

葫芦科植物幼嫩子房壁制片技术的优化 及其染色体倍性鉴定

刘昱希, 韩兰英, 李梦雪, 赵勤政, 陈劲枫, 娄群峰*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院, 南京 210095)

摘要: 该研究利用黄瓜、甜瓜、西瓜和西印度黄瓜这几种葫芦科植物的幼嫩子房壁作为材料进行染色体制片, 探索子房材料的样品大小、预处理时间和酶解时间对染色体制片的影响及其优化, 并用该制片方法对黄瓜候选单倍体植株的子房壁进行倍性鉴定和荧光原位杂交实验。结果发现: (1) 黄瓜、甜瓜、西瓜和西印度黄瓜的幼嫩子房壁最佳预处理时间分别为 1 h 30 min、1 h、55 min 和 45 min, 子房长度为 0.2~1 cm, 子房壁材料切成边长为 1~1.5 mm 小块, 酶解时间为 1 h 10 min~1 h 20 min 时, 用该优化制片方法均可观察到较多的分裂相。(2) 利用该方法鉴定结果显示, 葫芦科植物黄瓜、甜瓜、西瓜和西印度黄瓜的染色体分别为 14、24、22 和 24 条, 黄瓜候选单倍体植株的体细胞染色体数为 7 条。(3) 将该制片方法获得的染色体装片用于荧光原位杂交结果显示, 在二倍体黄瓜染色体中有 3 对明亮的 45S rDNA 杂交信号和 1 对 5S rDNA 杂交信号, 而单倍体黄瓜中相应信号数量均减半; 在甜瓜、西瓜和西印度黄瓜中均有 2 对 45S rDNA 杂交信号和 1 对 5S rDNA 杂交信号。研究认为, 利用葫芦科植物子房壁作为制片材料, 不仅可以获得良好的分裂相, 还具有易于取材、制片效率高等优点, 因此子房壁制片法是研究植物染色体数目和鉴定倍性的有效方法, 且该制片方法也适用于进一步的荧光原位杂交分析。

关键词: 子房; 染色体; 倍性鉴定; 荧光原位杂交; 葫芦科

中图分类号: Q-336; Q343.2⁺2 **文献标志码:** A

Optimization of Chromosome Preparation Method Using Young Ovary Wall of Cucurbitaceae Plants and Ploidy Identification

LIU Yuxi, HAN Lanying, LI Mengxue, ZHAO Qinzhen, CHEN Jinfeng, LOU Qunfeng*

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

Abstract: The young ovary wall of Cucurbitaceae plants, including cucumber, melon, watermelon and West Indian cucumber, were used as the material for chromosome preparation. Several main factors including sample size of ovary material, 8-hydroxyquinoline pretreatment time and enzymatic hydrolysis time were investigated to analyze their effects to chromosome preparation results, and we also explore how to optimize this method. Using this method, ploidy identification and fluorescence *in situ* hybridization exper-

收稿日期: 2019-12-15; 修改稿收到日期: 2020-05-25

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划子课题(2016YFD0100204-25); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201719); 江苏高校“青蓝工程”人才项目

作者简介: 刘昱希(1996-), 女, 在读硕士研究生, 从事黄瓜遗传育种研究。E-mail: 2018104064@njau.edu.cn

* 通信作者: 娄群峰, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜细胞分子生物学与遗传育种研究工作。E-mail: qlou@njau.edu.cn

