

龚志云,张明亮,薛超,等.小桐子高分辨率细胞学图的建立[J].江苏农业科学,2013,41(11):377-381.

小桐子高分辨率细胞学图的建立

龚志云,张明亮,薛超,石国新,刘秀秀

(扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室/教育部植物功能基因组学重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要:摸索出小桐子高分辨率细胞学图的建立方法,在小桐子的染色体制片过程中,根尖的长短、预处理的时间、酶解相关因素对试验影响较大。小桐子根尖长度为 1.5~2.0 cm,0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 2 h 时,37℃ 酶解 1.5 h 后得的染色体浓缩程度适宜,分散均匀、形态清晰、细胞分裂相较多,没有细胞质覆盖。小桐子花粉母细胞直径在 2 mm 左右能获得较多粗线期染色体浓缩的分裂相。

关键词:小桐子;高分辨率;染色体

中图分类号: Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0377-04

荧光原位杂交技术作为一项分子细胞遗传学工具,具有灵敏、特异、准确、安全、快速、高效等特点,在人类、动植物、微生物诸多领域获得了广泛应用。近年来,利用 FISH 技术对植物进行有关基因组物理图谱构建、染色体核型分析、物种亲缘进化、功能基因定位、转基因位点检测等方面的研究日渐增多^[1-5]。小桐子作为能源植物^[6-9]运用 FISH 技术进行细胞学研究意义深远,而 FISH 技术成功应用的前提是要求制片过程中,制作出染色体标本分裂相多、杂质少、染色体分散且形态好的标本。对于小桐子来说,染色体制片方面研究少有报道^[10],小桐子细胞质浓厚、染色体体形相对较小、中期分裂指数低、相邻染色体形态相似等。采用常规压片方法,染色体很难分散,细胞质残留多、背景深,且原位杂交前冷冻揭片步骤不好掌握^[11]。而酶解去壁低渗火焰干燥可以解决上述问题,近年来,众学者在水稻、甘蓝、芦笋、黄瓜、柑橘等^[12-15]作物探索过酶解去壁低渗法制备中期染色体技术,并取得了良好效果,特别是花粉母细胞染色体的制片,但在小桐子上还未见报道,建立一套小桐子高分辨率细胞学图十分必要。本试验借鉴其他植物制片技术的研究^[16-17],对影响小桐子中期染色体分裂指数和酶解去壁火焰干燥法制片效果的相关因子进行研究,并建立一套完整的小桐子高分辨率细胞学图的制备方法,为利用 FISH 技术开展小桐子分子细胞遗传学研究奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

小桐子种子、花蕾来自中国科学院华南植物研究所。选择适宜天气,将小桐子种子用 10 g/L 的 CuSO₄ 置于 26℃ 恒温箱吸胀 24 h,将吸胀好的种子播于泥土中。7 d 左右即会长出适宜的根尖,用于体细胞染色体制备。花蕾用乙醇:冰乙酸(3:1)固定液固定。

1.2 染色体的制备

在小桐子根尖生长适宜时期,收取大量根尖,置于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉 20℃ 恒温处理,预处理后的根尖经卡诺氏固定液固定,固定后的材料置于 -20℃ 冰箱中备用。

1.2.1 根尖染色体的制备 将经预处理并固定后的根尖用蒸馏水冲洗 2 次,然后切取 0.1~0.2 mm 的根尖生长点区置于 20 g/L 纤维素酶和 10 g/L 果胶酶的混合液中进行酶解去壁处理。吸去酶混合液将酶解好的根尖用新配的卡诺氏固定液清洗 3 次,然后再加入适量固定液固定 5 min 以上,并置于 -20℃ 冰箱中备用。

制片按 Kurata 的方法^[18]稍加修改进行,取清洗干净的载玻片,从冰箱中取出备用的根尖,置于载玻片上,滴加适量固定液,用镊子迅速敲碎根尖,于载玻片上滴加适量固定液,置于酒精灯上点燃,使其充分燃烧,将玻片置于玻片框中,晾干待用。取晾干的玻片,加入 20 μL 含有 2 μL/mL DAPI 的抗褪色剂,缓缓盖上盖玻片,压片,观察,拍照。

