

‘凤丹白’牡丹核型分析与减数分裂的细胞遗传学观察

李子峰^{1,2}, 王佳^{2,3}, 胡永红^{2*}, 刘庆华¹, 秦俊²

(¹莱阳农学院环境艺术学院, 山东青岛 266109; ²上海植物园, 上海 200231; ³北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要: 对江南牡丹品种‘凤丹白’的核型和花粉母细胞减数分裂行为进行研究。结果表明: ‘凤丹白’为二倍体, 染色体数 $2n=10$, 核型公式: $2n=2x=10=6m+2sm+2st$, 属于 2A 型, 没有观察到随体。推测‘凤丹白’和杨山牡丹不是同物异名, 主要表现在随体的有无。与杨山牡丹的核型进行比较发现: 从杨山牡丹演化到‘凤丹’系列是由纯合到不同等级的杂合。‘凤丹白’减数分裂过程中具有不同步性, 在后期、末期观察到染色体桥, 后期、末期分别观察到“对角线”桥、不均等分裂、双桥等现象。上海地区观察‘凤丹白’花粉母细胞减数分裂的最佳取材时间为 2 月底~3 月初。

关键词: 牡丹; 染色体; 核型; 花粉母细胞; 减数分裂

中图分类号: S 685.11 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 02-0411-06

Karyotype Analysis and Cytology Observation on Meiosis of *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’

LI Zi-feng^{1,2}, WANG Jia^{2,3}, HU Yong-hong^{2*}, LU Qing-hua¹, and QIN Jun²

(¹College of Landscape Architecture and Art, Laiyang Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²Shanghai Botanical Garden, Shanghai 200231, China; ³College of Landscape, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The karyotype and meiosis course of pollen mother cell on *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’ of cultivar group of tree peony from South Yangtse River of China have been observed and researched. Results show that the chromosome number of *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’ is 10. It is diploid. Kitagawa is $2n=2x=10=6m+2sm+2st$, which is belong to 2A type. It has not observed chromosome satellites. Extrapolated *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’ with *Paeonia ostii* is not the different same thing, whether there is mainly displays in chromosome satellites. Compare with the karyotype of *Paeonia ostii* and show that from *Paeonia ostii* to *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’ evolved the course from pure to mixed and shut different grade. Meiosis is out of step. It was observed that the chromosome bridge was in anaphase, telophase and the ‘diagonal’ bridge, splits unequally, one pair of bridges, etc. were in anaphase, telophase. The unusual phenomenon in meiosis course of pollen mother cell of *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’ have been analyzed from cell science of heredity level. The best time to observation of the pollen master cell meiosis is end of February to the beginning of March in Shanghai.

Key words: *Paeonia ostii*; Chromosome; Karyotype; Pollen mother cell; Meiosis

江南牡丹品种群 (Cultivar Group of Tree Peony from South Yangtse River of China) 是中国牡丹一个重要组成品种群。

收稿日期: 2006-10-30; 修回日期: 2007-03-19

基金项目: 上海市绿化管理局科学技术项目 (F050304)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: huyonghong68@hotmail.com)

‘凤丹’系列是江南牡丹品种群的一个亚群，由杨山牡丹 (*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang) 长期栽培演化形成的观赏兼药用的品种群 (李嘉珏, 1999; 中国牡丹全书编纂委员会, 2002), 具有植株高大, 根系浅, 耐湿热, 结实率高, 适应性强, 病虫害少等特点, 是江南地区培育耐湿热品种的重要种质资源 (李嘉珏, 2005)。

通过对江南牡丹品种群中最常见的‘凤丹白’品种进行核型分析与花粉母细胞减数分裂的研究, 一方面可为江南牡丹品种的演化、地理分布和分类学提供指导; 另一方面对于探讨江南牡丹杂交亲本的育性, 指导遗传育种工作, 尤其在确定种间杂交组合, 诱变育种等具有重要意义, 可为江南牡丹品种群的品种选育、杂交后代和新品种的鉴定、分类、推广提供重要的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试材及取样

