

响叶杨小孢子母细胞减数分裂及染色体行为的研究

鲁敏^{1,2}, 王君^{1,2}, 王旭军³, 吴际友³, 康向阳^{1,2*}

(1. 林木育种国家工程实验室, 北京林业大学, 北京 100083; 2. 林木、花卉遗传育种教育部重点开放实验室, 北京林业大学, 北京 100083; 3. 湖南省林业科学院, 长沙 410004)

摘要: 采用醋酸洋红压片法对响叶杨(*Populus adenopoda*)小孢子母细胞减数分裂进程中的染色体行为进行了研究。结果表明:响叶杨小孢子发生发育过程与其雄花芽/花序的外部特征和花药颜色有着密切关系;在其减数分裂进程中染色体行为正常,表明响叶杨同源染色体间表现出了较高的同源性,在中期Ⅱ平行纺锤体的出现与天然花粉中大花粉的存在可能有一定的联系;同时,减数分裂过程中核仁数目存在着动态变化,这种现象可能与杨属植物古多倍性起源有关。同一花芽的不同部位,减数分裂进程较不同步,这种不同步性是响叶杨适应环境的一种进化表现。

关键词: 响叶杨; 小孢子母细胞; 减数分裂; 染色体行为; 多核仁; 大花粉

中图分类号: Q343.2⁺4; Q943

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0171-07

Meiosis and Chromosome Behavior of Microsporocytes in *Populus adenopoda* Maxim

LU Min^{1,2}, WANG Jun^{1,2}, WANG Xu-Jun³, WU Ji-You³, KANG Xiang-Yang^{1,2*}

(1. National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Hunan Forestry Academy, Changsha 410004, China)

Abstract: The meiosis and chromosome behavior of microsporocytes in *Populus adenopoda* were studied by aceto-carmin squash technique. The meiosis of the pollen mother cells of *P. adenopoda* showed a high correlation to external characters of male flower buds/inflorescences and anther color. The normal behavior of chromosome indicated a high degree of homology among the homologous chromosomes of *P. adenopoda*. However, the appearance of paralleled spindles at metaphase II may result in big pollen grains. The varied number of nucleoli during meiosis of microsporocytes was probably due to ancient polyploid origin of *Populus*. The differences in the processes of meiosis in *P. adenopoda* occurred not only in different buds, but also in different parts of the flower bud. This meiosis asynchronicity was an important character of evolution for environmental adaptation during sexual reproduction of the genus.

Key words: *Populus adenopoda* Maxim; Microsporocyte; Meiosis; Chromosome behavior; Multi-nucleoli; Big pollen

细胞遗传学主要是通过对染色体数目、形态、功能和行为等方面的研究,来揭示物种起源进化、遗传变异等方面的信息,它是近代作物育种成功的基础^[1]。目前,有关杨树细胞遗传学的研究主要集中在染色体计数、染色体形态及生殖分裂过程中染

色体行为等方面。但由于杨树生长周期长,树体高大,采集材料较困难;配子体发育时间较长,减数分裂时期较难捕捉;加之制片技术等方面的原因^[2],导致其细胞遗传学研究水平还比较低。

响叶杨(*Populus adenopoda* Maxim)为杨柳

收稿日期: 2010-10-22, 修回日期: 2010-12-12。

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(20100400900-3); 中央高校基金科研业务费专项基金资助。

作者简介: 鲁敏(1985-),女,硕士研究生,主要从事林木倍性育种与细胞遗传学研究(E-mail: lmbifu@163.com)。

* 通讯作者: 康向阳,教授,博士生导师,主要从事林木倍性育种与细胞遗传学研究(Author for correspondence. E-mail: kangxy@bjfu.edu.cn)。

