

蒙古黄芪体细胞染色体核型及带型分析

林 勤, 阿布地热合木·热合曼, 任 贤

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以蒙古黄芪种子根尖为试验材料,采用细胞化学染色与制片、C-分带、计算机及其软件辅助,测量鉴定与比对分析的方法,研究了中药草蒙古黄芪体细胞染色体数目、核型与带型。结果表明:蒙古黄芪体细胞染色体核型是 $2n=16=2L+4M_1+6M_2+4S$,共有 8 对染色体,核型类型属于 2B 型, $A.sK$ (核型不对称系数) $=16.17/25.63 \times 100\% = 63.09\%$,染色体总体积为 $69.0 \mu m^3$;蒙古黄芪的体细胞染色体 C-带带型为 $2n=16=8m+6sm+2sm^+sat$,第 3 号染色体短臂区段带有随体,该试验可为黄芪及其蒙古黄芪的鉴定识别与利用提供参考。

关键词:蒙古黄芪;染色体;核型分析;C-带型

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0104-04

黄芪(*Astragalus membranaceus*)属豆科黄耆属多年生草本植物,别名绵芪,植株高 30~80 cm,主要的生产地有东北、华北及西北地区的内蒙、新疆、宁夏等,喜凉爽、耐寒耐旱,但怕热忌涝,适宜在土层深厚、肥沃,疏松的壤土中生长,在强盐碱地不宜种植,一般在林缘,灌丛和林地生长比较多、草地和山坡上也能看到分布^[1]。黄芪的药用部位是其干燥的根,是一种经常使用的名贵且用量大的中药材之一。味甜,微温,具有益气,增强免疫功能,保护肝脏,利尿急,抗衰老,抗压力,降低血压和更广泛的抗细菌作用^[2-3],是一种具有很大开发潜力的药用经济类植物。

蒙古黄芪(*Astragalus mongolicus*)体细胞染色体的核型、带型分析是在对该物种体细胞核内的染色体进行测量计算的基础上,进行分组、排队、配对并进行形态和定量表述带型变化等^[4-6],对于探讨该物种的遗传机制、物种亲缘关系与进化、远缘杂种的鉴定等都具有重要意义。

现利用蒙古黄芪种子根尖体细胞化学染色与制片、C-分带的方法及技术,计算机及其软件测量鉴定与比对分析的方法,研究了中药草蒙古黄芪体细胞染色体数目、核型与带型,以为该药用植物的栽培和良种利用提供细胞遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蒙古黄芪种子来源于宁夏农林科学院种质资源所金沙湾农场课题组。试验器具、药品和试剂等均由北方民族大学生物科学与工程学院细胞遗传学实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发与根尖制取 选择饱满无伤的蒙古黄芪种子,用自来水冲洗干净,利用 400 mL 蒸馏水中加 100 mL(浓度为 20 mg/L)GA₃ 溶液,加温至 40℃,在室温条件下浸泡种子 24 h 之后,再用无菌水冲洗 3 次,并放入培养皿(垫滤纸,加适量蒸馏水)中置于 25℃ 培养箱中发芽 3~4 d 后,9:00—10:00 时取其长度为 1.5~2.0 cm 的根进行预处理与固定。

1.2.2 根尖预处理与固定 将 1.2.1 所得到的根用 0.05% 的秋水仙碱溶液在室温下处理 1 h,之后用蒸馏水冲洗干净,加 Carnoy 固定液固定 24 h 后,倒掉固定液并冲洗,放入 70% 的酒精中在 4℃ 冰箱内保存待用。

1.2.3 体细胞染色体制片 材料酶解与软化:取出固定待用的部分根材料,加入 1% 果胶酶和纤维素酶等量混合的酶液,在 25℃ 的水浴锅中加热酶解处理 1 h 后,再将其材料放到 40% 醋酸液中进一步软化 15 min 左右,弃除醋酸液并用蒸馏水冲洗干净;染色:将酶解软化的材料移入一小烧杯中,加入适量蒸馏水浸泡,取其 1 条根放入干净的载玻片上,加 1 滴碱性品红染液,静止 7~8 min 染色;压片:材料染色后,在载玻片上,用刀片切除弃去根冠和根毛区部分,留 1.0~1.5 mm 左右的分生区,用解剖针或眼科镊子将其敲碎,弃除杂质,然后盖上

第一作者简介:林勤(1964-),男,本科,高级工程师,研究方向为微生物发酵及农产品加工。E-mail:18709589588@163.com.

