

DOI:10.11937/bfyy.201611026

# 杨山牡丹花粉母细胞减数分裂时期快速捕获方法初探及过程观察

张林娟<sup>1</sup>, 袁军辉<sup>2,3</sup>, 于水燕<sup>2,3</sup>, 胡永红<sup>2,3</sup>

(1. 上海师范大学, 上海 200234; 2. 上海辰山植物园 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海 201602;

3. 上海辰山植物园 上海市资源植物功能基因组学重点实验室, 上海 201602)

**摘 要:**以杨山牡丹花蕾为试材,通过持续的采样观察和染色体制片技术,研究了花蕾大小、花药颜色及平均气温对花粉母细胞减数分裂时期的影响,并观察了杨山牡丹花粉母细胞减数分裂全过程及其花粉粒形成过程中细胞内染色体的形态变化。结果表明:温度、花蕾大小和花药颜色是影响杨山牡丹减数分裂的关键因素,当日平均气温为 6.5~15.5℃、花蕾直径大小为 12~16 mm、花药颜色嫩黄时是杨山牡丹减数分裂的最佳观察时期。杨山牡丹花粉母细胞主要经过减数分裂期、四分体时期、小孢子早期、小孢子晚期和二核小孢子期进而形成花粉粒。该研究观察到杨山牡丹减数分裂过程中出现异常现象,即出现染色体桥、四分体。该研究为获得牡丹单一染色体提供了较好的技术支撑,为进一步从染色体水平开展分子生物学研究和遗传育种奠定了基础,并且也为其它植物获得减数分裂时期材料提供了借鉴。

**关键词:**杨山牡丹;染色体;减数分裂;小孢子;染色体桥

**中图分类号:**S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)11-0100-06

对于有性生殖的真核生物来说,减数分裂是一个非常重要的过程。它从二倍体细胞中产生单倍体配子,在这个过程中 DNA 复制一次发生 2 次连续的核分裂,染色体数目减半<sup>[1]</sup>。减数分裂既供应一半亲本染色体又因为遗传重组产生了有别于亲本的新遗传变异<sup>[2]</sup>,因此,对于维持个体的正常发育、保持物种的连续性和稳定性、揭示物种的起源以及物种的进化具有重要的主导作用。

不同植物减数分裂持续的时间并非一致,一般只有一天或几天,例如小麦(*Triticum aestivum*)减数分裂持续时间为 1 d,洋葱(*Allium cepa*)为 4 d,百合(*Lilium cvs*)为 7 d<sup>[3]</sup>。减数分裂与植物的生长状态、花蕾的大小及环境因子等密切相关,所以研究减数分裂过程和确定细胞减数分裂高峰期需要花大量时间和精力。目前仅在少量植物中有粗略的关于细胞减数分裂时期的报道,如席梦利等<sup>[4]</sup>、刘天伦<sup>[5]</sup>、高鹏等<sup>[6]</sup>、黄远新<sup>[7]</sup>分别通过观察麝香百合(*Lilium longiflorum*)的花蕾大小、水稻

(*Oryza sativa*)颖花的长度、杜仲(*Eucommia ulmoides*)花芽的长度及花药的变化、黑麦花药的长度来确定减数分裂时期,还有李静等<sup>[8]</sup>根据水培时间确定山杨(*Populus davidiana*)减数分裂期,并指出减数分裂还与花药的颜色变化相关。

富贵吉祥的牡丹,素有“国花”的美誉,是中国传统文化的重要组成部分<sup>[9-12]</sup>。牡丹属芍药科芍药属牡丹组(*Paeonia* section *Moutan* DC.),其根皮可以入药,籽油富含不饱和脂肪酸尤其是  $\alpha$ -亚麻酸,使得牡丹兼具观赏、药用和油用价值于一身<sup>[13-16]</sup>。杨山牡丹(*Paeonia ostii*)为江南牡丹品种群的主要原种之一<sup>[17]</sup>,其花为白色,花瓣基部偶见浅色红晕,花单瓣,作为药用牡丹栽培时通常称为“凤丹”。杨山牡丹主要栽培于北纬 28°12'53.1"~35°33'37.0",东经 106°33'09.0"~118°01'49.0",即河南、安徽、湖北、湖南、甘肃等地,这些地区年平均气温可达 15℃,年降雨量最低在 589.1 mm 左右,最高可达 1 200 mm 左右<sup>[17]</sup>,可见杨山牡丹分布范围较广,且具有耐湿热、适应性强的优点。

