

## 朝鲜蒲公英花粉败育的细胞学研究

张建<sup>1,2</sup>, 赵鑫<sup>1,2</sup>, 陈倩倩<sup>1,2</sup>, 宁伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 农业部东北野菜种质异位保存圃与鉴定中心, 辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:** 为从细胞水平探明朝鲜蒲公英花粉败育的原因, 通过卡宝品红染色和石蜡切片法观察花粉母细胞减数分裂行为及雄配子发育过程。结果表明: 花粉母细胞减数分裂过程中存在大量落后染色体、染色体桥、断片、染色体分离不同步以及不均等分裂等异常情况, 染色体行为异常导致四分体时期出现二分体、三分体、含微核的异常四分体以及多分体等现象; 朝鲜蒲公英成熟花粉为 3-细胞型, 存在多核的异常花粉粒。综合分析, 认为朝鲜蒲公英花粉母细胞减数分裂异常和雄配子的生殖核异常发育是导致花粉败育的主要原因。

**关 键 词:** 朝鲜蒲公英; 花粉母细胞; 四分体; 微核; 雄配子

中图分类号: S432.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)04-0359-04

## A cytological observation on those factors affecting pollen abortion of *Taraxacum coreanum*

ZHANG Jian<sup>1,2</sup>, ZHAO Xin<sup>1,2</sup>, CHEN Qian-qian<sup>1,2</sup>, NING Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110886, China; 2. Ex-situ Conservation Garden and Identification Center of Potherb Germplasm in Northeast China, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** Meiosis behaviors of pollen mother cells and development process of male gametes were observed by carbol fuchsin stainin and paraffin sectioning method for exploring the cytological mechanisms on pollen abortion of *Taraxacum coreanum* Nakai.. The results showed that there were much many abnormal cases in the process of meiosis, such as lagging chromosomes, chromosome bridges, fragments, unsynchronized segregation and uneven division. Many micronucleus, dyads, triads, tetrads and polyads come into being during tetrad phase induced by the abnormal behaviors of chromosomes. Mature pollen of *T. coreanum* mainly belongs to three-cell type and partially hybridizes with abnormal generative cells. In general, abnormal meiosis in the process of pollen mother cell and abnormal development of generative nucleus of male gametes were the main reasons for the pollen abortion of *T. coreanum*.

**Key words:** *Taraxacum coreanum* Nakai.; pollen mother cells; tetrad; micronucleus; male gametes

蒲公英(*Taraxacum coreanum* Nakai.)为菊科蒲公英属植物, 国家卫生部将其列为药食同源食品, 被广泛用作传统中药和饲料添加剂的原料<sup>[1]</sup>。花粉在植物有性生殖中具有重要意义。雄蕊从原基分化到有功能花粉形成之前, 都要在生理、生化、形态等方面经过一系列的变化, 其中任一过程受阻都不能正常发育, 产生败育花粉<sup>[2]</sup>。张建等<sup>[3]</sup>对斑叶蒲公英花粉母细胞进行观察, 发现不均等分裂是花粉活性低的主要原因。朝鲜蒲公英花粉败育率高达

80%以上, 且存在多重花粉管等异常现象<sup>[4]</sup>。笔者观察朝鲜蒲公英的花粉母细胞减数分裂及雄配子体发育过程, 从细胞水平探明花粉败育的原因, 旨在为进一步开发、利用朝鲜蒲公英种质资源提供参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材 料

2008 年 10 月, 于沈阳地区采集野生蒲公英标本, 保存于沈阳农业大学野菜课题组标本馆(SYAB)。

收稿日期: 2013-06-04

基金项目: 国家农业部野生植物资源保护项目(农计发[2010]29 号)

作者简介: 张建(1984—), 男, 河北武强人, 博士研究生, 主要从事植物繁殖生物学研究, zhangjian840000@163.com; \*通信作者, yecaiketizu@163.com

经中国科学院生态研究所李冀云研究员鉴定,所采集的标本为朝鲜蒲公英(*Taraxacum antungense* Nakai.)。试材栽培于沈阳农业大学百草园内,生长良好。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为的观察

2012年5月上旬,朝鲜蒲公英进入盛花期。取不同发育时期的花蕾(直径约0.1~0.8 cm),用卡诺固定液固定24 h后转入70%的乙醇,4℃保存,备用。采用卡宝品红染色法直接进行观察,压片。用Olympus BH<sub>2</sub>显微镜观察,照相。

