

DOI:10.11937/bfyy.201608016

东方百合 2n 花粉诱导及鉴定研究

廖晓珊¹, 吴青青², 张朝君², 周俊¹, 郑思乡¹, 王淋玉¹

(1. 湖南省株洲市农业科学研究所, 湖南 株洲 412000; 2. 贵州省园艺研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要:以东方百合“索尔邦”(Lilium oriental ‘Sorbonne’)的二倍体栽培品种为试材,采用沾有秋水仙素的棉球包裹法处理东方百合“索尔邦”花蕾,探索利用秋水仙素诱导百合 2n 花粉的方法和可能性,以期得到最佳诱导浓度和时间,并以同株植株叶片为对照,对 2n 花粉粒采用细胞流式仪鉴定。结果表明:在花粉细胞进行减数分裂中期 I 时,采用包裹法处理花蕾最高诱变率达 68%,其最适秋水仙素浓度为 0.4%,处理时间为 24 h。配子形成过程中出现四分体时期发现二分体、三分体及产生胞质分离而染色体不分离异常等情况。鉴定结果证实所获得 2n 花粉为二倍体。表明了人工诱导 2n 花粉是产生百合有性多倍化的一种有效途径。

关键词:“索尔邦”; 2n 花粉; 秋水仙素

中图分类号:S 682.2⁺65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0056-05

“索尔邦”属百合属(Lilium)东方百合杂种系(oriental hybrids)的优良品种。其花大色艳,花姿奇特,但其花粉量巨大,易造成花瓣和环境的污染,引发花粉过敏人群的过敏症状,所以培育百合无花粉和少花粉百合品种正成为国内外商品百合的育种目标之一。因三倍体具有高度不育性,所以培育三倍体是产生花粉败育新种质的重要途径^[1]。国内关于百合 2n 花粉诱导、2n 花粉鉴定等研究已有基础,如郑思乡等^[1]以东方百合为材料,在离体条件下采用秋水仙素诱导多倍体,突变率为 50%;封紫等^[2]采用氟乐灵能成功诱导 LA 系百合 Bonsior(2n=2x=36)的 2n 花粉;臧淑珍等^[3]通过试验发现,使用浓度为 0.1%、注射体积为 0.1 mL 的秋水仙素诱导亚洲百合 2n 配子为最佳;张彩霞等^[4]对西伯利亚品种的花粉母细胞的减数分裂及其雄配子体发育观测,发现在不同植株或相同植株的花蕾中,百合减数分裂的染色体行为表现不同步;而 AKUTSU 等^[5]通过试验证

明减数分裂中期 I 为诱导 2n 配子的较好时期等。

流式细胞术(Flow cytometry,简称 FCM)作为一种较为传统的测定基因组大小的技术,通过对细胞的光散射和不同荧光的多参数同步测定,可快速、精确地定性和定量分析测定某一细胞中的 DNA 含量^[6]。因此也可以鉴别植株的染色体倍性水平。在植物研究方面,这种方法已被成功地用于百合^[7]、草莓^[8]和枇杷^[9]等的倍性检测研究。对于东方百合“索尔邦”2n 花粉的诱导及其鉴定,国内仅仅在麝香百合、亚洲百合及东方百合的西伯利亚品种做过相应的研究,尚无采用流式细胞术对诱导得到的 2n 花粉为材料进行染色体倍性的鉴定。现采用脱脂棉包裹法研究筛选不同浓度的秋水仙素处理不同时间诱导东方百合“索尔邦”2n 花粉的最佳条件,对诱导获得的 2n 花粉粒做了系统的细胞学鉴定及染色体倍性鉴定的研究,以期对东方百合无花粉新种质的选育提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为东方百合“索尔邦”(Lilium oriental ‘Sorbonne’)。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉母细胞减数分裂观察 采用涂片法,对不同花蕾长度的花粉母细胞进行减数分裂期观察,并记录花蕾生长长度对应的花粉细胞减数分裂时期。

1.2.2 百合 2n 花粉诱导 对处于前期 I 的花蕾进行秋水仙素处理。采用棉球包裹法对花蕾处理。分别用浸透 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%秋水仙素溶液的棉

第一作者简介:廖晓珊(1984-),女,湖南长沙人,硕士,农艺师,现主要从事百合杂交育种技术等研究工作。E-mail:48191033@qq.com.

