

红肉火龙果气生根染色体制片优化及核型分析

刘顺枝, 周浩彬, 林润怡, 覃希, 王玉林, 胡位荣

(广州大学 生命科学院, 广东 广州 510006)

摘 要:以红肉火龙果的气生根为试材,研究气生根长度、采样时间、预处理方法、解离时间和染色方法等对红肉火龙果气生根根尖细胞染色体制片效果的影响,以优化的制片技术制片并进行核型分析。结果表明:10:30 时段取长度 5 mm 以下的幼嫩气生根,用 0.1%秋水仙素常温预处理 2 h,应用双低渗法使染色体分散,常温下 1 mol/L HCl 解离 50 min 或 60℃下解离 20 min,20%改良苯酚-品红染色液染色 20 min,可以得到最佳的制片效果,用中性树脂制成永久装片。染色体核型分析表明,红肉火龙果的染色体数目为 11 对,最长染色体/最短染色体为 1.63,核型公式为 $2n=2x=22=22m$,核型不对称系数为 54.29%,核型属 1A 类型。

关键词:红肉火龙果;气生根;染色体;制片技术;核型分析

中图分类号:S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0071-06

火龙果属仙人掌科(Cactaceae)量三角柱属(*Hylocereus*)和蛇鞭柱属(*Seleniurus*)植物,原产于中美洲热带沙漠地区,在亚洲是一种新兴的热带、亚热带水果。火龙果果实外形独特,色彩艳丽,营养丰富,具低脂肪、高水溶性膳食纤维、含有植物性白蛋白、色素,是集水果、蔬菜、花卉、保健于一体的绿色、环保果品^[1-2]。火龙果按果皮果肉颜色可分为红皮白肉、红皮红肉、黄皮白肉 3 类,其中前 2 类在我国台湾、海南、贵州、广东、广西、福建等地发展迅速。红皮红肉火龙果(*Hylocereus polyrhizus*)因其果肉富含甜菜红素、可溶性固形物和浓郁的味道,深受消费者喜爱。近些年来,国内外学者主要研究了火龙果的引种、栽培生理与分子生物学、果实品质及色素提取、采后保鲜和病虫害防治等^[2-7]。

有关火龙果的细胞学研究相对滞后^[8-9],Tel-Zur 等^[9]报道了诱导多倍体时火龙果的染色体数。植物的染色体数目与核型分析可为资源分类、亲缘关系、杂交育种及细胞工程中染色体鉴别等提供依据^[10]。火龙果为半附生肉质植物,植株生命力强,极其耐旱,在贫瘠的

土地上可以生长,茎蔓一年四季都会抽发气生根,取材方便。该试验对气生根长度、采样时间、预处理方法、解离时间和染色方法等进行了比较,优化红肉火龙果气生根细胞染色体的制片条件,并进行核型分析,以期火龙果细胞遗传学和育种研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的红肉火龙果‘红仙蜜’植株取自广州市番禺区商品性火龙果生产园,盆栽于实验室,肥水常规管理。

1.2 试验方法

1.2.1 常规制片法 在 10:30 时段取长度相近的气生根,用 0.1%秋水仙素预处理 2 h,蒸馏水漂洗,卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)固定 12 h,1 mol/L HCl 中室温(20℃)解离 50 min,切下根尖端的 1 mm,改良苯酚品红染色 20 min(改良苯酚品红染液的配制,A 液:碱性品红 3 g+70%乙醇 100 mL,充分搅拌溶解。B 液:A 液 10 mL+5%苯酚 90 mL。C 液:B 液 55 mL+冰醋酸 6 mL+38%甲醛 6 mL。10%苯酚-品红染色液:C 液 10 mL+45%醋酸 90 mL+1.5 g 山梨醇。20%苯酚-品红染色液:C 液 20 mL+45%醋酸 80 mL+1.5 g 山梨醇),压片、镜检^[11-12]。观察 100 个细胞,统计有丝分裂中期分裂相细胞数目,比较染色体的缩聚程度、清晰度及形态。临时装片经逐级乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片,可做成永久装片。

1.2.2 双低渗制片法 在 10:30 时段取长度相近的气生根,用 0.1%秋水仙素预处理 2 h,转入低渗液(0.075 mol/L KCl)中,20℃下处理 30 min;蒸馏水漂洗

第一作者简介:刘顺枝(1968-),女,硕士,副教授,现主要从事果树栽培生理与分子生物学等研究工作。E-mail:shunzhiliu@163.com.

