

利用青花菜幼嫩雌蕊进行染色体核型分析

张红梅, 张蜀宁*, 孔艳娥, 张丽丽

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

摘要: 以青花菜幼嫩雌蕊及根尖为材料采用常规压片法进行染色体核型分析。结果表明: 雌蕊子房部位处于有丝分裂中期的细胞较花柱和柱头部位多; 与根尖相比, 幼嫩子房中处于分裂中期的细胞较多, 且中期染色体在形态上与根尖无明显区别, 随体均清晰可见。两种材料获得的核型公式均为 $2n = 2x = 18 = 8m + 10sm (2sat)$, 其中第 3、4、7、8 对为中着丝粒染色体, 第 1、2、5、6、9 对为近中着丝粒染色体, 随体均位于第 6 对染色体上。核型分类均为基本对称型的 2A 型。用雌蕊为材料进行核型分析, 为染色体较小且具随体的十字花科作物的细胞学研究提供了新的方法。

关键词: 青花菜; 雌蕊; 根尖; 染色体核型

中图分类号: S 635 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 05-0727-04

Broccoli Karyotype Analysis by Using Immature Pistil

ZHANG Hongmei, ZHANG Shu-ning*, KONG Yan-e, and ZHANG Li-li

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

Abstract: In this article, we studied broccoli karyotype using immature pistil and root tip via squash method. The results indicated that there were more metaphase stage cells in ovary than in stigma and style. Compared with the root tip, the immature ovary possessed more cells which were at metaphase stage; There were no obvious differences in patterns of the morphology chromosome in both materials, we could see satellites in both cells of two materials; No matter which material was used, the karyotype formula both were $2n = 2x = 18 = 8m + 10sm (2sat)$, with 4 metacentric pairs (3, 4, 7, 8) and 5 acrocentric pairs (1, 2, 5, 6, 9) chromosomes, satellites all were observed at the sixth pair of chromosomes. The karyotype all belong to 2A, presented a ultimately symmetry karyotype. In addition, the pistil was more plentiful than root tip when used as preparation of chromosome material. This provided a new method about cytology studies for crucifer crops which have smaller chromosome and satellites.

Key words: broccoli; pistil; root tip; chromosome karyotype

青花菜 (*Brassica oleracea* L. var *italica* Planch.) 为十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种。国内外对青花菜的研究多集中在新品种选育、营养保健以及生理生化等方面 (Mithen et al., 2003), 在细胞学方面的研究较少 (万双粉等, 2006), 未见关于核型分析的报道。核型分析常用的材料是根尖染色体。当材料珍贵根尖获取困难时, 瓜类等作物可采用子叶、卷须等进行染色体计数 (陈劲枫和钱春桃, 2002) 和核型分析 (蔡华等, 2007)。国内外对十字花科作物的核型研究较多, 但都是以根尖为材料, 本试验中首次采用幼嫩雌蕊对青花菜的染色体进行核型分析, 为青花菜及十字花科作物的细胞学研究提供方法和理论依据。

收稿日期: 2008 - 12 - 31; 修回日期: 2009 - 03 - 31

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (SBK20082174)

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

1 材料与方法

供试青花菜材料为日本品种‘春绿’的株系 07Q-28, 引自江苏省镇江农业科学研究所。

雌蕊染色体制备: 2008年3月中下旬于始花期晴天 9:30—11:30取长度 1~5 mm的幼蕾, 用镊子将雌蕊剖出, 置于 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉水溶液中预处理 3 h, 蒸馏水冲洗 3次, 卡诺固定液(无水乙醇 冰醋酸 = 3:1)固定 24 h, 蒸馏水冲洗 3次, $0.075 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾前滴渗 1 h, 蒸馏水冲洗 3次, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 60 水浴解离 6 min, 蒸馏水后低渗 30 min。切取柱头、花柱和子房 3个部位, 用改良卡宝品红染色 5 min后压片。观察不同部位的压片各 50张, 统计中期分裂相。

根尖染色体制备: 种子常温浸种 12 h, 播于铺有湿滤纸的培养皿中 25 恒温培养, 发根后选 0.5~1.5 cm长的根尖, 用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉预处理 2.5 h, 卡诺固定液固定 24 h, $0.075 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾前滴渗 30 min, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 60 水浴解离 8.5 min, 蒸馏水后低渗 10 min, 切取 1~2 mm根尖, 改良卡宝品红染色至少 8 min后压片。

