

紫果西番莲染色体制片方法比较及其核型分析

魏秀清^{1,2,3}, 陈晓静^{1,2}

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学园艺植物遗传育种研究所, 福建 福州 350002; 3. 福建省农业科学院果树研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 比较了不同预处理方法、解离方法、酶解时间和制片方法对紫果西番莲细胞中期分裂相、染色体收缩程度和分散度的影响。结果表明: 8-羟基喹啉室温下处理根尖 2.5 h, 混合酶液 (2% 纤维素酶和 0.5% 果胶酶) 37 °C 酶解 70 min, 涂片法制片的染色体分散性好, 背景干净, 着丝点比较清晰, 随体明显, 效果最佳; 紫果西番莲的核型公式是 $2n=2x=18=14m\ (2sat)+4sm$, 属于 2A 型, 第 4 对染色体上带有随体。

关键词: 紫果西番莲; 染色体制片; 核型

中图分类号: Q 942

文献标识码: A

Comparison of chromosome spreading methods and karyotype of *Passiflora edulis* Sims

WEI Xiū qīng^{1,2,3}, CHEN Xiāo jīng^{1,2}

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;
2. Institute of Genetics and Breeding in Horticultural Plants, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agriculture Science, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Effects of different pretreatments methods, dissociation, enzymolysis time and slide making on the metaphase cells, chromosome contraction and dispersion degree of *P. edulis* Sims were compared. The best metaphase cells were prepared after the pretreatment with 8-Hydroxyquinoline for 2.5 h at room temperature and the subsequent enzyme digestion by a mixture containing 2% cellulase and 0.5% pectinase for 70 min at 37 °C. The chromosomes dispersed well with clean background and centromeric dots and satellite were clear. The karyotype formula of *P. edulis* Sims was $2n=2x=18=14m\ (2sat)+4sm$, belonging to 2A type, and a pair of satellites were located on the forth pair chromosomes.

Key words: *P. edulis* Sims; Chromosome technique; Karyotype

西番莲为西番莲科 (Passifloraceae) 西番莲属 (*Passiflora*) 的多年生常绿攀缘性藤本果树。在各品种中, 紫果西番莲 (*P. edulis* Sims.) 和变形黄果西番莲 (*P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) 最具栽培价值。目前西番莲研究多集中于引种栽培、果实加工、进化关系等方面, 遗传背景研究很少。作为遗传研究的一项重要手段, 核型分析通过明确染色体的数目、大小、形态来了解一个物种遗传变异的细胞遗传学的特征, 为深入研究物种提供基础, 其最直接方法就是根尖制片。有关西番莲的根尖细胞制片方法和染色体研究, 国内外的报道不多^[1-3]。在以往西番莲的染色体研究中, 研究者们都只选用了 1 种预处理剂^[2-3], 多数染色体

制片分辨率不高, 随体难以确定。本试验对不同的预处理方法、解离方法、酶解时间和制片方法作了比较, 寻找紫果西番莲根尖细胞染色体制片的最佳方法, 通过高质量的染色体制片观察, 进行紫果西番莲的核型分析, 确定随体染色体, 以充实紫果西番莲的遗传背景资料, 为西番莲的细胞遗传学研究、染色体工程和分子育种提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为紫果西番莲果实, 由福建闽清丰达生态农业大观园提供。

1.2 方法

1.2.1 预处理 取表面消毒的种子于培养皿上催芽(25°C), 待根长至 $0.5\sim 1.0\text{ cm}$ 时截取根尖, 室温下将根尖分别浸泡于 $0.002\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的8-羟基喹啉、饱和对二氯苯、 4°C 低温蒸馏水、 0.05% 秋水仙素和饱和 α -溴萘溶液中, 处理时间分别为 2.5 h 、 3 h 、 24 h 、 2 h 、 3 h , 其中饱和 α -溴萘采用避光处理。

1.2.2 固定 从预处理液中取出根尖, 蒸馏水漂洗 $2\sim 3$ 次后置于卡诺固定液(乙醇:冰醋酸=3:1)中固定 10 min , 滤纸吸干后移入 70% 乙醇中 4°C 保存备用。

1.2.3 解离 采用两种解离方式。(1) 酸解: 将固定过的根尖用蒸馏水漂洗 $2\sim 3$ 次, 滤纸吸干后投入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中 60°C 解离 10 min , 然后用蒸馏水多次漂洗, 切取根尖顶部 $1\sim 2\text{ mm}$ 备用;(2) 酶解: 将固定过的根尖用蒸馏水多次漂洗, 切取根尖顶部 $1\sim 2\text{ mm}$ 置于 $0.075\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液中 37°C 低渗 30 min , 后将根尖置于混合酶液中(含 2% 纤维素酶和 0.5% 果胶酶) 37°C 分别酶解 30 min 、 40 min 、 50 min 、 60 min 、 70 min , 再将根尖置于 $0.075\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液中

