

郭和蓉,朱娇,杜国辉,等.墨兰×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生及其细胞学机制[J].华中农业大学学报,2021,40(3):152-158.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.03.017

墨兰×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生及其细胞学机制

郭和蓉¹,朱娇^{1,2},杜国辉¹,黄紫婷¹,谢利¹,魏倩¹,张志胜¹

1.华南农业大学林学与风景园林学院/广东省植物分子育种重点实验室,广州 510642;

2.山东省农业科学院休闲农业研究所,济南 250100

摘要 为更有效开展国兰多倍体育种,采用显微观测技术对‘小香墨兰’、兔耳兰及其 31 份杂交后代 2n 雄配子发生及其细胞学机制进行了研究。结果显示:‘小香墨兰’×兔耳兰 30 份杂交后代 2n 雄配子发生率变幅为 0%~9.36%,3 a 平均发生率为 2.28%,显著高于母本(0.19%)和父本(0.22%),获得 2n 雄配子平均发生率大于 3%的资源 8 份。不同杂交后代 2n 雄配子发生率差异显著,多数后代不同年份间 2n 雄配子发生率差异显著,说明杂种后代雄配子发生既受遗传控制也受环境条件影响。杂种 2n 雄配子通过二分体和三分体方式产生,但不同后代主要发生途径不完全相同。二分体方式形成 2n 雄配子主要是由于小孢子母细胞减数分裂不同步导致一些小孢子母细胞减数分裂Ⅰ不分裂、减数分裂Ⅱ正常分裂所致,而三分体方式形成则是由于减数分裂Ⅱ纺锤体异常定向形成三极纺锤体所致。

关键词 国兰;多倍体育种;种间杂交;雄配子;远缘杂交;细胞学机制;有性多倍化

中图分类号 S 682.31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)03-0152-07

未减数配子是由于大、小孢子形成和发育过程中出现异常而形成具有孢子体染色体数目(2n)的配子,也被称为 2n 配子^[1]。自然界植物 2n 配子发生十分普遍^[1-3],2n 配子参与下的有性多倍化是植物多倍体形成的主要机制^[3-4],2n 配子途径也是人工创造多倍体资源和选育多倍体品种的有效途径^[4-6]。因此,研究 2n 配子发生及其细胞学机制,对深入研究植物多倍体进化机制,创建高效发生 2n 配子资源,推动多倍体育种均具有重要意义。

兰花 2n 配子发生已有一些研究报道,兰属兰花(*Cymbidium*)^[6]、蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)^[7-8]、石斛兰(*Dendrobium*)^[9-10]等均可产生 2n 配子,杂种 2n 配子发生率比非杂种的高^[6]。部分学者对百合(*Lilium auratum*)^[13]、香石竹(*Dianthus caryophyllus*)^[14]、燕麦(*Avena ventricosa*)^[15]和蝴蝶兰^[16]等 2n 配子形成的细胞学机制^[11-12]进行了探讨,但在兰属兰花上缺乏系统的研究报道。

多倍体育种是兰花育种的重要方法,目前商业化的蝴蝶兰、石斛兰、大花蕙兰(*Cymbidium hybri-*

dum)品种多数为多倍体^[17-19],但墨兰(*C. sinense*)等国兰商业化的品种均是二倍体。本研究以墨兰、兔耳兰(*C. lancifolium*)及其杂种后代为材料,探讨兰属兰花 2n 雄配子发生及其细胞学机制,创建高频发生 2n 雄配子资源,旨在为国兰多倍体育种和兰花多倍体进化研究积累材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为‘小香墨兰’(*C. sinense* ‘Xiaoxiang’)、兔耳兰及其 31 份杂交后代,杂交后代中的 30 份材料用于 2n 雄配子发生途径观察,1 份材料用于小孢子母细胞减数分裂过程观察。上述材料种植于华南农业大学增城基地兰花大棚中,常规栽培管理。植株开花后,取不同发育时期的花朵或花粉块固定。

