

药用植物山豆根的染色体核型观察*

An Observation of Karyotype of the Medicinal Plant *Sophora tonkinensis* Gapnep.

余丽莹^{1,2}, 谭小明², 周雅琴², 刘芳³

YU Li-ying^{1,2}, TAN Xiao-ming², ZHOU Ya-qin², LIU Fang³

(1. 中国医学科学院中国协和医科大学, 北京 100094; 2. 广西药用植物园, 广西南宁 530023; 3. 广西大学, 广西南宁 530004)

(1. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100094, China; 2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi, 530023, China; 3. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:采用根尖压片法制片镜检观察药用植物山豆根 (*Sophora tonkinensis* Gapnep.) 体细胞染色体数目, 并进行核型分析。结果发现山豆根的染色体数为 $2n=18$, 未发现非整倍性变异和多倍现象, 也未发现 B 染色体, 核型公式为 $K(2n)=18m$, 按 Stebbins 的核型分类标准, 属于 1A 类型。

关键词:染色体 核型分析 药用植物

中图分类号: Q942 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2007)03-0312-03

Abstract: The chromosome of *Sophora tonkinensis* Gapnep. was observed by the root tip pellet method. And its karyotype was analyzed. It was found that the formula was $K(2n)=18m$ and the type was 1A in the standard of Stebbins. The aneuploidy, polyploid and B chromosome are not found in the observation.

Key words: chromosome, karyotype analysis, medicinal plant

山豆根 (*Sophora tonkinensis* Gapnep.) 为豆科 (Leguminosae) 槐属 (*Sophore* Linn.) 植物, 主产于广西, 习称广豆根。以其根入药, 具有清热解毒、消肿止痛等功效^[1]。山豆根中含有多种生物碱, 其中苦参碱 (Matrine)、氧化苦参碱 (Oxymatrine) 等具有抗癌和抗霉菌作用。临床上常用其治疗湿热黄疸, 湿热带下, 钩端螺旋体病, 心率失常, 膀胱癌, 喉癌, 恶性葡萄胎等症^[2,3]。医药工业用山豆根作为原料, 研制开发治疗肝炎的针剂, 如肝炎灵, 咽喉肿痛的片剂以及抗肿瘤的中成药。但是, 山豆根的野生资源地域分布较窄, 在广西只分布于桂西南的几个县, 零星生长于石山区石缝, 且种子往往未成熟就已经大部分脱落掉于石缝之中, 导致其自然繁殖率较低, 加上人们对野生山豆根的滥采滥挖, 使得山豆根的野生资源逐年减少, 目前

已难以满足医药工业的需求。因此, 国内已通过组织培养的方式建立无性繁殖系, 并对其活性成分、临床、质量标准以及野生变家种等进行了研究^[4~8]。目前还没有关于山豆根细胞学观察的报道, 为了给山豆根的组培、育种工作提供更为详细的遗传背景, 我们对其染色体进行观察和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为山豆根种子。山豆根种子采集于山豆根主产地广西那坡县。凭证标本存放在广西药用植物园蜡叶标本馆。

1.2 方法

1.2.1 压片镜检

实验采用根尖压片法^[9]制片镜检。将山豆根种子置于 28℃ 培养箱中培养发根, 待初生根长到 0.5~1.0 cm 时, 剪下, 取生长良好者在 0~4℃ 冰箱中低温处理 24h, 然后转移到卡诺氏固定液 (95% 乙醇: 冰乙酸 = 3: 1) 中, 室温下固定 24h。再将根尖用蒸馏水冲洗 3 次, 放入已经在 60℃ 水浴锅中预热的 1 mol/L

收稿日期: 2006-12-12

修回日期: 2007-03-26

作者简介: 余丽莹 (1974-), 女, 助理研究员, 主要从事药用植物资源研究和药用植物保育工作。

* 广西科技攻关项目 (桂科攻 0322024-3A) 资助。

HCl 中,在 60℃ 恒温条件下解离 8 min,当根尖的伸长区变透明而分生区呈乳白色时取出。将解离好的材料用蒸馏水冲洗以后,转入 45% 醋酸中软化 10 min 左右。取软化后的根尖放在载玻片上,用刀片切去伸长区,只留下 1~2mm 的分生区。用卡宝品红染色 1min,压片镜检,取中期细胞染色体分散良好的标本放入冰箱,经冰冻揭片,待干燥,中性树脂封片。

1.2.2 选材与显微摄影

取染色体分散良好、着丝点清晰的中期分裂相进行染色体计数,并从中选择染色体数目完整、无重叠的 5 个分散较好的分裂相,在放大 500 倍下,用尼康显微照相机进行显微摄影。

