

番木瓜四倍体与二倍体的核型分析及 45S r DNA-FISH 研究

汪卫星, 李春艳, 向素琼, 梁国鲁*

(西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘 要: 以番木瓜四倍体与二倍体植株为材料, 利用 45S rDNA 为探针, 结合核型分析与荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, 简称 FISH) 技术, 分析比较了二者之间的核型特征。结果表明: 二倍体与四倍体番木瓜在核型特征上没有明显差异, 染色体绝对长度在 $2.35 \sim 4.76 \mu\text{m}$ 之间, 属于中小染色体, 均由中部着丝粒染色体 (m) 和近中部着丝粒染色体 (sm) 组成, 属 “2A” 类型, 二倍体核型公式为 $2n = 2x = 18 = 16m (2SAT) + 2sm$, 四倍体为 $2n = 4x = 36 = 32m (4SAT) + 4sm$; 在二倍体体细胞中期染色体及间期核中, 均发现两个杂交信号位点, 在四倍体中则发现 4 个杂交信号位点。二者的杂交信号均位于第 6 对带有随体的同源染色体的次缢痕区域。由此认为该四倍体是由二倍体直接加倍形成的同源四倍体。

关键词: 番木瓜; 核型; 荧光原位杂交; 同源四倍体

中图分类号: S 667.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0345-04

Karyotypes Analysis and 45S rDNA-FISH of the Tetraploid and Diploid in *Carica papaya* L.

WANG Wei-xing, LI Chun-yan, XIANG Su-qiong, and LIANG Guo-lu*

(College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: By using the techniques of karyotype analysis and fluorescence *in situ* hybridization with 45S rDNA as probe, the characteristics of karyotypes and 45S rDNA-FISH of tetraploid and diploid in *Carica papaya* L. were studied. The results showed that the karyotypes of tetraploid and diploid were similar, the lengths of their chromosomes were $2.35 - 4.76 \mu\text{m}$ as short chromosomes. They were composed of metacentric chromosomes and submetacentric chromosomes, their karyotypes were 2A, the karyotype formulas were $2n = 2x = 18 = 16m (2SAT) + 2sm$ and $2n = 4x = 36 = 32m (4SAT) + 4sm$. Two signals were detected in the karyons and chromosomes of somatic cells of diploids, and four signals were detected in that of tetraploids. These signals were all located in the Nucleolar Organizer Region existed in the sixth pair of homologous chromosomes with satellites. According to the results, it is concluded that tetraploids are homologous tetraploids which came into being as the reduplication of chromosomes of somatic cells of diploids.

Key words: *Carica papaya* L.; Karyotype; Fluorescence *in situ* hybridization; Homologous tetraploid

近年来, 关于番木瓜 (*Carica papaya* L.) 的遗传育种, 尤其是倍性育种已成为提高其果实品质及抗性的重要手段 (陈健, 2002)。作者在培育出四倍体植株的基础上, 通过分析比较四倍体与二倍体植株的核型以及 45S rDNA-FISH 结果, 探讨了四倍体植株染色体组成及来源, 为进一步进行番木瓜倍性育种提供细胞学参考和理论支持。

收稿日期: 2006 - 10 - 13; 修回日期: 2007 - 02 - 13

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lianggl@swu.cq.cn)

1 材料与方法

材料为组织培养条件下利用秋水仙素诱导产生的‘穗中红’番木瓜四倍体植株及其二倍体植株。采用通过去壁低渗—火焰干燥法进行染色体制片。至少选取 5 个细胞，按李懋学和陈瑞阳（1985）方法测定染色体的绝对长度、相对长度、长臂、短臂，计算出臂比值，再按 Levan等（1964）的方法进行计算和命名，依据 Stebbins（1971）分类标准进行核型分析。以南开大学生命科学学院陈瑞阳教授提供的带有 45S-rDNA 序列的质粒为材料，利用北京鼎国的质粒快速提取试剂盒提取质粒 DNA，0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，-20℃ 储存备用。原位杂交及杂交信号的检测参照 Chen 和 Armstrong（1994）、Jiang 和 Gill（1993）及 Kamstra 等（1999）的方法，稍作改动。

2 结果与分析

2.1 四倍体与二倍体的核型分析

试验结果表明：番木瓜四倍体与二倍体在核型上没有明显差异（图 1、图 2、表 1、表 2），染色体绝对长度在 2.35~4.76 μm 之间，属于中小染色体，均由中部和近中部着丝粒染色体（m 和 sm）组成，属“2A”类型。从这些核型特征上看，这里的四倍体是由二倍体直接加倍产生的同源四倍体。