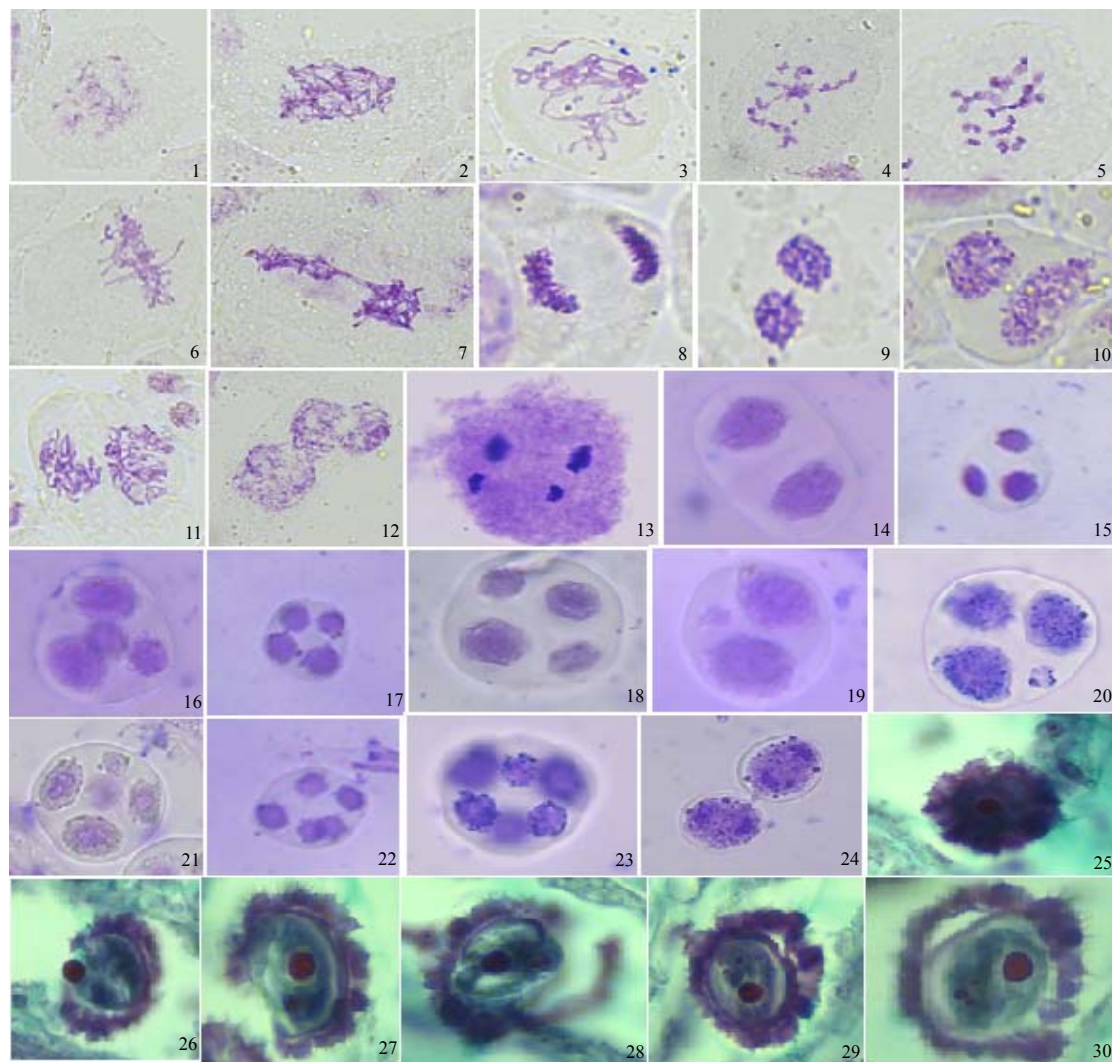
### 1.2.2 雄配子发育的石蜡切片观察

选取不同发育时期的花蕾,用50%FAA固定液进行固定、保存。用常规石蜡切片法制片。切片厚度8~10 μm。用番红固绿复染,中性树胶封片。用Olympus BH2显微镜观察,照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 小孢子的发生