责任作者:胡位荣(1966-),男,博士,教授,现主要从事果蔬采后生物学等研究工作。E-mail:weironghu@163.com.

基金项目:广州市科技计划资助项目(2014J4100143);广州市属高校科研计划资助项目(2012A047);广东省高等院校学科建设专项资助项目(粤财教(2008)342)。

收稿日期:2015-03-09

后转入卡诺氏固定液中在 4℃ 下固定 4 h, 在 1 mol/L HCl 中室温解离 50 min; 蒸馏水漂洗 3 次后转入双蒸馏水, 后低渗 10 min。再在 4℃ 下卡诺液固定 30 min。切下根尖端的 1 mm, 用 20% 改良苯酚-品红染色液染色 20 min, 压片、镜检^[13]。

1.2.3 取材时间的筛选 分别在 9:00、9:30、10:00、10:30、11:00、11:30, 随机切取长约 5 mm 的气生根, 按 1.2.1 的方法制片, OLYMPUS BX61 显微镜下观测有丝分裂中期分裂相细胞数目。每处理重复 2 次。

1.2.4 气生根长度的筛选 在 10:30 时段选取不同长度的气生根(1~50 mm), 切取根尖顶端 1 mm, 按 1.2.1 的方法制片, 显微镜下观测有丝分裂中期分裂相细胞数目。每处理重复 2 次。

1.2.5 预处理方法的筛选 切取长约 5 mm 的气生根根尖, 分别在 20℃ 下用 0.05%、0.10%、0.15% 秋水仙素预处理 1、2、3 h, 4℃ 下用蒸馏水处理 12、24 h。按 1.2.1 的方法制片, 显微镜下观测有丝分裂中期分裂相细胞数目及染色体的缩聚程度、清晰度及形态。每处理重复 2 次。

1.2.6 解离方法的筛选 切取长约 5 mm 的气生根, 分别在 1 mol/L HCl 溶液中, 于 20℃ 下解离 40、50、60 min; 60℃ 解离 10、20、30 min; 在 12 mol/L HCl 溶液中 20℃ 下解离 3、4、5 min。按 1.2.1 的方法制片, 显微镜下观测有丝分裂中期分裂相细胞数目。每处理重复 2 次。

1.2.7 改良苯酚品红染色液浓度与染色时间的筛选 分别用 10%、20% 改良苯酚-品红染色液染色 10、15、20、25、30、35、40、45 min, 显微镜下观察染色效果。每处理重复 2 次。

1.2.8 核型分析 按照优化的染色体制片条件, 制备红肉火龙果气生根染色体装片, 在显微镜下观察、统计 100 个染色体清晰且分散良好的分裂中期细胞(来自 5 株红肉火龙果植株)的染色体数目, 85% 以上的细胞具有恒定一致的染色体数即为红肉火龙果的染色体数目^[13]; 从中选择染色体完整、形态清晰、分散良好的 5 个细胞, 在 Olympus BX61 显微镜下通过 Olympus Dp20 成像系统用 DP2-BSW 控制软件拍照, 用 PhotoshopCS3 软件处理图片, 将染色体配对、测量染色体长短臂, 制作红肉火龙果的染色体核型图、绘制核型模式图^[11,14], 参照 Stebbins^[15]的标准进行核型分类。

2 结果与分析

2.1 红肉火龙果气生根染色体制片技术的优化

2.1.1 取材时间 从表 1 可以看出, 1 天中不同取材时间对红肉火龙果气生根根尖细胞有丝分裂中期分裂相细胞数量有一定的影响, 10:00—11:00, 细胞分裂旺盛, 中期分裂相细胞多, 占计数细胞的 21.7%, 其中 10:30 是最佳取材时间, 此时细胞分裂旺盛, 可得到最多的中期分裂相细胞, 染色体形态清晰可辨。