1.2.2 花粉母细胞染色体的制备 制片按 Wu 的方法^[19]稍加修改进行,从冰箱中取出固定好的材料,取一朵小花置于载玻片上,在解剖镜下,用镊子和解剖针取出花药,去掉其他杂质,滴一滴醋酸洋红,用解剖针迅速将花药捣碎,盖上盖玻片,用滤纸吸取多余染色液,可在显微镜下检查玻片质量,符合要求的玻片,然后马上用酒精灯烤片,烤好后在玻片一侧加适量 45% 醋酸,在另一侧用吸水纸将醋酸洋红吸去,烤片,置于液氮 2 min,取出玻片,迅速揭去盖玻片,晾干待用。取晾干的玻片,加入 20 μL 含有 2 μL/mL DAPI 的抗褪色剂,缓缓盖上盖玻片,压片,观察,拍照。

2 结果与分析

2.1 影响小桐子根尖染色体标本制备效果的因素

2.1.1 根长对染色体制片效果的影响 分别当根长至 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 cm 长度时,切取生长健壮的根尖,置于体积 10 倍于材料的卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)中固定 2 h,然后采用常规制片法进行有丝分裂指数和中期分裂指数的统计(表 1)。

$$\text{分裂相指数} = \frac{\text{分裂相数}}{\text{观察细胞总数}} \times 100\% ;$$

收稿日期:2013-05-02

基金项目:国家“973”计划(编号:2010CB126603);教育部霍英东教育基金会高等院校青年教师基金(编号:131030)。

作者简介:龚志云(1975—),女,博士,主要从事植物染色体分子生物学研究。Tel:(0514)87979304;E-mail:zygong@yzu.edu.cn。

前中期分裂指数 = $\frac{\text{前中期分裂相数}}{\text{观察细胞总数}} \times 100\%$ 。

表 1 小桐子根尖长度对细胞分裂指数的影响

根尖长度 (cm)	观察细胞 数(个)	分裂相数 (个)	分裂相指 数(%)	前中期分 裂数(个)	前中期分裂 相指数(%)
0.50	3 520	235	6.67	16	0.45
1.00	3 627	286	7.86	23	0.63
1.50	3 346	320	9.56	42	1.26
2.00	3 600	428	11.89	86	2.39
2.50	3 660	396	10.82	68	1.86
3.00	3 608	307	8.51	49	1.36

由表 1 可见,根尖长度对细胞分裂指数有明显的影响。当根长 2.0 ~ 2.5 cm 时切取,效果最好,细胞分裂指数为 10.85% ~ 11.89%,其中中期或前中期染色体分裂相指数能够达到 1.86% ~ 2.39%。根尖过短,分裂相较少,且染色质浓厚,染色体不易分散;根尖过长,分裂相也明显减少。

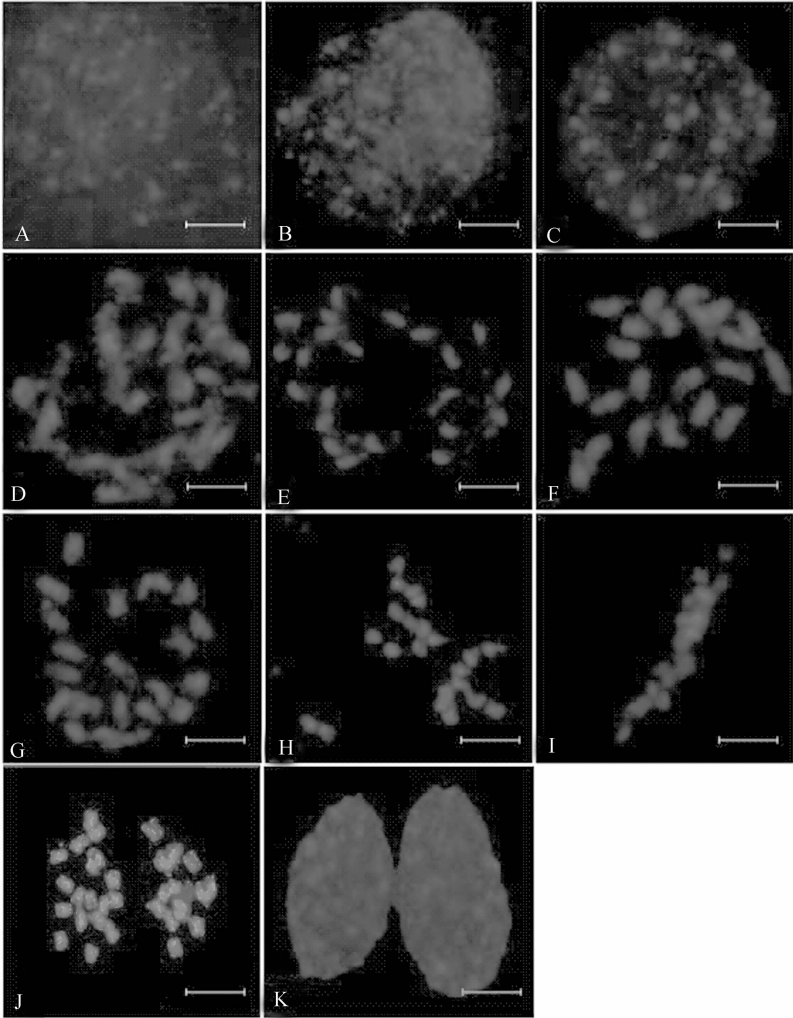
2.1.2 预处理时间对制片效果的影响 0.002 mol/L 8-HQ 在不同时间的预处理中,1 h 染色体凝缩不足,拖尾较严重;

