

毛车前的花粉母细胞减数分裂及核型分析

张书芹, 王俊杰, 史大聪, 刘 焰*

(华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用压片法, 对武汉地区野生毛车前的花粉母细胞减数分裂及体细胞核型进行了研究。结果表明, 毛车前的绝大多数花粉母细胞减数分裂中染色体行为正常, 终变期同源染色体配对后可形成 12 个二价体; 仅在 2.93% 的花粉母细胞减数分裂中观察到染色体落后、染色体桥等异常行为, 其减数分裂为同时型; 花粉粒育性为 96.88%。核型分析结果表明, 毛车前的染色体数目为 $2n=24$, 核型公式为 $K(2n)=24=22m+2sm$, 其核型为“1B”型。

关键词: 毛车前; 花粉母细胞; 减数分裂; 染色体; 核型

中图分类号: S567.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0124-04

Karyotype Analysis and Meiotic Observations of Pollen Mother Cells in *Plantago virginica* L.

ZHANG Shu-qin, WANG Jun-jie, SHI Da-cong, LIU Yan*

(College of Plant Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The meiosis of pollen mother cells and karyotype were analyzed for *Plantago virginica* L. in Wuhan by applying squash method. The result showed that chromosomes of most pollen mother cells were paired as 12 bivalents at diakinesis. The frequency of Lagging chromosome and chromosomal bridge were 2.93% in pollen mother cells during meiosis. The meiotic division belonged to the simultaneous type, and the stainability of pollen grains was 96.88%. The chromosome number was $2n=4x=24$ and karyotype formula was $K(2n)=4x=24=22m+2sm$, with karyotype type belonging to “1B”.

Key words: *Plantago virginica* L.; pollen mother cells; meiosis; chromosome; karyotype

毛车前(*Plantago virginica* L.)为车前科车前属的 1 年生或 2 年生植物, 又称北美毛车前、北美车前草^[1]。毛车前原产北美洲, 20 世纪 50 年代进入我国华东地区, 近年来其种群呈现暴发式增长态势, 已分布到上海、浙江、江西、江苏等省区, 是一种典型的外来入侵种^[2]。毛车前以干燥全草及种子入药, 有清热、明目、利尿、止泻、降低血压、镇咳祛痰等功效^[3]。国内已有学者对北美车前的生物学和生态学特征^[4]以及不同种群密度下的生理学特性^[5]、形态学特性^[6]及生活史^[7]等进行过较系统的研究。但有关其细胞遗传学方面的研究报道相对较少。染色体核型分析

是进行植物种质资源收集及鉴定的基础性工作^[8]。本研究首次对武汉地区野生毛车前的花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为、花粉粒育性进行观察以及对其体细胞染色体进行核型分析, 旨在为研究该属植物的系统演化、物种形成、种质资源遗传多样性及种质资源分类提供新的细胞学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为采自华中农业大学校园内的野生毛车前。

收稿日期: 2012-02-13

基金项目: 华中农业大学基金项目资助

作者简介: 张书芹(1981-), 女, 湖北松滋人, 助理实验师, 硕士, 主要从事遗传育种的教学与研究工作。

E-mail: zhangshuqin@mail.hzau.edu.cn

* 通讯作者: 刘 焰(1956-), 女, 湖北大悟人, 副教授, 主要从事药用植物种质资源遗传多样性及药用植物细胞遗传学研究。

E-mail: yanl@mail.hzau.edu.cn

1.2 试验方法

- 1.2.1 减数分裂观察方法 于 4—5 月份,取毛车前的幼嫩花蕾,在 4℃下用卡诺固定液固定 24 h。从花蕾中剥取花药,用 1 mol/L 盐酸 60℃恒温解离 2~3 min 后,用改良卡宝品红染色压片,在显微镜下观察并摄影^[9]。
- 1.2.2 花粉粒育性鉴定方法 取毛车前成熟新鲜的花粉粒于载玻片上,用 1%醋酸洋红染色 2 min 后装片,在光学显微镜下观察、计数,将染色深、外形饱满的计为可育花粉粒,不染色或染色浅的、外形皱瘪的计为败育花粉粒,并计算其可育花粉粒百分率。
- 1.2.3 体细胞观察方法 采用幼小雌蕊观察法,取毛车前幼小花蕾,置于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉中,在 4℃下预处理 4~5 h 后,然后用卡诺固定液 4℃下固定 24 h,在解剖镜下剥取幼小花蕾中的雌蕊,置 1 mol/L 盐酸中,60℃恒温解离约 15~20 min,然后用改良的卡宝品红染色压片,在显微镜下观察摄影。
- 1.2.4 核型分析方法 取 80 个分散良好,着丝点清晰的中期分裂相进行染色体计数,并从中选择染色体数目完整、无重叠的 5 个分散较好的分裂相进行显微摄影。染色体相对长度、臂比及类型按 Levan 的命名系统^[10]划分,染色体相对长度系数按 Kuo(1972)方法划分^[11],核型分类采用 Stebbins 的标准^[12]。

