

黄瓜倍性材料创制及染色体组成的 FISH 鉴定

管 苇, 张云霞, 杨树琼, 陈劲枫, 娄群峰

(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:【目的】黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 遗传基础狭窄, 种质资源多样性较为有限, 遗传育种研究相对落后。本试验旨在创制整倍体和非整倍体黄瓜种质材料, 建立其准确的染色体组成鉴定方法, 为进一步选育黄瓜各种染色体、目标性状的染色体定位及遗传育种研究奠定基础。【方法】以华北生态型黄瓜‘长春密刺’的高代自交系为材料, 0.4%秋水仙素溶液处理萌动种子, 诱导染色体数目加倍。为获得同源三倍体材料, 以诱导获得的同源四倍体为母本, 二倍体为父本进行杂交, 授粉 35—45 d 后采收成熟果实进行胚拯救。采用染色体计数, 结合形态学、叶片气孔电镜观察, 对诱导株及杂交后代的倍性进行鉴定。利用染色体特异的探针进行荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 通过观察特异探针在染色体上杂交信号的数目、强弱及位置, 结合黄瓜的染色体形态参数, 对诱导株的染色体组成进行鉴定。【结果】对经秋水仙素处理的‘长春密刺’材料进行有丝分裂中期染色体计数观察, 结果显示诱导获得 8 株四倍体 ($2n=28$), 3 株非整倍体 ($2n=16, 19, 27$) 材料。将四倍体与二倍体杂交获得了三倍体材料 ($2n=21$)。经荧光原位杂交分析, 根据黄瓜着丝粒探针 Type III 和核糖体 45S rDNA 两类信号在染色体上的信号特征可以看出, 与二倍体相比, 三倍体与四倍体上杂交信号为倍性变化关系, 进一步验证创制出的整倍性材料为三倍体与四倍体。不同倍性‘长春密刺’植株的形态学特征存在一定差异, 四倍体植株的形态指标与二倍体差异显著; 三倍体植株与二倍体在形态学上差异不显著; 非整倍体植株与二倍体在形态学上差异也不显著, 但其长势较二倍体弱, 且花期推迟, 雌雄花花期不遇, 坐果率明显低于二倍体。经叶片气孔电镜观察, ‘长春密刺’二倍体、三倍体与四倍体植株叶片气孔的大小与密度均存在差异, 随着倍性提高, 气孔的长度和宽度增加, 而气孔密度则下降, 说明形态学筛选和叶片气孔电镜观察可以作为鉴定黄瓜倍性的辅助方法。以上述两类黄瓜重复序列 (Type III 和 45S rDNA) 和染色体特异的单拷贝基因 *Csa006700* 为探针, 对染色体数目为 16 的一株非整倍体诱导株进行染色体组成鉴定。重复序列的荧光原位杂交结果显示, 额外的两条染色体为 1 号或 2 号染色体。进一步利用黄瓜 2 号染色体端部的基因 *Csa006700* 探针检测, 发现该基因只在其中一对染色体上有信号, 由此明确该材料为附加两条 1 号染色体的四体材料 ($2n=14+2$)。研究表明秋水仙素不仅可直接诱导出同源多倍体, 同时可诱导各种非整倍体植株。【结论】利用秋水仙素处理黄瓜萌动种子, 诱导染色体倍性的变化, 结合染色体特异探针的荧光原位杂交鉴定, 可快速创制并筛选出各种染色体组成的特异新种质。

关键词: 黄瓜; 秋水仙素; 整倍体; 非整倍体; 荧光原位杂交

Creation and Chromosome FISH Identification of Cucumber Materials with Different Ploidies

GUAN Wei, ZHANG Yun-xia, YANG Shu-qiong, CHEN Jin-feng, LOU Qun-feng

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

收稿日期: 2014-02-25; 接受日期: 2014-04-16

基金项目: 国家“863”计划项目 (2012AA100102)、国家“973”计划项目 (2012CB113900)、国家自然科学基金 (31272174)、“十二五”国家科技支撑计划 (2013BAD01B04-10)、江苏省农业科技自主创新资金 (CX (11) 1002)

联系方式: 管苇, E-mail: 2012804139@njau.edu.cn. 张云霞, E-mail: 2012104071@njau.edu.cn. 管苇和张云霞为同等贡献作者。通信作者娄群峰, E-mail: qflou@njau.edu.cn

Abstract: 【Objective】 The narrow genetic basis and limited genetic diversity of germplasm resources were the main bottlenecks of genetic and breeding researches of cucumber (*Cucumis sativus* L.). This research aimed to create different euploidy and aneuploidy cucumber germplasm materials, and to establish a reliable method for identifying chromosomal constitution of the new materials, which would lay a foundation for the researches of screening chromosome lines, chromosome localization and genetic breeding. 【Method】 The germinating seeds of the North China ecotype inbred line ‘Changchunmici’ of *C. sativus* were treated with 0.4% colchicine solution to induce the chromosome doubling. Autotriploid was obtained through culturing the 35-45 d zygotic embryo from the cross of the induced autotetraploid and diploid. The chromosomal ploidy or number of the induced plants and hybrids were investigated using chromosome counting, combined with the morphology, leaf stomata under electron microscope scanning. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was carried out to ascertain the chromosomal constitution of the induced plants based on the number, intensity and location of specific probe signals. 【Result】 According to the ploidy identification based on the mitotic metaphase chromosome number, eight autotetraploidy plants ($2n=28$) and three aneuploidy plants ($2n=16, 19$, or 27) were obtained in this study. Autotriploid plants ($2n=21$) were produced from the cross of autotetraploid and diploid. FISH signals of Type III (cucumber centromere probe) and 45S rDNA were multiple changes among diploid, triploid and tetraploid. The result further indicated the ploidy level. There were differences in morphologic characteristics among different ploidy plants of ‘Changchunmici’. Compared with diploid, tetraploid had significant differences in morphologic characteristics. The difference among triploid, aneuploidy and diploid were not significant, but the aneuploid grew weaker and with late flowering period and low fruit setting rate. Results from leaf stomata under electron microscope scanning showed that there were differences among different ploidy plants. With the increase of ploidy, the length and width of leaf stomata rose notably, but the stomatal density declined obviously, which could be used as an aid for identifying the ploidy of cucumber. The tandem repetitive sequence (45S rDNA and Type III) and chromosome-specific single copy gene *Csa006700* were used as FISH probes to identify chromosomal constitution of the aneuploidy plant with the chromosome number of 16. FISH results from repetitive probes on the mitotic metaphase chromosomes showed that the extra two chromosomes were chromosomes 1 or 2. Further, the chromosome 2 specific gene probe-*Csa006700* showed the signals on one pair of chromosomes. These results confirmed that this aneuploidy plant was assigned as tetrasome polyploidy with two extra chromosome 1 of cucumber ($2n=14+2$). These results confirmed that colchicine could directly not only induce autopolyploid, but also induce a variety of aneuploid. 【Conclusion】 It is a rapid method to create cucumber different euploidy and aneuploidy germplasm materials using colchicine, and the chromosomal constitution could be identified by FISH analysis based on the chromosome specific probes.

