

同源四倍体胡萝卜的减数分裂行为观察

裴红霞, 庄飞云*, 欧承刚, 赵志伟

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以花药培养获得的同源四倍体胡萝卜 ($2n=4x=36$) 植株为试材, 对其花粉母细胞减数分裂行为进行观察, 发现其与正常二倍体胡萝卜存在较大差异: 前减数分裂间期及前期 部分花粉母细胞具有多核仁现象; 终变期、中期 除二价体外, 还观察到单价体及多价体联合会形式; 中期 和中期 分别有 23.00% 和 32.29% 细胞存在一些染色体 (1~6 条) 未排在赤道板上; 中期 染色体平均构型为 $0.86 + 4.01 + 2.99 + 1.89 + 0.81 + 1.09$; 后期 、后期 均观察到落后染色体或染色体桥现象, 以及染色体分离多极化现象。由于其异常减数分裂行为, 造成了四倍体胡萝卜的配子多样化, 花粉畸形, 育性低。

关键词: 胡萝卜; 同源四倍体; 减数分裂

中图分类号: S 631.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 12-1809-06

Meiosis of Pollen Mother Cells of Autotetraploid Carrot

PEI Hong-xia, ZHUANG Fei-yun*, OU Cheng-gang, and ZHAO Zhi-wei

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Chromosomes behaviors of pollen mother cells (PMCs) of autotetraploid carrot ($2n = 4x = 36$) were observed using enzymes digestion technique. There were more than two nucleoli in about 4.58% PMCs at premeiotic interphase and prophase . Besides bivalents, univalents and multivalents were observed at diakinesis and metaphase . Some chromosomes (about 1 to 6) were found not to rank on the metaphase plate in about 23.00% PMCs at metaphase and 32.29% PMCs at metaphase , respectively. The average chromosome configuration was $0.86 + 4.01 + 2.99 + 1.89 + 0.81 + 1.09$. Chromosome lagging, chromosome bridge and spindle mis-orientation were also observed. Abnormal chromosome behavior of PMCs was reason for polymorphism of male gametophytes and lower fertility of pollen in autotetraploid carrot.

Key words: carrot; autotetraploid; meiosis

胡萝卜属 (*Daucus*) 除了 *D. glochidiatus* Labill ($2n=4x=44$) 和 *D. montanus* Humb. & Bonpl ($2n=6x=66$) 为多倍体外, 其他种均为二倍体。栽培胡萝卜 (*Daucus carota* L. var *sativa* DC.) 是野生胡萝卜种 (*Daucus carota* L.) 的一个变种, 基因狭窄, 从野生种导入优良抗性基因一直是育种者关注的问题。同源四倍体胡萝卜材料将为深入开展远缘杂交研究奠定良好基础, 但国内外尚未见相关报道。

本课题组通过多年花药培养试验, 获得了同源四倍体胡萝卜材料, 但其存在的花粉畸形、结实能力低等问题, 限制了材料的进一步利用。本试验中从细胞学水平上探讨同源四倍体胡萝卜花粉败育的

收稿日期: 2008 - 08 - 06; 修回日期: 2008 - 11 - 03

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD13B06); 农业部 '948' 项目 (2006-G13); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (082060302-06); 农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fy_zhuang@caas.net.cn)

原因,为进一步改善其育性提供理论依据。

1 材料与方 法

试验所采用的原始二倍体胡萝卜材料 HCM A. C., 由美国威斯康星大学 Philipp W. Simon教授提供, 本课题组通过花药培养获得了四倍体植株。

2007年 3月将四倍体种根移栽到中国农 业科学院蔬菜花卉研究所试验基地, 5月抽 薹开花。上午 8: 00—10: 00取适宜大小的花序, 用卡诺溶液 (无水乙醇 冰醋酸 =3 1) 固定过夜, 转至 70%酒精, 4 ℃下保存备用。

取出花药, 蒸馏水清洗 3次, 置于酶液 (4%纤维素酶与 1%果胶酶, 用柠檬酸缓冲液溶解), 37 ℃水浴锅中酶解 120~150 min, 再用蒸馏水清洗 3次, 将花药从中部切开, 用镊子轻轻挤压, 采用卡宝品红染色制片, 在 ZEISS显微镜 (Axioskop 40) 下观察并照相。每个分裂时期至少观察 100个以上花粉母细胞, 进行统计分析。