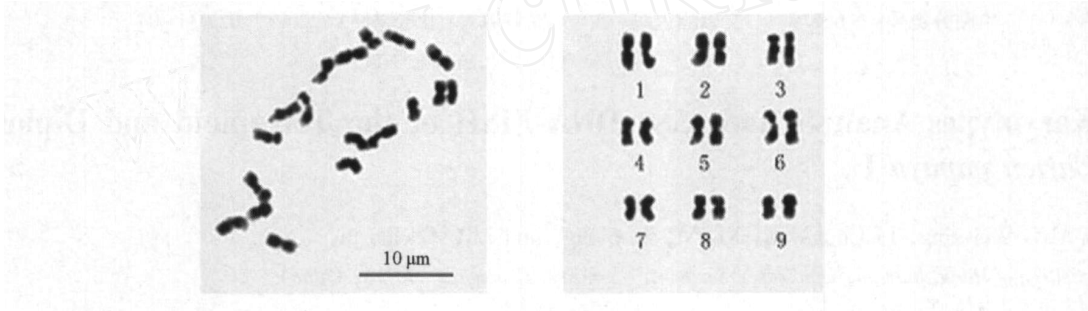


图 1 番木瓜 2x 体细胞染色体和核型
Fig 1 Photomicrographs of somatic and karyotype of *C. papaya* L. (2x)

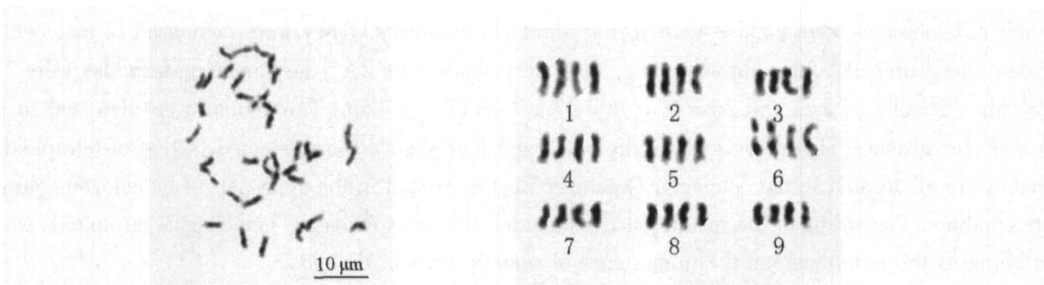


图 2 番木瓜 4x 体细胞染色体和核型
Fig 2 Photomicrographs of somatic and karyotype of *C. papaya* L. (4x)

表 1 二倍体和四倍体番木瓜的核型参数
Table 1 The karyotypical parameters of different ploidy of *C. papaya* L.

| 种类 Species | 绝对长度 Actual length (μm) | 相对长度 Relative length | 最长/最短染色体 Longest/shortest chromosomes | 平均臂比值 Arm ratio means | 核型公式 Karyotype formula | 核型类型 Types |
|---------------|----------------------------|-------------------------|---|--------------------------|---------------------------|---------------|
| 2x | 2.35~4.12 | 3.93~6.22 | 1.58 | 1.29 | 2n=2x=18=16m(2SAT)+2sm | 2A |
| 4x | 2.68~4.76 | 4.48~7.18 | 1.60 | 1.34 | 2n=4x=36=32m(4SAT)+4sm | 2A |

表 2 番木瓜 2x和 4x的染色体长度、臂比及类型

Table 2 The length, arm ratio and type of chromosomes in *C. papaya* L. (2x, 4x)