Key words: cucumber; colchicine; euploid; aneuploid; fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

0 前言

【研究意义】染色体数目的变异是种内性状多样化的重要基础,也是遗传与育种学家关注的重要研究内容。染色体数目变异类型主要包含整倍体和非整倍体两大类。其中多倍体较二倍体具有更强的遗传可塑性和更好的生理适应性,在产量和品质方面往往优于二倍体^[1],在一些重要性状的表达上,同源加倍的过程具有重要意义^[2]。多倍体还是育种学和遗传学研究的重要中间材料,利用染色体多倍化可有效克服远缘杂交障碍,提高育种效率;而非整倍体材料在基础研究和作物育种中都具有重要价值,不仅可用于创制新种质,还可用于基因定位和连锁遗传分析^[3]。创制染色体数目变异材料,并快速准确鉴定染色体数目组成及来源,可为育种提供细胞遗传学依据,为其遗传特性和育种用途的研究奠定理论基础。【前人研究进展】关于黄瓜不同倍性染色体系创制的研究已有报道。多

倍体主要通过化学药剂诱导获得,其中最常用的化学药剂为秋水仙素。Nikolova^[4]、陈劲枫^[5]和鄢郁霖等^[6]利用秋水仙素成功诱导出同源四倍体材料;刁卫平等^[7-8]对单倍体组织培养过程中形成的胚进行再生培养也获得了少量同源四倍体植株;刁卫平等^[9-11]通过二、四倍体杂交直接获得了同源三倍体材料,并将同源三倍体与二倍体杂交获得了4种表型的三体植株,但没有对其染色体组成进行进一步的分析。非整倍体在二倍体群体中自然发生的几率很小,主要通过杂交和回交的方法获得。近年,随着分子细胞遗传学在倍性育种中的不断发展,荧光原位杂交技术已成为一种有效的鉴定手段,不仅能快速分析出植株的倍性,而且能利用特定的序列探针准确识别不同染色体。在葫芦科作物中,陈劲枫等^[12]、Koo^[13]等对黄瓜及其近缘物种最早进行了研究,利用FISH技术对45S和5S rDNA在有丝分裂中期染色体上的物理位置进行了定位。Zhao等^[14]利用多个重复序列探针针对黄瓜7对有丝

分裂中期的染色体进行了区分, 并建立了 FISH 核型图。徐延浩等^[15]通过建立南瓜、丝瓜和冬瓜带有 45S 和 5S rDNA 标记的 FISH 核型图, 比较了 3 种葫芦科作物基因组中 rDNA 位点和数目分布的差异。李琦等^[16]成功将 45S rDNA 和 5S rDNA 定位到了西瓜、苦瓜与罗汉果中。在前期研究中, 获得了黄瓜染色体特异的单拷贝基因探针, 可用于准确识别特定的黄瓜染色体^[17]。这些研究为黄瓜染色体数目变异材料的创制与快速鉴定提供了可靠保证。【本研究切入点】前人研究中, 利用秋水仙素诱导同源四倍体的报道较多, 但直接利用秋水仙素诱导并鉴定出非整倍体的研究报道较少。对诱导株的染色体倍性鉴定多以形态学鉴定和染色体计数相结合, 利用荧光原位杂交进行诱导材料的倍性鉴定和染色体组成分析尚未见报道。【拟解决的关键问题】利用秋水仙素溶液处理华北型黄瓜自交系‘长春密刺’萌动种子, 诱导染色体数目变异, 采用重复序列及染色体特定基因为探针的荧光原位杂交鉴定方法, 结合形态学、叶片气孔电镜观察手段, 快速鉴定获得的黄瓜多倍体和非整倍体, 为黄瓜的种质创新和遗传改良提供材料。

1 材料与方法

试验于 2013 年秋在南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室进行。

1.1 试验材料

华北型黄瓜 (*Cucumis sativus*) 品种‘长春密刺’ ($2n=2x=14$) 的高代自交系。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导方法 参照陈劲枫等^[5]的诱导方法, 用 0.4%秋水仙素溶液浸泡已露出 0.5—1.0 cm 长胚根的‘长春密刺’萌动种子 80 粒, 置于摇床上避光处理 4 h, 以清水处理为对照。处理后的种子用清水冲洗 3 次并播入 32 孔穴盘中。

为获得同源三倍体材料, 以诱导出的同源四倍体为母本, 二倍体为父本进行杂交。对授粉后 35—45 d 的成熟果实进行胚胎拯救, 果实经流水冲洗后在超净工作台上用 75%的乙醇进行表面消毒, 剖开果实取出种子, 切取近胚轴端的组织作为外植体接种在 MS+3%蔗糖+0.8%琼脂 (pH 5.8) 的培养基上, 于 2 000 lx、光照/黑暗 (16 h/8 h)、26℃组织培养室内培养。

1.2.2 形态学观察 参照雷春等^[18]的方法, 待幼苗长至两叶一心时, 对处理株进行苗期形态学鉴定, 筛选出诱导株, 并在营养生长期和生殖生长期对诱导材

料进行观察。

1.2.3 染色体制片 利用黄瓜卷须进行染色体制片, 参照陈劲枫等^[19]的去壁低渗火焰干燥法, 略作修改。于晴天上午取 1—2 cm 幼嫩卷须, 经 E/G 固定液 (乙醇: 冰醋酸=3:1) 于 4℃下固定 24 h, 切取卷须顶部 2—3 mm 分生区, 用 4%的纤维素酶 RS 和 2%的果胶酶 Y-23 混合溶液, 37℃酶解 90 min 后, 水洗、固定, 采用火焰干燥法制片。三倍体组培材料的染色体制片参照曹清河等^[20]的方法。