减数分裂过程和雄配子发育过程中的朝鲜蒲公英花粉母细胞(×40)如图1所示(图片彩版见封二)。



1 细线期;2 偶线期;3 粗线期;4 双线期;5 终变期;6 中期I;7 后期I;8 末期I;9 前期;10 中期(垂直型纺锤体);11,12 后期;13 末期;14 二分体;15 三分体;16 四分体(正四面体型);17 四分体(左右对称型);18 四分体(十字交叉型);19 二分体+1个微核;20 三分体+1个微核;21 四分体+1个微核;22 五分体;23 六分体;24 刚释放出来的小孢子;25 单核中央期;26 单核靠边期;27 二核期;28,29 三核期;30 异常花粉。

图1 减数分裂过程和雄配子发育过程中的朝鲜蒲公英花粉母细胞(×40)

Fig.1 Meiosis of pollen mother cells and development process of male gamete of *T. coreanum* Nakai.(×40)

### 2.1.1 减数分裂 I

在前期的细线期,花粉母细胞核仁解体,染色质螺旋化,形成长细丝状染色体,此时着色能力很弱(图 1-1);在偶线期,同源染色体沿长轴平行配对,较细线期短而粗,分辨不出染色单体,且染色逐渐加深(图 1-2);在粗线期,染色体逐渐缩短变粗,染色能力增强,并且同源染色体配对完成(图 1-3);在双线期,染色体进一步浓缩(图 1-4);在终变期,染色体超螺旋化,显著收缩变短变粗,构型较为复杂,同源染色体间靠 1~2 个交叉维系着,具有相互分开的趋势(图 1-5)。

在中期可观察到染色体排列在赤道板上,但染色体配对较混乱,无明显成对现象,各同源染色体也没有分开(图 1-6),表明朝鲜蒲公英可能是异源多倍体。之后,在纺锤丝牵引下,同源染色体分开,向两极移动。由于有单价体、多价体存在,所以出现染色体桥(图 1-7)现象。此期染色体行为异常的花粉母细胞约占 40.6%。正常减数分裂行为是 2 组染色体到达两极(图 1-8),形成 2 个子核(图 1-9),此时 2 个子细胞之间没有明显的细胞板分隔,细胞质不发生分裂,没有细胞板形成,也没有形成 2 个子细胞,属于同时型胞质分裂。

### 2.1.2 减数分裂

在前期,核内染色体呈细丝状,逐渐变粗,进行染色体复制,2 组染色体的复制不同步(图 1-10),一边细胞达到前期,而另一边细胞达到中期,此期染色体行为异常的花粉母细胞占 38.7%。在后期,姊妹染色单体发生分离(图 1-11, 12),随后随机分配到子细胞的两极,在细胞内可看到大小不一致的 4 组染色体(图 1-13)。染色单体到达两极后即开始螺旋化,当新的核膜和核仁开始形成时即进入减数分裂末期。此时四分体类型比较复杂,有二分体(图 1-14)、三分体(图 1-15)、正四面体型四分体(1-16)、左右对称型四分体(1-17)、十字交叉型四分体(图 1-18)等。二分体、三分体、四分体、五分体以及六分体的频率分别为 10%、8%、64%、4%和

10%,其他异常多分体频率为 4%。各孢子间无细胞板形成。

除正常四分体外,还出现含 1 个微核的二分体(图 1-19)、三分体(图 1-20)和四分体(图 1-21),甚至还有 5 分体(图 1-22)、六分体(图 1-23)等多种异常类型,其中带微核的二分体、三分体以及四分体分别占二分体、三分体、四分体的 47%、32%和 38%。

### 2.2 雄配子的发育

随着胼胝质的逐渐解离,四分体互相分离,形成单核小孢子(图 1-24)。细胞壁较薄,核染色较深,位于中央(图 1-25)。细胞壁加厚,核仁变大,并向细胞边缘靠近,进入单核靠边期(图 1-26)。小孢子进行不均等的核分裂,形成大的营养核和小的生殖核,花粉体积也有明显增大(图 1-27)。生殖核远离营养核,同时营养核向花粉中央移动。当营养核处于中央位置,生殖核处于细胞边缘时,生殖核体积增大,进行有丝分裂,形成 2 个精细胞(图 1-28)。2 个精细胞开始分离(图 1-29)。在试验中也发现有 3 个精细胞的现象(图 1-30),1 个大,2 个小。异常多核花粉的发生频率约为 38%。

在显微镜下随机测定成熟花粉大小,并通过 SPSS 17.0 软件进行统计分析,结果(图 2)表明:朝鲜蒲公英花粉大小为 20.0~58.0  $\mu\text{m}$ (花粉粒数 165,标准差为 6.43,花粉平均直径 40.8  $\mu\text{m}$ ),主要分布在 40.0~44.0  $\mu\text{m}$ ,占统计总数的 50%左右。

