

DOI:10.11937/bfyy.201601020

小花吊兰染色体制片优化与核型分析

李 磊, 沈吉焚, 何梦玲, 严寒静

(广东药学院 中药学院, 广东 广州 510006)

摘 要:以小花吊兰根尖为试材,采用常规压片法制备染色体玻片标本,研究了取材时间、预处理方法、解离方法以及染色时间对小花吊兰根尖细胞染色体制片效果的影响,优化制片技术并进行核型分析,以为小花吊兰建立更加稳定、明晰的品种鉴定方法。结果表明:于8:00取小花吊兰根尖,0.05%秋水仙素预处理3 h,卡诺氏液固定,1.0 mol/L 盐酸 60℃下解离 15 min,改良卡宝品红染色 15 min,所得小花吊兰染色体制片效果较好。对小花吊兰体细胞染色体数目进行统计,核型分析表明,细胞染色体数为 $2n=2x=16$,中部着丝粒染色体(m)为 3 对,近中部着丝粒染色体(sm)为 4 对,近端部着丝粒染色体(st)1 对,核型公式为 $2n=2x=16=6m+8sm+2st$,核型属 2A 型,核型不对称系数为 64.39%。

关键词:小花吊兰;染色体;核型分析

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0076-04

小花吊兰(*Chlorophytum laxum* R. Br.)属百合科(Liliaceae)吊兰属(*Chlorophytum*)植物,又名三角草、疏花吊兰、土麦冬、山韭菜。广布于非洲和亚洲的热带、亚热带地区,生于湿润肥沃的草地、庭园、山坡阴蔽处或岩石边,我国分布于广东、海南、广西等地。小花吊兰为有毒植物,具有清热解毒、消肿止痛的作用,能治疗毒蛇咬伤,跌打肿痛^[1],可用鲜品捣烂敷患处,是广东恩平、台山、新会、中山常用地方药材^[2]。

大部分吊兰属植物生长于非洲地区,而生长于亚洲的,特别是印度地区的吊兰属植物被发现具有较大形态学以及染色体特征的多样性^[3]。吊兰属分类复杂、难于鉴别,全球约有 100 余种吊兰属植物^[4],因此除了从形态、显微等方法鉴别,染色体核型分析技术作为一个鉴别手段的补充,可以作为一个分类指标识别不同物种。由于小花吊兰的野生资源量较少,且不易栽培,目前对其研究较少,国内对其染色体数目、核型分析的研究尚鲜见报道,国外学者 SHIVA 等^[5]已证实小花吊兰属于二倍体植物,PATIL 等^[6]曾发现过较为罕见的小花吊兰四倍体品种,因此需要建立更加稳定、明晰的鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自中山市,分批移栽至广东药学院,经田素英副教授鉴定为百合科吊兰属植物小花吊兰(*C. laxum*)。

1.2 试验方法

于 2015 年 4 月 13 日 07:30—09:30 选取小花吊兰根尖,每隔 30 min 取材 1 次,用 0.02%秋水仙素处理 3 h,以确定合适的取材时间;以 0.02%~0.10%秋水仙素、0.002 mol/L 8-羟基喹啉、冰水混合液分别处理一定时间,择优确定预处理方法,预处理液及处理时间见表 1;取出经预处理的根尖,用蒸馏水漂洗 2~3 次,后转入 0.075 mol/L KCl 低渗液中,25℃处理 30 min,再漂洗 2~3 次,投入卡诺固定液中室温固定 18~24 h,固定后取出冲洗 2~3 次,放入 0.1 mol/L 与 1.0 mol/L 的盐酸中,在 60℃恒温水浴锅中解离 10、15、20 min,确定较优解离方法;取出经解离的根尖,漂洗 2~3 次后转移至蒸馏水中,室温下低渗处理 10 min,取根尖,只保留分生区,置于清洁的载玻片上,滴加 1~2 滴 20%改良卡宝品红溶

表 1 预处理液及处理时间

Table 1 Reagent and time for pretreatments

| 预处理液种类及浓度 Different reagents and concentrations | 预处理时间 Different pretreatment times/h |
|--|---|
| 4℃ 0.02%、0.05%、0.10%秋水仙素 | 2、3 |
| 4℃ 0.002 mol/L 8-羟基喹啉 | 2、3 |
| 冰水混合液 | 24 |

第一作者简介:李磊(1990-),男,硕士研究生,研究方向为药用植物种质评价。E-mail:captain0305@163.com.

