



邢冰,董诚明,李曼,等.冬凌草染色体制片方法的初步研究[J].黑龙江农业科学,2019(6):7-9.

# 冬凌草染色体制片方法的初步研究

邢冰<sup>1</sup>,董诚明<sup>1,2</sup>,李曼<sup>1</sup>,李询<sup>1</sup>

(1.河南中医药大学药学院,河南郑州450046;2.呼吸疾病河南省协同创新中心,河南郑州450046)

**摘要:**为寻找冬凌草染色体观察的最佳染色制片方法,并确定冬凌草染色体数目,采用丙酸-铁矾苏木精染色方法,对冬凌草的根尖及下胚轴进行染色制片,通过比较不同浓度的预处理液、不同取材时间对制片效果的影响,以探寻适宜于冬凌草染色体制片的有效技术。结果表明:进行冬凌草染色体数目观察适宜选取的材料为下胚轴,且取材时间8:00-9:00为最佳,将下胚轴用0.1%秋水仙碱溶液处理1h,并用丙酸-铁矾苏木精染色方法制片,观察到冬凌草染色体数目为16条。

**关键词:**染色方法;冬凌草;染色体

冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米桠[*Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara]的地上草质部分。茶菜属(*Rabdosia*)植物,全世界约有150种,我国有90种和21个变种,河南有9种和1个变种。目前作为冬凌草入药的主要为碎米桠一种。产于我国河南、山西、四川、贵州等地。冬凌草味苦,性微寒,具清热解毒,消炎止痛及抗肿瘤之功效。河南民间用于治疗咽喉肿痛、食管癌等已有50余年历史,临床报道其水及醇提取物对食管癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌有一定疗效,其生物活性及化学成分方面的研究也日益深入<sup>[1]</sup>。

染色体是遗传物质或基因载体的总称,包括原核生物及细胞器的遗传物质在内。但一般是指真核生物体细胞分裂中期具有一定形态的染色质。因这一时期染色体收缩到最短,形态上较为典型。目前,植物鉴定仍以在显微镜下观察染色体数目为主,其对于遗传工程中的染色体鉴别具有显著意义<sup>[2]</sup>,但目前对于冬凌草染色体观察少有研究,染色体数目观察主要依赖于染色体制片技术,因此染色制片方法、观察材料以及取材时间的选择尤为重要<sup>[3]</sup>,为了探索冬凌草变化的物质基础和其遗传稳定性,本试验通过探索不同取材部位、不同取材时间对冬凌草染色体形态及数目的影响,为冬凌草的染色制片方法提供参考,有助

于冬凌草染色体的核型研究,为进一步探讨其染色体结构奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 材料取自河南中医药大学冬凌草规范种植试验基地(济源市五龙口),经鉴定为唇形科香茶菜属植物碎米桠[*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara],为冬凌草的正品来源。

1.1.2 器材及试剂 恒温培养箱、桌面式洁净工作台、显微镜、培养皿、镊子、解剖针、刀片、秋水仙碱、苏木精、铁钾矾、丙酸、水合氯醛、乙醇、甲醇、冰醋酸。

### 1.2 方法

1.2.1 发芽与取材 取采集的冬凌草种子选取粒饱满的进行常规发芽。待根长1~2cm时,于9:30-10:30或15:30-17:00剪下,在4℃的冰箱中保存备用。待子叶萌发展开,在8:00-12:00每隔1h剪下子叶连同下胚轴在4℃的冰箱中保存备用。

1.2.2 染色制片法 根尖染色制片法:将剪下的根尖于0.05%,0.10%,0.15%秋水仙碱水溶液中处理2,3,4,5h后,用固定液(95%乙醇:冰醋酸=3:1)固定5h,取出固定的材料用蒸馏水反复冲洗干净后,置1N的盐酸中浸泡20min,倒去盐酸,用蒸馏水洗3遍,并置于蒸馏水中浸泡24h<sup>[4-6]</sup>。选取已处理过的根尖一枚,置于干净载玻片中央,吸去多余水分。另取一张干净载玻片,呈十字形交叉盖在有根尖的载玻片上,用大拇指按压在载玻片中央,使根尖压成一薄层后将两载玻片分开,各滴一小滴染色液(苏木精丙酸溶液:

收稿日期:2018-09-13

基金项目:国家自然科学基金(81603232)。

第一作者简介:邢冰(1995-),女,在读硕士,从事药用植物栽培研究。E-mail:xingbingywz@163.com。

通讯作者:董诚明(1963-),男,学士,教授,从事药用植物资源及栽培研究。E-mail:dcm371@hactcm.edu.cn。

铁钾矾丙酸溶液:水合氯醛=5 mL:5 mL:2 g)进行染色 30 min<sup>[7-9]</sup>,片刻后取一盖玻片,将盖玻片一端靠在离材料不远的载玻片上,一手握镊子顶着盖玻片,一手握解剖针托住盖玻片缓慢放下,若染色液不能布满盖玻片时,可在盖玻片边缘稍加染色液,再用一张大小合适的滤纸覆盖在盖玻片上,一手固定盖玻片,另一手持铅笔橡皮头,对准材料轻敲,使根尖细胞分散均匀。制好的片子若不能及时进行显微镜观察,可用矾士林临时封住盖玻片四周,置于 5℃ 冰箱,隔天镜检<sup>[10-15]</sup>。