1.2 细胞学观察

取‘小香墨兰’、兔耳兰及其 30 份杂交后代成熟花粉期的花粉块和编号 45-1 后代不同发育时期花朵或花粉块于卡诺固定液($V_{95\% \text{乙醇}} : V_{\text{冰乙酸}} = 3 : 1$)

收稿日期:2021-03-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31401899);广州市农业局项目(20101396);广东省清远市科技计划项目(2019A012;DZXQY033)

郭和蓉, E-mail: guoherong@scau.edu.cn

通信作者:张志胜, E-mail: zszhang@scau.edu.cn

中固定 24 h, 然后转移至 70% 乙醇于 4℃ 冰箱保存备用。

参考周建金等^[20]的方法制片, 制片后在 Olympus-I×71 倒置显微镜和 ZEISS 光学显微镜下观察, 每片随机选择 10 个视野拍照。每份材料观察 3 个花粉块, 观察小孢子母细胞减数分裂时, 在 40× 或 100× 下拍照, 以 100 个小孢子母细胞为 1 次重复, 重复 3 次。

1.3 统计分析

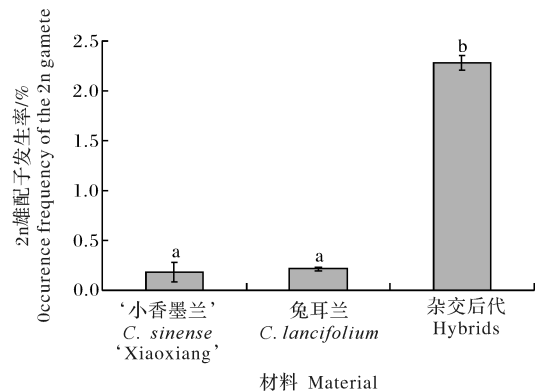
二分体发生率 = (二分体个数/观察总孢子数) × 100%; 三分体发生率 = (三分体个数/观察总孢子数) × 100%; 二分体途径对未减数雄配子发生的贡献率 = (二分体途径产生的未减数雄配子数/未减数雄配子总数) × 100%; 三分体途径对未减数雄配子发生的贡献率 = (三分体途径产生的未减数雄配子数/未减数雄配子总数) × 100%; 未减数雄配子发生率 = $(N_{2D} + N_{Tr})/T \times 100\%$, 其中 D 代表二分体, Tr 代表三分体, T 代表总花粉数。

数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 以邓肯氏新复极差法(Duncan's)测验在 $\alpha=0.05$ 水平上的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 ‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生试验结果(图1)显示, 30 份‘小香墨兰’×兔耳

兰杂交后代 2n 雄配子发生率 3 a 平均为 2.28%, 显著高于‘小香墨兰’(0.19%) 和兔耳兰(0.22%), 表明种间杂交显著提高了杂种后代 2n 雄配子发生率。不同‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代的 2n 雄配子发生率不同(表 1), 平均值变幅为 0.87%~6.07%。后代 45-60 的 2n 雄配子发生率最高, 为 6.07%; 45-29 的发生率最低, 为 0.87%。年份对大多数杂种后代 2n 雄配子发生率影响显著, 但对 45-113、45-116、45-105 和 45-29 等杂交后代影响不显著。



不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。Means in the same column with different small letters indicated significant difference at $\alpha=0.05$ level.

图1 ‘小香墨兰’、兔耳兰及其杂交后代 2n 雄配子平均发生率

Fig.1 Average incidence of 2n male gamete in *C. sinense* ‘Xiaoxiang’ and *C. lancifolium* and their hybrids