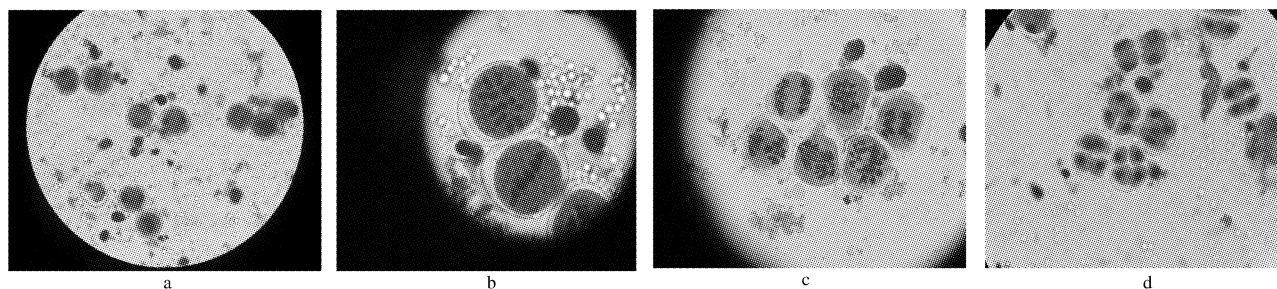
责任作者:郑思乡(1966-),男,湖南华容人,博士,研究员,现主要从事花卉生物技术与育种等研究工作。E-mail:zhengqianlian@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160176);株洲市企业创新引导资金资助项目(株科发[2014]45号);株洲市领军人才资助项目;贵州省科技厅资助项目(黔科合 J 字[2010]2090;黔科合 NY 字[2010]3074)。

收稿日期:2015-12-18

球包裹花蕾各 8 个,24、48 h 后用清水冲洗干净。而对照花蕾用清水浸透包裹处理,3 次重复。在花朵盛开时收集花粉,晾干并保存在冰箱。利用显微镜观察每个处理的 300 粒花粉,进行分析统计。

1.2.3 2n 花粉的倍性鉴定 对获得的 2n 花粉粒采用流式细胞仪进行鉴定。参考吴青青等^[7]流式细胞仪测定百合花粉倍性的方法。



注:a.花蕾长度 24 mm 时,减数分裂前期 I;b.花蕾长度 25 mm 时,减数分裂中期 I;c.花蕾长度 27 mm 时,减数分裂后期 II;d.花蕾长度 28 mm 时,减数分裂末期 II。

Note:a. When the bud length was 24 mm, meiotic prophase I; b. When the bud length was 25 mm, meiotic metaphase I; c. When the bud length was 27 mm, meiotic anaphase II classification; d. When the bud length was 28 mm, the end of meiosis II.

图 1 与花蕾长度对应的减数分裂时期

Fig. 1 The bud length corresponding to the period of meiosis

当“索尔邦”的花蕾长度为 24 mm 时,通过显微观察发现其花粉细胞处在减数分裂前期 I;当其长度在 25 mm 时,花粉细胞处在减数分裂中期 I;当长度为 27 mm 时花粉细胞进入减数分裂后期 II,当其长度为 28 mm 时观察其已进入四分体时期。参考 AKUTSU 等^[5]的试验结果,即减数分裂中期 I 为诱导 2n 配子的较好时期。因此,选择 25 mm 左右的花蕾作为秋水仙素诱导材料。

2.2 2n 花粉的诱导效果

分别在“索尔邦”花蕾长度为 25 mm 进入减数分离前期 I 时用 0.1%~0.5% 浓度的秋水仙素采用棉球包裹法处理二倍体品种的花蕾。使用秋水仙素溶液浸泡过的棉球包裹百合花蕾,得到外部形态明显变异的花蕾(图 3)。此种方法与以往的注射法有一定差别,能够更加灵活的控制处理时间和浓度,效果更加明显。棉球包裹法的优点在于对花蕾无机械损失,缺点是药液容易挥发,药品渗透的量减少。但在该试验中,采用脱脂棉包裹法,使用的秋水仙素浓度较高,延长处理时间,虽然在高温下秋水仙素也容易蒸发,试验中要注意保持空气湿度,以使处理的效果较明显。

从图 2 可知,随着处理浓度的提高与处理时间的增加,处理后的花蕾膨大数量和落蕾数逐渐增加,说明百合花器官对秋水仙素较敏感。植株矮化明显,说明植株顶端优势受到抑制。通过试验发现秋水仙素的浓