科 (Salicaceae) 杨属 (*Populus* L.) 高大乔木,是我国特有乡土树种,具有适应性强、速生、材质优等特性^[3],有关响叶杨细胞遗传学研究,仅侯延侠在报道响叶杨大、小孢子母细胞减数分裂对应关系时,对其小孢子母细胞减数分裂进程作了简单描述^[4]。为进一步丰富响叶杨细胞遗传学方面的内容,为其杂交及多倍体育种提供必要的细胞遗传学信息,作者对响叶杨小孢子母细胞减数分裂进程及染色体行为进行了观察分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料为湖南张家界的响叶杨 (*Populus adenopoda* Maxim) 雄花枝。于 2010 年 1 月下旬采集花芽饱满、无病虫害的健壮雄花枝,用塑料薄膜包裹严密,托运回北京林业大学,避风低温贮藏。

1.2 试验方法

将响叶杨雄花枝在北京林业大学温室 (10 ~ 20℃) 内进行切枝水培,每隔 2 ~ 3 h 采集 3 ~ 5 个雄花芽,在卡诺固定液 (无水乙醇 : 冰乙酸 = 3 : 1) 中固定 2 ~ 24 h, 4℃ 冰箱中保存,同时记录下固定花芽 (花序) 的外部形态特征和花药颜色。

小孢子母细胞减数分裂进程临时观察采用醋酸洋红染色压片法,所有观察花药均取其基部进行观察,以占优势比例的发育时期作为该阶段标志性时期。永久制片参考康向阳的方法^[2]: 取在卡诺固定液中固定的花芽,置于洁净载玻片上,除去花盘,滴加几滴固定液,用镊子夹碎花药作涂片,火焰干燥,用 1 : 10 Giemsa 染液 (pH = 6. 8, 磷酸缓冲液稀释) 染色约 1 h, 蒸馏水冲洗。晾干后镜检、照相。花粉观察采用醋酸洋红染色,镜检、照相。

对小孢子母细胞减数分裂过程中的异常现象记录并统计。同时,为了研究小孢子母细胞减数分裂

的不同步性,从每次固定的花芽中随机取 3 个,分别取其花芽基部、中部和顶部的花药进行压片观察,每个部位至少观察 500 个小孢子母细胞,统计各个时期所占的比例。

雄花芽 (花序) 及花药形态采用 Olympus SZX12 型体式显微镜观察, Olympus C5060 Wide Zoom 型数码相机照相。所有小孢子母细胞减数分裂制片均在 Olympus BX-51 光学显微镜下进行观察,并采用 Olympus DP70 照相系统数码照相。运用 Adobe Photoshop CS4 对图片的亮度和对比度进行优化。

2 结果与分析

2.1 响叶杨小孢子母细胞发育进程与雄花芽外部特征的关系

在温室 (10 ~ 20℃) 水培养条件下,本批次响叶杨材料完成小孢子发生、发育过程大约需要 158 h, 其小孢子母细胞发育进程与其雄花芽外部形态及花药颜色变化存在着一定的对应关系 (表 1)。水培后 42 h, 小孢子母细胞开始进入减数分裂,此时花芽开始膨大,花药呈嫩绿色 (图版 I : A, B); 随着减数分裂过程的继续进行,花序露出芽鳞,并逐渐伸长,同时花药颜色也由黄绿色变为微红色 (图版 I : C ~ H), 减数分裂完成并形成小孢子; 随后,露出芽鳞的花序继续生长,小孢子发育,花药颜色变为深红色 (图版 I : I ~ L), 小孢子完成由单核向双核的发育。

2.2 减数分裂染色体行为及核仁的动态变化

在响叶杨小孢子母细胞减数分裂进程中,其染色体行为正常。当减数分裂进入细线期,染色体呈丝状,排列杂乱无序 (图版 II : A); 至粗线期,同源染色体联会,形成的二价体开始收缩变粗,并相互缠绕 (图版 II : B); 进入双线期后,二价体进一步收缩变粗 (图版 II : C)。到终变期,二价体超螺旋化程度加

表 1 响叶杨小孢子发生、发育进程及其花芽 (花序) 形态、花药颜色对应关系

Table 1 Relationship of microsporogenesis and male gametophyte with morphology of male flower bud (catkin) and anther color in *Populus adenopoda*

