

半夏根尖染色体压片技术研究

贾袭伟¹, 贡小杰¹, 久西加¹, 徐宠然¹, 刘源¹, 毛洁¹, 刘东¹, 杜弢^{1,2}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 西北中藏药协同创新中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 半夏根尖染色体压片效果受多重因素制约, 为方便半夏染色体倍性鉴别、染色体计数, 探索适用于半夏的根尖压片技术选取半夏根尖为材料, 采用植物染色体常规压片法, 对预处理液、预处理时间、固定时间、染色液以及染色时间 5 个主要参数进行一系列的筛选优化。结果表明, 在半夏根尖压片过程中, 用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液预处理 3 h, 卡诺氏固定液固定 20.0 h, 60 °C 水浴, 1 mol/L 盐酸酸解 10 min, 45% 醋酸软化 20 min, 最后用改良石炭酸复红染液染色 20 min, 压片效果显著, 染色体清晰可辨, 可用于半夏染色体观察研究。

关键词: 半夏; 根尖; 压片技术; 染色方法

中图分类号: S567

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2023)01-0094-05

doi: 10.3969/j.issn.2097-2172.2023.01.021

Research on Chromosome Slicing Technology of *Pinellia ternate* Root Tip Tissue

JIA Xiwei¹, YUN Xiaojie¹, JIU Xijia¹, XU Chongran¹, LIU Yuan¹, MAO Jie¹, LIU Dong¹, DU Tao^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou Gansu 730000, China; 2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: The effect of *Pinellia* root tip chromosome compression is restricted by multiple factors. In order to facilitate the identification of *Pinellia* chromosomal ploidy and chromosome counting, a root tip compression technology suitable for *Pinellia ternate* was explored. In this experiment, the root tips of *Pinellia ternate* were selected as the material, and the routine pressing method of plant chromosomes was used. A set of technical methods for *Pinellia* root apex compression was developed. The experimental results showed that: in the process of root tip compression of *Pinellia ternate*, when pretreated with 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline solution for 3 h, fixed with Carnot's fixative for 20.0 h, water bath at 60 °C, and acid hydrolyzed in 1 mol/L HCl for 10 min, softened in 45% acetic acid for 20 min, and finally stained with modified carboic acid fuchsin for 20 min, the tableting effect was remarkable, and the chromosomes were clearly distinguishable, which can be applied to the observation and research of *Pinellia ternate*.

Key words: *Pinellia ternate*; Root tip; Tableting technique; Dyeing method

半夏来源于天南星科植物半夏[*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.]的干燥块茎, 夏、秋两季采挖, 洗净, 除去外皮晒干。半夏始载于《神农本草经》, 《礼记·月令》记载“五月半夏生, 盖当夏之半也, 故名, 又名守田、水玉, 守田会意, 水玉因形”^[1]。其味辛, 性温; 有毒, 归脾、胃、肺经。具燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结功效^[2], 临床常用以治疗咳嗽痰多、呕吐反胃、胸脘痞闷、瘰疬痰核等^[3]。研究发现, 半夏的不同居群、不同生态型之间染色体倍性混杂、数目多样^[4], 生产中, 常

因种源混乱影响半夏药材产量^[5]。目前对于半夏的研究, 主要集中在药理活性、化学成分鉴定及提取等方面, 在染色体倍性以及形态等细胞遗传学方面鲜有报道。

染色体是遗传物质的主要载体, 是细胞核中载有遗传信息(基因)的物质, 为细胞在有丝分裂或者减数分裂时 DNA 特定的存在形式。染色体的数目、形态及结构的变化导致遗传信息发生改变, 从而造成生物个体差异^[6-7]。因此, 探索并掌握染色体压片技术方法, 方便观察、统计染色体的形

收稿日期: 2022-07-26; 修订日期: 2022-10-25

基金项目: 国家中药材产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21); 2021年甘肃省第五批重点研发计划项目(21YF5NA130)。

