

裕民无刺红花染色体制片优化及核型分析

牛力涛^{1,2}, 王晓军¹, 郝秀英³, 刘 敏¹, 康喜亮¹, 袁永娴^{1,2}

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院 研究生院 北京 100039;

3. 新疆农业科学院 微生物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要: 比较了不同预处理和解离方法对裕民无刺红花染色体制片的影响, 观察 500 个根尖细胞, 比较不同部位中期细胞和适宜核型分析的中期细胞所占比例。结果表明: 用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉与 0.1% 秋水仙素按 1 : 1 混合 8 h, 1 mol/L 盐酸常温解离 6 min 制片所得染色体分散效果最佳。核型公式为 $2n=2X=24m$, 核型不对称系数 ($As.k\%$) 为 58.25%, 属于 1 B 类型, 核型对称性程度高, 表明裕民无刺红花在进化中处于比较原始类型。

关键词: 红花; 核型分析; 染色体; 制片

中图分类号: S 681.903.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)09-0157-04

红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 为 1 a 生草本植物, 属菊科红花属, 约由 20~25 种组成。红花分布较广, 在很多国家均有栽培。我国红花栽培历史悠久, 汉代就有关于红花栽培和药用的记载。近年来, 中国红花栽培面积在不断增加, 主要是药用和油药兼用^[1]。中国红花产区主要集中在新疆、四川、云南、河南等省。红花的干花具有活血通经, 去瘀疗伤, 宣毒透疹等功效, 有效药用成分为红花色素, 主要包括红花黄色素和红花红色素。红花种子含油率较高, 尤其是亚油酸含量很高, 且油质好, 用途广。红花油大量用来制作油漆和染料。红花是一种适应性强, 抗旱、抗寒、耐盐碱、耐贫瘠, 用途广泛的经济作物。近年来临床上常用来治疗子宫充血、心血管、血栓形成等疾病, 也作止痛, 消炎剂等应用。

裕民县是新疆红花的主要栽培基地, 主产无刺红花, 为油花兼用型。染色体研究可以为植物分类和进化研究提供有价值的信息^[2]。近年来, 红花的染色体核型分析文献已有报道³⁻⁴, 但未报道红花的具体品种, 且均采用常规制片方法, 其分析结果也有差别。该试验针对裕民无刺红花品质, 通过不同种制片方法制片, 对结果采用 Photoshop 图像处理软件进行处理, 并利用 Excel 数据处理软件对数据进行分析 and 绘制染色体核型分析图。对裕民无刺红花的核型进行分析, 以期为鉴定、起

源、演化、良种培育等研究提供必要的细胞学资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新疆裕民无刺红花品种。秋水仙素、8-羟基喹啉、无水乙醇、冰乙酸、盐酸、改良的石炭酸品红等均为国产分析纯试剂。OLYMPUS CH20 B1MF200 型显微镜。

1.2 试验方法

1.2.1 不同预处理及不同解离时间 供试材料的种子在 25℃ 恒温条件下萌发, 上午 9:30~10:30 取其生长旺盛的幼嫩根尖, 分别用 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉溶液 (8-Hydroxyquinolin)、0.1% 的秋水仙素溶液 (Colchicine)、0℃ 的冰水以及 0.002 mol/L 的 8-HQ 与 0.1% 的秋水仙素溶液 1 : 1 的混合溶液进行预处理 8 h, 蒸馏水洗涤后转入卡诺固定液 (Carnoy I) (无水乙醇 : 冰乙酸 = 3 : 1) 固定 24 h, 蒸馏水冲洗, 再分别用纯乙醇、95%、90%、85%、80%、75% 的乙醇冲洗, 最后用 70% 乙醇 4℃ 冰箱保存备用。制片时所取材料蒸馏水洗涤后, 在 1 mol/L HCl, 60℃ 恒温水浴中解离 4~7 min, 用改良苯酚品红染色, 常规方法压片。