1.2.4 荧光原位杂交 荧光原位杂交和信号检测参照 Lou 等^[21]的方法, 略作修改。

探针类型: (1) 重复序列: 45S rDNA 和着丝粒探针 Type III^[14]; (2) 2 号染色体特异基因探针 Csa006700^[17] (用于区分黄瓜 1 号和 2 号染色体)。通过缺刻平移法, 用地高辛-dUTP (Digoxigenin-dUTP, Dig-dUTP) 标记 45S rDNA 和 Csa006700 探针, 用生物素-dUTP (Biotin-dUTP, Bio-dUTP) 标记 Type III。

荧光原位杂交: (1) 染色体变性与杂交: 选择染色体分散良好的制片, 加 70%的去离子甲酰胺于 80℃变性, 以系列乙醇 (70%、90%、100%) 脱水晾干, 加上杂交混合液 (含去离子甲酰胺、2×SSC、50%硫酸葡聚糖、已标记的 DNA 探针), 置于杂交盒中 37℃杂交过夜。(2) 洗脱与信号检测: 将染色体制片依次置于 2×SSC、1×TNT 中洗涤, 加上带荧光信号的抗体, 置于杂交盒中 37℃杂交 40 min。玻片经 1×TNT 洗涤晾干后, 加上 DAPI 复染, 压片后在荧光显微镜下观察。

1.2.5 叶片气孔电镜观察 待幼苗长出 2—3 片真叶时, 以二倍体植株叶片气孔作为对照, 对叶片气孔大小、密度进行观察, 分析气孔大小与倍性的关系。方法参照叶德友等^[22], 略作修改。于叶片靠近中脉区域剪取 0.5 cm×0.5 cm 的叶块, 迅速用 2.5%戊二醛固定 2 h, 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 经 50%、60%、90%乙醇脱水干燥, 样品表面喷镀金属膜, 在扫描电镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 不同染色体数目黄瓜材料的获得

‘长春密刺’经秋水仙素诱导处理后, 出苗迟缓, 且出苗不整齐。部分单株子叶较小, 向外翻卷, 前两片真叶出现畸形。部分植株出现明显的多倍化特征, 表现为叶片变大变厚, 表面绒毛较密, 茎秆变粗, 节

间缩短等特征。待植株长到 10 节以上时,利用幼嫩卷须的顶端生长点进行染色体数目的鉴定,共从 80 株处理株中鉴定出 8 株四倍体 ($2n=28$), 3 株非整倍体 ($2n=16, 19, 27$)。

用同源四倍体材料和二倍体进行杂交,授粉后约 40 d,取种子进行胚培养,利用组培苗根尖鉴定技术对部分杂交后代组培材料进行了倍性鉴定。在鉴定的 20 份材料中,12 份组培材料为三倍体 ($2n=21$), 其余 8 份为二倍体 ($2n=14$)。

2.2 黄瓜整倍体材料的形态及染色体鉴定

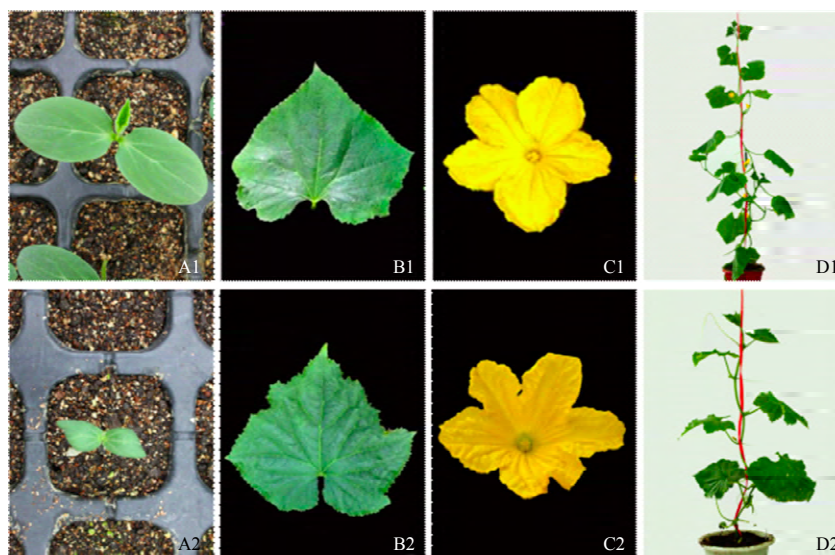
2.2.1 形态学观察

不同倍性‘长春密刺’植株的形态学特征存在一定的差异,四倍体植株的各植物形态指标与二倍体差异显著,而三倍体植株与二倍体在形态学上差异不显著。

处于营养生长期时,四倍体植株幼苗较二倍体生

长缓慢。四倍体真叶叶面积较大,叶片增厚,叶色较深,叶脉明显,叶缘褶皱,叶片不平整,叶片基部夹角较小,甚至呈现交叉现象;二倍体真叶叶面积较小,叶片较薄,叶色较浅,叶脉相对较细,叶片平整,叶片基部呈“U”形。四倍体茎较粗,节间距较短,植株整体呈“矮胖”状;二倍体茎较细,节间距较长,植株整体呈“高瘦”状(图 1)。

处于生殖生长期时,四倍体与二倍体雌雄花存在明显差异。四倍体花朵较大,花色为亮黄色,花瓣多为六瓣,花瓣较厚,表面有皱褶,雄花花药、花丝和雌花花柱膨大变粗,子房纵径较小、横径较大,呈现“短胖”状;二倍体花朵较小,花色为浅黄色,花瓣多为五瓣,花瓣较薄,表面较平整,雄花花药、花丝和雌花花柱相对较小,子房纵径较大、横径较小,呈现“长瘦”状。



A1: 二倍体子叶; B1: 二倍体真叶; C1: 二倍体雄花; D1: 二倍体植株。A2: 四倍体子叶; B2: 四倍体真叶; C2: 四倍体雄花; D2: 四倍体植株
A1: Cotyledon of diploid; B1: Leaf of diploid; C1: Male flower of diploid; D1: Plant of diploid. A2: Cotyledon of tetraploid; B2: Leaf of tetraploid; C2: Male flower of tetraploid; D2: Plant of tetraploid

图 1 二倍体与四倍体黄瓜植株形态比较

Fig. 1 Comparison of morphology between diploid and tetraploid plants

2.2.2 荧光原位杂交鉴定

用 Bio-dUTP 标记的 Type III 探针和 Dig-dUTP 标记的 45S rDNA 探针与‘长春密刺’有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交,绿色信号为 Type III,红色信号为 45S rDNA,蓝色为 DAPI 复染的有丝分裂中期染色体(图 2)。

