

Cucumis hytivus 染色体组间交换重组及其对雄配子育性的影响

郭军洋, 陈劲枫*

(作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京农业大学蔬菜研究所, 南京 210095)

摘要: 采用染色体压片技术对双二倍体种 *Cucumis hytivus* 染色体组间交换重组及其对雄配子育性的影响进行了细胞学研究。找到了该物种染色体组间交换重组的细胞学证据: 包括前期的“8”字形、“十”字形结构和中期 I 环状、链状多价体。研究还发现各种可能导致遗传物质不均衡分离的异常结构如染色体桥、染色体滞后、染色体组分离、微核等。染色体组间广泛的交换和重组导致约 93% 的多分体及部分异常四分体的形成, 多分体中大量的畸形小孢子和四分体中遗传物质不平衡的小孢子因不能正常发育而最终形成败育的雄配子, 直接影响到 *Cucumis hytivus* 育性。

关键词: *Cucumis hytivus*; 染色体组; 交换重组; 雄配子

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)02-0107-04

Genomic Exchange and Rearrangement and Its Effect on Fertility of Male Gametophyte in *Cucumis hytivus*

GUO Jun-Yang, CHEN Jin-Feng*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Genomic exchange and rearrangement of the amphidiploid species *Cucumis hytivus* and its effect on fertility of male gametophyte were cytologically studied through making slides. Cytological evidences for genomic exchange and rearrangement were found, such as “8” and “cross” configurations at prophase, chain and ring multivalents at metaphase I, as well as various abnormal chromosome structure including chromosome bridges, lagging, genomic separation, micronuclei etc, which probably resulted in unequivalent distribution of genetic germplasm. Such an extensive genomic exchange and rearrangement led to 93% polyads and some abnormal tetrads. Abnormal microspores in polyads and microspores with unbalance germplasm could not develop into normal male gametophytes, which is responsible for the low fertility of male gametophyte in *Cucumis hytivus*.

Key words: *Cucumis hytivus*; Genome; Exchange and rearrangement; Male gametophyte

Cucumis hytivus Chen & Kirkbride (HHCC, $2n=4x=38$) 是由栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n=14$) 与同属野生种 *C. hystris* Chakr. ($2n=24$) 间杂交后染色体加倍而来的双二倍体新种^[1]。经初步鉴定, 该双二倍体种具有营养丰富、抗根结线虫^[2]、耐低温弱光^[3,4]等普通黄瓜所没有的优良性

状。我们已将其与普通黄瓜进行了回交并得到了异源三倍体^[5]、单体异附加系^[6]等珍贵育种材料, 充分显示了在黄瓜育种中的重要价值。

在远缘杂交中, 外源基因的导入主要是通过染色体组间的交换和重组, 形成新的配子传递给后代^[7,8]。对 *Cucumis hytivus* 染色体组间交换重组及

收稿日期: 2004-07-12, 修回日期: 2004-09-22。

基金项目: 国家高技术研究发展计划专项经费(2002AA241251, 2004AA241120); 国家自然科学基金资助项目(30170644); 教育部《跨世纪优秀人才培养计划》; 教育部科技研究重点项目(01097)资助课题。

作者简介: 郭军洋(1979—), 女, 南京农业大学园艺学院 2002 级硕士研究生。陈劲枫(1959—), 男, 博士, 教授, 南京农业大学博士生导师。发表论文 50 余篇(15 篇被 SCI 收录), 农业部“有突出贡献的中青年专家”, “中国青年科技奖”获得者, 教育部“跨世纪优秀人才培养计划”入选者, 美国康乃尔大学唐氏基金获得者。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: jfchen@njau.edu.cn)。

其对雄配子育性的影响进行细胞学的研究不但可以找到该物种染色体组间交换重组的细胞学证据,而且还可以探明这种交换重组影响雄配子发育的细胞学机制,为更好地利用新种转移外源有用基因提供有价值的细胞学信息。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本实验所用材料 *Cucumis hytivus* 最初是由 Chen 和 Kikbride 于 2000 年^[1]首次合成的。后来通过自交,我们又得到了其自交后代植株。本实验所用花蕾材料取自南京农业大学试验地自交 2 代植株。

1.2 实验方法

1.2.1 减数分裂观察 取 2.0~4.0 mm 长的花蕾,用改良的卡诺液(乙醇:冰醋酸:三氯甲烷=5:3:2)固定 24 h,然后转入 70% 的酒精并保存于 4℃ 冰箱中备用。制片前先用 1 mol/L 盐酸在 60℃ 水浴下解离 10 min 左右,再用改良的卡宝(carbol fuchsin)染色液染色制片。对减数分裂中期 I 的染色体构型进行统计分析,每个视野细胞数不少于 30 个,共统计 3 个视野,并在 Olympus (BX51)显微镜上照相。