iments were carried out on the ovary wall of candidate haploid plants of cucumber. Results show that: (1) the best pretreatment time of young ovary wall is 1 h 30 min for cucumber, 1 h for melon, 55 min for watermelon, 45 min for West India cucumber. To observe clear mitotic metaphase with this optimized method, we should use melon ovary with a length range of 0.2—1 cm, cut the ovary wall material into small pieces with a side length of 1—1.5 mm. And the suitable time for enzyme digestion is 1 h 10 min to 1 h 20 min. (2) The identification results by this method showed that the cucurbitaceae plants cucumber, melon, watermelon and West Indian cucumber had 14, 24, 22 and 24 chromosomes, respectively. The somatic cell chromosome number in the plant identified as haploid was 7. (3) Fluorescence in situ hybridization showed that there were 3 pairs of bright 45S rDNA hybridization signals and 1 pair of 5S rDNA hybridization signals in cucumber chromosomes, and the number of corresponding signals in haploid cucumbers was 7. There were 2 pairs of 45S rDNA and 1 pair 5S rDNA signals in melon, watermelon and West Indian cucumber. Our studies indicated that the ovary wall chromosome preparation procedure is suitable for all these Cucurbitaceae species. Not only can they obtain good mitotic metaphase, but also have the advantages of easy to get material and high chromosome preparation efficiency. Therefore, when it is difficult to obtain root tips of the rare material, the ovary wall chromosome preparation method is an effective method for studying the chromosome number of plants and identifying ploidy. This method is also suitable for fluorescence *in situ* hybridization.

Key words: ovary; chromosome; ploidy identification; fluorescence *in situ* hybridization; Cucurbitaceae

染色体计数通常以细胞处于旺盛分裂期的种子根尖为制片材料,但是利用种子根尖进行制片往往不适于一些种子稀少且珍贵的材料,以及非种子来源的组织培养材料。染色体计数也可以利用正在生长的植株进行根尖的取材,但是处于土壤或基质中的根尖取材时既不易操作也不易获得分裂旺盛时间的根尖,同时容易对植株造成伤害。因此,有必要寻找其他材料来代替根尖。

子房由子房壁和胚珠组成,幼嫩子房的子房壁中有大量分裂旺盛的体细胞,可以观察到有丝分裂中期分裂相。有些早熟型黄瓜植株,长出 3~4 片真叶时就已经开始生长子房,而该时期的根系并不旺盛,特别是有些材料如西印度黄瓜,苗期根尖十分细小,难以取材;待到植株生长成熟,其根系生长速度减慢、开始老化,也不宜取到适合于染色体制片的根尖,此时植株的茎尖处依然有生长旺盛的子房。而且前人观察发现在同样的取材条件下,子房中的细胞分裂指数往往高于根尖^[1]。但少见关于利用子房壁制片的报道^[2]。

染色体计数是直接鉴定植株倍性的最准确的方法。在单倍体培养中,常有大批量再生植株需要倍性鉴定,如果采用常规根尖鉴定法,则需等植株生长旺盛,耗时又费工^[3]。前人也有采用卷须^[4]、不定芽等^[5]等方法进行制片鉴定染色体数,但是取样及制片难度较大。

葫芦科植物大多为一年生藤本植物,雌雄异花同株,雌花多子房下位,子房呈球状或棒状,较易分

离取样。本文首先以甜瓜(*Cucumis melo* L.)为材料,探索利用子房进行染色体制片的方法,为验证该方法的可靠性,又使用葫芦科其他的几个主要物种,黄瓜(*Cucumis sativus* L.)、西瓜(*Citrullus lanatus*)和西印度黄瓜(*Cucumis anguria* L.)为材料进行试验,证实该方法可广泛应用于葫芦科物种。进一步取黄瓜候选单倍体再生植株的子房壁进行倍性鉴定,为快速进行葫芦科植物染色体分析研究提供了新方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验材料包括葫芦科植物的黄瓜‘长春密刺’、甜瓜‘苏甜一号’、西瓜‘8424’和西印度黄瓜‘PI 249879’,以及黄瓜候选单倍体材料,由辐射花粉授粉后胚培养再生而来。植株材料种植于南京农业大学白马基地。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体制片 子房材料制片方法:利用幼嫩子房进行染色体制片,具体方法参照文献^[6],并略作修改。待植株生长旺盛,于晴天上午从节间和茎尖处取幼嫩子房作材料。用新鲜配制的 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉浸没材料,于避光条件下进行预处理,子房壁材料预处理时间为 30 min~1 h 40 min,每 10 min 一个梯度进行处理;再经 M:G 固定液(V(甲醇):V(冰醋酸)=3:1)固定 24 h,至材料呈白色。将子房样品切成小段,用 4% 的纤维