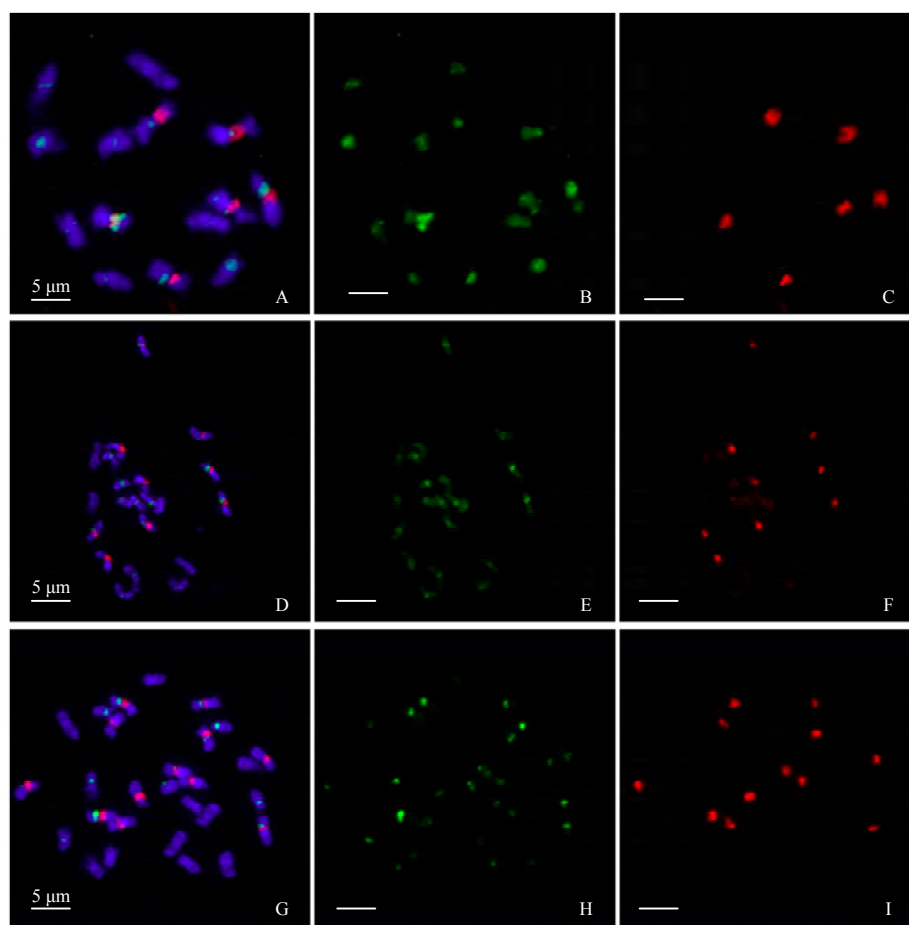
根据染色体制片分析结果,确定出候选四倍体 ($2n=28$) 和三倍体 ($2n=21$) 材料。为了确定本研究

诱导的候选染色体加倍材料为整倍体,参考 Zhao 等^[14]的黄瓜核型图,分析黄瓜着丝粒探针 TypeIII 和 45S rDNA 探针在候选多倍体中期染色体上的荧光原位杂交信号特征,包括信号的数目、位置、强度等信息,鉴定候选多倍体的染色体核型,由此分析出诱导株的整倍性。

用 Bio-dUTP 标记的 Type III 探针和 Dig-dUTP 标记的 45S rDNA 探针与中期染色体杂交(图 2)。Type

III 为着丝粒序列, 在‘长春密刺’二倍体中期染色体, 表现为 14 个信号 (图 2-B); 在候选三倍体中期染色体上, 共有 21 个信号 (图 2-E); 在候选四倍体中期染色体上, 共有 28 个信号 (图 2-H)。45S rDNA 在二倍体中期染色体上有 6 个较强的信号, 分别位于 3 对同源染色体上 (图 2-C); 在候选三倍体中期染色体上有 9 个较强的信号 (图 2-F); 在候选四倍体中期染色体上有 12 个较强的信号 (图 2-I)。从两类信号在染色体上的强弱和组合特征可以看出, 与二倍体相比, 三倍体与四倍体上信号为倍性变化的关系。由此表明创制出的整倍性材料为三倍体与四倍体。

2.2.3 叶片气孔电镜观察鉴定 ‘长春密刺’二倍体、三倍体与四倍体植株叶片气孔比较, 其大小与密度均存在差异 (图 3)。由表 1 可知二倍体对照株单位视野内气孔数目为 (982 ± 80) 个/ mm^2 ; 三倍体诱导株单位视野气孔数目为 (818 ± 78) 个/ mm^2 , 较二倍体对照株减少了 16.70%; 四倍体诱导株单位视野气孔数目为 (570 ± 82) 个/ mm^2 , 较二倍体对照株减少了 41.96%。而二倍体对照株气孔的平均长和宽分别为 $14.1 \mu\text{m} \times 9.8 \mu\text{m}$, 三倍体诱导株气孔的平均长和宽分别为 $15.8 \mu\text{m} \times 10.2 \mu\text{m}$, 四倍体诱导株气孔的平均长和宽分别为 $18.2 \mu\text{m} \times 13.0 \mu\text{m}$ (图 3)。