下胚轴染色制片法:将下胚轴用 0.1%秋水仙碱溶液处理 1 h,用固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 4 h,其他方法同根尖染色制片方法。

1.2.3 染色体数目统计 对 20~30 个可准确计数的分裂时期细胞进行观察,统计染色体数目<sup>[16]</sup>。

2 结果与分析

2.1 根尖染色制片

采用不同秋水仙碱浓度和预处理时间对冬凌草根尖染色体的影响结果,见表 1。所观察的片子中,用不同浓度秋水仙碱及预处理时间对根尖进行处理,结果表明 0.05%,0.10%,0.15%秋水仙碱水溶液中处理 2,3,4,5 h 对冬凌草根尖细胞分裂多为分裂初期,少数处于前期或前中期,最多为 4 个且出现的染色体呈棒状,制作的片子整体染色效果不明显,因此,冬凌草染色体观察制片不宜选择根尖作为观察材料。

表 1 不同秋水仙碱浓度和预处理时间下根尖细胞分裂数目

Table 1 Number of apical cell division under different colchicine concentrations and pretreatment time				
浓度 Concentration/%	预处理时间 Pretreatment time/h			
	2	3	4	5
0.05	2	3	1	4
0.10	3	2	4	2
0.15	3	2	3	1

表中细胞个数为处于细胞分裂前、中期的细胞数目。  
The number of cells in the table is the number of cells in the early and middle stages of cell division.

2.2 下胚轴染色制片

为了探索不同时间冬凌草下胚轴细胞分裂时期,于 8:00 至 12:00 每隔 1 h 取材一次,以确定

取材时间,其结果见表 2。所观察的染色片中,以取材时间为 8:00 和 9:00 的最佳,处于中前期至中期的细胞数目最多,染色体呈现长棒状、短棒状或点状等;10:00-11:00 的次之,分裂相多停留在中期,缩短呈短棒状或点状,且数目不好区分,见图 1。12:00 细胞数目达不到染色体统计要求的数目。因此冬凌草染色体数目观察以下胚轴且取材时间 8:00-9:00 为最佳。

表 2 不同取材时间对下胚轴细胞分裂数目  
Table 2 Number of cell divisions in hypocotyls with different time of material selection

取材时间 Sampling time	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00
细胞数目 Cell number	>30	>30	25~30	20~25	<15

表中细胞个数为处于细胞分裂前、中期的细胞数目。  
The number of cells in the table is the number of cells in the early and middle stages of cell division.

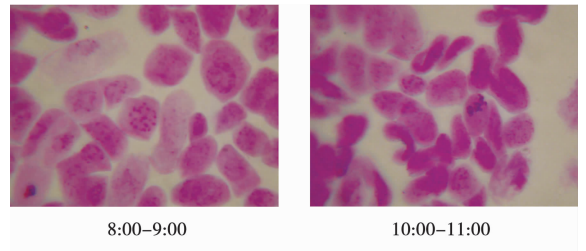


图 1 不同时间段冬凌草下胚轴细胞  
Fig.1 Hypocotyl cells of Rabdosia rubescens in different time periods

2.3 冬凌草染色体数目

染色体数目是植物形态表现的内在因素,是遗传物质的表现,不同的外部表现在染色体数目或染色体倍性的不同。通过对 30 个细胞的观察得出染色体的平均数为 16 条且呈圆粒状。

3 结论与讨论

染色体是遗传物质的载体,是基因的载体。生物体细胞的染色体数目和结构是重要的遗传标志之一,特别是在真核细胞中,因此深入认识染色体的结构和功能,对于生物的遗传、变异和进化以及细胞的增殖,个体的发生和生殖过程的平衡控制都具有十分重要的意义。每个物种的细胞都具有一定数目、形状、大小的染色体特征,称为染色体组型,因此在染色体的分析研究中,制备染色体标本无疑是细胞遗传学最基本的技术,优良的染色体制片是其他技术的先决条件。