| 序号 No. | 2x | | | 4x | | |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| | 相对长度 Relative length (%) | 臂比值 Longer arms/ shorter arms | 类型 Types of chromosomes | 相对长度 Relative length (%) | 臂比值 Longer arms/ shorter arms | 类型 Types of chromosomes |
| 1 | 3.42 + 2.80 = 6.22 | 1.22 | m | 3.77 + 3.41 = 7.18 | 1.11 | m |
| 2 | 2.87 + 2.71 = 5.58 | 1.06 | m | 3.28 + 2.68 = 5.96 | 1.22 | m |
| 3 | 3.80 + 2.04 = 5.84 | 1.86 | sm | 4.36 + 2.07 = 6.43 | 2.10 | sm |
| 3' | 3.44 + 1.59 = 5.03 | 2.16 | sm | 3.20 + 1.62 = 4.82 | 1.96 | sm |
| 4 | 3.25 + 1.94 = 5.19 | 1.68 | m | 3.09 + 2.43 = 5.52 | 1.27 | m |
| 5 | 2.75 + 2.40 = 5.15 | 1.15 | m | 2.90 + 2.41 = 5.31 | 1.20 | m |
| 6 | 2.33 + 2.14 = 4.47 | 1.09 | m (SAT) * | 2.73 + 2.56 = 5.29 | 1.07 | m (SAT) * |
| 7 | 2.37 + 2.09 = 4.46 | 1.13 | m | 2.63 + 2.37 = 5.00 | 1.11 | m |
| 8 | 2.23 + 1.83 = 4.06 | 1.22 | m | 2.97 + 1.82 = 4.79 | 1.63 | m |
| 9 | 1.99 + 1.94 = 3.93 | 1.01 | m | 2.60 + 1.88 = 4.48 | 1.38 | m |

注：随体长度不计算在内。Note: The length of satellites was not measured

2.2 45S rDNA-FISH研究结果

利用 45S rDNA 为探针对四倍体及二倍体体细胞中期染色体进行了 FISH 研究，图 3 中黄绿色的区域即为杂交信号。在二倍体体细胞中期染色体及间期核中，均发现两个杂交信号所在位点，在四倍体则发现 4 个杂交信号所在位点。在二倍体体细胞中期染色体上，杂交位点位于一对带有随体的同源染色体的次缢痕区域，根据核型分析其为第 6 对染色体。在四倍体中的 4 个杂交位点同样位于第 6 对带有随体的同源染色体的次缢痕区域。结合四倍体与二倍体体细胞核型分析的结果，认为四倍体与二倍体具有较高的同源性，可以推测即为二倍体体细胞直接加倍形成的同源染色体。

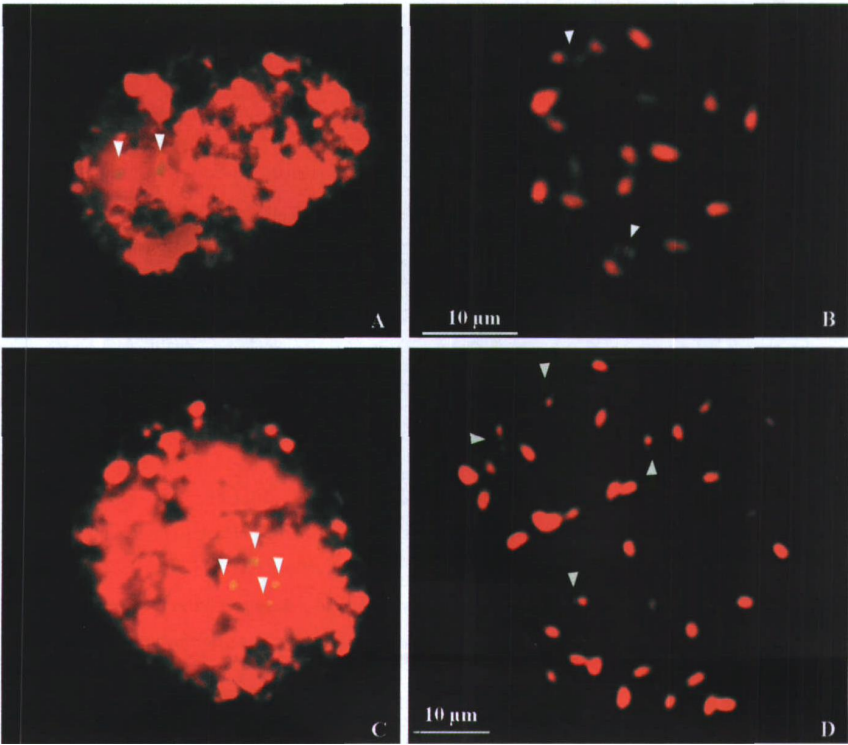


图 3 番木瓜二倍体与四倍体 45S rDNA-FISH 结果

A. 二倍体间期核；B. 二倍体中期染色体；C. 四倍体间期核；D. 四倍体中期染色体。

Fig 3 Photomicrographs of 45S rDNA-FISH of diploid and tetraploid in *C. papaya* L.