核型分析: 用 Zeiss Axioskop40显微镜对制片进行观察并拍照, 从根尖和子房制片中各选取 5张中期分裂相良好的照片, 用 Ikaros染色体图像分析软件进行染色体核型配对分析, 并参照李懋学和陈瑞阳(1985)以及 Leven等(1964)的植物核型分析标准进行分析测量, 求平均值, 制成染色体参数表, 按 Stebbins(1971)的分类标准进行核型分类。

2 结果与分析

2.1 幼嫩雌蕊中最佳部位的筛选

观察结果表明: 子房组织处于有丝分裂中期的细胞最多, 同一视野(20×)下, 子房组织中平均中期分裂相为 41.3个, 而柱头和花柱分别为 36.2个和 34.7个, 故子房部位最适宜用于染色体研究。

2.2 子房和根尖染色体制片效果的比较

1~5 mm长花蕾的幼嫩雌蕊正处于旺盛的有丝分裂期, 雌蕊组织的细胞排列较根尖细胞紧密, 同一视野中可以观察到更多的中期分裂相。同一视野(20×)下, 雌蕊材料中子房部位的平均中期分裂相为 41.3个, 而根尖中为 32.7个。由图 1和图 2可见: 幼嫩雌蕊中获得的中期染色体形态与根尖染色体无明显差异, 随体清晰。青花菜抽薹开花期有大量花蕾, 幼嫩雌蕊材料远比根尖材料丰富。

