

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.2024.0014

芦笋超雄株花粉母细胞减数分裂观察

李霞, 牛晓雪, 包艳存, 路远, 李付军, 牟萌,

雷霆, 田洪平, 李保华, 杨林

(潍坊市农业科学院 山东潍坊 261071)

摘要: 减数分裂是有性生殖的关键过程。为了明确芦笋超雄株花粉母细胞减数分裂的具体情况及其异常行为对配子生长发育的影响, 采用改良苯酚品红压片法对 58 株芦笋超雄株的 986 个花粉母细胞减数分裂过程进行了系统观察。结果表明, (1) 超雄株花粉母细胞减数分裂为胞质分裂同时型, 染色体构型为 10 个二价体, 四分体为十字交叉型。(2) 中期 I 小型棒状二价体的出现比例为 96.55%, 四价体为 8.62%, 染色体粘连为 22.41%。(3) 后期 I 落后染色体的出现比例为 12.07%, 染色体桥为 13.79%; 分裂期出现微核的比例为 6.59%。(4) 在中期 II~末期 II 中分裂不同步的出现比例为 34.45%。超雄株花粉母细胞在整个减数分裂进程中, 前期 I 所需时间最长。减数分裂配对成 10 个二价体, 在倍性水平上属于二倍体。减数分裂异常行为主要出现在中期 I 和后期 I。对超雄株花粉母细胞减数分裂过程的观察, 不仅能够丰富芦笋的细胞遗传学内容, 还可以为芦笋发育生物学、杂交育种、基因定位等方面提供必要的细胞遗传学信息。

关键词: 芦笋; 超雄株; 花粉母细胞; 减数分裂

中图分类号: S644.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)07-095-05

Observation on meiosis of pollen mother cells of super-male plants in *Asparagus officinalis* L.

LI Xia, NIU Xiaoxue, BAO Yancun, LU Yuan, LI Fujun, MU Meng, LEI Ting, TIAN Hongping, LI Baohua, YANG Lin

(Weifang Academy of Agricultural Sciences, Weifang 261071, Shandong, China)

Abstract: Meiosis is a key process in sexual reproduction. In order to clarify the specific situation and the effect of abnormal meiotic behavior of pollen mother cells (PMCs) on the growth and development of gametes in super-male asparagus plants, the improved phenol fuchsin method was used to systematically observe the meiosis process of 986 PMCs of 58 super-male asparagus plants. The results showed that: (1) The PMCs of super-male plants carried meiosis and cytokinesis simultaneously, with a chromosome configuration of 10 bivalents and the tetrad of a cross shaped structure. (2) At metaphase I, the proportion of small rod bivalents was 96.55%, tetravalent was 8.62%, and chromosome sticking was 22.41%. (3) At anaphase I, the proportion of lagging chromosomes was 12.07%, chromosome bridges was 13.79%, and the proportion of micronucleus was 6.59% in the division phase. (4) At metaphase II to telophase II, the proportion of asynchronization of chromosomes segregation was 34.45%. In the whole process of meiosis, the prophase I is the longest. There was paired as 10 bivalents at meiosis metaphase I, thus it is a diploid species. The abnormal behavior of meiosis mainly occurs in metaphase I and anaphase I. Based on the observation of the meiosis process of PMCs of the super-male, it can not only enrich the cytogenetic content of asparagus, but also provide the necessary cytogenetic information for asparagus of developmental biology, cross breeding, gene localization, and so on.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; Super-male plants; Pollen mother cells; Meiosis

收稿日期: 2024-01-09; 修回日期: 2024-03-28

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2022LZGC024); 潍坊市科技发展计划项目(2022ZJ1084, 2021ZJ1128); 潍坊市现代种业科研创新团队项目