表 1 取材时间对气生根中期分裂相细胞数的影响

取材时间	中期分裂相细胞百分比/%
9:00	14.2
9:30	17.8
10:00	21.0
10:30	22.2
11:00	21.8
11:30	18.6

2.1.2 气生根长度 从表 2 可以看出, 气生根的长度越短, 其有丝分裂中期分裂相细胞数越多, 这是由红肉火龙果的气生根生长规律决定的。气生根刚刚生长出来时, 生长速度快, 根尖分生区的细胞分裂旺盛, 1.0~5.0 mm 长的气生根平均中期分裂相细胞百分比可达 24.5%; 随着气生根继续伸长生长, 其细胞分裂速率逐步下降, 7.1~20.8 mm 长的气生根平均中期分裂相细胞百分比为 16.8%; 当气生根长 33.7~50.0 mm 时, 其生长基本停止, 会很快衰老、干枯, 根尖分生区细胞分裂基本停止, 此时的根尖制片所得的中期分裂相细胞数非常少, 50 mm 长的气生根中期分裂相细胞仅 0.4%。因此, 取样制片时应尽量切取长度在 5 mm 以内的幼嫩气生根。

表 2 气生根长度对中期分裂相细胞数的影响

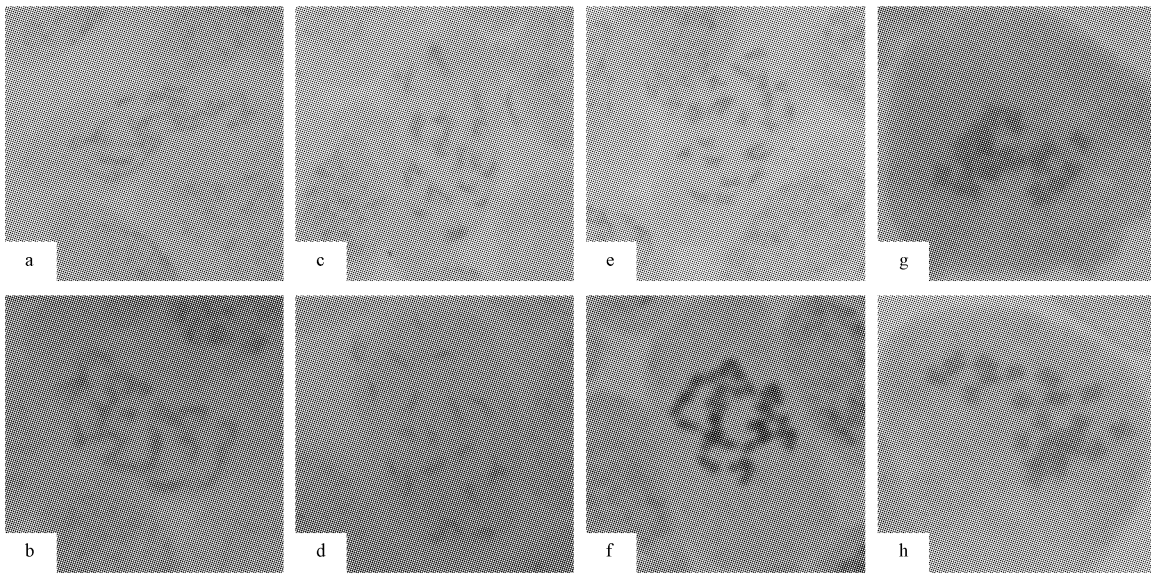
气生根长度/mm	中期分裂相细胞百分比/%
1.0	28.6
3.1	24.4
5.0	20.4
7.1	17.0
10.3	17.8
15.4	16.4
20.8	15.8
33.7	4.2
40.5	2.4
50.0	0.4

