

研究报告

Research Report

流苏树根尖染色体制片技术优化及核型分析

刘佳庚^{1,2} 李际红^{1,2*} 郭海丽^{1,2} 耿煜然³ 王如月^{1,2} 侯丽丽^{1,2}

1 山东农业大学林学院, 泰山森林生态系统国家定位观测研究站, 泰安, 271018; 2 山东农业大学林学院, 黄河下游森林培育国家林业和草原局重点实验室, 泰安, 271018; 3 山东省泰安市城市管理局园林绿化处, 泰安, 271000

* 通信作者, jhli@sdau.edu.cn

摘要 试验以流苏树(*Chionanthus retusus*)种子的初生根尖为材料, 从取材时间、预处理试剂、预处理时间以及解离方法等条件对常规染色体压片技术进行改进与优化, 以获得流苏树核型分析的清晰制片。结果表明, 取材时间为 9:30 am~10:00 am 时根尖中期细胞最多, 约占 20%~25%; 对二氯苯、0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液、对二氯苯与 8-羟基喹啉混合液以及冰水混合物四种不同预处理试剂均可获得形态清晰、分散良好的适用于核型分析的清晰制片, 其中对二氯苯的最适预处理时间为 1 h, 0.002 mol/L 8-羟基喹啉和对二氯苯与 8-羟基喹啉混合液的最适预处理时间均为 6 h, 冰水混合物的最适预处理时间为 6 h; 解离的最适方法为: 先用 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 接着蒸馏水冲洗后放入 1 mol/L HCl 溶液中 60℃处理 10 min。流苏树染色体核型公式为 $2n=2x=46=40m+6sm$, 流苏树染色体为 2B 型, 核型不对称系数 $As\cdot K\%$ 为 57.18%, 染色体相对长度组成为 $2n=7L+14M2+19M1+6S$ 。

关键词 流苏树, 染色体, 根尖, 压片技术, 核型分析

Optimization of Chromosome Tableting Technology and Karyotype Analysis of *Chionanthus retusus* Root Tips

Liu Jiageng^{1,2} Li Jihong^{1,2*} Guo Haili^{1,2} Geng Yuran³ Wang Ruyue^{1,2} Hou Lili^{1,2}

1 Mountain Tai Forest Ecosystem Research Station of State Forestry and Grassland Administration, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, 271018; 2 State Forestry and Grassland Administration Key Laboratory of Silviculture in downstream areas of the Yellow River, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, 271018; 3 Tai'an City Administration Bureau Landscaping Office, Tai'an, 271000

* Corresponding author, jhli@sdau.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0039

Abstract The experiment uses the primary root tip of the *Chionanthus retusus* seed as the material, and improves and optimizes the conventional chromosome tableting technology from the conditions of material extraction time, pretreatment reagent, pretreatment time, and dissociation method to obtain high quality chromosome preparation for *Chionanthus retusus* karyotype analysis. The results show that the most root-phase apical cells are obtained at 9:30 am~10:00 am, accounting for about 20%~25%; P-dichlorobenzene, 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline solution, mixed solution of p-dichlorobenzene and 8-hydroxyquinoline and ice-water mixture can obtain four different pretreatment reagents with clear morphology and good dispersion, suitable for karyotype analysis. The optimal pretreatment time for P-dichlorobenzene is 1 h, The optimum pretreatment time for 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline and the mixed solution of p-dichlorobenzene and 8-hydroxyquinoline is 6 h, and the optimal

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 9 月 21 日; 接受日期: 2020 年 9 月 21 日; 发表日期: 2020 年 9 月 28 日

引用格式: 刘佳庚, 李际红, 郭海丽, 耿煜然, 王如月, 侯丽丽, 2020, 流苏树根尖染色体制片技术优化及核型分析, 分子植物育种(网络版), 18(39): 1-9 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0039) (Liu J.G., Li J.H., Guo H.L., Geng Y.R., Wang R.Y., and Hou L.L., 2020, Optimization of chromosome tableting technology and karyotype analysis of *Chionanthus retusus* root tips, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(39): 1-9 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0039))

pretreatment time for ice-water mixture is 3 h; Optimal method of dissociation was soaked with 0.075 mol/L KCl solution for 20 minute, then rinsed with distilled water and placed in 1 mol/L HCl solution at 60°C for 10 minute. The *Chionanthus retusus* chromosome karyotype formula is $2n=2x=46=40m+6sm$. The chromosome of the *Chionanthus retusus* is type 2B, the karyotype asymmetry coefficient $As \cdot K\%$ is 57.18%, and the chromosome relative length composition is $2n=7L+14M2+19M1+6S$.