1.2.2 染色体数目确定与核型分析方法 在各处理组中随机观察 500 个细胞, 统计其处于中期细胞的数量, 即为中期细胞所占比例; 同时统计染色体分散较好、适宜作核型分析的细胞数量, 即为适宜核型分析的中期细胞所占比例。选取 30 个染色体形态清晰、分散较好的细胞进行显微镜照相和核型分析。图像采用 Adobe Photoshop 7.0^[5] 及 Excel^[6] 软件进行处理, 核型分析方法根据李懋学等^[7] 的标准, 核型不对称系数 ($As.K\%$) 按 Arano^[8] 提出的方法计算, 染色体形态根据 Levan 等^[9] 的方法归类, 核型对称性按 Stebbins^[10] 的标准划分, 染色体体积采用 De-escevi^[11] 的计算方法。

第一作者简介: 牛力涛 (1982-), 男, 在读硕士, 现主要从事植物生理生化研究。E-mail: gaoyilitao@163.com。

通讯作者: 王晓军 (1962-), 男, 硕士, 研究员, 现从事植物资源利用研究。E-mail: wangxj@ms.xjb.ac.cn。

基金项目: 中科院“西部行动计划高新技术”资助项目 (KGCXZ-YW-509)。

收稿日期: 2010-02-22

染色体形态测量公式:染色体总长度=单细胞全部染色体长度之和;相对长度=(每一个染色体长度/总染色体长度)×100%;相对长度系数=染色体长度/全组染色体平均长度;着丝粒指数=短臂/染色体全长×100%;臂比=长臂(*q*)/短臂(*p*);核型不对称系数(*As*·*K*%)=长臂总长/全组染色体总长 100%。

2 结果与分析

2.1 染色体制片的优化

2.1.1 不同预处理对中期细胞数的影响 从表 1 可见,根尖用 0.002 mol/L 8-HQ 与 0.1% 秋水仙素 1:1 的混合溶液进行预处理的中期细胞数所占比率最高(21.2%),适宜核型分析的中期细胞比率也是最高(3.3%)。制片前的预处理因植物不同而有所差别,辛培尧等^[12-19]曾用 8-HQ 溶液处理根尖进行压片,顾蔚等^[17-18]用秋水仙素溶液处理外植体,祝长青^[19-20]用冰水处理甜瓜根尖进行压片,都有不错的效果,该研究从中大胆吸取经验,用 8-HQ 与秋水仙素按 1:1 混合,用混合液处理裕民无刺红花根尖 8 h,收到较理想的效果。

表 1 不用处理组制片得到中期细胞与适宜核型分析中期细胞的比率

取材部位	不同处理	处理时间/h	中期细胞比率/%	适宜核型分析
				的中期细胞比率/%
根尖	8-HQ	8	17.2	2.1
	秋水仙素溶液	8	18.7	2.8
	冰水	8	8.3	0.6
	8-HQ 与秋水仙素混合溶液	8	21.2	3.3

2.1.2 不同的解离时间对制片效果的影响 若盐酸解离时间稍长则不易染色,若解离时间不够则细胞与细胞不易分离,造成叠压现象,制片效果较差,因此,摸索合适的解离时间对获得较好的制片效果十分重要,该研究的解离时间从 4~7 min 不等,其中以 6 min 时效果最佳。研究中也曾用纤维素酶和果胶酶来代替盐酸,虽然酶解去壁效果好,但酶解后因有较大细胞杂质而使压片不清晰,影响核型分析,同时,成本相对也较高,通过比较,以 1 mol/L HCl,60℃恒温水浴中解离 6 min 时效果最好,染色体较易分散开,适宜作核型分析。

2.2 染色体数目及形态

选取 30 个染色体形态清晰、分散较好的分裂中期细胞对染色体进行计数,结果发现所有红花细胞染色体数均为 24 条,未发现非整倍体细胞,因此,裕民无刺红花染色体数目为 2*n*=2*X*=24(见图 1)。

染色体相对长度组成测定利用 Adobe Photoshop 7.0 根据周劲松所述方法,测量出染色体绝对长度,再根据染色体绝对长度计算出染色体其它参数,其结果见表 2。经测量分析,裕民无刺红花的 24 条染色体可配为 12 对,染色体平均长度为 12.44 μm,根据李懋学等的染色

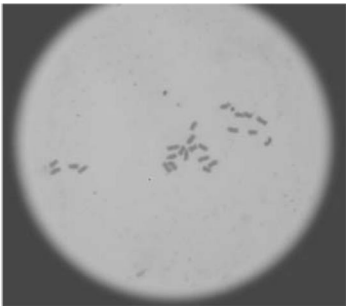


图 1 裕民无刺红花染色体形态

体分类标准,裕民无刺红花的 12 对染色体均为中部着丝粒(*m*)。染色体总长度为 149.33 μm。绝对长度变化范围为 10.58~14.81 μm,相对长度变化范围为 7.08%~9.92%,臂比变化范围为 1.09~1.69。