作者简介: 贾袭伟(1993—), 男, 甘肃环县人, 博士在读, 主要从事药用植物资源保护与利用研究工作。Email: 1959322720@qq.com。

通信作者: 杜弢(1967—), 男, 陕西凤翔人, 教授, 硕士, 主要从事药用植物栽培及育种的教学和研究工作。Email: gslzdt@163.com。

态及数目, 可有效解决细胞学研究和育种工作中染色体倍性鉴定、育种材料选择以及亲缘关系确定等技术难题。

1 材料与方法

1.1 材料

供试半夏是经甘肃中医药大学杜毅教授鉴定, 为天南星科植物半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.] 的干燥块茎, 采自清水县白沙镇。

供试试剂有卡诺氏固定液(北京索莱宝科技有限公司)、过氧化氢(天津市大茂化学试剂有限公司)、1, 4 二氯苯(北京沃凯生物科技有限公司)、1- 溴化萘及 8- 羟基喹啉(萨恩化学技术有限公司)、考马斯亮蓝 G250(天津市大茂化学试剂有限公司)、改良石炭酸复红染液(北京索莱宝科技有限公司)、1 mol/L 盐酸、45%醋酸。

供试仪器设备有 CX23 正置显微镜(甘肃嘉瑞贸易有限公司)、载玻片、盖玻片、试管、剪刀、镊子、显微镜、擦镜纸、香柏油、胶头滴管。

1.2 方法

根尖染色体压片的操作流程: 取材→预处理→固定→酸解→软化→染色→压片→镜检、拍照^[8-11]。

1.2.1 取材 将半夏种茎用毛刷于自来水中刷洗干净, 用 1 g/kg 的过氧化氢溶液浸泡 20 min, 再用无菌水冲洗 5~6 次, 平铺在放有 5~6 层湿润滤纸的培养皿中(每皿 5~6 个), 置于 28 ℃ 培养箱中, 每天定时补充水分以保持滤纸湿润, 3 d 后有大量的新生根着生于半夏种茎芽点周围。切取长 2 cm 的根尖(呈细长圆柱形, 表面类白色, 平滑, 形态学上端类圆形), 用蒸馏水冲洗干净后备用。

1.2.2 预处理 采用 3 种不同的预处理液, 为对二氯苯饱和水溶液、 α - 溴萘和对二氯苯饱和水溶液的混合液、0.002 mol/L 8- 羟基喹啉溶液。预处理时间设置为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 共 6 个梯度。将切取的半夏根尖置于含有不同预处理液的试管中进行预处理。在每个预处理时间下分别压片 10 张, 观察统计 10 张压片中清晰可见的染色体总数目, 比较半夏根尖染色体压片的效果, 从而选出最佳的预处理液。

1.2.3 固定 采用卡诺氏固定液在 4 ℃ 的条件下固定。固定时间分别设置为 14、16、18、20、22、

24 h, 共 6 个梯度。将预处理结束的半夏根尖从试管中用镊子夹出, 用蒸馏水反复冲洗 5~6 次, 置于含有卡诺氏固定液的试管中, 按照试验设计梯度进行固定。

1.2.4 酸解 将固定好的半夏根尖用蒸馏水反复冲洗 5~6 次, 置于加有 1 mol/L 盐酸的试管中, 在 60 ℃ 的水浴锅中酸解 10 min。

1.2.5 软化 将酸解好的半夏根尖置于 45% 的醋酸中软化 20 min。

1.2.6 染色 采用改良石炭酸复红染液、考马斯亮蓝 G250 染色液(配制方法: 称取考马斯亮蓝 G250 固体粉末 10 mg, 加入 5 mL 90% 乙醇进行溶解, 然后加入 5 mL 85% 磷酸, 最后加水定容到 100 mL, 振摇, 4 ℃ 备用)。两种染色液进行染色, 染色时间均设置为 5、10、15、20、25、30 min。比较染色结果的清晰程度, 从而选出最佳染色液。

1.2.7 压片 采用植物染色体常规压片法。用刀片切取染色完成的半夏根尖分生区组织, 放置在干净的载玻片上, 盖上盖玻片, 用带有橡皮的铅笔均匀敲击盖玻片表面^[12], 使其组织均匀分散在盖玻片之间^[13], 最终呈现出一层淡淡的薄雾状, 用滤纸擦去从边缘渗透出来的染色液。