芍药属植物在细胞学上具有独特性,该属植物在胚胎发育早期具有长时间的多核现象和多细胞花粉现象,有利于体胚发育研究<sup>[18]</sup>;在绒毡层、大孢子母细胞和胚胎发生方式等方面显示出特殊性<sup>[19]</sup>。根据这一系列的细胞组织特性,早期的研究认为芍药属植物起源古老,

**第一作者简介:**张林娟(1990-),女,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:zlj11299@163.com

**基金项目:**上海市绿化与市容管理局重点攻关资助项目(G142435, G152424);上海市资源植物功能基因组学重点实验室资助项目(14DZ2260400)。

**收稿日期:**2015-12-16

甚至于可能和裸子植物近缘<sup>[20]</sup>,但当代分子系统学表明其属于虎耳草目,位于核心真双子叶植物的基部。因此,芍药科是研究被子植物形态演化的重要类群,是细胞学和进化研究方面的理想素材。虽然目前有一些关于芍药属植物花粉母细胞发育过程的研究报道,但并不全面且未见对其减数分裂发生时间、确定方法及影响减数分裂的因素等方面的系统研究。韩莉等<sup>[21]</sup>在研究牡丹小孢子发生与雄配子体发育时,以“紫二乔”品种为例,得出在山东泰安牡丹的减数分裂持续时间长达30 d,大约从3月中旬到4月中旬,但该研究没有总结气温变化、花蕾大小及花药颜色等与花粉母细胞减数分裂的关系。由于年际间的气温变化很大,在不同地区,牡丹的花期和减数分裂时期往往是不一样的,即便在同一地区,牡丹花粉母细胞的减数分裂时期也可能不一样。因此,准确确定花粉母细胞减数分裂发生的时间依然是一件十分困难的事情。此外,长达30 d的采样,需要消耗大量的试验材料,投入大量的人员和时间成本,显然既费工又费时。在其它少量相关研究中,研究者们也大多采用一个“经验时间”判断减数分裂期,从其研究结果也可以看出,因为采样时间不确定,未能全面观察到减数分裂的过程<sup>[22-23]</sup>。另外,多数研究芍药属植物花粉母细胞的发育过程主要采用石蜡切片技术观察<sup>[24-26]</sup>,但石蜡切片所需时间较长(约7 d),不利于快速检测花粉母细胞的分裂状况,对取材也有一定局限性。

现以杨山牡丹花蕾为试验材料,对杨山牡丹花粉母细胞减数分裂及花粉粒形成过程中细胞及染色体形态变化进行了全面系统的观察研究,并且初步探究了一种快速捕获杨山牡丹花粉母细胞减数分裂时间点的方法,以加深对油用牡丹花粉形成和发育细胞学过程的理解,加快油用牡丹新品种培育及在细胞分子水平的研究步伐,提高牡丹价值的开发利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试杨山牡丹花蕾采自上海辰山植物园牡丹基地(北纬31°4'52",东经121°10'14")。

仪器和试剂:蔡司体视显微镜(购自卡尔蔡司),中性树胶(购自中国上海懿洋仪器有限公司),玻片(购自Fan Yi),卡诺固定液,卡宝品红。

卡诺固定液配制:无水乙醇:冰醋酸=3:1。

卡宝品红染色液按照穆光丽<sup>[27]</sup>的配方配制,配制好的染色液放置7 d后使用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 在9:00—10:00将花蕾取下,摘去花瓣并切下部分花托,放入卡诺固定液中,固定3 h后转入70%的酒精中,−20℃保存。该试验共采集了56个花蕾样品,花蕾直径大小为11.50~18.75 mm。