责任作者:严寒静(1972-),女,博士,副教授,现主要从事药用植物种质评价等研究工作。E-mail:yanhanjing1211@163.com.

基金项目:广州市科技资助项目(2014KP000051)。

收稿日期:2015-08-19

液,染色 10、15、20 min,考察较宜的染色时间。

1.3 项目测定

常规法压片后,对分散较好的染色体装片于 ZEISS Axioplan 2 显微镜及 AxioVision 4.1 图像分析系统下镜检与拍照,并用 MetaSystems 软件系统进行核型分析和染色体配对。

统计观察 30 个以上可准确计数染色体的根尖有丝分裂中期细胞,其中 85%以上的细胞具有恒定一致的染色体数,即可认为是该植物的染色体数目。核型分析采用李懋学等^[7]提出的标准进行,核型取 5 个典型中期细胞的平均值,测量染色体长臂和短臂,计算染色体相对长度、相对长度指数、着丝粒指数、臂比值;染色体相对长度指数(I. R. L)参考 KUO 等^[8]提出的方法计算;根据 LEVAN 等^[9]的命名法则,来确定染色体的着丝点位置;染色体核型分类按照 STEBBINS^[10]提出的方法来区分核型对称或不对称程度。染色体相对长度(%)=染色体长度/染色体组总长度×100;染色体相对长度指数(I. R. L)=染色体长度/全组染色体平均长度;着丝粒指数(%)=短臂/染色体长度×100;臂比(r)=长臂(L)/短臂(S)。

2 结果与分析

2.1 制片优化

2.1.1 取材时间的确定 试验结果显示,08:00 取材的根尖分生区细胞染色体多数呈粗短条状,边缘清晰;过早取材的染色体呈凌乱的毛线头状,边缘不清晰;过晚取材的染色体散乱,边缘模糊。因此 08:00 的小花吊兰细胞处于有丝分裂中期的比例较高,该时间点适于取材。

2.1.2 预处理方法优化 该试验考察了不同预处理液、浓度以及处理时间对染色体观察效果的影响,由表 2 可见,0.05%或 0.10%秋水仙素处理 3 h,显微镜视野中期细胞多、染色体分散效果好、分辨程度清晰,同时考虑到试验成本,最终确定 0.05%秋水仙素处理 3 h 为适宜

表 2 不同预处理方法的效果比较

Table 2 Effect of different pretreatment methods

| 预处理液 Pretreatment reagents | 预处理时间 Pretreatment times /h | 中期细胞 Metaphase cells | 分散效果 Dispersion effect | 分辨程度 Distinguish degrees |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 0.02%秋水仙素 | 2 | 少 | 团状 | 模糊 |
| | 3 | 少 | 团状 | 模糊 |
| 0.05%秋水仙素 | 2 | 较多 | 较好 | 较清晰 |
| | 3 | 多 | 好 | 清晰 |
| 0.10%秋水仙素 | 2 | 较多 | 较好 | 较清晰 |
| | 3 | 多 | 好 | 清晰 |
| 8-羟基喹啉 0.002 mol/L | 2 | 少 | 团状 | 模糊 |
| | 3 | 少 | 团状 | 模糊 |
| 冰水混合物 | 24 | 少 | 团状 | 模糊 |

的预处理方法。

2.1.3 解离方法优化 考察了酸解时间和解离浓度对染色体观察效果的影响,由表 3 可知,盐酸浓度过低或解离时间过短会导致细胞分散不完全、染色体过于聚集,盐酸浓度过高或解离时间过长会导致原生质体破碎、染色体分散过度,因此 1.0 mol/L 盐酸 60℃下解离 15 min 制片效果较好。

