

# 紫穗槐核型分析方法的探讨

时丽冉, 王 晶, 崔兴国

(衡水学院 生命科学系, 河北 衡水 053000)

**摘 要:** 采用低温 0.1%秋水仙素、0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液, 3 种预处理方法对紫穗槐的根尖进行处理。结果表明: 以 0~4℃处理 36 h 效果最佳。紫穗槐的体细胞染色体数目为  $2n=40$ , 核型公式  $K(2n)=2x=40=28m+8sm+2st+2m(SAT)$ , 核型分类为“2B”型, 不对称系数 57.70%, 为较对称类型。

**关键词:** 紫穗槐; 核型分析; 预处理方法

**中图分类号:** S 792.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0053-03

紫穗槐(*Amorpha fruticosa*)又名锦槐、紫花槐, 豆科紫穗槐属, 多年生落叶灌木, 原产北美。21 世纪初, 经日本引入我国东北, 现已发展到华北、华中、西北和长江流域地区, 紫穗槐是优良绿肥及茎条材兼用木本植物, 能改良土壤, 因其耐盐碱、耐瘠薄、耐干旱、耐涝、耐寒、抗沙压、抗逆性强, 并具有很强的抗病、虫、抗烟和抗污染能力, 所以生长范围非常广泛<sup>[1]</sup>。

对植物进行染色体核型分析是表明该物种特征、系统演化位置以及和相近种的亲缘关系的重要依据。核型是指染色体组在有丝分裂中期的表现, 包括染色体数目、大小、形态特征等<sup>[2]</sup>。因此得到清晰的中期染色体图像是进行核型分析的关键。经过前人的研究, 已摸索出多种方法对材料进行处理, 一般多采用根尖为研究对象, 利用物理方法和化学药物方法进行处理<sup>[3-6]</sup>。但不同植物由于其内在特点, 如种子的大小、胚根的粗细、萌发的速度等因素, 并不是所有方法都能取得良好的效果, 因此需要进行大量的探索, 寻找最适合该植物的预处理方法。现以紫穗槐为研究对象, 寻找适合紫穗槐的最快速、经济的核型分析方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 取材与萌发

紫穗槐种子 2007 年 11 月采于衡水湖湖滨林带。将其用自来水浸泡 24 h, 以软化坚硬的种皮, 利于种子吸水。种子置于铺有 1 层湿润滤纸的培养皿中, 25℃恒温培养, 待胚根伸长至 0.5 cm 左右时剪下进行处理。

### 1.2 胚根的预处理

采用如下 3 种方法对胚根进行预处理。

1.2.1 用低浓度的秋水仙素进行预处理 将紫穗槐的胚根浸泡于浓度为 0.1%的秋水仙素溶液中对其进行处

理。因为根尖脱离母体, 所以秋水仙素很容易从破损处渗入, 秋水仙素有很强的毒性, 如果用量过大或处理时间过长, 会引起染色体收缩过度或产生多倍体, 所以只需较低浓度和较短的时间即可。根据紫穗槐根尖的特点, 试验采用 0.1%的秋水仙素溶液 25℃处理 2 h。

1.2.2 用低浓度的 8-羟基喹啉溶液进行预处理 8-羟基喹啉溶液浓度范围在 0.002~0.004 mol/L, 该溶液适合处理具有较大染色体的植物。经该溶液处理后, 染色体的缢痕区比较清晰。试验采用浓度为 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉溶液, 在室温 25℃处理紫穗槐根尖 2 h。

1.2.3 用低温进行预处理 处理温度一般在 0~4℃, 最常用的就是用冰水混合物对材料进行预处理。该方法比较经济、简单和安全, 因而也比较常用。试验将紫穗槐的根尖放置在冰箱冷藏室处理 12~36 h。

### 1.3 低渗

低渗的目的是使水分通过细胞膜向细胞内渗入, 使细胞膨胀, 进而使细胞中本来已经分散的染色体更加分散。低渗液一般使用蒸馏水或 0.075 mol/L KCl 溶液。经长期的试验得知, 0.075 mol/L KCl 溶液对染色体的结构破坏较小, 处理后染色体较为明显清晰。低渗处理的时间应适当, 如果处理时间过短达不到应有的处理效果, 但是处理时间过长会使细胞胀破, 多个细胞的染色体混合在一起, 不容易观察和分析<sup>[7]</sup>。处理时间的长短因不同植物而定。在该试验中, 将预处理好的紫穗槐根尖用 0.075 mol/L 的 KCl 溶液处理 0.5 h。