选择较大花序观察花粉的形态及其育性, 采用醋酸洋红染色, 盖上玻片, 显微镜下观察并统计, 共观察 50个视野。

2 结果与分析

2.1 多核仁及多价体现象

在前减数分裂间期和前期, 发现一些细胞出现两个或两个以上的核仁 (图版, 1), 细胞比例达到 4.58%, 另外一些细胞的核仁呈不规则形状, 如三角形、短棒形 (图版, 2)。

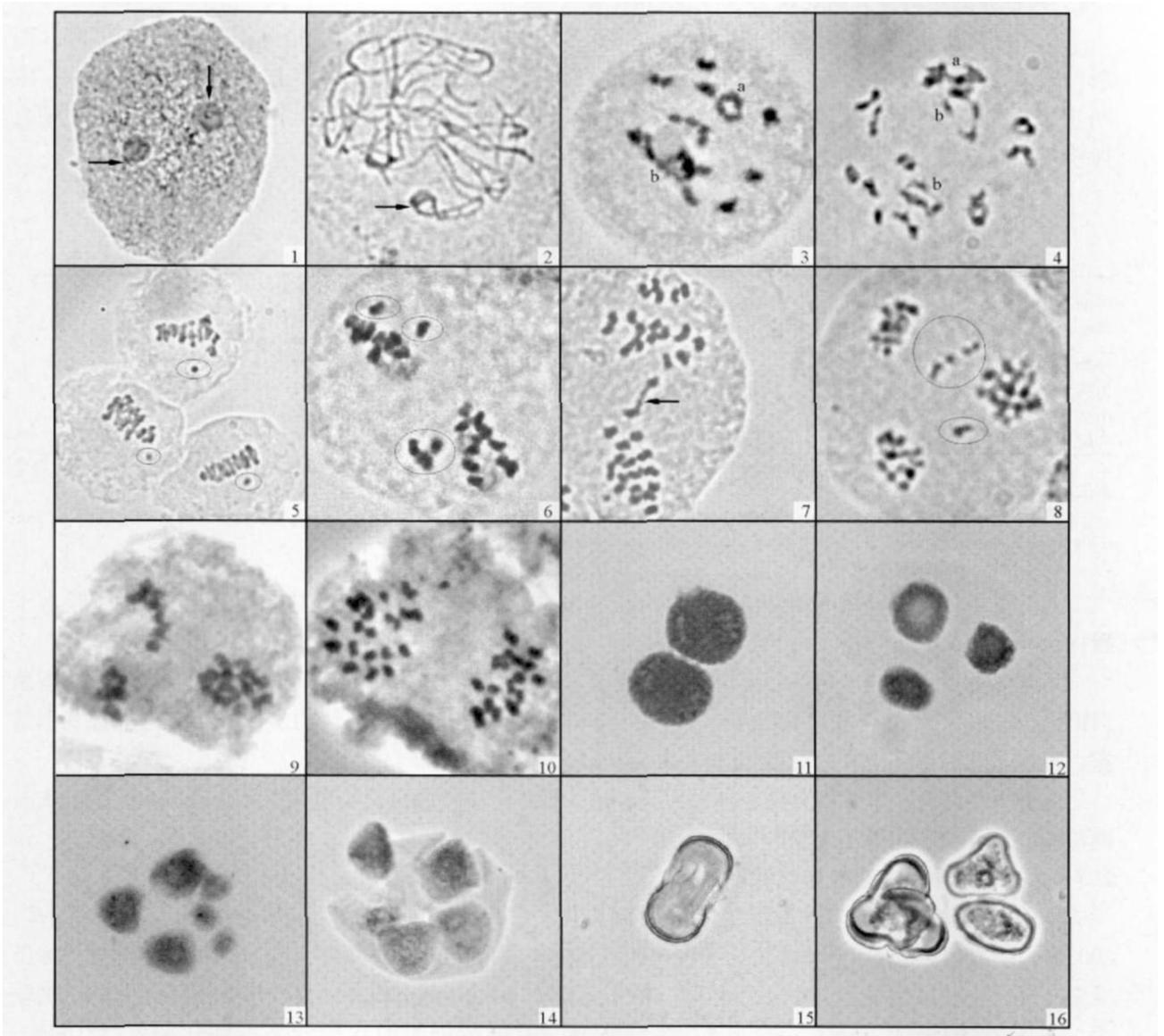
在双线期、终变期和中期, 花粉母细胞除了含有二价体以外, 均存在单价体及多价体 (图版, 3、4)。