1.2.2 花粉母细胞染色体永久制片 参考李懋学<sup>[28]</sup>的制片方法,对试验材料进行修改、优化后进行永久制片的操作:将保存在70%酒精中的花蕾取出,撕取1根雄蕊,吸去上面的酒精,置于载玻片上;滴加45%醋酸,用解剖针切取一小部分花药,剩余花药放入70%酒精中保存;继续滴加1滴卡宝品红,用镊子将花药捏碎,挤出细胞,去除残渣;在显微镜下初步观察是否有所需时期的细胞;若无,重新选取雄蕊,若有,则继续以下试验;盖上盖玻片,用力压片,注意根据不同时期,所需的力道也不一样;第1、2次减数分裂后期所需力道稍大点,这样能使染色体完全散开,易于分离;将盖上盖玻片的载玻片放入液氮中,立即取出,快速揭去盖玻片,晾干,在75%酒精中静置10 s取出,晾干,在样品处滴加2滴中性树胶,盖上盖玻片,晾干;在100倍油镜下观察各个时期,并拍照,共拍摄727张照片。

## 2 结果与分析

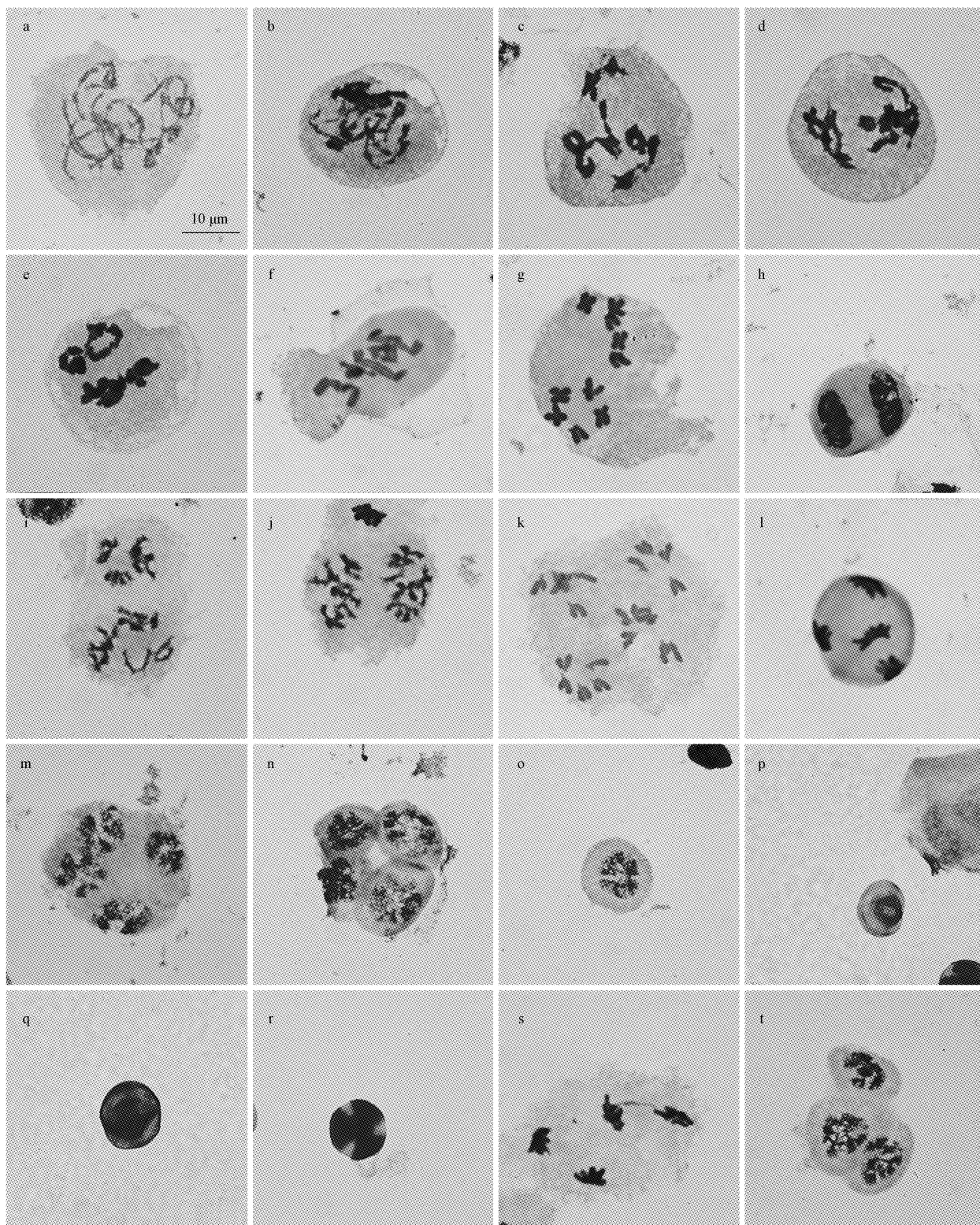
### 2.1 杨山牡丹花粉母细胞减数分裂期的形态变化

杨山牡丹花粉母细胞从减数第1次分裂前期到花粉粒形成期间的形态变化主要是细胞核及染色体的形态变化。

2.1.1 减数第1次分裂 由图1可以看出,杨山牡丹减数第1次分裂前期清楚的划分为细线期(图1a)、偶线期(图1b)、粗线期(图1c)、双线期(图1d)、终变期(图1e)。细线期的染色体呈散乱的线状;在偶线期,同源染色体进行配对;粗线期时,染色体缩粗变短,此时之间发生交叉互换;到双线期时染色体进一步缩粗变短,同源染色体开始分离,但分离不完全,呈现不同形状,有V型、O型、8型、X型;终变期时,染色体进一步凝缩,并向核的周围靠近,进入到减数第1次分裂中期(图1f),此时同源染色体排列在赤道板上,每对同源染色体仍有交叉,近端着丝粒的同源染色体常在长臂一端交叉,呈线状,中端着丝粒同源染色体常常两臂交叉,呈棱形。减数第1次分裂后期(图1g)时,同源染色体分离,分别移向细胞两极,能够清楚的观察到10条染色体,每条染色体含有2条姐妹染色单体,并且最小的染色体为近端着丝粒染色体。减数第1次分裂后期是获得单条染色体的较佳时期。到了减数第1次分裂末期(图1h),染色体移动到细胞两极。

