

静宁葫芦巴染色体制片及核型分析

杨福红

(甘肃省平凉市农业科学院, 甘肃 平凉 744000)

摘要: 以采自静宁的葫芦巴为材料, 研究了 1 mol/L 的盐酸在 60 ℃ 下的不同解离时间对根尖染色体制片的影响, 并确定染色体数目和进行核型分析。结果表明, 静宁葫芦巴根尖最佳解离时间为 2.0~2.5 min。染色体数为 16, 核型公式为 $2n=2x=16=8m+8sm(2SAT)$, 臂比值变化在 1.07~2.88, 平均臂比为 1.926, 随体在第 6 对染色体短臂上, 核型类别为 2A。

关键词: 葫芦巴; 染色体; 核型分析

中图分类号: Q343.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)05-0024-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.05.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.05.009)

Chromosome Preparation and Karyotype Analysis of *Trigonella foenum-graecum* L.

YANG Fuhong

(Pingliang Academy of Agricultural Sciences, Pingliang Gansu 744000, China)

Abstract: In this paper, the effects on routine chromosome preparation of *Trigonella foenum-graecum* L. with different acidolysis time with 1 mol/L HCl at 60 ℃ are studied. The chromosome number and the karyotype are investigated with conventional plant root tip squashing method. The result shows that the best acidolysis time is 2.0~2.5 min. The chromosome number is 16, with karyotype formula as follows: $(2n)=2x=16=8m+8sm(2SAT)$. The change of ration of chromosome length(L/S) is between 1.07~2.88, with an average ration is 1.926, and a pair of satellites in the short arm of 6th chromosomes, The karyotype type is 2A.

Key words: *Trigonella foenum-graecum* L.; Chromosome; Karyotype analysis

葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum* L.), 又叫香豆、苦豆和芦巴子等, 是豆科葫芦巴属一年生草本植物, 原产于西亚和欧州东南部, 在西亚诸国广泛种植, 我国多个省份都有栽培, 宁夏、甘肃、青海和四川等地为主要种植区。以种子入药, 味苦, 性温, 入肾、膀胱二经, 能补肾阳, 祛寒湿、治寒病。据现代药理学研究, 葫芦巴具有含葫芦巴碱、牡荆素、葫芦巴甙 I、II 等多种化学成分, 能够改善糖尿病、降低胆固醇和血脂含量, 并对动脉粥样硬化和冠心病具有预防作用^[1]。王喜军^[2]等人研究表明, 叶子中所含的葫芦巴素、B-谷留醇和东茛内酯等成分治疗肾功能衰竭和尿毒症具有良好作用。此外, 葫芦巴叶子可作为香料和调味剂。因此, 葫芦巴具有广阔的药用和香

料开发利用前景。每个物种具有特定的核型特征, 有关葫芦巴核型的研究已有报道, 不同地区葫芦巴的染色体核型各不相同。张荣等^[3]、祁如虎^[4]、黄永红等^[5]和刘萍等^[6]研究表明, 葫芦巴染色体数目均为 $2n=2x=16$, 但核型类型、有无随体和随体所处的染色体位置等结果各不相同。笔者通过对甘肃静宁农家收集到的葫芦巴进行染色体核型分析, 以了解其与其它葫芦巴资源的亲缘关系及其遗传多样性, 为葫芦巴育种和遗传多样性研究提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试葫芦巴来源于甘肃省静宁县农家, 染色体鉴定在山西农业大学中草药实验室完成。

收稿日期: 2017-02-25

基金项目: 甘肃省中药材产业科技攻关项目(GYC12-06)。

作者简介: 杨福红(1982—), 男, 甘肃平凉人, 农艺师, 硕士, 主要从事作物和药用植物遗传育种研究。联系电话: (0)13919513883。E-mail: 151288935@qq.com。

1.2 方法

1.2.1 种子发芽 将葫芦巴种子在 60 °C 温汤中浸种 24 h 后, 置培养皿中在人工气候培养箱中培养。

1.2.2 根尖压片 种子发芽后, 待根尖长 1.0 ~ 1.5 cm 时切取根尖, 用饱和对二氯苯水溶液预处理 3 h, 经蒸馏水冲洗 3 次, 置于卡诺固定液(无水乙醇与冰醋酸按体积比 3 : 1 配制)中, 室温下固定 24 h, 再用蒸馏水冲洗 3 次, 用 1 mol/L 的盐酸在 60 °C 下解离。设 6 个处理时间(1.0 min、1.5 min、2.0 min、2.5 min、3.0 min 和 3.5 min), 每处理 15 个根尖。然后用卡宝品红染色 4 ~ 6 h, 进行根尖压片, 用 OLYMPUS BX51 系统显微镜镜检并照相。