水培时间 (h) Culture time	花序 (芽) 变化 Flower bud (catkin) changes	减数分裂阶段 Meiosis progress	花药颜色 Anther color
42	花芽膨大,花序未露 (图版 I : A)	细线期 ~ 终变期 (图版 II : A ~ E)	嫩绿色 (图版 I : B)
54	花序微露 (图版 I : C)	中期 I ~ 末期 I (图版 II : F ~ K)	黄绿色 (图版 I : D)
67	花序 1/5 露出芽鳞 (图版 I : E)	后期 I ~ 末期 II (图版 II : G ~ L, 图版 III : A ~ G)	微红色 (图版 I : F)
73	花序 1/4 露出芽鳞 (图版 I : G)	末期 II ~ 四分体 (图版 III : G ~ J)	微红色 (图版 I : H)
96	花序 1/3 露出芽鳞 (图版 I : I)	单核期 (图版 III : K)	深红色 (图版 I : G)
158	花序 1/2 露出芽鳞 (图版 I : K)	单核期 ~ 双核期 (图版 III : K ~ L)	深红色 (图版 I : L)

强,并分散于核膜内缘,形态清晰,易于计数,此时核仁变小并逐渐消失(图版Ⅱ:D,E);随后,联会的成对的染色体继续变短加粗、相互排斥,在中期Ⅰ赤道板上呈“一”字型排列(图版Ⅱ:F);后期Ⅰ(图版Ⅱ:G),联会的同源染色体由于纺锤丝的牵引而彼此分开,分别移向细胞两极(图版Ⅱ:G);当相互分离的同源染色体被平均分配到两极后,减数分裂进入末期Ⅰ,实现了染色体数目的减半;同时分向两极的染色体开始解螺旋,核仁重新形成,在一极的子细胞内最多可以见到8个小核仁,小核仁间逐渐相互融合形成较大的核仁(图版Ⅱ:H~K),此时的染色体已经不能被染色观察到。

当细胞每一极的核仁融合成一个大的核仁时,减数分裂进入前期Ⅱ(图版Ⅱ:L);中期Ⅱ的染色体由于纺锤丝的牵引,染色体呈一定角度定向于赤道板,核仁消失(图版Ⅲ:A~C);后期Ⅱ,姊妹染色单体开始发生分离,分别移向两极,并被平均分配到细胞的4个角(图版Ⅲ:D);末期Ⅱ,姊妹染色单体开始解螺旋,核仁重新出现,而且与末期Ⅰ相似,同样可观察到1个子核内的8个小核仁以及它们的融合过程(图版Ⅲ:E,G)。

2.3 减数分裂中期Ⅱ纺锤体排列与四分体形态的多样性

从中期Ⅱ两个纺锤体在赤道面排列的取向上看,响叶杨中期Ⅱ两个纺锤体的相对位置表现出“八”字型(图版Ⅲ:A)、平行型(图版Ⅲ:B)和垂直型(图版Ⅲ:C)3种,对同一花芽的同一部位花药进行压片观察,发现有2种或2种以上的染色体排列类型同时存在,但主要以“八”字型为主,其所占比例为82.67%,平行型和垂直型所占的比例分别为13.18%和4.15%。末期Ⅱ结束后产生多种类型的四分体,主要包括左右对称型(图版Ⅲ:H)、四面体型(图版Ⅲ:I)和交叉型(图版Ⅲ:J),其中以左右对称型和四面体型四分体为主。此外,对收集的响叶杨花粉进行观察,发现有一定比率形态较大的花粉(图版Ⅲ:N),推测可能为未减数花粉。

2.4 小孢子母细胞减数分裂的不同步性

响叶杨小孢子母细胞减数分裂进程存在着较为明显的不同步现象,在一张制片中往往也能观察到4~7个不同的分裂相(图版Ⅲ:M)。将响叶杨的雄花芽分为基部、中部和顶端3个部位,并对各部位的减数分裂进程进行了统计,结果表明,同一花芽不