表1 不同年份‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生率

Table 1 The occurrence frequency of unreduced male gamete in hybrids of <i>C. sinense</i> ‘Xiaoxiang’ × <i>C. lancifolium</i>				%
材料 Material	2014—2016 年 2n 雄配子发生率			平均发生率
	The occurrence frequency of 2n male gamete during 2014—2016			Average occurrence frequency of the 2n male gamete
	2014	2015	2016	
小香墨兰 <i>C. sinense</i> ‘Xiaoxiang’	0.33±0.12a	0.00a	0.23±0.14a	0.19±0.10
兔耳兰 <i>C. lancifolium</i>	0.25±0.15a	0.20±0.04a	0.23±0.14a	0.22±0.01
45-60	9.36±1.61b	2.78±0.62a	—	6.07±2.69
45-6	9.12±1.92c	4.82±0.34b	0.53±0.32a	4.82±2.48
45-17	—	5.49±0.73b	2.36±0.27a	3.92±1.28
45-113	4.26±0.45a	3.43±0.75a	—	3.85±0.34
45-51	4.57±0.43b	3.79±0.71b	2.63±0.19a	3.66±0.56
45-41	8.69±0.96b	1.11±0.33a	0.53±0.15a	3.44±2.63
45-15	1.34±0.27a	5.70±0.23b	2.10±0.21a	3.05±1.34
45-109	8.39±0.89c	0.62±0.17b	0.09±0.09a	3.03±2.68
45-2	0.94±0.25a	5.03±1.17b	—	2.98±1.67
45-59	5.09±0.81c	—	0.34±0.24a	2.71±1.94
45-32	4.59±0.54b	1.45±0.54a	1.98±0.34a	2.67±0.97
45-19	0.77±0.18a	6.24±1.01b	0.65±0.33a	2.55±1.84
45-98	2.37±0.30b	4.49±0.33c	0.73±0.18a	2.53±1.09

续表 1 Continued Table 1

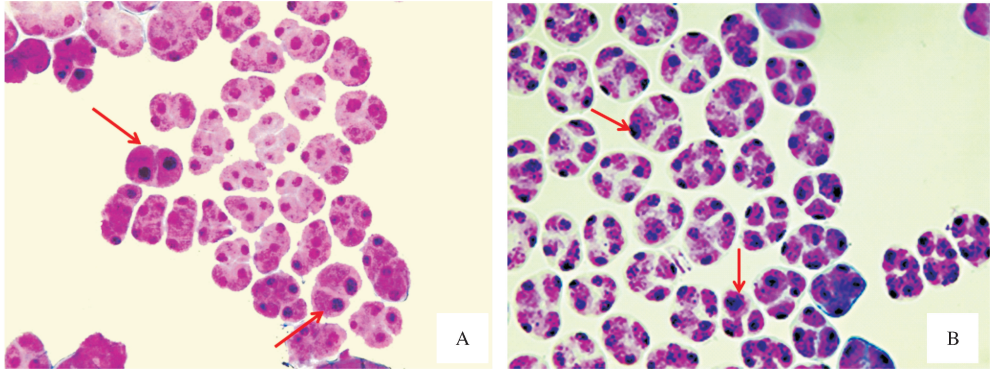
材料 Material	2014—2016 年 2n 雄配子发生率			平均发生率
	The occurrence frequency of 2n male gamete during 2014—2016			Average occurrence frequency of the 2n male gamete
	2014	2015	2016	
45-64	3.90±0.53b	0.37±0.37a	3.27±0.44b	2.51±1.09
45-39	1.63±0.18a	3.13±0.46b	—	2.38±0.61
45-92	4.67±0.57c	1.33±0.24b	0.32±0.25a	2.11±1.31
45-105	1.81±0.25a	1.94±0.17a	1.75±0.65a	1.83±0.06
45-52	4.26±0.55c	0.00±0.00a	1.04±0.07b	1.77±1.28
45-116	1.68±0.30a	1.73±0.26a	—	1.71±0.02
45-18	2.96±0.28c	0.25±0.13a	1.28±0.20b	1.50±0.79
45-50	0.54±0.13a	3.58±0.85b	0.31±0.14a	1.48±1.05
45-95	0.71±0.15a	2.46±0.34b	1.16±0.38a	1.44±0.52
45-85	1.62±0.14b	1.23±0.09a	—	1.43±0.16
45-46	2.95±0.61c	0.90±0.43b	0.30±0.12a	1.38±0.80
45-67	2.32±0.29b	1.62±0.32b	0.16±0.04a	1.37±0.64
45-5	1.17±0.30ab	2.00±0.17b	0.56±0.13a	1.24±0.42
45-37	2.71±0.47b	0.27±0.06a	0.31±0.05a	1.10±0.81
45-66	1.48±0.26b	—	0.68±0.21a	1.08±0.33
45-40	0.54±0.13a	0.31±0.15a	1.99±0.39b	0.95±0.53
45-29	—	0.75±0.32a	0.98±0.55a	0.87±0.09