供试材料‘凤丹白’ (*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang ‘Phoenix White’) 的种子产自安徽铜陵凤凰山 (2005年8月采收), 经沙藏后生根。花蕾取自上海植物园4年生‘凤丹白’植株 (2005年9月上盆)。

1.2 核型分析方法

核型分析采用根尖压片法。待根长至0.5~1.5 cm时, 上午9~11时取根尖于卡诺固定液中 (冰乙酸: 无水乙醇 = 1:3) 固定24 h; 固定后的根冲洗数次转移到50%酒精中; 用1 mol·L⁻¹ HCl溶液在60℃的水浴解离8~10 min; 蒸馏水冲洗后, 取根尖分生组织1~2 mm, 用改良卡宝品红染色; 冰冻法揭片, 干燥后中性树胶封片。选取5个染色体分散良好、着丝点清晰的细胞进行核型分析 (李懋学和陈瑞阳, 1985) 和核型分类 (Stebbins, 1971)。

1.3 花粉母细胞减数分裂的观察方法

花粉母细胞减数分裂的观察采用花药压片法。于2006年2月底~3月底隔天9:30~11:30取花蕾 (直径1.5~3.0 cm), 将花药在卡诺固定液中 (同上) 固定24 h, 转入70%的酒精中 (或在1 mol·L⁻¹ HCl中解离3 min), 将花药取出放在滤纸上吸除酒精, 转移到载玻片上, 加1~2滴卡宝品红染色液, 用镊子将花粉母细胞挤出, 加盖玻片, 在酒精灯上加热, 压片 (李懋学和张赞平, 1996), 在100倍油镜下进行显微观察摄影。

2 结果与分析

2.1 核型分析

试验中观察到的细胞染色体数均为10, 与前人观察结果 (陈瑞阳等, 2003) 一致。

根据根尖染色体观察与花粉母细胞减数分裂后期配对情况 (图版, 9~11) 得知: ‘凤丹白’为二倍体, 核型公式为: $2n = 2x = 10 = 6m + 2sm + 2st$ 。染色体组总长为42.95 μm, 臂比值大于2的染色体占染色体总数的20% (0.2), 最长与最短染色体比值为1.5 (<2), 核型分类为2A型, 属于较对称类型。‘凤丹白’的核型图及核型分析见图1和表1。

表 1 ‘凤丹白’的核型分析

Table 1 Karyotype analysis of *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’

序号 No.	长臂 + 短臂 = 全长 L + S = Total	臂比 (长臂 / 短臂) Arm ratio (L/S)	类型 Type
1	13.27 + 8.85 = 22.12	1.5	m
2	11.64 + 10.24 = 21.88	1.14	m
3	12.11 + 9.43 = 21.54	1.28	m
4	12.34 + 6.75 = 19.09	1.83	sm
5	12.57 + 2.79 = 15.36	4.5	st