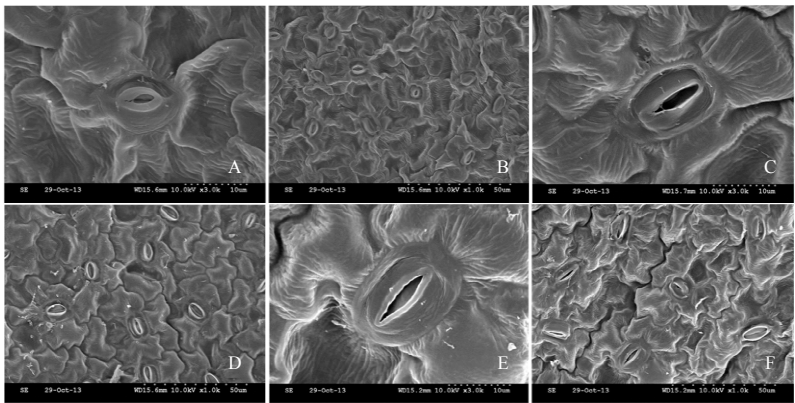
A—C: 二倍体荧光原位杂交结果; A: Type III (绿色) 和 45S rDNA (红色) 与 DAPI 复染的染色体 (蓝色) 合成图; B: Type III (绿色) 杂交信号; C: 45S rDNA (红色) 杂交信号。D—F: 三倍体荧光原位杂交结果; D: Type III (绿色) 和 45S rDNA (红色) 与 DAPI 复染的染色体 (蓝色) 合成图; E: Type III (绿色) 杂交信号; F: 45S rDNA (红色) 杂交信号。G—I: 四倍体荧光原位杂交结果; G: Type III (绿色) 和 45S rDNA (红色) 与 DAPI 复染的染色体 (蓝色) 合成图; H: Type III (绿色) 杂交信号; I: 45S rDNA (红色) 杂交信号
A-C: FISH result of diploid; A: A merged image of the mitotic metaphase chromosome and the FISH signals; B: FISH signals of Type III (green); C: FISH signals of 45S rDNA (red). D-F: FISH result of triploid; D: A merged image of the mitotic metaphase chromosome and the FISH signals; E: FISH signals of Type III (green); F: FISH signals of 45S rDNA (red). G-I: FISH result of tetraploid; G: A merged image of the mitotic metaphase chromosome and the FISH signals; H: FISH signals of Type III (green); I: FISH signals of 45S rDNA (red)

图 2 不同倍性黄瓜有丝分裂中期染色体荧光原位杂交

Fig. 2 FISH on mitotic metaphase chromosome of cucumber plants with different ploidy cucumbers

表 1 不同倍性黄瓜叶片气孔大小和数目的比较

植株倍性	气孔口长度	气孔口宽度	气孔器长度	气孔器宽度	气孔密度
Ploidy	Length of stomatal aperture (μm)	Width of stomatal aperture (μm)	Length of stoma (μm)	Width of stoma (μm)	Density of stoma (ind./mm ²)
二倍体植株 Diploid plants	3.2±0.41	1.2±0.38	14.1±1.52	9.8±2.01	982±80
三倍体植株 Triploid plants	7.5±0.77	1.8±0.33	15.8±1.21	10.2±0.89	818±78
四倍体植株 Tetraploid plants	9.1±1.38	1.9±0.76	18.2±2.11	13.0±1.88	570±82



A: 二倍体气孔 (3 000×) ; B: 二倍体气孔 (1 000×) ; C: 三倍体气孔 (3 000×) ; D: 三倍体气孔 (1 000×) ; E: 四倍体气孔 (3 000×) ; F: 四倍体气孔 (1 000×)
A: Stoma shape of diploid plants (3 000×); B: Stoma shape of diploid plants (1 000×); C: Stoma shape of triploid plants (3 000×); D: Stoma shape of triploid plants (1 000×); E: Stoma shape of tetraploid plants (3 000×); F: Stoma shape of tetraploid plants (1 000×)

图 3 不同倍性黄瓜叶片气孔比较

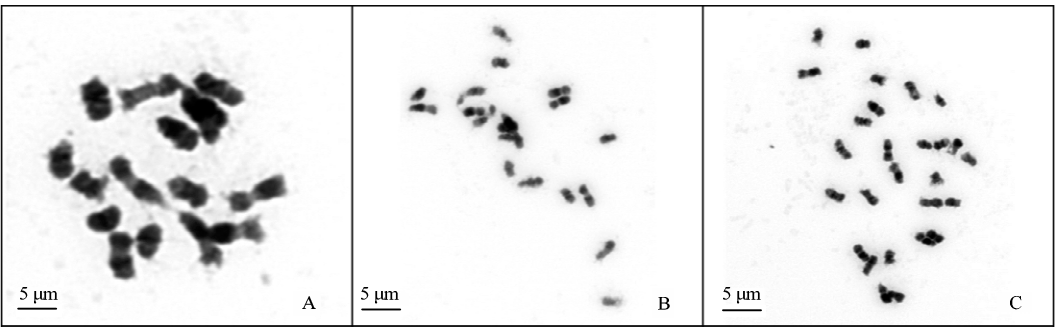
Fig. 3 Comparison of leaf stoma of different ploidy cucumbers

2.3 黄瓜非整倍体材料的形态及染色体鉴定

2.3.1 形态学观察 ‘长春密刺’ 非整倍体植株与正常二倍体植株相比，两者形态上差异不显著。在茎节、叶片、花器等方面，非整倍体植株与二倍体相似，但长势较二倍体弱，且花期推迟，雌雄花花期不遇，坐

果率明显低于二倍体。

2.3.2 荧光原位杂交鉴定 对 80 株处理株有丝分裂中期染色体进行计数观察，结果显示有 3 株染色体数目出现非整倍性变异，分别为 2n=16 的 1 号非整倍体 (Aneu-1，图 4-A)，2n=19 的 2 号非整倍体



A: Aneu-1, 染色体数目 2n=16; B: Aneu-2, 染色体数目 2n=19; C: Aneu-3, 染色体数目 2n=27
A: Aneu-1, Chromosome number 2n=16; B: Aneu-2, Chromosome number 2n=19; C: Aneu-3, Chromosome number 2n=27

图 4 非整倍体黄瓜有丝分裂中期染色体

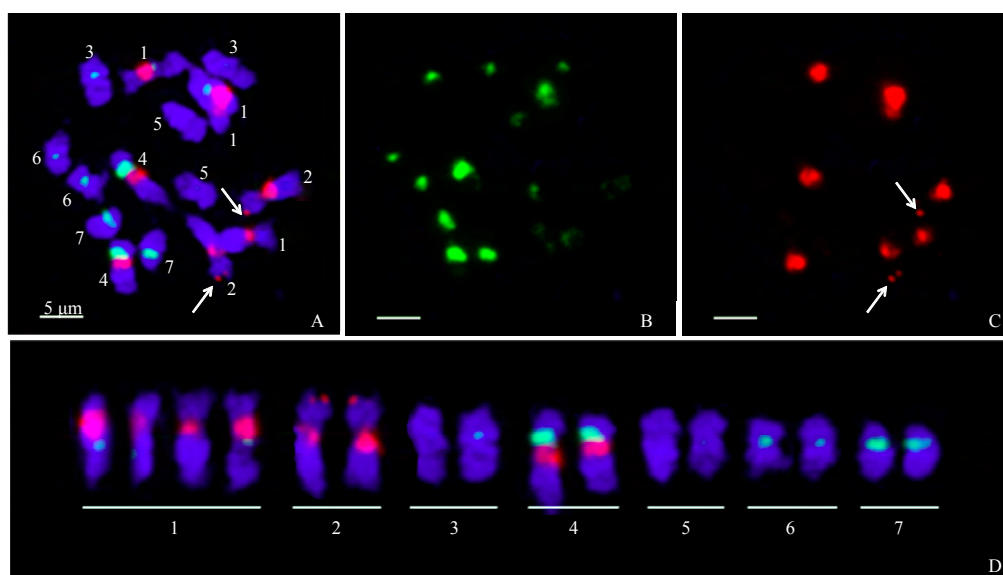
Fig. 4 Mitotic metaphase chromosome of aneuploidy cucumbers