2.1.2 减数第2次分裂 减数第2次分裂前期(图1i)2个子细胞中的染色体散乱分布于细胞中,而后再次凝集。到减数第2次分裂中期(图1j)时,染色体开始移向赤道板,着丝粒开始排列在赤道板上。减数第2次分裂后期(图1k),每条染色体从着丝粒处分离,分别移向细胞两极,2个子细胞中一共可以清晰的观察到20条染色体,减数第2次分裂后期为分离切割染色体的最佳时期。减数第2次分裂末期(图1l、m),染色体分别到达细胞两极,去凝集,子细胞再次分裂为2个子细胞,减数分裂结束。





注:a. 细线期;b. 偶线期;c. 粗线期;d. 双线期;e. 终变期;f. 减数第1次分裂中期;g. 减数第1次分裂后期;h. 减数第1次分裂末期;i. 减数第2次分裂前期;j. 减数第2次分裂中期;k. 减数第2次分裂后期;l. 减数第2次分裂末期;m. 减数第2次分裂末期;n. 四分体时期;o. 单核小孢子早期;p. 单核小孢子晚期;q. 二核小孢子时期;r. 成熟花粉粒;s. 染色体桥;t. 三分体。

图1 光学显微镜下观察的杨山牡丹减数分裂和花粉粒形成过程染色体形态变化以及减数分裂异常现象



2.2 花粉粒形成过程

花粉粒的形成主要经历了四分体时期、单核小孢子早期、单核小孢子晚期、双核小孢子时期和成熟花粉粒(图 1n~r)。图 1n 可以清楚的观察到 4 个子细胞,细胞核位于细胞中央,呈圆形或椭圆形,细胞质较浓厚,4 个子细胞聚集在一起,形成四分体。图 1o 为单核小孢子早期,子细胞从四分体中释放出来,形成小孢子,此时的小孢子为圆形,细胞核位于细胞中央。单核小孢子晚期,也称单核靠边期,细胞核位于细胞的一边,如图 1p 所示。从图 1q 可以看出,单核小孢子进行有丝分裂形成的 2 个子核,生殖核的染色质不断浓缩,造成两核的明显分化,生殖细胞相对于营养细胞小很多。成熟的花粉粒呈圆三角形,卡宝品红染色部分呈三叶风扇,有 3 个萌发孔,如图 1r 所示。