Keywords *Chionanthus retusus*, Chromosome, Root tip, Tableting technology, Karyotype analysis

流苏树(*Chionanthus retusus* Lindley & Paxton)是木犀科(Oleaceae)流苏树属(*Chionanthus*)植物,具有优良的抗逆性和适应性(缴丽莉等, 2006),是中国极具发展潜力的乡土树种。近年来关于流苏树的研究愈发受到重视,其研究领域主要集中在繁育技术(王鑫和孔祥生, 2014)、形态学特征(何艳霞等, 2017; 陈弯等, 2018)、化学成分及药用价值(邓瑞雪等, 2014; Song and Hong, 2020)等方面,同时随着DNA序列分析、分子标记等新方法和新技术的迅速发展,流苏树系统发育和基因组的研究也取得了一定的进展(Arias et al., 2011; Hong and Besnard, 2013; He et al., 2017)。但在关于流苏树细胞学研究方面,仅有对木犀科染色体基数以及流苏树属染色体数目的报道(Taylor, 1945; Chang et al., 1996),而流苏树的其他基本细胞学参数,包括染色体大小、倍性水平、核型不对称性、核型变异系数等尚不明确。

染色体制片技术已被广泛应用于染色体的观察与核型分析。何丽君等(2018)采用常规制片法对野生黑枸杞染色体进行了分析,确定了其染色体数目及核型公式;孙桂芳等(2019)通过染色体制片技术获得了9个品种波斯菊的核型数据,为探讨了种间的遗传多样性提供了重要依据。对于染色体较小,数目较多的植物,一般观察相对困难(杨宁等, 2012),因此具备成熟的染色体压片技术对获得清晰的染色体制片至关重要。本研究以流苏树的种子根尖为试验材料,探讨了不同取材时间、不同预处理试剂和时间以及不同解离条件对流苏树根尖染色体制片的影响,以期确立流苏树根尖制片的最佳方案,并通过对流苏树染色体核型的分析为流苏树细胞学研究以及流苏树育种研究提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 不同取材时间对根尖染色体制片的影响

在100×镜头下随机观察5个视野统计分裂期细胞数所占比例(表1)。结果表明上午9:00~11:00取材均可得到分裂期细胞,其中9:00~10:00分裂期细胞均超过20%~25%,但9:00~9:30多数细胞处于分

裂初期和间期,染色体聚集较差数目难以确定,分裂中期细胞较少(图1A);9:30~10:00多数细胞处于分裂中期,染色体数目清晰,形态完好,达到理想的观察效果(图1B);10:00~11:00之间中期分裂相有所下降,多数细胞处于细胞分裂末期(图1C;图1D)。

1.2 预处理条件的筛选

试验探讨了不同预处理试剂及不同预处理时间对流苏树染色体制片的影响,结果显示,对二氯苯最适宜的预处理时间为1 h(图2),8-羟基喹啉预处理时间为4~6 h(图2G;图2H),最适宜对二氯苯与8-羟基喹啉1:1混合溶液的预处理时间为6 h(图2M),冰水混合物最适宜的预处理时间为3 h(图2Q)。

对二氯苯预处理1 h的根尖,所得染色体形态较好,分散良好(图2B);预处理0.5 h的根尖分裂相少,染色体聚集成团,错乱重叠(图2A);预处理2 h有清晰的分裂相,但易重叠(图2C);预处理3 h分裂相形态特征明显但染色体过长且重叠(图2D);预处理4 h染色体浓缩过度,短而粗,分裂相特征不明显,可用于染色体计数,不适用于核型分析(图2E)。

经0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理6 h的根尖,所得染色体形态较好,染色体长度适中,染色体分散

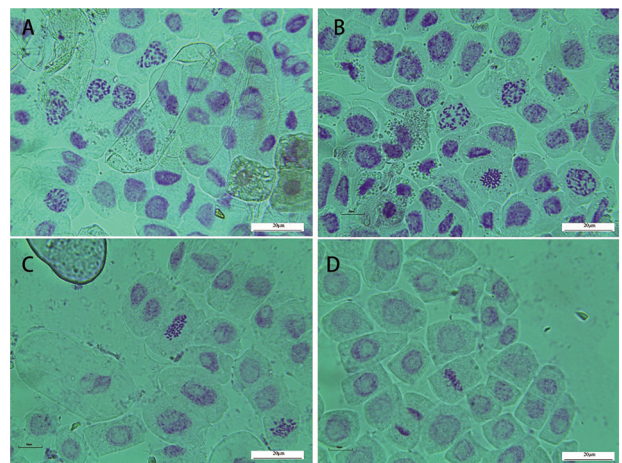


图1 不同取材时间的染色体形态

注: A: 9:00~9:30; B: 9:00~9:30; C: 9:00~9:30; D: 9:00~9:30

Figure 1 Chromosome morphology at different sampling times

Note: A: 9:00~9:30; B: 9:00~9:30; C: 9:00~9:30; D: 9:00~9:30

表 1 不同取材时间对流苏树根尖染色体制片的影响

Table 1 Effects of different material extraction time on *Chionanthus retusus* root tip chromosome preparation

取材时间 Sampling time	细胞观察情况 Observations on chromosome
9: 00~9: 30	多为分裂前期细胞, 处于分裂中期细胞约占 20% Mostly pre-dividing cells, approximately 20% of cells are in the mid-division stage
9: 30~10: 00	处于分裂期的细胞较多, 约占 20%~25% There are many cells in the middle division, about 20%~25%
10: 00~10: 30	处于分裂期的细胞数有所减少, 约占 12%~15% The number of cells in the division stage has decreased, accounting for about 12%~15%
10: 30~11: 00	处于分裂期细胞数约占 10%~16% Cells in the division stage accounts for about 10%~16%

(图 3C); 预处理 2 h 的根尖无分裂细胞(图 2F); 预处理 4 h 有清晰的分裂相, 但部分染色体出现重叠(图 2G); 预处理 6 h 分裂相形态特征明显, 分散较好(图 2H); 预处理 8 h 与 10 h 染色体浓缩过度, 短而粗, 分裂相特征不明显(图 2I; 图 2J)