2 h 染色体浓缩程度适宜,分散均匀,形态清晰,细胞分裂相较多;3 h 染色体浓缩过度,形态模糊,染色体之间很难辨认,所以 2 h 是理想的预处理时间。

2.1.3 酶解时间对染色体制片效果的影响 在酶解去壁方面,用 20 g/L 纤维素酶和 10 g/L 果胶酶的混合液在 37 ℃ 下酶解,设置了酶解时间梯度,处理温度和时间设置分别为 37 ℃ 下酶解处理 60、70、80、90、100、110、120、130 min。结果发现,若酶解时间太短,如 37 ℃ 消化 60 min 或 70 min 则达不到处理效果,染色体不能清晰分开,且染色质残留较多,呈很厚的云雾状;消化 100 min 能较完全地去掉细胞壁和细胞膜,DAPI 染色后在荧光显微镜下可清晰观察到明亮的中期或前中期染色体,无细胞质或细胞质极淡,并且染色体分散很好。酶解时间过长,如 37 ℃ 消化 130 min 则会造成染色体形态模糊,难以辨认。

2.2 小桐子体细胞高分辨率细胞学图的建立

通过以上相关影响因素研究,在取材根尖长度、根尖预处理、酶解时间都适宜的情况下,本试验共收集了 520 根根尖,用火焰干燥法制取了 100 张玻片,拍摄了 428 张图片,选取相对适合的组建一套小桐子高分辨率细胞学图。



A~C—小桐子有丝分裂间期; D~H—小桐子有丝分裂前期; I—小桐子有丝分裂中期; J—小桐子有丝分裂后期; K—小桐子有丝分裂末期。图中染色体以DAPI染色,所有标尺均为10 μm