2.1.3 预处理方法 染色体制片时, 常用秋水仙素、低温等理化措施对材料进行预处理以获得尽可能多的中期分裂相, 采取不同的预处理方法得到的红肉火龙果气生根染色体制片效果有较大的差异, 由表 3、图 1 可知, 0.05% 秋水仙素处理时需要较长的时间, 否则染色体收缩不足, 呈丝状, 细长(图 1b、d); 高浓度(0.15%)秋水仙素处理时则需要控制好处理时间, 过长容易出现染色体收缩过度的现象, 导致染色体呈点状, 不便于测量染色体的长短臂长度(图 1h)。0.1% 秋水仙素处理 2 h 时, 染色体收缩适当, 缢痕清晰, 且有丝分裂中期分裂相细胞数目较高(20.0%), 制片效果较理想(图 1f), 适合用于核型分析制片; 0.1% 秋水仙素处理 1 h 时, 染色体收缩程度不足, 着丝点不是很清晰(图 1e), 而处理 3 h 时则收缩过度(图 1g), 均不适用于核型分析。4℃ 下蒸馏水处理 12 h 和 24 h 后, 染色体缩聚程度小, 呈丝状, 较清晰, 但处于中期分裂相的细胞较少, 占整个有丝分裂的

11.7%。可见,低温处理对染色体有一定的收缩作用,但幅度较小,染色体细长,呈丝状,易造成多条染色体缠绕(图 1a、c),不利于染色体的识别及核型分析。

表 3 预处理对气生根细胞染色体制片效果的影响

预处理试剂与温度	处理时间/h	染色体的缩聚度清晰度及形态	中期分裂相细胞百分比/%	综合评价
0.05%秋水仙素,20℃	1	缩聚程度小,丝状,不清晰	12.6	较好
	2	缩聚程度小,丝状,较清晰	17.4	较好
	3	缩聚程度一般,丝状,较清晰	18.2	较好
0.10%秋水仙素,20℃	1	缩聚程度小,丝状,较清晰	14.4	较好
	2	缩聚程度一般,伸展,清晰	20.0	好
	3	缩聚程度大,点状,清晰	22.4	较好
0.15%秋水仙素,20℃	1	缩聚程度小,丝状,清晰	17.2	较好
	2	缩聚程度大,点状,清晰	20.4	较好
	3	缩聚程度大,点状,清晰	24.2	较好
蒸馏水,4℃	12	缩聚程度小,丝状,较清晰	9.6	较差
	24	缩聚程度小,丝状,不清晰	13.8	较差



注:a.蒸馏水,4℃,12 h;b.0.05%秋水仙素,20℃,1 h;c.蒸馏水,4℃,24 h;d.0.05%秋水仙素,20℃,2 h;e.0.1%秋水仙素,20℃,1 h;f.0.1%秋水仙素,20℃,2 h;g.0.1%秋水仙素,20℃,3 h;h.0.15%秋水仙素,20℃,1 h。

图 1 不同预处理对红肉火龙果气生根细胞染色体形态的影响

2.1.4 解离方法 解离的目的是软化或去除细胞壁的纤维素、果胶,以便于制片。解离程度不足会导致根尖细胞与细胞不易分离,细胞重叠,影响制片效果;解离过度则会导致细胞受损,染色体不易染色,染色效果差,染色体丢失等^[16]。由表 4 可知,1 mol/L HCl 在 20℃酸解

表 4 解离方法对气生根细胞染色体制片效果的影响

解离试剂	处理温度/℃	处理时间/min	解离效果
1 mol/L HCl	20	40	解离程度不足,压片时细胞与细胞不易分离
	20	50	解离程度适当,压片时细胞分散容易,染色体着色深
	20	60	解离过度,有些细胞染色体不易染色
	60	10	解离程度不足,压片时细胞与细胞不易分离
	60	20	解离程度适当,压片时细胞分散容易,染色体着色深
	60	30	解离过度,细胞染色体不易染色
12 mol/L HCl	20	5	解离不均匀,有些细胞未完全分散,有些细胞染色体不易染色
	20	6	解离过度,染色体不易染色,出现染色体丢失
	20	7	解离过度,染色体不易染色,出现染色体丢失

50 min 与 60℃下解离 20 min 时红肉火龙果气生根染色体制片效果最好;浓盐酸(12 mol/L HCl)解离时难以把握解离时间,易出现解离不均匀或解离过度现象,且浓盐酸具有强烈的腐蚀性,操作时较危险。