对二氯苯与 0.002 mol/L 8-羟基喹啉混合预处理 6 h 的根尖, 所得染色体形态较好(图 2M)。预处理 2 h 的根尖可见后期分裂相, 中期分裂相少(图 2K); 预处理 4 h 染色体形态较好, 但易重叠(图 2L); 预处理 8 h 染色体分散较好, 但过度浓缩, 特征不明显, 可用于计数(图 2N); 预处理 10 h 染色体浓缩过度(图 2O)。

冰水混合物预处理 0 h 的根尖可见后期分裂相, 中期分裂相少(图 2P); 预处理 3 h 的根尖, 所得染色体分散较好, 但显示缢痕不清晰(图 2Q); 预处理 6 h 染色体分散, 缢痕清晰(图 2R); 预处理 9 h 染色体松散不浓缩, 集聚(图 2S); 预处理 12 h 染色体浓缩过度, 短而粗, 分裂相特征不明显, 且染色体重叠(图 2T)。

1.3 解离方法的确定

试验参考酸解离法(马梦茹等, 2017)和酶解离法(张志丹等, 2019), 探讨了 6 种不同解离情况下对流苏树根尖细胞染色体制片的影响, 以期获得最佳的解离效果。结果显示: 1 mol/L HCl 60°C 解离 10 min 结果显示解离程度较好, 但细胞壁未得到充分软化, 压片后细胞部分不在同一平面(图 3A); 1 mol/L HCl 60°C 解离 20 min 出现细胞壁破裂, 染色体丢失(图 3B); 先用 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 蒸馏水冲洗后放入 1 mol/L HCl 60°C 解离 10 min 细胞解离程度较好, 压片较为容易, 细胞多数在同一平面, 细胞膜充分分离, 染色体铺展良好, 较容易观察单个细胞(图 3C); 1 mol/L HCl 60°C 解离 10 min, 冲洗 3~5 次

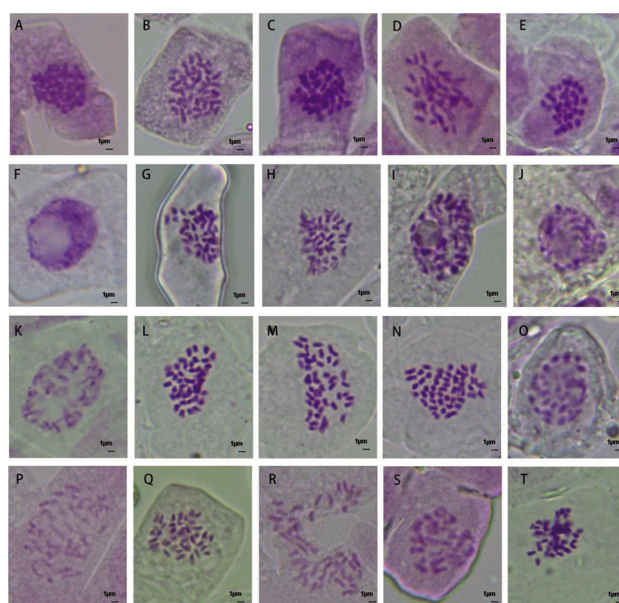


图 2 各预处理试剂不同时间梯度的染色体形态

注: A~E: 饱和对二氯苯处理 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h; F~J: 0.002 mol/L 8-羟基喹啉处理 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h; K~O: 饱和对二氯苯与 0.002 mol/L 8-羟基喹啉处理 1:1 混合液处理 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h; P~T: 冰水混合物处理 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h

Figure 2 Chromosome morphology of different pretreatment reagents at different time gradients

Note: A~E: Treat with saturated p-dichlorobenzene for 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h; F~J: Treated with 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h; K~O: Treat 1:1 mixture with saturated p-dichlorobenzene and 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h; P~T: Treat with ice water mixture for 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h

后放入 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液处理 1 h, 细胞破碎, 没有完整的细胞(图 3D); 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 接着蒸馏水冲洗后, 45%醋酸 2 h, 冲洗, 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液 1 h 解离良好, 压片后细胞多在同一平面, 染色体分散, 较易观察(图

3E); 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 接着蒸馏水冲洗后, 45%醋酸 2 h, 冲洗, 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液 2 h 细胞解离程度较好, 细胞壁充分软化, 部分出现细胞壁破裂(图 3F)。

1.4 核型分析

选取适宜的流苏树根尖制片方法, 即上午 9: 30~10: 00 切取根尖, 放入对二氯苯与 8- 羟基喹啉混合溶液预处理 6 h, 冲洗后前低渗 20 min, 接着放入 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min, 染色, 压片后观察 30 个以上细胞确定流苏树的染色体数目为 46, 挑取 5 个分散良好、缢痕清晰的分裂相进行核型分析(表 2; 图 4)。

2 讨论

植物染色体制片中一般选择细胞分裂旺盛的植物组织或者细胞。根尖、茎尖、愈伤组织、幼小花蕾、芽等均可作为试验材料, 本研究选用根尖作为试验材料, 因为流苏树种子通过层积催芽可较容易获取根尖, 且根尖分裂旺盛, 细胞分裂期细胞较多。

植物细胞分裂旺盛时期一般在生长季上午 9:

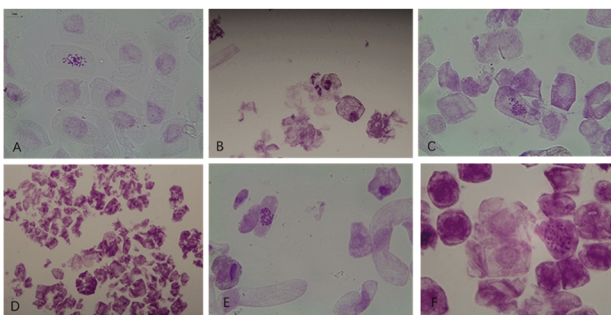


图 3 不同解离条件下细胞染色体形态

注: A~B: 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min, 20 min; C: 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 冲洗 3~5 次, 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min; D: 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min, 冲洗 3~5 次, 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液处理 1 h; E~F: 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 冲洗 3~5 次, 45%醋酸溶液处理 2 h, 冲洗 3~5 次, 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液解离 1 h, 2 h

Figure 3 Chromosome morphology under different dissociation conditions

Note: A~B: 1 mol/L HCl dissociates at 60℃ for 10 min, 20 min; C: 0.075 mol/L KCl solution treatment for 20 min, rinse 3~5 times, 1 mol/L HCl dissociates at 60℃ for 10 min; D: 1 mol/L HCl dissociates at 60℃ for 10 min, rinse 3~5 times, treatment with 2.5% cellulase+pectinase mixed solution for 1 h; E~F: 0.075 mol/L KCl solution treatment for 20 min, rinse 3~5 times, treatment with 45% acetic acid solution for 2 h, rinse 3~5 times, treatment with 2.5% cellulase+pectinase mixed solution for 1 h, 2 h

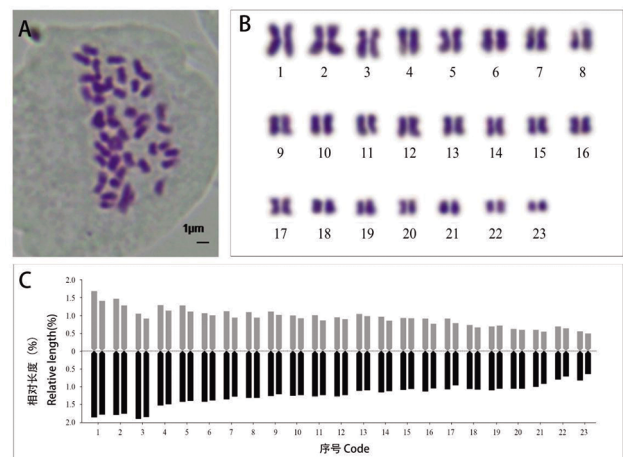


图 4 流苏树染色体核型及核型模式图

注: A:中期染色体; B:核型; C:核型模式

Figure 4 Chromosome karyotype and karyotype Pattern diagram of *Chionanthus retusus*

Note: A: Metaphase chromosome; B: Karyotype; C: Karyotype diagram

00~11: 00 和下午 14: 00~16: 00, 但不同植物存在一定差异。韩杰等在对薄壳山核桃取材时间进行研究发现, 上午 7: 30~8: 45, 9: 30 中期分裂像最多且最清晰(韩杰等, 2018); 付文婷等在对一种贵州地方线椒的根尖处理时发现上午 10: 00 取材所得分裂相最高(付文婷等, 2018, 北方园艺, (18): 52-56)。本研究由于试验时间处于秋季, 温度较低, 下午取材效果较差, 所以主要探讨了上午不同取材时间段对根尖压片的影响。结果显示, 取材时间在上午 9: 00~10: 00 分裂期细胞均超过 20%~25%, 但 9: 00~9: 30 多数细胞处于分裂初期和间期, 9: 30~10: 00 多数细胞处于分裂中期, 染色体数目清晰, 形态完好, 是流苏树根尖的最佳取材时间。

预处理试剂和预处理时间直接影响染色体制片的质量, 是能否得到清晰的制片的关键(胡凤荣等, 2012)。预处理剂的选用和预处理的时间应视不同植物而定。雷海英等(2019)在处理苦参时采用 0.2%秋水仙素溶液浸没胚根, 室温诱导 4 h, 分散效果良好; 李晓等(2019)发现美国流苏染色体以 0.002 mol/L 8-羟基喹啉处理根尖组织 3 h 所得制片效果最好; 胡凤荣等(2012)在对风信子进行核型分析时采用 5 种不同的预处理试剂均可得到质量较高的制片, 其中包括混合处理试剂。混合处理液多为两种不同预处理试剂按一定比例组合配置而成, 其处理效果较单一处理试剂处理时理想(杨宁等, 2012; 赵雁等, 2019, 北方园艺, (22): 83-89)。因此, 本研究在研究单一试剂对

