

无融合生殖悬铃叶苧麻 (*Boehmeria tricuspis*) 多倍性发生的染色体行为研究

邱财生, 程超华, 赵立宁, 李育君, 臧巩固

(中国农业科学院麻类研究所, 长沙 410205)

摘要: 对无融合生殖悬铃叶苧麻 ($2n=42$) 和有性生殖悬铃叶苧麻 ($2n=28$) 花粉母细胞 (PMC) 减数分裂行为进行比较研究, 从而推断两者之间的进化关系; 探索无融合生殖悬铃叶苧麻 (*B. tricuspis*) 发生的细胞遗传学基础, 为无融合生殖发生的遗传学研究提供理论依据。在无融合生殖类型经诱导所产生的 PMC 的减数分裂过程中, 发现有丰富的三价体形成, 属典型的同源三倍体减数分裂行为特征; 而有性生殖类型 PMC 的减数分裂行为绝大多数正常, 但也存在少量异常现象。其中有些异常行为, 可能与未减数配子 ($2n$) 的形成紧密相关。因而推断, 在有性生殖类型的生殖过程中, 可能发生了未减数配子 ($2n$) 与减数配子 (n) 的融合, 产生了同源三倍体合子, 这应该是无融合生殖悬铃叶苧麻发生的重要的细胞遗传学基础。

关键词: 无融合生殖; 悬铃叶苧麻; 染色体; 减数分裂; 倍性发生

Study on Chromosome Behavior in Polyploidy of Apomictic *Boehmeria tricuspis*

QIU Cai-sheng, CHENG Chao-hua, ZHAO Li-ning, LI Yu-jun, ZANG Gong-gu

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205)

Abstract: The objective of this paper was to investigate the cytogenetic basis for origin of triploid apomictic *Boehmeria tricuspis*. We developed a study on the meiosis of PMC between the triploid apomictic *B. tricuspis* and the diploid sexual *B. tricuspis*. Rich trivalents were found in the PMC meiosis of triploid apomictic *B. tricuspis* showed it was a autotriploid. In the sexual *B. tricuspis*, the PMC meiosis usually be normal. But a few were abnormal and some of their behavior might led to the occurrence of $2n$ gamete. The fusion of $2n$ gamete and n gamete might led to auto-triploid apomictic plants. This would be the cytogenetic basic event for the origin of triploid apomictic *B. tricuspis*.

Key words: apomictic; *Boehmeria tricuspis*; chromosome; meiosis; polyploidy origin

无融合生殖具有重要的应用价值和学术研究价值, 对作物育种有着巨大的潜在价值, 是生物学科一个重要的新生长点^[1]。近年来, 人们一直在很多植物上对无融合生殖相关的遗传基础进行研究^[2-6]。多倍性与无融合生殖的关系非常密切, 超过 99% 的无融合生殖体都是多倍体; 而多倍体的起源主要通过 3 种形式: 合子染色体加倍、植物分生组织内细胞的染色体加倍、生殖细胞的染色体加倍^[7]。自然界中多倍体的形成, 以生殖细胞的染色体加倍较多。对苧麻无融合生殖的研究有助于了解苧麻起源及进

化, 同时对苧麻的遗传育种及杂种优势的固定有着极其重要的意义, 但这方面的研究才刚刚起步, 有待于进一步深入^[8]。

悬铃叶苧麻 (*B. tricuspis* (Hance) Makino) 属荨麻科 (Urticaceae) 苧麻属 (*Boehmeria*)。苧麻属约有 120 种, 多数分布在亚洲和美洲, 少数分布于大洋洲、非洲以及印度洋的一些岛屿上^[9-10]。细胞学研究^[11-17]揭示, 苧麻属的染色体基数可能是 $X=14$ 。已报道有二倍体 ($2n=28$)、三倍体 ($2n=42$)、四倍体 ($2n=56$) 和五倍体 ($2n=70$) 存在。其中, 二倍体

收稿日期: 2012-07-18 修回日期: 2012-10-11 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1734.006.html>

基金项目: 国家重大基础研究前期项目 (2003CCA00400); 国家自然科学基金项目 (39880034)