2.1.5 改良苯酚品红染色液浓度与时间 改良苯酚品红染色液具有只染色染色体,对细胞质几乎不染色的优点^[12]。红肉火龙果气生根根尖采用 10%改良苯酚-品红染色液染色 40 min,或者用 20%改良苯酚-品红染色液染色 20 min,都可以达到较好的染色效果。少于该时间染色效果不足,颜色略淡,不便于观察;染色时间过长会导致染色体与细胞质的色差变小,对后续的 Photoshop 软件处理带来一定的影响。

2.1.6 制片方法 由图 2 可知,双低渗法制片法因采用 2 次低渗处理,水分透过细胞膜渗入细胞质,从而使细胞膨胀,进一步分散细胞中本已较分散的染色体^[13],故制

片后其染色体较常规制片法更分散。当制成永久装片时,经过脱水处理,细胞紧贴于玻片,不存在染色体垂直分布,难以全部看清的问题。常规制片法虽然操作较简

单,但大部分细胞的染色体过于集中,缠绕、重叠,难以逐一区分,而且还会导致染色体垂直分布,使后续的核型分析困难。

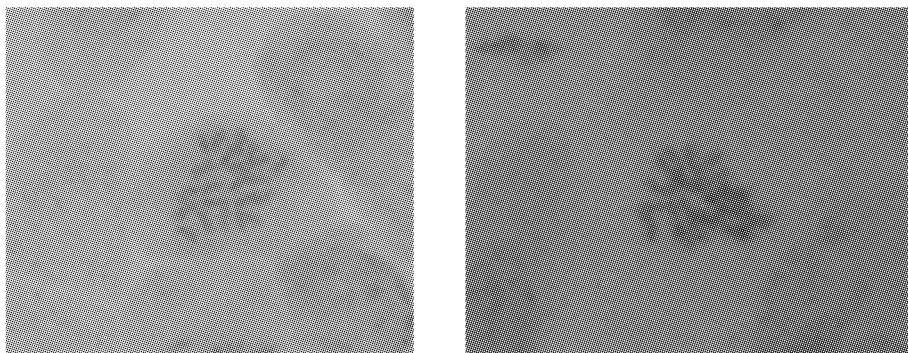


图2 双低渗制片法(左)与常规制片法(右)对红肉火龙果气生根染色体制片效果的影响

2.2 红肉火龙果的核型分析

2.2.1 染色体数目 对来自5株植株的100个染色体分散良好的分裂中期细胞的染色体数目计数,有92个细胞的染色体数目为22条,占计数细胞的92.0%,未发现非整倍的细胞(图3)。据此可确定红肉火龙果的染色体数目为 $2n=2x=22$ 。

2.2.2 染色体的形态分析 红肉火龙果由11对中部着丝点染色体(m)组成,染色体中不存在副缢痕,无随体,其核型公式为 $2n=2x=22=22m$ (表5)。核染色体的总长度为65.19 μm ,平均绝对长度为5.93 μm ,长臂总长度为35.39 μm ;核染色体相对长度变化范围在6.88%~11.18%,染色体平均相对长度为9.09%;11对染色体的臂比值范围为1.05~1.54,均小于2,染色体长度比(最长染色体的长度/最短染色体的长度)为1.63,核型不对称系数(As. K%,全部染色体的长臂之和/全部染色体的总长度)为54.29%,表现出较高的对称性。依据Stebbins^[15]的核型分类标准,红肉火龙果染色体的核型属于1A型。

表5 红肉火龙果染色体的核型参数

序号	绝对长度/ μm			相对长度/%			臂比 /(长/短)	类型
	长臂	短臂	全长	长臂	短臂	全长		
1	4.42	2.87	7.29	6.78	4.40	11.18	1.54	m
2	3.74	3.00	6.74	5.74	4.60	10.34	1.25	m
3	3.61	3.03	6.64	5.54	4.65	10.19	1.19	m
4	3.26	2.94	6.20	5.00	4.50	9.50	1.11	m
5	3.45	2.68	6.13	5.29	4.10	9.39	1.29	m
6	3.10	2.77	5.87	4.75	4.26	9.01	1.12	m
7	2.97	2.84	5.81	4.35	4.55	8.90	1.05	m
8	2.97	2.48	5.45	4.55	3.81	8.36	1.19	m
9	2.74	2.58	5.32	4.21	4.00	8.21	1.05	m
10	2.77	2.48	5.25	4.26	3.81	8.07	1.12	m
11	2.35	2.13	4.48	3.27	3.61	6.88	1.11	m