表 2 流苏树染色体核型参数

Table 2 Parameters of chromosome karyotype of *Chionanthus retusus*

序号 No.	相对长度(%) Relative length (%)			臂比 (长臂/短臂) Arm ratio (L/S)	染色体类型 Chromosomes symmetry	着丝点指数(%) Centromeric index (%)	染色体相对 长度系数 Coefficient of relative length	染色体相对 长度类型 Type of relative length
	短臂 Short arm	长臂 Long arm	全长 Length					
	1	1.68	1.87					
2	1.41	1.79	3.19	1.27	m	44.05	1.47	L
3	1.47	1.80	3.27	1.23	m	44.89	1.50	L
4	1.27	1.76	3.03	1.39	m	41.92	1.40	L
5	1.04	1.91	2.95	1.83	sm	35.35	1.36	L
6	0.91	1.86	2.77	2.05	sm	32.80	1.27	L
7	1.28	1.53	2.81	1.20	m	45.56	1.29	L
8	1.13	1.50	2.62	1.33	m	42.99	1.21	M2
9	1.27	1.43	2.70	1.12	m	47.15	1.24	M2
10	1.10	1.40	2.50	1.27	m	44.04	1.15	M2
11	1.07	1.41	2.48	1.32	m	43.18	1.14	M2
12	1.01	1.38	2.38	1.37	m	42.28	1.10	M2
13	1.11	1.36	2.47	1.23	m	44.93	1.13	M2
14	0.93	1.28	2.21	1.38	m	41.99	1.02	M2
15	1.08	1.32	2.40	1.22	m	45.09	1.11	M2
16	0.93	1.32	2.25	1.42	m	41.33	1.03	M2
17	1.10	1.26	2.37	1.14	m	46.62	1.09	M2
18	1.01	1.21	2.22	1.20	m	45.36	1.02	M2
19	0.99	1.26	2.25	1.26	m	44.18	1.03	M2
20	0.91	1.24	2.15	1.36	m	42.29	0.99	M1
21	1.00	1.29	2.29	1.29	m	43.58	1.05	M2
22	0.85	1.24	2.10	1.46	m	40.65	0.96	M1
23	0.94	1.29	2.23	1.37	m	42.14	1.02	M2
24	0.89	1.24	2.13	1.39	m	41.80	0.98	M1
25	1.03	1.12	2.15	1.09	m	47.96	0.99	M1
26	0.98	1.11	2.08	1.13	m	46.88	0.96	M1
27	0.96	1.16	2.12	1.21	m	45.24	0.98	M1
28	0.85	1.13	1.98	1.34	m	42.77	0.91	M1
29	0.92	1.10	2.02	1.19	m	45.74	0.93	M1
30	0.91	1.06	1.98	1.17	m	46.15	0.91	M1
31	0.91	1.14	2.05	1.25	m	44.38	0.94	M1
32	0.76	1.05	1.81	1.38	m	41.97	0.83	M1
33	0.90	1.08	1.98	1.20	m	45.51	0.91	M1
34	0.77	0.97	1.74	1.25	m	44.43	0.80	M1
35	0.73	1.07	1.79	1.47	m	40.47	0.83	M1
36	0.66	1.08	1.74	1.64	m	37.82	0.80	M1
37	0.68	1.11	1.78	1.63	m	38.00	0.82	M1
38	0.71	1.06	1.77	1.48	m	40.27	0.81	M1
39	0.62	1.06	1.67	1.72	sm	36.80	0.77	M1
40	0.59	1.06	1.65	1.79	sm	35.84	0.76	M1
41	0.59	1.01	1.60	1.70	sm	37.05	0.73	S
42	0.54	0.92	1.46	1.71	sm	36.90	0.67	S
43	0.68	0.80	1.48	1.17	m	46.09	0.68	S
44	0.63	0.71	1.34	1.13	m	46.88	0.62	S
45	0.55	0.82	1.37	1.51	m	39.85	0.63	S
46	0.48	0.64	1.13	1.34	m	42.81	0.52	S

试验的影响的同时也探讨了混合处理试剂对染色体制片的影响。结果表明,使用对二氯苯饱和液处理,可使染色体分散较好,尤其适合染色体计数,1 h 时处理效果最好;0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液处理后,染色体显示缢痕清晰,但细胞中期分裂相比较少;对二氯苯与 8-羟基喹啉 1:1 混合溶液处理的染色体兼具两种试剂的共同优点,染色体分散良好且缢痕清晰,以 6 h 时处理效果最佳;通过物理方法即冰水混合处理 6 h,同样可达到核型分析的要求,但显示缢痕效果略差于混合处理液。在各个预处理试剂的选用中,饱和对二氯苯对于抑制植物纺锤体的作用较强,用于处理流苏树等染色体较小的植物时,预处理时间短,但获得的染色体过度浓缩,显示缢痕效果较差,所得制片可用于染色体计数;8-羟基喹啉作用力相对缓和,因此能够很好的保持染色体形态,得到结构清晰的染色体,但得到的制片分裂中期细胞较少,且分散效果较差;二者混合使用时可获得协同增益的效果,得到分散良好,结构清晰,适用于核型分析的染色体制片。因此,综合分析流苏树预处理的最佳条件为对二氯苯与 8-羟基喹啉 1:1 混合溶液处理 6 h 小时。