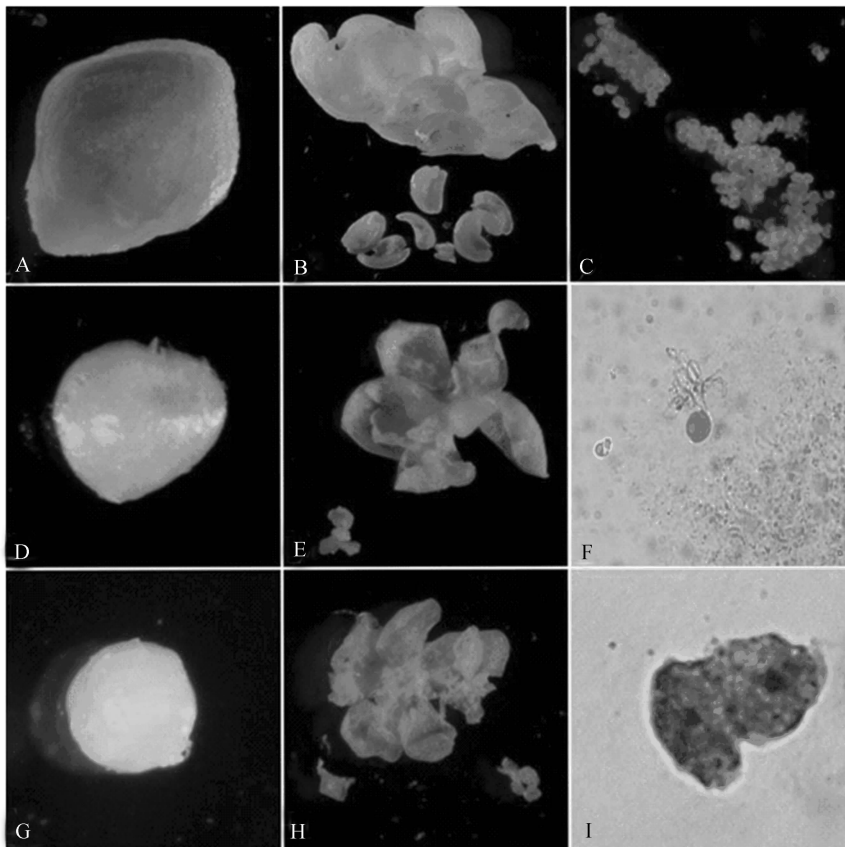
图1 小桐子高分辨率细胞学图

从图 1 可以看出,所有细胞已没有染色质的覆盖,染色质或染色体能很好分散出来。在小桐子有丝分裂间期细胞中(图 1-A、B、C),染色质没有高度螺旋化形成染色体,但常染色质和异染色质非常明显,常染色质区着色浅,比较分散,而异染色质区着色深,呈颗粒状,比较浓缩。在细胞分裂进入前期后,染色质开始浓缩形成染色体。染色体在间期中已经复制,每条染色体由 2 条染色单体组成。染色体散于细胞质中。从分裂早前期到后前期的过程中染色体越来越浓缩(图 1-D~H)。随后进入有丝分裂中期(图 1-I),染色体浓缩变粗,小桐子的所有染色体排列在赤道面上。在小桐子有丝分裂后期(图 1-J),每条染色体的 2 条姊妹染色单体分开并移向两极。小桐子根尖细胞进入有丝分裂末期(图 1-K),到达两极的染色体首先解螺旋而轮廓消失,全部染色体构成一个大染色质块,细胞一分为二。

2.3 影响小桐子花粉母细胞染色体制片的相关因素

2.3.1 取材对制片效果的影响 提供的材料时期要适宜,获得处于适当减数分裂期的材料是制片成败的关键,需选择有大量花粉母细胞的花药进行观察,小桐子处于减数分裂时期的花药一般个头较大,整体呈乳白色。若花药颜色呈微黄色,一般不是理想材料。

2.3.2 制片过程中影响因素 花粉母细胞在压片过程中特别容易随染液溢出,滴加醋酸洋红宜少不宜多,稍后用镊子把所有可见花药壁残渣清除干净,如果清除不彻底,压片过程中细胞和染色体不容易分散压平,片面不清洁,影响观察,制作永久片时会引起材料的大量脱落。玻片在酒精灯上微烤轻微加热时,不可使染液煮沸。揭片过程中,取出玻片时,应迅速用刀片揭去盖玻片,将玻片置于手心来回摩擦,防止玻片冰冻结霜。



A—解剖镜下小孢子时期小桐子花粉母细胞; B—解剖镜下小孢子时期小桐子花药结构; C—解剖镜下小桐子花粉; D—解剖镜下减数分裂时期小桐子花粉母细胞; E—解剖镜下减数分裂时期小桐子花药结构; F—显微镜下减数分裂时期小桐子细胞学形态; G—解剖镜下个体偏小小桐子花粉母细胞; H—解剖镜下个体偏小小桐子花药结构; I—显微镜下间期小桐子细胞学形态

