

中国水仙的核型分析和小孢子发生中的细胞学研究

王 瑞 陈林姣 赵玉辉 武 剑 田惠桥*

(厦门大学生命科学学院, 厦门361005)

摘要 中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)只开花不结实,以鳞茎营养繁殖。对中国水仙的染色体倍性有不同的报道。对中国水仙的核型分析,支持它是三倍体的观点,但其核型也显示出了异源三倍体的倾向。在小孢子母细胞减数分裂过程中,染色体的异常行为多表现为:中期出现单个染色体游离在纺锤体外面、在后期出现的染色体桥和落后染色体、在末期出现的单个染色体游离在细胞核外形成微核的现象。这些异常现象引起小孢子的败育,也支持中国水仙为三倍体植物的观点。

关键词 中国水仙;核型;小孢子母细胞;减数分裂;染色体

中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)是石蒜科水仙属多年生草本花卉植物,以福建省漳州地区的漳州水仙最为有名。中国水仙高度不育,开花后虽然子房膨大,但不产生种子,只能以母球两侧分生的小鳞茎做种进行营养繁殖。对中国水仙只开花不结实现象,前人大多从染色体数目和核型分析的结果推断可能是由于三倍体导致它不育^[1-3],然而,也有人认为中国水仙是二倍体植物^[4]。有关中国水仙染色体倍性问题需要进一步研究。

最近,武剑等^[5]对中国水仙的有性生殖过程做了胚胎学研究,证明了其减数分裂前的小孢子母细胞发育未显示异常。四分体时期以后,大部分小孢子呈空瘪状态,少部分小孢子含有染色较深的细胞质。约27%的花粉可发育成类似正常的二胞花粉。这些花粉用于离体萌发实验时只有1.34%的可以萌发出花粉管,但在授粉的花柱头上未观察到花粉管。雌蕊的中轴胎座上着生了上60~90个胚珠,然而大多数胚囊发育失败,只有约4.5%的胚囊发育成具有7胞8核结构的蓼型胚囊^[5]。水仙胚胎学的研究结果阐明了其有性生殖败育的过程,但对于水仙的染色体倍性特征如何导致大部分花粉和胚囊败育的具体原因还不清楚。本文通过对中国水仙的染色体核型分析和小孢子减数分裂过程中染色体的行为探索其染色体倍性与小孢子败育之间的关系,进一步揭示中国水仙有性生殖失败的机制。

1 材料与方法

实验材料为漳州单瓣水仙品种。在染色体核型分析实验中,取生长状态良好、长约0.5 cm的白色

根尖用 α 溴萘饱和液在4℃条件下预处理18~24 h,再用0.075 mol/L KCl的 α 溴萘饱和溶液在4℃条件下低渗处理30 min后,用蒸馏水洗净在卡诺固定液中固定20~24 h,保存在70%乙醇中备用。固定后的根尖先用1 mol/L HCl在室温下解离10~15 min,再在60℃水浴中解离3.5~4.5 min。用蒸馏水充分洗净HCl后,切取1 mm根尖分生组织用卡宝品红液染色,压片镜检,选取染色体形态良好且分散的分裂中期细胞用Leica显微镜观察并拍照。

在花粉发育的细胞学观察实验中,主要取减数分裂前、后时期的花蕾,剥出花药,用卡诺固定液固定20~24 h后用同样方法压片,用Leica显微镜的显微干涉镜头观察。

2 结果

2.1 中国水仙的核型研究

在30个染色体分散良好的根尖细胞中,有28个细胞的染色体数目为30条,占计数细胞的94%,因此可以确定中国水仙的体细胞染色体数目为 $2n=30$ (图1)。将这些染色体根据染色体大小、形态和着丝粒所在位置进行分类,这些染色体表现出 $2n=3X=30$ 倾向,染色体基数 $X=10$,呈三倍体趋势(图2)。其核型公式为: $2n=3x=15sm+15st$,展示出较高的不对称性。其中第一组,第二组,第四组,第六组,第七组5对为亚端部着丝点(st);第三组,第五组,第八组,