2 结果与分析

2.1 减数分裂时期与花蕾长度的关联

通过对“索尔邦”的减数分裂过程观察,发现随着减数分裂的进行,不同时期的花蕾长度、大小等形态特征有明显区别,而不同品种的东方百合生长速度不一致,进入减数分裂的时期也不同。

度和处理时间与百合花蕾变异膨大率成正比,花蕾对于秋水仙素非常敏感,当处理浓度和时间到达一定阈值时(即浓度 0.3% 处理时间 48 h 或浓度 0.4% 处理时间 24 h),花蕾对秋水仙素的耐受力到达极限;当浓度再增加、处理时间再延长时,花蕾的变异率下降,死亡率升高。表 1 表明,采用包裹法诱导花蕾膨大率的最佳处理浓度为 0.4% 处理 24 h 和处理浓度 0.3% 处理 48 h。

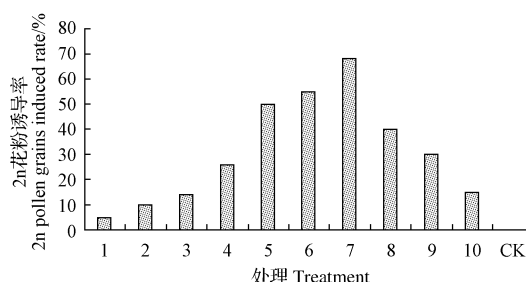
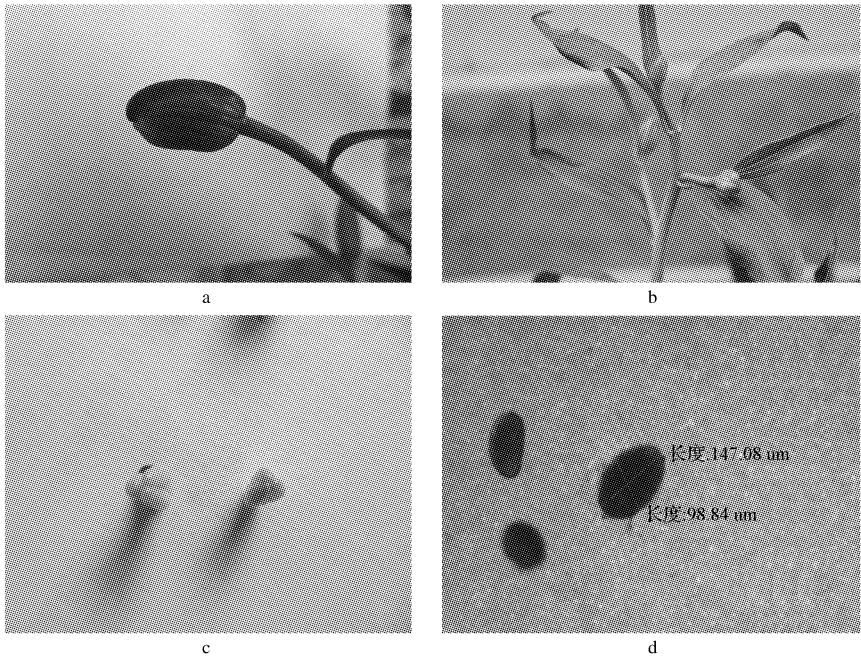


图 2 秋水仙素诱导产生 2n 花粉的百分比

Fig. 2 The percentage of 2n pollen grains induced by colchicines

2.3 2n 花粉的细胞学鉴定及统计分析

由于 2n 花粉粒含有较 n 花粉粒多 1 倍的染色体,原生质也较丰富,所以其体积远较 n 花粉粒大。对 10 个组合的花粉进行显微镜观察,筛选出巨大花粉粒。观察符合条件的花粉粒减数分裂。发现在减数分裂阶



注:a. 棉球包裹处理的花蕾;b. 未处理的花蕾;c. 花药处理(左)与正常(右)的对照;d. 2n 花粉粒。

Note:a. The buds was treated by package method;b. Untreated buds;c. Anther-processed compared with normal controls;d. 2n pollen grain.