### 1.4 材料的固定、解离、染色与制片

将处理后的根尖用卡诺氏固定液(无水酒精:冰醋酸=3:1)固定 2~24 h, 保存在 70%的乙醇中。制片前用 1 mol/L HCl 在 60℃进行解离 10 min, 解离的时间根据根尖的粗细确定, 很细的根尖解离时间不宜超过 5 min, 否则影响染色。改良品红染色 30 min, 常规方法压片。

### 1.5 镜检

选择分散良好的中期染色体在油镜下拍照分析, 染

第一作者简介: 时丽冉(1970-), 女, 硕士, 副教授, 现主要从事植物生理学与细胞生物学研究工作。E-mail: slr701212@163.com.

收稿日期: 2008-09-29

染色体计数至少观察统计 30 个完整的中期分裂相。核型分析至少测量 5 个细胞的染色体。核型分析按李懋学和陈瑞阳(1985)确定的标准<sup>[8]</sup>。染色体的相对长度、臂

比及类型按 Leven 等(1964)命名系统<sup>[9]</sup>。核型类型参照 Stebbins(1971)标准<sup>[10]</sup>。凭证标本保存于衡水学院生命科学系细胞生物学实验室。

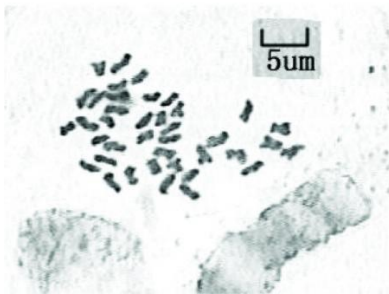


图 1 低温处理紫穗槐中期染色体图像

Fig. 1 Chromosome metaphase of *Amorpha fruticosa* with low temperature treatment

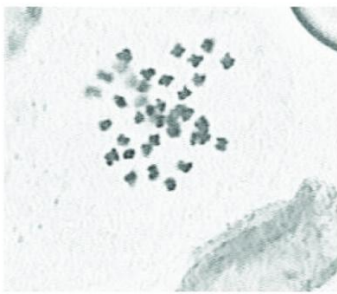


图 2 秋水仙素处理紫穗槐中期染色体图像

Fig. 2 Chromosome metaphase of *Amorpha fruticosa* with colchicine treatment

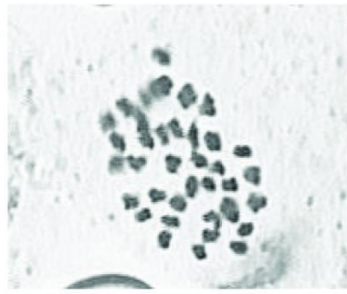


图 3 8-羟基喹啉溶液处理紫穗槐中期染色体图像

Fig. 3 Chromosome metaphase of *Amorpha fruticosa* with 8-Hydroxy Quinoline Min treatment

2 结果与分析

2.1 3 种预处理方法的比较

获得形态良好、分散适当、着丝点清晰的染色体图像是核型分析的关键。而材料的恰当处理对获得优良的染色体图像影响很大。结果表明,以 0~4℃处理 36 h 效果较好,中期分裂相多,染色体分散,着丝点清晰,适合进行染色体核型分析(见图 1)。而用秋水仙素和 8-羟基喹啉溶液处理之后,染色体中期分裂相虽然很多,但着丝点不清楚,长度相对缩小了很多(如图 2、3),对观察和分析不利。因此,对于紫穗槐而言,用低温处理 36 h 是预处理中最佳的方法。

臂/短臂),确定着丝点位置类型。在许多情况下,绝对长度不是一个可靠的比较数值。因为预处理条件和染色体缩短程度不同,所以即使是同一植物,不同作者所测得的绝对长度往往有明显差异。而相对长度则是比较稳定的可比较数值。相对长度=每条染色体长度/染色体组总长度×100%(见表 1)。根据表 1 的数值可以看出,紫穗槐 40 条染色体中臂比值在 1.01~1.70 范围的染色体为中部着丝点染色体(m)共 15 对,臂比值在 1.71~3.00 范围的染色体为近中部着丝点染色体(sm)共 4 对,臂比值在 3.01~7.00 之间的染色体称为近端部着丝点(st)共 1 对,在紫穗槐的染色体中发现 9 号染色体是具随体的染色体。根据以上数据,可以确定紫穗槐的染色体核型公式为  $K(2n)=2x=40=28m+8sm+2st+2m(SAT)$ 。