同部位的小孢子母细胞减数分裂进程存在差异(表2),其中,花芽中部发育最快,而花芽的顶端发育最慢。

表2 响叶杨雄花芽小孢子母细胞减数分裂进程的不同步性
Table 2 The meiosis asynchronicity of *P. adenopoda*

水培时间(h) Culture time	减数分裂时期 Meiotic stages	花芽不同部位小孢子母细胞发育各时期所占的百分率(%) Percentage of each stage in different parts of flower buds		
		顶端 Tip	中部 Middle	基部 Base
66	细线期	54.51	0	32.72
	粗线期~终变期	42.07	5.59	57.61
	中期Ⅰ~末期Ⅰ	3.42	69.86	7.26
	前期Ⅱ~末期Ⅱ	0	14.12	2.41
	四分体	0	10.4	0
75	细线期	26.62	0	0
	粗线期~终变期	61.8	0	5.52
	中期Ⅰ~末期Ⅰ	9.55	7.23	70.11
	前期Ⅱ~末期Ⅱ	2.03	87.16	24.37
	四分体	0	5.61	0

3 讨论

本研究发现,在温室(10~20℃)水培养条件下,响叶杨完成小孢子发生发育过程大约需要158 h。伴随小孢子母细胞减数分裂的进行,相对应的雄花芽外部形态也有一定变化,其中以花药的颜色变化较为明显,由嫩绿色变为深红色,可作为即时判别响叶杨小孢子母细胞减数分裂进程的形态学依据。

从对响叶杨小孢子母细胞减数分裂的观察结果看,其减数分裂的终变期、中期Ⅰ没有单价体的出现,联会的二价体结合紧密;在后期Ⅰ、末期Ⅰ、后期Ⅱ及末期Ⅱ亦未见到落后染色体,而且产生的花粉均表现出了较好的育性,表明响叶杨的19对同源染色体之间表现出了较高的同源性。

响叶杨小孢子母细胞减数分裂过程中表现出核仁大小和数目的动态变化,而且在末期Ⅰ和末期Ⅱ的子核内,最多存在8个小核仁。在中东杨^[5]、毛白杨^[2,6]和通辽杨^[7]的小孢子母细胞减数分裂过程中也均发现了多核仁现象。因此这种多核仁现象可能是杨属植物的普遍特征。由于核仁的数目与倍性有一定的相关,多核仁现象是多倍性的一种标志,因此这种多核仁现象可能与杨属植物的古多倍性起源有关^[2,8]。此外,由于“最多的核仁的数目即与核仁组织区(NOR)的数目相符”^[9],实验中观察到,响叶杨在末期Ⅰ两极和末期Ⅱ四极的极细胞中核仁数目最多的为8个,与毛白杨^[2,6]和通辽杨^[7]相同,推断

杨树染色体组中至少应该有8对具有核仁组织区的染色体。

目前,在灰杨(*P. canescens*)^[10]、香脂杨(*P. balsamifera*)^[11]、毛白杨(*P. tomentosa*)^[12]以及‘通辽杨’(*P. simonii* × *P. nigra* ‘Tongliao’)^[7]等杨树中都发现有天然未减数2n花粉的存在。其中毛白杨天然2n花粉发生的主要原因是由于减数第二次分裂过程平行纺锤体极点融合^[13]。本研究发现,在响叶杨中可能有天然未减数大花粉的产生,同时也观察到中期Ⅱ存在较高比例的平行纺锤体,这两者间可能存在一定的联系,相关问题还有待进一步研究。

研究表明,杨树小孢子母细胞减数分裂过程呈现出较强的不同步性^[2,7]。在本研究中发现,响叶杨小孢子细胞减数分裂过程中,同一花枝不同部位的花芽,同一花芽的不同小花,减数分裂过程均表现出明显的不同步性。响叶杨小孢子母细胞减数分裂的这种不同步性,可以扩展其花期,增加两性功能的有效利用时间,对其种群繁殖后代有利,这应该是响叶杨生殖过程中对环境适应的一种进化表现^[14,15]。

参考文献:

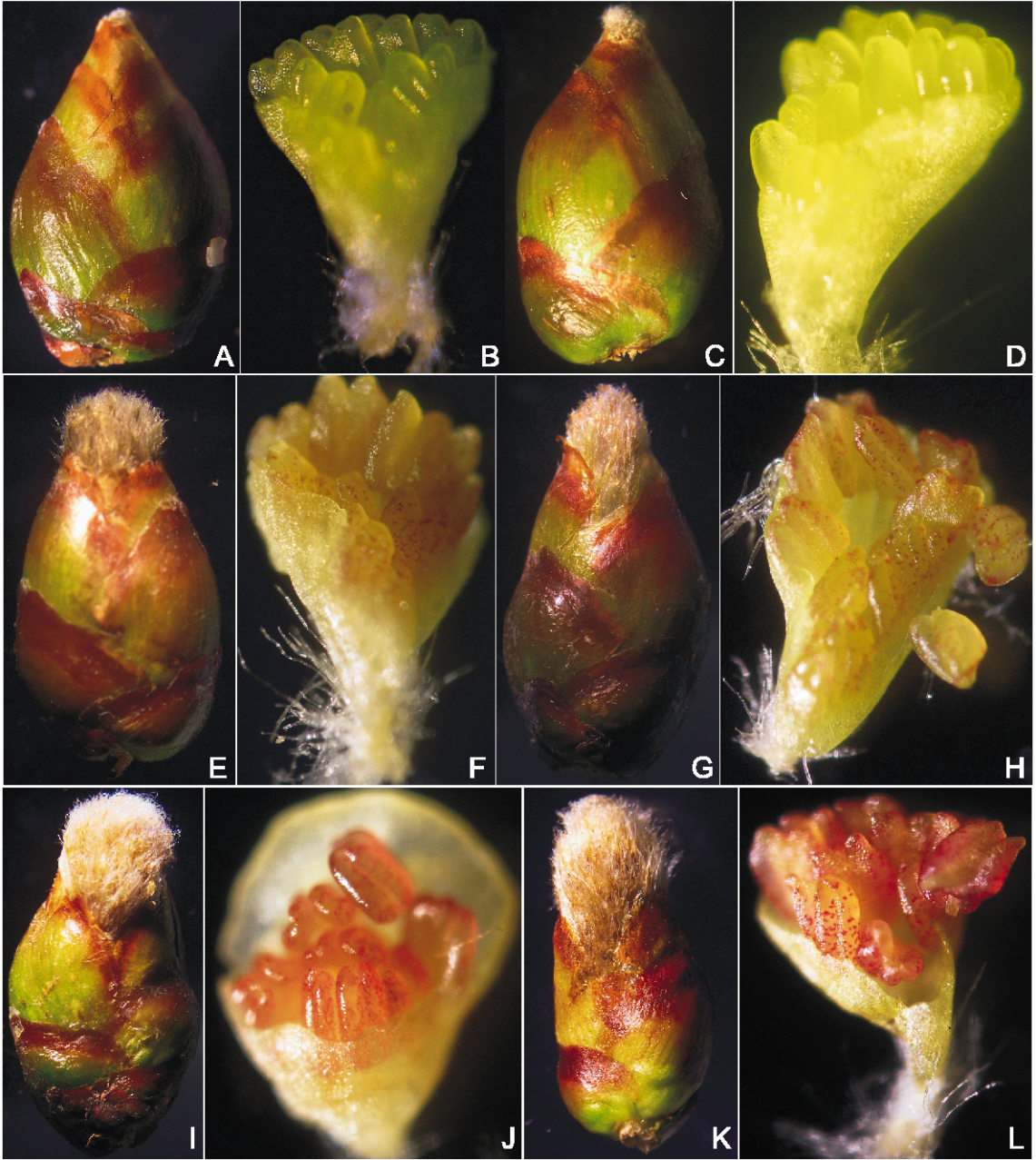
- [1] Moor D M. 植物细胞遗传学[M]. 莫慧英,译. 北京:科学出版社,1983.
- [2] 康向阳. 毛白杨细胞遗传与三倍体选育[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002: 11–13.
- [3] 王旭军,吴际友,程勇,等. 响叶杨良种繁育研究进展[J]. 湖南林业科技,2006,33(5): 72–74.
- [4] 侯延侠,康向阳. 响叶杨大、小孢子母细胞减数分裂进程及其对应关系[J]. 西北植物学报,2006,26

(1): 46–49.