图 3 秋水仙素处理的花蕾、花药及 2n 花粉粒

Fig. 3 The flowers,anther and 2n pollen treated by colchicine

表 1

秋水仙素对“索尔邦”的诱变效果

Table 1

The inducing effect of colchicine on ‘Sorbonne’

编号 Number	浓度 Concentration/%	时间 Time/h	处理花蕾数 Treated buds/个	落蕾数 Death buds/个	异常膨大蕾数 Abnormal enlargement buds/个	死亡率 Death rate/%	异常膨大率 Abnormal enlargement rate/%
1	0.1	24	20	2	2	10	11
2	0.1	48	20	2	2	10	11
3	0.2	24	20	4	3	20	19
4	0.2	48	20	4	4	20	25
5	0.3	24	20	5	4	25	27
6	0.3	48	20	5	5	25	33
7	0.4	24	20	5	5	25	33
8	0.4	48	20	6	4	30	29
9	0.5	24	20	10	3	50	30
10	0.5	48	20	12	2	60	33

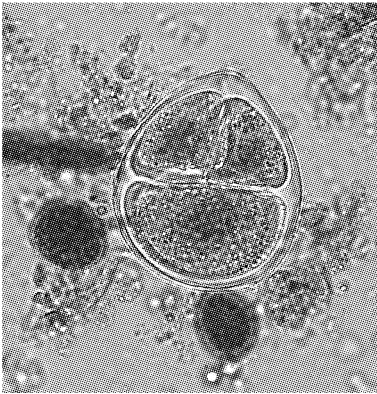


图 4 四分体时期的三分体

Fig. 4 The triad at the tetrad stage

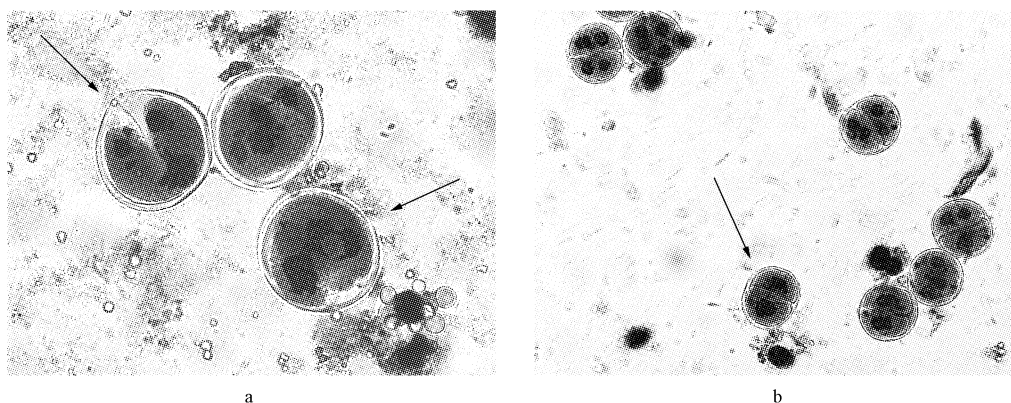
段的四分体时期存在三分体(图 4),进而由此判断为 2n 花粉。

根据 2n 花粉频率计算公式为: $P(\%) = \frac{2n \text{ 花粉粒}}{(2n \text{ 花粉粒} + n \text{ 花粉粒})} \times 100$ 。其中,败育的花粉不计入其中^[10]。与未处理花朵的花粉进行比较,秋水仙素能够有效的促进 2n 花粉的产生。从图 2 可以看出,在设定范围内,随着处理浓度和时间的增加,2n 花粉的诱变率也增加,当处理浓度为 0.4%、处理时间为 24 h 时,镜检发现 2n 花粉的诱变率达到最大值 68%。当浓度再升高时,诱变率不升反降,说明花粉的受损伤数量增多,失活率增加。再结合表 1 的结果分析,得出采用秋水仙素使用包裹法诱导百合 2n 花粉的最佳浓度为 0.4%、处理时间为 24 h。

2.4 2n 花粉的细胞学观察

百合是单子叶植物,与双子叶植物同时型减数分裂不同,其胞质分裂属于连续型。其产生的 2n 配子遗传类型是 FDR(first division restitution)、SDR(second division restitution)2 种^[11]。将减数分裂的某一次缺失或胞质分裂异常会导致产生四分体时期的二分体或三分体作为百合产生 2n 配子的细胞学证据。即 FDR 经过一次减数分裂后一直保持二分体形态(图 5a),而 SDR 在经过正常的第 1 次减数分裂后会缺失第 2 次减数分裂,具体表现就是染色体分离而胞质不分离(图 5b)。这种

不均等分离引起遗传物质分配不均匀,是导致配子不育的主要原因^[12]。因纺锤体定位异常而产生的 2n 配子在遗传上等同于 FDR 型,而 SDR 型 2n 配子因减数分裂时期遗传物质分配不均导致败育,所以 FDR 型 2n 配子在有性多倍化育种中具有重要的利用价值^[13],通过对大量的试验材料减数分裂观察,发现了很多四分体时期的二分体、三分体现象,同时也有胞质分离异常及不分裂现象的产生,从而得知即使在同一花药内的小孢子母细胞,它们的发育阶段却是不同步的。筛选保存 2n 花粉,准备进行下一步检测。



注:a. 胞质分离异常图;b. 四分体时期的二分体、三分体。

Note:a. The picture of abnormal cytoplasmic separation;b. The triad,dyad were at the tetrad stage.