素酶 R-10 和 2% 的果胶酶 Y-23 混合溶液, 37 °C 下酶解, 水洗、固定, 将酶处理后的材料置于乙醇清洁过的载玻片上并在 45% 乙酸中分散。加适量固定液后烧片干燥。在 Olympus 相差显微镜下观察制片效果, 分散良好的制片用于下一步的荧光原位杂交实验。

1.2.2 探针制备 用缺刻平移法来标记 45S rDNA 和 5S rDNA 探针^[6]。标记使用的 Digoxigenin-dUTP 和 Biotin-dUTP 购于 Roche 公司。

1.2.3 荧光原位杂交 荧光原位杂交具体方法参照 Lou 等的方法^[7], 并稍作修改。

变性与杂交: 取出已制备好的玻片, 各加入 100 μL 的 70% 的去离子甲酰胺, 盖上盖玻片, 在 80 °C 中变性 1 min 30 s。处理后, 立刻放入 -20 °C 的酒精梯度脱水。

制备杂交探针: 将 10 μL 50% 去离子甲酰胺溶液, 2 μL 2 \times SSC, 4 μL 10% 硫酸葡聚糖, 1 μL 已标记的 DNA 探针混合均匀后在 90 °C 环境中变性 6 min, 取出后放在冰盒中待用。将处理好的杂交混合液加在晾干的玻片上, 盖上盖玻片, 37 °C 过夜杂交。

洗脱及荧光检测: 在 2 \times SSC 溶液中浸泡至盖玻片自然脱落, 转入另一瓶 2 \times SSC 中震荡洗涤 5 min, 再在 1 \times TNT 溶液中震荡洗涤 5 min。之后各加入 100 μL 偶联荧光信号的抗体于 37 °C 温育 40 min。取出玻片, 1 \times TNT 洗涤晾干后加 0.02 mg \cdot mL⁻¹ 的 DAPI 复染。压片后使用连接在 Olympus BX51 荧光显微镜的 Hamamatsu CCD 相机观察拍照。

2 结果与分析

2.1 子房壁制片方法

首先以甜瓜为材料, 探究制片方法。用 0.002 mol \cdot L⁻¹ 的 8-羟基喹啉经梯度时间进行预处理, 发现甜瓜子房最佳预处理时长为 1 h, 若时间过短, 染色体浓缩不够, 出现拖尾现象; 若时间过长, 则染色体固缩过度。据此确立黄瓜、西瓜和西印度黄瓜的最佳预处理时长分别为 1 h 30 min、55 min、45 min。黄瓜候选单倍体材料预处理时间与黄瓜相同。

取甜瓜不同大小的子房取材进行酶解制片, 发现子房越小越易于酶解, 且细胞分裂旺盛。综合考虑取样的难易程度, 确定长度为 0.2~1 cm 的子房材料均可制片用于染色体计数(图 1)。进一步试验观察到几种葫芦科植物宜取材的子房形态, 如图 2。

子房酶解前需去除雌花花冠部分, 切取子房壁, 如图 3。切成边长 1~1.5 mm 的方块, 以便与酶液充分接触。确立适宜酶解时长为 1 h 10 min~1 h 20 min。若时间过短, 染色体黏连不分散, 时间过长则染色体形态模糊。制片后可观察到子房壁细胞的中期分裂相较多, 制片效果如图 4。其他几种葫芦科植物酶解和制片步骤与甜瓜相同。

2.2 子房壁制片在染色体计数中的应用

首先利用黄瓜、甜瓜、西瓜和西印度黄瓜子房壁制片, 从中分别选择 30 个染色体形态清晰、分散良好的中期分裂相细胞观察计数^[8], 结果如图 5 所示: 黄瓜染色体数目为 14 条; 甜瓜染色体数目为 24 条; 西瓜染色体数目为 22 条; 西印度黄瓜染色体数目为 24 条。利用几种植物子房壁作为制片材料均获得了清晰可辨的染色体图像并与前人以根尖为材料的研究结果相符合^[9]。