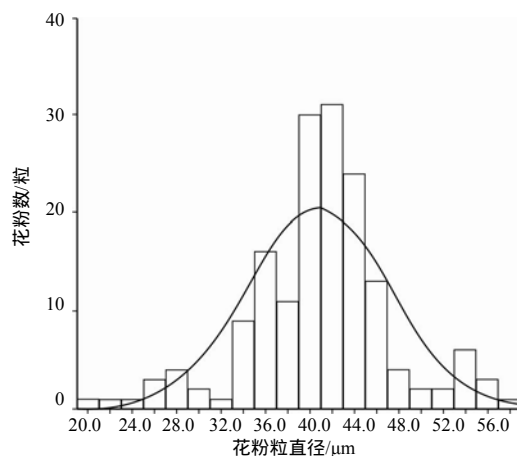


图 2 朝鲜蒲公英花粉粒大小分布

Fig.2 Distribution of the pollen diameter of *T. coreanum*

### 3 结论与讨论

花粉发育异常主要表现为小孢子母细胞减数分裂异常和雄配子体发育不正常,这主要是由外部环境或遗传上的原因引起<sup>[5]</sup>。本试验中,朝鲜蒲公英在花粉母细胞减数分裂过程中大量出现落后染色体、染色体桥、断片等异常现象,在四分体时期可观察到大量微核现象。微核是落后染色体产生的直接结果<sup>[6]</sup>。此外,还出现了较高频率的多分体,这主要是由染色体桥、断片、落后染色体致使染色体最终分配不均衡而杂乱分离产生的,说明减数分裂异常是朝鲜蒲公英花粉活性较低的直接原因之一。

雄配子的第一次分裂在花粉发育过程中起关键作用。正常发育的花粉经不对称分裂,产生2个大小不等的具有不同结构的细胞,即营养细胞和生殖细胞。小孢子细胞核的位移很可能是大多数植物小孢子不对称分裂的前提条件之一。Twell<sup>[7]</sup>指出,细胞核的位移和纺锤体轴的位置是保证小孢子正常不对称分裂的重要过程。本试验结果进一步确证了细胞核的位移是保证不对称分裂的前提,朝鲜蒲公英雄配子体发育属于三核细胞花粉发育。

朝鲜蒲公英能够完成减数分裂且形成四分孢子的频率为64%,其中无微核的四分体占总数的62%。据此推测,正常四分体的发生频率约为40%,而成熟花粉中正常花粉约占50%,表明在雄配子体发育过程中存在异常雄配子消失现象,从而导致正常花粉所占比例提高。朝鲜蒲公英花粉败育率高达80%以上,而正常大小的花粉只占总数的50%左右,

这表明正常花粉也有50%以上不能萌发。试验中发现,成熟花粉中存在多个生殖核的异常现象,这可能是导致正常花粉不能萌发以及多重花粉管现象存在<sup>[4]</sup>的原因。生殖细胞过度增殖和多生殖核现象对植物倍性的增加是否有一定作用还有待研究。

#### 参考文献:

- [1] 张波,吴志刚,刘文义,等.蒲公英无融合生殖特性初探[J].沈阳农业大学学报,2011,42(4):475-478.
- [2] 何爽,张爱勤,夏荣,等.新疆不同生态区域苜蓿花粉败育情况及影响因素的细胞学研究[J].草业学报,2011,20(4):153-158.
- [3] 张建,陈倩倩,赵鑫,等.斑叶蒲公英的核型分析和花粉母细胞的减数分裂观察[J].西北植物学报,2012,32(12):2419-2425.
- [4] 邢艳萍,张建,吴杰,等.东北地区5种蒲公英花粉离体萌发条件及特性的研究[J].沈阳农业大学学报,2012,43(3):295-299.
- [5] 胡适宜.被子植物胚胎学[M].北京:高等教育出版社,1982.
- [6] 张仲鸣,苏都莫日根,李正理.银杏小孢子中的微核形成及其在进化过程中的意义[J].植物学报,1997,39(2):97-101.
- [7] Twell D. Mechanisms of microspore polarity and differential cell fate determination in developing pollen// [M]. Cresti M, Cai G, Moscatelli A. Fertilization in Higher Plants .Berlin Heidelberg :Springer-Verlag ,1999 : 201-215 .

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库