收稿日期:2006-05-22 接受日期:2006-10-24

福建省自然科学基金(No. F0210009)和国家自然科学基金(No. 30670126)资助项目

*通讯作者。Tel: 0592-2186486, E-mail: hqtian@xmu.edu.cn

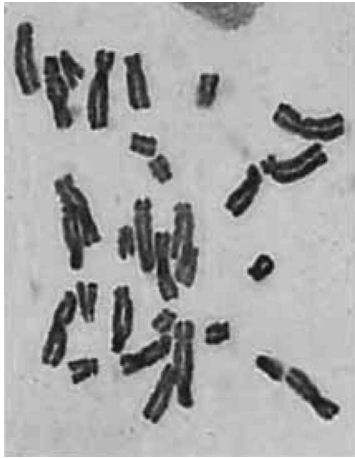


图1 根尖细胞中的染色体(2 000×)

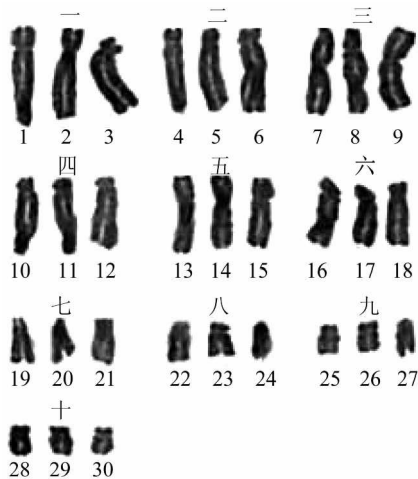


图2 中国水仙的核型(2 000×)

第九组和第十组5对为亚中部着丝点(sm)。

仔细分析中国水仙的核型可以看出有几组染色体的3个成员之中,其中2个形态较一致而与另一个有较大差异:在第一组的3条染色体中,1号和2号染色体的形态很相似而3号染色体的形态比较特殊。在第二组的3条染色体中,第4和5号染色体的形态很相似,但第6号染色体的形态较特殊。同样在第六组的第18号染色体,第七组的第21号染色体,第八组的第24号染色体和第九组的第27号染色体也都明显区别于同组别的其他两条染色体,表现出两条染色体同源而不是三条染色体完全同源的趋势(图2)。

2.2 减数分裂过程中的染色体行为观察

在小孢子母细胞减数分裂前期,核仁解体,染色质凝集成细长染色丝,相互缠绕而不易区分(图3)。随后染色质进一步凝聚、螺旋化、缩短变粗(图4)。

到减数分裂I的中期,小孢子母细胞染色体的联会出现紊乱,有些细胞中染色体全部排列在赤道板上

(图5),有些细胞中多数染色体排列在赤道板上,而少数染色体游离于赤道板外(图6,图7)。有些细胞不形成中期赤道板,染色体往往无秩序地分散在细胞内(图8)。

在减数分裂I的后期,很多小孢子母细胞染色体的分离也呈现明显不规则,多数细胞中染色体随机地向两极移动,分向两极染色体很不均衡,同时观察到在染色体组外常有游离的落后染色体滞留在赤道板附近,有的随机散落在细胞中(图9,图10,图11)。染色体向两极分离过程中,常形成一个或多个染色体桥(图9,图11)。

在减数分裂I末期,正常小孢子母细胞染色体移到两极,重组成两个细胞核(图12)。在异常小孢子母细胞中,分裂中期的染色体桥在染色体向两极移动时可能断裂(图13,图14),染色体断片及游离在细胞内的落后染色体形成微核(图15),在不同的细胞中微核的大小和数目不等。

水仙的小孢子四分体是同时型,减数分裂I形成两个细胞核以后并不伴随着细胞的分裂形成二分体,其细胞核继续分裂(图16)。在减数分裂I过程中,许多细胞中依然表现出了染色体的不规则现象,常常形成一个或多个染色体桥(图17),个别染色体则无序地分散在细胞内,形成四个小孢子细胞核后常常可以看到各自细胞核伴随着不等数量的微核现象(图18)。有时在一个药室中,绝大多数的小孢子母细胞已进行到减数分裂I的过程中,但也出现有个别细胞仍停留在减数分裂I前期(图19),这些细胞中虽然看不出染色体的异常,但它的发育时间上与大多数细胞的不同步将也会影响到它们的继续发育。在整个花药中只有少数小孢子母细胞能进行正常的减数分裂过程,形成的四分体小孢子中没有微核(图20),这类小孢子在以后的发育过程中可形成正常的花粉粒。

