

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 ℃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 Xiurqing^{1,2,3}, CHEN Xiaojing^{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 ℃. 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. *favicarpa* 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。

收稿日期: 2009- 06- 25 初稿; 2009- 08- 03 修改稿
作者简介: 魏秀清 (1982-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 果树种质资源保存及遗传育种
通讯作者: 陈晓静, 女, 教授, 博导, 遗传育种专业 (E-mail: xjchen804@sina.com)

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℃)，待根长至 0.5~1.0 cm 时截取根尖，室温下将根尖分别浸泡于 0.002 mol·L⁻¹ 的 8-羟基喹啉、饱和对二氯苯、4℃ 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 2~3 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℃ 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 2~3 次，滤纸吸干后投入 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液中 60℃ 解离 10 min，然后用蒸馏水多次漂洗，切取根尖顶部 1~2 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 1~2 mm 置于 0.075 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液中 37℃ 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℃ 分别酶解 30 min、40 min、50 min、60 min、70 min，再将根尖置于 0.075 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液中

37℃ 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 mol·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。

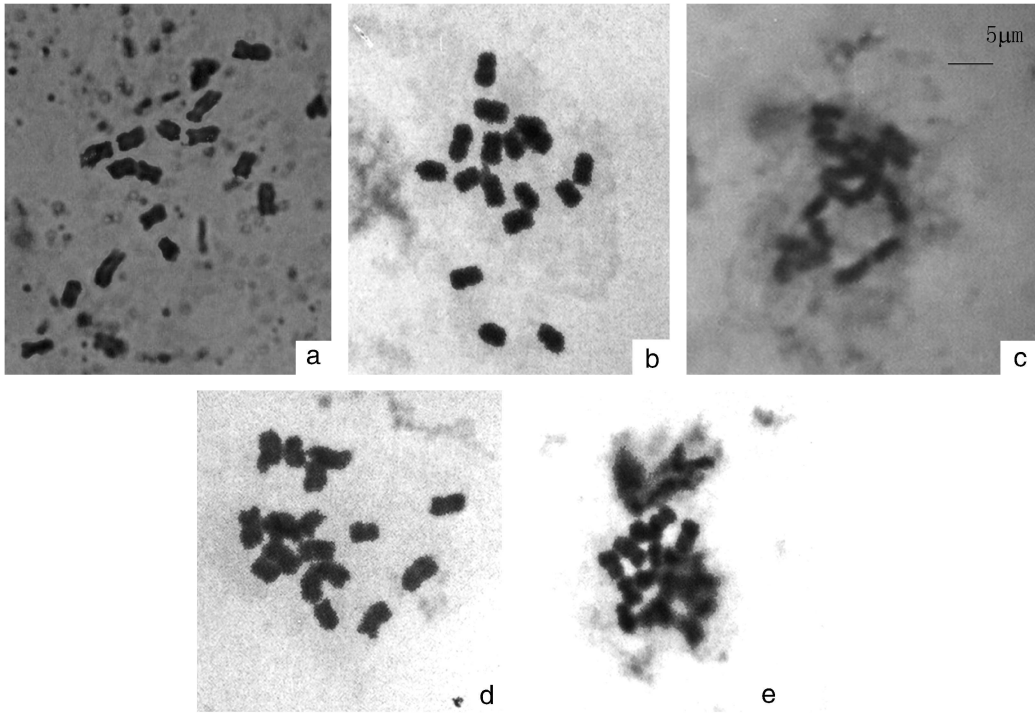


图 1 不同预处理后紫果西番莲染色体形态

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。

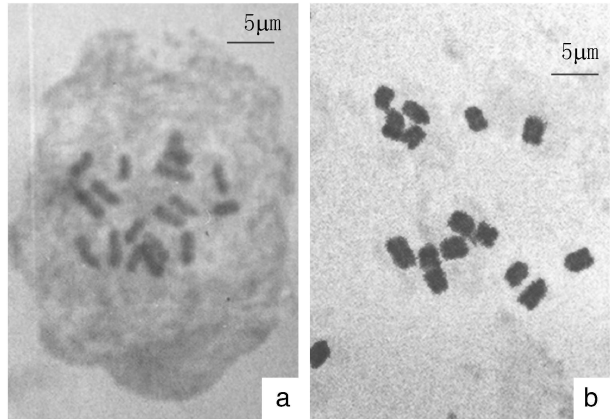


图 2 酶解后细胞中期分裂相形态

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。

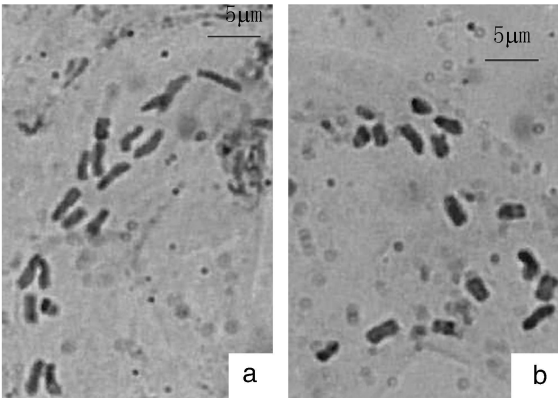


图 3 不同制片后细胞中期分裂相形态

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 $Lt / St = 2.02$ ，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。

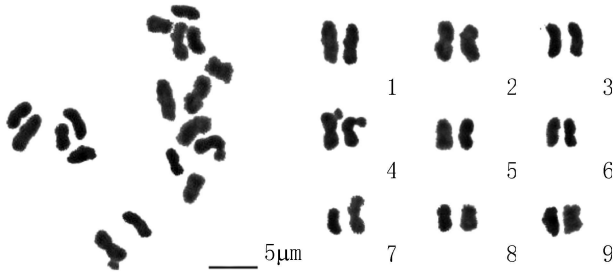


图 4 紫果西番莲染色体数目和核型图

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

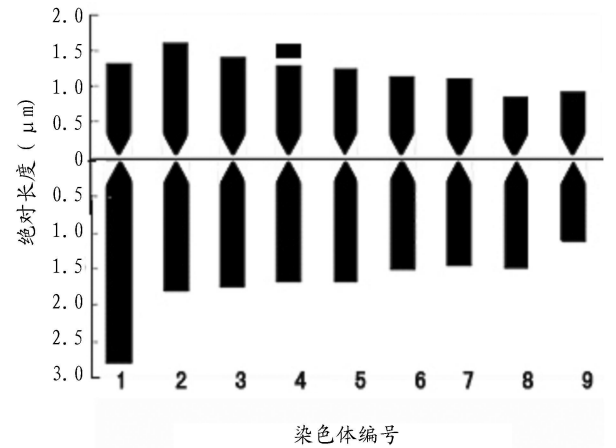


图 5 紫果西番莲染色体模式图

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 <i>P. edulis</i> 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)