1.2.2 小孢子发育观察和雄配子育性鉴定 取 5~6 mm 左右的花蕾,采用减数分裂观察中相同的固定和解离方法,用醋酸洋红(aceto-carmine)染色制片。在 Olympus (BX51)显微镜上观察小孢子发育的各个时期,同时统计雄配子育性,以染色较深的作为可育雄配子,以染色较浅或不染色的作为不育的雄配子,每个视野不少于 100 个,共统计 3 个视野。

2 结果与分析

2.1 染色体组间交换重组

在减数分裂各个不同时期,双二倍体都表现出了各种染色体易位的典型结构,如粗线期的环状染色体(图 1:1),终变期的“8”字形、“十”字形以及环状和链状多价体等(图 1:2),约 69% 的花粉母细胞在中期 I 都表现出复杂的染色体构型(图 1:4)。中期 I 的染色体构型主要以二价体为主(14.69),但四

价体(0.93)和六价体(0.62)的比例也较多(表 1)。这些多价体可由同源多倍体和易位杂合体产生,根据新种减数分裂中的各种多价体现象,我们推测该物种发生了非同源染色体间易位。

表 1 双二倍体新种减数分裂中期 I 的染色体构型
Table 1 Chromosome configurations at M I of PMCs in the amphidiploid species

统计细胞数 Cells examined	染色体构型(平均值) Chromosome configuration(average value)					
	I	II	III	IV	VI	VII
95	0.41	14.69	0.06	0.93	0.62	0.07

在减数分裂后期至四分体形成的过程中,我们还观察到了各种由染色体易位导致的异常染色体分离行为,如后期 I 的染色体桥(图 1:5)、后期和末期的染色体滞后(图 1:6、7)、后期 II 的染色体组分离(图 1:8)、四分体时期的微核(图 1:9)等。这些滞后的染色体和不正常分离形成的染色体断片在末期因不能正常到达两极而随机分布于细胞质中,它们牵动细胞质使其发生不均等分裂,最终导致高频率(约 92.61%)的多分孢子(图 1:10)和低频率(约 7.39%)的四分孢子产生。