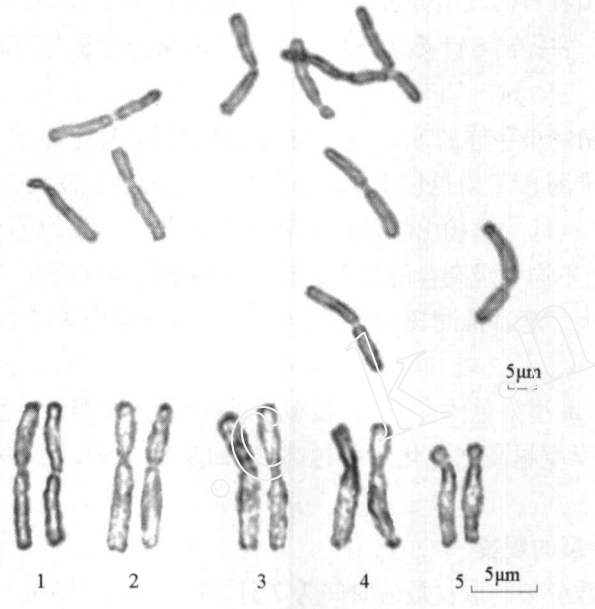


图1 '凤丹白' 体细胞分裂中期

Fig. 1 Metaphase of *Paeonia ostii* 'Phoenix White' somatic cell

2.2 花粉母细胞减数分裂

共观察了 200 个细胞, 包括了前期 至四分体时期。

2.2.1 第 1 次分裂 第 1 次分裂 (图版, 1~15) 观察到细胞 82 个, 前期 的细胞占 18.3%, 终变期占 4.8%; 中期 的细胞占 23.2%, 在所观察的细胞中所占比例较高, 染色体提早分离占 7.32%; 后期 可观察到染色体桥占 2.43%, 比例较低; 在末期 观察到了染色体桥, 所占比例为 5%。二分体所占比例最大, 为 30.1%。

在第 1 次分裂中可以明显看到 5 号染色体不进行同源染色体配对, 形成单价体 (图版, 11)。

2.2.2 第 2 次分裂 第 2 次分裂 (图版, a~n) 共观察到细胞 128 个, 比第 1 次分裂观察到的多。观察到“对角线”桥、双线桥及不均等分裂等现象。

观察到的前期 较少, 约占总观察数的 6.25%, 中期 也较少, 只观察到相对中期 。后期 观察到的较多, 约占总数的 25%, 并且观察到了不均等分裂、不均等分裂的双桥、“对角线”桥。而末期 观察到的数量最多, 约占 35.2%, 并观察到了染色体桥。在对四分体的观察统计中, 占 29.7%, 其数量很大, 并观察到了两个三分体。

3 讨论

3.1 核型

本试验观察到的江南牡丹 '凤丹白' 核型与张赞平观察到的洛阳 '凤丹' 一致, 而与王莲英观察到的北京 '凤丹' ($2n = 2x = 10 = 8m + 2st$) 不一致。与染色体图谱 (陈瑞阳 等, 2003) 中标准牡丹的核型: $[2n = 2x = 10 = 6m + 2sm (1SAT) + 2st (1SAT)]$ 在有无随体方面不一致。本试验中没有观察到随体, 而王莲英、张赞平在 '凤丹' 的核型观察中也均未见到随体, 推测 '凤丹' 不存在随体或很难观察到随体。

'凤丹' 和杨山牡丹的关系一直不很清楚, 一种观点认为 '凤丹' 只是杨山牡丹的异名, 其差异仍在 *P. ostii* 的变异范围之内 (拉丁名使用同一个) (洪德元和潘开玉, 1998, 2005); 另一观点认为

‘凤丹’是杨山牡丹长期演化而来的栽培亚种（沈保安，2001）。

本试验结果与对杨山牡丹的核型分析得出：杨山牡丹核型公式 $2n = 2x = 10 = 6m (3SAT) + 2sm (1SAT) + 2st (2SAT)$ ，并提出 SAT 数及 SAT-染色体的杂合性是芍药属种间差异的一个重要的细胞学特征。

但是，由于芍药属植物染色体的 SAT 直径与染色体直径之比多小于 1/2，加之其变异较大，因此识别和判断比较困难；推测 SAT 染色体由纯合向不同等级的杂合发展，可能是芍药属植物分化趋势的核型上的一种反映。‘凤丹’是杨山牡丹逐步演化的品种，二者比较可以得出：从杨山牡丹演化到‘凤丹’系列是由纯合向不同等级杂合的过程，正是这种杂合演化而使‘凤丹’的染色体不同于杨山牡丹，主要表现在随体上。笔者推测杨山牡丹和‘凤丹’并非同种异名，有待于分子生物学方法进一步证明。

‘凤丹白’的核型：m 型染色体占 3/5，核型不对称型为 2A 型，一般认为核型不对称程度是进化的一种标志，即不对称程度越高则进化水平越高（Stebbins, 1971）。因而，‘凤丹’为较进化的种类。