材料观察的部位、取材时间等因素会影响染色体的制片效果。涂红艳等<sup>[17]</sup>以白姜花根尖为材料检测染色体数目,杨宁等<sup>[18]</sup>对唇形科植物百里香的研究中以幼苗芽尖为材料,本实验选取冬凌草下胚轴细胞,观察到染色体数目较多,可达到统计要求。有研究表明,8:00-10:00为一般植物细胞染色体的分裂旺盛期<sup>[13]</sup>,任文娟等<sup>[19]</sup>在对菜用大黄染色体数目的研究中发现,取材时间最佳为8:00。洪培培等<sup>[20]</sup>研究显示,选取9:00左右生长旺盛的一串红根尖作为试验材料压片效果最佳,所得染色体分散较好,有利于染色体的统计计数。本研究表明冬凌草观察染色体数目的最佳取材时间为8:00-9:00,此时处于分裂中前期至中期的染色体细胞数目最多,易观察。

对冬凌草植物染色体的观察要选择细胞分裂旺盛期,其染色体呈圆粒状,但是染色体臂在观察时不明显,究其原因是否是取材时期还是其他因素有待进一步研究。

综上,本试验研究了不同取材部位、不同取材时间对冬凌草染色体形态及数目的影响,得出冬凌草最佳取材部位为下胚轴,最佳取材时间为8:00-9:00,通过观察30个细胞,得到平均数为16条呈圆粒状的染色体。

#### 参考文献:

- [1] 刘净,梁敏钰,谢韬.冬凌草研究进展[J].海峡药学,2004,16(2):1-7.
- [2] 洪培培,杨建玉,陈洪伟,等.一串红染色体制片技术优化与计数[J].西北植物学报,2011,31(10):2124-2128.
- [3] 尹丽莎,陈杰,周军,等.滇杨根尖细胞染色体制片技术优

- 化[J].南方农业学报,2015,46(7):1253-1258.
- [4] 图力古尔,包海鹰.关白附(黄花乌头)的染色体研究[J].长春中医学院学报,1994,10(40):47.
- [5] 庄体德,潘泽慧,姚欣梅.薏苡属的遗传变异性及核型演化[J].植物资源与环境,1994,3(2):16-21.
- [6] 刘丽莎.几种药用植物染色体制备技术的改进[J].甘肃中医学院学报,1997,14(4):56-57.
- [7] 杨德奎,周俊英.七种药用植物的染色体研究[J].广西植物,1998,18(2):115-118.
- [8] 刘丽莎.苦参幼嫩子叶染色体制片的初步研究[J].中药材,1997,20(3):109-110.
- [9] 温学森,李先恩,赵华英,等.地黄常见种质的染色体观察[J].中草药,2005,36(1):124-125.
- [10] 张鸿卿,连慕兰.细胞生物学实验方法与技术[M].北京:北京师范大学出版社,1992.
- [11] 孙敬三,钱迎倩.植物细胞学研究方法[M].北京:科学出版社,1987.
- [12] 杨景山.医学细胞化学与细胞生物技术[M].北京:中国协和医科大学联合出版社,1990.
- [13] 李国珍.染色体及其研究方法[M].北京:科学出版社,1985.
- [14] 朱微.植物染色体及染色体技术[M].北京:科学出版社,1982.
- [15] 刘祖洞,江绍慧.植物染色体压片法[J].遗传学试验,1979(3):208-212.
- [16] 晁无疾,苏玉萍.李属植物幼叶染色体观察方法初报[J].果树科学,1986(4):42-45.
- [17] 涂红艳,张爱玲,肖望,等.姜科植物染色体制片方法的优化[J].热带作物学报,2016,37(5):1017-1021.
- [18] 杨宁,谈永霞,李巧峡,等.百里香染色体制片优化及核型分析[J].草业学报,2012,21(1):184-189.
- [19] 任文娟,郭小菲,姜立娜,等.菜用大黄染色体制片优化及核型分析[J].华北农学报,2013,28(5):128-132.
- [20] 洪培培,杨建玉,陈洪伟,等.一串红染色体制片技术优化与计数[J].西北植物学报,2011,31(10):2124-2128.

## Preliminary Study on the Chromosome Production Method of *Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara

XING Bing<sup>1</sup>, DONG Cheng-ming<sup>1,2</sup>, LI Man<sup>1</sup>, LI Xun<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Respiratory Diseases, Henan Province Cooperative Innovation Center, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** In order to find the best staining method for the observation of chromosome, and to determine the number of the chromosomes of *Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara, the root tip and hypocotyl of *I. rubescens* were dyed and prepared by propionic acid-iron sorghum hematoxylin staining method. By comparing the effects of different concentrations of pretreatment liquid and different materials on the effect of tableting to explore an effective technique for chromosome production of *I. rubescens*. The results showed that, to observe the number of chromosomes of *I. rubescens*, the experimental Materials were hypocotyls and the time was 8:00-9:00. The hypocotyls were treated with 0.1% colchicine solution for 1 h and prepared by propionic acid-iron sulphate hematoxylin staining method, and the number of chromosomes in *I. rubescens* was 16.

**Keywords:** chromosome preparation technology; *Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara; chromosome