1.2.8 镜检及拍照 采用正置显微镜进行镜检, 用 JD capture 软件对染色体进行拍照记录。

2 结果与分析

2.1 预处理液筛选

预处理的目的是抑制纺锤体的形成, 使细胞分裂过程中的染色体缩短和比较分散, 尽可能地使其分裂期停止于中期阶段, 从而便于观察。3 种预处理液对半夏根尖进行预处理的效果(表 1)为 0.002 mol/L 8- 羟基喹啉溶液 > α - 溴萘和对二氯苯饱和水溶液的混合液 > 对二氯苯饱和水溶液。在显微镜下观察表明, 用 0.002 mol/L 8- 羟基喹啉溶液处理的半夏根尖效果最好, 视野中染色体形态、缢痕以及随体清晰可见, 染色体数目精确, 便于计数分析; α - 溴萘和对二氯苯饱和水溶液的混合液处理的半夏根尖部分染色体缩短变粗不明显, 呈线型的染色体缠绕在一起, 不利于数目的统计分析; 对二氯苯饱和水溶液处理的半夏根尖效果不佳, 染色体同样变粗不明显, 出现粘连现象。

表 1 不同预处理液处理结果分析

预处理液	优点	缺点	评价
对二氯苯饱和水溶液	便宜, 适用范围广, 便于操作	毒害大、染色体出现粘连, 不利于统计	差
α -溴萘和对二氯苯饱和水溶液的混合液	作用迅速, 便于操作	毒害大、染色体缩短变粗不明显, 不利于统计	中
0.002 mol/L 8-羟基喹啉	清晰显示染色体数目及其形态	毒害稍大	优

2.2 预处理时间

预处理时间是预处理液发挥最佳效果的重要因素。由图 1 可知, 以 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液为预处理液时处理效果最佳。由表 2 可知, 在 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液预处理液中, 预处理 1.0~1.5 h 时, 镜检发现染色体形态较清晰; 2.0~3.0 h 时, 染色体形态清晰; 3.5 h 时, 则染色体较模糊不清楚。对镜检观察到的清晰染色体个数统计结果发现, 预处理 3.0 h 时最多。因此, 半夏根尖的最佳预处理时间为 3.0 h。

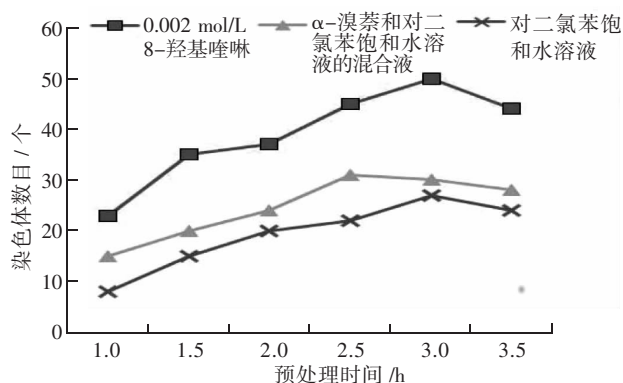


图 1 3 种预处理液不同处理时间下染色体数目变化

表 2 0.002 mol/L 8-羟基喹啉在不同预处理时间的处理效果

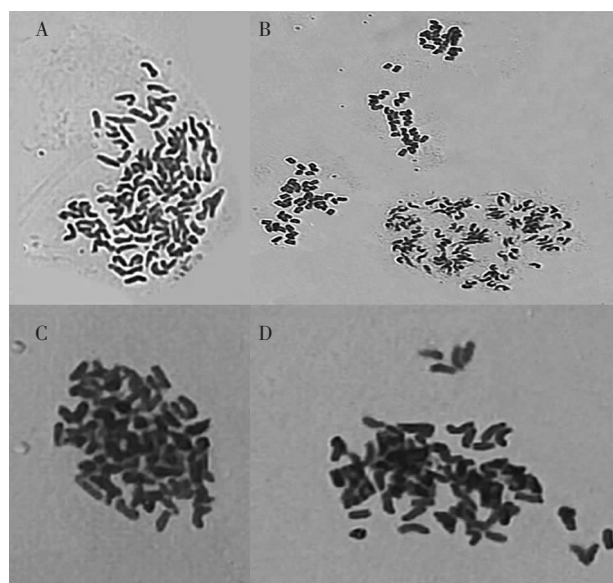
预处理时间/h	处理效果	清晰染色体条数/条
1.0	较清晰	23
1.5	较清晰	35
2.0	清晰	37
2.5	清晰	45
3.0	清晰	50
3.5	较模糊	44

