

分子植物育种
Molecular Plant Breeding
ISSN 1672-416X, CN 46-1068/S

《分子植物育种》网络首发论文

题目：王莲属三种植物的染色体制片优化及核型分析
作者：邓鸟絮，吴福川，赵雁
网络首发日期：2023-06-07
引用格式：邓鸟絮，吴福川，赵雁. 王莲属三种植物的染色体制片优化及核型分析[J/OL]. 分子植物育种.
<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230605.1005.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究报告

Research Report

王莲属三种植物的染色体制片优化及核型分析

邓鸟絮^{1,2} 吴福川^{2*} 赵雁^{1*}

1 云南农业大学园林园艺学院, 昆明, 650201; 2 中国科学院西双版纳热带植物园, 西双版纳, 666303

*共同通信作者, wfc@xtbg.org.cn; zhaoyan@ynau.edu.cn

摘要 本文以克鲁兹王莲(*Victoria cruziana*)、亚马逊王莲(*V. amazonica*)和品种‘追梦人’(*V. 'Dreamer'*)根尖为材料, 采用常规压片法, 探讨取材时间、预处理试剂、预处理时间和染色剂染色等条件对染色体制片的影响, 以优化染色体制片技术, 并进行核型分析。结果表明: 三种供试材料的染色体优化条件相同, 以 0.002 mol/L 8-羟基喹啉和 20 mg/L 放线菌酮为预处理液, 分别恒温 4 °C 处理 8 h 和 5 h, 能获得形态良好、收缩适中的高质量染色体制片, 其余优化条件为: 上午 9:00—10:30 取材, 卡诺固定液 I (V_{95%无水乙醇}:V_{冰乙酸}=3:1) 恒温 4 °C 固定 2~12 h, 1 mol/L HCl 溶液 65 °C 水浴解离 3~5 min, 改良苯酚溶液染色 8~10 min。克鲁兹王莲核型公式为 $2n=2x=24=15m+9sm$, 核型不对称系数为 60%, 核型为 2B 型; 亚马逊王莲的分别为 $2n=2x=20=15m+5sm$, 59% 和 1B 型; 追梦人的则分别为 $2n=2x=20=7m+13sm$, 62% 和 1B 型。本研究结果将为解析王莲属植物亲缘关系和培育新品种提供理论依据。

关键词 王莲属; 染色体; 制片优化; 核型分析

Optimization of Chromosome Preparation Technology and Karyotype Analysis of Three Plants in the *Victoria*

Deng Niaoxu^{1,2} Wu Fuchuan^{2*} Zhao Yan^{1*}

1 College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201; 2 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna, Yunnan, 666303

* Corresponding autho, wfc@xtbg.org.cn; zhaoyan@ynau.edu.cn

Abstract The root tips of *Victoria cruziana*, *V. amazonica* and *V. 'Dreamer'* were used as experimental material in this paper. It was optimized the chromosome preparation method by means of analysis karyotype using different sampling times, pretreatment reagents, pretreatment times and dye agents based on the conventional tablet pressing method. The results showed that the chromosomal optimization conditions of these three materials were the same. It can be obtained high quality chromosome preparation with good shape and moderate shrinkage by using 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline and 20 mg/L actinomycin as the pretreatment solution at constant temperature 4 °C treat 8h and 5h, respectively. The rest of optimum selections were: sampling at 9:00~10:30 am, fixed at a constant temperature of 4°C for 2-12h with Carnot fixative ($V_{95\% \text{ ethyl alcohol}} : V_{\text{hydrochloric acid}} = 3:1$), dissociation 3-5 minute at 65 °C with 1 mol/L hydrochloric acid stained for 8-10min with modified phenol solution. The chromosome karyotype formula of *V. cruziana*, *V. amazonica*, and *V. 'Dreamer'* was $2n=2x=24=15m+9sm$, $2n=2x=20=15m+5sm$, and $2n=2x=20=7m+13sm$, respectively. The karyotype asymmetry coefficient of these three materials was 60%, 59%, and 62%, and the karyotype of these three materials was 2B, 1B, and 1B, respectively. The results of this study will provide more details to understanding the genetic relationship of *Victoria*, and cultivating new varieties in the future.

Keywords *Victoria*; Chromosome; Production optimization; Karyotype analysis

王莲是睡莲科(Nymphaeaceae)王莲属(*Victoria* Lindl.)植物的统称, 本属 3 个种: 克鲁兹王莲 (*V. cruziana* A.D.Orb)、亚马逊王莲[*V.amazonica* (Poepp.) J. C.Sowerby]和玻利维亚王莲[*V. boliviana* Magdalena & L.T.Sm] (Smith L T. et al., 2022)。2021 年国际登录的新品种‘追梦人’ (*V. 'Dreamer'*)由亚马逊王莲诱变而来, 因叶色有双色或过渡色, 观赏性增强, 抗寒性也更强, 已在版纳等地栽培应用。王莲花期集中在 7—10 月, 一朵花的寿命为 3 d, 但色彩和香味随着开花时间的延续而不同, 被誉为“善变的女神”(黄秀等, 2016); 叶片巨大, 直径可达 3 m, 且承重能力可达 75 kg (黄仕才和吴福川, 2018); 具有独特的观赏性、趣味性和科普性(周庆源等, 2006), 可营建高质量水体景观。目前, 园林中广泛应用的王莲是克鲁兹王莲, 亚马逊王莲和长木王

