

亚洲百合花粉染色体加倍的研究

孙晓梅, 贾 莲, 杨宏光, 崔文山, 王亚斌

(沈阳农业大学 林学院 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以亚洲百合俄维依幼嫩花蕾为材料,采用不同浓度秋水仙碱溶液处理幼嫩花蕾来得到染色体加倍的 $2n$ 花粉。观察花粉母细胞减数分裂过程,探讨其减数分裂过程与花蕾大小的对应关系,确定诱导 $2n$ 花粉的有效时期。结果表明:花蕾长度为 $1.0\sim 2.4\text{ cm}$ 时是 $2n$ 花粉的有效诱导时期,以 0.1% 的秋水仙碱溶液连续注射处理 3 d ,效果最佳,诱导率高达 33.2% 。

关键词:亚洲百合;减数分裂; $2n$ 花粉

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)06-0144-04

百合多倍体育种是种质创新的主要途径。在我国百合多倍体育种的工作多集中于无性阶段诱导体细胞染色体加倍来获得多倍体,与通过有性阶段诱导 $2n$ 配子途径相比缺少亲代配子体的同源重组,而减数分裂过程中则经常发生, $2n$ 配子被视为在杂交育种过程中获得所期望性状渐渗最有希望的途径^[1-3]。因此利用 $2n$ 配子有性多倍化途径培育多倍体不仅可提高杂种倍性,而且可以传递杂合性和上位性,具有重要的育种价值^[4]。

试验以亚洲百合俄维依幼嫩的花蕾为材料,在掌握小孢子母细胞减数分裂过程的基础上,对秋水仙碱人工诱导花粉染色体加倍的有效处理时期、处理浓度及处理方式进行了研究,为百合的三倍体育种提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

亚洲百合俄维依(*Avignon*),沈阳农业大学植物园种植。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉母细胞减数分裂过程与花蕾大小相关性的研究采用俄维依的花药内含物涂抹制片,无须固定,取材后直接压片,镜检并拍照。从长度为 0.5 cm 的花蕾开始取材,取至减数分裂结束后形成花粉粒的花蕾长度,按照花蕾大小分别进行染色压片。观察花粉母细胞所处的减数分裂时期并拍照,并对其所处分裂期与花蕾大

小的对应关系进行研究。

1.2.2 $2n$ 花粉的诱导 分别采用注射法和包裹法。注射法是将浓度为 0.01% 、 0.05% 、 0.1% 、 0.2% 的秋水仙碱溶液用注射器注入幼嫩花蕾的中下部,注射量以药液从花蕾顶部溢出为准,每天1次,共注射 3 d 。每个浓度注射 30 个花蕾,以清水处理为对照;包裹法是用浸透 0.05% 、 0.1% 秋水仙碱溶液的脱脂棉,分别包裹去除花被片的花蕾和带有花被片的完整花蕾各 30 个,套塑料袋防止蒸发, 3 d 后用清水冲洗干净,设置对照。形成花粉后进行显微观察和统计。

1.2.3 $2n$ 花粉的统计 处理后明显变异的植株,取花粉粒制片,观察测量花粉粒直径,以花粉粒直径显著增大作为诱导成功的初步鉴定指标,并对 $2n$ 花诱导频率进行估测。具体方法:将每个处理所得花粉混合均匀,制成 $3\sim 5$ 个临时涂片,每片观察 5 个视野,统计花粉中的大花粉百分率。

2 结果与分析

2.1 花粉母细胞减数分裂过程

亚洲百合俄维依花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为正常,在分裂间期完成DNA的复制、DNA的转录及蛋白质的合成,从外表看似处于静止的状态,却是细胞核高度活跃的时期(图1A)。在前期I,从细线期到终变期,核仁体积逐渐变小,细线期细胞核和核仁都较大,染色体呈细长的线状结构,粗线期染色体缩短变粗,此时的染色体已经处于联会状态,终变期,同源染色体配对(图1B、1C、1D)。有研究表明,减数分裂前期I是诱导 $2n$ 花粉的最佳时期,此时期诱导成功的 $2n$ 配子即FDR(First division restitution)型 $2n$ 配子,其杂合性高于其它类型 $2n$ 配子。前期I结束后,核仁开始解体,核膜逐渐消失,中期I二价体被纺锤丝定位于赤道板上(图1E)。后期I配对的同源染色体开始彼此分离,由纺