作者简介: 李霞, 女, 研究员, 研究方向为芦笋遗传育种及栽培。E-mail: 55654687@qq.com

通信作者: 李保华, 男, 研究员, 研究方向为芦笋育种与栽培及推广。E-mail: shidaiyi@126.com

杨林, 男, 高级农艺师, 研究方向为蔬菜育种与栽培。E-mail: 80408239@qq.com

减数分裂是DNA复制一次,而细胞连续分裂两次,形成单倍体的精子或卵子,减数分裂过程中非同源染色体及非姊妹染色单体间发生交换,使配子的遗传多样化,增加了后代的适应性。减数分裂是维持物种染色体数目稳定,使生物物种得以保存延续的重要生物过程,在植物生命周期中维持遗传稳定性和丰富变异性方面起重要作用^[1]。在减数分裂过程中会出现正常二价体(指在减数分裂偶线期同源染色体联会时,正常是每对同源染色体形成一个二价体,此时,每条染色体由两条姊妹染色单体组成。有 n 对染色体的细胞中将形成 n 个二价体)、四分体(指花粉母细胞在孢子母细胞的分化方向中,在花粉形成前,四个花粉由胼胝质相连形成的结构)。当然也会出现异常分裂行为:(1)单价体:减数分裂过程中不能配对的染色体。一般在花粉母细胞减数分裂前期I和中期I出现。(2)四价体:在减数分裂偶线期发生联会的四条同源染色体配成一组的多价体。(3)染色体桥:由两条染色体分别发生断裂后,具有着丝粒的残臂相接而形成的双着丝粒染色体所特有的结构,在两极之间被拉紧而形成桥。(4)落后染色体:在减数分裂的后期I、末期I、后期II、末期II,大多数染色体移向两极之后,少数染色体不移向两极,仍停滞在赤道板上或者在移向两极过程中与大多数染色体不同步,形成落后的染色体或断片。(5)微核:随着落后染色体或断片的出现及分裂的进行,这些滞后的染色体或断片丢失或游离于主核外,形成微核^[1]。

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)为百合科天门冬属多年生草本植物,具有 $2n=2x=20$ 条染色体,二倍体基因组大小为1323 Mb^[2-4],幼茎质嫩味美,营养丰富,风味独特,是一种具有较高药用、营养和保健价值的高档蔬菜,畅销全球,享有“蔬菜之王”的美誉^[5-6]。芦笋为典型的雌雄异株植物,具有XY型性别决定系统,芦笋的自然群体中性别表现型有4种,分别为雌性、雄性、超雄性和两性株,性染色体组成分别为XX,XY,YY和XY^[7]。超雄株(YY)可以正常生长发育,形态及生理等各方面特征均与正常雄株(XY)相同,但其与雌株杂交的后代全为雄性,因此超雄株对芦笋育种具有重要意义^[8-10]。目前生产上获得超雄株的方法主要有两种,一是花粉培养诱导芦笋雄核形成双单倍体,二是雄性两性花自花或异花授粉^[11-12]。国内对芦笋超雄株的研究主要涉及超雄株的获得、田间鉴定筛选、分子鉴定筛选等方面^[13-16],还未涉及芦笋超雄株染色体的研究,因

此,笔者采用常规的细胞学分析方法对芦笋超雄株花粉母细胞进行减数分裂观察,旨在为芦笋超雄株的研究增加细胞学资料,为进一步揭示超雄株生长发育及全雄育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2018年在潍坊市农业科学院现代农业科技示范园定植968株芦笋雄性两性株,从中鉴定出了58株超雄株^[15],笔者以58株超雄株单株为试验材料,2023年5—6月在超雄株的盛花期不间断地取长度0.5 cm左右的花蕾进行观察。

1.2 方法

采用改良的苯酚品红染色法,取超雄株0.5 cm左右的花蕾,在卡诺氏固定液I中固定24 h,然后转移到70%酒精中于4℃冰箱保存备用。采用压片法制片,取新鲜花蕾或从70%酒精中取出保存的花蕾,用镊子取出花药,放置于载玻片中央,滴加1滴苯酚品红染液,用镊子和解剖针剖开花药,将其中的小孢子母细胞挤出,去除杂质,盖上盖玻片并压片,用解剖针轻轻敲击并排除气泡,在酒精灯外焰烤片3~4 s或者手背感觉微热时,在N-300M生物显微镜下100倍观察并拍照。

2 结果与分析

笔者对58株超雄株的986个花粉细胞减数分裂进行观察,发现减数分裂过程包括2次连续的核分离,第一次减数是同源染色体的分离,第二次减数是姊妹染色单体的分离。细胞胞质分裂方式为同时型,详细分裂过程如图1所示。