植物细胞含细胞壁和果胶等物质影响压片的效果,因此需要解离除去果胶,并软化细胞壁。李晓等(2019)在探讨与流苏树同科同属的美国流苏的最佳解离方法时发现 1 mol/L HCl 溶液 60℃水浴解离 20 min 所得染色体制片效果最好。本试验在使用 1 mol/L HCl 溶液 60℃解离流苏树根尖时,发现解离时间不宜过长,当时间超过 20 min 时解离过度,细胞破裂,解离时间以 10 min 左右为宜,但此时细胞核膨胀较小,染色体不易分散;在将酸解离和酶解离结合使用的情况下,即先用 1 mol/L HCl 60℃解离后,再放入酶解液(2.5%纤维素酶 + 果胶酶混合溶液)继续解离时效果较差,细胞破碎严重。0.075 mol/L KCl 溶液能够使细胞核充分膨胀,便于染色体铺展,于鹏飞等(2019)在研究香椿染色体核型时使用 0.075 mol/L KCl 前低渗 10~15 min,解离效果良好。本试验在酸解离前加入 0.075 mol/L KCl 前低渗处理 20 min,解离效果较为理想,染色体分散均匀;在有些植物中,45%的醋酸解离亦可以获得较好的效果,苏晓倩等(2019)在对二倍体风信子进行解离时采用 45%醋酸处理 2 h,解离效果良好,本研究发现 45%醋酸对流苏树根尖解离时所需时间较长,在与酶解液结合使用时可缩短解离时间,达到较好的解离效果,但酶解离时间不宜超过 2 h。综合分析,最佳解离方法为

0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min,蒸馏水冲洗后放入 1 mol/L HCl 溶液中 60℃解离 10 min,此方法具有操作方便以及低成本的优势。

研究发现流苏树染色体数为 $2n=2x=46$,与 Taylor (1945)报道的关于流苏树属植物染色体数目 $2n=46$ 相一致。流苏树染色体较小,为 1~2 μm ,属于小染色体,这也给制片和观察带来了一定的困难。按照植物的进化程度与其核型不对称程度存在一定的关联,因此核型分析已被广泛应用于种内分化变异程度和进化趋势(孙立民等,2017)等方面的研究。流苏树的染色体核型为 2B 型,染色体核型较为对称,核型不对称系数为 57.18%,染色体对称程度较高,按照 Stebbins 的观点判断流苏树在系统演化中处于相对原始的地位,但进一步的确定还有待于对流苏树细胞学、遗传学、发育学等方面的深入探索与研究。

本研究对流苏树染色体制片技术进行了优化,并首次对流苏树染色体进行了核型分析,确定了流苏树染色体数目、形态、染色体核型类型等基础的细胞学参数,为流苏树的识别与划分以及流苏树新品种的开发提供更丰富、更具体的细胞学依据,减少了育种工作及新品种选育的盲目性。

3 材料与方法

3.1 试验材料

供试材料流苏树种子,由山东省淄博市冠军苗圃提供,部分种子采集自泰山罗汉崖。选择生长健壮,干型好,无病虫害的成龄树,8~9 月中旬,果皮由青变白,略显蓝紫色时及时采种(彭勇和杨银虎,中国花卉园艺,(22): 38-39);将采集的种子进行水选和消毒后,采用层积催芽的方式获取种子根尖。层积催芽 25~30 d 后流苏树种子根尖生长 1~2 cm 时切取根尖。

3.2 取材与预处理

选择晴朗的上午:9:00~9:30、9:30~10:00、10:00~10:30、10:30~11:00,切取流苏树种子根尖。

根尖切取后分别置于不同的预处理剂中进行不同时间的处理(表 3)。然后将预处理后的材料使用蒸馏水冲洗 3~5 次后置于卡诺氏固定液(冰醋酸:无水乙醇 =1:3)中固定 10~24 h,移入 4℃冰箱保存备用。

3.3 材料的解离

试验探讨了 6 种不同解离情况下对流苏树根尖细胞染色体制片的影响,以期获得最佳的解离效果。具体方法:(1) 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min;(2) 1 mol/L

表3 预处理试剂及时间

Table 3 Pretreatment reagents and time

预处理试剂	预处理时间(h)
Pretreatment reagent	Pretreatment time (h)
对二氯苯(饱和溶液)	0.5, 1, 2, 3, 4
p-dichlorobenzene (saturated solution)	
0.002 mol/L 8-羟基喹啉	2, 4, 6, 8, 10
0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline	
对二氯苯(饱和溶液)与 0.002 mol/L 8-羟基喹啉混合溶液(1:1)	2, 4, 6, 8, 10
p-dichlorobenzene and 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline mixture (1:1)	
冰水混合物	0, 3, 6, 9, 12
Ice-water mixture	

HCl 60℃解离 20 min; (3) 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 蒸馏水冲洗后放入 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min; (4) 1 mol/L HCl 60℃解离 10 min, 冲洗 3~5次后放入 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液处理 1 h; (5) 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 蒸馏水冲洗后, 放入 45%醋酸溶液中 2 h, 冲洗, 再放入 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液解离 1 h; (6) 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20 min, 接着蒸馏水冲洗后, 45%醋酸 2 h, 冲洗, 2.5%纤维素酶+果胶酶混合溶液解离 2 h。

3.4 染色体制片及核型分析

将解离好的材料用蒸馏水充分冲洗后放入滴加卡宝品红染液的 1.5 mL 离心管中, 整体预染, 压片后镜检, 100×物镜(油镜)下观察拍照。随机观察五个视野, 统计细胞分裂中期细胞数及细胞形态等确定制片质量。