第一作者简介:孙晓梅(1970-),女,山东昌邑人,博士,副教授,硕士生导师,现从事园林植物遗传育种的教学与科研工作。E-mail: xiaomei7280@126.com。

基金项目:沈阳市科技攻关资助项目(1071146-3-00)。

收稿日期:2009-12-20

锤丝分别拉向细胞的两极,这时每一极区的染色体数目是原来的一半(图 1F)。在末期 I,在细胞两极分别形成新的子核,但细胞质不分裂(图 1G、1H)。中期 II,2 个子细胞中的染色体都排列到细胞的赤道面上,纺锤体再次出现(图 1I)。后期 II,子细胞中每条染色体的 2 条染色

单体,随着丝点分离而彼此分开,由纺锤丝牵引移向两极(图 1J、1K、1L)。末期 II,在细胞内形成了 4 个子核,最后细胞质分裂,同时形成 4 个子细胞,即四分体,接着发育形成花粉粒(图 1M、1N、1O)。

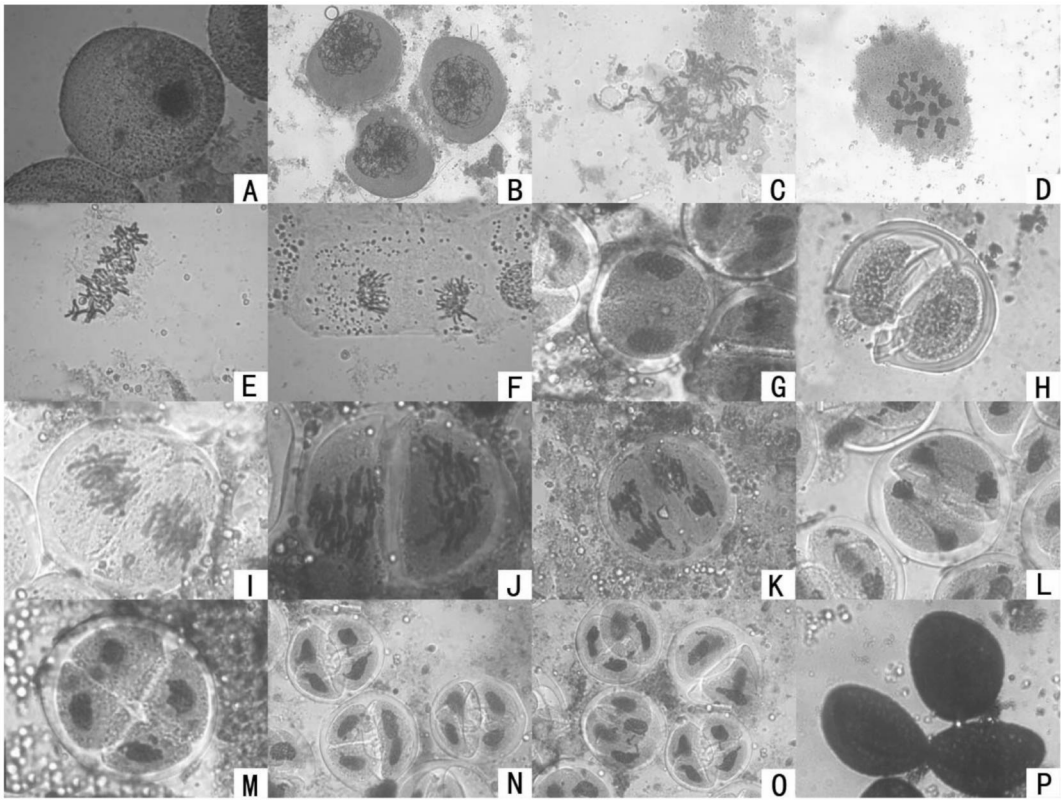


图 1 俄维依花粉母细胞减数分裂

注 A. 间期; B、C、D 前期 (B 粗线期; C 偶线期; D 终变期); E. 中期; F. 后期; G、H. 末期; I. 中期 II; J、K. 后期 II; L. 末期 II; M、N、O. 四分体; P. 花粉粒