作者简介: 邱财生, 硕士, 助理研究员, 研究方向为苧麻无融合生殖。E-mail: qcaisheng@163.com; 程超华为并列第 1 作者

通信作者: 臧巩固, 研究员, 研究方向为生物技术。E-mail: ibfczgg@sohu.com

种以有性生殖繁殖,多倍体种以无融合结子(agamospermy)繁殖^[15-16]。有研究资料表明,悬铃叶苕麻中也存在有不同的倍性类型。已报道的体细胞染色体数有 $2n = 42$ 、 $2n = 56$ 和 $2n = 70$,都是多倍体,并具有无融合生殖能力^[11-12,15-17]。目前,有关无融合生殖多倍体发生细胞学机制的研究资料尚不多见。臧巩固等^[14]首次发现了有性生殖的悬铃叶苕麻二倍体,并且发现悬铃叶苕麻有性类型与无融合生殖类型在分类学性状上十分近似。这表明两者的遗传基础差异可能不大。对两者遗传基础进行比较研究,有助于加深对无融合生殖发生的遗传学基础的理解。本研究以悬铃叶苕麻无融合生殖类型和有性生殖类型为材料,从细胞遗传学层面进行分析,主要对两者的花粉母细胞(PMC)减数分裂行为进行比较研究,从而对无融合生殖发生的遗传学基础提供一些研究资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

有性生殖悬铃叶苕麻、无融合生殖悬铃叶苕麻,均采自国家种质长沙苕麻圃。其中,有性生殖类型具有正常的雄花序和雌花序发育,而无融合生殖类型在自然条件下一般不产生雄花序,只有雌花序发生,并进行孤雌生殖结子。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体数目观察 分别取悬铃叶苕麻有性及无融合生殖类型的嫩茎水培生根,待根长至1.5~2 cm时,切取根尖,置于4℃蒸馏水中低温过夜。采用酶解法制片,Giemsa染色法染色,染色后进行镜检拍照。每材料观察细胞50个以上,以统计其染色体数目。

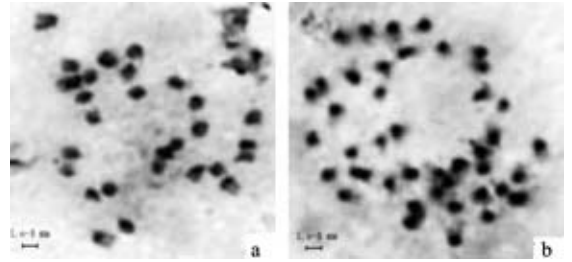
1.2.2 PMC取材 有性生殖类型的取材:现蕾3 d后每天9:30及16:30左右取材,取材日期从6月12日至7月花期结束。取材后用卡诺固定液固定12 h左右,转70%乙醇中存放。无融合生殖类型的取材:雄花诱导参照赵立宁等^[18]的方法,诱导雌花序发生性别转变,转变为雄花序和雄花蕾。喷施赤霉素第3次结束后的第2天开始取材,取材和固定保存法与有性生殖类型相同。

1.2.3 PMC制片观察拍照 参照朱澍^[19]的方法制片,用丙酸-铁钒-苏木精染液染色,镜检,观察拍照;制作永久片:低温冷冻80 min,迅速用刀片揭开盖玻片,缓缓置于45%醋酸浸泡1.5 min,经浓度梯度乙醇脱水,使用二甲苯透明,用中性胶封片。

2 结果与分析

2.1 染色体数目

参照李懋学等^[20]的方法,对2种悬铃叶苕麻分别进行染色体计数,结果表明,有性生殖类型的染色体数目是 $2n = 28$,无融合生殖类型染色体数目是 $2n = 42$ 。两者的染色体形态基本一致(图1)。



a: 悬铃叶苕麻有性生殖类型; b: 悬铃叶苕麻无融合生殖类型
a: sexual *B. tricuspis*, b: triploid apomictic *B. tricuspis*

图1 2种悬铃叶苕麻的染色体图

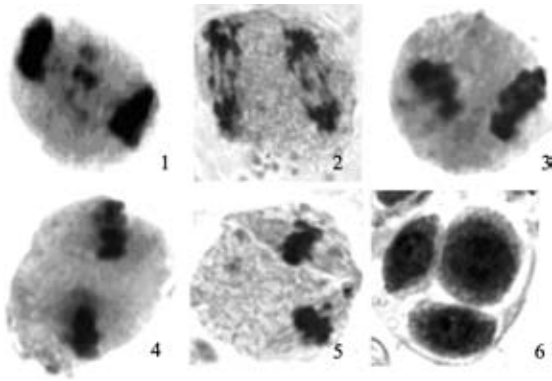
Fig. 1 The karyotype of two types of *B. tricuspis*