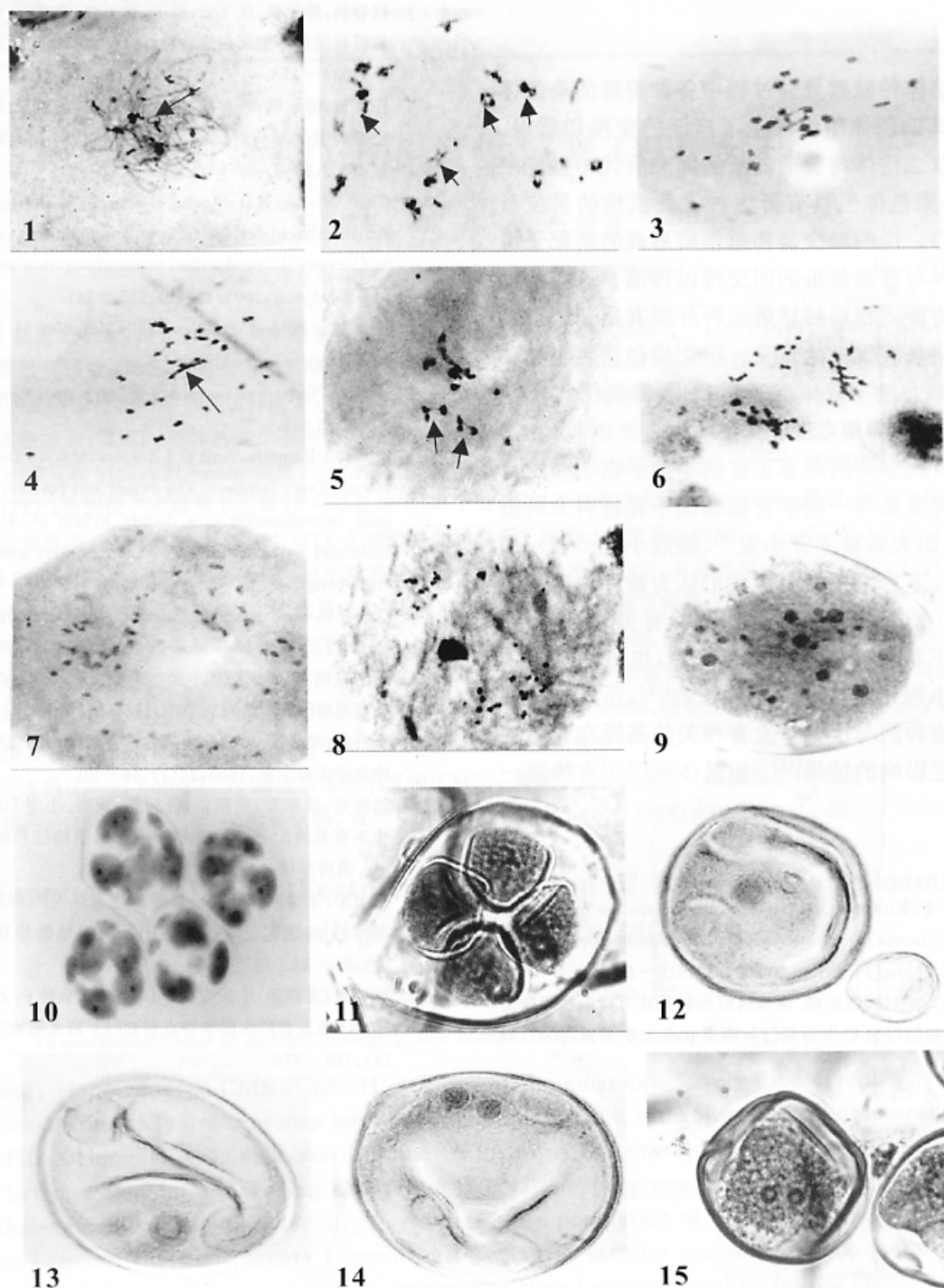
2.2 小孢子发育和雄配子育性鉴定

多分孢子中大量的畸形小孢子最终都成为大小不一的败育花粉,这是新种雄配子育性低的主要原因。除此之外,我们在小孢子发育过程时还观察到部分形态完整的四分体(3.48%)中的小孢子败育(图 1:11)现象,而且从四分体中游离出来的部分形态正常的小孢子在发育的不同时期也有不同程度的败育(图 1:12~15),各个时期的败育率见表 2。从表 2 中可以看出:单核晚期和两核早期的败育率分别约为 53.43% 和 47.73%,是败育的主要时期。这部分形态正常的小孢子的败育很可能是由易位引起的遗传物质后期不均衡分配导致的。部分小孢子可以经过正常的发育最终成为正常的花粉。醋酸洋红染色表明这部分花粉的可染率约 10%,这部分花粉的存在很可能是双二倍体具有部分育性的主要原因。由此可见,多分体中的畸形小孢子和四分体中遗传物质组成不均衡的小孢子是新种败育雄配子的直接来源。

表 2 双二倍体新种小孢子在不同时期的败育率
Table 2 Rate of aborted microspore at different stages in the amphidiploid species

四分体时期 Tetrad stage		单核期 Single-nucleate stage				两核期 Two-celled stage			
		早期 Early stage		晚期 Late stage		早期 Early stage		晚期 Late stage	
		细胞数 CE	败育率(%) AR	细胞数 CE	败育率(%) AR	细胞数 CE	败育率(%) AR	细胞数 CE	败育率(%) AR
305	3.48	309	15	317	53.43	315	47.73	302	26.79

Notes: CE=cells examined, AR=aborted rate.



1. 粗线期(箭头所指为环状结构); 2. 终变期染色体构型(自左至右箭头所指分别为六价体,“十”字形结构,环状四价体和“8”字形结构); 3. 中期 I, 19 I; 4. 中期 I 异常的染色体配对(箭头所指为多价体); 5. 后期 I 染色体桥; 6. 后期 I 染色体组分离; 7. 后期 I 落后的染色体; 8. 后期 I 染色体组分离; 9. 四分体时期微核; 10. 多分孢子; 11. 完整四分体中的败育小孢子; 12. 败育的单核早期花粉; 13. 败育的单核晚期花粉; 14. 败育的两核早期花粉; 15. 败育的两核晚期花粉。1~9, 11~15, $\times 100$; 10, $\times 40$

1. Pachytene (arrow showing ring chromosome synapsis); 2. Chromosome configurations at diakinesis (from left to right, arrows showing hexavalent, “cross” configuration, ring quadrivalent and “8” configuration); 3. 19 I at metaphase I; 4. Abnormal chromosome synapsis (arrow showing multivalent); 5. Chromosome bridges at anaphase I; 6. Lagging chromosomes at anaphase I; 7. Lagging chromosomes at anaphase I; 8. Genomic separation at anaphase I; 9. Micronuclei at tetrad; 10. Multi-microspores; 11. Aborted microspores in complete tetrad; 12. Aborted microspore at single-nucleate early stage; 13. Aborted microspore at single-nucleate late stage; 14. Aborted microspore at two-celled early stage; 15. Aborted microspore at two-celled late stage. 1~9, 11~15, $\times 100$; 10, $\times 40$