2 结果与分析

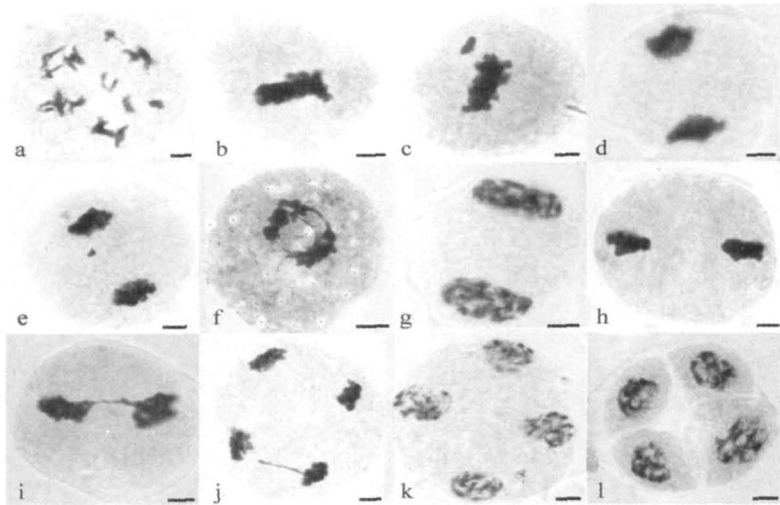
2.1 花粉母细胞减数分裂过程观察

毛车前的绝大多数花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为正常,其减数分裂染色体行为特征与二倍体植物相似,仅在少数花粉母细胞中观察到染色体落后、染色体桥等异常行为,其异常频率仅为 2.93%(表 1)。在终变期,同源染色体配对后,可形

成 12 个高度浓缩、形态较为清晰的二价体(图 1-a),佐证了毛车前的染色体数目为 $2n=24$,该时期是染色体计数的最佳时期。在中期 I,二价体聚集并排列到赤道面上形成赤道板,出现纺锤丝(图 1-b),此期观察到少数细胞中出现落后染色体(图 1-c)。在后期 I,配对的同源染色体彼此分离,在纺锤丝的牵引下,分别向两极移动(图 1-d),此期也观察到少数细胞中出现落后染色体(图 1-e)和染色体桥(图 1-f)。在末期 I,染色体并没有出现明显的解聚现象,在细胞两极分别形成 2 个新的子核,但细胞质不分裂(图 1-g)。在中期 II,2 个子细胞中的染色体都排列到细胞的赤道面上,分别形成 2 个呈一定角度的赤道板(图 1-h)。后期 II,每条染色体上的 2 个姐妹染色单体分开,分别走向细胞两极,此期也观察到少数细胞中出现染色体桥(图 1-i)。在后期 II,每条染色体上的 2 个姐妹染色单体分开,分别走向细胞两极,此时在细胞内可看到 4 组染色体,此期也观察到少数细胞中出现染色体桥(图 1-j)。在末期 II,细胞内部出现 4 个子核(图 1-k),接着细胞质分裂并形成 4 个子细胞,即四分体(图 1-l),其减数分裂方式属于同时型。

表 1 毛车前花粉母细胞减数分裂异常的频率

分裂时期	正常分裂细胞数/个	异常分裂细胞数/个	细胞总数/个	异常分裂频率/%
终变期	34	0	34	0.00
中期 I	66	2	68	2.94
后期 I	78	3	81	3.70
末期 I	63	2	65	3.07
中期 II	60	2	62	3.22
后期 II	44	1	45	2.22
末期 II	45	2	47	4.25
四分体	40	1	41	2.44
合计	430	13	443	2.93



a. 终变期; b. 中期 I; c. 中期 I 落后染色体; d. 后期 I; e. 后期 I 落后染色体; f. 后期 I 染色体桥; g. 末期 I; h. 中期 II; i. 中期 II 染色体桥; j. 后期 II 染色体桥; k. 末期 II; l. 四分体。标尺长度=5μm

图 1 毛车前花粉母细胞减数分裂

2.2 花粉粒育性观察结果

通过随机取样,共观察统计了 448 个成熟花粉粒的醋酸洋红染色反应结果,其中不被染色或染色浅的花粉粒仅有 14 个,可育花粉粒为 96.88%,败育花粉粒仅占 3.12%,与减数分裂的异常频率十分相近。