2.3 花粉的发育

刚从四分体释放出来的小孢子在大小和外部形态方面比较一致,细胞壁较薄,细胞质浓厚,细胞核位于中央,液泡不明显(图21)。随着花药的发育,大多数的小孢子发生了异常,只有少数小孢子显示出了正常的发育(图22)。这些可正常发育的小孢子中逐渐形成许多小液泡,细胞体积增大(图23)。到小孢子晚期时,细胞质中形成的大液泡将细胞质和核推向细胞边缘(图24),接着进行一次不等有丝分裂,产生一个体积较大的营养细胞和一个体积较小的生殖细胞,生殖细胞呈透镜状,贴于壁内侧(图25)。以后生殖细胞脱离花粉壁完全进入到营养细胞中(图26)。

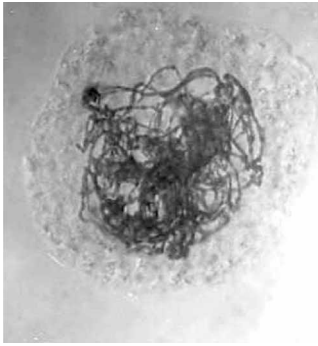


图3 处于细线期的小孢子母细胞(1 300×)



图7 异常小孢子母细胞减数分裂I中期,部分染色体位于赤道板以外(1 300×)



图4 处于粗线期的小孢子母细胞(1 300×)



图8 异常小孢子母细胞减数分裂I中期,染色体无规则分布在细胞中(1 300×)



图5 小孢子母细胞的减数分裂I中期,染色体排列于赤道板上(1 300×)

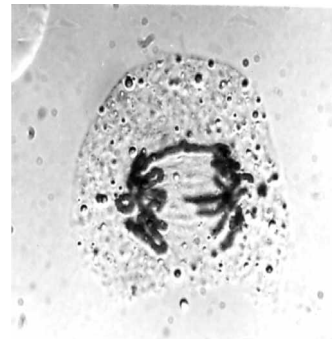


图9 小孢子母细胞减数分裂I后期,染色体移向两极(1 300×)

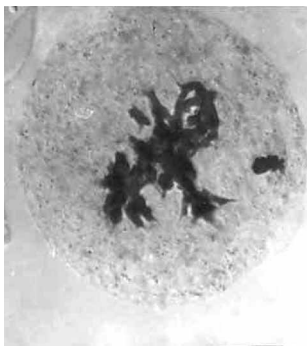


图6 异常小孢子母细胞减数分裂I中期,部分染色体位于赤道板以外(1 300×)



图10 异常小孢子母细胞减数分裂I后期,一些染色体滞留在赤道板上形成落后染色体(1 300×)

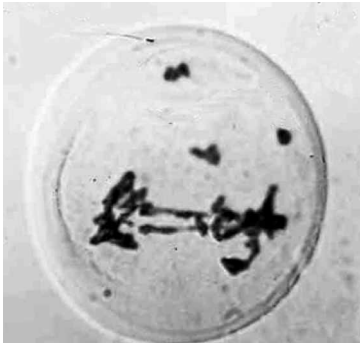


图 11 异常小孢子母细胞减数分裂 I 后期染色体向两极移动，同时有染色体桥的形成，而没有配对的染色体散落在细胞中(1 300×)

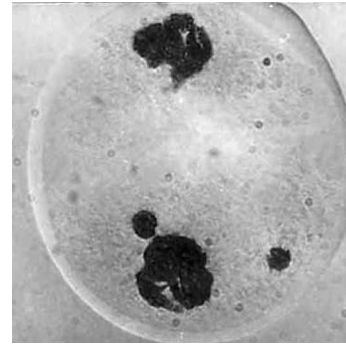


图 15 异常小孢子母细胞减数分裂 I 末期，移至两极的染色体进一步凝集，落后染色体或染色体片段形成微核(1 300×)

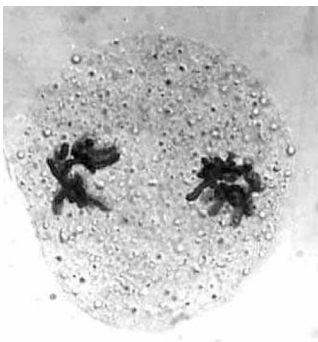


图 12 小孢子母细胞减数分裂 I 末期(1 300×)



图 16 异常小孢子母细胞减数分裂 II，有染色体桥和落后染色体的形成(1 300×)



图 13 异常小孢子母细胞减数分裂 I 末期，部分染色体形成落后染色体(1 300×)

