

江西野生金线莲茎尖染色体制作技术优化

张付远¹ 李丹丹^{1,2} 宋墩福¹

(1 江西环境工程职业学院, 江西赣州 341000; 2 华南农业大学, 广东广州)

摘要 研究了金线莲茎尖染色体的制片技术优化。以江西野生金线莲组培瓶苗的茎尖为试材, 采用常规压片法, 研究不同取材时间、解离时间、预处理时间及染色时间对制片的影响。结果表明, 茎尖取材各时间段无显著差异, 相比较 9:30 效果最好, 用 0.1% 的秋水仙素处理 2h, 卡诺液固定, 用 1mol/L HCl 于 60℃ 下解离 15min, 最后用改良的苯酚品红溶液染色 8min 后进行压片, 能获得较理想的染色体制片。

关键词 金线莲, 茎尖, 染色体

金线兰属 *Anoectochilus* Bl. 隶属于兰科 Orchidaceae, 该属植物全世界约有 30 种, 分布于印度、喜马拉雅山东部、太平洋群岛西南部和亚洲南部、东南部到澳大利亚地区; 中国有 11 种, 其中 7 种为中国特有^[1]。在我国金线兰属植物常被称为“金线莲”^[2]。金线莲通常又称花叶开唇兰、金线兰、鸟人参, 是珍稀名贵中草药, 可全草入药, 性平味甘, 清热凉血, 祛风利湿, 可用于治疗支气管炎、肾炎、结核性脑膜炎、咳血、小儿急惊风、风湿性关节炎等症^[3-4]。但是金线莲对生态环境要求严格, 且数量少, 远不能满足需求^[5]。因此, 国内已通过组培快繁方法建立无性系植株, 目前对金线莲的研究还只限于植物学描述、资源评价、化学有效成分、药理机制、药效成分的提取工艺、组培快繁、栽培及少部分分子标记的研究, 曾雅娟等^[6](2001)曾有报道了金线莲的染色体核型属不对称“2A”类型, 核型公式 $2n=40=38m+2sm$ 。但是图像不够清晰。

为了给金线莲育种和栽培提供详细遗传背景资料, 现对其染色体进行观察, 并在结合前人染色体制片技术的基础上, 用金线莲组培瓶苗茎尖为材料, 得到了简单有效稳定的染色体制片方法, 以期对金线莲的种质资源分类、遗传关系远近鉴定、种质资源创新及利用等提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用材料为江西野生金线莲 *Anoectochilus roxburghii*(Wall.) Lindl. 组培瓶苗的茎尖, 取自江西环境工程职业学院花卉中心。

1.2 方法

1.2.1 取材。取金线莲组培幼苗, 切取 1cm 左右长的茎尖。从 8:30~17:30, 每隔 2h 取材 1 次。

1.2.2 预处理。将根尖置于 0.1% 的秋水仙素中分别预处理 1h、2h、4h、6h。

1.2.3 固定保存。将预处理过的茎尖放入卡诺液中固定 24h, 用自来水冲洗 5 遍, 可以直接进行解离, 如暂时不做解离可保存在 70% 酒精中, 于 4℃ 冷藏备用。

1.2.4 解离。固定过的茎尖置于 1mol/L HCl 中在 60℃ 恒

温水浴锅中进行解离, 解离时间设定为 5min、10min 和 15min。

1.2.5 染色。将解离好的茎尖用蒸馏水冲洗 5 遍, 并用改良的苯酚品红染色液进行染色, 染色时间设定为 4min、8min、16min。

1.2.6 压片镜检。切取茎尖分生区部分置于载玻片上, 盖上盖玻片, 先用镊子轻敲, 最后用铅笔的橡皮头敲盖玻片使染色体均匀分散。将压好的片子置于显微镜下镜检, 寻找到清晰的细胞中期分裂相并拍照取像。

2 结果与分析

2.1 不同染色时间对染色体观察的影响

结果表明, 采用改良的苯酚品红溶液染色 4min 时, 染色体着色比较浅, 染色 8min 时, 染色体染色清晰, 细胞质不染色或颜色较淡, 染色效果较佳, 而当染色 16min 时, 背景的清晰度较差, 较难观察染色体。

2.2 不同解离时间对染色体制片的影响

不同解离时间对制片效果的影响见表 1, 结果发现, 经 1mol/L 的 HCl 在 60℃ 下解离 10min 时, 金线莲茎尖细胞分散较好, 染色体清晰。解离 5min 时, 染色体互相重叠, 无法清晰分辨染色体。解离 15min 时, 部分细胞破裂, 染色体出现缺失或混杂。

表 1 不同解离时间的效果比较

解离时间/min	细胞分散效果	染色体情况
5	重叠	重叠在一起
10	分散	染色体分离清晰
15	分散	缺失或混杂

2.3 不同预处理时间对染色体制片的影响

如表 2 所示, 经 0.1% 的秋水仙素预处理 2h 后, 可获得到较多的染色体形态清晰的中期分裂相细胞。预处理 1h 时, 染色体过长, 相互重叠交叉, 不利于观察, 预处理 4~6h 时染色体过分收缩, 影响染色体形态。

表 2 不同预处理时间的效果比较

预处理时间/h	中期分裂相	染色体的形态
1	少	染色体较清晰
2	多	染色体清晰可分别
4	较多	染色体小块状
6	无	细胞核呈点状

玛咖、松花粉保健酸奶的开发与研究

兰玉倩

(丽江师范高等专科学校应用技术学院,云南丽江 674100)