莲(*Victoria* 'Longwood Hybrid')由于抗寒性差, 仅在较温和的地方栽培(李淑娟等, 2017), 培育王莲的重要途径之一还包括对遗传多样性分析和选育抗寒新品种。但对王莲的研究主要集中在形态学(Sônia and Robson, 2011)、解剖学(李爱华等, 2013)、栽培养护技术(文光琪等, 2003; 任启飞等, 2014)、化学成分研究(Chang et al., 2014)、基因组学研究(Puchooa et al., 2004)等方面。但目前对王莲细胞学上的研究很少 (韦平和等, 1994; Pellicer et al., 2013)。

染色体核型分析是一种基础的细胞遗传学研究方法, 其在预测和鉴定种间杂交的亲缘关系和多倍体育种结果的研究方面有重要的参考价值, 也能为生物的系统发育和亲缘关系提供依据(杨宁等, 2012)。染色体核型分析方法的技术随着社会的发展不断更新, 从测量误差比较大的手动核型分析, 逐渐发展为误差相对较小且简便的 Adobe Photoshop 软件分析(闫素丽等, 2008), 后发展为更加高效、快速和准确的自动核型分析(何小周和郭东林, 2009)。目前用这些方法对植物核型分析的研究较多, 但其国内外对王莲染色体核型分析鲜少, 仅有韦平和等(1993)年初步得出克鲁兹王莲核型为 $2n=24=8sm+8m+8T$ 。本试验对王莲属三种植物进行染色体制片技术优化并对其染色体进行核型分析, 旨在探明王莲属三种植物的亲缘关系, 以期为王莲新品种选育提供细胞学依据。

1 结果与分析

1.1 不同取材时间对染色体制片的影响

于上午 8:30—12:00 每隔 0.5 h 取克鲁兹王莲、亚马逊王莲和‘追梦人’种子萌发所形成的根尖作为染色体根尖压片材料, 三种植物根尖压片细胞有丝分裂中期分裂相情况相同(表 1)。

表 1 不同取材时间的观察

Table 1 Observation of different sampling time

取根时间	中期细胞	分辨程度
Sample time	Metaphase cells	Degree of resolution

8:30—9:00	少	模糊
9:00—9:30	多	清晰
9:30—10:00	多	清晰
10:00—10:30	多	清晰
10:30—11:00	少	模糊
11:00—11:30	较少	较清晰
11:30—12:00	较少	较清晰

1.2 不同预处理对染色体形态的影响

预处理是制作染色体压片的关键步骤，其主要作用是抑制和破坏纺锤丝形成，使更多的细胞在有丝分裂中期时停留，着丝点清晰度主要受预处理试剂和处理时间的影响，通过制片分析发现 6 种预处理方法均可以使王莲属 3 种植物根尖细胞停留在有丝分裂中期(图 1; 图 2)。

采用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉对王莲属三种植物根尖分别预处理 2 h、5 h 和 8 h，预处理 2 h 染色体长且相互重叠缠绕(图 1 A1~图 1 A3)；预处理 5 h 长度明显收缩，但还存在部分缠绕和粘连，不易于准确计数(图 1 B1~图 1 B3)；预处理 8 h 时染色体形态清晰、长度适中、分散良好(图 1 C1~图 1 C3)，综上所述，0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 8 h 效果最佳。

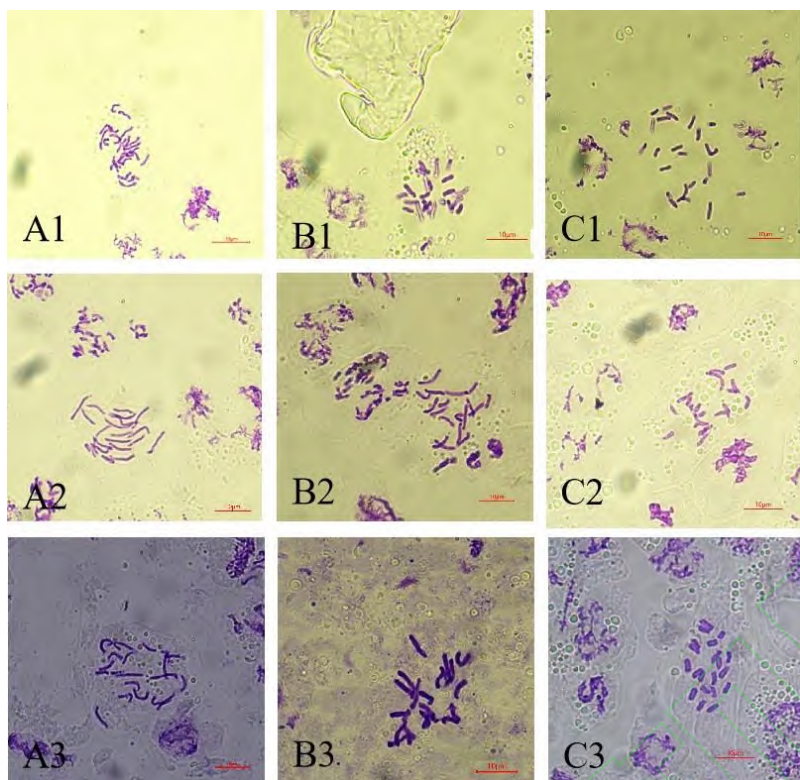


图 1 0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理不同时间的染色体分散情况(倍数: 10×100)

克鲁兹王莲预处理 2h (A1)、5h (B1)、8h (C1); 亚马逊王莲为 2h (A2)、5h (B2)、8h (C2); ‘追梦人’为 2h (A3)、5h (B3)、8h (C3)

Figure 1 Chromosomal dispersion of 0.002 mol/L 8-hydroxyquinoline pretreatment at different times (multiple: 10×100)

V. Cruziana Pretreatment for 2h (A1), 5h (B1), 8h (C1); *V. amazonica* was 2h (A2), 5h (B2), 8h (C2); *V. 'Dreamer'* was 2h (A3), 5h (B3), 8h (C3)