1.2.3 测量

分别在 5 张放大的照片(500×)上测量每条染色体的长臂长度和短臂长度。先在每条染色体旁边用笔作临时序号,随测量随记录。记录每条染色体的长臂长度、短臂长度、随体有无,对于有随体的染色体,随体的长度记入染色体长度之内;对于每条染色体的着丝粒经平分之二,记入两臂长度之内;先用细线量取与染色体等长的长度,再用游标卡量出线的相应长度。通过 5 个分裂相得到相应的 5 个数据,取平均值。

1.2.4 计算

染色体相对长度按文献[10]中 Levan 等的方法计算,即:

染色体相对长度 = (某染色体的长度 ÷ 染色体组内全部染色体总长度) × 100

参照文献[10]中 Levan 等的方法按着丝点位置划分染色体类型。臂比为 1.0,染色体类型为正中着丝点染色体(M);臂比为 1.01~1.70,染色体类型为中部着丝点染色体(m);臂比为 1.71~3.0,染色体类型为近中部着丝点染色体(sm);臂比为 3.01~7.00,染色体类型为近端部着丝点染色体(st)。

臂比 = 长臂长度 ÷ 短臂长度

1.2.5 配对与排列

根据测量数据,比较染色体的形状、大小、相对长度、臂比、随体的有无等特征,对照片上的染色体进行粗剪和同源染色体的配对。将配对的染色体按由大到小的顺序进行排列并编号。对于等长的染色体,以短臂长的排在前面。

2 结果与分析

2.1 山豆根染色体制片方法

2.1.1 取材时间

比较上午(9 时至 11 时)、下午(15 时至 17 时)、晚上(19 时至 21 时)3 个时段的实验结果发现,以上

午 9 时至 11 时为宜,此时期选取的材料分裂相较多,比较容易找到合适的中期分裂相。

2.1.2 预处理

经过反复比较和筛选,以 0~4℃ 处理 20~24h 为宜。秋水仙素、8-羟基喹啉处理效果均不及 -4℃ 低温处理分裂相多,染色体的形态好。以往的研究^[11]多采用 8-羟基喹啉或秋水仙素处理,在其他作物上效果较好,但是对于山豆根这种染色体比较小的物种而言,用秋水仙素或 8-羟基喹啉处理时,使得山豆根染色体缩得更短,所以效果不如在 0~4℃ 低温处理好。

2.1.3 解离

解离是为了去除细胞纤维素以便压片。预热的 1mol/LHCl 于 60℃ 恒温水浴锅中解离 8min 效果好。虽然酶解能较好地去除细胞纤维,但酶的质量、浓度、pH 值和温度都对酶的效果有不同影响,而且成本较高,浓盐酸由于浓度较高、解离时间难以控制,容易导致解离过度。

2.1.4 染色

卡宝品红染色液是本实验最适合的染液。它的特点是如果解离时间合适,染色体清晰,细胞质几乎不着色,但前提是盐酸解离后必须用蒸馏水彻底清洗干净,否则因卡宝品红属碱性染液而致染色必然失败。醋酸洋红、锡夫试剂染色效果较差。

2.2 山豆根的核型分析

通过观察 30 个以上根尖细胞的分裂中期染色体,确定山豆根的染色体数为 $2n=18$ 。未发现非整倍性变异和多倍现象,也未发现 B 染色体(图 1、图 2)。核型分析共测量 5 个分散良好、着丝点清晰的染色体,结果见表 1。按 Levan 等的分类标准,山豆根的染色体组成为 $K(2n)=2x=18m$ 。山豆根具有 9 对染色体,最长染色体与最短染色体之比为 1.47:1,臂比均小于 2。因此,根据 Stebbins 的核型分类标准^[12],其核型属于“1A”型,是最对称的类型,说明在进化上处于相当原始的类型。根据表 1 中的相对长度值绘出核型分析图(图 3)。