2.3 减数分裂异常现象

该研究中进一步观察到杨山牡丹减数分裂存在异常现象,出现染色体桥和三分体。在杨山牡丹减数分裂时期,可以明显观察到染色体桥,染色体桥是指在染色体分别向两极移动过程中,一桥状物将两极染色体连接,如图 1s 所示。正常分裂过程中,到减数第 2 次分裂末期时,均等的分成 4 个子细胞,4 个子细胞聚集在一起为四分体,但是由于染色体的不均等分裂导致三分体的形成,如图 1t 所示。

2.4 确定杨山牡丹花粉母细胞进行减数分裂的时间段

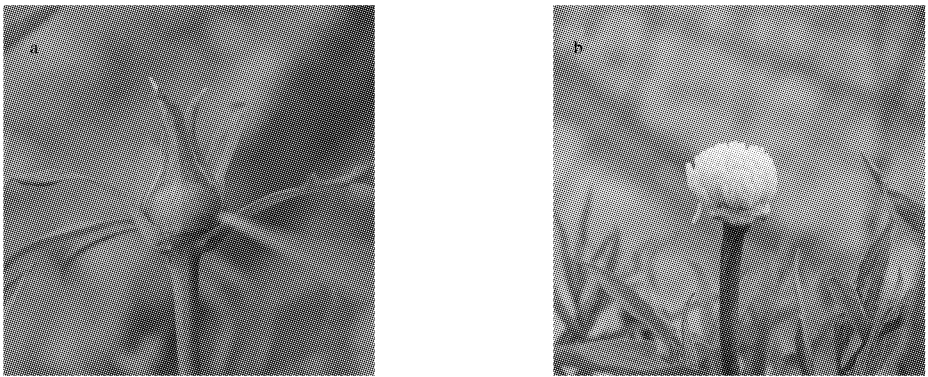
花蕾直径大小为 12~16 mm(表 1,图 2a),减数分裂较旺盛。在此范围内能够找到减数分裂过程中各个时期的细胞;日平均温度在 6.5~15.5 ℃时较佳。当花蕾中大多数花粉母细胞处于减数分裂期时,花药颜色大都为嫩黄(图 2b);而当花药颜色为嫩黄偏乳白时,大多数花粉母细胞还未进入减数分裂期;而当花药颜色转变为黄色时,则绝大多数花粉母细胞已经过了减数分裂时期,此时采样则太晚。由表 1 可知,当雄蕊颜色嫩黄,花蕾直径 13.35~13.45 mm 时,从花药中检测到的处于减数

分裂时期的细胞达 50%以上,且通过压片可以观察到大多数减数第 1 次分裂中期到减数第 2 次分裂后期的细胞。

从以上试验可知,牡丹花粉母细胞处于减数分裂期时花蕾直径大小为 12~16 mm(表 1),平均温度为 6.5~15.5 ℃,花药颜色为嫩黄(图 2b),该条件下采集的样品减数分裂较旺盛,可从 10%~90%的花粉母细胞中检测到减数分裂,且有较多处于后期的染色体。由此特征参数可知,进行减数分裂时期的花蕾发育大致处于风铃期,并且确定了在上海地区 2014 年 3 月 5 日左右,花蕾中间较长花药可见减数分裂时期染色体;3 月 10 日左右,大部分花蕾减数分裂较旺盛,此时期为观察减数分裂的最佳时期;3 月 12 日左右,大部分减数分裂结束,开始形成四分体;3 月 15 日左右,开始形成花粉粒;3 月 17 日左右,已有较多花粉粒成熟。2015 年采集处于减数分裂时期花蕾的最佳时期为 3 月 19—21 日。