采用 20 mg/L 放线菌酮溶液对王莲属三种植物根尖分别预处理 2 h、5 h 和 8 h，预处理 2 h 染色体长且扭曲、重叠、缠绕严重(图 2 D1~D3); 预处理 5 h 时染色体长度明显收缩，形态清晰、长度适中、分散良好(图 2 E1~图 2 E3); 预处理 8 h 时染色体收缩过度，近似点状(图 2 F1~图 2 F3)，综上所述，20 mg/L 放线菌酮预处理 5 h 效果最佳。

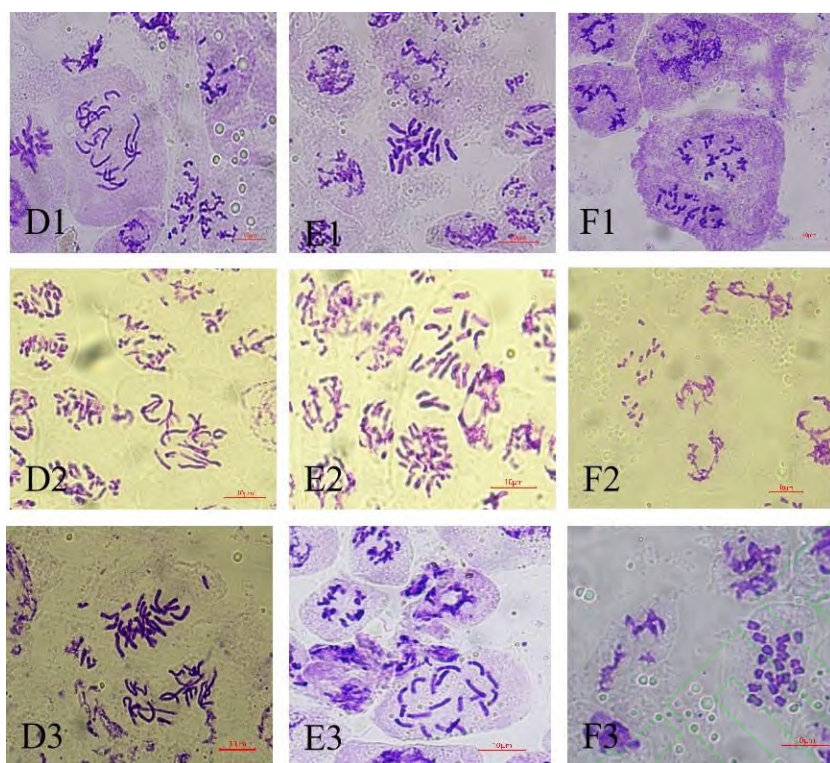


图 2 20 mg/L 放线菌酮预处理不同时间的染色体分散情况图(倍数: 10×100)

克鲁兹王莲预处理 2h (D1)、5h (E1)、8h (F1); 亚马逊王莲为 2h (D2)、5h (E2)、8h (F2); ‘追梦人’为 2h (D3)、5h (E3)、8h (F3)

Figure 2 Chromosomal dispersion of 20 mg/L actinomycin D at different treatment times (fold: 10×100)

Pretreatment *V. cruziana* for 2 h (D1), 5 h (E1), 8 h (F1); *V. amazonica* was 2 h (D2), 5 h (E2), 8 h (F2) ; *V. 'Dreamer'* was 2 h (D3), 5 h (E3), 8 h (F3)

1.3 不同染色剂染色效果分析

本试验采用改良苯酚染液和卡宝品红染液两种染色剂分别对王莲属三种植物细胞进行染色 8~10 min, 卡宝品红染液染色较浅且不均匀, 后期核型分析不能识别出完整的染色体(图 3G1~G3), 改良苯酚染液染色较深且比较均匀, 后期核型分析能识别出完整的染色体, (图 3 H1~H3)。

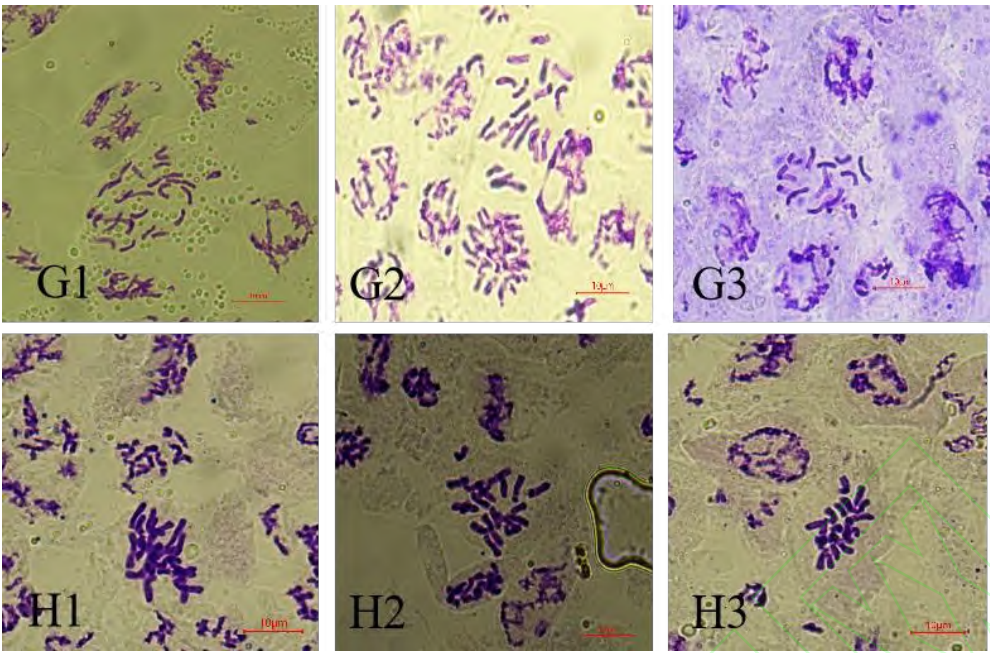


图 3 不同染色剂染色效果情况图(倍数: 10×100)