3.2 花粉母细胞减数分裂的观察

观察花粉母细胞减数分裂的取材最佳时间为 2 月 25 日 ~ 3 月 15 日（上海），花蕾直径 1.5 ~ 2.5 cm。

就一天中花粉母细胞减数分裂情况进行观察，从 9 00 ~ 16 30 每 0.5 h 取材 1 次，不同取材时间段都在进行减数分裂，但中午气温较高，停留在分裂中期的时间较短，这正是不能获得良好中期分裂相的原因。

‘凤丹白’花粉母细胞减数分裂具有极不同步性，同一花粉可观察到从第一次分裂到四分体的各个时期，其中中期观察到较少，只观察到 1 ~ 2 个。

同一花蕾的花粉减数分裂观察中发现：花蕾边缘花粉母细胞处于四分体的数量多于内侧的，而花蕾内侧花粉母细胞二分体的数量多于外侧。

‘凤丹白’的花粉母细胞减数分裂形成单价体，可能原因为：不联会，同源染色体没有发生联会，二价体提早分离；不规则联会，几条染色体（并非两同源染色体）不规则地联在一起等。而从中、后期 中可以看出，5 号染色体参与了赤道面排列并拉向两极，形成的单价体能正常分离，因此认为‘凤丹白’形成单价体的主要原因是二价体提早分离。正是这样在后期均能正常的分向两极，形成正常的配子，从而不影响江南牡丹凤丹系列的育性。

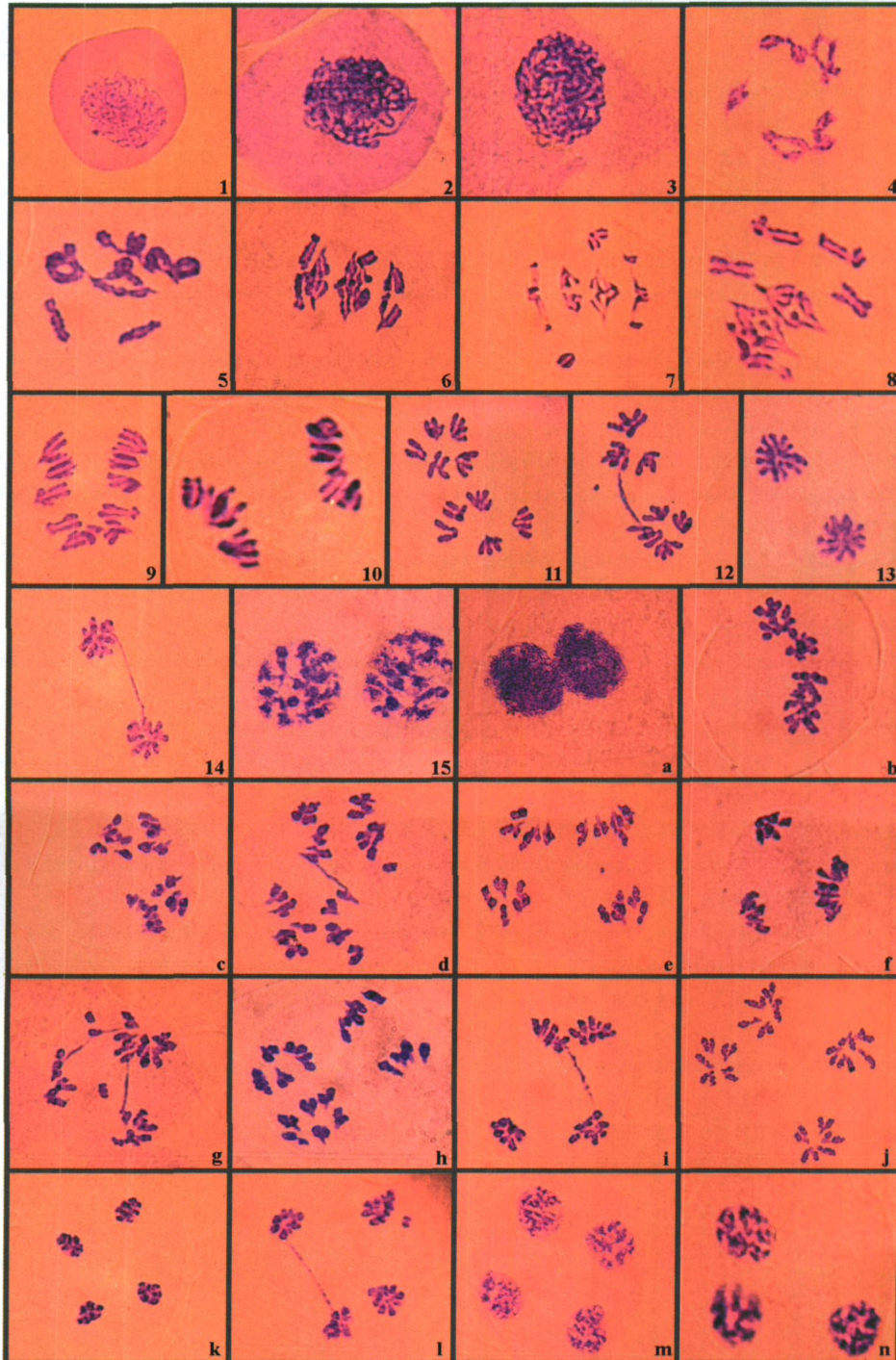
在分裂过程中观察到了不均等分裂、染色体桥以及落后染色体的存在，但没有见到染色体片段的出现。