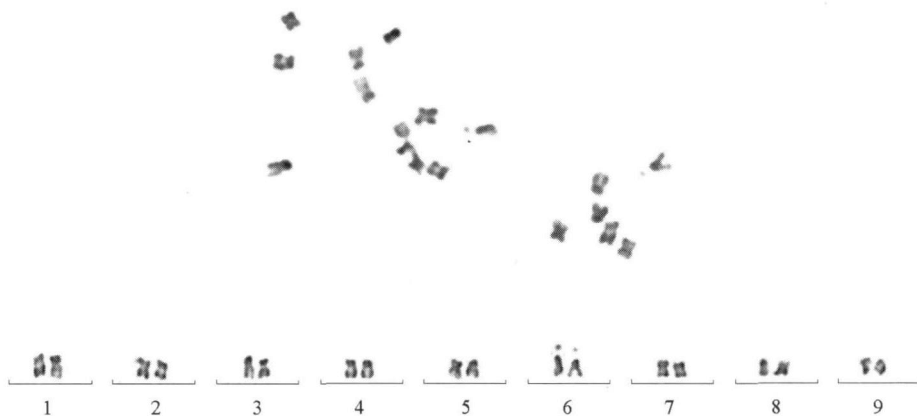


图 1 青花菜根尖染色体中期分裂相和核型

Fig. 1 Metaphase chromosomes and karyotype of broccoli root tip

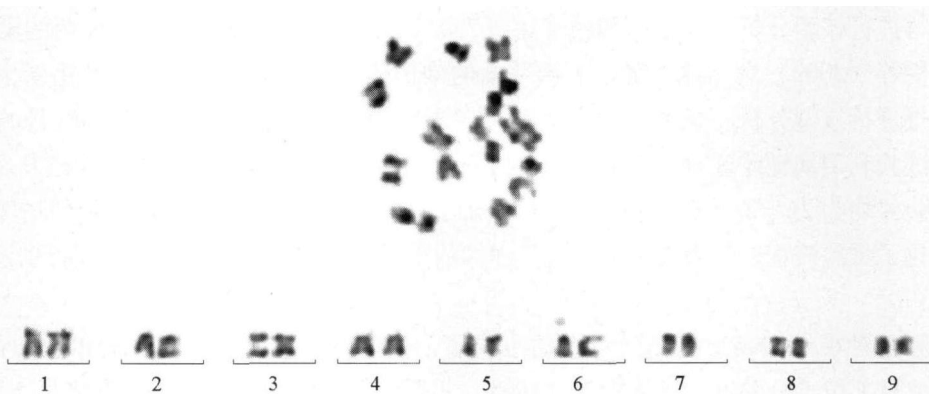


图 2 青花菜幼嫩雌蕊中染色体中期分裂相和核型

Fig. 2 Metaphase chromosomes and karyotype of broccoli immature stigma

2.3 利用幼嫩子房和根尖获得的染色体核型的比较

由表 1 可以看出, 青花菜子房和根尖染色体的核型参数基本一致, 各个染色体的相对长度, 以及长、短臂无明显差别, 相对长度的变化范围分别为 14.10 ~ 8.96 和 13.63 ~ 9.05, 着丝粒指数变化范围分别为 32.79% ~ 46.28% 和 32.13% ~ 42.23%, 臂比值变化范围分别在 1.16 ~ 2.05 和 1.37 ~ 2.11 之间。在臂比值方面, 仅第 9 对的差别较大, 子房染色体为 1.74, 根尖染色体为 2.10, 这可能是由于第 9 对染色体太小而引起的误差。两种方法所得核型公式均为 $2n = 2x = 18 = 8m + 10sm (2sat)$; 子房和根尖染色体长度比 (最长/最短) 接近, 分别为 1.57 和 1.51, 臂比 > 2 的染色体比值分别为 11.11% 和 22.22%; 根据 Stebbin 核型分类标准, 核型分类均为基本对称型的 2A 型, 核型类型一致。

表 1 青花菜子房和根尖染色体的核型参数表

Table 1 The karyotype parameters table of chromosomes of broccoli ovary and root tip

染色体编号 Chromosome No	相对长度 / % Relative length						着丝粒指数 / % Centromeric index		臂比 Am ratio		染色体类型 Type	
	长臂 Long am		短臂 Short am		全长 Total length		根尖 Root tip	子房 Ovary	根尖 Root tip	子房 Ovary	根尖 Root tip	子房 Ovary
	根尖 Root tip	子房 Ovary	根尖 Root tip	子房 Ovary	根尖 Root tip	子房 Ovary						
1	8.86	9.06	4.77	5.04	13.63	14.10	35.00	35.76	1.86	1.80	sm	sm
2	8.03	8.03	4.43	4.39	12.46	12.42	35.55	35.34	1.81	1.83	sm	sm
3	7.06	6.44	4.82	5.14	11.88	11.58	40.57	44.35	1.46	1.25	m	m
4	6.72	6.07	4.63	5.23	11.35	11.30	40.77	46.28	1.45	1.16	m	m
5	7.30	7.00	3.70	4.01	11.00	11.02	33.63	36.44	1.97	1.74	sm	sm
6*	7.30	7.10	3.46	3.45	10.76	10.55	32.13	32.79	2.11	2.05	sm (sat)	sm (sat)
7	5.79	5.98	4.24	4.30	10.03	10.27	42.23	41.82	1.37	1.39	m	m
8	5.84	5.60	3.99	4.20	9.83	9.80	40.59	42.86	1.46	1.33	m	m
9	6.13	5.70	2.92	3.27	9.05	8.96	32.26	36.46	2.10	1.74	sm	sm

注: *表示具随体的染色体 (随体长度不计)。

Note: * means the chromosomes that had satellites and whose satellite lengths were not included

3 讨论

根尖是核型分析最常用的材料, 但对于一些植物而言则不一定适用。例如, 大蒜和洋葱的根尖在预处理过程中极易发生组织和细胞间的粘连, 同时染色体也难以分散 (蔡华等, 2007)。一般来说,

凡是进行细胞分裂的分生器官、组织甚至单个细胞都可以进行染色体观察。因此,可利用其他材料来代替根尖材料进行核型分析。陈劲枫和钱春桃(2002)用卷须对黄瓜、菜豆和葡萄的染色体进行了计数,钱春桃等(2002)利用卷须确定了佛手瓜的染色体数。蔡华等(2007)利用新生子叶对染色体较大的牡丹进行核型分析。李懋学和张赞平(1996)曾利用幼小花蕾对芍药和牡丹的染色体进行过研究。本试验利用幼嫩雌蕊对青花菜进行核型分析。对雌蕊和根尖材料的核型比较发现,两种材料获得的核型公式均为 $2n = 2x = 18 = 8m + 10sm (2sat)$ 。与根尖相比,雌蕊无需材料的培养,缩短了试验周期,简化了试验流程。这为染色体小且具随体的十字花科等作物的细胞学研究提供了一个简便的新方法。