观察 30 个以上细胞数确定流苏数染色体数量, 选取适于核型分析的 5 个缢痕清晰、分散良好、染色体数目完整的高质量染色体照片进行核型分析, 用 Photoshop 2020 软件剪取染色体并进行同源染色体配对; 采用 Karyotype Analysis 2.0 软件进行染色体长短臂的测量, 并计算染色体的相对长度和臂比; 染色体核型分析的方法与标准按照李懋学和陈瑞阳(1985)修改制定的方法进行计算与分析, 按 Arano (1963)的方法计算核型不对称系数。按照 Kuo 等(1972)提出的, 染色体相对长度系数(IRL)=染色体长度/全组染色体平均长度, 计算确定染色体相对长度类型。

作者贡献

刘佳庚是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 负责完成试验并进行数据处理和论文撰写; 李际红是本研究的负责人和构思者, 指导实验设计、数

据分析和论文写作与修改; 郭海丽、耿煜然参与实验设计及实验材料的采集; 侯丽丽、王如月参与试验结果分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由山东省农业良种工程项目(2016LZGC-036)、山东省林业科技创新项目(LYCX02-2018-11)和山东省农业科技资金项目(林业科技创新项目)(2019LY001)共同资助。

参考文献

- Arano H., 1963, Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan IX: The karyotype analysis and phylogenetic considerations on *Pertya* and *Ainsliaea*, Bot. Mag. Tokyo, 76: 32-39
- Arias R.S., Techen N., Rinehart T.A., Olsen R.T., Kirkbride J.H., and Scheffle B.E., 2011, Development of simple sequence repeat markers for *Chionanthus retusus* (Oleaceae) and effective discrimination of closely related taxa, HortScience, 46(1): 23-29
- Chang M.C., Qiu L.Q., Wei Z., and Green P.S., 1996., Oleaceae: *Chionanthus*, In: Wu Z.Y., Raven P.H., and Hong D.Y. (eds.), Flora of China, vol. 15, Science Press and Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis, pp.293-295
- Chen W., Fan L.L., Xu X.M., Xing G.Z., Zheng W.M., Fan W., and Li C.Q., 2018, Study on anatomical characteristics of leaves and petioles of 14 *Chionanthus retusus* bio-type, Zhongguo Nongye Daxue Xuebao (Journal of China Agricultural University), 23(5): 38-51 (陈弯, 樊莉丽, 许笑蒙, 邢国珍, 郑文明, 樊巍, 李春奇, 2018, 14 个类型流苏树叶片和叶柄解剖学特征的比较研究, 中国农业大学学报, 23(5): 38-51)
- Deng R.X., Zhang C.F., Liu P., Duan W.L., and Yin W.P., 2014, Separation and identification of flavonoids from Chinese