表 3 不同解离条件的效果比较

Table 3 Effect different dissociation condition

| 解离时间 Times of dissociation /min | 解离浓度 Concentrations of dissociation /(mol·L ⁻¹) | 观察效果 Observation effect |
|---------------------------------------|---|-------------------------------|
| 10 | 0.1 | 细胞未分散,染色体部分聚集 |
| | 1.0 | 细胞未完全分散,染色体部分聚集 |
| 15 | 0.1 | 细胞未完全分散,染色体部分聚集 |
| | 1.0 | 细胞较清晰,染色体分散良好 |
| 20 | 0.1 | 原生质体破碎严重,染色体分散过度 |
| | 1.0 | 原生质体破碎严重,染色体分散过度 |

2.1.4 染色时间优化 染色剂选择为 20%改良卡宝品红溶液,同时考察染色时间为 10、15、20 min 的观察效果。结果表明,15 min 时染色体较清晰,对比度良好,适宜观察;染色时间过短则细胞染色体颜色较浅,对比度较弱,不宜观察;染色时间过长则细胞染色体颜色过深,模糊成团状,也不宜观察,故选择染色时间为 15 min。

2.1.5 制片优化结论 最终确定 08:00 为较宜的取材时间,将小花吊兰根尖以 0.05%秋水仙素预处理 3 h,0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 30 min,卡诺氏液固定过夜,1.0 mol/L 盐酸 60℃下解离 15 min,蒸馏水后低渗 10 min,改良卡宝品红染色 15 min,所得小花吊兰染色体制片效果较好,显微镜视野内观察到染色体较分散、着丝点较清晰的中期细胞(图 1)。

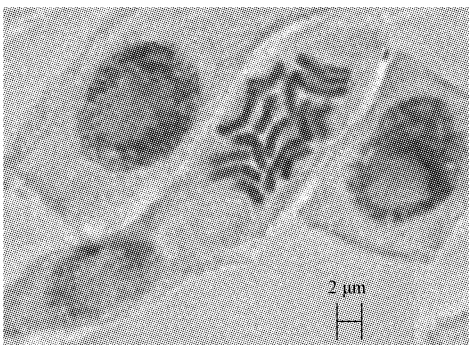


图 1 小花吊兰染色体形态

Fig. 1 The chromosome morphology of *C. laurum*

2.2 核型分析

2.2.1 染色体数目 统计的细胞数目在 30 个以上,其中 85%以上的细胞具恒定一致的染色体数,由多个细胞染色体统计得出小花吊兰的染色体数目为 16 条,即

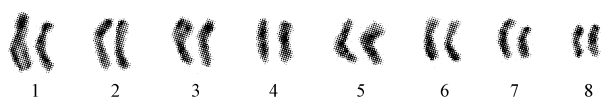


图2 小花吊兰核型图

Fig. 2 Karyotype of chromosome in *C. laxum*

$2n=2x=16$ 。染色体核型图见图2。

2.2.2 染色体相对长度及核型分析 试验结果表明,小花吊兰染色体数目为 $2n=2x=16$,其中第2、3、8号为中部着丝粒染色体(m),第1、5、6、7号为近中部着丝粒染色体(sm),第4号为近端部着丝粒染色体(st);1~3号为中长染色体(M2),4~7号为中短染色体(M1),第8号为短染色体(S)。染色体核型分析参数见表4、图3。核型公式为 $2n=2x=16=6m+8sm+2st$,染色体相对长度在9.41%~15.68%,平均相对长度为12.50%,染色体长度比为1.67,臂比大于2:1染色体占37.5%,按照STEBBINS^[10]的核型分类标准,小花吊兰的核型属2A型,核型不对称系数为64.39%。

表4 染色体核型分析参数

Table 4 Karyotype parameters of chromosome in *C. laxum*

| 染色体编号 No. | 相对长度 Relative length (S+L=T)/% | 相对长度系数 Relative length index | 着丝粒指数 Centromere index/% | 臂比 Arm ratio | 类型 Type |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------|------------|
| 1 | 5.40+10.28=15.68 | 1.25 | 34.44 | 1.90 | sm |
| 2 | 6.45+7.84=14.29 | 1.14 | 45.12 | 1.22 | m |
| 3 | 5.40+8.01=13.41 | 1.07 | 40.26 | 1.48 | m |
| 4 | 2.54+10.00=12.54 | 1.00 | 20.28 | 3.93 | st |
| 5 | 4.18+8.01=12.19 | 0.98 | 34.29 | 1.92 | sm |
| 6 | 4.18+7.84=12.02 | 0.96 | 34.78 | 1.88 | sm |
| 7 | 3.10+7.35=10.45 | 0.84 | 29.67 | 2.37 | sm |
| 8 | 4.36+5.05=9.41 | 0.75 | 46.30 | 1.16 | m |