责任作者:任贤(1957-),男,硕士,教授,研究方向为遗传育种。E-mail:renxian57@163.com.

基金项目:国家民委《微生物发酵酿造工艺重点实验室》资助项目。

收稿日期:2014-11-10

盖玻片,并在其上放一小块吸水纸吸除多余染液和用解剖针垂直轻敲几下后,再放一合适的橡皮擦用拇指适力下压,使其细胞分散;镜检与显微照相及保存制片:在显微镜($\times 20$ 、 $\times 40$ 、 $\times 100$ 目镜)下,选择细胞分裂中、后期染色体清晰且分散良好的分裂相拍照,并以 JPG 格式保存数码照片和在 4°C 冰箱中保存制样玻片待用;核型分析:对上述选择保存的染色体清晰且分散良好的分裂相数码照片,采用周友泉等^[7]、杨大翔^[8] 利用 Photoshop 软件的分析鉴定方法,对蒙古黄芪体细胞染色体形态进行测定与鉴定,获得核型、组型分析的有关参数。参照李懋学等^[5-6] 的方法,对其染色体的核型、组型进行分析。

1.2.4 体细胞染色体 C-带制片与分析 冷冻揭片与干燥:将保存在冰箱中的染色体制片取出,并标记盖玻片及样本位置后,放入液氮中 30 s 时,立即取出制片并用刀片迅速揭去盖玻片,在室温下干燥 5 d 左右;预处理:将干燥好的制片,放入装有 200 mL,0.1 mol/L 盐酸的

烧杯中,置于 50°C 水浴锅中处理 5 min,移入染色缸并加入 5% 的氢氧化钡溶液,在 20°C 温度处理 1 min,用温水冲洗制片至透明,再将其置入到 $2\times\text{SSC}$ 50 mL 的溶液中,在 60°C 保温 2 h 后用蒸馏水冲洗干净以待染色处理;Giemsa 染色:利用 pH 6.8 的 Giemsa 染液染色 2 h 后,用蒸馏水冲洗,并在空气中自然干燥待镜检拍照。镜检及染色体 C-带显带分析:方法同上。

2 结果与分析

2.1 蒙古黄芪体细胞染色体核型结果与分析

通过 1.2.3 体细胞染色体制片技术与方法,获得的清晰且分散良好蒙古黄芪体细胞染色体的分裂相及数码照片,并经 Photoshop 软件测量与计算比对分析,蒙古黄芪体细胞染色体数目及形态特征见图 1~3,测量与计算比对分析结果列于表 1~3。由图 1、2 可知,蒙古黄芪体细胞染色体的形态特征较为清晰,体细胞染色体数为 16 条。



图 1 蒙古黄芪染色体中期分裂相($\times 100$)