中期, 单价体占到总染色体数的 2.39% (表 1)。终变期、中期, 五价体数分别占到了总染色体数的 11.39%和 11.25%, 六价体分别占 18.00%和 18.17%, 说明细胞内的非同源染色体之间存在着广泛的部分同源联会。

中期的染色体平均构型为 $0.86 +4.01 +2.99 +1.89 +0.81 +1.09$ (表 1)。

表 1 同源四倍体胡萝卜花粉母细胞的终变期和中期的染色体构型
Table 1 Chromosome configurations at diakinesis and metaphase in autotetraploid carrot

构型 Configuration	终变期 Diakinesis		中期 Metaphase	
	平均数 Mean number	比例 / % Rate	平均数 Mean number	比例 / % Rate
	0.70	1.94	0.86	2.39
	4.03	22.39	4.01	22.28
	2.94	24.50	2.99	24.92
	1.96	21.78	1.89	21.00
	0.82	11.39	0.81	11.25
	1.08	18.00	1.09	18.17



图版说明：同源四倍体胡萝卜花粉母细胞减数分裂（1~10）及 n 分体、花粉的不同类型（11~16）

1. 前减数分裂间期，箭头所指示双核仁；2. 粗线期，箭头所指示畸变核仁；3. 终变期（a环状多价体，b多价体）；4、5. 中期（4中 a多价体，b环状多价体，5示赤道板外染色体）；6. 中期，赤道板外染色体；7. 后期，箭头示染色体桥；8、9. 末期（8落后染色体，染色体不均等分离成多极，9染色体不均等分离成三极）；10. 后期，不均等分离，一极染色体数为16，另一极染色体数为20；11. 二分体；12. 三分体；13. 三分体+3微核；14. 四分体+1微核；15、16. 成熟花粉粒（15长椭圆形，16左四棱形，右小形）。

Explanation of plates: Meiosis of PMCs (1 - 10) and different types of tetrads and pollen grains in autotetraploid carrot (11 - 16)

1. Premeiotic interphase, arrow showing two nucleoli; 2. Pachytene, arrow showing abnormal nucleolus; 3. Diakinesis (a showing ring multivalent and b showing multivalent); 4, 5. Metaphase (a showing multivalent and b showing ring multivalent in 4 and 5 showing the chromosomes outside metaphase plate); 6. Metaphase, showing the chromosomes outside metaphase plate; 7. Anaphase, showing the chromosomes bridge; 8, 9. Telophase (8 showing lagging chromosomes and chromosome multi-polarization and 9 showing tri-polarization); 10. Anaphase, showing unequal separation; 11. A primary type of diad having two large-sized components; 12. A primary type of triad having three large-sized components; 13. A primary type of polyad having three large and three small-sized components; 14. Tetrad with one micronucleus; 15, 16. Pollen grains of autotetraploid (15 showing oblong pollen grains and 16 showing big, four-arris pollen grains at left and small-sized pollen grains at right).

2.2 染色体的不均等分离现象

在中期_{II}和中期_I，一些花粉母细胞的部分染色体未排于赤道板上，染色体数1~6条不等（图版，5、6），这些异常细胞的比例分别为23.00%和32.29%（表2）。后期_I、末期_I和后期_{II}、末期_{II}，均发现了落后染色体或染色体桥现象（图版，7、8）。后期_I和后期_{II}出现落后染色体或染色体桥现象的细胞比例分别为15.00%和13.33%（表2）。

表2 不同减数分裂时期染色体行为异常的花粉母细胞的比例

Table 2 Rate of abnormal PMCs at different meiosis stages

时期 Stage	细胞数 Number of cells	异常细胞数 Number of abnormal cells	异常细胞比例 / % Rate of abnormal cells
中期 Metaphase	200	46	23.00
后期 Anaphase	200	30	15.00
中期 Metaphase	192	62	32.29
后期 Anaphase	120	16	13.33

注：中期_I、中期_{II}异常花粉母细胞为含赤道板外染色体的花粉母细胞；后期_I、后期_{II}异常花粉母细胞为含落后染色体或染色体桥花粉母细胞。

Note: Abnormal PMCs at metaphase_I and metaphase_{II} were cells with the chromosomes outside metaphase plate; Abnormal PMCs at anaphase_I and anaphase_{II} were cells with lagging chromosomes or chromosome bridges

落后染色体与行动滞后的游离单价体有较强的关联性（李子先等，1996），染色体桥则是由于臂内倒位引起的。

后期_I和后期_{II}的染色体分离情况较为复杂，除出现了四极分离，还出现了三极及多极分离现象（图版，8、9），可能与微管系统的异常有关（Xu et al, 2001）。染色体的多极分离使得有害基因暴露，可能是花粉后期败育的原因之一（Chen et al, 2003）。