注:同行不同字母表示差异显著, $P<0.05$;“—”表示当年未开花。Note:Means in the same column with different small letters indicated significant difference at 0.05 level;“—” indicated no flower.

2.2 ‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生途径

对‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生途径进行了鉴定。结果(图 2)显示,在‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代的花粉块中,除了正常的四分

体外,还有一定比例的二分体(图 2A)和三分体(图 2B),二分体中有 2 个 2n 雄配子,三分体包含了 1 个 2n 雄配子和 2 个 n 配子。说明‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生主要为二分体和三分体途径。



A:45-51 成熟花粉,箭头示二分体;B:45-98 成熟花粉,箭头示三分体。A: Maturepollen of 45-51, dyads (arrow); B: Mature pollen of 45-98, triads (arrow).

图 2 ‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代的 2n 配子发生途径

Fig.2 Occurrence pathway of 2n male gamete in hybrids of *C. sinense* ‘Xiaoxiang’×*C. lancifolium*

结果显示,所有杂交后代 2n 雄配子发生均通过二分体和三分体途径,但不同后代 2n 雄配子发生的主要途径不完全相同(图 3)。二分体途径对 45-60、45-51、45-41、45-109 和 45-2 等后代 2n 雄配子形成的贡献率分别为 63.98%、64.41%、78.91%、72.23%和 79.24%,因此,这些后代 2n 配子形成主要通过二分体途径。三分体途径对 45-39、45-18、45-85、45-66和 45-5 等后代 2n 雄配子形成的贡献率分别

为 70.37%、77.39%、85.20%、85.33%和 88.04%,其 2n 雄配子形成主要通过三分体途径。

2.3 ‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 2n 雄配子发生的细胞学机制

‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代 45-1 的 2n 雄配子发生率为 4.94%。对其小孢子母细胞减数分裂过程进行观察(图 4),结果显示:45-1 小孢子母细胞减数分裂存在不同步现象,在中期 I,5.79%小孢子母