表 1 杨山牡丹花蕾直径、平均温度和花药颜色所对应的分裂时期细胞数百分比

花蕾直径/mm	平均温度/℃	雄蕊颜色	减数分裂细胞数/%
<11.50	<7.5	嫩黄偏乳白	0
11.70~11.80	6.5~8.5	嫩黄偏乳白	1
12.00~12.10	7.0~9.5	嫩黄	10
12.47~13.32	7.5~15.5	黄	0~2
13.35~13.45	10.5~15.5	嫩黄	50~90
13.44~13.45	11.0~15.5	黄	0~1
13.46	9.5	黄	1
13.51~13.60	7.5~15.5	黄	0~1
13.67	9.5	嫩黄偏乳白	0
13.69~13.75	9.5~15.5	黄	0
13.77	10.5	嫩黄	29
13.80~13.83	11.0~13.0	黄	0
13.85	9.5	嫩黄偏乳白	2
13.85	11.0	黄	0
13.95	9.5	嫩黄偏乳白	3
14.60~15.30	6.5~8.5	嫩黄	18~30
15.95~16.00	8.5~12.5	黄	0
16.00	8.5	嫩黄	25
16.60~17.50	8.5~18.5	黄	0~1
>17.50	>13.0	黄	0



注:a.完整花蕾;b.嫩黄的花药。

图 2 杨山牡丹减数分裂时期的花蕾

### 3 讨论

#### 3.1 牡丹花粉粒形成

木本植物小孢子减数分裂到花粉粒形成过程基本相似,但最终形成的是不同的多细胞花粉,华北落叶松形成的是五细胞花粉粒<sup>[29]</sup>,而牡丹为二胞花粉。该研究通过杨山牡丹花粉母细胞减数分裂期的特征参数,采集到所需样品并且比较系统的总结了杨山牡丹花粉母细胞减数分裂及花粉粒形成过程中细胞和染色体的形态变化,对杨山牡丹花粉粒的发育形成有了进一步的认识。另外通过花粉母细胞压片观察第1次减数分裂后期,可明显看到5对染色体,其中3对为中端着丝粒染色体,1对为近端着丝粒染色体,1对为近中端着丝粒染色体,这与张赞平等<sup>[30]</sup>在杨山牡丹的核型分析以及李子峰等<sup>[31]</sup>研究凤丹核型为 $2n=2x=10=6m+2sm+2s$ 的结论相同。花粉母细胞到花粉形成的发育过程是复杂的,在单核小孢子晚期形成二细胞花粉过程中进行了一次有丝分裂,在该研究中未详细概括,还有待进一步深入研究。

#### 3.2 减数分裂异常现象突出

在观察染色体形态变化的过程中,观察到染色体分裂异常现象,主要为染色体桥。穆光丽<sup>[27]</sup>在研究芍药属染色体减数分裂行为和进化中指出,染色体桥的形成是由于染色体交叉端化延迟或失败导致染色体分离障碍,还有一种原因是同源染色体臂内倒位区域发生了DNA片段的交换,发生交换的倒位区域不能正常分离,从而形成倒位桥。在减数分裂结束时不止有四分体,还出现较多的三分体,这与郝捷等<sup>[32]</sup>观察紫斑牡丹染色体行为异常相似。三分体形成的机制主要是由于在减数第2次分裂后期只有一半的染色单体正常分裂,而另一半则不分裂。最后形成了大小不等的配子<sup>[33]</sup>。已有研究报道指出芍药属小孢子发育过程中,在减数分裂期染色体行为异常会导致花粉败育<sup>[24]</sup>。针对减数分裂异常现象的研究可以探究花粉败育的原因,进而提高育性和结籽量。

#### 3.3 依据花蕾大小、花药颜色等快速捕获牡丹减数分裂时期

相对于动物,植物细胞减数分裂时间较短,BENNETT等<sup>[34]</sup>统计了15种被子植物减数分裂持续时间,大部分集中在18~38 h,少数为144 h和180 h,可见大多数被子植物减数分裂所经历的时间较短,容易错过取材时间,对获取分裂期细胞造成一定难度。所以找到一种简单快速的确认减数分裂期的方法很有必要。ROBERT等<sup>[35]</sup>在有关花药发育的1篇文章里曾提到,细胞的分化和开裂是按时间次序发生并与花蕾的大小是一一对应的。JULIAN等<sup>[36]</sup>研究发现杏树(*Prunus armeniaca* L.)花药减数分裂时间是与冬季低温有关。该研究结合

气温、花药颜色、直径来获取减数分裂时期材料,其它植物也可以通过观察花蕾的大小颜色以及气温,从而确定减数分裂的时间点,快速获取减数分裂期的细胞。因此,该研究方法为其它植物获取减数分裂时期的材料提供了借鉴。