图 4 紫穗槐染色体核型图

Fig. 4 Karyotypes of *Amorpha fruticosa*

2.2 染色体数目及倍数

选择 30 个分散良好的中期染色体统计数目,确定紫穗槐体细胞染色体数目为  $2n=40$  条,占计数细胞的 97%,李懋学和陈瑞阳提出,85%以上的细胞具有恒定一致的染色体数目时,即可认为是该植物的染色体数目<sup>[8]</sup>。在观察的细胞中没有发现 B 染色体(见图 1)。

2.3 染色体长度组成及核型分析

2.3.1 核型公式的确定 取 5 个形态清晰、分散良好的染色体图像在油镜下用显微摄像系统拍照,将镜台测微尺在同等条件下拍照,以便测量染色体绝对长度(实际长度  $\mu m$ ),绝对长度=放大的染色体长度(mm)/放大倍数。用精密量角圆规准确测量 5 个细胞染色体的长臂、短臂长度,取平均值<sup>[11]</sup>。计算每条染色体的臂比值(长

表 1 紫穗槐染色体参数

Table 1 Chromosome parameter of *Amorpha fruticosa*

序号 No	染色体绝对长度 Chromosome Length/ $\mu m$	染色体相对长度 Chromosome relative length/%	臂比(长臂/短臂) Arm ratio	类型 Type
1	3.010=1.510+1.500	6.51	1.01	m
2	2.900=1.850+1.050	6.27	1.76	sm
3	2.875=1.650+1.225	5.95	1.35	m
4	2.750=1.525+1.225	5.95	1.24	m
5	2.550=1.300+1.250	5.51	1.04	m
6	2.525=1.275+1.250	5.46	1.02	m
7	2.500=1.500+1.000	5.41	1.50	m
8	2.475=1.575+0.900	5.35	1.75	sm
9	2.450=1.950+0.500	5.30	3.90	st
10	2.400=1.400+1.000	5.19	1.40	m
11	2.275=1.175+1.100	4.92	1.07	m
12	2.250=1.240+1.010	4.87	1.23	m
13	2.150=1.400+0.750	4.65	1.87	sm
14	2.050=1.400+0.650	4.43	2.15	sm
15	2.025=1.025+1.000	4.38	1.03	m
16	2.005=1.055+0.950	4.34	1.11	m
17	1.950=1.100+0.850	4.22	1.29	m
18	1.900=1.000+0.900	4.11	1.11	m
19	1.750=1.000+0.750	3.78	1.33	m
20	1.450=0.750+0.700	3.14	1.07	m

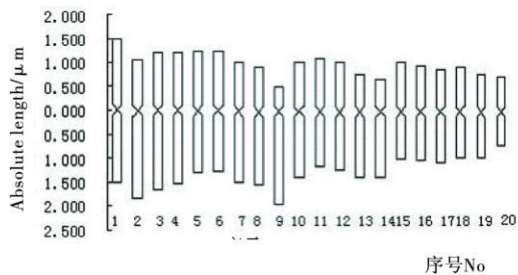


图 5 紫穗槐染色体核型模式图  
Fig.5 Idiograms of *Amorpha fruticosa*

2.3.2 紫穗槐核型图的制作 挑选具代表性的染色体图像打印,用眼科剪沿染色体边缘小心将每条染色体剪下,根据染色体的长短和形态特征进行同源染色体配对,然后按照从大到小的原则排列编号。用扫描仪将贴好的染色体扫描储存,得到染色体核型图(如图 4)。

2.3.3 紫穗槐核型模式图的制作 根据表 1 中所列各染色体的绝对长度,用 Excel 软件绘制核型模式图(图 5)。横坐标为染色体序号,纵坐标表示染色体绝对长度。着丝点的位置统一位于纵坐标的“0”点位置。核型模式图比较直观地体现了染色体组中各条染色体的形态。

2.3.4 紫穗槐核型分类 紫穗槐染色体总长 46.24 μm,平均长度 2.31 μm,属中小型染色体。染色体长臂总长 26.68 μm,根据 Arano<sup>[12]</sup> 的计算方法,染色体不对称系数=染色体长臂总长度/染色体组总长度(100%,紫穗槐染色体的不对称系数为 57.70%,为较对称类型。根据 Stebbins<sup>[10]</sup> 的“不对称核型分析”分类标准,属于“2B”型。