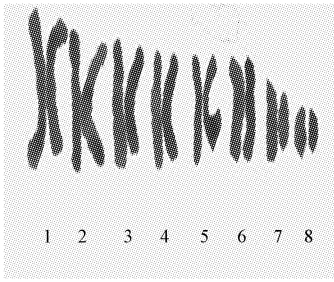


图 2 蒙古黄芪体细胞染色体核型

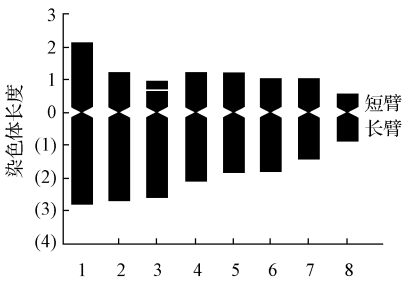


图 3 蒙古黄芪体细胞染色体核型模式

由表 1、2 和图 3 可以看出,蒙古黄芪体细胞染色体的 8 对染色体的相对长度的变化范围为 $5.8\% \sim 19.3\%$,最长和最短的染色体长度分别为 $4.94\ \mu\text{m}$ 和 $1.48\ \mu\text{m}$,其比值大于 2,染色体总宽度为 $4.22\ \mu\text{m}$,1 号染色体为长染色体,7 号和 8 号染色体为短染色体,第 2 号、3 号和 4 号都为中长染色体,5 号和 6 号是中短染色体,核型不对称系数(A. sK)为 63.09% ,3 号染色体短臂上有一随体。结果表明,蒙古黄芪体细胞染色体数是 16 条,核型为 $2n=2x=16=2L+4M_1+6M_2+4S$,属于 2B 核型类型,遵循对称型向不对称型发展进化的规律。

表 1 蒙古黄芪体细胞染色体相对长度及类型

序号 /对	全长 / μm	短臂 / μm	长臂 / μm	臂比	分类 类型
1	2.14	2.80	4.94	1.30	L
2	1.22	2.70	3.92	2.21	M_2
3	0.98	2.62	3.60	2.67	M_2
4	1.24	2.10	3.34	1.75	M_2
5	1.21	1.81	3.02	1.50	M_1
6	1.05	1.80	2.85	1.71	M_1
7	1.04	1.44	2.48	1.40	S
8	0.58	0.90	1.48	1.55	S

表 2 蒙古黄芪体细胞染色体相对长度、
相对系数及 Kuo 分类

序号	染色体长度/ μm	染色体相对长度/%	染色体相对系数	Kuo 分类
1	4.94	19.3	1.54	L
2	3.92	15.3	1.23	M_2
3	3.60	14.0	1.13	M_2
4	3.34	13.1	1.04	M_2
5	3.02	11.8	0.94	M_1
6	2.85	11.1	0.90	M_1
7	2.48	9.7	0.76	S
8	1.48	5.8	0.46	S

表 3 蒙古黄芪染色体宽度、
染色体体积及差值统计

序号	染色体宽度/ μm	染色体体积/ μm^3	差值($d=L-S$)
1	0.59	11.30	0.66
2	0.45	5.42	1.48
3	0.58	3.28	1.64
4	0.48	4.20	0.86
5	0.26	1.86	0.60
6	0.69	4.44	0.75
7	0.64	3.09	0.40
8	0.53	0.91	0.32
Σ	4.22	69.0	6.71

注:染色体体积=染色体宽度 $\times\pi\times(\text{染色体长度}/2)^2$ 。

2.2 蒙古黄芪体细胞染色体 C-带型结果与分析

通过 1.2.4 体细胞染色体 C-带制片技术与分析方法,获得的蒙古黄芪体细胞染色体 C-带较为清晰,且分散良好的细胞分裂相及数码照片,并经 Photoshop 软件测量与计算比对分析,其染色体数目及带型特征见图 4~6,测量与计算比对分析结果列于表 4。



图 4 蒙古黄芪染色体 C-带图

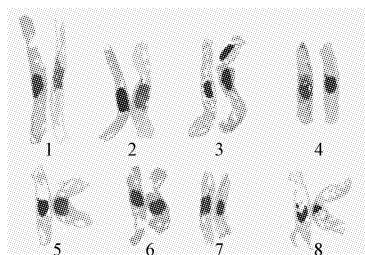


图 5 蒙古黄芪染色体 C-带型分析图

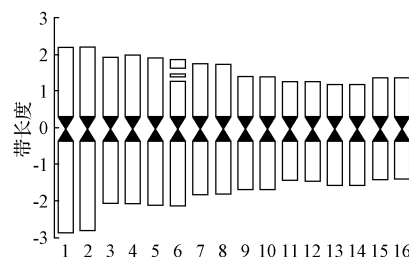


图 6 黄芪染色体 C-分带带型模式图

表 4 蒙古黄芪染色体 C-分带相关参数

序号 /对	实际测量长度/ μm			臂值	着丝点 位置
	短臂	长臂	全长		
1	2.14	2.80	4.94	1.30	m
2	1.22	2.70	3.92	2.21	sm
3	0.98	2.62	3.60	2.67	sm ⁺ sat
4	1.24	2.10	3.34	1.75	sm
5	1.21	1.81	3.02	1.50	m
6	1.05	1.80	2.85	1.71	sm
7	1.04	1.44	2.48	1.40	m
8	0.58	0.90	1.48	1.55	m