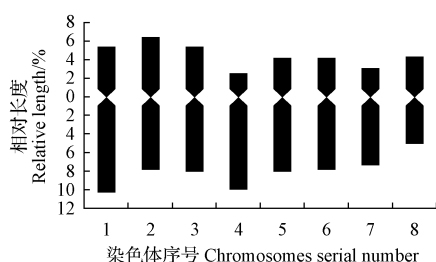


图3 小花吊兰染色体模式图

Fig. 3 Karyotype pattern of chromosome in *C. laxum*

3 讨论

3.1 染色体制片优化的探究

关于制片取样的时间,可能与植物种类、外界环境、取样部位等因素有关。不同植物的细胞分裂调控机制存在差别,取材时间便有所不同,如蓝花丹(*Plumbago auriculata*)初生根^[11]在09:00—09:30取材进行制片观察到的细胞中期分裂相较多,又如甜瓜(*Cucumis melo*

L.)嫩芽叶尖^[12]的最佳取材时间为08:00左右;外界环境包括光照、温度、空气、水分、土壤条件等,植物内在的生理变化会受到外在环境的影响,并且在自身遗传物质调控下有序地完成^[13];取材部位可以选择根尖、茎尖、幼叶、愈伤组织等,一般能进行细胞分裂的植物组织或单个细胞都可以作为取材的对象^[14],而不同部位的细胞分裂规律有一定差异,应视具体情况而分析。为了保证细胞处在分裂的旺盛时期,显微镜视野中能够观察到较多分裂中期的状态,取材时间一般在08:00—11:00或13:00—15:00进行^[15],该试验选择08:00取材与小花吊兰独特的生长节律性有关,具体内在机制有待更深入地探究。

对材料预处理的目的在于使更多细胞处于分裂中期的状态,从而便于染色体观察,常用的预处理方法有使用秋水仙素、对二氯苯水溶液、8-羟基喹啉溶液及其混用等化学方法,也有用冰水混合物处理的物理方法^[16],其中秋水仙素为较常用的预处理液,其作用机制主要是阻碍纺锤体的形成与活动。不同植物所适宜的预处理液种类及处理方法有所不同,应根据研究对象、考察目的、试验成本和实际可操作度来选择合适的方法。如李倩等^[17]在进行2种观赏性吊兰(*Chlorophytum comosum*)核型分析时选择以0.10%秋水仙素处理3.5 h,而小花吊兰与其同为吊兰属(*Chlorophytum*),因此该试验主要考察了秋水仙素的处理方法。

常用解离方法有酶解与酸解,通过解离,细胞之间的果胶层被去除,细胞壁得到软化,从而便于压片,酶解法一般用低浓度果胶酶(1%~2%)和纤维素酶(1%~5%)混合液,酸解法一般在60℃下盐酸中解离,其中酸解法较为经济便捷。百合科(Liliaceae)植物染色体一般数量较少、形状较大,便于观察;李益锋等^[18]在龙牙百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)核型分析中选择以1.0 mol/L盐酸于60℃恒温水浴中解离8~10 min,小花吊兰与其同属百合科;李国泰^[19]在吊兰(*Chlorophytum comosum*)核型分析中选择以1.0 mol/L盐酸60℃恒温下解离8 min,小花吊兰与其同为吊兰属。因此该试验选择了酸解法,并考察了解离的适宜条件。

3.2 进化程度的探讨

核型进化基本趋势一般由对称向不对称发展,核型不对称系数越接近50%,核型的对称程度越高,进化程度越低,不对称的核型多见于特化的、衍生的以及较进化的植物类群中^[20]。对广东中山所生小花吊兰进行的核型分析显示,其不对称系数为64.39%,核型属2A型;李国泰^[19]对吊兰进行核型分析,测得不对称系数为72.58%,核型属3B类;李倩等^[17]对2种观赏吊兰进行

