

嵩明海菜花的核型分析

郭 庆¹, 翟书华¹, 熊继会¹, 黄定兴²

(1. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650031; 2. 昆明市第三十中学, 云南 昆明 650031)

摘 要:以我国云南省嵩明海菜花为试材, 研究其体细胞染色体数目和核型($2n=2x=22=12m+8sm+2st$)。结果表明:嵩明海菜花核型类型为“2B”型, 与海菜花属的核型非常相近, 这为进一步研究水鳖科海菜花属的系统演化提供了重要的细胞学资料, 为海菜花的 1 个新变种提供细胞学依据。

关键词:嵩明海菜花; 染色体; 核型

中图分类号:S 555⁺.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)02-0121-04

海菜花(*Ottelia acuminata* (Gagnep))是国家重点保护的珍稀濒危水生植物, 中国独有, 属国家 3 级重点保护植物。嵩明海菜花是植物界被子植物门单子叶植物纲水鳖目水鳖科植物, 为海菜花(水鳖科)的 1 个新变种, 是多年生水生草本, 完全沉在水里, 主根不发达, 由许多不定根形成须根系。茎缩短、叶基生, 花单性, 雌雄异株, 白色花瓣, 雌、雄蕊为黄色, 种子数多, 先端有毛, 可进行种子繁殖或根茎繁殖。

分布于云南、贵州、广西和海南部分地区海拔 2 700 m 以下的湖泊、池塘、沟渠和深水田中。可生长在 4 m 的深水中, 要求水体特别干净, 喜温暖。一般花期 5~10 月, 温暖地区全年有花。云南省嵩明县黑龙潭、青龙潭和上村龙潭的海菜花因其叶形与原变种不同而被蒋柱檀等定为海菜花(水鳖科)的 1 个新变种(*O. acuminata* var. *songmingensis* Z. T. Jiang et al.)。

对海菜花的核型分析曾有过《通海海菜花的核型研究》^[1]和《路南海菜花的核型分析及其海菜花属的演化探讨》^[2]的报道。2005 年 9 月蒋柱檀等报道了《嵩明海菜花是海菜花(水鳖科)的一新变种》^[3], 该变种与原变种的区别在于叶片带状厚纸质, 不透明, 叶尖钝圆或具短尖, 现阶段还没有嵩明海菜花的核型分析的报道, 现以云南省嵩明海菜花为试材, 研究其体细胞染色体数目和模型, 以期水鳖科海菜花属的系统演化提供细胞学资料, 为海菜花的一新变种提供细胞学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 嵩明海菜花(*O. acuminata* var. *songmingensis* Z. T. Jiang et al.)采自云南省昆明市嵩明县黑龙潭(图 1)。嵩明海菜花除叶形外与海菜花很相似。海菜花的叶形是随着底质营养条件、水体环境和气候等环境因素的变化而变化, 变异很大, 甚至同一植株的不同年龄阶段的叶形也不一样。而嵩明海菜花各年龄阶段的叶形保持不变, 在不同营养条件底质、不同水体流速、不同水深的条件下, 仍保持带状厚纸质的叶片形态。根据这一特性将嵩明海菜花确定为 1 个新变种(图 2)。原变种海菜花的叶片膜质, 半透明, 形状多变, 由披针形、长椭圆形、狭卵形、广卵形至宽心形, 先端急尖、渐尖, 基部楔形、圆形、心形至深心形。嵩明海菜花的叶片呈长带状、叶片边缘全缘或者略具波状褶皱, 叶脉、佛焰苞、花梗、萼片背面中脉上无疣刺及疣凸, 仅果棱上有疣凸。

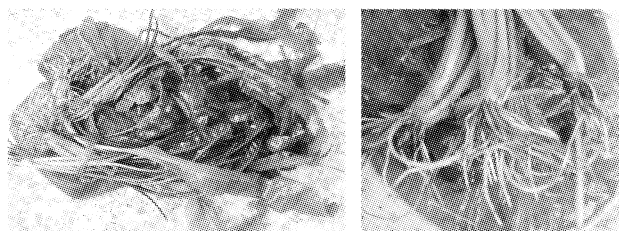


图 1 嵩明海菜花



图 2 嵩明海菜花的叶型

第一作者简介:郭庆(1968-),女,四川泸州人,硕士,副教授,现从事细胞学与动物学研究工作。E-mail: gqbioinformatic@126.com。

基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(2010C211);云南省自然科学基金资助项目(2010ZC165)。