2.2.3 染色体核型图及模式图 选取红肉火龙果气生根根尖其中一个中期分裂相的细胞,用Photoshop软件将照片中22条染色体配为11对,获得了红肉火龙果染色体核型图(图3),其核型模式图见图4。

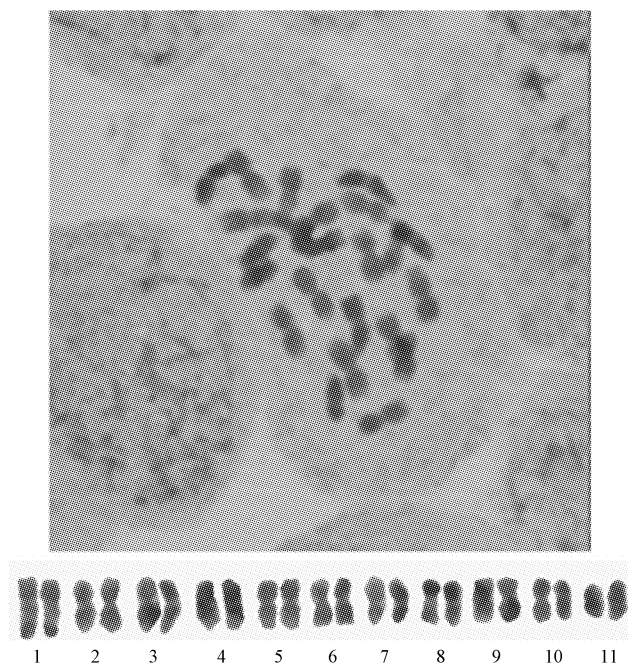


图3 红肉火龙果的染色体图(上)及处理后获得的染色体核型图(下)

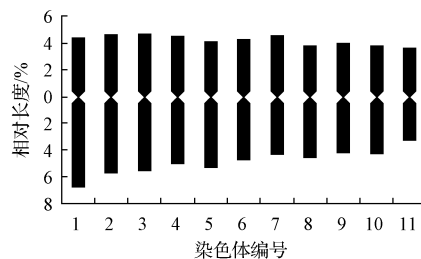


图4 红肉火龙果的核型模式图

3 讨论

良好的染色体制片是核型分析的基础。目前,植物染色体制片所取的材料多半是实生根根尖或者茎尖,气

生根的报道较少。以红肉火龙果的气生根作为材料进行染色体制片,具有取材方便、根较粗壮易操作等优点。但由于气生根较粗壮,生长于空气中易老化,当根长超过 30 mm 时,制片所得的中期分裂相细胞数非常少,因此,红肉火龙果的气生根染色体制片时所需解离时间较长,60℃下需要 20 min,室温下则需要 50 min,较文献上的实生根所需时间要长^[11,16]。通过综合比较,该试验优化了红肉火龙果气生根根尖细胞染色体制片的条件:在 10:30 取植株上幼嫩的气生根(长 5 mm 以下,以刚刚长出来的为最好),在 0.1%秋水仙素溶液中室温预处理 2 h,用 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 30 min。先在卡诺氏液中于 4℃下前固定 4 h,再于 1 mol/L HCl 中室温解离 50 min 或 60℃下解离 20 min。然后用双蒸馏水后低渗 10 min,卡诺氏液后固定 30 min。用浓度为 20%改良苯酚-品红染色液染色 20 min,压片,或永久装片。这样所得的装片,含有较多的有丝分裂中期相细胞,其染色体清晰,收缩适当,分散效果好,为火龙果核型分析奠定了基础。