核型分析,测得金边吊兰(*Chlorophytum comosum* cv. *variegatum*)不对称系数为 69.4%,核型属 3A 类,金心吊兰(*Chlorophytum comosum* cv. *medio-pictum*)不对称系数为 68.1%,核型属 3B 类。由此推测,小花吊兰在吊兰属中染色体对称性较大,是相对较为原始的物种。关于其在吊兰属中进化程度、系统地位的问题,仍有待进一步探讨,从而作出明确的界定。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海:上海人民出版社, 1977:62.
- [2] 童家赞,张秋镇,彭伟文. 三角草的生药鉴别[J]. 现代中药研究与实践, 2009(3):30-31.
- [3] BASU S, JHA T B. Cytogenetic studies in four species of *Chlorophytum* Ker-Gawl. (Liliaceae)[J]. Nucleus, 2011, 54(3):123-132.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 14 卷. 北京:科学出版社, 1980:41-45.
- [5] SHIVA KAMESHWARI M N, MUNIYAMMA M. Cytomorphological study in three species of the genus *Chlorophytum* Ker Gawl. (Liliaceae)[J]. Taiwan, 2001, 46(4):307-317.
- [6] PATIL V P, KUMBHOJIKER M S, GANDHI S S. Karyomorphological studies in *Chlorophytum* Ker-Gawl[J]. Cytologia, 1987, 52(3):543-550.
- [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] KUO S R, WANG T T, HUANG T C. Karyotype analysis of some Formosan gymnosperms[J]. Taiwan, 1972, 17(1):66-80.
- [9] LEVAN A, FREDGA K, SANDBREG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2):197-220.
- [10] STEBBINS G L. Chromosome evolution in higher plants[M]. London: Edward Arnold Ltd, 1971:85-104.
- [11] 赵晨宇. 蓝花丹染色体核型分析研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2013:13.
- [12] 易鼎杰,梁国鲁. 甜瓜嫩芽叶尖的染色体计数新方法研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2010(3):67-69.
- [13] 胡玉欣,李家洋. 高等植物细胞分裂调控的研究进展[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2002(3):1-5.
- [14] 朱微. 植物染色体及染色体技术[M]. 北京:科学出版社, 1982.
- [15] 丁鸿,邱东萍,陈少雄. 植物染色体标本的制备和染色体核型分析研究进展[J]. 南方农业学报, 2012(12):1958-1962.
- [16] 刘永安,冯海生,陈志国,等. 植物染色体核型分析常用方法概述[J]. 贵州农业科学, 2006(1):98-102.
- [17] 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.
- [18] 李益锋,皮俊,朱敏. 龙牙百合核型分析[J]. 湖北农业科学, 2012(6):1139-1141.
- [19] 李国泰. 吊兰染色体核型分析[J]. 亚热带植物科学, 2005(1):33-35.
- [20] 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, 1996:1-37.

Optimization of Chromosome Mounting Technique and Karyotype Analysis of *Chlorophytum laxum* R. Br

LI Lei, SHEN Jifen, HE Mengling, YAN Hanjing

(College of Traditional Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: Taking the root-tips of *Chlorophytum laxum* R. Br as test materials, using a conventional chromosome mounting technique to prepare the slice specimens of chromosomes and its karyotype was analyzed. The effect of sampling time, permanent, dissociation and staining time on cytological observation were analyzed. The results showed that the optimum materials should be achieved at 08:00 AM, pretreated with 0.05% colchicine for 3 hours, fixing chromosomes in Kano's fluid, then dissociated in 1.0 mol/L hydrochloric acid at a temperature of 60°C for 15 minutes. Karyotype analysis of *C. laxum* showed that the chromosome number was 16 and the karyotype formula was $2n=2x=16=6m+8sm+2st$. 3 pairs were metacentric(m), 4 pairs were submetacentric(sm), and 1 pair were subtelocentric(st). The karyotype of *C. laxum* was type 2A and the karyotype asymmetry coefficient was 64.39%.

Keywords: *Chlorophytum laxum* R. Br; chromosome; karyotype analysis