(Aneu-2, 图 4-B), 及 $2n=27$ 的 3 号非整倍体(Aneu-3, 图 4-C)。

进一步对染色体数目 $2n=16$ 的 Aneu-1 进行了染色体组成分析。用 Bio-dUTP 标记的 Type III 探针和 Dig-dUTP 标记的 45S rDNA 探针与其有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交, 绿色信号为 Type III, 红色信号为 45S rDNA, 蓝色为 DAPI 复染的有丝分裂中期染色体(图 5)。

根据 FISH 结果, 利用有丝分裂中期染色体上信号的数目、位置、强度等信息鉴定染色体, 在二倍体‘长春密刺’荧光原位杂交中有 6 个较强的 45S rDNA 杂交信号, 其中 4 号染色体 45S rDNA 和 Type III 杂交信号均很强且相邻, 1 号和 2 号染

色体 45S rDNA 杂交信号较强, 但 Type III 杂交信号较弱(图 5)。对 Aneu-1 有丝分裂中期染色体 FISH 核型图进行分析, 发现有 8 个较强的 45S rDNA 杂交信号, 分别位于 8 条染色体上, 其中仅两条染色体上 45S rDNA 和 Type III 杂交信号均较强, 初步推测该诱导株附加的两条染色体为 1 号或 2 号染色体。为确认该诱导株 Aneu-1 附加的具体是哪两条染色体, 利用已定位在黄瓜 2 号染色体端部的基因 *Csa006700* 为探针, 进一步鉴定区分 1 号与 2 号染色体。原位杂交结果显示, *Csa006700* 探针仅在一对染色体端部出现, 由此可以排除 2 号染色体为附加染色体的可能, 因此确定附加的两条染色体为黄瓜 1 号染色体。



A: Type III(绿色), 45S rDNA(红色)和 *Csa006700* 探针(红色, 箭头指示)与 DAPI 复染的染色体(蓝色)合成图; B: Type III 杂交信号; C: 45S rDNA 和 *Csa006700* 探针(箭头指示)杂交信号; D: 基于 Type III(绿色), 45S rDNA(红色)和 *Csa006700* 探针(红色)的荧光原位杂交图像核型图(1—7 表示染色体编号)

A: A merged image of the mitotic metaphase chromosome and the FISH signals; B: FISH signals of Type III; C: FISH signals of 45S rDNA and probe *Csa006700* (the arrows point the site of signal); D: Karyotype based on Type III (green), 45S rDNA (red) and probe *Csa006700* (red) FISH (1-7 show chromosome No.)

图 5 Aneu-1 有丝分裂中期染色体荧光原位杂交

Fig. 5 FISH on the mitotic metaphase chromosome of Aneu-1

3 讨论

3.1 黄瓜不同倍性材料的创制

秋水仙素是目前诱导植物多倍体最广泛、有效的化学诱导剂之一, 其在诱导过程中不会影响染色体的结构特性, 因而获得的多倍体植株较少发生不利变异。本试验通过秋水仙素直接诱导出非整倍体植株, 类似

现象在不结球白菜^[23]、油菜^[24]、香蕉^[25]等作物倍性诱导研究中也进行了报道。试验发现经秋水仙素处理后的植株在生长过程中出现还原现象, 即在幼苗期鉴定为四倍体, 但继续生长一段时间后又恢复到二倍体株型, 猜测此现象的发生是植物生长点内有分生能力的细胞加倍数量不足所导致。同时, 有少数细胞在分裂过程中由于部分姐妹染色体出现滞后而造成非整倍体

细胞,继而形成非整倍体植株。非整倍体植株经驯化稳定后是遗传育种研究的重要种质材料,利用秋水仙素处理获得的非整倍体在遗传上与亲本共性较好,既可用于基因定位、基因转移和构建连锁群,也可用于染色体功能等的研究^[24]。

秋水仙素诱导产生非整倍体的频率较低,这可能与材料的基因型、生理状态,秋水仙素溶液的浓度,处理的时间等因素有关,利用秋水仙素诱导黄瓜非整倍体的条件还有待进一步优化。在木本植物的多倍体研究中还发现,早期诱导出的非整倍体和嵌合体植株经过多次连续继代培养,其倍性会回复到原二倍体状态^[26],这与处理株还原的发生可能是同一原因,如何将诱导出的倍性材料保存下来也是进一步研究的重点。

3.2 黄瓜不同倍性材料的鉴定

对秋水仙素诱导获得的植株进行早期准确的染色体鉴定是快速筛选获得各种变异材料的重要环节之一。在批量诱导植株时,快速筛选出诱导成功的植株,并在早期进行移植培养,不仅能避免人为管理因素造成的目标诱导株生长发育不良,还能尽早地对诱导株进行自交或杂交留种。目前,倍性鉴定一般以形态学观察为初步鉴定方法,辅以染色体计数、流式细胞仪等方法^[27]。本试验诱导的四倍体植株在形态学特征上与二倍体相比差异显著,但三倍体与非整倍体植株在形态学特征上与二倍体相似,在鉴定初期及时有效地运用形态学观察可以缩小鉴定群体,极大地减少后期筛选工作。荧光原位杂交技术是一种高效的分子细胞遗传学技术,可应用于染色体的识别^[28]。利用染色体特异的探针进行荧光原位杂交,不仅能快速有效鉴定出黄瓜的倍性,同时能准确识别出植物的全部或部分染色体。在花生^[29]、番木瓜^[30]、大白菜^[31-32]、甘蓝^[32]、百合^[33]等植物上已运用此方法来区分染色体,构建精确的核型图。