2.1 间期

染色体呈松散的染色质状态,核内染色较为均匀,核质分界明显(图1-A)。

2.2 前期I-细线期

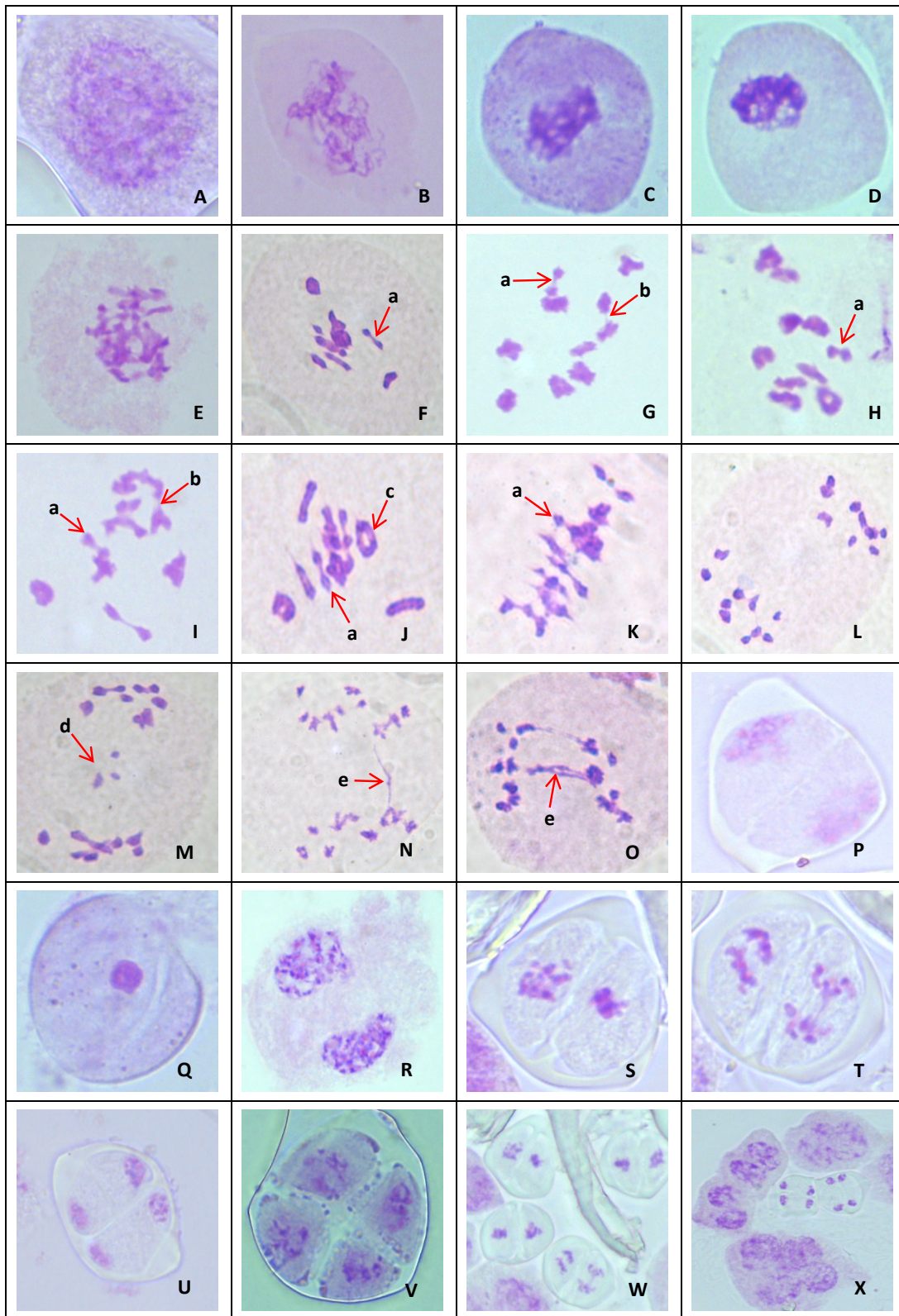
花粉母细胞的核仁开始解体,着色能力越来越弱。染色质浓缩为几条细而长的线,首尾不分地绕成一团,每一染色体已复制为2个单体(图1-B)。

2.3 前期I-偶线期

染色体形态与细线期没有太大的变化,同源染色体开始配对,出现联会现象,染色体松散,增粗,但无法辨认染色单体(图1-C)。

2.4 前期I-粗线期

同源染色体配对完毕,出现二价体,每个二价体含有4个染色单体,但仅含有2个着丝粒,染色



注:A. 间期;B. 细线期;C. 偶线期;D. 粗线期;E. 双线期;F. 终变期;G~K. 中期I;L~O. 后期I;P. 末期I;Q. 微核;R. 前期II;S. 中期II;T. 后期II;U. 末期II;V. 四分体;W~X. 分裂不同步。a. 小型棒状二价体;b. 染色体粘连;c. 四价体;d. 落后染色体;e. 染色体桥。放大倍数 100。

Note: A. Interphase; B. Leptotene; C. Zygotene; D. Pachytene; E. Diplotene; F. Diakinesis; G-K. Metaphase I; L-O. Anaphase I; P. Telophase I; Q. Micronucleus; R. Prophase II; S. Metaphase II; T. Anaphase II; U. Telophase II; V. Tetrad; W-X. Asynchronization of chromosome segregation. a. Small bar bivalent; b. Chromosome sticking; c. Quadrivalent; d. Lagging chromosome; e. Chromosome bridge. 100×magnification.