A. Karyon of diploid; B. Chromosomes of diploid; C. Karyon of tetraploid; D. Chromosomes of tetraploid

3 讨论

作者前期对番木瓜几个品种核型分析的结果 (汪卫星等, 2006) 表明, 在番木瓜的染色体组中存在一对具有“大随体”的同源染色体, 而随体形成的原因尚不清楚。在本试验中不仅对二倍体与四倍体体细胞染色体的形态进行了分析, 而且通过 FISH 技术确定了 45S rDNA 在番木瓜染色体组中的分布情况, 探讨了番木瓜随体特性及其形成的可能原因。根据本结果, 45S rDNA 在番木瓜体细胞染色体中位于第 6 对同源染色体的次缢痕区, 通过对该位置的分析初步认为番木瓜体细胞染色体中的随体为中间或中部随体, 这在百合、大蒜、黄芪、柑橘 (梁国鲁和陈全友, 1994) 上均有相同的发现, 从起源上说, 认为这是端部随体连同其相接的臂发生臂内倒位衍生而来 (Matsuura, 1942; 梁国鲁和陈全友, 1994)。

本研究认为获得的四倍体为典型的同源四倍体, 这对于进一步研究包括直接利用四倍体的多倍体优势及与二倍体杂交获得三倍体类型都具有重要的意义。利用秋水仙素溶液诱导多倍体已在多种园艺植物如大白菜、西瓜、甜瓜、柑橘、香蕉、百合等植物上获得成功 (张全美和张明方, 2003), 然而多倍体特性可能导致的后代不育、杂种发育不良等现象是限制其应用的主要原因, 因此研究多倍体植株染色体的组成及来源可以为人工有目的地进行多倍体育种提供细胞学参考, 并进一步应用于科学研究和生产实践。

番木瓜四倍体类型是进行番木瓜品种选育和倍性育种的宝贵材料, 因此关于四倍体染色体组成和来源等细胞学方面的研究对于研究多倍体遗传特性和育种优势具有重要的理论与实践意义。

References

- Chen Jian. 2002. The colorized photo and explanation on varieties and planting of *Carica papaya* L. Beijing: China Agricultural Press: 1 - 4. (in Chinese)
- 陈 健. 2002. 番木瓜品种与栽培彩色图说. 北京: 中国农业出版社: 1 - 4.
- Chen Q F, Armstrong K. 1994. Genomic *in situ* hybridization in *Avena sativa*. *Genome*, 37: 607 - 612.
- Jiang J M, Gill B S. 1993. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. *Genome*, 36: 792 - 795.
- Kanstra S A, Kuipers A G J, de Jen M J, Ramanna M S, Jacobsen E. 1999. The extent and position of homoeologous recombination in a distant hybrid of *A. trioneria*: a molecular cytogenetic assessment of first generation backcross progenies. *Chromosome*, 108: 52 - 63.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A A. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas*, 52: 201 - 220.
- 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. 关于植物核型的标准化问题. *武汉植物学研究*, 3 (4): 297 - 302.
- Liang Guo-lu, Chen Quan-you. 1994. Studies on the system and evolution of satellite chromosomes in *Citrus*. *Journal of Southwest Agricultural University*, 16 (2): 106 - 110. (in Chinese)
- 梁国鲁, 陈全友. 1994. 柑橘属随体染色体系统演化研究. *西南农业大学学报*, 16 (2): 106 - 110.
- Matsuura H. 1942. Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* pall. XVI alterations of the nucleolus-chromosome system due to irradiation. *Cytologia*, 12: 271 - 288.
- Stebbins G L. 1971. Chromosome evolution in higher plants. London: Edward Arnold, Academic Press: 87 - 123.
- Wang Wei-xing, Li Chun-yan, Liang Guo-lu. 2006. Studies of karyotype in *Carica papaya*. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (2): 389 - 391. (in Chinese)
- 汪卫星, 李春艳, 梁国鲁. 2006. 番木瓜的核型分析. *园艺学报*, 33 (2): 389 - 391.
- Zhang Quan-mei, Zhang Ming-fang. 2003. Research advances on polyploid induction of horticultural plants. *Chinese Journal of Cell Biology*, 25 (4): 223 - 228. (in Chinese)
- 张全美, 张明方. 2003. 园艺植物多倍体诱导研究进展. *细胞生物学杂志*, 25 (4): 223 - 228.