图2 小桐子不同时期花药及粗线期染色体制片

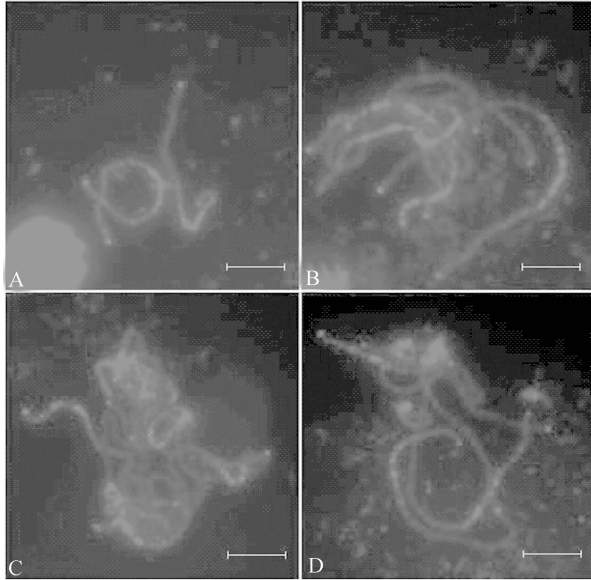
所取的小桐子花粉母细胞中,有部分小桐子花粉母细胞已过了减数分裂期,而进入了小孢子时期,小孢子时期的花粉母细胞形态上较大,外观上微黄(图 2-A),用镊子剥去花瓣,雄蕊较脆(图 2-B),很难用镊子捣碎,加上醋酸洋红,捣碎,解剖镜下观察,个体金黄发亮(图 2-C)。处于减数分裂时期的花粉母细胞个体外观呈乳白色,个体直径在 2 mm 左右(图 2-D),花瓣轻柔,用解剖针和镊子拨开花瓣,雄蕊相对柔软(图 2-E),加入醋酸洋红迅速捣碎,然后烤片,用

45% 的醋酸褪色烤片,在显微镜下观察可以看到大多数细胞处于减数分裂时期,处于减数分裂粗线期的细胞还可以清晰地看到染色体的分布(图 2-F),若取的花粉母细胞外观上看个体形态偏小,且个体呈透明状(图 2-G),这个时期的花粉母细胞基本上处于减数分裂间期,用解剖针和镊子拨开花瓣,雄蕊太小,得不到完整的雄蕊(图 2-H),加入醋酸洋红迅速捣碎,然后烤片,用 45% 的醋酸褪色烤片,在显微镜下观察,可以看到很难看到的分裂期细胞,所有细胞基本上处于减数

分裂期的间期,处于间期的细胞形态较小(图 2-I)。

2.4 小桐子粗线期高分辨率细胞学图的建立

通过前期相关影响因素研究,取合适材料,注意相关因素的情况下,本试验共选取了大量花药,制备了 60 张玻片,拍摄了 327 张图片,确立小桐子粗线期高分辨率细胞学图。小桐子在粗线期,非姊妹染色单体结合紧密,二价体缩短变粗(图 3-A、3-B、3-C、3-D),染色体形态非常清晰,可以清楚看出常染色质和异染色质区域,并且单条染色体可以游离出来,便于后期的进一步研究。



图中染色体都以 DAPI 染色,所有标尺均为 10 μm

图3 小桐子粗线期染色体

3 结论与讨论

植物细胞的分裂活动有其自身发育的阶段性的,研究表明,根尖的长度与中期细胞分裂指数有密切关系。对于小桐子,通过不同根长的根尖取材观察,研究发现根长为 1.5~2.0 cm 时是小桐子根尖细胞分裂最为旺盛的时期,此时取材进行预处理易获得较多的中期或前中期分裂相细胞。预处理是染色体制片过程中的关键一步,它对于得到大量中期分裂相及清晰的染色体形态至关重要。不同材料,预处理剂适宜时间不同。试验表明,小桐子根尖用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 2 h 时,染色体浓缩程度适宜,分散均匀、形态清晰、细胞分裂相较多。在根尖染色体制备中,酶液所需的处理时间直接影响着酶解去壁的效果。本研究中通过对照试验在 37℃ 条件下,酶解时间以 1.5 h 左右效果最好。在试验过程中,如果更换使用不同厂商的酶,酶解时间需重新调整。本研究结果,小桐子根尖染色体制片取得了良好结果,染色体中期分裂相多,染色体分散良好,形态清晰,背景干净。制片可以不经预处理直接应用于 FISH 杂交,为利用体细胞染色体上开展 FISH 技术的相关研究奠定了基础^[20]。

一般情况下,一个花药内花粉母细胞发育时期是同步的,对于花粉母细胞选取正确时期,就有足够的材料进行粗线期染色体制片,这样大大方便了取材。另外与有丝分裂中期染色体相比,粗线期染色体的染色质更为疏松,更有利于高密度