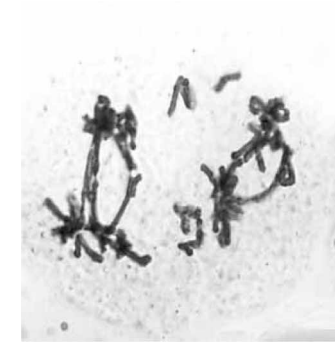


图 17 异常小孢子母细胞减数分裂 II，有染色体桥和落后染色体的形成(1 300×)

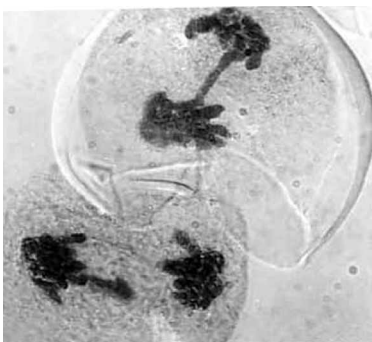


图 14 异常小孢子母细胞减数分裂 I 末期，有落后染色体和染色体桥的形成(1 300×)

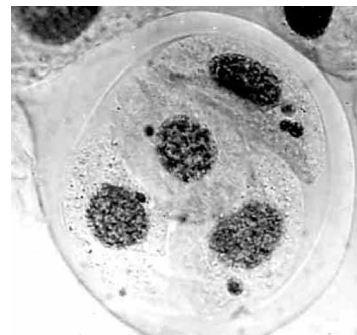


图 18 异常小孢子母细胞减数分裂 II 末期，四分体细胞中有不同数目的微核(1 300×)

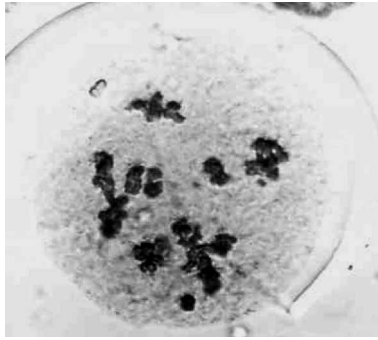


图19 异常小孢子母细胞减数分裂中期染色体无规则分布 (1 300×)



图23 发育正常的早期小孢子(1 500×)



图20 形态正常的四分体(1 300×)

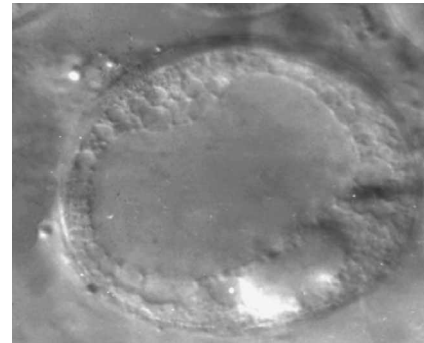


图24 发育正常的晚期小孢子(1 500×)



图21 花药中早期小孢子都显示正常形态(1 000×)

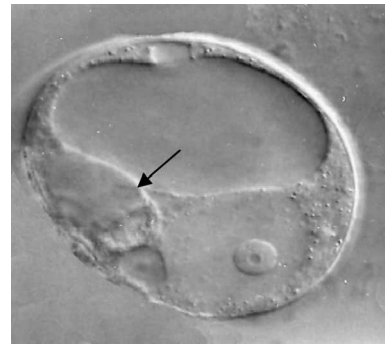


图25 早期二胞花粉, 由1个大的营养细胞和1个小的生殖细胞(黑色箭头所示)组成(1 500×)



图22 花药中的可育花粉和败育花粉(1 000×)



图26 晚期二胞花粉(箭头示生殖细胞)(1 500×)

大部分异常小孢子则呈现出细胞质收缩，胞质逐渐稀薄，不形成大液泡，到小孢子晚期时表现出空瘪状态和不规则形状(图 22)。

3 讨论

水仙属植物染色体数目和倍性变化复杂，染色体基数有 $X=7$ 、10和11三类，除二倍体外，还存在三倍体、四倍体和六倍体，染色体数目从14~56不等^[6-9]。中国水仙高度不育，只开花不结实，靠子鳞茎繁殖后代。对于中国水仙只开花不结实现象，前人大多从染色体数目和核型分析的结果推断可能是由于三倍体导致它不育^[1-3]。然而，曾沧江等^[4]认为中国水仙是二倍体植物，对前面的推论提出疑问。在我们的研究中，根据染色体的大小和着丝粒所在位置，将其分为10小组染色体，其中第3小组和第5小组的染色体着丝粒在近中部位置，但这两组染色体的大小又差异明显，将这6条染色体分为两个小组比三个小组更合理些。因此，我们的结果支持中国水仙是三倍体的提法。

