色体凝集并开始解螺旋(图 1:13)。

四分体时期 此时细胞质才开始分裂,胞质分裂属于同时型(图 2:14),形成四分体的 4 个小孢子被共同的胼胝质包被,各个小孢子之间也有胼胝质分割,四分体的排列方式有正四面体型(图 2:15)和十字交叉型(图 2:16)。

2.3 单核靠边期与成熟花粉

本研究表明,石竹的单核靠边期(图 2:17)的相应花蕾长度为 10~12 mm,宽度为 1.8~2.1 mm。植物单倍体诱导一般以小孢子单核靠边期为最佳阶段^[7],这为石竹小孢子培养提供了采样依据。在光镜下观察石竹成熟花粉粒为球形,花粉壁较薄且萌发孔内凹,一般具有 3~4 个萌发孔(图 2:18),萌发孔数目与大多数植物花粉相同。

3 讨论

在石竹减数分裂早期 I 的终变期(图 1:4)观察到有 15 个二价体,证明石竹为二倍体,且染色体数目为 $2n=2x=30$,与王莲英等的研究结果^[8]相符。经观察统计,二价体大多数结构松散并以棒状体为主要构型。终变期单价体与二价体容易区分,由于同源染色体彼此互相排斥且染色体尚未高度缢缩,

因此绝大部分的二价体构型清晰,终变期应为石竹二价体构型观察的最佳时期。第一次减数分裂后进入中期 II(图 2:1),已凝缩螺旋化的单价体彼此分离,在核内分布均匀容易分辨,此时也可进行染色体计数。

垂直型和平行型一般被认为是植物减数分裂过程中正常的纺锤体类型,石竹减数分裂的中期 II 和后期 II 除了有正常的垂直型和平行型纺锤体类型外,还有“八”字型纺锤体类型。张成合等^[9]认为“八”字型和近平行型纺锤体往往会导致末期 II 染色体融合,从而最终形成三分体和二分体,而三分体和二分体是植物 $2n$ 配子体发生的主要途径。在石竹减数分裂过程中观察到“八”字型纺锤体类型,这在理论上表明二倍体石竹花粉中有 $2n$ 配子体存在的可能性,但本试验中没有观察到 $2n$ 配子体,可能与品种类型、观察细胞数目不够多有关,“八”字型纺锤体类型是否一定导致 $2n$ 配子体产生也值得进一步研究。

有研究表明,在百合科(Liliaceae)百合(*Lilium davidii* var. *unicolor*)^[10]、葫芦科(Cucurbitaceae)黄瓜(*Cucumis sativus*)^[11]、十字花科(Brassicaceae)萝卜(*Raphanus sativus*)^[12]等植物的减数分裂过程中,观察到不同分裂时期共存于同一花药的现象。本研究在石竹减数分裂过程中也观察到此现象,如中期 I 和后期 II 同时存在于同一花药内(图 2:19)。有学者^[13]认为减数分裂的这种不同步性对其种群繁殖后代是有利的,可以扩展其花期、增加两性功能的有效作用时间,是一种适应当地环境条件的进化表现。

染色体不均等分离、落后染色体的出现和多极等行为会导致减数分裂发生异常而降低可育性,尽管石竹的减数分裂过程中也存在着上述畸变现象,但各时期的这些畸变比例非常低,均小于 3%,属于正常范围之内,因而石竹仍然能够保持较高的种子繁殖能力。

参考文献

- [1] Dong L X(董连新), Guan X L(关雪莲). Seed morphology of *Dianthus* and its significance for taxonomy [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2010, 30(3): 257-261.(in Chinese)
- [2] Dong L X(董连新), Guan X L(关雪莲). Pollen morphology of eight species of *Dianthus* from Xinjiang [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2009, 29(6): 647-650.(in Chinese)
- [3] Wu S J(武术杰). Introduction and cultivation of *Dianthus* sp. [J]. J NE For Univ(东北林业大学学报), 2007, 35(5): 84-86.

(in Chinese)

[4] Huang Y(黄莺), Fan Y P(范燕萍), Wang W S(王文生), et al. The induction of callus and plantlet regeneration in *Dianthus chinensis* [J]. J S China Agri Univ (Nat Sci)(华南农业大学学报: 自然科学版), 2003, 24(1): 50–52.(in Chinese)

[5] Wang C Q(王长泉), Song H(宋恒), Wang X F(王希峰), et al. Selection of salt tolerance variants from china pink [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2001, 28(5): 469–471.(in Chinese)

[6] 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 Boreal-Occid Sin(西北植物学报), 2006, 26(5): 970–975.(in Chinese)

[7] Feng J H(冯九焕), Lu Y G(卢永根), Liu X D(刘向东), et al. Pollen development and its stages in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chin J Rice Sci(中国水稻科学), 2001, 15 (1): 21 – 28. (in Chinese)

[8] Wang L Y(王莲英), Qin K J(秦魁杰), Wu D X(吴涤新), et al. Floriculture [M]. Beijing: China Forestry Publishers, 1988: 1–273.(in Chinese)

[9] Zhang C H(张成合), Shen S X(申书兴), Liu X M(刘学岷), et al. The formation of triad is the main way of $2n$ gamete formation in chinese cabbage [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 1999, 26(1): 76–80.(in Chinese).

[10] Zhang C X (张彩霞), Min J (明军), Li B S (李博生). Observation of meiosis and male gametophyte development in *Lilium* [J]. Biol Bull(生物学通报), 2009, 44(10): 53–56.(in Chinese)

[11] Cao Q H(曹清河), Chen J F(陈劲枫), Qian C T(钱春桃), et al. Cytological studies on meiosis and male gametophyte development in cucumber [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin(西北植物学报), 2004, 24(9): 1721–1726.(in Chinese)

[12] 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(3): 38–41.(in Chinese)

[13] Zhang Z M(张仲鸣), Sodmergen(苏都莫日根), Li Z L(李正理). Micronucleus formation in microspores of *Ginkgo biloba* L. and its significance in evolution [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1997, 39(2): 97–101.(in Chinese)