该研究方法结合采样时气温、花药颜色和花蕾直径的多重标准选取合适的花蕾,采用染色体压片技术,取材固定后当天就可以观察检测,避免了现有技术采样时,由于偶然性与不确定性因素的存在,而错过得到处于减数分裂时期的牡丹花粉母细胞的最佳时期。采用该方法,能够采到牡丹减数分裂时期的细胞样品,通过观察能够确定各个时期,避免了采样的盲目性,为科研工作节省了时间和人力、节约了成本、提高了工作效率。与此同时,将获取的处于减数分裂时期的花药作为材料,用特殊的玻片进行染色体制片,得到分散的处于减数分裂中期的染色体,并对单条染色体进行显微切割扩增,可得到目的条带,因此该研究方法为更加全面深入地揭示减数分裂这一生命现象提供了试验材料,也为下游牡丹单染色体及牡丹基因组研究提供了基础。

通过该试验研究发现,在染色体制片过程中发现花蕾发育出现不同步现象,同一花蕾中,中间雄蕊发育较快,边缘较慢;且在同一雄蕊中发育也不同步,在形态学上端发育较下端快。所以,在取材时也可根据花蕾发育不同步现象结合上述采样依据(花蕾直径大小为12~16 mm,平均温度为6.5~15.5℃,花药颜色为嫩黄选择合适的样品)。

该研究观察了杨山牡丹减数分裂时期染色体的形态变化,以期获取其减数分裂时期单条染色体,为下游科学研究做好铺垫。在采样和观察的过程中,初步探究了以杨山牡丹花蕾大小、花药颜色以及平均温度为依据,采集杨山牡丹减数分裂时期花蕾的方法。该方法更加精细的结果有待在此观察的基础上选取大量样本进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] DING D Q. A rush hour towards sexual reproduction: The chromosome dynamics during meiosis[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(33): 3500-3503.
- [2] HARRISON C J. Meiosis in flowering plants and other green organisms[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(11): 2863-2875.
- [3] 李懋学, 张纯方. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991: 1-60.
- [4] 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, 2008, 32(6): 43-46.
- [5] 刘天伦. 水稻花粉母细胞减数分裂的时期[J]. 中国农科科学, 1981(1): 38-42.
- [6] 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.
- [7] 黄远新. 黑麦减数分裂时期的定位观察[J]. 生物学通报, 2008, 43(11): 53-55.