根据上述试验, 我们对前期通过辐射花粉结合胚培养获得的黄瓜候选单倍体植株进行鉴定分析, 使用黄瓜再生植株的子房壁制片进行染色体计数, 发现部分黄瓜候选再生植株经鉴定染色体数目为 7 条, 为单倍体(图 5)。

2.3 子房壁制片在荧光原位杂交鉴定中的应用

用 Dig-dUTP 和 Bio-dUTP 标记的 45S rDNA 和 5S rDNA 探针与子房壁材料的有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交, 结果如图 6。

由 FISH 结果可知, 在甜瓜中有 2 对 45S rDNA 杂交信号和 1 对 5S rDNA 杂交信号; 在西瓜中有 2 对 45S rDNA 信号和 1 对 5S rDNA 信号, 其中 1 对 45S rDNA 信号与 5S rDNA 信号位于同一条染色体上; 在西印度黄瓜中有 2 对 45S rDNA 信号和 1 对 5S rDNA 信号, 也有 1 对 45S rDNA 信号与 5S rDNA 信号位于同一条染色体上。黄瓜的荧光原位杂交中有 3 对较强的 45S rDNA 信号, 1 对 5S rDNA 信号; 均与前人研究中的位点数量及位置吻合^[10-11]。在单倍体材料中相应信号数量减半, 进一步证实该制片方法在染色体数目鉴定中的可靠性。

3 讨论

幼嫩的子房处于快速细胞分裂和膨大阶段, 营养生长旺盛, 因此可用于观察有丝分裂中期染色体。前人利用香石竹^[2]、兰花^[12]和烟草^[13]的子房进行染色体制片, 也表明子房是染色体制片的理想材料。但这些物种均为雌雄同花, 花蕾结构复杂, 制片前需剥去花萼、花冠、雄蕊和柱头, 与之相比葫芦科植物

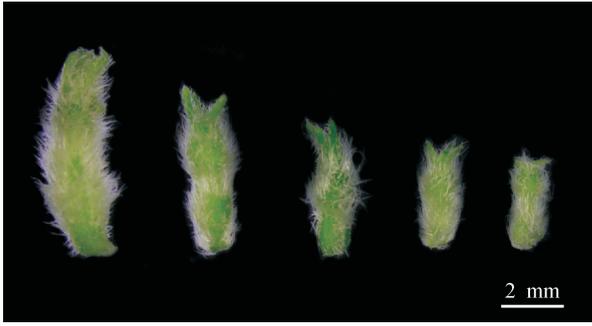
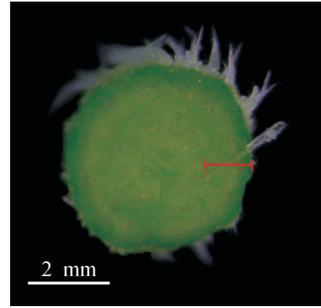
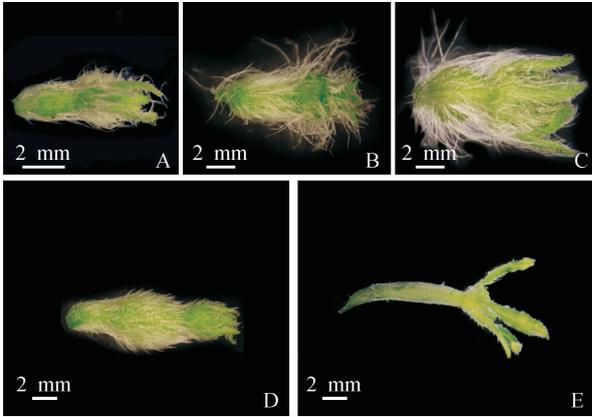


图 1 适宜于染色体制片的甜瓜子房长度
Fig.1 Ovary size suitable for chromosome preparation of melon