- fringetree flowers (*Chionanthus retusa* Lindl et Paxt), *Shipin Kexue (Food Science)*, 35(1): 74-78 (邓瑞雪, 张创峰, 刘普, 段文录, 尹卫平, 2014, 流苏花黄酮类化学成分的分离鉴定, *食品科学*, 35(1): 74-78)
- Han J., Kong D.Y., and Peng F.R., 2018, Optimization of chromosome mounting technique and karyotype analysis of *Carya illinoensis*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 16 (16): 5240-5246 (韩杰, 孔德仪, 彭方仁, 2018, 薄壳山核桃染色体制片技术的优化与核型分析, *分子植物育种*, 16(16): 5240-5246)
- He L.J., Chen H.J., Shan Y.M., Liu J.W., Hou J., Mu K.B., and Zhang T., 2018, Karyotype analysis on wild *Lycium ruthenicum* Murr., *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 16(18): 6055-6060 (何丽君, 陈海军, 单玉梅, 刘嘉伟, 侯杰, 穆可彬, 张婷, 2018, 野生黑果枸杞染色体核型分析, *分子植物育种*, 16(18): 6055-6060)
- He Y.X., Kong L.Q., Chen P.Z., Miao X., and Shang F.D., 2017, Floral syndrome and reproductive strategy of an androdioecious species, *Chionanthus retusus* (Oleaceae), *Shengtai Xuebao (Acta Ecologica Sinica)*, 37(24): 8467-8476 (何艳霞, 孔令茜, 陈鹏臻, 苗欣, 尚富德, 2017, 雄全异株流苏树的花部特征及繁育系统研究, *生态学报*, 37(24): 8467-8476)
- He Y.X., Liu L., Yang S., Dong M., Yuan W., and Shang F.D., 2017, Characterization of the complete chloroplast genome of Chinese fringetree (*Chionanthus retusus*), *Conservation Genetics Resources*, 9(3): 431-434
- Hong W.C., and Besnard G., 2013, Intricate patterns of phylogenetic relationships in the olive family as inferred from multi-locus plastid and nuclear DNA sequence analyses: a close-up on *Chionanthus* and *Noronhia* (Oleaceae), *Mol. Phylogenet. Evol.*, 67(2): 367-378
- Hu F.R., Wang F., Bao R.L., and Xie W.R., 2012, Pretreatment reagents for hyacinthus root tip and karyotype analysis, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 32(10): 2030-2034 (胡凤荣, 王斐, 鲍仁蕾, 谢蔚然, 2012, 风信子根尖预处理及核型分析, *西北植物学报*, 32(10): 2030-2034)
- Jiao L.L., Lu B.S., Bai Z.Y., Meng Q.R., and Zhen H.W., 2006, The comparison of cold resistance of four gardening young trees, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 33(3): 667-670 (缴丽莉, 路丙社, 白志英, 孟庆瑞, 甄红伟, 2006, 四种园林树木抗寒性的比较分析, *园艺学报*, 33(3): 667-670)
- Kuo S.R., Wang T.T., and Huang T.C., 1972, Karyotype analysis of some formosan gymnosperms, *Taiwania*, 17(1): 66-80
- Lei H.Y., Hou Q.W., Bai F.L., Zhao N., He B.B., and Wang Z.J., 2019, Chromosome number and karyotype analysis of *Sophora flavescens* Ait. from eight different habitats, *ZhiWu Shengli Xuebao (Plant Physiology Journal)*, 55(7): 967-974 (雷海英, 侯沁文, 白凤麟, 赵楠, 何宝宝, 王志军, 2019, 八种不同产地苦参的染色体数目及核型分析, *植物生理学报*, 55(7): 967-974)
- Li M.X., and Chen R.Y., 1985, A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants, *Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research)*, 3(4): 297-302 (李懋学, 陈瑞阳, 1985, 关于植物核型分析的标准化问题, *武汉植物学研究*, 3(4): 297-302).
- Li X., Zhang G.X., Hu F.R., and Liu W.J., 2019, Pretreatment for *Chionanthus virginicus* root tip and karyotype analysis, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 17(19): 6447-6454 (李晓, 张鸽香, 胡凤荣, 刘文静, 2019, 美国流苏根尖预处理及核型分析, *分子植物育种*, 17(19): 6447-6454)
- Ma M.R., Wang Y., Zhuang N.S., and Gao H.Q., 2017, Karyotype analysis of four main rubber tree (*Hevea brasiliensis*) cultivars, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 36(1): 311-317 (马梦茹, 王英, 庄南生, 高和琼, 2017, 四个橡胶树主要栽培品种的核型分析, *基因组学与应用生物学*, 36(1): 311-317)
- Song J.H., and Hong S.P., Identity and localization of floral scent components in an androdioecious species, *Chionanthus retusus* (Oleaceae), *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 13(2): 288-294
- Su X.Q., Wang F., and Hu F.R., 2019, Karyotype analysis of 3 diploid hyacinth cultivars, *Zhejiang Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Zhejiangensis)*, 31(9): 1509-1515 (苏晓倩, 王斐, 胡凤荣, 2019, 3个二倍体风信子品种核型分析, *浙江农业学报*, 31(9): 1509-1515)
- Sun G. F., Yang J.W., Zhao Y. X., and Liu D.Y., 2019, Karyotype analysis of nine varieties of *Cosmos bipinnata*, *Hebei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Hebei Agricultural University)*, 42(1): 38-44 (孙桂芳, 杨建伟, 赵艺璇, 刘冬云, 2019, 波斯菊9个品种核型分析, *河北农业大学学报*, 42(1): 38-44)
- Sun L.M., Wang W.Y., Xing S.Y., Tang H.X., Kong Q.Q., and Liu P.Y., 2017, Chromosome karyotype analysis and evolutionary trend of ancient *Ginkgo biloba* half-sib families, *Xinan Linye Daxue Xuebao (Journal Of Southwest Forestry University (Natural Science Edition))*, 37(5): 15-21 (孙立民, 王文英, 邢世岩, 唐海霞, 孔倩倩, 刘佩迎, 2017, 古银杏半同胞家系染色体核型分析及进化趋势研究, *西南林业大学学报(自然科学版)*, 37(5): 15-21)
- Taylor H., 1945, Cyto-taxonomy and phylogeny of the Oleaceae, *Brittonia*, 5(4): 337-367
- Wang X., and Kong X.S., 2014, Tissue culture and rapid propagation of *Chionanthus retusus*, *Zhiwu Shengli Xuebao (Plant Physiology Journal)*, 50 (10): 1510-1514 (王鑫, 孔祥生, 2014, 流苏树的组织培养和快速繁殖, *植物生理学报*, 50(10): 1510-1514)
- Yang N., Tan Y.X., Li Q.X., Jia L.Y., Yang X.L., and Liu X.R., 2012, Optimization of a chromosome mounting technique and karyotype analysis of *Thymus mongolicus*, *Caoye Xue-*

- bao (*Acta Prataculturae Sinica*), 21(1): 184-189 (杨宁, 谈永霞, 李巧峡, 贾凌云, 陈锡莲, 刘效瑞, 2012, 百里香染色体制片优化及核型分析, *草业学报*, 21(1): 184-189)
- Yu P.F., Sun X.J., Li C.C., Zhang X., Zheng W., and Liu C.J., 2019, Chromosome karyotype analysis and development of SSR molecular markers in *Toona sinensis*, *Yuanyi Xuebao* (*Acta Horticulturae Sinica*), 46(6): 1172-1182 (于鹏飞, 孙晓健, 李晨晨, 张旭, 郑威, 刘常金, 2019, 香椿染色体核型分析及 SSR 分子标记开发, *园艺学报*, 46(6): 1172-1182)
- Zhang Z.D., Wang Y., Zhuang N.S., and Gao H.Q., 2019, Modified method of chromosome preparation and detection of FISH signal in Brazilian rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue* (*Genomics and Applied Biology*), 38(6): 2713-2717 (张志丹, 王英, 庄南生, 高和琼, 2019, 巴西橡胶树染色体制片方法的改良及 FISH 信号检测, *基因组学与应用生物学*, 38(6): 2713-2717)