37°C 低渗 30 min , 去除 KCl 溶液。

1.2.4 染色制片观察 压片: 将经酸解的根尖用镊子移至载玻片上, 用另一载玻片呈十字盖在根尖上, 轻压后将两载玻片分开, 铁矾苏木精染色 3 min 后压片; 涂片: 吸取根尖酶解液并移至载玻片中央, 铁矾苏木精染色 3 min 后涂片。

选择染色体清晰的中期细胞进行显微摄影及分析。核型分析参照李懋学等^[4]的核型分析标准进行, 染色体类型按照Levan等^[5]的分类系统, 核型类型参照Stebbins^[6]的标准。

2 结果与分析

2.1 不同预处理对根尖细胞有丝分裂制片效果的影响

在染色体制片中, 为获得更多的中期分裂相, 常用秋水仙素、8-羟基喹啉、对二氯苯、 α -溴萘、放线菌酮等化学试剂进行预处理, 但不同的预处理对改变细胞质粘度, 抑制和破坏纺锤丝的形成, 影响染色体的收缩与分散的程度不同。由表1、图1可知, 各预处理方法中 $0.002\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉室温下预处理 2.5 h 的效果最好, 染色体长度适宜, 且分散性好, 着丝点清晰, 随体明显。

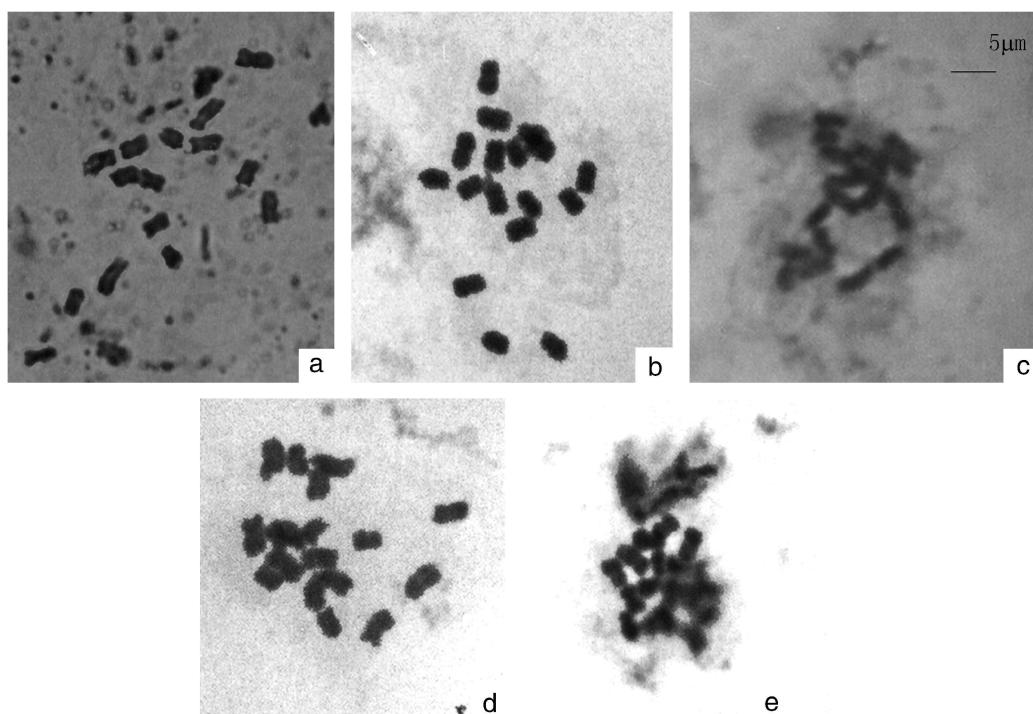


图1 不同预处理后紫果西番莲染色体形态

Fig 1 Conformation of *P. edulis* Sims chromosomes by different pretreatments

注: a 为 8-羟基喹啉处理; b 为对二氯苯处理; c 为低温处理; d 为秋水仙素处理(0.05%); e 为饱和 α -溴萘处理

表 1 不同预处理方法对有丝分裂制片效果的影响
Table 1 Effect of different pretreatment methods on mitosis