图中红线标注部分为所取子房壁
图 3 甜瓜子房截面

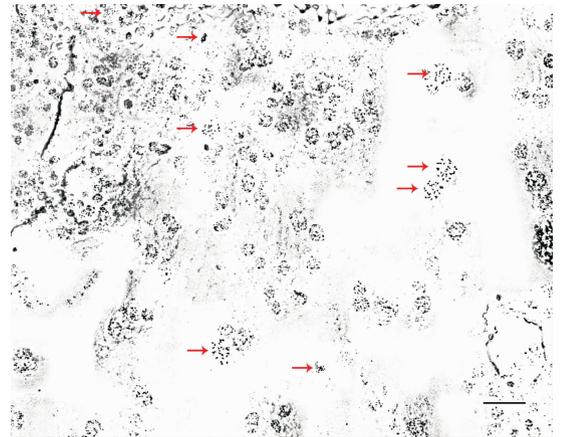
The red line in the picture indicates the ovary wall
Fig. 3 Melon ovary section



A. 黄瓜;B. 甜瓜;C. 西瓜;D. 西印度黄瓜;E. 单倍体黄瓜
图 2 适宜于染色体制片的几种葫芦科植物的幼嫩子房

A. Cucumber; B. Melon; C. Watermelon; D. West Indian cucumber; E. Haploid cucumber

Fig. 2 Young ovary of Cucurbitaceae plant suitable for chromosome preparation

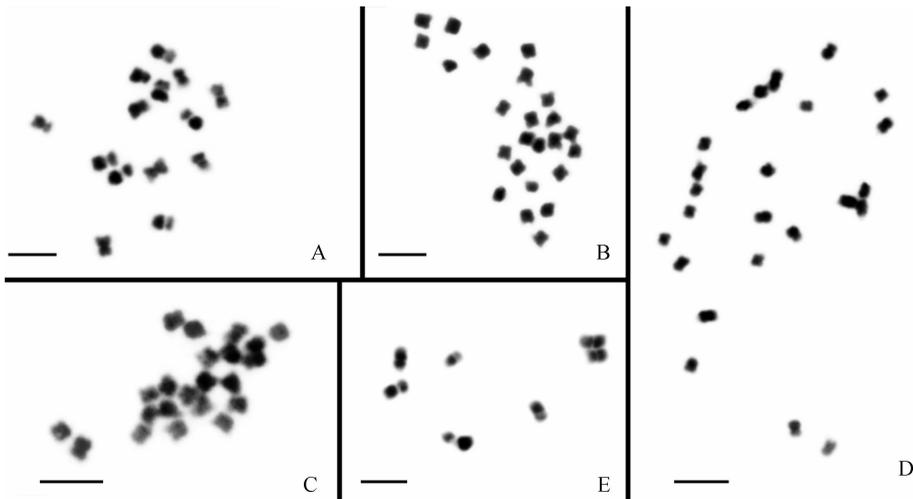


如箭头所示,可见大量中期分裂相 比例尺=50 μm

图 4 甜瓜子房壁制片效果

As indicated by the arrows, a large number of cells with metaphase chromosomes can be seen, scale bar=50 μm

Fig. 4 Chromosome preparation result of melon ovary wall



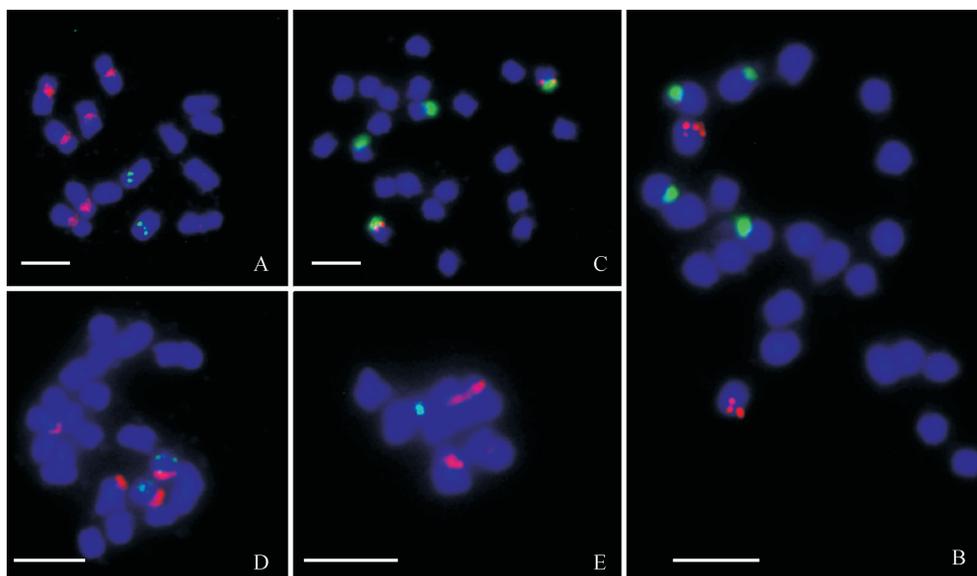
A. 黄瓜(2n=14);B. 甜瓜(2n=24);C. 西瓜(2n=22);D. 西印度黄瓜(2n=24);E. 单倍体黄瓜(n=7),比例尺=5 μm