4 讨论

3 种预处理的方法中,用低浓度的秋水仙素进行预处理是因为秋水仙素能结合在微管蛋白二聚体上,阻断微管的装配,使纺锤体的形成受阻<sup>[3]</sup>,染色体停滞在分裂中期。但处理时间过长或浓度过高,会造成染色体缩短变形,甚至形成多倍体。因此采用秋水仙素进行处理需要进行大量的摸索,且秋水仙素价格昂贵,使用不当对人体会造成神经毒性。用低浓度的 8-羟基喹啉溶液进行预处理可以阻止或破坏纺锤体微管的形成,使有丝分裂过程被抑制在分裂中期阶段,以便累积较多的处于分裂中期的分裂相。但如果处理时间不当,使用 8-羟基喹啉溶液同样会导致染色体高度浓缩、变短,不利于进

行核型分析。低温处理同样会破坏微管的形成,获得中期分裂较多的细胞,但对染色体形态基本无影响,并且简单易行,试验发现,紫穗槐根尖在 0~4℃低温条件下处理 36 h 可以得到大量清晰的中期染色体图像用于核型分析。

试验的研究结果表明,紫穗槐的体细胞染色体数目为 2n=40,核型公式  $K(2n)=2X=40=28m+8sm+2st+2m(SAT)$ ,与国内有关紫穗槐属植物染色体基数 n=20 一致,核型分类是“2B”型。染色体绝对长度变异范围 1.45~3.01 μm,不对称系数 57.70%,属于较对称类型,一般认为染色体对称的植物为原始类型,不对称者属进化类型,因此紫穗槐在进化程度上属于较原始类型。这一结果与吕明亮的研究结果有所不同,他的预处理方法是用秋水仙素和 8-羟基喹啉处理,得到的核型公式是  $K(2n)=4X=40=30m+8sm+2st$ ,核型分类是“2A”型<sup>[4]</sup>。这可能是由于预处理方法不同造成的。

参考文献

[1] 陈汉斌,郑亦津,李法曾.山东植物志[M].青岛:青岛出版社,1997:650-653.  
[2] 吴桂容.细胞分类学研究进展[J].广西梧州师范高等专科学校学报,2004,20(2):75-79.  
[3] 孔红.3 种甘草属植物的核型研究[J].植物研究,2006,26(5):560-562.  
[4] 杨德奎.点地梅的染色体研究[J].山东科学,2002,15(3):9-11.  
[5] 杨美娟,杨德奎,付丽霞.两种车轴草的染色体研究[J].山东科学,2003,16(4):17-20.  
[6] 纪春艳,马玉心,崔大练.芦荟属四种植物染色体核型研究[J].中国林副特产,2002,62(30):15-16.  
[7] 刘永安,冯海生,陈志明.植物染色体核型分析常用方法概述[J].贵州农业科学,2006,34(1):98-102.  
[8] 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.  
[9] Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 197-201.  
[10] Stebbins, G. L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London: Edward Arnold, 1971: 88.  
[11] 杨汉民.细胞生物学实验[M].2 版.北京:高等教育出版社,1997:208.  
[12] Arano, H. Cytological studies in subfamily carduoideae(compositae) of Japan[J]. IX Bot Mag, 1963, 76: 32.  
[13] 翟中和,王喜忠,丁明孝.细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,2000:331.  
[14] 吕明亮.紫穗槐的染色体核型分析[J].辽宁中医学院学报,2006(1):84-85.

Study on Karyotype Analysis Methods of *Amorpha fruticosa*

SHI Li-ran, WANG Jing, CUI Xing-guo

(Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000, China)

**Abstract:** Using low temperature, 0.1% colchicine treatment, 0.002 mol/L 8-hydroxy quinoline solution processing, three methods to treatment the root tip of *Amorpha fruticosa*. The results showed that using low temperature with 36 hours was the best way. The number of chromosomes of *Amorpha fruticosa* was 2n=40, the karyotype formula was  $K(2n)=2x=40=28m+8sm+2st+2m(SAT)$ , belonging to "2B" type. The coefficient of non-symmetry was 57.70%, and it was a more symmetrical type.

**Key words:** *Amorpha fruticosa*; Karyotype analysis; Pretreatment methods