卡宝品红染液染色: 克鲁兹王莲(G1), 亚马逊王莲(G2), ‘追梦人’ (G3); 改良苯酚染液染色: 克鲁兹王莲(H1), 亚马逊王莲(H2), ‘追梦人’ (H3)

Figure 3 Map of staining effect of different chromosomes (fold: 10×100)

Carbo fuchsin dye solution: *V. cruziana* (G1), *V. amazonica* (G2), *V. 'Dreamer'* (G3); Modified phenol dye solution: *V. cruziana* (H1), *V. amazonica* (H2), *V. 'Dreamer'* (H3)

1.4 染色体计数

王莲属 3 种植物各选择 30 个形态良好、分散清晰的有丝分裂中期分裂相细胞进行计数(表 2), 统计分析表明: 克鲁兹王莲 $2n=24$ 、亚马逊王莲 $2n=20$ 、‘追梦人’ $2n=20$, 三种植物都未发现嵌合体变异和多倍体现象, 都属于二倍体植物。

表 2 三种供试材料的染色体数目

Table 2 Chromosomes number of three *Victoria* plants

	克鲁兹王莲 <i>V. cruziana</i>			亚马逊王莲 <i>V. amazonica</i>			‘追梦人’ <i>V. 'Dreamer'</i>	
染色体条数(条)	21	22	24	18	19	20	18	20

Number of chromosomes								
细胞个数(个)	2	2	26	2	1	27	1	19
Number of cells								
百分比(%)	6.6	6.6	84.6	6.6	3.3	90.0	3.3	96.7
Percentage (%)								

1.5 核型分析

核型分析时王莲属三种植物各选取 5 个细胞完整且处于有丝分裂中期、染色体长度适中、分散效果好的细胞染色体，求其平均值作为核型参数。

克鲁兹王莲 $2n=24$ 条，二倍体，其中中部型(m)染色体为有 15 条，近中部型(sm)染色体为 9 条，核型公式为 $2n=2x=15m+9sm$ ，染色体相对长度范围为 2.78%~6.14%，染色体相对长度组成 $2n=24=21M1+3S$ ，染色体的平均臂比为 1.52，染色体臂比范围为 1.08~2.15，最长染色体比最短染色体为 2.21，核型不对称系数为 60%，2B 核型(表 3; 表 4; 图 4 A)。

亚马逊王莲 $2n=20$ 条，二倍体，其中中部型(m)染色体为 15 条，近中部型(sm)染色体为 5 条，核型公式为 $2n=2x=15m+5sm$ ，染色体的相对长度范围为 3.02%~7.85%，染色体相对长度组成为 $2n=20=17M1+3S$ ，染色体的平均臂比为 1.48，染色体臂比变化范围 1.05~1.99，最长染色体比最短染色体为 2.60，核型不对称系数为 59%，1B 核型(表 3; 表 4; 图 4 B)。

‘追梦人’ $2n=20$ 条，二倍体，其中中部型 (m) 染色体为 7 条，近中部型(sm)染色体为 13 条，核型公式为 $2n=2x=7m+13sm$ ，染色体的相对长度范围为 3.04%~6.57%，染色体相对长度组成为 $2n=20=17M1+3S$ ，染色体的平均臂比为 1.87，最长染色体比最短染色体为 2.16，染色体臂比范围 1.32~1.96，核型不对称系数为 62%，1B 核型(表 3; 表 4; 图 4 C)。

表 3 王莲属 3 种植物的核型参数

Table 3 Karyotype parameters of three *Victoria* plants

名称	序号	相 对 长	臂 比	染 色 体 类 型	序号	相对长(%)	臂 比	染 色 体 类 型
Name	Number	(%)	Arm	Chromosomes	Number	Relative	Arm	Chromosomes
		Relative	radio	symmetry		length (%)	radio	symmetry
		length						
		(%)						
克鲁兹王莲	1	6.14	1.34	m	13	3.98	1.40	m
<i>V. cruziana</i>	2	5.57	1.26	m	14	3.89	1.30	m
	3	5.39	1.65	sm	15	3.66	1.63	sm
	4	5.31	1.63	sm	16	3.54	1.29	m
	5	5.15	2.15	sm	17	3.43	1.23	m
	6	4.97	1.49	m	18	3.42	1.09	m
	7	4.81	1.54	m	19	3.39	1.16	m
	8	4.70	1.98	sm	20	3.30	1.08	m
	9	4.53	1.89	sm	21	3.16	1.56	m
	10	4.44	1.88	sm	22	3.07	1.37	m
	11	4.21	1.51	m	23	2.90	1.71	sm
	12	4.14	1.40	m	24	2.78	1.97	sm
亚马逊王莲	1	7.85	4.79	m	11	4.87	2.91	m
<i>V. amazonica</i>	2	6.44	3.74	m	12	4.76	2.64	m
	3	6.09	4.01	sm	13	4.67	2.87	m
	4	5.93	3.29	m	14	4.58	2.84	sm