2.3 固定时间

在用 3 种预处理液预处理的前提下, 不同固定时间的固定效果见表 3。从表 3 可知, 以 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液为预处理液时, 在预处理的前提下固定 14~18 h, 镜检发现染色体是一个渐变清晰的过程 (从模糊到比较模糊再到比较清晰), 不便于染色体形态的观察以及计数; 固定 20~22 h, 镜检时染色体清晰, 利于观察以及计数(图 2A、2B); 固定 24 h, 镜检时染色体变得比较模糊 (图

表 3 不同预处理液下不同固定时间的染色体镜检效果

固定时间/h	固定效果		
	对二氯苯饱和水溶液	α -溴萘和对二氯苯饱和水溶液的混合液	0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液
14	模糊	模糊	模糊
16	模糊	模糊	比较模糊
18	模糊	模糊	比较清晰
20	模糊	模糊	清晰
22	比较模糊	比较模糊	清晰
24	比较模糊	比较模糊	比较模糊



A 为固定 20 h, B 为固定 22 h, C 和 D 均为固定 24 h。

图 2 卡诺氏固定液不同固定时间染色体效果

2C、2D)。为了提高试验的可靠性和准确性, 半夏根尖的最佳固定时间为 20 h。

2.4 染色液筛选

考马斯亮蓝 G250 染色液染出的半夏根尖效果不佳, 镜检呈现区域白色或者蓝色, 看不到细胞核内的染色体形态(图 3A、3B); 改良石炭酸复红染液染出的半夏根尖效果最佳, 镜检时染色形态数目清晰可辨 (图 4A、4B、4C、4D、4E、4F)。因此, 改良石炭酸复红染液为半夏根尖染色的最佳染色液。

2.5 染色时间

从表 4 可知, 考马斯亮蓝 G250 的染色效果随着染色时间延长, 染色加深, 但不论时间长短都

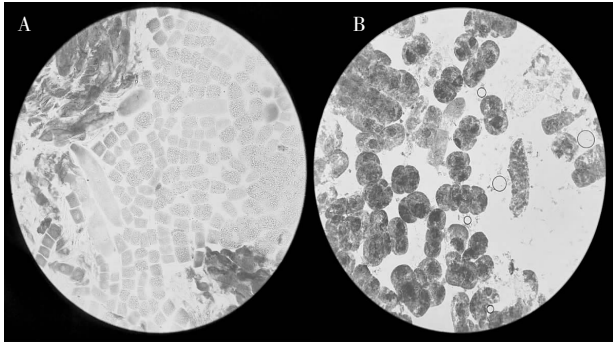


图 3 考马斯亮蓝 G250 染色液的染色效果
A 为考马斯亮蓝 G250 染色 (区域白), B 为考马斯亮蓝 G250 染色 (区域蓝)。

图 3 考马斯亮蓝 G250 染色液的染色效果

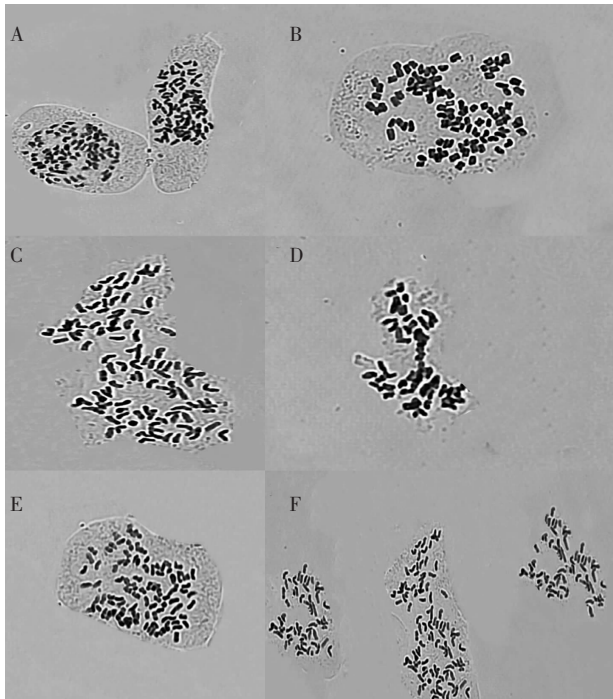


图 4 改良石炭酸复红染液的染色效果

不能清楚地看到细胞核内染色体形态。改良石炭酸复红染液染色时, 随着染色时间的延长, 染色同样加深。染色 5~15 min, 染色较浅, 不利于观察; 染色 20 min, 染色明显, 能清楚观察到染色体的形态以及数目; 染色 25 min, 染色体颜色较深, 稍有模糊; 染色 30 min, 染色体颜色过深,