对于观察到的后期 不均等分裂，主要形成机制是：在后期 只有一半的染色单体正常分裂，而另一半则不分裂，最后形成了大小不等的配子，即三分体。

对于染色体桥，后期 、末期 及末期 的桥在倒位环内只有 1 次交换，涉及 2 条染色单体，当别的染色体分向两极时，桥也拉长，一直拉断为止。“对角线”桥形成的原因可能是纺锤体轴向改变而出现的一种分离方式；而双桥形成涉及 4 个染色单体，倒位圈内发生四线双交换，所以形成 2 个桥（李雪 等，2003；何丽霞，2004）。

3.3 花粉母细胞减数分裂与结实率

从江南牡丹‘凤丹白’花粉母细胞减数分裂来看，分裂的异常现象很少，笔者认为这是‘凤丹白’结实率高的原因之一。但‘凤丹白’的结实率还应与大孢子母细胞减数分裂、受精过程中一系列外界因素及病虫害有关，还需进一步研究。



图版说明: 1~15. 第1次分裂。a~n. 第2次分裂。1. 细线期; 2. 偶线期; 3. 粗线期; 4. 双线期; 5. 终变期; 6. 中期; 7, 8. 染色体提早分离; 9~11. 后期; 12. 后期 染色体桥; 13. 末期; 14. 末期 染色体桥; 15. 二分体。a. 前期; b. 中期; c. 后期 初期; d. 后期 '对角线' 桥; e, j. 后期; f, h. 后期 不均等分裂; g. 后期 双线桥; i. 后期 '对角线' 桥; k. 末期; l. 末期 染色体桥; m. 四分体; n. 三分体。

Explanation of plates: 1 - 15. The first meiosis; a - n The second meiosis. 1. Leptotense; 2. Zygotene; 3. Pachytene; 4. Diplotene; 5. Diakinesis; 6. Metaphase; 7, 8. Chromosomes disjunction ahead of time; 9 - 11. Anaphase; 12. Chromosome bridge in anaphase; 13. Telophase; 14. Chromosome bridge in Telophase; 15. Diad. a. Prophase; b. Metaphase; c. Initial stage of Anaphase; d. Chromosomes 'diagonal' bridge in Anaphase; e, j. Anaphase; f, h. Unequal separation of chromosome in Metaphase; g. Chromosome double ridges in Metaphase; i. Chromosomes 'diagonal' bridge in Anaphase; k. Telophase; l. Chromosome bridge in Telophase; m. Tetrad; n. Tritrad