收稿日期:2011-11-03

1.1.2 试验试剂 卡诺氏固定液:冰醋酸:无水乙醇=1:3; α -2 溴萘饱和液:将 1 滴 α -2 溴萘滴到 100 mL 蒸馏水中用力摇匀(现配现用);1 mol/L 盐酸:10 mL 浓盐酸加水稀释至 120 mL;卡宝品红染色液:先配成 3 种原液,再配成染色液。原液 A 为 3 g 碱性品红溶于 100 mL 70%乙醇(可长期保存);原液 B 为原液 A 10 mL 加入 90 mL 5%石炭酸水溶液(限 2 周内使用);原液 C 为原液 B 45 mL,加冰乙酸和福尔马林(37%甲醛)各 6 mL(可长期保存)。染色液为取原液 C 10~20 mL,加 45%的乙酸 80~90 mL,再加山梨醇 1.8 g,配成 10%~20%的石炭酸品红液,放置 2 周后使用,着色能力显著加强。

1.2 试验方法

1.2.1 取材 采集整株嵩明海菜花,养殖在水槽中,置于向阳处,经常换洁净的水,一般 1 个星期换 2~3 次水。试验时将海菜花捞出,用镊子切取长势好、长度为 0.5~1.5 cm 左右的根尖进行处理。

1.2.2 预处理 将切取的根尖投入稀释好的 α -2 溴萘饱和液中预处理 4~8 h(10~15℃)。

1.2.3 固定 将预处理过的根尖用蒸馏水冲洗干净后移入卡诺氏固定液中固定 10~16 h(14~20℃),固定液的量约为材料的 10 倍。固定后若要保存,则用 95%酒精冲洗后转入 70%酒精中,于 4℃冰箱保存;若要继续试验,则可用蒸馏水清洗掉药液后方可进行下一步操作。

1.2.4 解离 将固定后的根尖置于载玻片上(最好 1 块载玻片放置 1 个根尖),加入 1 mol/L 盐酸的解离液,加的量大约是材料的 3~4 倍,室温下解离 10~15 min,解离完毕用自来水将解离液彻底洗净。

1.2.5 染色及压片 将解离好的根尖置于载玻片中间,放在解剖镜下切去根冠(大概 1~2 mm),从分生组织切取尽可能薄的一小片滴加卡宝品红染液,染色大约 5~10 min,盖上盖玻片,用吸水纸覆于盖玻片一侧并用手按住,用橡皮头敲击根尖切片,用力要均匀,将材料敲击分散^[6]。

1.3 镜检及核型分析

将玻片置于显微镜下观察,找到染色体分散良好、形态清晰的有丝分裂中期细胞,数出细胞中的染色体数目。大约统计 120 个细胞。在染色体计数的基础上,选择 10 个典型的细胞,用形态学分析软件处理(显微镜 40 倍,缩放 200%),测量每条染色体的长臂和短臂。

计算出染色体的相对长度,计算公式:相对长度(%)=染色体长度/染色体组总长度×100。

将 2 条同源染色体的相对长度计算平均值,作为染色体组中这一序号的染色体的相对长度。算出这些参数后,最为接近的染色体为同源染色体。利用 Adobe Photoshop 软件处理染色体的配对。

计算出每条染色体的臂比,计算公式:臂比(r)=长

臂(L)/短臂(S)。式中,长、短臂的值取自 2 条同源染色体的平均值,臂比值反应着丝粒的位置,是描述染色体特征的重要指标,该试验采用 Levan 等^[5]提出的着丝粒命名法。

2 结果与分析

2.1 嵩明海菜花的染色体数目

由表 1 可知,嵩明海菜花的染色体数目为 $2n=22$,试验数据同时也反映出种群内不同个体间染色体数目有所不同,同一个体的不同细胞间染色体数目也不相同,所记录到的 120 个细胞分裂中期细胞染色体的计数观察到有 $2n=14, 16, 18, 20, 22$ 的染色体数目变化,其中 $2n=22$ 的个数为最多,数据的变化没有明显的规律,进一步论证了李恒^[8]的海菜花属通常发生染色体数目不规则变化的结论。