2.3 体细胞核型分析结果

通过对 65 个毛车前幼嫩雌蕊的染色体数目统计,确定其染色体数目为 $2n=24$ 。核型分析参数取自 5 个分散良好、着丝点清晰的中期细胞染色体的平均值,核型分析内容见表 2,同源染色体配对后的核型见图 2,核型模式见图 3。结果表明:毛车前最长染色体和最短染色体之比为 2.78,臂比大于 2.00 的染色体为 0%,核型不对称系数为 56.76%,核型公式为 $K(2n)=24=22m+2sm$,毛车前的核型类型为“1B”,属于较对称核型。

表 2 毛车前染色体相对长度、臂比及类型

序号	相对长度/% (短臂+长臂=全长)	臂比 (长/短)	相对长度 系数	类型
1	13.38(5.52+7.86)	1.42	1.60	m
2	11.64(4.22+7.42)	1.76	1.38	sm
3	9.14(4.18+4.86)	1.16	1.33	m
4	8.86(3.52+5.34)	1.60	1.10	m
5	8.84(3.42+5.32)	1.58	1.11	m
6	8.16(3.96+4.20)	1.06	0.97	m
7	8.04(3.78+4.26)	1.13	0.96	m
8	7.08(3.48+3.60)	1.03	0.84	m
9	6.76(3.32+3.44)	1.04	0.81	m
10	6.72(3.20+3.52)	1.10	0.81	m
11	5.30(2.04+3.26)	1.60	0.63	m
12	4.82(1.86+2.96)	1.59	0.58	m

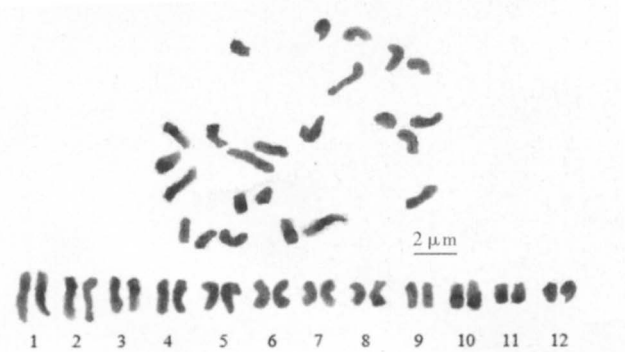


图 2 毛车前的体细胞中期染色体及核型

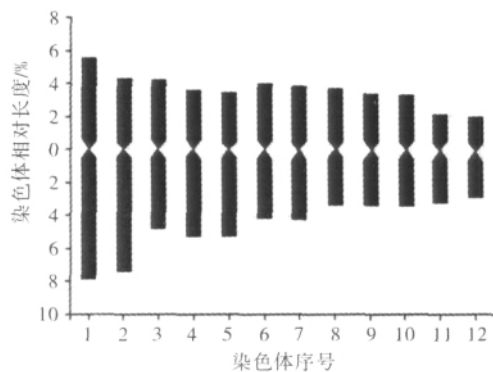


图 3 毛车前染色体核型模式

3 讨论

本研究结果表明,毛车前绝大多数花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为正常,仅在 2.93% 的花粉母细胞中观察到落后染色体、染色体桥等异常现象,这与其花粉粒败育率 3.12% 十分相近。有关植物花粉母细胞减数分裂异常对花粉育性影响的报道很多,伊华林等认为,花粉母细胞减数分裂异常是导致柑橘花粉不育或低育的主要原因之一^[13]。李雪等发现,兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常是导致其花粉败育的主要原因^[14]。另外,程志号等^[15]在黄岑、王俊杰等^[16]在麦蓝菜的研究中,均认为花粉母细胞减数分裂中染色体行为的异常导致了子细胞中遗传物质的不均衡分配,致使产生不育花粉。因此,毛车前花粉母细胞减数分裂中染色体落后、染色体桥等异常现象可能是导致 3.12% 花粉粒败育的主要原因。