呈现区域紫色, 染色体同时变得模糊, 不利于染色体观察以及计数。为了提高试验的可靠准确性, 20 min 为半夏根尖的最佳染色时间。

3 讨论与结论

影响植物根尖压片效果优劣的因素很多, 比如选取压片材料的生理状况、取样的时间、预处液的种类及浓度、预处理时间及温度, 固定液的种类、时间、温度, 解离的时间、温度、染色液的种类、染色时间、温度等条件^[14-15]。其中每个操作步骤都非常重要, 直接影响下一步的操作结果^[16-17]。一般来说, 植物细胞的分裂周期由一系列基因、酶和蛋白质精确调节, 细胞分裂取决于 DNA、RNA 和蛋白质等细胞成分的定量合成, 任何影响这些物质合成的因素都会影响细胞分裂, 如温度、营养、蛋白质抑制剂或核酸合成的抑制剂、植物激素等都会影响细胞分裂。因此, 在半夏根尖的压片中, 笔者发现部分压片透过灯光照射, 呈现出丝状, 并不是淡淡的薄雾状。对呈现丝状的压片镜检发现, 染色体模糊, 难以找到清晰的染色体, 可观察区域不连续, 存在断层现象, 即使用带橡皮的铅笔用力敲击, 也不能使其呈现出淡淡的薄雾状, 从而影响镜检效果。对呈现淡淡薄雾状的压片镜检发现, 染色体分布均匀, 形态清晰, 便于观察以及计数。寻找其原因发现, 虽然根尖由同一时间在同一半夏种茎上切取, 但部分根尖粗壮, 部分根尖细小, 在解离以及软化相同时间的情况下, 对于稍微细小的半夏根尖足以将其软化, 但对于粗壮的根尖并不足以使其软化。因此, 对于材料的选择至关重要, 选择形态大小相同的材料对于实验的成功事半功倍。

通过观察大量压片发现, 半夏根尖染色体压片, 其中有一部分染色体呈弯曲的线状, 扭曲缠绕在一起, 同时细胞间的染色体重重叠叠, 交叉缠绕在一起, 非常不利于观察以及计数。究其原

表 4 不同染色时间和染色液的染色效果

染色时间 /min	染色效果	
	考马斯亮蓝 G250	改良石炭酸复红染液
5	呈现区域白色, 观察不到染色体	较浅, 观察不到染色体
10	呈现区域白色, 观察不到染色体	较浅, 观察不到染色体
15	区域白色至蓝色, 观察不到染色体	稍浅, 染色体不清晰
20	区域白色至蓝色, 观察不到染色体	适中, 观察到清晰染色体
25	呈现区域蓝色, 观察不到染色体	较深, 染色体稍有模糊
30	呈现区域蓝色, 观察不到染色体	深, 染色体变得模糊

因,很大可能是在压片过程中用带橡皮的铅笔敲击力度不够,没有使染色体充分分散开来;也有可能是在观察过程中载玻片与盖玻片错位,导致此现象的出现。所以,在压片以及观察的过程要避免人为误差。在观察寻找典型分裂相细胞染色体时,有些压片找不到典型分裂相细胞的染色体,有些压片只能清楚地观察到几个典型分裂相细胞的染色体,而有些压片则能观察到许多典型分裂相细胞的染色体。这可能与取材时间和取材部位有关。查阅文献发现,8:00—10:00时取材^[12-13],就有极大可能获得处于细胞分裂各个时期的材料^[18]。于是,我们分别在8:00—10:00时以及14:00—16:00时切取同一培养皿培养的半夏根尖部位,使用本试验探索出的最佳条件进行处理,结果发现,8:00—10:00时取材的半夏根尖和14:00—16:00时取材的半夏根尖镜检并没有发现明显的差异,并没有发现8:00—10:00时取材的半夏根尖比14:00—16:00时取材的半夏根尖有更多的典型分裂相细胞的染色体。可能本试验用的半夏根尖培养在保温箱里进行,温度以及湿度变化不显著,从而影响了半夏有丝分裂的进程,这与李淑洁^[19]关于大麦根尖染色体研究出现的现象具有相似性;试验样本过少,缺乏有效性,精度不够,有存在偶然误差的可能,不具代表性。由于半夏的染色体相对比较小,通过显微镜观察时具有很大的挑战性。本试验选择改良石炭酸复红染液,染色时间相对较短,镜检效果明显,易于观察,此方法方便简单快捷。