图 5 减数分裂期染色体特征

Fig. 5 The image of meiosis chromosome characteristics observed

2.5 2n 花粉的倍性鉴定

流式细胞术倍性鉴定可在短时间内高速分析上万个细胞,能同时对许多样本的大量细胞核 DNA 含量进行测定,DNA 含量变异可在分布图上直观地看出。细胞核 DNA 含量的比较,一般以 G0-G1 期细胞核 DNA 含量 2C 相对值的高低来表示。

百合花粉粒为椭圆形,长径在 100 μm 左右,体积微小,花粉壁厚,在经过花粉破碎、细胞核提取液的裂解以及 30 μm 的筛网过滤之后,得到的悬浮液基本为单一细胞核和较小的细胞碎片。叶片与花粉均采用 dapi 染料,提取液采用 Cystain UV Precise T。

图 6 为诱导植株的鲜嫩叶片 DNA 含量,叶片的二倍体 G0-G1 值为 83.96,CV 值为 9.53%。图 7 为同一植株经诱导后得到的 2n 花粉粒 DNA 含量,2n 花粉的单倍体峰的 G0-G1 值为 41.03,CV 值 6.53%;二倍体峰 G0-G1 值为 77.16,CV 值为 6.40%。CV 值表示取样的变异系数,CV 值越高则表示取样同质性差。采用吴青青等^[7]测定百合花粉倍性方法所对得到的叶片和花粉进行上样检测,得到的 CV 值均在 10 以下,表明取样的同质性较好。从图 6、7 可以看出,不论是叶片 G0-G1 峰还是花粉 G0-G1 峰均较清晰,表明细胞碎片

较少。2n 花粉的二倍体峰 G0-G1 值是单倍体峰的 2 倍,而 2n 花粉的二倍体峰 G0-G1 值与叶片的二倍体峰 G0-G1 值相差不大。结果均表明所获 2n 花粉即为二倍体。

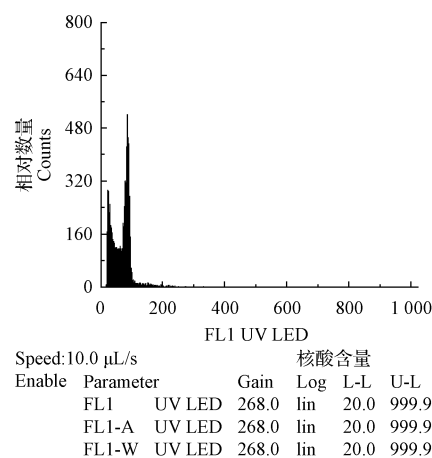


图 6 植株叶片 DNA 含量

Fig. 6 DNA content of plant leaves

3 讨论

未减数配子是百合种间杂种 F_1 代不育性的重要途

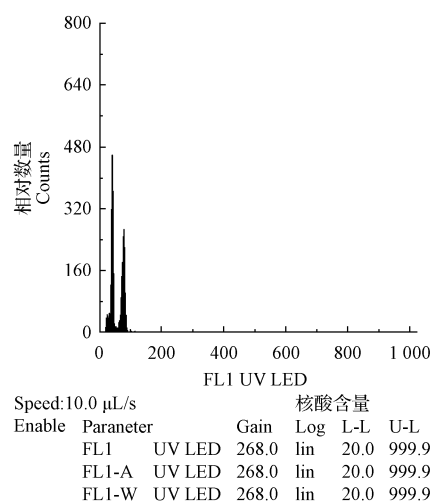


图7 2n花粉DNA含量

Fig. 7 DNA content of 2n pollen

径^[2]。张彩霞等^[12]的研究结果表明,花药发育进程与花蕾长度呈正相关关系;AKUTSU等^[5]的研究结果表明,在减数分裂中期 I 对花粉进行 2n 配子诱导,诱变率较高。通过对不同长度的花蕾花粉细胞的显微观察,选择在花蕾长度为 25 mm 时即在其减数分裂中期 I 时对二倍体花蕾进行秋水仙素诱导处理,通过统计诱变频率得到最佳处理条件,即处理浓度 0.4%,处理时间 24 h 能够得到诱变率高达 68% 的 2n 花粉。然后对巨大花粉粒(比 n 花粉粒直径大 30% 以上的花粉粒)及其染色体进行减数分裂细胞学观察得到在传递杂合性和上位性中具有特殊的价值^[13] FDR 型 2n 花粉。