2.2 花粉母细胞减数分裂进程与花蕾长度的对应关系
长度范围在 1.0~2.5 cm 的花蕾内部花粉母细胞大都处于减数分裂时期;长度大于 2.5 cm 的花蕾内部就已发育成为花粉粒(见表 1)。结果表明,亚洲百合俄维依花蕾长度在 2.4 cm 以下时,均可进行 2n 花粉的诱导处理,若花蕾长度大于 2.5 cm,花粉母细胞已进入四分体时期,诱导时期已错过。

表 1 俄维依(Avignon)花蕾长度与减数分裂发育时期的对应关系

花蕾长度/cm	花粉母细胞发育时期
0.5~1.0	间期
1.1~1.3	细线期
1.4~1.7	粗线期
1.8~1.9	终变期
2.0~2.4	中后期到第 2 次减数分裂
2.5~3.0	四分体
3.0 以上	花粉粒

2.3 2n 花粉的诱导

2.3.1 包裹法 用浸有药液的脱脂棉包裹 30 个切除花

被片的花蕾,3 d 后均出现了腐烂和死亡;以浸透清水的脱脂棉包裹作为对照,同样导致死亡。结果表明,保持花蕾的完整性也是诱导 2n 配子的关键。经脱脂棉包裹带有花被片的完整花蕾 3 d 后,花蕾外部并无变异畸形,开花后检验花粉,未发现有变异的大花粉粒,原因可能由于花被片较厚,药液未能对花被中间的花粉母细胞起作用。

2.3.2 注射法 大部分的花蕾出现了中部膨大现象,其生长长度仅为同生长期正常花蕾的 1/2,大部分花蕾出现了外层 3 片花被先裂开的变异现象(图 2A、2B)。处理 10 d 后,观察变异花蕾中的花粉,发现了体积增大且颜色较深的大花粉,可以初步断定为 2n 花粉(图 2C)。

2.4 秋水仙素处理后花粉粒大小的检测与 2n 花粉频率的测定

2.4.1 秋水仙素处理后花粉粒大小的检测 亚洲百合俄维依正常花粉粒为椭圆体至长椭圆体,加倍后的 2n 花粉体积极明显增大且颜色较深,多为圆球型。分别随机抽取花粉粒进行测量,取平均值(见表 2),正常花粉长短