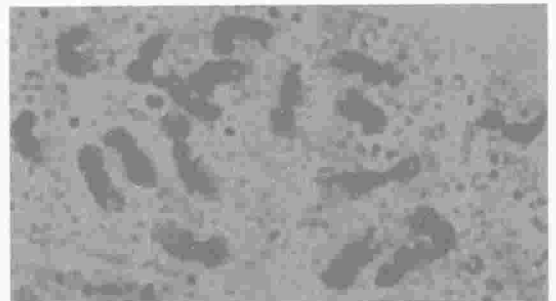


图 1 山豆根中期染色体

Fig. 1 The metaphase chromosomes of *S. tonkinensis*



图2 山豆根核型

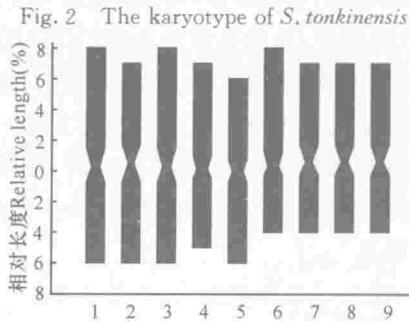


图3 山豆根染色体核型模式

Fig. 3 Idiogram of *S. tonkinensis*

表1 山豆根染色体的核型分析

Table 1 Karyotype analysis of *S. tonkinensis*

染色体 编号 Number	相对长度 Relative length(%)			臂比 Arm ratio	类型 Type
	长臂 Long arm	短臂 Short arm	总长 Total length		
1	7.74	5.66	13.40	1.37	m
2	6.53	5.61	12.14	1.16	m
3	6.45	5.67	12.12	1.14	m
4	7.19	4.85	12.04	1.48	m
5	6.07	5.48	11.55	1.11	m
6	6.79	4.01	10.80	1.69	m
7	5.55	4.36	9.91	1.27	m
8	5.20	3.96	9.16	1.31	m
9	5.10	3.78	9.06	1.29	m

3 结束语

山豆根染色体镜检制片,在上午9时至11时取材,采用0~4℃低温做预处理,在预热的1mol/LHCl60℃恒温水浴锅中解离8min,卡宝品红染色液染色制片效果较好。

全世界大约有70种豆科槐属(*Sophora* Linn.)植物,已发表染色体的计数者约30种。从公开发表的资料可知,这个属具有从n=14,11,9和8的非整倍性变化,而以n=9为最普遍,占68%^[13]。目前主流的看法认为蝶形花科(Papilionaceae)染色体的原始基数为x=14,包括槐属在内的最古老的槐族(*Sophoreae*),而这个基数很可能是从云实科(Caesalpinaceae)的多倍化祖先起源的。随之而来的是发生一系列下降性非整倍性变化而产生了小于14的基数。Goldblatt的研究结果支持Yakovlev等人提出的观点,即断裂是造成这种非整倍性变化的原因^[14]。按上述观点,则包括山豆根在内的n=9的种

是从n=14衍生而来的。自然界中槐属植物的体态进化趋势似乎证明了这一设想,因为目前所知的n=14的种均为乔木,如槐(*S. japonica* L.),(*S. affinis* Torr. et Gray)和(*S. chinensis*),而其他n=11,9和8的种多数是小乔木和灌木,如山豆根;也有的是多年生草本植物,如苦参(*S. flavescens*)等^[13]。但是,单从细胞学单方面的资料尚不足以说明植物的系统位置,山豆根的染色体报道需要结合其它方面的材料,才能较准确的探讨其在该科中的系统位置,而本文正为探讨其系统位置提供了重要的细胞学方面证据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典I部[M]. 广州:广东科技出版社,2005:1-668.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海人民出版社,1997:181.
- [3] 李希新. 广豆根的研究概况[J]. 山东中医药大学学报,2000,24(3):235.
- [4] 邓银华,孙丽,章为,等. 山豆根细胞毒活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:408-410.
- [5] 丁佩兰,陈道峰. 中药山豆根及其制剂的药理作用、临床应用与不良反应[J]. 中国临床药理学杂志,2003,12(5):315-318.
- [6] 宋茹,王媛媛. 山豆根合剂的质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2001,12(8):693-694.
- [7] 覃文流,凌征柱,吴庆华,等. 山豆根野生变家种研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(9):1668-1669.
- [8] 覃文流,凌征柱,许鸿源. 山豆根组织培养获得再生植株[J]. 中国中药杂志,2005,30(4):303-304.
- [9] 郭善利,刘林德. 遗传学实验教程[M]. 北京:科学出版社,2004:1-176.
- [10] FERDGA L A L, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hered, 1964, 52:201-220.
- [11] 曾雅娟,肖华山,黄代青. 金线莲染色体的核型分析[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2001,17(4):118-120.
- [12] STEBBINS G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London:Edward Arnold,1971:87-90.
- [13] 徐炳声,黄少甫. 苦参的染色体核型[J]. 植物研究,1985,5(2):123-127.
- [14] GOLDBLATT P. Cytology and the phylogeny of Leguminosae [M]//POLHILL R M, RAVEN P H. Advances in Legume Systematics. Kew London:Royal Botanical Gardens,1981:427-463.

(责任编辑:邓大玉)