摘要 以玛咖、松花粉、纯牛奶为主要原料,以白砂糖、水、明胶、CMC、单甘脂为辅料,在单因素试验的基础上,通过正交试验确定了凝固型玛咖松花粉保健酸奶的加工工艺和相关参数。试验结果表明,当玛咖提取液浓度为15%、松花粉添加量为4%、白砂糖添加量为8%、发酵剂接种量为4%,其余为纯牛奶,发酵温度45℃,发酵时间8h的配比,得到的凝固型玛咖松花粉保健酸奶口味最佳。试验得到的产品具有玛咖特有香气松花粉特有的松香味,香气协调,微黄,组织细腻,营养丰富。

关键词 玛咖 松花粉 酸奶 发酵

玛咖营养成分丰富,对人体有滋补强身的功用^[1],在我国没有自然分部,云南省丽江市与玛咖原产地的自然环境和栽培条件非常相似,目前种植面积较多。玛咖中富含高浓度的营养素,可以抗疲劳、抗衰老、促进新陈代谢、抵制压力等,目前对玛咖营养价值的研究多集中在总蛋白质、氨基酸、总糖、矿物质以及玛咖多糖、玛咖酰胺、玛咖烯、芥子油苷^[2-3]等。以玛咖为加工原料进行新品开发的研究较少。

花粉是迄今为止所发现的天然食品中营养成分最全面的物质之一,是21世纪新型的营养源和保健食品^[4-5],不仅具有低脂肪、高蛋白的特点,而且含有人体所需的多种维生素、酶、微量元素和生物活性物质,被人们称为营养素的浓缩体,完全的营养源,享有“全能营养品”之美誉。我国松属植物资源较为丰富,其中数量较多的有红松、油松、云南松、马尾松以及华山松,此外还有从国外引进的黑松等。丽江具有典型的“立体气

2.4 不同取材时间的影响

观察不同取材时间的对压片效果的影响(预处理2h、解离10min、染色8min),统计处于分裂中期的细胞所占比例(见表3)。结果表明金线莲根尖的最佳取材时间为9:30。

表3 不同取材时间的效果比较

取材时间	观察染色清晰细胞数	分裂中期的细胞数	分裂中期细胞所占比例/%
8:30	30	8	26.7
9:30	30	9	30.0
10:30	30	8	26.7
11:30	30	9	26.7

3 讨论

根尖压片法是植物染色体研究中应用最为广泛的常规技术,使用茎尖较少,但是金线莲种子小,选取胚根上的根尖比较难,加上金线莲大部分采用组培快繁方法,根尖上培养基较难洗干净,造成取材困难,效果较差。而茎尖比较容易取材,经本研究发现效果较好,可以作为金线莲染色体制备方法。

本试验结果表明,于9:30切取金线莲幼苗的茎

候”特征,多样的地貌,明显的海拔高差使全市兼有亚热带、温、寒带3种气候。使得占全市90%以上的山区、半山区拥有了丰富的森林、草山、草坡资源,为丽江发展生态松花粉提供了很好的条件。

近年来,乳酸菌发酵饮料以其独特的风味丰富的营养和良好的保健功效收到消费者的重视与青睐,本产品通过对酸奶风味的研究,研制出一种集玛咖、松花粉保健功能的新型风味发酵乳,丰富了酸奶的市场,同时也提供了一种玛咖加工的新途径。

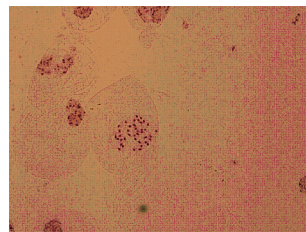
1 材料及方法

1.1 材料

纯牛奶(市售),黄玛咖干片(市售),松花粉(市售),白砂糖(市售),明胶、CMC、单甘脂(市售、食品级),酸奶发酵剂(市售,安琪)

1.2 仪器与设备

高压均质机 温州市龙湾永兴华威机械厂,电热恒尖,用0.1%的秋水仙素预处理2h,经卡诺液固定4h后,用1mol/L HCl于60℃下解离10min,再用改良的苯酚品红溶液染色8min后进行压片,能获得染色体分散良好、形态清晰的压片(图1,400x下拍照观察)。



(收稿 2018-03-25)

参考文献:

- [1]Chen S C, Gale S W, Cribb P, Ormerod P. *Anoectochilus Blume*[M] // Wu Z Y, Raven P H, Hong D Y. *Flora of China* (Vol.25). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2009: 76-80.
 - [2]易骏,吴建国,张秀才,等.不同植物基原金线莲生药鉴别[J].中草药,2015,46(23): 3570-3576.
 - [3]彭东辉,连强牡,刘淑兰.花叶开唇兰的栽培技术[J].中国林副特产,1999(3):21.
 - [4]林仕裕,孙华香.金线莲的组织培养[J].福建中医药,1990,21(5):23-24.
 - [5]吴岩斌,田怀珍,郑丽香,等.短唇金线兰—中国兰科植物新记录种.亚热带植物科学[J].2017,46(3):285-287.
 - [6]曾雅娟,肖华山,黄代青.金线莲染色体核型分析[J].福建师范大学学报(自然科学版),2001,17(4): 118-120.
- 作者简介** 张付远(1979-),河南南阳人,讲师,主要从事植物栽培方面研究。