轴长度分别为85.59 μm 和52.74 μm , 长短轴长度差较大, 为椭圆形, 大花粉长短轴分别为117.38 μm 和110.18 μm , 接近

圆球形。根据前人研究经验, 将花粉粒巨大者作为 2 n 配子诱导成功的间接判别指标。

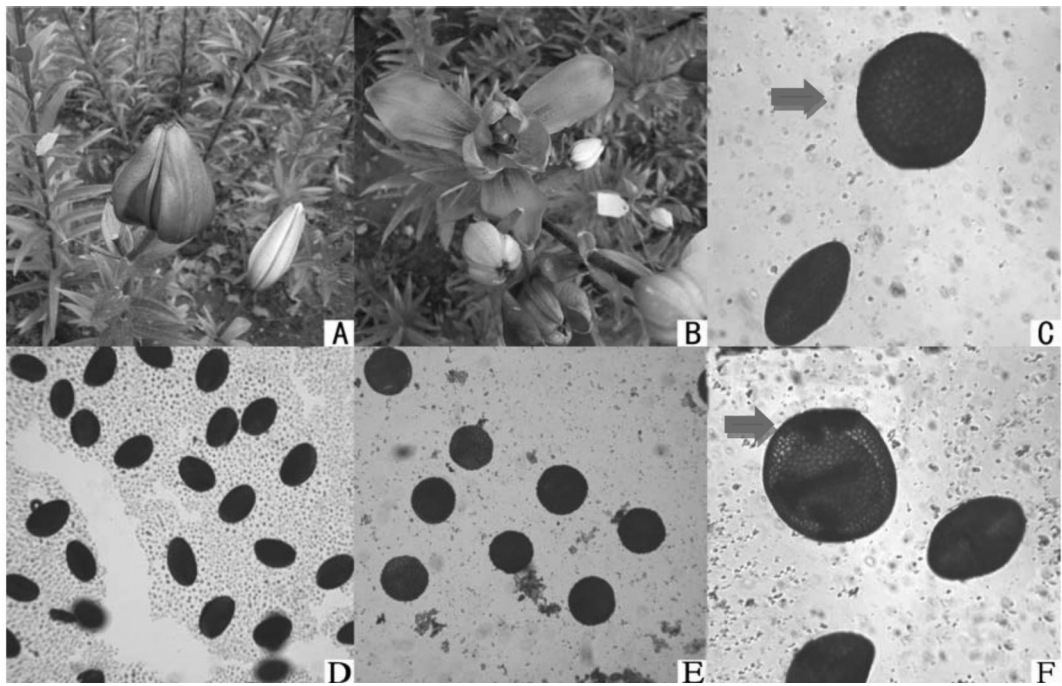


图2 2 n 花粉的诱导

注 A. 秋水仙素处理后中部膨大的花蕾; B. 变异的花朵; C. 箭头所示 2 n 花粉; D. 正常花粉粒 E. 处理后的花粉粒; F. 箭头所示未正常分裂的花粉粒

表2 2 n 花粉粒与正常花粉直径大小测量

花粉粒直径(平均值)/ μm	长轴 平均值/ μm	短轴 平均值/ μm
对照	85.59	52.47
大花粉	117.38	110.18

2.4.2 大花粉得率统计结果 0.1%的秋水仙素溶液处理 3 d 效果最佳, 诱导率可高达 33.2%, 0.01%诱导率最低, 达 6.37%, 但不是浓度越高诱导率越高。在试验过程中发现秋水仙素浓度越高, 对花蕾的毒害性越大, 因此要选择合适的注射浓度(见表3)。

表3 不同秋水仙碱浓度处理俄维依(Avignon)的平均大花粉得率

处理浓度/%	大花粉得率 %				平均得率/%	
0	0	0	0	0	0	0
0.01	6.1	6.61	7.87	5.23	6.06	6.37
0.05	15.66	12.13	22.46	17.66	14.56	16.49
0.1	27.61	29.7	41.16	36.43	31.09	33.2
0.2	29.71	15.88	11.24	20.88	19.6	19.46

3 结论与讨论

试验研究表明 花蕾长度与花粉母细胞所处的分裂时期具有对应关系, 是估计花粉母细胞发育时期较为可靠的指标, 当百合花蕾长度为 1.0~2.5 cm 时花粉母细胞分裂处于旺盛期, 花蕾长度为 1.0~2.4 cm 时是 2 n 花粉的有效诱导时期, 以 0.1%的秋水仙碱溶液连续注射处理 3 d 效果最佳, 诱导率高达 33.2%。

试验过程中发现, 与脱脂棉包裹相比, 注射法较适

合百合花蕾这种敏感组织。但在使用注射法过程中, 操作也有一定困难, 在对百合花蕾注射过程中如果造成严重的机械损伤, 也会导致花蕾死亡, 因此运用注射法诱导 2 n 花蕾时, 不但要选择合适的秋水仙素浓度, 还要注意操作力度, 尽可能避免针尖伤到柱头和其他组织, 每次注射时尽量重复用同一个注射针孔。

参考文献

[1] Van Tuyl J M, Lim K B. Interspecific hybridization and polyploidisation as tools in ornamental plant breeding [J]. Proceeding of the International Symposium on Classical Versus Molecular Breeding of Ornamentals, 2003, 612: 13-22.

[2] Van Tuyl J M, Van Dijken A, Chi H S. Breakthroughs in interspecific hybridization of lily [J]. ActHort, 2000, 508: 83-90.

[3] Ramanna M S, Jacobsen E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement A review [J]. Euphytica, 2003, 133: 3-18.

[4] 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, 59(3): 497-485.

[5] 高鹏, 康向阳, 张平冬, 等. 杜仲大小孢子母细胞减数分裂进程对应关系的研究[J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(1): 60-64.

[6] 高鹏, 林威, 康向阳. 秋水仙碱诱导杜仲花粉染色体加倍的研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(4): 39-42.

[7] 张成合. 大白菜 2 n 配子发生的遗传分析[J]. 园艺学报, 2000, 27(4): 295-296.