图 5 几种葫芦科植物的染色体

A. Cucumber(2n=14); B. Melon(2n=24); C. Watermelon(2n=22); D. West Indian cucumber(2n=24);

E. Haploid cucumber(n=7), scale bar=5 μm

Fig. 5 Chromosomes of several Cucurbitaceae plants



蓝色为 DAPI 复染的有丝分裂中期染色体。A. 黄瓜: 5S rDNA(绿色)和 45S rDNA(红色)信号; B. 甜瓜: 5S rDNA(红色)和 45S rDNA(绿色)信号; C. 西瓜: 5S rDNA(红色)和 45S rDNA(绿色)信号; D. 西印度黄瓜: 5S rDNA(绿色)和 45S rDNA(红色)信号;

E. 单倍体黄瓜: 5S rDNA(绿色)和 45S rDNA(红色)信号, 比例尺=5 μm

图 6 几种葫芦科植物 5S rDNA 和 45S rDNA 荧光原位杂交结果

Blue shows the metaphase mitotic chromosome counterstained with DAPI. A. Cucumber: 5S rDNA(green) and 45S rDNA(red)signals;

B. Melon: 5S rDNA(red) and 45S rDNA(green)signals; C. Watermelon: 5S rDNA(red) and 45S rDNA(green)signals;

D. West Indian cucumber: 5S rDNA(green) and 45S rDNA(red)signals; E. Haploid cucumber: 5S rDNA(green)

and 45S rDNA(red)signals, scale bar=5 μm

Fig. 6 Distribution of 5S rDNA and 45S rDNA loci in several cucurbits

的子房更易于取样处理。

为保证所取材料正处于旺盛分裂期,取材时需注意以下方面:取材位置,最好从新生的生长旺盛的侧枝或主枝茎尖处取材;取材大小,甜瓜大于 1 cm 的子房材料可观察到分裂相较少,而小于 0.2 cm 的子房虽然分裂旺盛,但体积较小,取材困难。因此本研究认为在甜瓜中,长度为 0.2~1 cm 的子房适用于制片,在该范围内,应尽量选取较小材料,根据不同植物果实成熟后的大小来调整取材的适宜长度。取材时子房大小的差异可能产生材料用 8-羟基喹啉预处理后效果不整齐的现象,可以在处理前将材料切分成一致大小来解决这个问题。在传统根尖制片方法中,1 个根尖通常只能制作 1 张装片,而 1 个子房可切分为 5~9 份,每份细胞数量充足,可单独制片。而且缩小酶解材料的体积,可以缩短酶解的时长,提高了制片效率^[14]。

对葫芦科植物倍性鉴定实验而言,子房壁是良好的补充材料。Lelu 等^[15]发现小孢子再生植株不同器官和组织存在混倍性现象,例如有些植株根尖为二倍体或四倍体,而相应的地上部茎尖鉴定却为单倍体或二倍体。因此,仅使用根尖细胞染色体进行倍性鉴定,可能得出错误结论,结合植株地上部子房壁细胞进行倍性鉴定可提高结果的准确性。