李懋学和张赞平(1996)指出,对于幼小花蕾,如取材适宜,其细胞分裂指数往往高于根尖,取材时间与取材部位十分关键。肖增宽等(1994)报道,马铃薯花粉母细胞发育略早于胚囊母细胞。本试验中发现,当花蕾长 1~5 mm 左右,雄蕊处于减数分裂期,而雌蕊正处于有丝分裂旺盛期。对雌蕊的柱头、花柱和子房部位进行压片,发现子房部位分裂相较其他两个部位多。这可能是由于此时正在为胚囊母细胞的形成以及进入减数分裂做准备。不同材料制片流程和处理时间不同。黄瓜卷须制片和根尖制片的差异主要体现在预处理和解离环节上(陈劲枫和钱春桃,2002)。本研究中发现,青花菜雌蕊和根尖在预处理、前低渗、后低渗特别是解离时间存在较大差异,当雌蕊解离时间达 8.5 min 时,细胞解离过度,而根尖在 8.5 min 时,解离效果最好。因此,必须根据材料特点筛选适宜的制片流程。

References

- Cai Hua, Xia hai-wu, Yuan Qing-jun. 2007. The peony chromosom studies by using neonatal cotyledon. *Biology Bulletin*, 42 (6): 51 - 53. (in Chinese)
- 蔡 华, 夏海武, 袁庆军. 2007. 利用新生子叶制备牡丹染色体的研究. *生物学通报*, 42 (6): 51 - 53.
- Chen Jin-feng, Qian Chun-tao. 2002. Studies on chromosome preparations using plant tendril as source tissue. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (4): 378 - 380. (in Chinese)
- 陈劲枫, 钱春桃. 2002. 利用几种园艺作物卷须制片鉴定染色体数目的研究. *园艺学报*, 29 (4): 378 - 380.
- Li Mao-xue, Chen Rui-yang. 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 3 (4): 297 - 302. (in Chinese)
- 李懋学, 陈瑞阳. 1985. 关于植物核型分析的标准化问题. *武汉植物学研究*, 3 (4): 297 - 302.
- Li Mao-xue, Zhang Zan-ping. 1996. *Crop chromosome engineering and technology*. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese)
- 李懋学, 张赞平. 1996. 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社.
- Levan A K, Fredga K, Sanderg A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201 - 220.
- Mithen R, Faulkner K, Magrath P. 2003. Development of isothiocyanate-enriched broccoli and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (4): 727 - 734.
- Qian Chun-tao, Luo Xiang-dong, Chen Jin-feng, Wu Si-yang. 2002. Confirming chromosome number in chayote [*Sechium deule* (Jacq.) Swartz] using its tendrils. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 25 (2): 113 - 114. (in Chinese)
- 钱春桃, 罗向东, 陈劲枫, 吴斯洋. 2002. 利用卷须制片确认佛手瓜染色体数目. *南京农业大学学报*, 25 (2): 113 - 114.
- Stebbins G L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold Ltd.
- Wan Shuang-fen, Zhang Shu-ning, Zhang Jie. 2006. Pollen mother cell mitosis and male gametophyte development in *B rassic a oleracea* L. var *italica* Plenck. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 26 (5): 970 - 975. (in Chinese)
- 万双粉, 张蜀宁, 张 杰. 2006. 青花菜花粉母细胞减数分裂及雄配子体发育. *西北植物学报*, 26 (5): 970 - 975.
- Xiao Zeng-kuan, Chen Yi-li, Lü Wen-he, Zou De-tang. 1994. Karyotype analysis of tetraploid potatoes (*S. tuberosum*). *Chinese Potato Journal*, 8 (2): 81 - 84. (in Chinese)
- 肖增宽, 陈伊里, 吕文河, 邹得堂. 1994. 四倍体马铃薯 (*S. tuberosum*) 核型分析. *马铃薯杂志*, 8 (2): 81 - 84.