流式细胞仪通过检测植株的 G0-G1 峰的核酸含量可以判断植物的倍性。将此项技术运用在百合花粉的倍性鉴定方面,能够直观、快速的判断检测花粉是否为

未减数配子。有助于 2n 花粉的精确筛选,缩短三倍体培育时间。通过该试验,课题组成功获得大量的 FDR 型 2n 花粉,为下一步东方百合无花粉新种质的培育奠定理论基础。

参考文献

- [1] 郑思乡,毛琪,吴福川,等. 东方百合 2n 配子杂交后代多倍体诱导研究初报[J]. 云南农业大学学报,2001,19(6):633-642.
- [2] 封紫,刘瑞峰,贾桂霞. 氟乐灵诱导百合 2n 花粉的研究[J]. 西北农业学报,2012,21(3):153-157.
- [3] 臧淑珍,杨佳明,赵兴华,等. 秋水仙素不同处理方法和浓度诱导百合 2n 配子的研究[J]. 北方园艺,2010(11):98-100.
- [4] 张彩霞,明军,李博生. 百合花粉母细胞减数分裂及其雄配子体发育观测[J]. 生物学通报,2009,44(10):53-56.
- [5] AKUTSU M, KITAMURA S, TODA R, et al. Production of 2n pollen of Asiatic hybrid lilies by nitrous oxide treatment[J]. Euphytica, 2007, 155: 143-152.
- [6] 李华,常莹. 流式细胞仪工作原理与临床应用[J]. 中国医疗器械信息,2011,17(5):37-45.
- [7] 吴青青,胡小京,黄伟,等. 流式细胞仪测定百合花粉倍性的研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(28):4-6.
- [8] 于红梅,王静,赵密珍. 等. 利用流式细胞仪检测草莓倍性方法的优化[J]. 南方农业学报,2014,43(10):1530-1533.
- [9] 张志珂,王永清,林顺权,等. 借助细胞流式仪进行枇杷基因组测序材料的倍性鉴定[J]. 果树学报,2012,29(3):498-504.
- [10] 肖增宽,陈伊里,李景华. 马铃薯倍性鉴定与 2n 配子材料筛选方法[J]. 东北农学院学报,1986,17(2):113-120.
- [11] BRETAGNOLLE F, THOMPSON J D. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants[J]. New Phytol, 1995, 129: 1-22.
- [12] 张彩霞,明军,刘春,等. 百合花粉母细胞减数分裂异常现象观测分析[J]. 生物学通报,2010,45(5):45-47.
- [13] 李洁筠,吴红芝,陈溪,等. 彩色马蹄莲 2n 配子育种技术初探[J]. 中国农学通报,2011,27(8):108-113.

Study on 2n Pollen Induction and Its Identification of *Lilium oriental*

LIAO Xiaoshan¹, WU Qingqing², ZHANG Zhaojun², ZHOU Jun¹, ZHENG Sixiang¹, WANG Linyu¹

(1. Agricultural Sciences Institute of Hunan Zhuzhou, Zhuzhou, Hunan 412000; 2 Horticultural Research Institute of Guizhou, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract: *Lilium oriental* ‘Sorbonne’ diploid cultivars were used as material to explored the method and possibility of stained with colchicine package method to induce 2n gamete. In order to get the best induced concentration and time, taking leaf from the same plant as control, 2n pollen were authenticated by flow cytometry instrument. The results showed that the highest mutation rate of flower buds was 68%, the best concentration of colchicines was 0.4%, and the handling time was 24 hours in the meiosis stage I of the pollen mother cell through package method. The abnormal phenomena like days and triads at the tetrad stage and cytoplasm separation but the chromosome non separation, etc. were observed, which was identified by flow cytometry. The results obtained that the 2n pollen was diploid as the monoecious plants for the control. The results implied that 2n pollen induced artificially can be a powerful method to creat the sexual polyploids of *Lilium oriental*.

Keywords: *Lilium oriental* ‘Sorbonne’; 2n pollen; colchicine