图 1 *Cucumis hytivus* 减数分裂及其雄配子发育过程中的异常现象

Fig. 1 Chromosome abnormalities during meiosis and male gametophyte in *Cucumis hytivus*

3 讨论

双二倍体种减数分裂过程中各种特殊的染色体行为证明其染色体组间发生了广泛的交换和重组。我们已在双二倍体与普通黄瓜的回交后代中发现了具有14条染色体但具有野生种优良抗性的易位系(尚未报道)。说明经交换和重组后形成的新配子可以通过新种与普通黄瓜的回交得以传递。这对于以双二倍体为桥梁材料转移野生种外源有用基因改良黄瓜品种将具有重大的意义。但交换和重组也导致了双二倍体大量不育雄配子的产生,降低了雄配子的育性,增加了利用难度。

本文所观察到的形态正常的小孢子在不同发育时期的败育现象与一些学者在雄性不育材料上所报道的类似,如太谷核不育小麦^[9]、矮败小麦^[10]、D₂型细胞质雄性不育小麦^[11]等。我们认为新种的这种败育现象除了跟其自身染色体组变异有关外,可能存在与雄性不育材料相似的败育机制,也可能是由远缘杂种的小孢子核质不协调引起的^[12],还可能是来源于不同物种的与小孢子发育相关的基因在表达的过程中相互影响的结果^[13]。但具体原因还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Chen J F, Kirkbride J. A new synthetic species of *Cucumis* (Cucurbitaceae) from interspecific hybridization and chromosome doubling[J]. *Brittonia*, 2000, **52**: 315-319.
- [2] 陈劲枫, 林茂松, 钱春桃. 甜瓜属野生种及其与黄瓜种间杂交后代抗根结线虫初步研究[J]. 南京农业大学学报, 2001, **24** (1): 21-24.
- [3] 钱春桃, 陈劲枫, 庄飞云, 赵飞, 徐玉波, 李式军. 弱光条件下甜瓜属种间杂种的某些光合特性[J]. 植物生理学通讯, 2002, **38** (4): 336-338.
- [4] 庄飞云, 陈劲枫, 钱春桃, 李式军, 任刚, 王志军. 甜瓜属种间杂交新种及其后代对低温的适应性反应[J]. 南京农业大学学报, 2002, **25**(2): 27-30.
- [5] Chen J F, Luo X D, Staub J E, Qian C T, Zhuang F Y, Ren G. An allotriploid derived from an amphidiploid $\times$ diploid mating in *Cucumis* 1: production, micropropagation and vettification [J]. *Euphytica*, 2003, **131**(2): 235-241.
- [6] Chen J F, Luo X D, Qian C T, Margeret M Jahn. *Cucumis* monosomic alien additional lines morphological, cytological and RAPD marker analysis[J]. *Thero Appl Genet*, 2004, **108**: 1343-1348.
- [7] Silvan A Kamstra, Anja G J Kuipers, Marjo J De Jeu, M S Rammanna, Evert Jacobsen. The extent and position of homoeologous recombination in a distant hybrid of *Alstroemeria*; a molecular cytogenetics assessment of first generation back-cross progenies[J]. *Chromosoma*, 1999, **108**: 52-63.
- [8] Comai L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, **43**: 387-399.
- [9] 陈朱希昭. 太谷核不育小麦小孢子发生和败育过程的电子显微镜观察[J]. 中国农业科学, 1985, **5**: 16-20.
- [10] 巫升鑫, 刘思衡. 矮败小麦雄性败育的细胞形态学观察[J]. 福建农业大学学报, 1996, **25**(1): 16-20.
- [11] 刘春光, 吴郁文, 张翠兰, 任树新, 张炎. 小麦 D₂ 型细胞质雄性不育系雄配子体发育的细胞形态学特征和同工酶的研究[J]. 遗传学报, 1995, **22**(3): 199-205.
- [12] 元增军, 王洪刚, 李晴祺. 普通小麦与黑麦的杂交亲和性及其杂种 F₁ 的雄配子发生特点[J]. 武汉植物学研究, 1998, **16** (1): 85-88.
- [13] 李兴锋, 王洪刚. 小黑麦 $\times$ 小滨麦三属杂种 F₁ 小孢子发生和雄配子体发育的细胞学特点研究[J]. 西北植物学报, 2002, **22** (4): 766-770.