统计 50 个中期染色体分散的细胞^[5]。

1.2.3 核型分析 对中期染色体分散良好的细胞进行染色体计数, 参照李懋学^[7]和李贵全^[8-9]等人的方法, 用 Adobe photoshop 进行染色体组型分析^[10]。

2 结果与分析

2.1 不同解离时间对染色体分裂相的影响

解离是染色体根尖压片中的重要步骤之一, 1 mol/L 的盐酸能够使组织细胞的细胞壁软化和细胞间的中胶层物质溶解从而达到分离细胞的目的, 便于制片时获得良好的分裂相。不同解离时间对分离细胞和染色体分裂相的影响见表 1 和图 1。

表 1 不同解离时间对染色体分裂相的影响

时间/min	解离情况	分裂相状况
1.0	细胞不分散	无良好分裂, 不能染色体计数。
1.5	外缘细胞解离, 中间不分散。	良好分裂相少, 染色模糊, 重叠比例高, 染色体扎堆。
2.0	细胞分散良好	良好分裂相多, 染色体分散, 清晰, 容易计数, 最高可在 10% 左右。
2.5	细胞分散良好	良好分裂相较多, 染色体分散, 容易计数, 最高可在 5% ~ 7%。
3.0	细胞分散	良好分裂相少, 染色体重叠比例高, 不易计数。
3.5	细胞呈片状, 间隔模糊。	无良好分裂相。

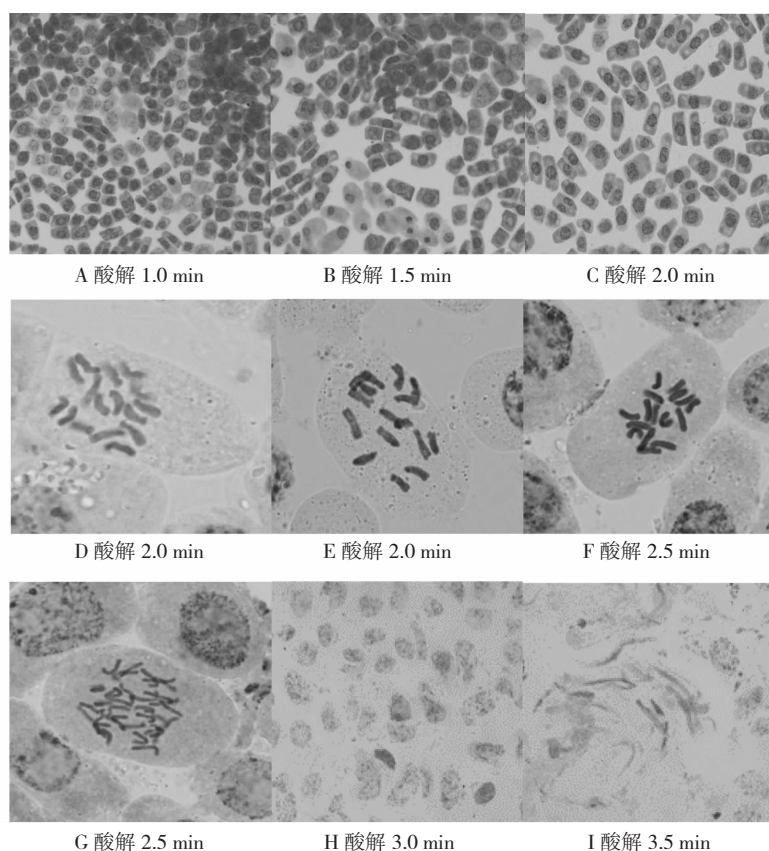


图 1 不同解离时间对染色体分裂相的影响

由表 1 和图 1 可知，葫芦巴染色体制片的最佳解离方法是 1 mol/L 的盐酸在 60 °C 解离 2.0 ~ 2.5 min，细胞分散良好，染色体分散，清晰，容易计数(见图 1C 和图 1G)。解离时间过短或过长，都严重影响细胞的分散状况和染色体计数，解离时间过短(见图 1A 和图 1B)，细胞重叠不分散，无良好分裂相；解离时间过长(见图 1H 和图 1I)，导致细胞成片状，染色体和细胞质着色困难，间隔模糊，无良好分裂相。