表 1 嵩明海菜花的染色体数目统计

$2n=$	22	20	18	16	14
细胞个数	77	16	11	7	9
所占百分数/%	64.17	13.33	9.17	5.83	7.50

注:细胞总数=120 个。

2.2 嵩明海菜花的染色体长度、臂比和类型

染色体的绝对长度即测量出的实际长度,在不同的处理条件或不同的生理状况下表现不同,因此并不可靠。核型分析中用染色体的相对长度表示该染色体的长度。由表 2 可知,按 Levan 等^[5]的染色体分类标准,确定嵩明海菜花的核型公式为 $2n=2x=22=12m+8sm+2st$,着丝粒位置为中部、亚中部和亚端部着丝粒区,没有正中、端部着丝粒区和端部着丝粒。臂比范围为 1.21~3.63,臂比平均值为 1.82。染色体实际长度范围为 3.00~13.44 μm ,相对长度范围为 4.25~19.03,最长与最短染色体比为 4.48,染色体组总长度为 70.65 μm 。

表 2 嵩明海菜花的核型分析

染色体序号	实测染色体长度 (长臂+短臂=全长)/ μm	染色体相对长度/%	臂比=长臂/短臂	类型
1	7.36+6.08=13.44	10.42+8.61=19.03	1.21	m
2	5.05+3.08=8.13	7.15+4.36=11.51	1.64	m
3	6.03+1.66=7.69	8.54+2.35=10.89	3.63	st
4	4.38+2.76=7.14	6.20+3.91=10.11	1.59	m
5	4.14+2.33=6.47	5.86+3.30=9.16	1.78	sm
6	3.72+2.26=5.98	5.27+3.20=8.47	1.65	m
7	3.35+2.28=5.63	4.74+3.23=7.97	1.47	m
8	3.01+1.94=4.95	4.26+2.75=7.01	1.55	m
9	2.89+1.49=4.38	4.09+2.11=6.20	1.94	sm
10	2.49+1.35=3.84	3.52+1.91=5.43	1.84	sm
11	1.89+1.11=3.00	2.68+1.57=4.25	1.71	sm

注:染色体组总长度=70.65 μm 。

2.3 嵩明海菜花核型的对称性分析

核型的对称性分析是核型分析的重要内容之一,在研究染色体组的起源与进化中占有重要地位。根据 Arano H^[9] 提出的核型不对称系数(As. K)的方法计算,即: $As. K\% = \text{长臂总长} / \text{全组染色体总长} \times 100$ 。嵩明海菜花的 $As. K = 62.72$,表明嵩明海菜花的核型为不对称,最长与最短染色体之比为 4.8,臂比大于 2:1 的染色体为 0.09。根据 Levan A 等^[5] 提出的着丝粒命名法分析,1、2、4、6、7、8 号染色体的着丝粒位置为中部着丝粒区,5、9、10、11 号染色体的着丝粒位置为亚中部着丝粒区,3 号染色体的着丝粒位置为亚端部着丝粒区,没有正中中部着丝粒区和端部着丝粒,由此说明,嵩明海菜花的染色体没有随体及 B 染色体存在。根据 Stebbins G L^[10] 提出的核型分类划分标准,嵩明海菜花的核型属 2B 型。

2.4 嵩明海菜花染色体核型比较分析

图 3 和图 4 分别为嵩明海菜花的染色体及其配对结果。



图 3 嵩明海菜花的染色体

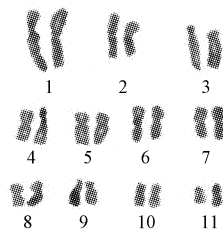


图 4 嵩明海菜花的染色体配对

将嵩明海菜花与海菜花、通海海菜花和路南海菜花的核型公式、臂比平均值、标准差和变异幅度等进行对比,嵩明海菜花和通海海菜花都出现了 2st 染色体,区别在于嵩明海菜花的 sm 比通海海菜花的多;核型类型只有路南海菜花为 1B 型,其余都是 2B 型;平均臂比,嵩明海菜花为最高,其次为通海海菜花;对比臂比 > 2 的染色体比例,在 11 对染色体中,嵩明海菜花有 1 对;与其它海菜花不同;最长染色体与最短染色体的比值,嵩明海菜花的值为最大;嵩明海菜花的标准差在海菜花与通海海菜花之间,更接近海菜花的标准差;嵩明海菜花的变异幅度最大,通海海菜花次之(表 3)。