2.2 有性生殖悬铃叶苕麻减数分裂中的异常现象

对有性生殖悬铃叶苕麻的PMC减数分裂进行系统观察,发现其花粉母细胞的染色体数为28,减数分裂方式为同时型。多数PMC减数分裂行为正常,终变期形成14个二价体,经历了中期、后期的发育和分裂过程,产生正常的四分小孢子。在5%左右的PMC中观察到了染色体行为异常现象,表现为:后期I、后期II染色体落后、染色体桥(图2-1、图2-2);中期II赤道板排列异常,2个纺锤体的定向出现偏差,由正常的相互垂直异变为八字形或平行定向(图2-3、图2-4);后期II纺锤丝把染色体拉向三极,其中的一极出现2个纺锤体融合趋势(图2-5);末期II形成一大两小的三分体(图2-6)等。

2.3 无融合生殖悬铃叶苕麻PMC减数分裂

通过赤霉素诱导无融合生殖类型雌花花芽发生性别转变发育成为雄花,观察其PMC减数分裂过程,结果:细线期、粗线期、双线期染色体的行为未发现异常现象(图3-1~图3-3);终变期和中期I:未见核仁,染色体联会形式多种多样,统计了110个细胞,有多种联会形式(图3-4、图3-5、图3-10、图4-12),发现完全配对成14个三价体的PMC 2个,平均联会构型:4.16III+9.92II+9.72I;三价体以链状形式较多(图3-12),少量呈环状形式(图3-10);这些现象与同源三倍体减数分裂行为相符合。后期I:染色体提前分离(图3-6)、染色体落后(图3-7)、染色体桥(图3-8、图3-9)等异常现象普遍存在。



1: Anaphase I, showed chromosomes unequally distracted and some lagged chromosomes, 2: Anaphase II, showed typical chromosome bridge, 3: Metaphase II, Triangle orientation spindle, 4: Metaphase II, showed parallel chromosomes, 5: Anaphase II, showed how the chromosomes be dragged to 3 poles, 6: Telophase, Triad

图2 有性生殖悬铃叶苳麻减数分裂过程中的异常现象

Fig. 2 The abnormal phenomena in the meiosis of the sexual *B. tricuspis*

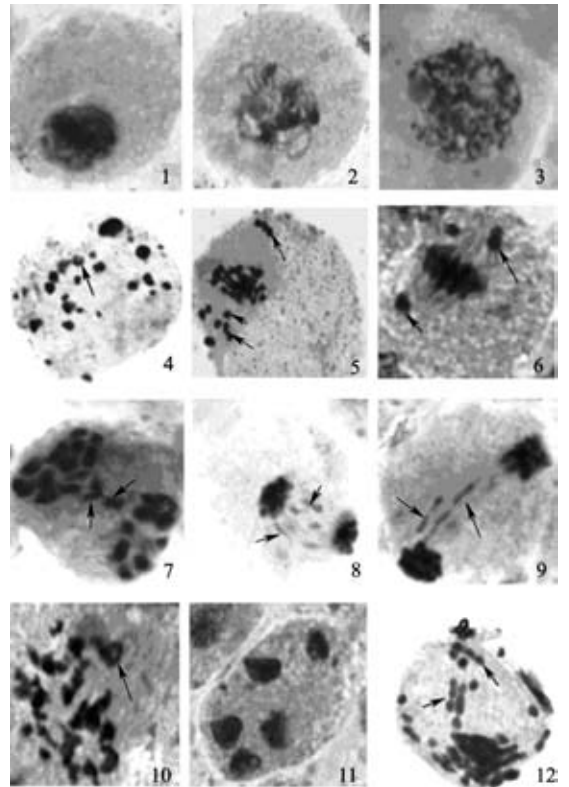
在试验中观察到许多 PMC 细胞发生了疑似细胞凋亡的现象(图 3-11),如染色质凝集等。

3 讨论

3.1 悬铃叶苳麻有性生殖类型具备了产生 $2n$ 配子的潜力

未减数配子在植物中的发生较为普遍,而未减数配子与减数配子结合($2n + n$)是自然界三倍体发生的主要途径。未减数配子的产生与减数分裂异常直接相关。研究表明, $2n$ 雄配子发生的主要机制有:减数分裂前失调和减数分裂失调 2 大类。在减数分裂失调类中,第 2 次分裂纺锤体异常,在植物中较为普遍,其主要机理有:减数分裂中期 II 细胞中 2 个纺锤体融合成 1 个纺锤体,结果产生二倍性的二倍体;后期 II 2 个纺锤体的定向常由互相垂直而变成相互平行,从而牵引 4 个子核两两为一单位走向一极,最终形成 2 个二倍性的二分体;纺锤体有时还形成三极状,结果产生三分体,包括 2 个 n 配子和 1 个 $2n$ 配子^[21]。