- [5] 刘玉喜,张敦方,陆志华. 中东杨小孢子的发生[J]. 东北林学院学报,1979(2): 1–4.
- [6] 康向阳,朱之悌,张志毅. 毛白杨花粉母细胞减数分裂及其进程的研究[J]. 北京林业大学学报,2000,22(6): 5–7.
- [7] 王君,康向阳,李代丽,等. 通辽杨花粉母细胞减数分裂及其染色体行为研究[J]. 西北植物学报,2006,26(11): 2231–2238.
- [8] Van Dillewijn C. Cytology and breeding of *Populus* [J]. *Ned Boschb Tijdschr*,1939(12): 470–481.
- [9] 李懋学,张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996: 1–15.
- [10] Seitz F W. The occurrence of triploids after self-pollination of anomalous and rogynous flowers of a grey poplar[J]. *Z Forstgenet*,1954,3(1): 1–6.
- [11] Manzos A M. Fast-growing form of *Populus balsamifera* obtained by pollinating female flowers with fractionated pollen of the same species[J]. *Dokl Akad Nauk SSSR*,1960,130(2): 433–435.
- [12] 朱之悌,林惠斌,康向阳. 毛白杨异源三倍体 B301 等无性系选育的研究[J]. 林业科学,1995,31(6): 499–505.
- [13] Zhang Z, Kang X, Zhang P, et al. Incidence and molecular markers of 2n pollen in *Populus tomentosa* Carr[J]. *Euphytica*,2007,154: 145–152.
- [14] 董源. 毛白杨胚胎学观察——1. 花药的结构及花粉的发育[J]. 北京林学院学报,1982,4: 80–88.
- [15] Harder L D, Thomson J D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal pollinated plants[J]. *Amer Nat*,1989,133(3): 323–344.