物理图谱,高分辨的染色体物理图谱或细胞遗传学图的建立,无论是对于基因组的测序还是蛋白质组的研究,都是十分重要的^[21]。小桐子粗线期染色体具有许多在中期染色体上难以辨认的标记,如粗线期染色体上常染色质、异染色质、染色粒明显不同的分布。大多数植物中异染色质结合为大的染色体片段,围绕到着丝粒、端粒和核仁组织者,这些特征性异染色质区域,有助于单一染色体的识别。粗线期染色体伸展,长度是体细胞中期染色体的 10~15 倍,易于进行 FISH 探针杂交,杂交中可以大幅提高探针信号的检出率^[22~24]。

参考文献:

- [1] Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, et al. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae [J]. Annals of Botany, 2006, 97(2): 205-216.
- [2] Hasterok R, Ksiazczyk T, Wolny E, et al. FISH and GISH analysis of Brassica genomes [J]. Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica, 2005, 47(1): 185-192.
- [3] Maluszynska J, Hasterok R. Identification of individual chromosomes and parental genomes in Brassica juncea using GISH and FISH [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2005, 109(1/2/3): 310-314.
- [4] Yang K, Qi H Y, Zhu L Q, et al. Localization of S genes on extended DNA fibers (EDFs) in Brassica oleracea by high-resolution FISH [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(3): 277-284.
- [5] 孔芳, 蒋金, 吴磊, 等. 利用原位杂交及 CAPS 标记分析芸薹属 A、B 和 C 基因组间的关系 [J]. 作物学报, 2008, 34(7): 1188-1192.
- [6] Fairless D. Biofuel: the little shrub that could - maybe [J]. Nature, 2007, 449: 652-655.
- [7] Sato S, Hirakawa H, Isobe S, et al. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, Jatropha curcas L. [J]. DNA Research, 2011, 18: 65-76.
- [8] Modi M K, Reddy J R, Rao B V, et al. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(6): 1260-1264.
- [9] Jha T B, Mukherjee P, Datta M M, et al. Somatic embryogenesis in Jatropha curcas Linn., an important biofuel plant [J]. Plant Biotechnol, 2007(1): 135-140.
- [10] Carvalho C R, Clarindo W R, Praca M M, et al. Genome size, base composition and karyotype of Jatropha curcas L. [J]. Plant Science, 2008, 174: 613-617.
- [11] 林小虎, 李兴锋, 王黎明, 等. 麦类作物体细胞基因组原位杂交 (GISH) 效果影响因素的分析 [J]. 实验生物学报, 2005, 38(2): 126-132.
- [12] 卢军, 李乐玉, 朱利泉, 等. 一种高效稳定的甘蓝染色体制片新方法 [J]. 北方园艺, 2008(9): 148-150.
- [13] 杨晓玲, 程舟. 柑橘类植物染色体制片新技术 [J]. 同济大学学报: 自然科学版, 2005, 33(2): 242-244.
- [14] 周劲松, 陆斌, 汤泳萍, 等. 去壁低渗法制备芦笋染色体标本的研究 [J]. 江西农业学报, 2006, 18(2): 15-16.
- [15] 陈迪新, 宣章燕. 去壁低渗法在黄瓜染色体核型分析中的应用 [J]. 生物学通报, 2008, 43(4): 52-53.
- [16] Gong Z Y, Yu H X, Huang J, et al. Unstable transmission of rice chromosomes without functional centromeric repeats in asexual propagation [J]. Chromosome Research, 2009, 17: 863-872.

沈植国. 土耳其黄连木资源概况及对我国发展黄连木能源林的启示[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 381–382.

土耳其黄连木资源概况及对我国发展 黄连木能源林的启示

沈植国

(河南省林业科学研究院, 河南郑州 450008)