本课题组在对悬铃叶苳麻有性生殖类型的细胞学研究观察到相关的异常情况主要有:1)染色体落后、染色体桥等现象,表明在本试验材料的减数分裂中也有“纺锤体异常”出现;2)2 个纺锤体的定向出现八字型和互相平行现象。意味着可能出现 4 个子核两两为一单位走向一极,最终形成二倍性的二分体的结果;3)纺锤体形成三极状,结果可能产生包括 2 个 n 配子和 1 个 $2n$ 配子的三分体。这些现象证明,悬铃叶苳麻有性生殖类型不仅能产生减数配



1: Leptotene stage, 2: Pachytene stage, 3: Diplotene stage, 4: Diakinesis, showed bivalent like the letter "v", 5: Metaphase I, lagged trivalent, univalent and bivalents, 6: Anaphase I, predivided chromosomes, 7: Anaphase I, lagged chromosomes, 8: Anaphase I, showed lagged chromosomes and chromosome bridge, 9: Anaphase I, showed typical chromosome bridge, 10: Diakinesis, circle trivalents, 11: Telophase II, the chromosomes were divided into 5 piles, 12: Diakinesis, chain trivalents

图3 无融合生殖悬铃叶苳麻 PMC 减数分裂

Fig. 3 The meiosis of the apomictic *B. tricuspis*

子(n),同时具备了产生未减数配子($2n$)的潜力。为经过 $2n + n$ 的途径产生同源三倍体,提供了细胞学遗传学基础。

3.2 无融合生殖悬铃叶苳麻的减数分裂行为符合同源三倍体的特点

减数分裂异常是同源多倍体植物的特征之一。由于染色体的来源相同,减数分裂过程中大都会形成多价体,多价体的形成反映了不同染色体之间的同源关系,也反映了不同染色体组(x)之间的同源关系。同源三倍体的联会特点是每个同源组的 3 个染色体,在同源区段内只能有 2 条染色体,而将第 3 个染色体的同源区段排斥在联会之外;这决定了同源三倍体两两联会的不完整性 and 松弛性,从而使其容易发生提前分离;在同源的 3 个染色体之中,如果有 2 个先联会成二价体,第 3 个就会发生不联会(asynapsis)成为单价体。所以每个同源组的 3 个染色体可能联会成三价体,也可能联会成 1 个二价体和

1 个单价体,三价体在后期 I 一般会发生不均衡分离,特殊情况下整个三价体可能会被拉到同侧^[22]。

本研究观察到无融合生殖悬铃叶苕麻终变期染色体配对构型特点表现出明显的同源三倍体特征:4. 16III + 9. 92II + 9. 72I, 平均每个 PMC 细胞有 4. 16 个三价体,三价体发生频率较高;并且观察到 2 个完全配对的 14 个三价体的细胞。一般异源三倍体中偶然的异源染色体配对难以出现如此多的三价体,所以应该可以推断,这 3 个染色体组是同源的。其后期 I 出现的染色体提前分离、不均等分离、染色体落后、染色体桥等异常现象都在其他植物种类的同源三倍体减数分裂过程中普遍存在。

3.3 2 种不同生殖类型悬铃叶苕麻间的遗传关系

根据本课题组的观察,无融合生殖类型和有性生殖类型亲缘关系十分紧密:1) 两者在形态学上极为相似,没有异种间的杂交后代在形态上分离或两亲本特征组合的特点。只是无融合生殖类型更为高大,这个符合同源多倍体的特征;2) 两者的染色体形态相似,虽然数目不同,但互为整倍性关系。目前在苕麻属发现的倍性有二倍体 ($2n = 28$)、三倍体 ($2n = 42$)、四倍体 ($2n = 56$) 和五倍体 ($2n = 70$), 其中的多倍体均具无融合生殖能力。已发表的胚胎学研究证明,多为配子体无融合生殖中的二倍体孢子生殖类型^[13,15-16]。从细胞学角度分析,不同倍性之间存在着明显的进化规律:染色体数目呈规则的整倍性递增,且每一台阶的上升,均只增加 1 个单倍体配子的染色体数目 ($n = 14$)。染色体数目的这种递增方式,只能用 $2n + n$ 的途径解释。其倍性水平的进化,每一次都是在原有倍性水平上,由 1 个未减数配子与 1 个减数配子的结合而完成。由于从三倍体到五倍体的多倍体均具无融合生殖能力,这可能暗示:无融合生殖的发生或其遗传基础的形成,与 $2n$ 配子的形成有关。推测的理由有:1) 无融合生殖实际上是一种异常的减数分裂过程,而 $2n$ 配子的产生也是减数分裂异常的结果,两者之间应有共同的遗传基础。2) 从三倍体到五倍体均保持有无融合生殖能力,说明无融合生殖的遗传结构在不同倍性类型的传递中一直被保持着。这样的传递,只可能通过未减数配子 ($2n$) 来实现。而减数配子由于经过染色体的分离组合,不易保持原有的遗传结构。