Tel-Zur 等^[9,17]报道量天尺属植物为二倍体(2n=22),蛇鞭柱属植物为四倍体(2n=44),并通过属间杂交试验表明蛇鞭柱属植物可能是由量天尺属植物进化而来。该试验经过核型分析确定了红肉火龙果的染色体数目为 22,二倍体,这与 Tel-Zur 等^[9]报道一致。红肉火龙果由 11 对中部着丝点染色体组成,其核型公式为 2n=2x=22=22m,核型为 1A 型。红肉火龙果的核型不对称系数为 54.29%,低于 60%,按照 Arano^[18]提出的标准,一般认为染色体的核型进化趋势是由对称向不对称方向演化,所以依据红肉火龙果的核型特征可以推测,红肉火龙果(属于量天尺属)在系统演化上处于比较原始、古老的地位。不过,由于仙人掌科植物的核型分析研究资料缺乏^[19],还有待于对不同类型、品种的火龙果进一步开展核型分析和分子生物学研究,以期为鉴定品种、确定亲缘关系及培育新品种提供依据。

参考文献

- [1] 邓仁菊,范建新,蔡永强.国内外火龙果研究进展及产业发展现状[J].贵州农业科学,2011,39(6):188-192.
- [2] Herbach K M, Rohe M, Stintzing F C, et al. Structural and chromatic

stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives[J]. Food Research International, 2006, 39(6): 667-677.

- [3] Nerd A, Sitrit Y, Kaushik R A, et al. High summer temperatures inhibit flowering in vine pitaya crops (*Hylocereus* spp.)[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 96: 343-350.
- [4] Tao J, Qiao G, Wen X P, et al. Characterization of genetic relationship of dragon fruit accessions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers[J]. Sci Hortic, 2014, 170: 82-88.
- [5] 陈丽娜,陈石,李润唐,等.红肉火龙果与白肉火龙果品质分析[J].中国南方果树,2011,40(4):69-70.
- [6] 刘顺枝,孙茹,江月玲,等.贮藏温度对火龙果品质和衰老变化的影响[J].食品科学,2013,34(12):336-340.
- [7] Guo L W, Wu Y X, Ho H H, et al. First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China[J]. Journal of Phytopathology, 2014, 162(4): 272-275.
- [8] Cisneros R, Garcia R B, Tel-Zur N. Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae) [J]. Flora, 2011, 206: 1076-1084.
- [9] Tel-Zur N, Dudai M, Raveh E, et al. In situ induction of chromosome doubling in vine cacti (Cactaceae) [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129: 570-576.
- [10] 杨汉民.细胞生物学实验[M].2版.北京:高等教育出版社,1997.
- [11] 张红梅,张蜀宁,孔艳娥,等.青花菜染色体制片技术及核型分析[J].南京农业大学学报,2009,32(4):33-36.
- [12] 何兰花,卢家现.用改良苯酚品红染色液替代醋酸洋红染色液的研究[J].生物学报,2000,17(2):28-29.
- [13] Chen R Y, Song W Q, Li X L. A new method for preparing mitotic chromosomes from plant [J]. Acta Bot Sin, 1979, 21(3): 297-298.
- [14] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物学研究,1985,3(4):297-302.
- [15] Stebbins G L. Chromosome evolution in higher plants [M]. London: Edward Arnold, 1971: 87-89.
- [16] 刘敏,王卉,宁慧霞,等.天山雪莲根尖染色体制片影响因素研究及组型分析[J].西北农业学报,2013,22(2):170-176.
- [17] Tel-Zur N, Abbo S, Bar-Zvi D, et al. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): evidence from hybridization and cytological studies [J]. Ann Bot, 2004, 94(4): 527-534.
- [18] Arano H. Cytological studies in subfamily earduoideae (compositae) of Japan. IX [J]. Bot Mag, 1963, 76: 32-39.
- [19] 刘顺枝,刘正浩,林润怡,等.白肉火龙果染色体制片技术及核型分析[J].广东农业科学,2015,42(3):115-118.