本试验利用荧光原位杂交技术对黄瓜诱导获得的候选材料进行细胞遗传学研究,分析特定的重复序列(45S rDNA 和着丝粒序列 Type III)或基因位点在染色体上的定位,从而确定其倍性及染色体的组成。在整倍体的鉴定中,45S rDNA 杂交信号数与染色体组数即植株倍性对应相关^[34],分析 45S rDNA 的信号数目和强弱,结合着丝粒信号强弱信息,可清楚地确定染色体的倍性变化,如在黄瓜二倍体中 45S rDNA 有 6 个较强的杂交信号,三倍体中有 9 个较强的杂交信号,四倍体中有 12 个较强的杂交信号。在非整倍体的

鉴定中,Type III 和 45S rDNA 的杂交信号数目和强弱为识别附加染色体提供了依据。Zhao 等^[14]根据染色体的相对长度、臂比值和基于 Type I/II, III, IV 和 45S rDNA 重复序列的荧光原位杂交结果绘制了黄瓜核型图,为准确识别黄瓜 7 对染色体提供了参考。在黄瓜的 7 对染色体中,4 号、6 号和 7 号染色体上的 Type III 杂交信号较强,1 号和 3 号染色体上的 Type III 杂交信号较弱,2 号和 5 号染色体上的 Type III 杂交信号很弱;1 号、2 号和 4 号染色体上的 45S rDNA 杂交信号较强,3 号和 7 号染色体上的 45S rDNA 杂交信号较弱,5 号和 6 号染色体上没有 45S rDNA 杂交信号。本试验根据 Type III 和 45S rDNA 的 FISH 结果,推测出非整倍体材料 Aneu-1 附加的两条染色体为黄瓜 1 号或 2 号染色体。为了明确附加的为哪两条染色体,利用前期确定的黄瓜 2 号染色体特异探针^[17],确定了 Aneu-1 为附加两条黄瓜 1 号染色体的四体材料。本研究所获得的四体材料在黄瓜目前的相关研究中是首次报道,该材料的获得对于性状的染色体定位等相关研究具有重要的价值。

4 结论

利用秋水仙素溶液处理黄瓜萌动种子,创制出不同倍性的种质材料。以着丝粒序列 Type III 和 45S rDNA 为探针与有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交可作为检测黄瓜倍性的一种方法,且结合染色体特异探针能明确诱导材料的染色体组成。

References

- [1] 韦荣昌,吴庆华,马小军,谭小明,李小勇,施力军,白隆华.植物多倍体的研究进展.种子,2013,32(7): 50-52.
Wei R C, Wu Q H, Ma X J, Tan X M, Li X Y, Shi L J, Bai L H. Research progress of plant polypoid. *Seed*, 2013, 32(7): 50-52. (in Chinese)
- [2] Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 2010, 186(1): 5-17.
- [3] Khush G S, Singh R J, Sur S C, Librojo A L. Primary trisomics of rice: origin, morphology, cytology and use in linkage mapping. *Genetics*, 1984, 107(1): 141-163.
- [4] Nikolova V, Niemirowicz-Szczytt K. Diploidization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploids by colchicine treatment. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1996, 65: 311-317.
- [5] 陈劲枫,雷春,钱春桃,罗向东,庄飞云.黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定.植物生理学通讯,2004,40(2): 149-152.

- Chen J F, Lei C, Qian C T, Luo X D, Zhuang F Y. Synthesis and characterization of autotetraploid in cucumber polyploid breeding. *Plant Physiology Journal*, 2004, 40(2): 149-152. (in Chinese)
- [6] 鄢郁霖, 王小蓉, 唐海东, 蓝丽, 李焕秀, 贺忠群, 汤浩茹. 秋水仙素处理对黄瓜生长发育及诱变效应研究. *长江蔬菜*, 2010(6): 8-11.
- Yan Y L, Wang X R, Tang H D, Lan L, Li H X, He Z Q, Tang H R. Effects of colchicines treatment on growth and development and mutagenic of cucumber. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2010(6): 8-11. (in Chinese)
- [7] 刁卫平, 贾媛媛, 江彪, 鲍生有, 姜群峰, 陈劲枫. 黄瓜未授粉子房培养获得同源四倍体. *园艺学报*, 2008, 35(12): 1781-1786.
- Diao W P, Jia Y Y, Jiang B, Bao S Y, Lou Q F, Chen J F. Induction of autotetraploid cucumbers by unpollinated ovary culture and their characterization. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(12): 1781-1786. (in Chinese)
- [8] Diao W P, Bao S Y, Jiang B, Cui L, Qian C T, Chen J F. Cytological studies on meiosis and male gametophyte development in autotetraploid cucumber. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(2): 373-376.
- [9] 刁卫平, 崔利, 江彪, 鲍生有, 陈劲枫. 黄瓜同源三倍体创制及减数分裂行为观察. *西北植物学报*, 2009, 29(1): 36-42.
- Diao W P, Cui L, Jiang B, Bao S Y, Chen J F. Creation and meiosis studies of autotriploid in cucumber. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(1): 36-42. (in Chinese)
- [10] Diao W P, Bao S Y, Jiang B, Cui L, Chen J F. Primary trisomics obtained from autotriploid by diploid reciprocal crosses in cucumber. *Sexual Plant Reproduction*, 2009, 22(1): 45-51.
- [11] Diao W P, Bao S Y, Jiang B, Cui L, Qian C T, Chen J F. Cytogenetic studies on microsporogenesis and male gametophyte development in autotriploid cucumber (*Cucumis sativus* L.): implication for fertility and production of trisomics. *Plant Systematics and Evolution*, 2009, 279: 87-92.
- [12] Chen J F, Staub J E, Adelberg J W, Jiang J M. Physical mapping of 45S rRNA genes in *Cucumis* species by fluorescence *in situ* hybridization. *Canadian Journal of Botany*, 1999, 77(3): 389-393.
- [13] Koo D H, Hur Y, Jin D C, Bang J W. Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Molecules and Cells*, 2002, 13(3): 413-418.
- [14] Zhao X, Lu J Y, Zhang Z H, Hu J J, Huang S W, Jin W W. Comparison of the distribution of the repetitive DNA sequences in three variants of *Cucumis sativus* reveals their phylogenetic relationships. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(1): 39-45.
- [15] 徐延浩, 杨飞, 程有林, 马璐, 王建波, 李立家. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜染色体上的比较定位. *遗传*, 2007, 29(5): 614-620.
- Xu Y H, Yang F, Cheng Y L, Ma L, Wang J B, Li L J. Comparative analysis of rDNA distribution in metaphase chromosomes of cucurbitaceae species. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(5): 614-620. (in Chinese)
- [16] 李琦, 马璐, 黄婧, 李立家. 西瓜、苦瓜与罗汉果染色体的 rDNA 定位及其核型分析. *武汉大学学报: 理学版*, 2007, 53(4): 449-456.
- Li Q, Ma L, Huang J, Li L J. Location of rDNA and karyotype analysis in watermelon, *Momordica charantia* and *Momordica grosvenori* chromosome. *Journal of Wuhan University: Natural Science Edition*, 2007, 53(4): 449-456. (in Chinese)
- [17] Lou Q F, Zhang Y X, He Y H, Li J, Jia L, Cheng C Y, Guan W, Yang S Q, Chen J F. Single copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. *The Plant Journal*, 2014, 78(1): 169-179.
- [18] 雷春, 陈劲枫, 张晓青, 陈丽娟, 张永兵. 不同倍性黄瓜的形态和一些生理生化指标比较. *植物生理学通讯*, 2005, 41(4): 471-474.
- Lei C, Chen J F, Zhang X Q, Chen L J, Zhang Y B. Morphologies and several physiological and biochemical indexes of cucumbers (*Cucumis sativus* L.) with different ploidies. *Plant Physiology Journal*, 2005, 41(4): 471-474. (in Chinese)
- [19] 陈劲枫, 钱春桃. 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*, 2002, 29(4): 378-380.
- Chen J F, Qian C T. Studies on chromosome preparations using plant tendril as source tissue. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29(4): 378-380. (in Chinese)
- [20] 曹清河, 陈劲枫, 罗向东, 钱春桃, 郭军洋. 用组培芽鉴定组培材料染色体数目的方法. *植物生理学通讯*, 2003, 39(6): 655-657.
- Cao Q H, Chen J F, Luo X D, Qian C T, Guo J Y. Chromosome count using buds *in vitro*. *Plant Physiology Journal*, 2003, 39(6): 655-657. (in Chinese)
- [21] Lou Q F, He Y H, Cheng C Y, Zhang Z H, Li J, Huang S W, Chen J F. Integration of high-resolution physical and genetic map reveals differential recombination frequency between chromosomes and the genome assembling quality in cucumber. *Plos One*, 2013, 8(5): e62676.
- [22] 叶德友, 王暄, 张燕霞, 钱春桃, 陈劲枫. 酸黄瓜南方根结线虫病抗性的解剖学及其细胞学研究. *植物病理学报*, 2010, 40(5): 495-503.
- Ye D Y, Wang X, Zhang Y X, Qian C T, Chen J F. Anatomy and cytology of sour cucumber for its resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(5): 495-503. (in Chinese)