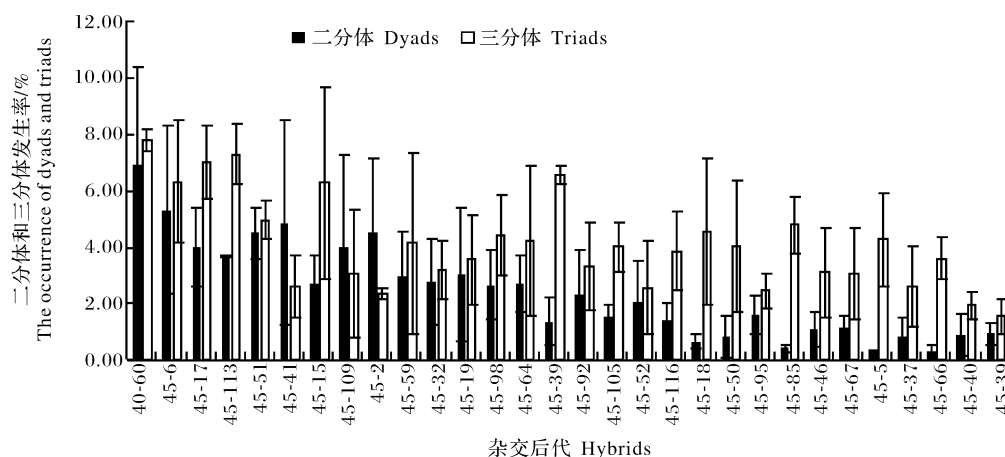
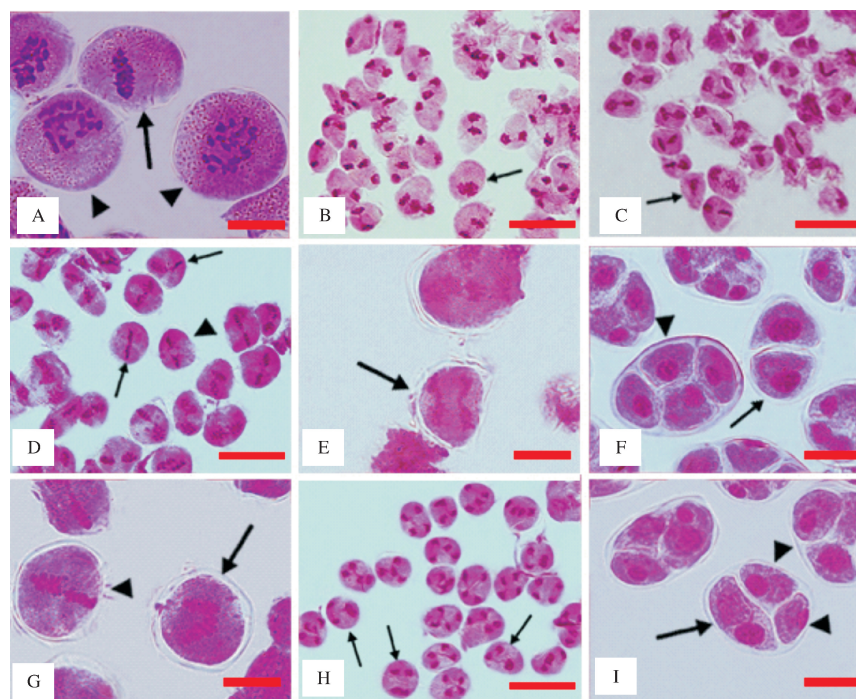


图3 ‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代二分体和三分体的平均发生率

Fig.3 Average incidence of dyads and triads in hybrids of *C. sinense* ‘Xiaoxiang’ × *C. lancifolium*

A: 中期 I, 示处于中期 I (箭头) 和终变期小孢子母细胞 (箭头), Bar=10 μm ; B: 后期 I, 示未进行第一次分裂的小孢子母细胞, Bar=20 μm ; C: 中期 II, 示未分裂的小孢子母细胞染色体排列在赤道板上 (箭头), Bar=20 μm ; D: 中期 II, 示融合纺锤体 (长箭)、垂直纺锤体 (短箭) 和平行纺锤体 (箭头), Bar=20 μm ; E: 后期 II, 示融合纺锤体引起两组染色体被牵引至同一子细胞中 (箭头), Bar=10 μm ; F: 成熟花粉期, 示二分体 (箭头) 和四分体 (箭头), Bar=10 μm ; G: 中期 II, 示三极纺锤体 (箭头) 和平行纺锤体, Bar=10 μm ; H: 后期 II, 示 2 组染色体被牵引至同一子细胞中 (箭头), Bar=20 μm ; I: 成熟花粉期, 示三分体, 包含 1 个 2n 花粉 (箭头) 和 2 个 n 配子 (箭头), Bar=10 μm .

图4 ‘小香墨兰’×兔耳兰杂交后代‘45-1’2n 雄配子发生的细胞学机制

Fig.4 Cytological mechanism of unreduced male gamete of the hybrid ‘45-1’ of *C. sinense* ‘Xiaoxiang’ × *C. lancifolium*

细胞仍处在终变期(图4A),这些小孢子母细胞不进行减数分裂第一次分裂(图4B),而直接进行减数分裂第二次分裂(图4C),形成二分体,最终发育成2个2n雄配子(图4F)。

