

粗根鸢尾染色体制片技术及核型分析

毕晓颖^{1,2}, 赵芷唯¹, 郑洋^{1,2}, 李东升³

(¹沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161; ²辽宁省北方园林植物与地域景观高校重点实验室, 沈阳 110161;

³辽宁省高速公路管理局葫芦岛管理处, 辽宁葫芦岛 125001)

摘要:以粗根鸢尾根尖为试材, 研究取样时间、预处理液、解离时间等对其染色体制片的影响, 并以此最佳条件进行粗根鸢尾核型分析, 为其细胞学研究及开展杂交育种提供参考。结果表明, 根尖取样以上午 8:00—11:00 从田间植株取材为佳; 用 2 mmol/L 8-羟基喹啉溶液预处理 2.5 h, 经卡诺固定液固定 2 h 后, 在 5 mol/L 盐酸常温下解离 10 min, 卡宝品红溶液染色压片镜检, 能取得良好的制片效果; 粗根鸢尾的染色体数目为 $2n=18$, 核型公式为 $2n=2x=18=12m+6sm$, 核型属于 2A 型。

关键词:粗根鸢尾; 染色体; 制片技术; 核型分析

中图分类号: S68

文献标志码: A

论文编号: 2010-3585

Staining and Slide-preparing Technique of Chromosome and Karyotype Analysis of *Iris tigridia*

Bi Xiaoying^{1,2}, Zhao Zhiwei¹, Zheng Yang^{1,2}, Li Dongsheng³

(¹College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161;

²Key Laboratory of Northern Landscape Plants and Regional Landscape, Shenyang 110161;

³Huludao Management Department of Liaoning Highway Administration Bureau, Huludao 125001)

Abstract: The root tips of *Iris tigridia* were used to study the effects of sampling time, pre-treating solution and dissociation time on slide-preparing for chromosome and karyotype analysis. The aim was to provide the references for its cytology research and crossbreeding. The results showed that the optimal sampling time of root tips was 8:00–11:00 am in the field. The best process of staining and slide-preparing technique was that the root tips were pretreated 2.5 h with 2 mmol/L 8-hydroxy quinoline solution, and then it was fixed with Carnoy solution for 2 h, associated with 5 mol/L HCl for 10 min at room temperature and stained with Carbol fuchsin solution. The chromosome number of *Iris tigridia* was $2n=18$. Karyotype formula was $2n=2x=18=12m+6sm$. The karyotype classification belonged to 2A type.

Key words: *Iris tigridia*; chromosome; staining and slide-preparing technique; karyotype analysis

0 引言

鸢尾属 (*Iris*) 植物是一类具有较高观赏和经济价值的宿根草本植物, 主要分布于北半球, 全世界大约有 300 余种^[1]。中国鸢尾属植物资源丰富, 约有 65 种、8 变种及 6 变型, 主要分布于东北、西北和西南地区^[2]。鸢尾属植物的细胞学研究始于 1900 年, 到目前为止, 全世界已有 2/3 以上的鸢尾属植物有染色体数目或核型的报道, 但中国鸢尾属植物染色体方面的研究较少, 仅沈云光等^[3]报道了西南地区 13 种鸢尾属植物的核

型, 赵毓棠、陆静梅^[4]报道了东北地区的 3 种鸢尾属植物的核型, 董晓东、李继红等^[5]对产于中国西南的中甸鸢尾进行了核型分析。粗根鸢尾 (*Iris tigridia*) 属鸢尾科鸢尾属植物, 产于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、山西, 生于固定沙丘砂质草原或干山坡上, 也产于苏联、蒙古。陆静梅等^[6]采用常规制片技术对粗根鸢尾的染色体进行了研究, 得出粗根鸢尾的染色体数目为 $2n=20$, 但与前苏联植物学家报道 $2n=28$ 差异较大。本研究以粗根鸢尾为试材, 进行核型分析, 旨在探讨其染色体制

基金项目: 辽宁省教育厅科学技术研究项目“鸢尾种间杂交及种质创新研究”(L2010491)。

第一作者简介: 毕晓颖, 女, 1971 年出生, 河北滦县人, 副教授, 博士, 从事观赏植物种质资源与遗传育种研究。通信地址: 110161 沈阳农业大学园艺学院, Tel: 024-88487143, E-mail: bixiaoying@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2010-12-13, 修回日期: 2011-02-16。