表 2 裕民无刺红花的核型分析

染色体编号	绝对长度/μm			相对长度/%			着丝粒指数	臂比(长/短)	染色体类型
	长臂	短臂	全长	长臂	短臂	全长			
1	8.19	6.63	14.81	5.48	4.44	9.92	0.45	1.24	m
2	8.06	5.95	14.01	5.40	3.99	9.38	0.45	1.36	m
3	8.05	5.33	13.38	5.39	3.57	8.96	0.40	1.51	m
4	8.06	5.18	13.24	5.40	3.47	8.87	0.39	1.56	m
5	7.79	4.75	12.54	5.22	3.18	8.40	0.38	1.64	m
6	7.20	4.98	12.18	4.82	3.33	8.15	0.41	1.45	m
7	6.30	5.80	12.10	4.22	3.88	8.10	0.48	1.09	m
8	6.49	5.54	12.03	4.35	3.71	8.05	0.46	1.17	m
9	6.65	5.33	11.98	4.45	3.57	8.02	0.45	1.25	m
10	6.84	4.79	11.63	4.58	3.21	7.79	0.41	1.43	m
11	6.73	4.15	10.88	4.50	2.78	7.28	0.38	1.62	m
12	6.64	3.94	10.58	4.45	2.64	7.08	0.37	1.69	m

2.3 染色体核型图

根据染色体绝对长度、相对长度、臂比等进行同源染色体的染色体排列,按染色体由长到短同源染色体重新编号,用 Photoshop 将照片中的染色体一一抠出来,重新放置在一张新图版上,并利用构造线将 12 对染色体着丝点排列在同一水平线上,短臂在上,长臂在下,即为染色体核型图(见图 2)。

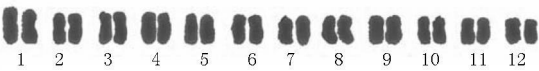


图 2 裕民无刺红花染色体核型图

2.4 核型模式图

利用 Excle 绘制图表功能,结合画图软件可制作核型模式图,横坐标为染色体序号,纵坐标为染色体的相对长度。长臂在下,短臂在上,着丝点在同一水平线上(见图 3)。

2.5 核型分析(核型公式及分类)

裕民无刺红花体细胞染色体数目 2*n*=24(图 1),核心分析数据见表 2,其核型公式为 2*n*=2*X*=24=24*m*。

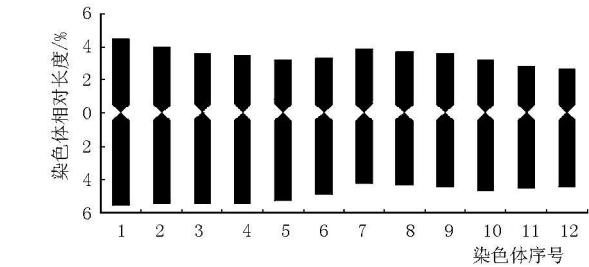


图3 裕民无刺红花染色体核型模式图

染色体总长度为149.33 μm, 长臂总长为86.99 μm, 根据 Arano 的方法计算方法, 核型不对称系数(As.K%)为58.25%, 核型对称性程度高。最长染色体与最短染色体之比是1.4 : 1.0。由于12对染色体的臂比值均小于2, 根据 Stebbins 的核型分类标准, 裕民无刺红花染色体核型类型为1 B型。

2.6 染色体体积

根据 De-veseovi 等的染色体体积计算公式得出各对染色体体积, 见表3。全组染色体总体积4 758.10 μm³, 裕民无刺红花染色体体积在308.31 ~ 529.81 μm³ 范围之内。

表3 裕民无刺红花染色体体积

染色体编号	染色体长 度/μm	染色体 宽度/μm	染色体 体积/μm ³
1	14.81	6.75	529.81
2	14.01	5.94	387.80
3	13.38	5.84	357.78
4	13.24	6.38	422.33
5	12.54	6.28	387.55
6	12.18	6.48	400.70
7	12.10	6.38	386.02
8	12.03	7.00	462.54
9	11.98	7.13	477.22
10	11.63	5.81	308.31
11	10.88	6.06	313.76
12	10.58	6.25	324.27