在减数分裂中期Ⅱ,1.63%二分体形成融合纺锤体(图4D),导致后期Ⅱ(图4E)两套染色体进入同一个子细胞形成2个2n雄配子(图4F);4.63%二分体形成三极纺锤体(图4G),导致在减数分裂第二次分裂后期,2组染色体进入同一子细胞中,另2组染色体分别进入不同子细胞(图4H),形成三分体(图4I),产生1个2n雄配子和2个n雄配子。

3 讨论

高效发生2n配子资源的创建有助于利用2n配子途径选育多倍体植物新品种。已有研究表明,不同种植物、同种植物不同个体2n配子发生率差异明显^[2-3],远缘杂交是获得高效发生2n配子资源的有效手段^[6,21]。本研究中国兰和兔耳兰种间杂交后代2n雄配子发生率显著高于亲本,45-60的2n雄配子发生率是其父本的30倍、母本的32倍,45-51、45-15等后代2n雄配子平均发生率大于3%,每年发生率均在1%以上,这些资源的获得为国兰多倍体育种提供了亲本材料。

兰花小孢子形成过程中,减数分裂前加倍,减数分裂Ⅰ、Ⅱ后期失调,不进行减数分裂Ⅰ或Ⅱ以及减数分裂Ⅱ纺锤体的异常是2n雄配子和多倍体配子发生的主要原因^[22]。本研究发现,墨兰和兔耳兰种间杂种2n雄配子均通过二分体和三分体方式产生,二分体是由于小孢子母细胞减数分裂不同步,导致减数分裂Ⅰ不分裂,而减数分裂Ⅱ正常分裂或由于减数分裂Ⅱ细胞纺锤体异常定向,形成融合纺锤体所致;三分体的形成都是由于减数分裂Ⅱ纺锤体异常定向形成三极纺锤体所致。这一结果与前人在其他品种兰花上的研究结果^[16,22]不完全一致,朱娇等^[16]对蝴蝶兰未减数配子发生机制的研究结果表明,二分体的形成是由于小孢子母细胞减数分裂不同步导致的,没有发现因减数分裂Ⅱ纺锤体异常定向导致二分体发生的现象,这可能是材料不同所致。进一步的研究表明,不同后代2n雄配子发生途径不完全相同,一些后代主要通过二分体方式产生,另一些后代则主要通过三分体途径发生,说明2n雄配子

发生受多基因控制,鉴定、克隆和解析这些基因的功能将成为今后研究的主要方向之一。

2n配子发生主要受遗传因素控制^[12,23],但外界环境也会在很大程度上影响其发生频率^[14,24-26],如高温^[27-28]和低温^[29-30]是具有重要影响的环境因素。Zhou等^[14]研究表明,香石竹同一品种在3月、6月、9月和12月的2n雄配子发生率差异明显,月份对不同品种2n雄配子发生影响也不同。本研究对30份杂交后代连续3a的观测结果也表明,墨兰和兔耳兰多数杂交后代不同年份间的2n配子发生率差异显著,且2n配子发生率高的后代年份间差异大,其原因有待进一步研究。

参考文献 References

- [1] KREINER J M, KRON P, HUSBAND B C. Evolutionary dynamics of unreduced gametes[J]. Trends in genetics, 2017, 33(9): 583-593.
- [2] RAMSEY J. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae) [J]. Heredity, 2007, 98(3): 143-150.
- [3] KREINER J M, KRON P, HUSBAND B C. Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size[J]. New phytologist, 2017, 214(2): 879-889.
- [4] ROSELLINI D, FERRADINI N, ALLEGRIUCCI S, et al. Sexual polyploidization in *Medicago sativa* L.: impact on the phenotype, gene transcription, and genome methylation [J]. G3: Genes/genomes/genetics, 2016, 6(4): 925-938.
- [5] LIESEBACH H, ULRICH K, EWALD D. FDR and SDR processes in meiosis and diploid gamete formation in poplars (*Populus* L.) detected by centromere-associated microsatellite markers[J/OL]. Tree genetics & genomes, 2015, 11: 801 [2021-03-22]. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0801-6>.
- [6] ZENG R Z, ZHU J, XU S Y, et al. Unreduced male gamete formation in *Cymbidium* and its use for developing sexual polyploid cultivars[J/OL]. Frontier in plant science, 2020, 11: 00558 [2021-03-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32499802/>. <http://doi.org/10.3389/fpls.2020.00558>.
- [7] HSU S C, CHENG T C, BOLANOS-VILLEGAS P, et al. Pollen meiotic behavior in relation to *Phalaenopsis* breeding[J]. International orchid symposium, 2010, 878: 139-143.
- [8] HSU S T, WONGPRICHACHAN P, CHOU Y M, et al. Analyses of sporads types at different bud development stages of *Phalaenopsis* orchids[J]. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 2014, 59(1): 39-44.
- [9] MCCONNELL J, KAMEMOTO H. Morphology and meiotic behavior of three *Dendrobium* amphidiploids and their diploid