	5	5.71	3.68	sm	15	4.33	2.31	m
	6	5.56	3.17	m	16	4.07	2.44	m
	7	5.44	2.78	m	17	4.87	2.32	m
	8	5.42	3.57	sm	18	4.76	2.09	m
	9	5.30	2.82	m	19	4.67	2.09	m
	10	5.02	2.76	m	20	4.58	2.01	sm
‘追梦人’	1	6.57	1.96	sm	11	5.06	1.60	m
V. 'Dreamer'	2	6.28	1.81	sm	12	4.89	1.32	m
	3	6.10	1.77	sm	13	4.82	1.62	sm
	4	5.79	1.60	m	14	4.67	1.84	sm
	5	5.73	1.87	sm	15	4.57	1.58	m
	6	5.65	1.68	sm	16	4.28	1.69	sm
	7	5.53	1.73	sm	17	4.09	1.78	sm
	8	5.33	1.82	sm	18	3.84	1.36	m
	9	5.24	1.54	m	19	3.34	1.65	sm
	10	5.18	1.70	sm	20	3.04	1.53	m

表 4 王莲属 3 种植物的核型特征

Table 4 The karyotype characteristics of three *Victoria* plants

名称	核型公式	染色体相对长度组	相对长度范围(%)	平均臂比	最长 / 最短	核型不对称系数(%)	类型
Name	Karyotype formula	成	围(%)	比	最 短	系数(%)	Type
		Chromosome	Relative	Average	Lc/Sc	Index	of

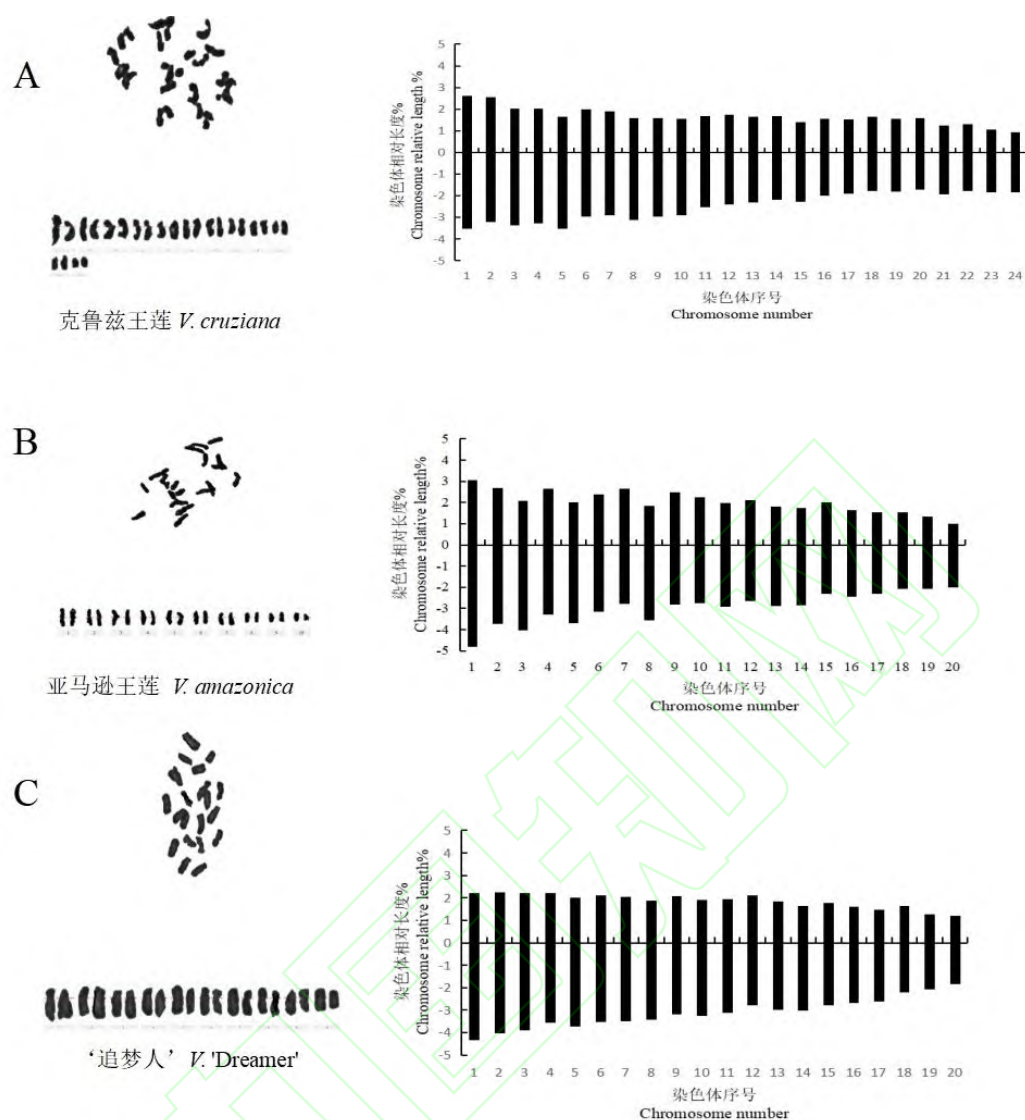


图 4 王莲属 3 种植物的染色体形态，染色体核型以及核型模式图

Figure 4 Chromosome morphology, karyotype and karyotype pattern of three *Victoria* plants

2 讨论

染色体核型分析的首要目标是制作出良好的染色体压片，标准的染色体压片需分散效果好且着丝点清晰(刘丹等, 2015)。染色体根尖压片制作过程中的各个步骤都会影响染色体制片的效果。由于根尖分生组织的细胞分裂较旺盛，取材较方便、不受季节影响，采用根尖制作染色体压片(李淑洁, 2020; 梁韶等, 2018)。不同植物根尖染色体的中期分裂相高峰期存在一定差异，番木瓜分裂高峰期为 9:00—10:00 (任鹏荣等, 2017)，迪庆百脉根(*Lotus corniculatus*)为 9:00—11:00 (鲁泽刚等, 2017)，田葛缕子(*Carum buriaticum*)为 10:00