片技术,为其细胞学研究及开展杂交育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

田间试验于2010年在沈阳农业大学花卉基地进行,室内试验在沈阳农业大学观赏园艺实验室进行。

1.2 试验材料

供试粗根鸢尾采自辽宁省北镇市医巫闾山,栽植保存于沈阳农业大学花卉试验基地。

1.3 试验方法

1.3.1 试材染色处理

(1)取材。采用2种取材方法:①田间直接取材,春夏季取植株生长旺盛的根尖0.5 cm左右;②种子萌发取材,将种子放在培养皿中于25℃条件下进行萌发,待根长至0.5~0.8 cm时截取根尖。2种取材方法均从上午8—11点间每隔1 h取1次根尖,每个取样时间设3次重复,每次观察10个根尖,以确定最佳取样方法和取样时间。

(2)预处理。分别用2 mmol/L的8-羟基喹啉水溶液和0.1%秋水仙碱溶液作为预处理液,在室温下处理粗根鸢尾根尖1.5、2.5、3.5、4.5 h,以确定最佳的预处理液及预处理时间。

(3)固定。预处理后将根尖转入卡诺固定液分别固定2、4、6 h。

(4)解离。用5 mol/L盐酸在常温下分别解离8、9、10 min,以确定适宜解离时间。

(5)染色。将根尖置于卡宝品红中染色24 h。

1.3.2 染色体核型分析 采用常规压片法压片,选取30个染色体分散较好的细胞,利用photoshop软件统计细胞内染色体数目并进行配对^[7-8]。以5个细胞的各项指标数得出核型的数值。核型分析参照李懋学、陈瑞阳的标准^[9-10],染色体类型按Levan标准命名^[11],核型类别

按Stebbins的分类标准^[12]。

1.3.3 精密仪器和药品规格 本研究室内使用仪器为厦门Motic厂生产的DMBA400型显微镜。药品规格:8-羟基喹啉25 g,分析纯;秋水仙碱1 g,分析纯;无水乙醇500 mL,分析纯;99%乙酸500 mL,分析纯;36%盐酸500 mL,分析纯。

1.3.4 统计分析 用Excel软件对原始数据进行计算整理。

2 结果与分析

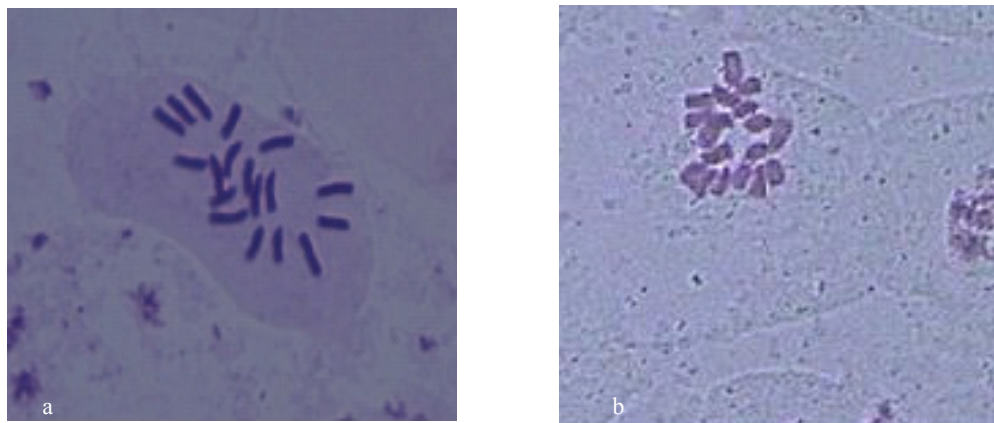
2.1 染色体制片技术优化

2.1.1 取材 试验表明,取材方法对染色体制片效果影响很大。春夏季上午8:00—11:00从田间取材进行制片,90%的制片中均有7~11个中期分裂相。而以种子萌发的根尖为材料进行制片,供试的30个根尖均未观察到染色体分裂相,且染色效果差。因此,根尖取样以上午8:00—11:00从田间植株取材为佳。