鲁 敏等：图版 I

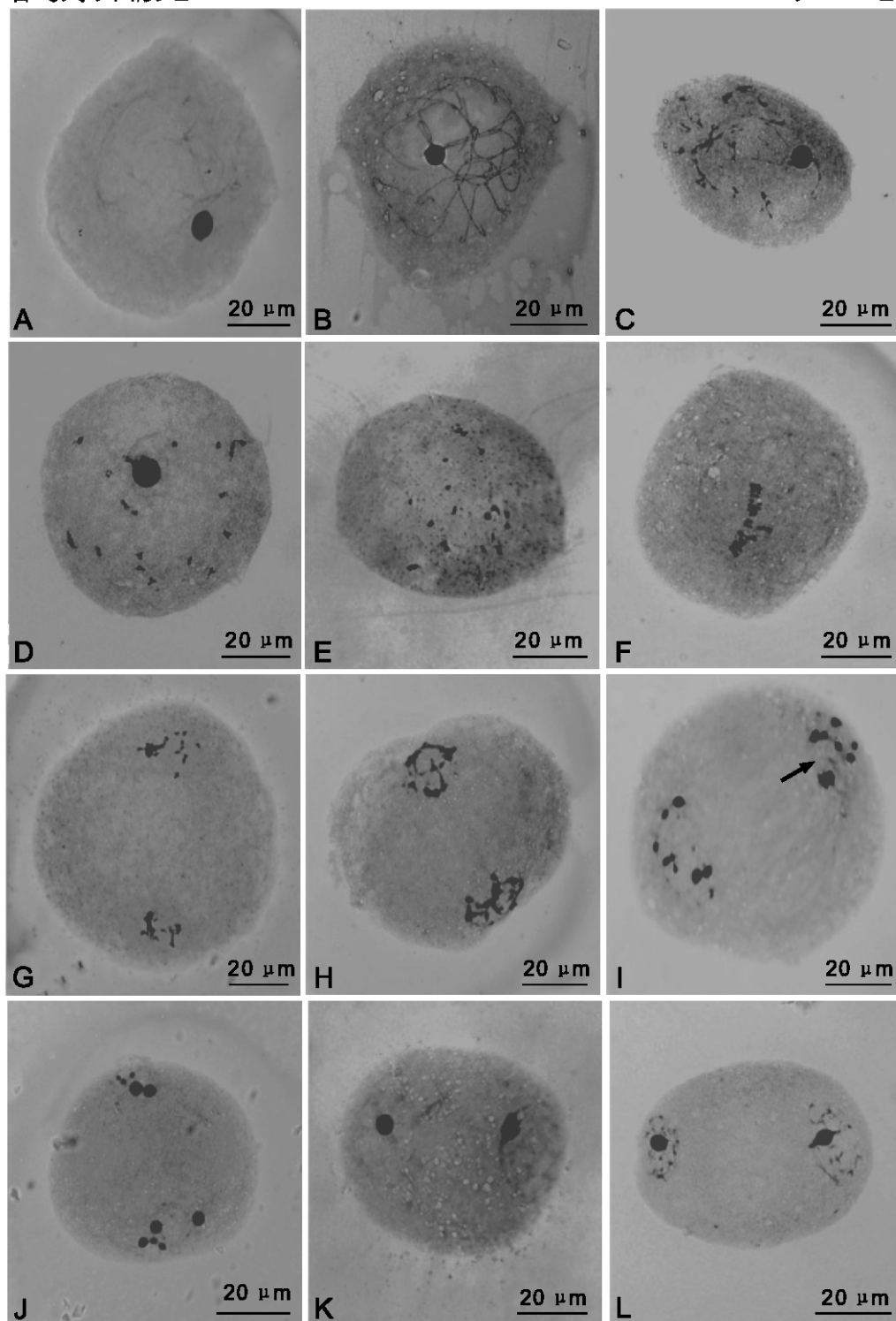
LU Min *et al.* : Plate I



A,B. 响叶杨无性系膨大的雄花芽及其花药；C,D. 花序微露的雄花芽及其花药；E,F. 1/5 花序露出芽鳞的雄花芽及其花药；G,H. 1/4 花序露出芽鳞的雄花芽及其花药；I,J. 1/3 花序露出芽鳞的雄花芽及其花药；K,L. 1/2 花序露出芽鳞的雄花芽及其花药。

A,B. Male flower bud enlarged obviously and anthers of the clone of *Populus adenopoda* Maxim; C,D. Male flower bud with a little catkin out and its anthers; E,F. Male flower bud with one-fifth of the catkin out and its anthers; G,H. Male flower bud with one-fourth of the catkin out and its anthers; I,J. Male flower bud with one-third of the catkin out and its anthers; K,L. Male flower bud with half of catkin out and its anthers.