—12:00 (马宏荣等, 2020), 本试验用根尖制作王莲染色体压片, 分裂高峰期为 9:00—10:30。此外不同植物适用的预处理方式不同, 铺地黍(*Panicum repens*)用 4 °C 冰水预处理 22 h (林晓璇等, 2021), 紫果西番莲(*Passiflora edulis*)用 0.1%秋水仙素和 0.002 mol/L 8-羟基喹啉等体积混合预处理 3 h (丰国蕊等, 2021), 普通油茶(*Camellia oleifera*)用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 5~6 h (叶天文等, 2020), 都能够获得分散良好、着丝点清晰的染色体细胞。本试验供试的三种材料在恒温 4 °C 下分别用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 8 h 和 20 mg/L 放线菌酮预处理 5 h 都能得到分散良好、着丝点清晰的染色体细胞。解离常用酸解法和酶解法, 但酸解法操作简便、成本低, 采用此方法的研究较多 (周翼虎等, 2014; 王乐乐等, 2022, 私人通信)。黄果龙葵 (*Solanum diphyllum*)最佳的解离是 1 mol/L HCl 在 60 °C 处理 7 min (王佳兴, 2020)。本试验也采用酸解法 1 mol/L HCl 在水浴 65 °C 解离 3~5 min。

染色体数目是染色体核型分析中最基本的参数, 植物细胞学对研究细胞结构具有重要意义, 其中细胞学特征中染色体数目和形态是最稳定的特征之一, 即染色体数目和形态。不同物种之间染色体大小以及核型都会有所不同(李瑜, 2010; 张籍元等, 2021)。睡莲科植物存在二倍体、三倍体、四倍体、六倍体、八倍体、十六倍体等 6 个倍性水平, 染色体数量为 16~224 不等, 其中二倍体和四倍体植物的染色体变化幅度较大(韦平等, 1994; Pellicer et al., 2013)。本试验中克鲁兹王莲的染色体数 $2n=24$ 的占 86.6%, 染色体 $2n=2x=24$, 亚马逊王莲的染色体数 $2n=20$ 的占 90.0%, 染色体 $2n=2x=20$, ‘追梦人’的染色体数目 $2n=20$ 的占 96.7%, 染色体 $2n=2x=20$ 。克鲁兹王莲和亚马逊王莲的研究结果与前人的研究结果一致, 追梦人首次研究。

核型分析是依据染色体的形态特征而进行的研究。核型分析可为细胞遗传分类、种间遗传关系和染色体重组研究提供重要依据(赵虎基等, 2000; 刘青等, 2022)。Stebbins (1971)按对称程度的高低将染色体核型分为 12 种类型, 高等植物核型是从对称性逐渐向着不对称性演化的一种趋势, 因此可以通过核型对称度来判断植物进化程度的高低, 染色体变异小的植物核型对称程度高, 进化程度低, 反之亦然。克鲁兹王莲染色体核型 $2n=2x=24=15m+9sm$, 核型不对称系数 60%, 2B 核型, 平均臂比为 1.52。亚马逊王莲

$2n=2x=20=15m+5sm$, 核型不对称系数 59%, 1B 核型, 平均臂比为 1.48。‘追梦人’ $2n=2x=20=15m+5sm$, 核型不对称系数 62%, 1B 核型, 平均臂比为 1.87。供试的三个材料, 进化程度都不高。但是克鲁兹王莲的结果与韦平和等人(1993)分析出的结果稍有不同, 因此有必要开展王莲更系统、更精确、更深入的核型研究, 为其优良品种选育和系统的分类方面提供更为可靠的细胞学依据。近年来, 荧光原位杂交等技术在重要的经济作物与模式植物禾本科、菊科、茄科、豆科等的核型分析中已广泛应用, 今后王莲染色体的精细结构可以通过构建多种原位杂交探针的方法来研究。

克鲁兹王莲、亚马逊王莲和‘追梦人’的染色体制片技术优化方案, 结果均表明: 最佳取材时间为上午 9:00—10:30; 分别以 0.002 mol/L 8-羟基喹啉和 20 mg/L 放线菌酮为预处理液恒温 4 °C 均能得到形态良好、收缩适中的高质量染色体制片, 其中 0.002 mol/L 8-羟基喹啉最佳预处理为 8 h, 20 mg/L 放线菌酮最佳预处理为 5 h; 最佳固定为卡诺固定液 I ($V_{95\% \text{ 无水乙醇}}:V_{\text{冰乙酸}}=3:1$) 在 4 °C 恒温固定 2~12 h; 最佳解离为 1 mol/L HCl 溶液 65 °C 水浴解离 3~5 min; 最佳染色为改良苯酚溶液染色 8~10 min。克鲁兹王莲核型公式为 $2n=2x=24=15m+9sm$, 核型不对称系数 60%, 2B 核型; 亚马逊王莲为 $2n=2x=20=15m+5sm$, 核型不对称系数 59%, 1B 核型; ‘追梦人’为 $2n=2x=20=7m+13sm$, 核型不对称系数 62%, 1B 核型, 供试的三个材料进化程度都不高。

3 材料与方法

3.1 试验材料

以王莲种子通过浸泡萌发所形成幼苗的根尖为试验材料, 其种子采自中国科学院西双版纳热带植物园水生植物园(E 101°25', N 21°41', 海拔 570 m)。