由以上对比可推测,嵩明海菜花可能是在海菜花的基础上变异而得,与通海海菜花相同,可能是原变种染色体结构变异所致。从核型方面分析为三者的亲缘关系提供了一定证据。在宏观上表现出嵩明海菜花除叶形外与海菜花很相似。海菜花的叶形是随着底质营养条件、水体环境和气候等环境因素的变化而变化,变异很大,甚至同一植株的不同年龄阶段的叶形也不一样。而嵩明海菜花各年龄阶段的叶形保持不变,在不同营养条件底质、不同水体流速、不同水深的条件下,仍保持带状厚纸质的叶片形态,这些不同可能由染色体变异所导致。

表 3 4 种海菜花属植物的核型比较

种名	嵩明海菜花	通海海菜花	路南海菜花	海菜花
核型公式	$2n=2x=22$ $=12m+8sm+2st$	$2n=2x=22$ $=18m+2sm+2st$	$2n=2x=22$ $=18m+4sm$	$2n=2x=22$ $=20m+2sm$
核型	2B	2B	1B	2B
平均臂比	1.82	1.61	1.40	1.40
臂比 > 2 染色体比例	1/11	2/11	0/11	2/11
最长染色体/最短染色体	4.48	3.12	3.00	2.38
标准差 SD	0.63	0.86	0.26	0.50
变异幅度	1.82 ± 0.23	1.61 ± 0.28	1.40 ± 0.15	1.40 ± 0.21
文献	该文	[1]	[2]	[11]

3 结论与讨论

从整个试验过程来分析,按照宏观到微观的思路来进行,运用了植物学、细胞生物学、遗传学和计算机的 Adobe Photoshop 软件和形态学分析软件等方法,首先根据蒋柱檀等报道了嵩明海菜花是海菜花(水鳖科)的一新变种,在宏观上表现出嵩明海菜花除叶形外与海菜花很相似。海菜花的叶形是随着底质营养条件、水体环境和气候等环境因素的变化而变化,变异很大,甚至同一植株的不同年龄阶段的叶形也不一样。而嵩明海菜花各年龄阶段的叶形保持不变,在不同营养条件底质、不同水体流速、不同水深的条件下,仍保持带状厚纸质的叶片形态。由宏观上的异同来研究微观的异同,微观的染色体的形态所体现的异同决定了宏观的异同。该试验也体现出一个问题,即染色体变异导致性状表现的变异,当然环境因素也可能有一定的影响。

参考文献

- [1] 翟书华,姚忠庆,邹晓菊. 通海海菜花的核型研究[J]. 陕西师范大学学报, 2001, 29(S1): 84-87.
- [2] 翟书华,王斌,王定康,等. 路南海菜花的核型分析及其海菜花属的演化探讨[J]. 湖泊科学, 2010, 22(5): 735-738.
- [3] 蒋柱檀,李恒,刀志灵. 海菜花(水鳖科)一新变种嵩明海菜花[J]. 广西植物, 2005, 25(5): 424-425.
- [4] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [5] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [6] 李正理. 植物制片技术[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [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, 3(3): 297-302.
- [8] 李恒. 海菜花属的分类、地理分布和系统发育[J]. 植物分类学报, 1981, 19(1): 18-22.
- [9] Arano H. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Composite) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenetic considerations on Pertya and A in sliaea [J]. BotMag (Tokyo), 1963, 76: 32-39.
- [10] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London: Edward Arnold Ltd, 1971.
- [11] 王宁珠. 九种水鳖科植物染色体数目及其核型分析[J]. 植物分类学报, 1986, 24(5): 370-375.