预处理	时间 (h)	温度	结果
0.002 mol·L ⁻¹ 8-羟基喹啉	2.5	室温	染色体长度适宜, 分散性好, 着丝点清晰, 随体明显。
饱和对二氯苯	3	室温	染色体形态较好, 分散性好, 很少粘连, 但缢痕普遍不明显。
低温	24	4℃	染色体收缩不完全, 细长粘连, 形态不清晰, 难以见到着丝点。
0.05% 秋水仙素	2	室温	染色体形态较好, 缢痕较明显, 但容易粘连, 分散性较差。
饱和α-溴萘	3	室温 避光	染色体分散性很差, 常粘成团, 但仔细分辨可发现形态较好, 缢痕也较清晰。

2.2 不同酶解时间对细胞中期分裂相的影响

由图 2 看出, 酶解时间直接影响制片效果。经酶解 30 min, 细胞破裂后还可见大量细胞质存在于染色体周围, 染色体与背景对比度不够, 反差较小, 少量染色体重叠、堆积; 酶解 70 min, 分裂相背景干净, 染色体分散, 形态清晰。表 2 显示, 酶解时间越长, 背景越干净, 染色体分散性越好。但并不是时间越长越好, 酶解时间太长会破坏染色体。紫果西番莲根尖细胞酶解 70 min 可获理想效果。

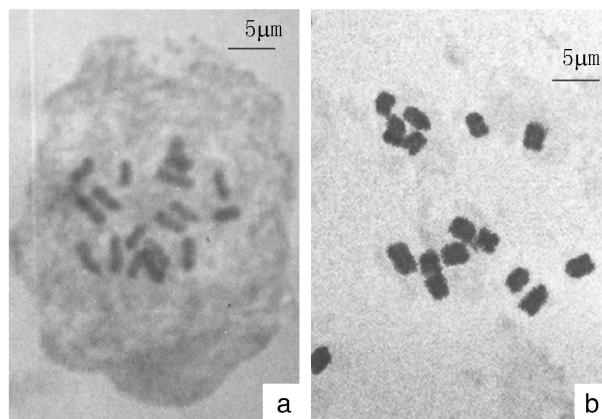


图 2 酶解后细胞中期分裂相形态

Fig 2 Metaphase enzymatic macerated with a solution containing 2% cellulase and 0.5% pectinase at 37℃

注: a- 酶解 30 min; b- 酶解 70 min

2.3 不同解离和制片方法对细胞中期分裂相的影响

试验中观察到根尖经酶解后制片, 其染色体的分散程度明显好于酸解, 显微镜下观察到的细胞是离散的, 而酸解压片后的染色体分散性差, 常出现重叠。由于酶解能降解细胞壁的纤维素和中胶层的

果胶类物质, 低渗使细胞膨胀, 染色体更分散, 因此, 在进行紫果西番莲核型分析时酶解更合适。

两种制片法的效果(图 3)比较显示: 压片的背景较浓, 染色体容易相互重叠缠绕, 形态不清晰, 难以用于核型分析。而涂片的染色体分散, 形态清晰。可见, 涂片法更适宜于紫果西番莲的核型分析。

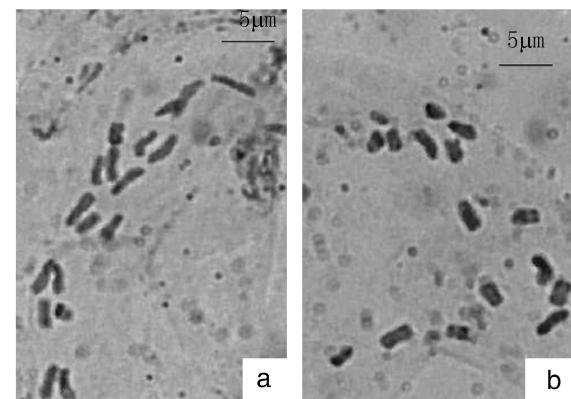


图 3 不同制片后细胞中期分裂相形态

Fig 3 Metaphase of different chromosome preparations

注: a- 酸解压片; b- 酶解涂片

表 2 不同酶解时间对细胞中期分裂相形态的影响

Table 2 Effect of different enzymolysis time on metaphase

酶解时间 (min)	细胞中期分裂相形态
30	细胞质多, 背景明显, 染色体重叠、堆积、分散性差。
40	细胞质较多, 但较分散, 存在背景, 染色体重叠, 很少出现堆积, 分散性较差。
50	少量细胞质, 涂片法染色体分散性较差, 压片法染色体能较好地分散。
60	背景干净, 染色体部分挤压, 但形态清晰。
70	背景干净, 染色体分散性好, 形态清晰。