经过对悬铃叶苕麻无融合生殖类型和有性生殖类型的 PMC 减数分裂进行的系统研究可以看出:无融合生殖类型的减数分裂行为符合一般同源三倍体染色体行为的特征;有性生殖类型具备产生 n 和 $2n$

配子的能力和潜力。结合形态学观察、染色体观察及分子水平的亲缘关系研究^[23]等综合推断:悬铃叶苕麻无融合生殖类型是同源三倍体,其起源与悬铃叶苕麻有性生殖类型中的 $2n$ 配子的产生及与 n 配子的融合直接相关。

参考文献

- [1] 蔡得田. 水稻无融合生殖理论与实践[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998: 3-4, 10-13
- [2] Anna K, Frantisek K, Radka R. Expressivity of apomixis in $2n + n$ hybrids from an apomictic and a sexual parent; insights into variation detected in *Pilosella* (Asteraceae; Lactuceae) [J]. Sex Plant Reprod, 2011, 24: 63-64
- [3] Paule J, Sharbel T F, Dobeš C. Apomictic and sexual lineages of the *Potentilla argentea* L. group (Rosaceae): Cytotype and molecular genetic differentiation [J]. Taxon, 2011, 60(3): 721-732
- [4] Sharbel T F, Voigt M L, Corral J M, et al. Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns [J]. Plant Cell, 2010, 22: 655-671
- [5] Sharbel T F, Voigt M L, Corral J M, et al. Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex [J]. Plant J, 2009, 58: 870-882
- [6] Tucker M R, Koltunow A M G. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships [J]. Funct Plant Biol, 2009, 36: 490-504
- [7] 黄群策. 被子植物的无融合生殖[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2000
- [8] 陈建华, 许英, 王晓飞, 等. 苕麻属植物资源基础研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 345-351
- [9] 王文采. 中国苕麻属校订 [J]. 云南植物研究, 1981, 3(3): 307-328
- [10] Blume C L, Brill E J. Museum botanicum Lugduno-batavum [M]. Charleston: Bibliolife, 1856: 194-227
- [11] 臧巩固. 苕麻属三组五种核型研究 [J]. 中国麻作, 1993(1): 1-6
- [12] 臧巩固. 苕麻属无融合生殖种质资源的初步研究 [J]. 中国麻作, 1991(2): 6
- [13] 臧巩固, 赵立宁, 孙敬三. 赤苕无融合生殖细胞胚胎学研究 [J]. 植物学报: 英文版, 1997, 39(3): 210-213
- [14] 臧巩固, 赵立宁. 中国苕麻属无融种综发现初报 [J]. 中国麻业, 1996, 18(1): 19
- [15] Okabe S. Cytological studies of the apomixis in Angiosperms. I. Apomixis in the genus *Boehmeria* [J]. Sci Rep, 1963, 4(29): 207-215
- [16] Yahara T A. Biosystematic study on the local populations of some species of the genus *Boehmeria* with special reference to Apomixis [J]. J Faculty of Sci Sect III, 1983, 13: 217-261
- [17] Acharya N, Yonekura K, Suzuki M, et al. Cytological studies of genus *Boehmeria* Jacq. (Urticaceae) in Nepal [J]. Jpn Bot, 2003, 78(2): 95-102
- [18] 赵立宁, 臧巩固. 苕麻属全雌型无融合生殖种雄花诱导研究 [J]. 中国麻业, 1997, 19(2): 5-8
- [19] 朱激. 植物染色体及染色体技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1982: 35-41, 145-154
- [20] 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: 63-66, 160-180
- [21] 李树贤. 植物染色体与遗传育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 96
- [22] 朱军. 遗传学 [M], 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 130-132
- [23] 张静, 吴先军, 汪旭东, 等. 特异同源三倍体水稻材料 SAR-3 细胞学研究 [J]. 作物学报, 2002, 28(5): 704-708