2.2 染色体核型分析

通过根尖压片对 50 个分散良好的中期细胞进行染色体计数，葫芦巴的染色体数目均为 $2n=2x=16$ (见图 1 F)，未见其他数目的染色体细胞。葫芦巴染色体参数见表 2。对葫芦巴种子核型分析表明，相对长度的变化范围在 4.25% ~ 6.40%；臂比值变化为 1.07 ~ 2.88，平均臂比为 1.926。随体在第 6 对染色体的短臂上，核型类别为 2A，核型公式为 $2n=2x=16=8m+8sm$ (2SAT)(如图 2 和图 3)。

染色体数目： $2n=2x=16$

核型公式： $8m + 8sm(2SAT)$

核型分类：2A

最长染色体 / 最短染色体：1.51

臂比 > 2 的染色体比例：0.5

表 2 二倍体葫芦巴染色体参数^①

染色体编号	相对长度 /%			臂比	染色体类型
	长臂	短臂	全长		
1	4.75	1.65	6.40	2.88	sm
2	4.40	1.80	6.20	2.50	sm
3	4.55	1.60	6.15	2.85	sm
4	3.25	2.85	6.10	1.14	m
5	4.30	1.60	5.90	2.70	sm
6	2.75	2.30	5.15	1.20	m*
7	2.50	2.35	4.85	1.07	m
8	2.20	2.05	4.25	1.08	m

①表内 * 为具随体染色体，随体长度未计算在内。

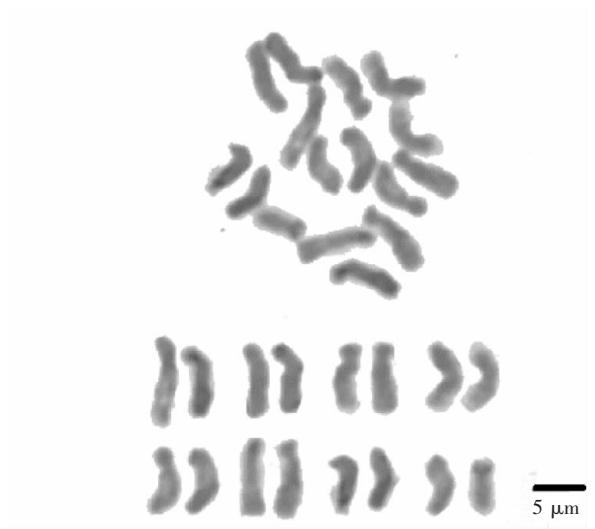


图 3 二倍体葫芦巴染色体形态和核型

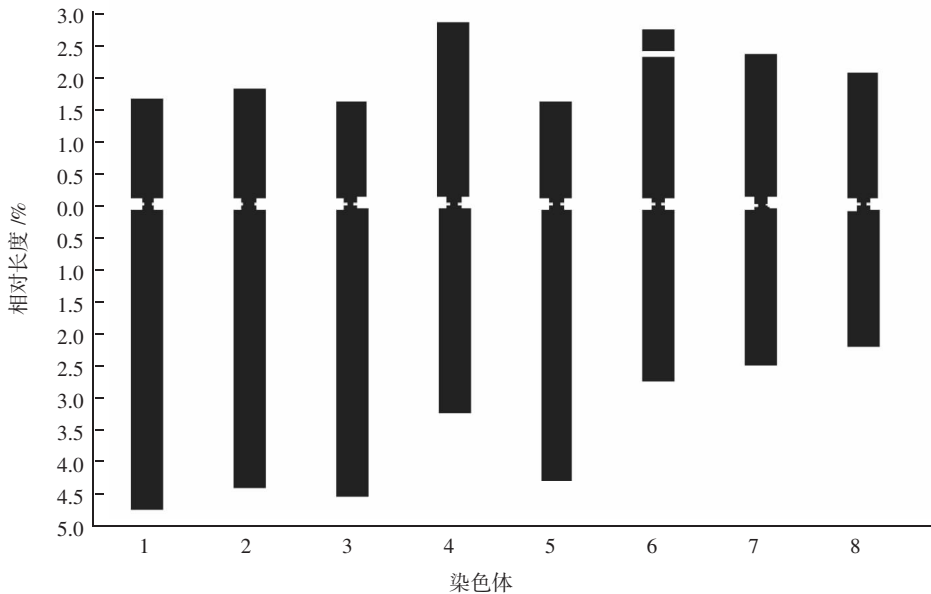


图 2 二倍体葫芦巴核型模式 ($2n=2x=18$)