3.2 取材

采用浸泡法, 待种子萌发生根 2~5 cm 时, 于上午 8:30—12:00 进行取材, 切取根尖幼嫩部分 1.5~2 cm。

3.3 预处理

将切取下来根尖用无菌水清洗干净吸干水分后放入预先盛有预处理液(0.002 mol/L 8-羟基喹啉与 20

mg/L 放线菌酮)的离心管中，轻轻振荡后在 4 °C 冰箱内恒温，分别处理 2 h、5 h、8 h。

3.4 固定

用无菌水将预处理过的根尖放在培养皿中浸泡 2~3 min，后用无菌水反复冲洗 1~2 次，用卡诺固定液 I(V_{95%乙醇}: V_{冰乙酸}=3: 1)在 4 °C 冰箱中恒温固定 2~24 h。

3.5 低渗与解离

前低渗：用无菌水将固定过的根尖放在培养皿中浸泡 2~3 min，在用无菌水反复冲洗 1~2 次，后用 0.075 mol/L KCl 溶液前低渗 20~30 min；解离：用无菌水将前低渗过的根尖放在培养皿中浸泡 2~3 min，在用无菌水反复冲洗 1~2 次，后解离用 1 mol/L HCl 在 65 °C 恒温 3~5 min；后低渗：用无菌水将解离过的根尖放在培养皿中浸泡 2~3 min，后用无菌水反复冲洗 1~2 次，放入无菌水中后低渗 30 min。

3.6 染色与压片

染色：将根尖从培养皿中取出用滤纸吸干水分，置于载玻片上，用镊子夹住根尖生长区部位，用解剖刀划下根尖分生区部分，后用 2 μL 的移液枪吸取染色剂(卡包品红染液和改良苯酚染液)，滴一滴于根尖分生区上，染色 8~10 min；压片：常规压片，用橡皮擦把根尖分生区细胞敲散，压片时应保持均衡施力，先从周围慢慢向中间敲，尽量让细胞处于同一水平面。

3.7 染色体观察及图片采集

将制作好的根尖压片用光学显微镜观察，先从低倍镜(10×)、再到高倍镜(40×)、最后在油镜 (100×)下观察染色体数目完整、分散良好、清晰的染色体，进行拍片保存。

3.8 染色体数目及核型分析

根据李懋学和陈瑞阳(1985)的分析标准，确定染色体数目以及核型分析，从王莲属三中植物各统计 30 个能清楚计数且处于分裂中期的完整细胞，并从中选取 5 个进行自动核型分析，求其平均值作为核型分析参数。

3.9 数据分析方法

核型数据分析染色体相对长度系数参照参郭幸荣Kuo (1972)的计算方法；参照李愁学、陈瑞阳(1985)的分类标准进行分类方法；参照Levan (1964) 等人的命名方法进行命名；参照Arano (1963)的方法计算核型不对成称系数；参照Stebbins (1971)的标准进行核型分类；采用WPS Office进行数据统计分析。

作者贡献

邓鸟絮是本研究的实验设计者和实验研究的执行人，并完数据分析、论文结果分析与初稿写作；吴福川是本研究的构思者及负责人并指导论文设计、数据分析和论文书写；赵雁指导论文的书写和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由中国科学院西双版纳热带植物园普洱学院实习学生培养质量提升试点项目(Y8HX031B04)的支持。

参考文献

- Arano H., 1963, Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan IX. The karyotype analysis and phylogenic considerations on *pertya* and *ainsliaea* (2), *Shokubutsugaku Zasshi*, 76(895):32-39.
- Chang M.Y., Wu H.M., Li H.T., and Chen C.Y., 2014, Secondary metabolites from the leaves of *Victoria amazonica*, (*Chemistry of Natural Compounds*), 50 (5): 955-956.
- Feng G.R., Zhao L.h., Zhu Y.j., Tang J.R., Cai N.H., and Xu Y.L., 2021, Studies on chromosome preparation techniques of root-tip of *Passiflora edulia* Sims, *Shanxi Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition))*, 41 (3): 42-49. (丰国蕊, 赵李姗, 朱雅静, 唐军荣, 蔡年辉, 许玉兰, 2021, 紫果西番莲根尖染色体制片技术研究, 山西农业大学学报(自然科学版), 41 (3): 42-49.)
- He X.Z., and Guo D.L., 2009, Automatic karyotype analysis Technology and It application in plants, *Anhui Nongye Kexue (Anhui Agricultural Sciences)*, 37(31): 15129-15130. (何小周, 郭东林, 2009, 自动核型分析技术及其在植物中的应用, 安徽农业

科学, 37(31): 15129-15130.)

Huang S.C., and Wu F.C., 2018, *Victoria* secret of bearing capacity, *Huahui (Flowers)*, (3): 6-7. (黄仕才, 吴福川, 2018, 王莲能承重的秘密, 花卉, (3): 6-7.)

Huang X., Yan L., Jiang L.Y., Liu Y., Xiang G.F., and Tian X.M., 2016, Cultivation technique of *Victoria* in Changsha, *Hunan Linye Keji (Hunan Forestry Science and Technology)*, 43(1): 101-105. (黄秀, 颜立红, 蒋利媛, 刘艳, 向光锋, 田晓明, 2016, 王莲在长沙的引种栽培, 湖南林业科技, 43(1): 101-105.)

Kuo S.R., Wang T.T., and Huang T.C., 1972, Karyotype analysis of some Formosan gymnosperms, *Taiwania*, 17(1): 66-80.

Levan A., 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*, 52: 201-220.