- counterparts[J]. Hortscience, 1993, 28(9): 935-937.
- [10] HEE K H, LOH C S, YEOH H H. Early *in vitro* flowering and seed production in culture in *Dendrobium Chao praya smile* (Orchidaceae)[J]. Plant cell reports, 2007, 26(12): 2055-2062.
- [11] BROWNFIELD L, KOHLER C. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects[J]. Journal of experimental botany, 2011, 62(5): 1659-1668.
- [12] STORME N D, GAALEN D. Sexual polyploidization in plants: cytological mechanisms and molecular regulation[J]. New phytologist, 2013, 198(3): 670-684.
- [13] CHUNG M Y, CHUUNG J D, RAMANNA M, et al. Production of polyploids and unreduced gametes in *Lilium auratum* × *L. henryi* hybrid[J]. International journal of biological sciences, 2013, 9(7): 693-701.
- [14] ZHOU X H, MO X J, GUI M, et al. Cytological, molecular mechanisms and temperature stress regulating production of diploid male gametes in *Dianthus caryophyllus* L. [J]. Plant physiology and biochemistry, 2015, 97: 255-263.
- [15] NIKOLOUDAKIS N, AISSAT A, KATSIOTIS A. Screening *A. ventricosa* populations for 2n gametes[J]. Euphytica, 2018, 214(2): 1-9.
- [16] 朱娇, 刘译阳, 曾瑞珍, 等. 不同倍性蝴蝶兰未减数雄配子的发生及其细胞学机理初探[J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2132-2138. ZHU J, LIU Y Y, ZENG R Z, et al. Preliminary study on formation and cytological mechanism of unreduced male gametes in different ploidy phalaenopsis[J]. Horticulturae sinica, 2014, 41(10): 2132-2138 (in Chinese with English abstract).
- [17] 朱根发, 吕复兵, 王碧青, 等. 大花蕙兰品种的染色体数目分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 417-421. ZHU G F, LÜ F B, WANG B Q, et al. Chromosome analysis of hybrid *Cymbidium* [J]. Acta horticulturae sinica, 2006, 33(2): 417-421 (in Chinese with English abstract).
- [18] 廖道龙, 谢利, 曾瑞珍, 等. 石斛属植物倍性与形态学性状的相关性研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(10): 2023-2029. LIAO D L, XIE L, ZENG R Z, et al. Relationship between chromosome ploidy and morphology characters in *dendrobium* [J]. Acta botanica boreali-occidentalia sinica, 2012, 32(10): 2023-2029 (in Chinese with English abstract).
- [19] 谢利, 刘芳, 易懋升, 等. 蝴蝶兰倍性与叶部和花部性状的相关性[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(5): 82-87. XIE L, LIU F, YI M S, et al. A correlation between ploidy levels and characters of leaf and flower in *Phalaenopsis* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2014, 35(5): 82-87 (in Chinese with English abstract).
- [20] 周建金, 曾瑞珍, 刘芳, 等. 不同倍性蝴蝶兰杂交后代的染色体倍性研究[J]. 园艺学报, 2009(10): 1491-1497. ZHOU J J, ZENG R Z, LIU F, et al. Investigation on chromosome ploidy of the hybrids of *Phalaenopsis* polyploids[J]. Acta horticulturae sinica, 2009(10): 1491-1497 (in Chinese with English abstract).
- [21] RAMSEY J, SCHEMSKE D W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants[J]. Annual review of ecology and systematics, 1998, 29: 467-501.
- [22] TEOH S B. Polyploid spore formation in diploid orchid species [J]. Genetica, 1984, 63(1): 53-59.
- [23] RAMANNA M S, KUIPERS A, JACOBSEN E. Occurrence of numerically unreduced(2n) gametes in *Alstroemeria* interspecific hybrids and their significance for sexual polyploidisation [J]. Euphytica, 2003, 133(1): 95-106.
- [24] GRIESBACH R J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement[J]. Heredity, 1985, 76(1): 74-75.
- [25] MIRZAGHADERI G, HÖRANDL E. The evolution of meiotic sex and its alternatives[J/OL]. Proceedings of the Royal Society B: biological sciences, 2016, 283: 20161221 [2021-03-22]. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1221>.
- [26] YOUNIS A, HWANG Y J, LIM K B. Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding[J]. Plant Cell Rep, 2014, 33: 215-223.
- [27] PÉCRIX Y, RALLO G, FOLZER H, et al. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. [J]. Journal of experimental botany, 2011, 62(10): 3587-3597.
- [28] CRESPEL L, BRAS C L, RELION D, et al. Effect of high temperature on the production of 2n pollen grains in diploid roses and obtaining tetraploids via unilateral polyploidization [J]. Plant breeding, 2015, 134: 356-364.
- [29] MASON A S, NELSON M N, YAN G, et al. Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures[J/OL]. BMC plant biology, 2011, 11: 103 [2021-03-22]. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-103>.
- [30] STORME N D, COPENHAVER G P, GEELEN D. Production of diploid male gametes in *Arabidopsis* by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays[J]. Plant Physiol, 2012, 160: 1808-1826.