2.1.2 预处理 试验表明,2 mmol/L的8-羟基喹啉水溶液预处理2.5 h效果最好,可以得到分散性好,染色体形态清晰的中期分裂相(图1-a);处理1.5 h观察到的中期分裂相,虽然其染色体分散性好,但收缩性差,形态不佳,只适宜染色体计数;处理3.5 h和4.5 h观察到的中期分裂相,其染色体分散性好但过度收缩,长短臂不易测量。用0.1%秋水仙碱溶液预处理1.5~4.5 h观察到的中期分裂相无明显差异,其染色体均过度收缩且分散性差(图1-b)。

2.1.3 固定 试验表明,用卡诺固定液固定2 h即可达到杀死细胞维持染色体结构完整性的目的,固定4 h、6 h会使根尖变硬,在后期压片时,染色体分散性差。

2.1.4 解离 试验表明,粗根鸢尾解离10 min,根尖软化程度好,在压片时其细胞分散性好,染色体较分散;解离8 min、9 min,根尖软化程度不够,细胞排列较紧密,



a、2 mmol/L 8-羟基喹啉;b、0.1%的秋水仙素
图1 不同预处理后的粗根鸢尾染色体

当距离较近的细胞中出现中期分裂相时会难以区分,影响核型分析的精确度。

2.2 粗根鸢尾染色体数目及核型分析

2.2.1 染色体数目 选择30个染色体分散良好的细胞观察计数,其中26个细胞染色体数目为18条,占计数总数的86.7%;3个细胞染色体数目为17条,占计数总数的10.0%;1个细胞染色体数目为16条,占计数总数的3.3%。因此,确定粗根鸢尾染色体数目为 $2n=2x=18$ (图1-a)。

2.2.2 染色体核型分析 由表1可知,粗根鸢尾的第2、3、4、5、6、9对染色体为m染色体,第1、7、8对染色体为sm染色体,核型公式为 $2n=2x=18=12m+6sm$,核型图和核型模式图分别见图2和图3。最长与最短染色体的比值为1.36,臂比值大于2的染色体占全部染色体的比例为0.11,根据Stebbins核型分类标准,核型类型为2A型,属于基本对称型。染色体相对长度变化范围在9.8%~13.3%之间,染色体相对长度组成为

表1 粗根鸢尾的染色体参数

染色体编号	相对长度(L+S)/%	相对长度系数	臂比	类型
1	8.8+4.5=13.3	1.20	1.95	sm
2	6.5+5.3=11.8	1.06	1.24	m
3	6.7+4.9=11.6	1.04	1.39	m
4	5.8+5.7=11.5	1.04	1.02	m
5	6.4+4.5=10.9	0.98	1.44	m
6	6.1+4.5=10.6	0.95	1.36	m
7	7.7+2.8=10.5	0.95	2.72	sm
8	6.6+3.4=10	0.90	1.94	sm
9	6.1+3.7=9.8	0.88	1.67	m



图2 粗根鸢尾核型图

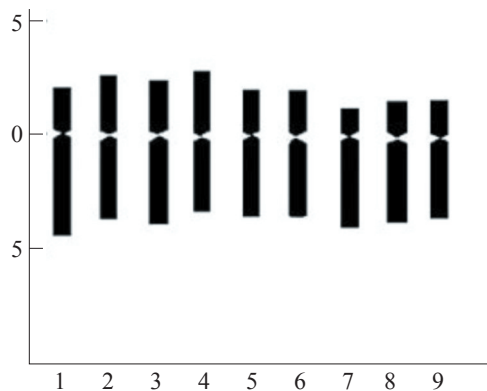


图3 粗根鸢尾核型模式图

$8M_2+10M_1$, 平均臂比为1.64,核型不对称系数为60.8%。

3 结论与讨论

鸢尾属植物染色体较小,要想获得清晰的中期染色体制片具有较大的难度^[13]。良好的染色体制片受多种因素影响,其中取材适当与否,是染色体制片关键的一步。经过反复试验发现,粗根鸢尾的最佳取材方法是在上午8:00—11:00从田间植株截取生长旺盛的根尖;而以种子萌发的根尖为试材未能观察到染色体中期分裂相,原因可能是粗根鸢尾属于单子叶植物,主根生长缓慢、停止生长早,细胞分裂频率低,中期分裂相细胞所占比例小,因此很难观察到理想的中期分裂相。沈云光等^[3]在鸢尾属植物染色体观察试验中也是采取从田间植株取材的方法,与本试验相同。