图1 芦笋超雄株花粉母细胞减数分裂

Fig. 1 Meiosis of pollen mother cells of super-male plants in *Asparagus officinalis* L.

体继续缩短变粗、螺旋化,向四周发散(图 1-D)。

2.5 前期I-双线期

染色体进一步缩短变粗,同源染色体分离,此时可以看到染色体的交叉现象,因为交叉使得单体上的若干点仍然连在一起,出现 U 形、8 字形等多种形状(图 1-E)。

2.6 前期I-终变期

交叉向染色体端部移动,交叉数减少,染色体变得更粗。到终变晚期,染色体与中期染色体大小基本相同,核仁着色变浅,此时可见 10 对同源染色体构成 10 个二价体,呈环状、棒状(图 1-F)。

2.7 中期I

侧面观察染色体整齐地排列在赤道板上,极面观察染色体散布在细胞中,两两配对分散在细胞质中。在 58 株超雄株的所有花粉母细胞的减数分裂过程中,单株之间不存在明显的差异,染色体构型均为 10 个二价体,即 10II,二价体构型的形状有棒状、环状,以环状为主,棒状二价体 1~5 个不等(图 1-G~K);在分裂过程中,小型棒状二价体的出现比例为 96.55%、四价体为 8.62%、染色体粘连为 22.41%。

2.8 后期I

同源染色体彼此分开,移向细胞两极。由于此时着丝点未分开,所以细胞两极的染色体数是母细胞的一半,但每条染色体中依然含有两条单体(图 1-L~O)。在分裂过程中落后染色体的出现比例为 12.07%;染色体桥为 13.79%。

2.9 末期I

同源染色体分别到达两极,染色体变成了染色质,核膜、核仁重新出现,形成 2 个子核,此时每个子核染色体数目减半为 10 条,同时细胞质分开形成 2 个子细胞(二分体),可确定超雄株的细胞质分裂方式为同时型(图 1-P)。在分裂期微核的出现比例为 6.59%(图 1-Q)。

2.10 前期II

染色体缩短,前期快结束时核膜消失,此时的每条染色体都有 2 条单体,细胞有 10 条染色体(图 1-R)。

2.11 中期II

染色体浓缩变短,2 组染色体分别排列在各自的赤道板上,纺锤体出现,每条染色体有 2 个染色单体和 1 个着丝粒(图 1-S)。

2.12 后期II

着丝点完成复制,彼此分开。姊妹染色单体从

着丝粒处分裂为二,在纺锤丝的作用下分别移向两极(图 1-T)。

2.13 末期II

移到两极的染色体解螺旋,浓缩成团,出现核仁、核膜,形成单倍的子核(图 1-U),胞质分裂,1 个母细胞分裂成 4 个子细胞,至此减数分裂结束,进入四分体时期(图 1-V)。在中期II~末期II中分裂不同步的出现比例为 34.45%(图 1-W~X)。

3 讨论与结论

国内外鲜见对芦笋超雄株花粉母细胞减数分裂的研究。笔者在本研究中发现,超雄株花粉母细胞的减数分裂过程符合二倍体减数分裂的规律。减数分裂的染色体行为,在不同植株或相同植株的花蕾上表现基本一致;超雄株花粉母细胞是胞质同时型;染色体构型为 10 个二价体,有棒状和环状,四分体为十字交叉型。绝大多数花粉母细胞减数分裂中染色体的行为正常,但也有不同比例的四价体、染色体粘连、落后染色体、染色体桥、微核、分裂不同步等现象发生。在自然条件下,外界因素或个体细胞内某些生理、生化过程可诱发染色体结构变异。中期I四价体的出现可能导致一部分细胞中的同源染色体不能准确地分配到两极,从而造成染色体的重复或缺失;落后染色体很可能是四价体在后期分离产生的,最终形成微核或消失在细胞质中从而导致配子染色体数不平衡,从而影响超雄株的育性^[17]。同源染色体之间出现的一定程度异质性导致染色体桥的出现,这可以作为鉴定是否出现染色体倒位的证据之一^[18-19]。在第二次减数分裂过程中发现 1~3 个时期分裂同时出现在 1 个花蕾中,这种不同步性可以扩展花期,在发育过程中增加两性功能的有效作用时间,对种群繁殖后代有利,是一种适应当地环境条件的进化表现^[20-21]。