减数分裂过程中，除部分染色体丢失外，还发现了一些细胞虽然染色体总量并未减少，但分离至两极的染色体数不相等的现象（图版，10）。

2.3 多分体现象及花粉粒形状的多样化

同源四倍体胡萝卜花粉母细胞为同时型胞质分裂，与正常二倍体胡萝卜相同（张永兵等，2005）。但试验中发现四倍体花粉母细胞在四分体时期，除形成四分体外，还形成二分体、三分体以及多分体，一些细胞中还包含一个或多个微核（图版，11~14）。四分体在众多分离类型中的比例较大，占到72.02%，二分体、三分体、多分体及含有微核细胞的比例分别占到0.41%、7.00%、4.52%和16.05%（表3）。

表3 花粉母细胞四分体时期形成不同多分体类型的比例

Table 3 Number and rate of PMCs of different types of polyad at tetrad

类型 Types of polyad	数量 Number	比例 / % Rate
四分体 Tetrads	700	72.02
二分体 Dyads	4	0.41
三分体 Triads	68	7.00
多分体 Polyads	44	4.52
含微核细胞 Cells with micronuclei	156	16.05
总计 Total	972	100.00

四分体时期所形成的三分体及多分体可能是后期_I时染色体分离三极化及多极化所导致的直接结果（Qian et al, 2005）。

同源四倍体胡萝卜的花粉粒形状大小不一（图版，15、16），小花粉粒多为不规则形状，大花粉

粒形状呈长椭圆形 (图版, 15)、四棱形 (图版, 16) 及不规则形。长椭圆形大花粉在总花粉量中仅占 5.18%, 四棱形大花粉比例最大, 占到 58.52%, 其次是小花粉粒, 占到 26.67% (表 4)。小花粉粒由微核形成, 与减数分裂过程中后期、后期的落后染色体现象密切相关 (张仲鸣等, 1997; 张蜀宁等, 2007), 且不具有育性。

表 4 四倍体胡萝卜形成不同形状花粉粒的比例

Table 4 Number and rate of different pollen grains in autotetraploid carrot

花粉粒类型 Types of pollen grains	数量 Number	比例 / % Rate
长椭圆形大花粉粒 Oblong pollen grains	49	5.18
四棱形大花粉粒 Four-arris pollen grains	553	58.52
不规则大花粉粒 Irregular pollen grains	91	9.63
小花粉粒 Small pollen grains	252	26.67
总计 Total	945	100.00

3 讨论

同源四倍体普遍存在育性低, 花粉败育等现象, 阻碍了其在生产中的应用。对于花粉的败育机制已有多方面的研究: 细胞核的异常 (朱必才和高立荣, 1988), 遗传物质的不均衡 (李子先等, 1996; Chen et al, 2003), 微管系统异常 (代西梅等, 2006), 绒毡层异常 (康向阳, 2001) 等均与花粉的败育有关。

作者在试验中发现, 同源四倍体胡萝卜花粉母细胞在减数分裂过程中也存在细胞核的异常及遗传物质的不均衡: 多核仁现象, 核仁畸变 (图版, 1、2); 游离单价体的随机分配 (表 1); 非同源染色体部分同源联会形成多价体 (图版, 3、4; 表 1); 赤道板外染色体 (图版, 5、6; 表 2); 染色体桥的最终断裂 (图版, 7); 联会染色体后期未发生分离, 染色体的二极化、三极化及多极化 (图版, 8、9); 落后染色体丢失或形成微核 (图版, 13、14) 等均会导致不均等分离, 最终都会形成致死配子, 使得同源四倍体胡萝卜的花粉败育, 有性生殖能力远低于正常二倍体胡萝卜。且发现同源四倍体胡萝卜同一花药中的花粉母细胞的发育具有非同步性, 在每个花药中, 都可观察到处于不同时期的花粉母细胞。

同源四倍体胡萝卜中 58% 以上的花粉粒形状为四棱形 (图版, 16; 表 4), 可能与植株倍性有一定的相关性。我们通过对四倍体胡萝卜自交后代以及与二倍体杂交后代植株的倍性及育性鉴定, 发现只有四倍体植株中存在四棱形花粉粒。目前我们正在观察同源四倍体自交分离后代植株的减数分裂行为及其育性, 以期通过筛选获得具有高结实率的四倍体单株, 为胡萝卜育种及遗传研究提供新型种质。