Optimizing of Aerial Root Chromosome Preparation Technology and Karyotype Analysis of Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)

LIU Shun-zhi, ZHOU Hao-bin, LIN Run-yi, QIN Xi, WANG Yu-lin, HU Wei-rong
(School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: Taking aerial root tips of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) as material for chromosome preparation, the effect of root length, sampling time, permanent, dissociation time and staining on cytological observation were analyzed. The

DOI:10.11937/bfyy.201512021

南药青天葵转录组 SSR 位点信息分析

黄琼林¹, 何 瑞², 詹若挺², 陈蔚文²

(1. 广东医学院, 广东 湛江 524023; 2. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 教育部岭南中药资源重点实验室, 广东 广州 510006)

摘 要:以青天葵全转录组测序获得的 142 220 条 unigene 为试材, 采用 MicroSATellite (MISA) 软件分析青天葵简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 的分布频率和重复基元的类型等特征, 利用 Primer 5.0 对符合鉴定要求的 SSR 基元进行引物设计, 并通过 SSRFinder 校验 SSR 引物, 以期为青天葵遗传多样性分析、分子标记辅助育种、遗传图谱绘制等种质资源研究提供参考依据。结果表明:在青天葵转录组共检测到分布在 5 223 条 unigene 上的 5 684 个 SSR 位点, SSR 发生频率为 3.67%, 分布密度为 1/13 kb。二核苷酸重复为青天葵 SSR 主要基元类型, 其中 AG/CT 和 AT/AT 基序出现频率最高, 占 SSR 总数的 52.9%。设计筛选得到 2 486 条 SSR 引物。青天葵转录组 SSR 位点出现频率高、类型丰富、多态性潜能较高。

关键词:青天葵; SSR; 位点信息; 转录组

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0076-04

青天葵属兰科芋兰属多年生小草本植物毛唇芋兰 (*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.) 的全草或叶片, 是我国岭南地区名贵中药, 具有润肺止咳、清热解毒、散瘀止痛的功效, 对肺部疾病, 尤其是小儿呼吸道疾病有着显著疗效^[1]。由于人类过度开采和自身萌发条件苛刻, 青天葵面临着野生资源枯竭和人工栽培繁殖系数低的困境, 导致药材资源严重短缺。青天葵也早已在 1993 年被列入《中国南部石灰岩稀有濒危植物名录》^[2]。在资源

紧缺的情况下, 青天葵在种植和销售过程中出现了众多的混伪品, 造成其种质混乱, 品质下降, 进一步加剧了青天葵资源破坏程度。因此, 急需加强青天葵的资源保护和利用。但是, 青天葵目前主要开展了人工栽培^[3]、组织培养^[4]、药理药化^[5-6]等方面的研究, 其种质资源遗传多样性和分子标记辅助育种的研究尚少。

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 是指 1~6 个核苷酸串联重复单元, 又叫微卫星 DNA, 是一种广泛存在于原核生物和真核生物基因中的遗传标记, 具有共显性、信息丰富、多态性丰富等特点^[7], 现已广泛应用于植物分子辅助育种、遗传图谱构建、品种鉴定、遗传多样性分析、功能基因定位以及种子纯度鉴定等研究^[8]。目前, 党参^[9]、杜仲^[10]、西洋参^[11]、灯盏花^[12]等药用植物已利用第二代高通量测序 (next generation sequencing, NGS) 技术进行了转录组来源 SSR 位点挖

第一作者简介:黄琼林(1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为分子生物学。E-mail: perfectql@163.com.

责任作者:何瑞(1972-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药资源可持续利用与开发。E-mail: ruihe@gzucm.edu.cn.

基金项目:教育部留学回国人员科研启动资助项目(教外司留[2009]1001号); 广东医学院博士学位人员科研启动资助项目(B2013017)。

收稿日期:2015-01-19

results showed that the optimum chromosome preparation was achieved with collecting root tips at 10:30 AM, root length within 5 mm, pretreated for 2 hours in 0.1% colchicine at room temperature, spreading chromosomes by double-hypotonic treatment, dissociation with 1 mol/L HCl for 50 minutes at room temperature or 20 minutes at 60°C, and stained with 20% modified carbol fuchsin dyeing. The permanent slides could be made by the neutral resin. The karyotype analysis indicated that red pitaya is diploid ($2n=2x=22$), and the ratio of the longest chromosome to the shortest one was 1.63, so that the karyotype formula of red pitaya was $2n=22m$, belonging to 1A karyotype. The karyotype asymmetrical coefficient was 54.29%.

Keywords: red pitaya; aerial root; chromosome; preparation technique; karyotype analysis