3 讨论

核型是区别物种的基本遗传学依据, 也对分子生物学的研究具有指导意义^[21]。裕民无刺红花染色体行为分析过程中发现, 不同的研究者采用不同方法报道的红花核型参数及类型差异较大, 且报道核型参数均不够完全。该试验通过多次压片观察, 利用计算机软件对照片进行处理分析, 获得精确度较高和较全的红花核型参数。由于先前研究者都未报道红花的具体品种, 因地域不同, 可能存在遗传多样性, 从而导致核型数据有所差异, 该试验所用材料为新疆塔城地区裕民县的无刺红花品种。裕民无刺红花的核型相对比较对称, 在植物界, 核型进化的基本趋势是由对称向不对称发展的, 系统演化上处于比较原始的植物, 大多具有相对对称的核型, 不对称的核型则常见于衍生的或进化较高级的植物^[22]。所以, 可以认为裕民无刺红花在系统演化上处于较古老的地位。该试验对裕民无刺红花体细胞染色体行为进

行了分析, 对红花品种间的鉴定、亲缘关系的确定、更优质品种的培育和开发等方面有重要的意义。

4 结论

裕民无刺红花染色体总体积4 758.10 μm³, 染色体为较大染色体。染色体数为2n=24, 核型公式是2n=2X=24=24m, 全组染色体总长度为149.33 μm, 长臂总长为86.99 μm, 核型不对称系数(As.K%)为58.25%。

参考文献

[1] 赵钢, 王安虎. 红花的资源及药用价值[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 25.

[2] 洪德元. 植物细胞分类学[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 198-199.

[3] 赵桦, 杨培君, 李会宁. 三种药用植物染色体组型分析[J]. 汉中师范学院学报(自然科学), 2004, 22(1): 70-73.

[4] 杨九艳, 王俊杰, 李凤云. 蒙药红花的染色体核型分析[J]. 中国民族医药杂志, 1999(5): 31-32.

[5] 周劲松, 苏小波, 汤泳萍, 等. 利用 Photoshop 进行芦笋核型分析的研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(2): 73-75.

[6] 乔永刚, 宋芸. 利用 EXCLE 制作核型模式图[J]. 农业网络信息, 2006(10): 97-98.

[7] 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(4): 297-302.

[8] Arano H. Cytological studies in subfamily carduoideae (compositae) of Japan. IX [J]. Bot Mag, 1963 76: 32-39.

[9] Levan A. Nomenclature for centromere position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52: 201-220.

[10] Stebbins G L. Chromosome evolution in Ksher Cants [M]. London: Edward Aronld, 1971: 88-105.

[11] De-veseovi et al. Comparative karyotype analysis of Douglas-fir [J]. Silvae Genet, 1975, 24(2-3): 4.

[12] 辛培尧, 尚勋武, 郭鸿彦, 等. 大麻染色体行为分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(11): 2189-2193.

[13] 曹清河, 马代夫, 张安. 甘薯近缘种染色体核型及花粉粒超微结构分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1610-1613.

[14] 张景华, 陈瑶瑶, 王广东. 杂交兰×蕙兰种间杂交后代的核型特征分析[J]. 分子植物育种, 2009(2): 380-384.

[15] 张旭, 吴卫, 郑有良, 等. 紫苏属植物染色体数目和核型分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(10): 1972-1977.

[16] 王小蓉, 汤浩茹, 段娟, 等. 中国悬钩子属空心莓组与木莓组 28 种和变种的核型比较研究[J]. 植物分类学报, 2008, 46(4): 505-515.

[17] 顾蔚, 卜海东, 张成艳, 等. 华中五味子染色体制片优化及核型分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(2): 0262-0266.

[18] 李倩, 张桂彬, 孙崇苹. 两种观赏吊兰的核型分析[J]. 北方园艺, 2009(3): 202-204.

[19] 祝长青, 李明敏, 周慧, 等. 铅胁迫对甜瓜染色体核型的影响[J]. 种子, 2008, 5(27): 29-31.

[20] 陈仕勇, 马啸, 张新全, 等. 10 个四倍体披碱草属物种的核型[J]. 植物分类学报, 2008, 46(6): 886-890.