笔者首次对芦笋超雄株的减数分裂过程进行了较为系统的观察研究,结果表明,超雄株花粉母细胞经过 2 次分裂,最终形成 4 个子细胞。超雄株花粉母细胞在整个减数分裂过程中,前期I所需时间最长。减数分裂配对成 10 个二价体,在倍性水平上属于二倍体。减数分裂异常行为主要出现在中期I和后期I。在减数分裂中期I有单价体、四价体的产生,后期I、后期II出现落后染色体、染色体桥、微核等,从而导致小孢子发育成无育性的配子,进而产生无活力的花粉,降低了花粉的育性。在花粉母细胞第二次分裂过程中出现的染色体不同步现象,

在一定程度上延长了花期,可降低外界极端环境对散粉或减数分裂的影响而增加授粉概率,提高了种群繁殖能力,是一种生物适应环境的进化机制。通过对超雄株花粉母细胞减数分裂过程的观察,有助于了解其花粉形成的过程和超雄性的起源与进化。研究结果不仅能够丰富芦笋的细胞遗传学内容,还可以为芦笋发育生物学、杂交育种、基因定位等方面提供必要的细胞遗传学信息,为全雄育种和遗传改良奠定基础。随着双色荧光原位杂交技术、高通量测序技术、DAPI 分带技术等分子细胞遗传学各种研究手段的不断改进,染色体研究的准确率有了较大提高,染色体研究将在物种的染色体组分析、物种的起源与演化分析、外源染色体导入片段的鉴定、染色体精细结构分析等方面有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 刘大钧.细胞遗传学[M].北京:中国农业出版社,1999.
- [2] 任青.芦笋简介[J].现代农业,1988(5):9-10.
- [3] 李可峰.石刁柏(*Asparagus officinalis* L.)种质资源遗传多样性分析[D].济南:山东师范大学,2004.
- [4] HARKESS A, ZHOU J S, XU C Y, et al. The asparagus genome sheds light on the origin and evolution of a young Y chromosome[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1279.
- [5] 高武军,张宏杰,王孝娟,等.石刁柏 EST 序列中微卫星分布特征分析[J].生物技术,2011,21(6):27-31.
- [6] 郭鑫,赵传志,赵术珍,等.芦笋的杂交育种与生物技术研究进展[J].分子植物育种,2021,19(23):7910-7916.
- [7] 周劲松,汤泳萍,盛文涛,等.芦笋性别决定与性别分化研究进展[J].植物遗传资源学报,2010,11(5):600-604.
- [8] LÖPTIEN H. Identification of the sex chromosome pair in asparagus(*Asparagus officinalis* L.)[J]. *Zeitschrift Für Pflanzenzüchtung*, 1979, 82(2): 162-173.
- [9] 黄玲,赖佳,韦树谷,等.石刁柏两性花与雄花的抗氧化酶活性及其相关基因可变剪接的差异分析[J].植物生理学报,2019, 55(8):1231-1238.
- [10] 李霞,包艳存,李保华,等.芦笋两性株染色体的细胞学研究[J].种子,2022,41(7):88-91.
- [11] 周维燕.芦笋组织培养及育种中的应用[M].北京:高等教育出版社,1989.
- [12] 刘奇顺,瞿华香,余格辉,等.芦笋种质资源与育种技术研究进展[J].中国农学通报,2021,37(1):55-60.
- [13] 李乐斌,张景丽,冯光,等.芦笋性别基因型的分子鉴定新技术与超雄株筛选[J].中国蔬菜,2022(8):78-84.
- [14] 周劲松,汤泳萍,罗绍春,等.芦笋超雄株的 DNA 分子标记辅助筛选[J].园艺学报,2012,39(11):2182-2188.
- [15] 李霞,高武军,牛晓雪,等.芦笋超雄株 STS 双分子标记的开发及应用[J].植物遗传资源学报,2022,23(6):1828-1834.
- [16] 李芳,张元国,包艳存,等.芦笋全雄系同质型父本“超雄株”的选育[J].山东农业科学,2006(2):40-41.
- [17] 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.
- [18] 陈欣,杨倩,张平冬,等.胡杨小孢子母细胞减数分裂与花粉变异研究[J].西北林学院学报,2015,30(2):90-95.
- [19] 何丽霞.黄牡丹花粉母细胞减数分裂过程的细胞遗传学观察[J].兰州大学学报,2004,40(6):78-82.
- [20] WYATT R. Inflorescence architecture: How flower number, arrangement, and phenology affect pollination and fruit-set[J]. *American Journal of Botany*, 1982, 69(4): 585-594.
- [21] HARDER L D, THOMSON J D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants[J]. *American Naturalist*, 1989, 133(3): 323-344.