本研究结果表明,武汉地区野生毛车前的核型公式为 $K(2n)=24=22m+2sm$,其中 22 条为中着丝粒染色体,2 条为近中着丝粒染色体,核型为“1B”型,核型不对称系数为 56.76%,属较对称核型。本研究结果虽然与王丰等报道的浙江师范大学校园内的毛车前染色体数目相同均为 $2n=24$,但核型类型和核型公式存在差异;王丰等报道的毛车前核型公式为 $K(2n)=24=24m$,所有染色体均为中着丝粒染色体,核型为“1A”型,属最对称核型^[17];与张华宣等报道的辽宁长海毛车前的染色体数目、核型类型和核型公式均有较大差异,张华宣等报道的辽宁长海毛车前染色体数目为 $2n=2x=12$,核型公式为 $2n=2x=12=6m+4sm+2st$,核型为“2A”型,属较对称核型^[18]。上述差异表明不同来源、不同种质的毛车前在染色体水平上存在差异,即存在遗传多样性。Stebbins 认为,植物界核型进化的趋势是从对

称到不对称^[12],因此,武汉野生毛车前的进化地位属于较原始的类型。目前,关于车前属植物的染色体基数尚存争议,由于车前属植物同时存在 $2n=36$ 、24、12,因此,徐炳声等认为,把6作为车前属植物的染色体基数更为可取^[19]。而王丰等已研究过的6种车前科植物(包括北美车前),其染色体数目有 $2n=8$ 、12、24、36等4种情况,则认为 $x=4$ 较符合实际^[17]。本研究观察到毛车前花粉母细胞在减数分裂终变期,所有的染色体均可正常配对,且形成了12个二价体,其减数分裂染色体行为特征与偶倍数异源多倍体相似,由于在偶倍数异源多倍体细胞中,每种染色体组都有2个,同源染色体都是成对存在的,因而减数分裂时能像二倍体一样形成二价体^[20],因此,综合前人的研究结果比较分析,可推测武汉野生毛车前很可能是一个偶倍数异源多倍体,即异源四倍体($x=6$)或异源六倍体($x=4$)。

另外,本研究报道了利用毛车前的幼小雌蕊制备染色体的方法,这为克服药用植物因种子发芽慢、发芽率低而导致的难以取材问题提供了有益的借鉴。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第七十卷[M]. 北京:科学出版社,2002:332.
- [2] 陈香,胡雪华,肖宜安,等. 铝胁迫下北美车前和车前生长及叶绿素荧光特性的比较研究[J]. 植物研究,2011,31(6):680-685.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977:403.
- [4] 郭水良,顾德兴,刘鹏,等. 北美车前生物与生态学特征的研究[J]. 生态学报,1996,16(3):302-307.
- [5] 方芳,郭水良,黄华,等. 北美车前的种群密度对地上和地下器官形态的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2004,12(5):419-424.
- [6] 郭水良,盛海燕. 北美车前(*Plantago virginica* L.)种群密度制约的统计分析[J]. 植物研究,2002,22(2):236-240.
- [7] 郭水良,方芳,黄华,等. 外来入侵植物北美车前繁殖及光合生理生态学研究[J]. 植物生态学报,2004,27(4):514-518.
- [8] 陈卫国,郝林,渠云芳,等. 棉花[AGD]三种杂种核型分析[J]. 山西农业科学,2004,32(2):41-45.
- [9] 吴建国,李再云,刘焰,等. 一种鉴定油菜远缘杂种的细胞学方法[J]. 遗传,1999,21(5):51-52.
- [10] Levan A, Fredga K, Samdberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52:201-220.
- [11] Kuo S R, Wang T T, Huang T C. Karyotype analysis of some formosan gymnosperms[J]. Taiwante, 1972, 17(1):66-80.
- [12] Stebbins G L. Chromosomal evolution in high plants [M]. London:Edward Arnold Ltd, 1971:87-90.
- [13] 伊华林,徐强,陈春丽. 2个柑橘品种花粉母细胞件数分裂行为的观察[J]. 华中农业大学学报,2003,22(2):172-174.
- [14] 李雪,陈丽梅,杜捷,等. 兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察[J]. 西北植物学报,2003,23(10):1796-1799.
- [15] 程志号,蔡明历,郝大翠,等. 黄芩的花粉母细胞减数分裂及核型分析[J]. 中国野生植物资源,2010,29(2):34-37.
- [16] 王俊杰,马玉涛,惠荣奎,等. 麦蓝菜的花粉母细胞减数分裂及核型分析[J]. 中国野生植物资源,2011,30(4):34-56.
- [17] 王丰,郭继明,郭灵云. 北美车前染色体核型研究[J]. 植物学通报,1993,10(2):57.
- [18] 张华宣,刘均容,程斐. 海滨车前和毛车前的核型研究[J]. 绵阳师专学报:自然科学版,1997,15(2):39-42.
- [19] 徐炳声,葛传吉,李岩坤. 三种药用车前的染色体数目和核型的研究[J]. 广西植物,1987,7(3):195-199.
- [20] 朱军. 遗传学[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2002:134.