3 结论与讨论

在该试验中,蒙古黄芪体细胞分裂中期染色体制片精细,不重叠,分散度好,中期染色体的形态较清晰,利用计算机及其软件对其体细胞染色体有关参数的量测、计算与比对分析较传统的方法与技术获得的结果精准。

蒙古黄芪的体细胞染色体数是 16 条,核型为 $2n=2x=16=2L+4M_1+6M_2+4S$,属于 2B 核型类型,不对称系数(As. K)为 63.9%,遵循对称型向不对称型发展进化的规律,从该试验可知,蒙古黄芪是从莢膜黄芪(As. K 为 61.7%)变异而来的,这与乔有名等^[9]、燕玲等^[10]的报道基本一致,但与李国泰^[11]报道的黄芪染色体数目为 22 不一致,这有可能是制片技术问题而导致试验结果有差异。

C-带主要显示着丝粒结构异染色质及其它染色体区段的异染色质部分,蒙古黄芪体细胞的第 3 号染色体短臂部分区段 Giemsa 染液着色较深,染色体的 C-带型为 $2n=2x=16=8m+6sm+2sm^+sat$,带型属于 2B 类型,第 3 号染色体短臂具有随体,这与吴松权等^[12]报道

由图 4~6 和表 4 可进一步看出,C-带主要显示着丝粒结构异染色质,及其它染色体区段的异染色质部分,第 3 号染色体短臂部分区段被 Giemsa 染液染成深色。结果表明,蒙古黄芪的体细胞染色体的 C-带型公式为 $2n=2x=16=8m+6sm+2sm^+sat$,第 3 号染色体短臂具有随体,带型属于 2B 类型。

的黄芪染色体的第 8 号染色体上有随体不一致,这很可能与使用的材料不同或试验上存在差异导致的,也可能是黄芪染色体结构变异所致。

利用 HCl-Ba(OH)_2 -Giemsa 方法^[6]对黄芪染色体进行 C-分带时,盐酸软化($\leq 5 \text{ min}$)和氢氧化钡脱色($\leq 60 \text{ s}$)时间比较关键。该试验建立了蒙古黄芪体细胞染色体的 C-带型,进一步确定了蒙古黄芪染色体上随体的存在,为该物种的鉴定提供了一定的参考依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [2] 田宏印. 黄芪化学研究及其有效成分[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),1996,45(1):75-76.
- [3] 云秦川. 中药黄芪的药理研究进展[J]. 内蒙古中医药,2004(6):33-34.
- [4] 张贵友. 植物染色体常规压片技术及核型分析[M]. 北京:清华大学出版社,2003.
- [5] 李懋学,张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [6] 李懋学. 染色体的次缢痕、核仁组成区和随体[J]. 生物学通报,1985(7):12-14.
- [7] 周友泉,王厚照. Photoshop 在染色体参数测量中的应用[J]. 江西医学检验,2003(1):24-26.
- [8] 杨大翔. 用 Adobe Photoshop. 5 进行核型分析[J]. 农业网络信息,2005(3):44-46.
- [9] 乔有名,李宏华,朱松涛. 黄芪和甘草染色体数目及核型分析[J]. 青海畜牧兽医杂志,2001,31(3):14-15.
- [10] 燕玲,宛涛,张众,等. 膜荚黄芪的与蒙古黄芪植物学特征分析[J]. 内蒙古农牧大学学报,2001,22(4):71-77.
- [11] 李国泰. 黄芪染色体核型分析[J]. 中国林福特产,2004,8(4):3-4.
- [12] 吴松权,王立平,孙丽娜,等. 黄芪染色体核型分析[J]. 湖北农业科学,2006,45(5):31-33.