对日本、朝鲜和我国台湾所产的65个系统的中国水仙进行了核型和减数分裂的观察，认为这些系统乃同一起源的同源三倍体种^[2]。李懋学等^[2]在研究了大陆3个中国水仙的核型和C带后，也认为中国水仙是同源三倍体。然而，庄伟建等^[3]对平潭水仙和漳州水仙的C带分析中发现，每组染色体3个成员中均以其中两个形态和C带带纹较为一致，而与另一个差异较大，认为中国水仙是节段异源三倍体。在我们的观察中，也有多组三个染色体中的两个体积形态非常相象，而另一个则表现出了很大的差异，尤其是一、四、六、七和九组中的这种现象很明显，用异源三倍体解释这些现象更合适。

作为三倍体植物，其性细胞在减数分裂过程中由于染色体的配对和分离会出现很大的异常。王莲英等^[10]在中国水仙花粉母细胞减数分裂过程中观察到

染色体明显不规则分离现象以及含有微核的小孢子。在中国水仙的胚胎学观察中也证实有约3/4的花粉败育现象，但由于切片方法是对二维图像进行观察，对减数分裂过程中的染色体异常现象无法正确判断^[5]。在本实验中用压片的方法，花粉母细胞中的染色体异常行为可清楚地展现：在减数分裂I的前期有些染色体不配对；在中期出现的单个染色体游离在纺锤体外面；在后期染色体移向两极时出现的染色体桥和落后染色体现象；在末期出现单个染色体游离在细胞核外的微核现象。这些染色体的异常行为在减数分裂II的过程中也常有出现。最终，减数分裂完成后形成了许多含有微核的小孢子。减数分裂过程中染色体的异常行为对花粉发育的影响主要发生在小孢子发育过程中(只有约27%的小孢子显示出继续发育的迹象)，但对许多花粉的后期也有严重的影响，形成了许多异常二胞花粉，最后只有1.34%的花粉萌发出花粉管^[5]。因此，中国水仙的大部分小孢子败育实际上是其遗传物质不平衡导致的。然而，在细胞核中遗传物质的不平衡甚至染色体成倍增加都不影响细胞的生活，但在细胞核外形成的单个染色体微核则导致细胞死亡，这是一个有趣的问题。中国水仙减数分裂过程中高频率的染色体异常行为也支持其为异源三倍体植物的观点。

参考文献(References)

- [1] 栗田正秀. 育种杂志, 1955, 5: 23
- [2] 李懋学等. 园艺学报, 1980, 7: 29
- [3] 庄伟建等. 福建农业学报, 1999, 14: 51
- [4] 曾沧江等. 植物研究, 1984, 4: 159
- [5] 武剑等. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44: 112
- [6] Darlington CD. Chromosomes Atlas of Flowering Plants, London: George Allen & Unwin Ltd., 1956
- [7] Brandham PE. Genetica, 1986, 68: 161
- [8] Brandham PE et al. Kew Bull, 1987, 42: 65
- [9] 吕柳新等. 福建农学院学报, 1989, 18: 31
- [10] 王莲英等. 北京林学院学报, 1984, (2): 78

Karyotype Analysis and Cytological Study during Microsporogenesis of *Narcissus tazetta var chinensis*

Rui Wang, Lin-Jiao Cheng, Yu-Hui Zhao, Jian Wu, Hui-Qiao Tian*

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Chinese narcissus (*Narcissus tazetta var. chinese* Roem.) only blooms without seeds and it propagates using its bulbs. There were some different reports for its karyotype. Our result of karyotype analysis supports the viewpoint that Chinese narcissus belongs to triploid plant, and the karyotype leans to a heterogeneous triploid. During the meiosis of microspore mother cells (MMC), the most cells display abnormal chromosomes: some chromosomes moved out of the spindle of the cell at metaphase; some chromosome bridges and lagging ones were formed at anaphase; and many microspores displayed the micronucleus at the telophase. The abnormality of chromosomes during MMC meiosis may induce microspore abortion during its development.

Key words Chinese narcissus; karyotype; microspore mother cell; meiosis; chromosome

Received: May 22, 2006 Accepted: October 24, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.F0210009) and the National Natural Science Foundation of China (No.30670126)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2186486, E-mail: hqtian@xmu.edu.cn