注: 酶解温度 37℃。

2.4 染色体的数目、倍数和核型分析

取紫果西番莲 50 个根尖细胞有丝分裂中期图相统计染色体数目。通过观察, 其染色体数目为 $2n = 2x = 18$, 与陈晓静等^[2]的报道一致。未发现非整倍性和多倍性染色体数目变异现象, 表明其染色体数目是恒定的。

紫果西番莲的染色体形态和核型模式见图 4、图 5, 核型分析结果见表 3。其核型公式为 $2n = 2x = 18 = 14m$ (2sat) + 4sm。第 1、8 对为近中部着丝粒染色体, 其余 7 对均为中部着丝粒染色体, 第 4 对上有随体, 染色体绝对长度变化范围是 2.04~

4~12 μm , 染色体组的平均总长度为 26~22 μm , 相对长度为 7.77%~15.70%。最长染色体和最短染色体之间的比值为 $\text{L}_t / \text{S}_t = 2.02$, 臂比大于 2 的染色体占 0.11, 根据 Stebbins^[6] 的染色体核型分类标准, 紫果西番莲染色体属于 2A 型。

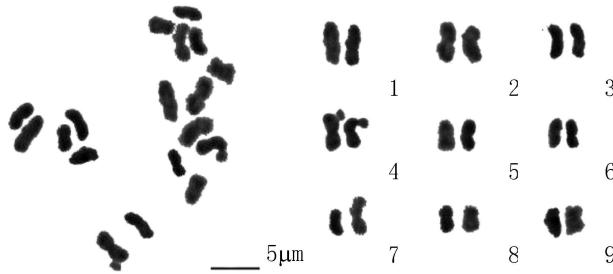


图 4 紫果西番莲染色体数目和核型图

Fig 4 Chromosome number and karyotype of *P. edulis* Sims

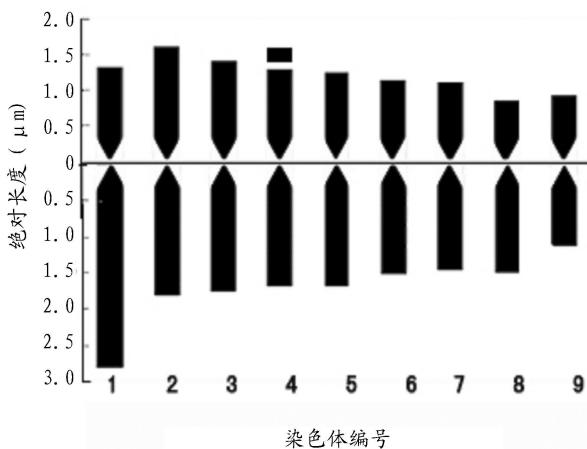


图 5 紫果西番莲染色体模式图

Fig 5 Chromosome idiogram of *P. edulis* Sims

表 3 紫果西番莲的核型分析

Table 3 Data of karyotype analysis of *P. edulis* Sims

序号	绝对长度 (μm)	相对长度 (%)	臂比 (L/S)	类型
1	2.79+ 1.33= 4.12	10.64+ 5.06= 15.70	2.10	sm
2	1.80+ 1.60= 3.40	6.88+ 6.09= 12.97	1.13	m
3	1.76+ 1.41= 3.17	6.71+ 5.39= 12.10	1.24	m
4	1.68+ 1.30= 2.98	6.41+ 4.94= 11.35	1.30	m*
5	1.68+ 1.25= 2.93	6.42+ 4.74= 11.16	1.35	m
6	1.52+ 1.14= 2.66	5.79+ 4.35= 10.14	1.33	m
7	1.46+ 1.11= 2.57	5.55+ 4.24= 9.79	1.31	m
8	1.51+ 0.86= 2.37	5.76+ 3.28= 9.04	1.75	sm
9	1.12+ 0.92= 2.04	4.27+ 3.50= 7.77	1.22	m