- [8] 李静,李正华,郭成博,等. 山杨小孢子发生与雄配子体发育进程即时观察[J]. 林业科技,2014,39(3):5-7.
- [9] 成仿云,李嘉珏,陈德忠,等. 中国紫斑牡丹[M]. 北京:中国林业出版社,2005:1-94.
- [10] 李嘉珏,张西方,赵孝庆. 中国牡丹[M]. 北京:中国大百科全书出版社,2011:1-164.
- [11] HONG D. Peonies of the world[M]. Taxonomy and Phytogeography. Royal Botanical Gardens Kew, London; Missouri Botanical Garden, St. Louis, 2010.
- [12] YUAN J H, CORNILLE A, GIRAUD T, et al. Independent domestications of cultivated tree peonies from different wild peony species[J]. Molecular Ecology, 2014(23): 82-95.
- [13] 王荣花,刘雅丽. 牡丹和芍药花瓣中高级脂肪酸组分及含量的测定[J]. 中国农学通报,2004(20):212-214.
- [14] 高婷婷. 牡丹籽油成分分析及储藏条件研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [15] 史国安,郭香凤,金宝磊,等. 牡丹籽油超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺优化及抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报,2013(28):47-50.
- [16] LI S S, YUAN R Y, CHEN L G, et al. Systematic qualitative and quantitative assessment of fatty acids in the seeds of 60 tree peony (*Paeonia section Moutan* DC.) cultivars by GC-MS[J]. Food Chemistry, 2014, 173: 133-140.
- [17] 王佳. 杨山牡丹遗传多样性与江南牡丹品种资源研究[D]. 北京:北京林业大学,2009.
- [18] 李萍,成仿云. 牡丹组织培养技术的研究进展[J]. 北方园艺,2007(11):102-106.
- [19] 彭镇华,江守和. 芍药科植物特性与起源[J]. 安徽农业大学学报,2000,27(3):209-213.
- [20] 母锡金,王伏雄. 芍药胚和胚乳早期发育的研究[J]. 植物学报,1985(27):7-12.
- [21] 韩莉,孔兰静,王宗正,等. 牡丹小孢子发生与雄配子体发育的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2000,31(1):27-31.
- [22] 李懋学. 芍药的小孢子母细胞减数分裂和花粉的发育[J]. 园艺学报,1981,8(4):49-55.
- [23] 于玲,何丽霞. 紫斑牡丹小孢子形成过程的细胞遗传学研究[J]. 西北植物学报,2000,20(3):467-471.
- [24] 成仿云. 紫斑牡丹花粉发育的细胞形态学研究[J]. 园艺学报,1998,25(4):367-373.
- [25] 魏乐,张怀刚. 3种牡丹雄配子体发育的比较研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(2):509-511.
- [26] 许世磊,宋春花,侯祥云,等. 川赤芍花粉粒发育过程的细胞学观察[J]. 山东农业科学,2012,44(1):29-31.
- [27] 穆光丽. 芍药属染色体减数分裂行为和进化[D]. 北京:中国科学院植物研究所,2013.
- [28] 李懋学. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:1-56.
- [29] 张守攻,杨文华,李懋学,等. 华北落叶松小孢子母细胞(PMC)减数分裂和花粉的发育[J]. 植物分类学报,2007,45(4):505-512.
- [30] 张赞平,侯小改. 杨山牡丹的核型分析[J]. 遗传快报,1996,18(5):3-6.
- [31] 李子峰,王佳,胡永红,等. ‘凤丹白’牡丹核型分析与减数分裂的细胞遗传学观察[J]. 园艺学报,2007,34(2):411-416.
- [32] 郝捷,刘胜. 紫斑牡丹栽培品种小孢子发育过程的细胞遗传学研究[J]. 生物学杂志,2000,17(3):16-18.
- [33] 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.
- [34] BENNETT M D, LEWIS K R, HARBERD D J. The time and duration of meiosis (and discussion)[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 1977, 277(955): 201-226.
- [35] ROBERT B G, THOMAS P B, PAUL M S. Anther development: basic principles and practical applications[J]. The Plant Cell, 1993, 5: 1217-1229.
- [36] JULIAN C, HERRERO M, RODRIGO J. Anther meiosis time is related to winter cold temperatures in apricot (*Prunus armeniaca* L.) [J]. Environmental and Experimental Botany, 2014, 100: 20-25.

## The Initial Research on Approach of Quickly Capture Meiosis Period and Observation of Meiosis Process in Pollen Mother Cell in *Paeonia ostii*

ZHANG Linjuan<sup>1</sup>, YUAN Junhui<sup>2,3</sup>, YU Shuiyan<sup>2,3</sup>, HU Yonghong<sup>2,3</sup>

(1. Shanghai Normal University, Shanghai 200234; 2. Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, the Chinese Academy of Science, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602; 3. Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resources, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602)

**Abstract:** The *Paeonia ostii* buds was taken as the material, then the effects of flower bud size, anther color and average temperature on pollen mother cell meiosis were researched by consecutive observation of sampling and slide-preparing technique of chromosome. And the detailed cell chromosomes morphological changes in the whole process of pollen mother cell meiosis and the process of pollen grain formation of *Paeonia ostii* was characterized in this paper. The results showed that the temperature, bud size, and anther color were the key factors which influence the meiosis through based on consecutive observation of sampling, the best observation period of meiosis in tree peony when the daily average temperature was 6.5—15.5 °C, the bud diameter size was 12—16 mm, and the anther was bright yellow. The formation of pollen grain in *P. ostii* mainly consist of pollen mother cell meiosis stage, metaphase, early stage of mononuclear microspore, later stage of mononuclear microspore and two nuclear microspore stage and then form pollen grain finally. The research observed *P. ostii* meiosis exist anomalies further, such as chromosome bridge, abnormal tetrad. This research provided basic technical support for obtaining the single chromosome of tree peony, further lay a foundation for molecular biology research and genetic breeding in chromosome level, and provided the reference for other plants.

**Keywords:** *Paeonia ostii*; chromosome; meiosis; microspore; chromosome bridge