[8] 席梦利, 张静, 邱帅, 等. 麝香百合小孢子母细胞减数分裂进程与花蕾大小相关性研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 32(6): 43-46.

夏橙绿斑病原藻分离株的遗传多样性研究

王大平

(重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 永川 402160)

摘要: 从不同地域发生的夏橙绿斑病中分离出 4 株虚幻球藻, 对其进行了表型研究, 并利用 ISSR 技术对 4 株虚幻球藻分离株的遗传多样性进行了分析。结果表明: 这 4 株虚幻球藻分离株的表型存在一定差异, 并表现出多样性。从 100 个 ISSR 随机引物中筛选出 9 个引物, 共扩增出条带 98 条, 其中多态性条带数为 57 条, 多态性比率为 58.2%。虚幻球藻 CS 与虚幻球藻 JA 的遗传距离为 0.1852, 距离较近, 遗传相似性较大, 而与其另 2 株的遗传距离以及另 2 株之间的遗传距离均较远, 遗传相似性较小, 遗传分化明显, 说明从夏橙绿斑病中分离获得的 4 株虚幻球藻分离株基因型也有差异, 存在着遗传多样性。

关键词: 夏橙绿斑病; 虚幻球藻; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S 666.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)06—0147—03

夏橙绿斑病是夏橙的主要病害之一, 在夏橙产区的夏橙叶片和果实上均有发生, 爆发时严重影响夏橙的树势、果实品质和产量, 给夏橙种植业造成巨大的经济损失。该病由绿藻门虚幻球藻属虚幻球藻 (*Apatococcus lobatus*) 寄生^[1] 所致, 关于该病原藻株间具有明显的变异和分化现象尚未见报道。2006 年 4~5 月, 课题组从不同地域夏橙树上获得了表型有一定差异的 4 株虚幻球藻分离株, 并利用 ISSR 技术对其进行了遗传多样性分析, 以期为进一步研究夏橙绿斑病及防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

4 株虚幻球藻是从不同地域的夏橙树叶片和果实上的绿斑病中分离获得。4 株虚幻球藻的来源及来源地特征见表 1。

表 1 4 株虚幻球藻的来源及来源地特征

藻株代号	来源	来源地特征
CS	重庆长寿区狮子镇	该镇为丘陵地 有一长寿湖 夏橙种植在长寿湖两岸的缓坡上 有长寿湖的大水体效应。
JA	四川江安古贤坝	该坝地势低、平坦, 夏橙种植于此坝上, 周围有长江的大水体效应。
YY	重庆云阳宝坪镇	该镇地势高, 由大山组成 夏橙种植在山的下坡位 周围无大水体效应。
ZX	重庆忠县新立镇	该镇地势高, 较平坦, 通风好, 周围无大水体效应。

1.2 试验方法

1.2.1 藻株分离与培养 将采集的田间具绿斑病的夏橙叶片、果实样本, 用无菌水冲洗多次后取其表面绿色污斑, 接种于 BG-11^[2] 固体培养基上, 于光照培养箱 (温

作者简介: 王大平(1965-), 男, 四川大竹人, 博士, 教授, 现从事园艺及园林植物教学与研究工作。E-mail: wdp600@126.com。
基金项目: 重庆市教委重点科研资助项目 (KJ051205)。
收稿日期: 2009-12-20

Study of Pollen Chromosome Doubling of Asiatic Hybrids Avignon

SUN Xiao-mei, JIA Lian, YANG Hong-guang, CUI Wen-shan, WANG Ya-bin
(Shenyang Agricultural University Forestry College, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: The methods to doubled pollen chromosome of *Avignon* were studied. Using flower buds of *Avignon* as materials, the meiosis processes of pollen mother cells were observed. In order to know when 2n pollen could be induced, the relations between flower buds length and pollen mother cells developmental stages were studied. Then it induced doubling pollen chromosome with various concentrations of colchicines in different treatments. The results indicated that the best time for 2n pollen induction was that the length of flower buds was 1.0~2.4 cm. The highest percentage of unreduced pollen obtained by treating flower buds for 3 days with 0.1% colchicines was 33.2%.

Key words: *Avignon*; meiosis; 2n pollen