染色体的倍性鉴定是倍性育种及其应用中不可缺少的工作。利用最方便、最快捷的方法尽早确定出植物的倍性水平,就能极大地减少工作量、避免盲目性、降低成本,加快育种工作的进程^[20]。我们采用最方便快捷的压片方法,通过对根尖染色体制片的5个主要参数预处理液、预处理时间、固定时间、染色液以及染色时间进行一系列合理的筛选优化,探索出的适合半夏根尖的染色方法为半夏根尖用0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理3.0 h、卡诺氏液固定20 h,在60℃水浴,1 mol/L 盐酸中酸解10 min,45%的醋酸中软化20 min,用改良石炭酸复红染液染色20 min,压片效果最佳。

参考文献:

[1] 王依明,王秋红.半夏的化学成分、药理作用及毒性

研究进展[J].中国药房,2020,31(21):2676-2682.

- [2] 文建水.采收期对天水小拱棚半夏产量的影响[J].甘肃农业科技,2020(4):14-16.
- [3] 左军,牟景光,胡晓阳.半夏化学成分及现代药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(9):26-29.
- [4] 成彬,马小军,陈力,等.半夏多倍体复合体及其细胞地理学研究[J].中国中药杂志,2006(17):1405-1408.
- [5] 鲁斌,王永峰.16份半夏地方品种在清水县引种初报[J].甘肃农业科技,2019(1):52-55.
- [6] 顾卫红.西瓜染色体的细胞学观念初报[J].北方园艺,1995(5):9-12.
- [7] 徐道娜,薛志强,李世栋,等.西瓜染色体压片技术改进研究[J].西北农业学报,2007(6):301-304.
- [8] 王玉祥,陈述明,张博.苜蓿根尖制片技术研究[J].中国农学通报,2013,29(9):163-166.
- [9] 刘莹,赵翠荣,王立峰,等.小麦根尖染色体制片及植株倍性鉴定[J].安徽农业科学,2012,40(25):12349-12350.
- [10] 梁韶,雷秀娟,宋娟,等.人参不同材料染色体制片技术优化[J].吉林农业大学学报,2018,40(5):583-588;530.
- [11] 张天翔,林宗铿,蔡坤秀,等.金线莲根尖染色体制片技术研究[J].福建热作科技,2011,36(1):12-14.
- [12] 王彬.中国沙棘染色体的染色和制片技术[J].青海农林科技,2010(3):8-10.
- [13] 冯斗,王建岭,席世丽,等.木薯根尖染色体的观察技术[J].安徽农业科学,2008(9):3711-3712.
- [14] 王明艳,韩秀玲,吴鹏,等.药用植物刺五加根尖压片技术研究[J].安徽农业科学,2010,38(3):1149-1150.
- [15] 齐迎春,周光来,高扬.孔雀草的根尖压片技术及染色体形态分析研究[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2008(3):261-265.
- [16] 陈瑞娇,白肋.朱顶红染色体核型分析[J].北方园艺,2013(8):110-111.
- [17] 谢珍玉,郑成木.中国海南岛13种菊科植物的细胞学研究[J].植物分类学报,2003(6):545-552.
- [17] 韩毅科,杜胜利,王鸣.黄瓜染色体制片及倍性研究[J].华北农学报,2003(1):72-74.
- [19] 李淑洁.一种改进的大麦根尖染色体压片法及其应用[J].甘肃农业科技,2020(5):32-35.
- [20] 杨懋勋,黄永芳.植物细胞工程技术在盾叶薯蓣研究中的应用[J].河南农业科学,2006(7):15-18.