本试验利用几种葫芦科植物子房壁进行制片,其染色体计数结果均与前人的研究数据相符,荧光原位杂交后的分裂相背景较浅,均可获得清晰的染色体图像,探针杂交信号也较强,且与预期数量一致。这说明,本子房壁材料制片方法获得的染色体适于荧光原位杂交,这为后续葫芦科植物细胞遗传学分析打下了基础。因此,利用子房壁材料制片进行染色体计数和倍性鉴定具有可行性和准确性。

参考文献:

- [1] 李懋学,张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 23-314.
- [2] 周旭红, 桂敏, 夏晶, 等. 利用子房壁鉴定香石竹染色体数目的研究[J]. 江西农业学报, 2010, **22**(1): 61-63.
ZHOU X H, GUI M, XIA J, *et al.* Studies on identifying number of chromosome in carnation by using ovary wall[J]. *Jiangxi Agricultural Journal*, 2010, **22**(1): 61-63.
- [3] 付文婷, 张爱民, 廖芳芳, 等. 辣椒根尖预处理及植株倍性鉴定[J]. 现代农业科技, 2015, (18): 77-78.
FU W T, ZHANG A M, LIAO F F, *et al.* Pretreatment for pepper root tip and plant ploidy identification[J]. *Modern Agricultural Technology*, 2015, (18): 77-78.
- [4] 钱春桃, 罗向东, 陈劲枫, 等. 利用卷须制片确认佛手瓜染色体数目[J]. 南京农业大学学报, 2002, **25**(2): 113-114.
QIAN C T, LUO X D, CHEN J F, *et al.* Confirming chromosome number in chayote [*Sechium deule* (Jacq.) Swartz] using its tendrils[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, **25**(2): 113-114.
- [5] 曹清河, 陈劲枫, 罗向东, 等. 用组培芽鉴定组培材料染色体数目的方法[J]. 植物生理学报, 2003, **39**(6): 655-657.
CAO Q H, CHEN J F, LUO X D, *et al.* Chromosome count using buds *in vitro*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, **39**(6): 655-657.
- [6] LOU Q F, HE Y H, CHENG C Y, *et al.* Integration of high-resolution physical and genetic map reveals differential recombination frequency between chromosomes and the genome assembling quality in cucumber [J]. *Plos One*, 2013, **8**(5): e62676.
- [7] LOU Q F, ZHANG Y X, HE Y H, *et al.* Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis* [J]. *Plant Journal*, 2014. **78**(1):169-179.
- [8] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题[J]. 植物科学学报, 1985, **3**(4): 297-302.
LI M X, CHEN R Y. Standardization issues regarding plant karyotyping [J]. *Journal of Plant Science*, 1985, **3**(4): 297-302.
- [9] 张振涛. 甜瓜属主要物种染色体进化分析及种间异染色体体系的创制和鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [10] ZHAO, X, LU J Y, ZHANG Z H, *et al.* Comparison of the distribution of the repetitive DNA sequences in three variants of *Cucumis sativus* reveals their phylogenetic relationships [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, **38**(1): 39-45
DOI: 10.1016/j. jgg. 2011. 12. 005.
- [11] 李琦, 马璐, 黄婧, 等. 西瓜、苦瓜与罗汉果染色体的 rDNA 定位及其核型分析[J]. 武汉大学学报(理学版), 2007, (4): 449-456.
LI Q, MA L, HUANG J, *et al.* Chromosome rDNA mapping and karyotype analysis of watermelon, momordica and Lohanguo [J]. *Journal of Wuhan University (Science Edition)* 2007, (4): 449-456.
- [12] BIANCO P S, DEMERICO, P. MEDAGLI, *et al.* Polyploidy and aneuploidy in Ophrys, Orchis, and Anacamptis (Orchidaceae) [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 1991, **178**(3-4): 235-245.
- [13] 党江波, 梁国鲁, 向素琼, 等. 利用幼嫩子房对烟草单个植株进行染色体制片的方法; 中国 201410557520. 2 [P]. 2015. 01. 21
- [14] 何玉华. 黄瓜 3,4 号染色体分子细胞遗传图谱的构建[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [15] 管苇. 黄瓜倍性材料的创制与鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

(编辑:潘新社)