摘要:介绍了土耳其黄连木属种质资源的种类、分布、形态特征、种间关系等, 并对我国发展黄连木能源林产业提出了建议。

关键词:土耳其; 黄连木; 种质资源

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)11–0381–02

黄连木属(*Pistacia* L.) 属于漆树科(Anacardiaceae), 本属植物约 10 种, 主要分布于地中海沿岸, 阿富汗, 亚洲中部、东部、东南部等地区。我国有 3 种, 分别是中国黄连木(*P. chinensis* Bunge)、清香木(*P. weinmannifolia* J. Poisson ex Franch.)、阿月浑子(*P. vera* L.)^[1]。中国黄连木是优良的油料树种, 果实含油率约 40%, 果肉含油率超过 50%, 是一种不干性油, 可作工业原料或食用油, 以黄连木种子为原料生产的生物柴油的主要理化指标达到美国生物质燃料油以及中国轻质燃料油标准^[3–4]。近年来, 随着国家对生物质能源的重视, 研究人员对能源树种黄连木开展了广泛研究, 但主要限于中国黄连木^[5]。为了解国外黄连木资源分布及栽培情况, 促进我国黄连木能源林产业发展, 2012 年 12 月, 河南省林业科学研究院选派科研人员赴土耳其对土耳其黄连木资源概况进行了考察。本研究介绍了土耳其黄连木资源概况, 旨在为我国开发利用黄连木资源提供依据。

1 土耳其黄连木种质资源及分布概况

土耳其野生黄连木种质资源丰富, 约有 6 600 万株野生黄连木, 共有 5 种, 分别为黑黄连木(*P. terebinthus* L.)、大西洋黄连木(*P. atlantica* Desf.)、宽果黄连木(*P. eurycarpa* Yalt.)、埃及黄连木(*P. khinjuk* Stocks)、乳香黄连木(*P. lentiscus* L.) , 另外还有栽培种阿月浑子(*P. vera* L.)。野生种主要被用于当地消费、油料、肥皂生产, 多年来, 除乳香黄连木外, 其他野生种在土耳其主要被用作嫁接阿月浑子的砧木^[6–8]。有学者认为, 土耳其地中海和爱琴海沿岸分布有巴勒氏登黄连木(*P. palaestina* Bois.)^[8], 但不少学者认为巴勒氏登黄连木是黑黄连木的亚种。黑黄连木是土耳其最主要的野生黄连木资源, 除了极端寒冷和雨量过多的地方, 几乎分布于土耳其的所有地区, 能生长在岩石、钙质、干旱地区, 具有较强的抗寒性、抗旱性。宽果黄连木和埃及黄连木主要分布在土耳其的东南部地区, 包括比特利斯(Bitlis)、马尔丁(Mardin)、哈卡里(Hakkari)等省。大西洋黄连木主要分布于马尔马拉海、爱琴海、地中海、黑海沿岸、安纳托利亚中部地区。乳香黄连木仅分布于地中海、爱琴海沿岸地区^[6–9]。

2 土耳其黄连木种质资源形态特征

Salih 教授对土耳其野生黄连木种质资源的形态特征及

收稿日期: 2013–04–13

基金项目: 国家林业局“948”项目(编号: 2011–4–35); 河南省郑州市金水区科技公关项目(编号: 2011–31–3)。

作者简介: 沈植国(1977—), 男, 河南辉县人, 硕士, 高级工程师, 从事能源树种、园林树木等研究。E-mail: smess123@sina.com。

[17] Gong Z Y, Yu H X, Yi C D, et al. Isolation and characterization of a rice chromosome 8 monosomic line occurred during tissue culture [J]. Prog Nat Sci, 2008, 18: 1507–1512.

[18] Kurata N O T. Karyotype analysis in rice I. A new method for identifying all chromosome pairs [J]. Jpn J Genet, 1978, 53: 251–255.

[19] Wu H K. Note on preparing of pachytene chromosomes by double mordant [J]. Scientific Agriculture, 1967, 15: 40–44.

[20] Han Y H, Zhang Z H, Liu J H, et al. Distribution of the tandem repeat sequences and karyotyping in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by fluorescence *in situ* hybridization [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2008, 122(1): 80–88.

[21] Cheng Z, Buell C R, Wing R A, et al. Toward a cytological charac-

terization of the rice genome [J]. Genome Res, 2001, 11: 2133–2141.

[22] Koo D H, Nam Y W, Choi D, et al. Molecular cytogenetic mapping of *Cucumis sativus* and *C. melo* using highly repetitive DNA sequences [J]. Chromosome Res, 2010, 18(3): 325–336.

[23] Koo D H, Chio H W, Cho J, et al. A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. ‘Winter long’) revealed by C-banding, pachytene analysis, and PAPD-aided fluorescence *in situ* hybridization [J]. Genome, 2005, 48(3): 534–540.

[24] Koo D H, Plaha P, Lim Y P, et al. A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence *in situ* hybridization [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(7): 1346–1352.