2n male gametogenesis and its cytological mechanism in hybrids of *Cymbidium sinense* × *C. lancifolium*

GUO Herong¹, ZHU Jiao^{1,2}, DU Guohui¹, HUANG Ziting¹, XIE Li¹, WEI Qian¹, ZHANG Zhisheng¹

1.College of Forestry and Landscape Architecture/Guangdong Provincial
Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China;

2.Institute of Leisure Agriculture, Shandong Academy of Agricultural Sciences,
Ji'nan 250100, China

Abstract Microscopic observation was used to study 2n male gametogenesis and its cytological mechanism in *Cymbidium sinense* ‘Xiaoxiang’, *C. lancifolium* and its thirty-one hybrids to more effectively develop the breeding of polyploids in Chinese *Cymbidium*. The results showed the occurrence frequency of unreduced male gamete of thirty hybrids ranged from 0% to 9.36%. The average occurrence frequency of consecutive three years was 2.28%, significantly higher than that of both male parent (0.22%) and female parent (0.19%). Eight hybrids with average occurrence frequency of more than 3% were obtained. There were significant differences in the average occurrence frequency of 2n male gamete among hybrids. The average occurrence frequency of 2n male gamete in most hybrids was significantly different among different years, indicating that the occurrence frequency of 2n male gamete was not only controlled by genetic factor but also significantly affected by environmental condition. The unreduced male gamete in the interspecific hybrids was produced with both dyad and triad. However, the main way of producing unreduced male gamete was not completely the same in hybrids. The formation of dyads was mainly due to the asynchronous meiotic division of microspore mother cells, resulting in some microspore mother cells not dividing in meiosis I and normal division in meiosis II, while the formation of triad was caused by the abnormal orientation of the meiotic II spindle to form a tripolar spindle in the interspecific hybrids.

Keywords Chinese *Cymbidium*; polyploid breeding; interspecific hybridization; male gamete; distant hybridization; cytological mechanism; sexual polyploidy

(责任编辑:张志钰)