鲁敏等: 图版 II

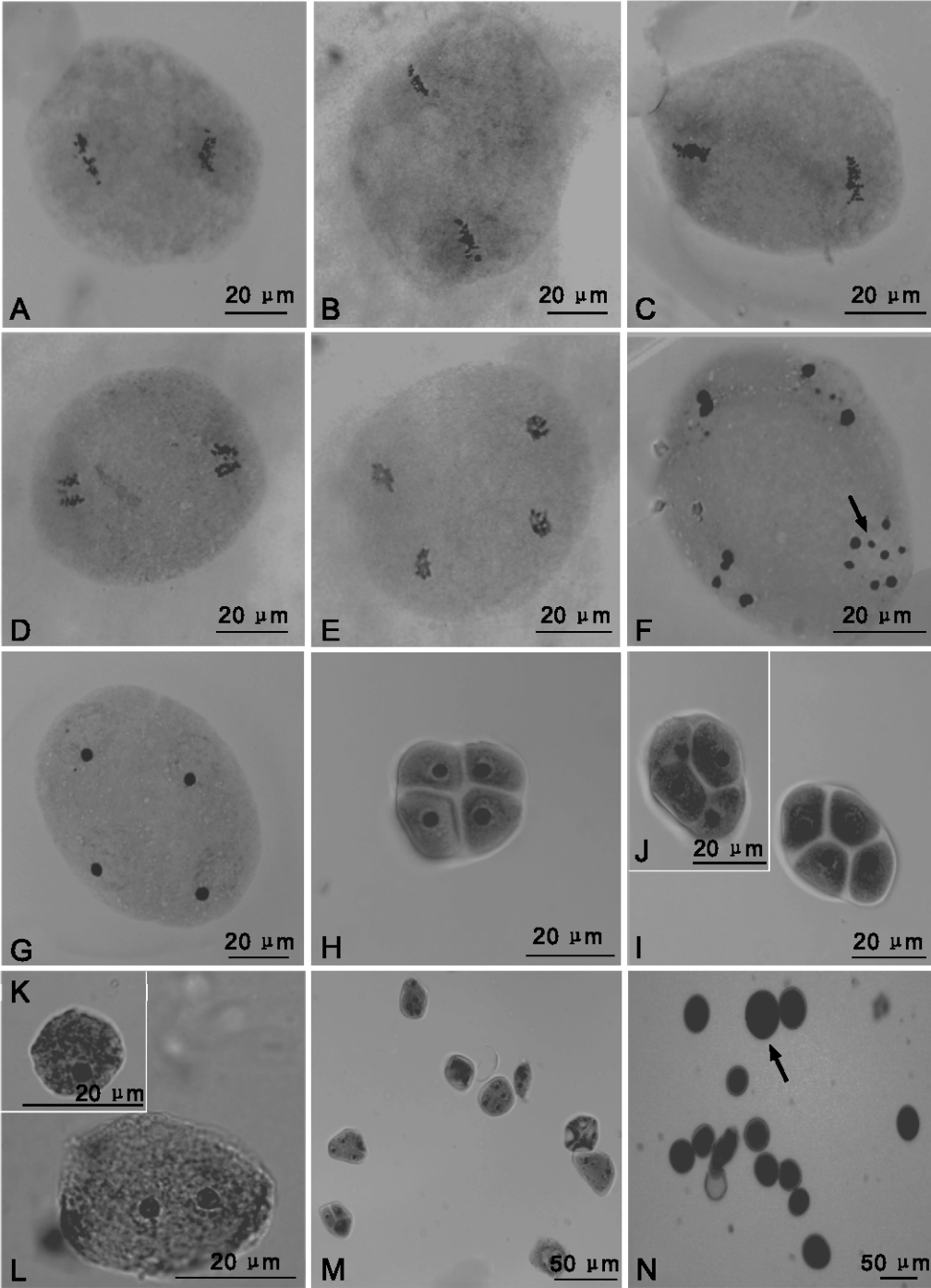
LU Min *et al.*: Plate II

A. 细线期; B. 粗线期; C. 双线期; D, E. 终变期; F. 中期 I; G. 后期 I; H~K. 末期 I, 显示核仁的发生及融合, 箭头指示在 1 个子核内的 8 个小核仁; L. 前期 II。

A. Leptotene; B. Pachytene; C. Diplotene; D, E. Diakinesis; F. Metaphase I; G. Anaphase I with the lagging chromosomes; H-K. Telophase I, showing occurrence and fusion of the nucleoli; the arrow shows eight nucleoli in one daughter nucleus; L. Prophase II.

鲁 敏等：图版 III

LU Min *et al.* : Plate III



A ~ C. 中期 II；A. “八”字型纺锤体，B. 平行纺锤体，C. 垂直纺锤体；D. 后期 II；E ~ G. 末期 II，显示核仁的发生及融合，箭头指示在 1 个子核内的 8 个小核仁；H ~ J. 四分体；H. 左右对称型四分体，I. 四面体型四分体，J. 交叉型四分体；K. 单核后期小孢子；L. 双核期小孢子；M. 减数分裂进程的不同步，同一张临时制片中包含 4 个不同的分裂相；N. 响叶杨天然大花粉（箭头指示）。
A ~ C. Metaphase II；A. Spindles with certain angle；B. Spindles with parallel orientation；C. Spindles with vertical orientation；D. Anaphase II；E ~ G. Telophase II，showing occurrence and fusion of the nucleoli；the arrow shows eight nucleoli in one daughter nucleus；H ~ J. Tetrad；H. Isobilateral tetrad；I. Tetrahedral tetrad；J. Decussate tetrad；K. Late uni-nucleate microspore；L. Bi-nucleate microspore；M. The asynchronism of meiotic process，showing four stages on one temporary preparation；N. The natural large pollen grain in *P. adenopoda* Maxim (arrow) .