3 小结与讨论

解离目的是使组织细胞的细胞壁软化和细胞间的中胶层物质溶解而便于染色体的观察。常用的方法有酸解法和酶解法。本研究表明,利用 1 mol/L 的盐酸在 60 °C 下解离葫芦巴种子根尖细胞的最佳时间为 2.0~2.5 min,细胞分散良好,染色体分散,清晰,容易计数。解离时间过短或过长,都严重影响细胞的分散状况和染色体计数。这与人研究结果趋同^[11-13],但在具体解离时间上有所不同。张荣^[3]和刘萍^[6]的研究表明,葫芦巴根尖利用 1 mol/L 的盐酸解离时间分别为 10 min 和 5~10 min,笔者研究得到的解离时间是 2.0~2.5 min,这可能是笔者在解离过程中利用 60 °C 水浴加热,促进了葫芦巴根尖细胞的解离速度所致。

核型是该物种在系统演化中的位置和相近种亲缘关系的重要依据。对甘肃省静宁县农家采摘的葫芦巴种子核型分析表明:葫芦巴核型公式为 $2n=2x=16=8m+8sm(2SAT)$,平均臂比为 1.926,随体在第 6 对染色体短臂上,核型类别为 2A。在这里,笔者关于葫芦巴染色体数目 $2n=2x=16$ 的结果与前人^[3-6,14]的研究结果相同,而在核型类型和核型公式等方面的研究结果不尽相同:如张荣等人^[3]报道的云南葫芦巴核型为 $2n=2x=16=2M+2m+2m(SAT)+10sm$,属 2B 型,随体在第 1 对染色体上;祁如虎^[4]报道青海西宁葫芦巴核型为 $2n=2x=16=4m+10sm+2st$,属 3A 型,未见随体;黄永红^[5]等人报道葫芦巴的核型为 $2n=2x=16=6m+2m(SAT)+4sm+4st$; Martin 等^[14]对土耳其胡卢巴的核型为 $2n=2x=16=4m+12sm$,未见随体;刘萍等人^[6]研究宁夏青铜峡和陶乐葫芦巴核型 $2n=2x=16=14sm+2sm(SAT)$ 为 2A 型,甘肃张掖葫芦巴核型 $2n=2x=16=4m+10sm+2sm(SAT)$ 为 2A 型,随体都在第 8 对染色体上。分析不同地域来源的葫芦巴染色体数目相同而染色体核型不同所表现出葫芦巴遗传多样性,可以推测它们属于葫芦巴的不同种或者是同一种的不同生态居群。同种植物在长期的自然选择、人工选择和相互引种的作用下,为适应当地的自然生态环境有可能演化成不同的生态居群。尽管静宁葫芦巴核型公式和随体位置与前人

的研究不一致,但与对宁夏青铜峡、陶乐和甘肃张掖葫芦巴的研究结果趋于相似,即同源性较强,特别是与甘肃张掖葫芦巴的结果更加接近。可能 4 个地方的葫芦巴来源于同一种源,因引种、人工选择和适应当地环境生态变化而在核型上产生了适应性变化,这有待通过其他途径进一步验证。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志: III[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 491.
- [2] 王喜军, 王 栋, 杜胜滨, 等. 葫芦巴地上部分生物活性成分研究[J]. 中医药信息, 1994(6): 43-44.
- [3] 张 荣, 赵艳晖. 葫芦巴核型分析[J]. 中药材, 1996, 19(8): 381-382.
- [4] 祁如虎. 三种葫芦巴属植物的核型比较[J]. 中国草地, 1997, 19(8): 381-382.
- [5] 黄永红, 高景全. 葫芦巴核型分析[J]. 黑龙江农业科学, 1996(5): 46-47.
- [6] 刘 萍, 张晓岗. 不同葫芦巴种质资源染色体核型的遗传多样性[J]. 西北农业学报, 2013, 22(1): 168-173.
- [7] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准问题[J]. 武汉植物学研究. 1985, 3(4): 298-302.
- [8] 李贵全. 细胞学研究基础[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 79-99.
- [9] 张贵友, 吴 琼, 林 琳. 普通遗传学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003: 12-18.
- [10] 杨大翔. 用 Adobe Photoshop 进行核型分析[J]. 农业网络信息, 2005(3): 45-46.
- [11] 汪 祥, 李晓玲, 杨 进, 等. 中华蚊母树染色体制片及核型分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(9): 1742-1748.
- [12] 张 敏, 王 卉, 宁慧霞, 等. 天山雪莲根尖染色体制片影响因素研究及组型分析[J]. 西北农业学报, 2013, 22(2): 170-176.
- [13] 刘 丹, 夏 雪, 吴益梅, 等. 植物染色体制片效果影响因素的解析[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(10): 1654-1657.
- [14] MARTIN E, AKAN H, EKICI M, et al. Karyotype analyses of ten sections of *Trigonella* (*Fabaceae*) [J]. Comparative Cytogenetics, 2011, 5(2): 105-121.