苦瓜离体再生体系建立的研究

武 鹏¹, 方 锋 学², 黄 如 葵³, 黄 熊 娟³, 陈 小 凤³

(1. 广西农业科学院 广西现代农业科技示范园, 广西 南宁 530007; 2. 广西农业科学院 甘蔗研究所, 广西 南宁 530007;
3. 广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007)

摘 要:以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的激素组合进行苦瓜离体再生体系的研究。结果表明: 种子去壳洗净浸泡 5 min, 用 70% 酒精浸泡 1 min, 洗净后 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 的灭菌效果最好; 通过愈伤组织诱导不定芽没有取得成功; 利用无菌苗不同部位直接诱导不定芽, 子叶节效果最好, 最高诱导率达到 100%, 最适宜诱导培养基是 MS+6-BA 2 mg/L+IBA 0.02 mg/L 和 MS+6-BA 4 mg/L+IBA 0.01 mg/L; 最适生根培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L。

关键词: 苦瓜; 离体培养; 愈伤组织; 不定芽

中图分类号: S 642.503.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2012)02-0124-03

苦瓜(*Momordica charantia* L.) 属于葫芦科苦瓜属 1 a 生蔓生草本植物, 又称凉瓜、锦荔枝、红姑娘、癞瓜、红羊等, 起源于印度和缅甸, 现广泛分布于热带、亚热带和温带地区, 在印度、日本和东南亚栽培历史悠久。苦瓜作为蔬菜作物主要以食用嫩瓜为主, 具有较高的营养价值, 同时还具有很高的药用价值。近年来, 有关苦瓜组织培养方面的研究虽日益增多^[1-17], 但现有的苦瓜离体再生体系并不适于离体遗传转化, 因此, 该试验通过苦瓜的种子无菌萌发, 研究适合于苦瓜离体遗传转化的再生体系, 为今后通过现代生物技术培育苦瓜优良品种或创造新种质提供理论依据和技术支持。

第一作者简介: 武鹏(1978-), 男, 硕士, 助理研究员, 现从事蔬菜育种与栽培研究工作。E-mail: wupeng@gxaas.net。

基金项目: 广西农业科学院基本科研业务专项资助项目(200815(基))。

收稿日期: 2011-11-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦瓜自交系‘MC9’和‘MC42’, 由广西农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 试验方法

MS 培养基和 1/2MS 培养基(MS 培养基大量元素用量减半), 蔗糖 20 g/L, 琼脂 10 g/L, pH 5.8。培养温度为(28±1)℃, 光照强度为 2 000 lx, 每日光照 14 h, 黑暗 10 h。

1.2.1 种子无菌萌发 用以下 3 种处理方式去种壳: (1) 55℃ 温水浸种 10 min, 然后室温浸泡 24 h, 在超净台上用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水洗净待用; (2) 在超净台上用 10% NaClO₄ 浸泡 15 min, 无菌水洗净待用; (3) 用水浸泡 5 min, 在超净台上用 70% 酒精泡 1 min, 洗净后 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水洗净待用。把消毒好的种子接种于 MS 培养基中, 各接 6 瓶, 每瓶 5 粒, 放入培养箱, 10 d 后统计污染率和发芽率。比较各种消

Karyotype Analysis of *Ottelia acuminata* var. *songmingensis* Z. T. Jiang

GUO Qing¹, ZHAI Shu-hua¹, XIONG Ji-hui¹, HUANG Ding-xing²

(1. Department of Life Science and Technology, Kunming College, Kunming, Yunnan 650031; 2. 30th Middle School of Kunming, Kunming, Yunnan 650031)

Abstract: Taking *Ottelia acuminata* var. *songmingensis* Z. T. Jiang which grows in Yunnan, China as the material. The chromosome number and karyotype ($2n = 2x = 22 = 12m + 8sm + 2st$) were studied. The results showed that the karyotype belongs of *Ottelia acuminata* var. *songmingensis* to ‘2B’ and was very similar to that of the *Ottelia*. This was for further study of the water turtle evolution of the genus *Kehai Ottelia acuminata* provides important cytological data for the sea to provide a new variety of cauliflower cytological basis.

Key words: *Ottelia acuminata* var. *songmingensis*; chromosome; karyotype