龙葵毛状根诱导条件的研究

王 丽, 刘 琪, 宁 明 明, 张 卫 东, 戚 小 利, 李 秀 霞

(佳木斯大学 生命科学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘 要:以发根农杆菌 A4、C58C1 和 A1476 为诱导菌株, 探讨外植体类型、发根农杆菌种类、侵染时间、预培养时间、菌液浓度和共培养天数对龙葵毛状根诱导率的影响。结果表明:外植体以叶片诱导率最高;发根农杆菌 A4、C58C1 和 A1476 侵染龙葵叶片均能诱导出毛状根, C58C1 诱导率较高;较佳侵染时间为 5 min;发根农杆菌浓度在 $OD_{600}=0.6$ 时诱导效果较好;预培养和共培养时间均为 2 d 时诱导率较高。该试验为大量生产毛状根, 并利用毛状根培养技术生产药物龙葵碱提供了试验基础。

关键词:龙葵;发根农杆菌;毛状根诱导;条件优化

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0107-05

龙葵(*Solanum nigrum* L.)属茄科茄属 1 年生草本植物,广泛分布于欧、亚、美洲的温带至热带地区^[1],我国各地均有分布^[2],是我国传统的中草药,其全草均可入药。中国龙葵有 3 个种及 1 个变种,分别为龙葵、少花龙葵、红果龙葵和黄果龙葵^[3]。龙葵全草含苷类生物碱、

多糖、矿物质、维生素、色素、氨基酸等多种成分,所含生物碱可抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞转移,所含多糖能增强机体的免疫能力^[4-6]。临床中具有抗炎与抗休克、抑菌抗病毒、解热镇痛和祛痰止咳等作用。

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)属根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属的一种革兰氏阴性土壤细菌,它可以使植物宿主细胞组织产生毛状根瘤。在自然状态下,发根农杆菌通过伤口侵染植物, Ri 质粒上的 T-DNA 能插入植物基因组,其所携带的基因在宿主细胞中整合表达,使植物产生毛状根^[7]。利用毛状根诱导技术已在刺五加(*Acanthopanax senticosus*)、北柴胡(*Bupleurum chinense* DC)和三裂叶野葛(*Pueraria phaseoloides*)等多

第一作者简介:王丽(1988-),女,硕士研究生,研究方向为资源植物学与生物技术。E-mail:917549490@qq.com.

责任作者:李秀霞(1963-),女,博士,教授,现主要从事植物资源学与生物技术等研究工作。E-mail:lixixia2006@163.com.

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12521523);佳木斯大学研究生科技创新资助项目(LZZ2014_001);黑龙江省高校科技成果产业化前期研发培养资助项目(1253CGZH08)。

收稿日期:2014-11-13

Karyotype and Banding Pattern Analysis of Somatic Cell Chromosome in *Astragalus mongolicus*

LIN Qin, Abudirehemu · REHEMAN, REN Xian

(School of Biological Science and Engineering, Northern University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking the root tip of seed from *Astragalus mongolicus* as material, the chromosome number, karyotype and zone type of somatic cell were studied by the methods of chemical staining, producer slide, C-banding methods and technology, computer and its software measurement and so on. The results showed that the number of RTC of *Astragalus mongolicus* was 8, and the karyotype formula was $2n=16=2L+4M_1+6M_2+4S$. The karyotype belonged to 2B type; and $A.sK$ (asymmetrical karyotype coefficient) $=16.17/25.63 \times 100\% = 63.09\%$. The total volume of chromosome was $69.0 \mu m^3$. In addition, the C-banding formula was $2n=16=8m+6sm+2sm^{+}sat$. There was a satellite in the segment of short arm of chromosome 3, which would lay the foundation for identifying and utilizing *Astragalus membranaceus* and *Astragalus mongolicus*.

Keywords: *Astragalus mongolicus*; chromosome; karyotype analysis; C-banding