- 495-503. (in Chinese)
- [23] 张振超, 张蜀宁, 张伟, 张红亮. 四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定. 西北植物学报, 2007, 27(1): 28-32.
- Zhang Z C, Zhang S N, Zhang W, Zhang H L. Induction of tetraploidy of non-heading Chinese cabbage with late-bolting and identification of chromosome configuration. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(1): 28-32. (in Chinese)
- [24] 杨桂娟, 姜淑慧, 忻如颖, 王建飞, 管荣展, 杨清. 利用染色体加倍技术创建油菜非整倍体. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1559-1565.
- Yang J J, Jiang S H, Xin R Y, Wang J F, Guan R Z, Yang Q. Creation of rapeseed aneuploids by chromosome doubling technique. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(8): 1559-1565. (in Chinese)
- [25] 谭平, 唐晓华, 劳世辉, 魏岳荣, 洪林. 秋水仙素诱导抗枯 1 号香蕉多倍体试验. 南方农业学报, 2012, 43(11): 1718-1722.
- Tan P, Tang X H, Lao S H, Wei Y R, Hong L. *In vitro* polyploidy induction of banana Kangku 1 using colchicines. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(11): 1718-1722. (in Chinese)
- [26] 李云, 冯大领. 木本植物多倍体育种研究进展. 植物学通报, 2005, 22(3): 375-382.
- Li Y, Feng D L. Advances in research into polyploidy breeding of woody plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 22(3): 375-382. (in Chinese)
- [27] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1991, 9(3): 229-233.
- [28] 位芳, 张改生. 利用荧光原位杂交技术分析新合成异源四倍体拟南芥. 作物学报, 2010, 36(7): 1216-1220.
- Wei F, Zhang G S. FISH analysis of resynthesized allotetraploid *Arabidopsis*. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(7): 1216-1220. (in Chinese)
- [29] Robledo G, Lavia G I, Seijo G. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118(7): 1295-1307.
- [30] 汪卫星, 李春艳, 向素琼, 梁国鲁. 番木瓜四倍体与二倍体的核型分析及 45S rDNA-FISH 研究. 园艺学报, 2007, 34(2): 345-348.
- Wang W X, Li C Y, Xiang S Q, Liang G L. Karyotypes analysis and 45S rDNA-FISH of the tetraploid and diploid in *Carica papaya* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(2): 345-348. (in Chinese)
- [31] 轩淑欣, 申书兴, 赵建军, 张成合, 陈雪平, 鄯丽娟. 25S rDNA 和 5S rDNA 在大白菜中期染色体上的 FISH 定位. 中国农业科学, 2007, 40(4): 782-787.
- Xuan S X, Shen S X, Zhao J J, Zhang C H, Chen X P, Qie L J. Location of 25S rDNA and 5S rDNA in Chinese cabbage-pe-tsai metaphase chromosome. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(4): 782-787. (in Chinese)
- [32] 鄯丽娟, 申书兴, 轩淑欣, 王彦华, 陈雪平, 张成合, 李晓峰, 罗双霞. 大白菜和结球甘蓝基因组原位杂交及核型分析. 园艺学报, 2007, 34(6): 1459-1464.
- Qie L J, Shen S X, Xuan S X, Wang Y H, Chen X P, Zhang C H, Li X F, Luo S X. Karyotype analysis of Chinese cabbage and cabbage by genome *in situ* hybridization. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(6): 1459-1464. (in Chinese)
- [33] 周树军, Jaap van Tuyl, 臧德奎, 夏宜平, 李方. 45S rDNA 在 4 种百合属植物染色体上的物理定位. 园艺学报, 2008, 35(6): 859-862.
- Zhou S J, Tuyl J V, Zang D K, Xia Y P, Li F. Physical localization of 45S rDNA on the chromosomes of 4 species of the genus *Lilium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(6): 859-862. (in Chinese)
- [34] Mishima M, Ohmido N, Fukui K, Yahara T. Trends in site-number change of rDNA loci during polyploidy evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma*, 2002, 110(8): 550-558.

(责任编辑 赵伶俐)