[21] 闫素丽, 安玉麟, 孙瑞芬, 等. 染色体核型分析及染色体显微分离技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 70-74.

[22] 李懋学, 张教方. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991.

红掌组织培养过程中外植体褐变的研究

杜敬然¹, 赵 斌¹, 李英丽¹, 李荣华², 方正¹

(1. 河北农业大学 河北省生物无机化学重点实验室 河北 保定 071001; 2. 沧州师范专科学校 生物系, 河北 沧州 061001)

摘 要: 在红掌组织培养过程中, 外植体易发生褐变, 严重阻碍了红掌组织培养的正常进行。现以红掌‘红粉佳人’(Anthurium andraeanum cv. Sonate)品种为试材, 取健康植株幼嫩叶片为外植体, 对其愈伤组织培养过程中褐变现象进行研究。研究不同抗氧化剂、吸附剂(柠檬酸、抗坏血酸 VC、叶酸、聚乙烯吡咯烷酮 PVP、活性炭 AC)以及不同培养基硬度的防褐化效果。结果表明: 使用硬度为 5 g/L 琼脂的 MS 培养基, 并添加 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 0.2%可有效控制褐变并获得较高的愈伤诱导率。

关键词: 红掌; 组织培养; 外植体; 褐化

中图分类号: S 682.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)09-0160-03

红掌(Anthurium andraeanum)属天南星科(Araceae)花烛属(Anthurium Schott)^[1], 又名火鹤、安祖花、大叶花烛、红鹤芋、哥伦比亚花烛等, 是多年生附生常绿草本花卉, 原产于哥伦比亚和厄瓜多尔^[2]。其肉穗花序黄色^[3], 具有红色、橙色、黄色、粉色、绿色及白色蜡质佛焰苞, 高雅别致, 适合于高档场所和家庭室内摆放。红掌花期很长, 盆栽品种可以四季开花, 并且瓶插水养期可

长达 1 个月^[4] 是一种花叶兼赏的价值很高的名贵盆栽及切花的高档花卉, 深受人们喜爱。红掌通常以分株繁殖为主, 以扦插为辅, 繁殖速度很慢, 自然繁殖远不能满足市场需求, 所以组织培养已成为重要的繁殖途径, 但在组培过程中外植体的褐化现象成为亟待解决的难题。该研究旨在找出红掌组织培养过程中防止褐化的最佳条件, 从而提高红掌组培诱导率和繁殖系数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红掌品种‘红粉佳人’(Anthurium andraeanum cv. Sonate) 购自北京大兴苗圃, 以健康植株的幼嫩叶片为试材, 试验于 2009 年 3~5 月在河北农业大学生物无机化学重点实验室组培室进行。

第一作者简介: 杜敬然(1982-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士, 研究方向为植物营养与品质。E-mail: djr518@yahoo.com.cn

通讯作者: 方正(1963-), 男, 河北万全人, 博士, 研究员, 现主要从事植物营养研究方面的工作。E-mail: Fangzheng555@hebau.edu.cn

基金项目: 河北省科技厅博士基金资助项目(00547001 D-3)。

收稿日期: 2010-02-02

Optimization of Chromosome Sectioning and Karyotype Analysis of *Carthamus tinctorius* L.

NIU Li-tao^{1,2}, WANG Xiao-jun¹, HAO Xiu-ying³, LIU Min¹, KANG Xi-liang¹, YUAN Yong-xian^{1,2}

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi, Xinjiang 830091)

Abstract: The different methods of the pretreatments and dissociations in chromosome sectioning of *Carthamus tinctorius* L. were compared. 500 top of root cells were observed, the proportions of metaphase cells and the metaphase cells which were suitable for karyotype analysis were compared. The results showed that the pretreatment with the mixture of 0.002 mol/L 8-Hydroxyquinolin and 0.1% Colchicine(v :v=1 :1) 8 h, 1 mol/L HCl at normal temperature 6 min performed well in the sectioning. The karyotype analysis revealed that the karyotype of *Carthamus tinctorius* L. was $2n=2X=24=24m$ and its index of $AS.K\%$ was 58.25%, the karyotype asymmetry belonged to 1 B type, its karyotype was symmetrical. This suggested that it was relatively primitive forms.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; karyotype analysis; chromosome number