在染色体制片技术的各个环节中,预处理至关重要。预处理效果好,既可以得到较多的处于中期分裂相的染色体,又可以使染色体分散开,便于核型分析。有研究认为用秋水仙素进行预处理的效果较好^[14-15],8-羟基喹啉适合处理具有较大染色体的植物^[15]。本试验发现秋水仙素不适用于粗根鸢尾,8-羟基喹啉溶液处理2.5 h后试验效果最好,而处理3.5 h和4.5 h的染色体过度收缩,很难进行染色体的形态分析。但沈云光等^[3]在试验中用8-羟基喹啉溶液预处理时间较长也取得了较好的效果,这可能与当时沈云光等预处理时的温度有差异相关。

鸢尾属植物的染色体数目、核型变化较大,不同亚属间、同一亚属的不同种之间,甚至同种内都存在染色体数目和核型的变化^[16]。本研究粗根鸢尾染色体数目为 $2n=18$,核型公式为 $2n=2x=18=12m+6sm$,与陆静梅报道的 $2n=20=20SM$,以及原苏联植物学家报道的 $2n=28$ 不一致^[5],均为初次报道。

须毛状附属物亚属(*Sect. Iris*)是鸢尾属中种类最多的一个亚属,中国原产仅13个种,粗根鸢尾即属于该亚属。到目前为止,中国仅对该亚属少数几种进行了细胞学方面的研究^[3-6],其中长白鸢尾(*I. mandshurica*)核型公式为 $2n=14=14M$,核型不对称分类属1B型;中亚鸢尾(*I. bloudowii*)核型公式为 $2n=26=2st+6M+18sm$,核型不对称分类属3C型;大锐果鸢尾(*I. cuniculiformis*)核型公式为 $2n=22=4m+6sm+12st$,核型不对称分类属3A型;长管鸢尾(*I. dolichosiphon*)的核型公式为 $2n=22=4m+12sm+6st$,核型不对称分类属3A型。根据高等植物核型演化的主要趋势是由对称到不对称^[17],可得出粗根鸢尾较该亚属其他4种原始。

参考文献

[1] 郭翎. 鸢尾[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 1.

[2] 赵毓棠. 鸢尾欣赏与栽培利用[M]. 北京: 金盾出版社, 2005: 34-40.

[3] 沈云光, 王仲朗, 管开云. 国产 13 种鸢尾属植物的核型研究[J]. 植物分类学报, 2007, 45(5): 601-618.

[4] 赵毓棠, 陆静梅. 国产三种鸢尾染色体核型的研究[J]. 东北师范大学报: 自然科学版, 1986(2): 71-78.

[5] 董晓东, 李继红. 中甸鸢尾的核型分析[J]. 大理学院学报, 2002, 1(4): 47-48.

[6] 陆静梅, 韩丽娟, 张力. 粗根鸢尾染色体核组型分析[J]. 长春师院学报: 自然科学版, 1993(1): 36-38.

[7] 周劲松, 苏晓波, 杨永平, 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.

[8] 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, 21(1): 43-44.

[9] 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: 1-20.

[10] 陈瑞阳. 植物有丝分裂染色体标本制备新方法[J]. 植物学报, 1979, 21(3): 297-298.

[11] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclatureal evolution in higher plants[M]. London Edward Arnold, 1971: 85.

[12] Stebbins G L. Chromosome evolution in higher plants[M]. London: Academic Press, 1971: 87-123.

[13] 卢继承. 用核型分析的方法鉴定鸢尾的染色体[J]. 山东农业大学学报, 2007, 38(1): 64-66.

[14] 董晓东, 李继红. 中甸鸢尾的核型分析[J]. 大理学院学报, 2002, 1(4): 47-48.

[15] 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, 34(1): 98-102.

[16] Dadington C D, Wylie A P. Chromosome Atlas of Flowering Plants [M]. London: George Allen & Unwin Ltd, 1955: 383-390.