References

- Chen Rui-yang, Song Wen-qin, Li Xiu-lan, Li Mao-xue. 2003. Chromosome atlas of major economic plants genome in China III. Beijing: Science Press: 664 - 665. (in Chinese)
- 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 李懋学. 2003. 中国主要经济植物基因染色体图谱 (第3册). 北京: 科学出版社: 664 - 665.
- Chinese Peony Book Condification Committee. 2002. Chinese peony book. Beijing: China Science and Technology Publishing House: 71 - 72. (in Chinese)
- 中国牡丹全书编纂委员会. 2002. 中国牡丹全书. 北京: 中国科学技术出版社: 71 - 72.
- He Li-xia. 2004. The cytogenetic observation on pollen mother cell of *Paeonia lutea*. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 6 (40): 78 - 82. (in Chinese)
- 何丽霞. 2004. 黄牡丹花粉母细胞减数分裂过程的细胞遗传学观察. 兰州大学学报 (自然科学版), 6 (40): 78 - 82.
- Hong De-yuan, Pan Kai-yu. 1998. Taxonomical history and revision of *Paeonia* sect. Moutan (Paeoniaceae). Acta Phytotaxonomica Sinica, 37 (4): 351 - 368. (in Chinese)
- 洪德元, 潘开玉. 1998. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理. 植物分类学报, 37 (4): 351 - 268.
- Hong De-yuan, Pan Kai-yu. 2005. Make up of the note revision of *Paeonia* sect. Moutan (Paeoniaceae). Acta Phytotaxonomica Sinica, 43 (3): 284 - 287. (in Chinese)
- 洪德元, 潘开玉. 2005. 芍药属牡丹组分类补注. 植物分类学报, 43 (3): 284 - 287.
- Li Jia-jue. 1999. Peonies in Chinese horticulture. Beijing: China Forestry Publishing House: 29 - 67. (in Chinese)
- 李嘉珏. 1999. 中国牡丹与芍药. 北京: 中国林业出版社: 29 - 67.
- Li Jia-jue. 2005. Pictorial record of Chinese tree peony varieties? Northwest, Southwest, South Yangtse river. Beijing: China Forestry Publishing House: 8 - 9. (in Chinese)
- 李嘉珏. 2005. 中国牡丹品种图志·西北、西南、江南卷. 北京: 中国林业出版社: 8 - 9.
- Li Mao-xue, Chen Rui-yang. 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants. Journal of Wuhan Botanical Research, 3 (4): 297 - 302. (in Chinese)
- 李懋学, 陈瑞阳. 1985. 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物学研究, 3 (4): 297 - 302.
- Li Mao-xue, Zhang Zan-ping. 1996. Research techniques of crops chromosome. Beijing: China Agricultural Press: 42 - 98. (in Chinese)
- 李懋学, 张赞平. 1996. 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社: 42 - 98.
- Li Xue, Chen Limei, Du Jie, Liang Wan-fu, Xing Heng-tai. 2003. Observation on abnormal meiosis of pollen mother cells in *Lilium davidii* var. *unicolor*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 23 (10): 1796 - 1799. (in Chinese)
- 李雪, 陈丽梅, 杜捷, 梁万福, 幸亨泰. 2003. 兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察. 西北植物学报, 23 (10): 1796 - 1799.
- Shen Bao-an. 2001. Taxonomic identification and revision of medicinal plants in sect. Moutan of the genus *Paeonia*. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 12 (4): 330 - 333. (in Chinese)
- 沈保安. 2001. 中国芍药属牡丹组药用植物的分类鉴定研究与修订. 时珍国医国药, 12 (4): 330 - 333.
- Stebbins G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London: Edward Arnold Ltd.