注: 绝对(相对)长度: 长臂+ 短臂= 全长, 全长包含随体长度; * 为带随体染色体。

3 讨 论

小染色体植物制片较难获得清晰的染色体形态, 且随体易在制片过程中丢失, 故小染色体植物制片并不要求确定随体。但随体是染色体识别的重要特征之一, 黄代青等^[7]成功地分离出银杏第 1 染色体便是根据其带随体的特征进行辨认。且不同物种所带随体的数目、位置、大小和形态是稳定的, 它作为物种特性在植物分类、遗传背景、染色体育种等研究中具有重要价值。随体通过次溢痕连接于染色体主体部分, 次溢痕处 DNA 螺旋松解变细, 受到外力拉扯容易断裂, 造成随体丢失。确保小染色体植物的随体在制片过程中不丢失很重要, 其结果直接影响核型分析的准确性。在本试验过程中发现与酸解压片法相比, 酶解涂片法能更好地保存紫果西番莲第 4 对染色体上的随体, 这可能与酶解能较好地去除细胞壁干扰, 低渗后细胞易于破裂有关, 且涂片法作用于染色体的力量较小, 因而随体不易丢失。

许多研究表明不同植物属、种间染色体数目稳定, 而核型对称性、染色体组成、随体有无、数量、位置等存在差异^[8~12], 为各种、品种的分类提供了依据。不过要对属、种进行系统分类只有在全面了解各种、品种核型资料的基础上才有可能^[13]。目前, 关于植物核型研究的报道很多, 但各研究结果的可比性却很低^[14~15], 通过试验寻找一个最佳的制片方法, 属内近缘植物统一使用该制片方法, 可以最大程度地消除试验误差, 提高试验结果可靠性, 为植物系统分类奠定基础。本试验以紫果西番莲根尖为材料进行了该方面的探索, 对不同预处理方法、解离方法、酶解时间和制片方法进行了比较, 得到一个最佳的制片方法, 但该方法是否适用于所有西番莲属植物还有待于进一步研究。

本文的核型分析结果与陈晓静等^[3]报道的紫果西番莲的核型相近, 核型公式分别为 $2n = 2x = 18 = 14m$ (2sat) + 4sm 与 $2n = 2x = 18 = 14m + 4sm$, 属于较为原始的类型。陈晓静等^[3]指出由于紫果西番莲染色体或随体较小, 随体难以确定, 需改进处理方法。本试验通过多种方法观察发现紫果西番莲带有随体, 并确定其位于第 4 对染色体上, 为该染色体的识别提供了依据, 同时也进一步证实了紫果西番莲和黄果西番莲具有很近的亲缘关系。

致谢: 本文承蒙福建农林大学申艳红老师指导, 谨致谢忱。

参考文献:

- [1] CARNEIRO M S, CAMARGO L E A, COELHO A S G, et al. RAPD based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) [J]. *Genome*, 2002, 45: 670– 678.
- [2] 陈晓静, 吕柳新. 西番莲属 2 个主要栽培类型的核型分析 [J]. 福建农业大学学报: 自然科学版, 1994, 21 (3): 30– 33.
- [3] 梁达德, 庄南生, 潘佐柳, 等. 黄果西番莲的染色体核型分析 [J]. 热带作物学报, 1996, 17 (1): 75– 78.
- [4] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型的标准化问题 [J]. 武汉植物学研究, 1985, 3 (4): 297– 302.
- [5] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes [J]. *Hereditas*, 1964, 52: 201– 220.
- [6] STEBBINS G L. Chromosomal evolution in higher plant [M]. London: Edward Arnold Ltd, 1971: 85– 104.
- [7] 黄代青, 吕柳新, 王平. 银杏第 1 染色体 DNA 文库的构建 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31 (4): 490– 494.
- [8] 陈晓静. 福建 3 个产地水仙的核型分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13 (4): 28– 31.
- [9] 刘勇, 林刚, 何光源, 等. 两个油菜种的染色体核型分析 [J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33 (3): 119– 121.
- [10] 覃广泉, 刘念. 两种国产苏铁属植物的核型分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13 (6): 511– 515.
- [11] 姜丽, 计巧灵, 张丕鸿. 三个亚麻品种染色体核型分析 [J]. 中国麻业科学, 2008, 30 (5): 241– 244.
- [12] 申定健, 唐正义, 祝华珍. 柑桔属 6 种植物染色体核型比较分析 [J]. 内江师范学院学报, 2006, 21 (4): 53– 57.
- [13] 史刚荣. 甘草属核型的数量分析及其分类学意义 [J]. 淮北煤师院学报, 2002, 23 (4): 45– 48.
- [14] 陈瑞阳, 李秀兰, 宋文芹, 等. 我国部分热带果树染色体研究 [J]. 武汉植物学研究, 1985, 3 (4): 423– 428.
- [15] 吕柳新. 荔枝与龙眼核型的比较研究 [J]. 福建农业大学学报: 自然科学版, 1994, 23 (2): 145– 147.

(责任编辑: 刘新永)