References

- Chen J F, Luo X D, Staub J E, Qian C T, Zhuang F Y, Ren G 2003. An allotriploid derived from an amphidiploid \times diploid mating in *Cucumis*: Production, micropropagation and verification. *Euphytica*, 131: 235 - 141.
- Dai Ximei, Huang Qun-ce, Li Guo-ping, Qin Guang-yong 2006. Developmental characters of autotetraploid rice pollen. *Chinese J Rice Sci*, 20 (2): 165 - 170. (in Chinese)
- 代西梅, 黄群策, 李国平, 秦广雍. 2006. 同源四倍体水稻花粉的发育特征. *中国水稻科学*, 20 (2): 165 - 170.
- Kang Xiang-yang 2001. Study on mechanism of pollen abortion in Chinese white polar (*Populus tomentosa* Carr). *Scientia Silvae Sinicae*, 37 (3): 35 - 41. (in Chinese)
- 康向阳. 2001. 毛白杨花粉败育机制的研究. *林业科学*, 37 (3): 35 - 41.

- Li Zi-xian, Liu Gang, Han Si-huai, Chen Xue-liang 1996. Study on cytogenetics of the polyploid in *O. saliva* × *O. grandiglumis* F₂ plants. *Hereditas* (Beijing), 18 (5): 11 - 15. (in Chinese)
- 李子先, 刘刚, 韩思怀, 陈学良. 1996. 栽培稻 × 大颖野生稻 F₂多倍现象的细胞遗传学研究. *遗传*, 18 (5): 11 - 15.
- Qian C T, Jahn M M, Staub J E, Luo X D, Chen J F. 2005. Meiotic chromosome behaviour in an allotriploid derived from an amphidiploid diploid mating in *Cucumis*. *Plant Breeding*, 124: 272 - 276.
- Xu S X, Liu X D, Feng J H, Lu Y G. 2001. Comparative studies on the changes of microtubule distribution and reorganization during the meiotic stages of development in normal (R36) and a temperature photoperiod sensitive male sterile line (Peiai 64S) of rice (*Oryza sativa*). *Acta Botanica Sinica*, 43 (3): 221 - 226.
- Zhang Shu-ning, Wan Shuang-fen, Zhang Wei, Hou Xi-lin. 2007. Meiosis of pollen mother cells in autotetraploid *broccoli*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 387 - 390. (in Chinese)
- 张蜀宁, 万双粉, 张伟, 侯喜林. 2007. 同源四倍体青花菜花粉母细胞的减数分裂. *园艺学报*, 34 (2): 387 - 390.
- Zhang Yong-bing, Zhuang Fei-yun, Zhao Zhi-wei, Chen Jin-feng. 2005. Mitotic karyotyping and meiotic observation in carrot (*Daucus carota* L.). *Acta Agriculturae Shanghai*, 21 (3): 26 - 28. (in Chinese)
- 张永兵, 庄飞云, 赵志伟, 陈劲枫. 2005. 胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 有丝分裂核型及减数分裂观察. *上海农业学报*, 21 (3): 26 - 28.
- Zhang Zhong-ming, Sodmergen, Li Zheng-li. 1997. Micronucleus formation in microspores of *Ginkgo biloba* L. and its significance in evolution. *Acta Botanica Sinica*, 39 (2): 97 - 101. (in Chinese)
- 张仲鸣, 苏都莫日根, 李正理. 1997. 银杏小孢子中的微核形成及其在进化过程中的意义. *植物学报*, 39 (2): 97 - 101.
- Zhu Bi-cai, Gao Li-rong. 1988. A study on autotetraploid common buckwheat. Comparison of morphology and cytology between autotetraploid and diploid common buckwheat. *Hereditas* (Beijing), 10 (6): 6 - 8. (in Chinese)
- 朱必才, 高立荣. 1988. 同源四倍体荞麦的研究. 同源四倍体荞麦与二倍体普通荞麦的外部形态及细胞学比较. *遗传*, 10 (6): 6 - 8.

图书推荐

《蔬菜学》

本书由方智远院士主编, 江苏科学技术出版社出版发行。全书共分 7 大章, 33 个小节, 44 万字, 552 页, 本书较系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就; 比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容; 简述了 21 世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体, 有利于读者更加深入地了解蔬菜学, 研究蔬菜学, 是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价: 47 元 (含邮费)。

《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷, 1~6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2 263 个品种, 1 347 页; 7~12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2 550 个品种, 1 177 页。入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子公司、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。