Li A.H., Ye Y.Z., Ye R., and Wang P.P., 2013, Preliminary study on anatomical structure of reproductive organs and habits of *Bloommand Fructification of Victoria cruziana*, *Hubei Linye Keji (Hubei Forestry Science and Technology)*, (1): 14-17+91. (李爱华, 叶奕佐, 叶嵘, 王莘萍, 2013, 克鲁兹王莲繁殖器官的解剖结构和开花结实习性的初步研究, 湖北林业科技, (1): 14-17+91.)

Li M.X., and Chen R.Y., 1985, A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants, *Zhiwu Kexue Xuebao (Plant Science Journal)*, 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, 植物科学学报, 3(4): 297-302.)

Li S.J., 2020, An improved squash technique of barely root-tip and Its application, *Gansu Nongye Keji (Gansu Agricultural Science and Technology)*, (5): 32-35. (李淑洁, 2020, 一种改进的大麦根尖染色体压片法及其应用, 甘肃农业科技, (5): 32-35.)

Li S.J., Wei Q., Shang Y.D., Wu Y.P., and Liu A.C., 2017, Phenotype observation and analysis of *Victoria* Hybrid Progenies, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xubao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 18(5): 974-983. (李淑娟, 尉倩, 尚煜东, 吴永朋, 刘安成, 2017, 王莲(*Victoria*)杂交后代表型观察分析, 植物遗传资源学报, 18(5): 974-983.)

Li Y., Lin H.M., and Cheng W.D., 2010, Karyotype analysis of *Hedysarun polybotrys* Hands-Mazz, *Keji Daobao (Science and Technology Review)*, 28(1): 40-43. (李瑜, 蔺海明, 程卫东, 2010, 红芪染色体数目及核型分析, 科技导报, 28(1): 40-43.)

Liang S., Lei X.J., Song J., Hou Z.F., Yao L.N., Zheng H.Y., and Wang Y.P., 2018, Optimization of chromosome preparation

technique of different materials of *Panax ginseng*, Jilin Nongye Daxue Xuebao (Journal of Jilin Agricultural University), 40(5):

583-588+530. (梁韶, 雷秀娟, 宋娟, 侯志芳, 姚丽娜, 郑惠元, 王英平, 2018, 人参不同材料染色体制片技术优化, 吉林农业大学学报, 40(5): 583-588+530.)

Lin X.X., Chen L.J., Rong C.Y., Chen K.Q., and Gao G.J., 2021, Optimization of chromosome preparation and karyotype analysis of *Panicum repens*, Caoyuan Kexue (Pratacultural Science), 38(1): 89-98. (林晓璇, 陈林静, 容晨毓, 陈凯琪, 高桂娟, 2021, 铺地黍染色体制片优化及核型分析, 草业科学, 38(1): 89-98.)

Liu D., Xia X., Wu Y.M., Gu J.H., Tian Y.X., and Sun B., 2015, Analysis of influencing factors of plant chromosome sectioning effect, Zhejiang Nongye Kexue (Zhejiang Agricultural Sciences), (10): 1654-1657. (刘丹, 夏雪, 吴益梅, 辜金花, 田玉肖, 孙勃, 2015, 植物染色体制片效果影响因素的解析, 浙江农业科学, (10): 1654-1657.)

Liu Q., Pan H.Y., Huang J.L., and JOHN S. H. H., 2021, Research progress of molecular karyotypes of plant Xibei Nonglin Keji Daxue Xuebao (Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)), 50(2): 82-89. (刘青, 潘浩研, 黄家丽, 2021, 植物染色体分子核型技术研究进展, 西北农林科技大学学报(自然科学版), 50(2): 82-89.)

Lu Z.G., Li M.G., Li G.H., Zhao Y., Zhang J., and Bi Y.F., 2017, Optimization of chromosome sectioning and karyotype analysis of wild type *Lotus corniculatus* in Diqing, Xibu Linye Kexue (Western Forestry Science), 46(4): 101-106+120. (鲁泽刚, 李孟南, 李国华, 赵雁, 张杰, 毕玉芬, 2017, 迪庆野生型百脉根的染色体制片优化与核型分析, 西部林业科学, 46(4): 101-106+120.)

Ma H.R., Shen N.D., and Zhu H.Q., 2020, Pressing technology of root tip chromosome and karyotype analysis of *Carum buriatum*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 18(24): 8233-8239. (马宏荣, 沈宁东, 朱惠琴, 2020, 田葛缕子根尖染色体压片技术及核型分析, 分子植物育种, 18(24): 8233-8239.)

Pellicer J., Kelly L. J., and Magdalena C., 2013, Insights into the dynamics of genome size and chromosome evolution in the early diverging angiosperm lineage Nymphaeales (water lilies), (Genome), 56(8): 437-449.

Puchoa D., and Khoiratty S.U.S.S., 2004, Genomic DNA extraction from *Victoria amazonica*, (Plant molecular biology reporter),

22(2): 195-196.

- Ren P.R., Feng R.X., You K.Z., Li W.H., Zhang Y.C., Chen S.H., and Zhou C.Q., 2017, Study on chromosome pressing technique of papaya root tip, *Zhongguo Redai Nongye* (Chinese Tropical Agriculture), (4): 59-62. (任鹏荣, 冯瑞祥, 游恺哲, 李卫红, 张颖聪, 陈韶辉, 周常清, 2017, 番木瓜根尖染色体压片技术的研究, 中国热带农业, (4): 59-62.)
- Ren Q.F., Li S., Long C.C., Zhou Q., and Fang X.J., 2014, A preliminary report on the introduction and seedling cultivation of *Victoria cruziana* in Guizhou and suggestions for cultivation, *Beifang Yuanyi* (Northern Horticulture), (5): 62-64. (任启飞, 李飒, 龙成昌, 周庆, 房小晶, 2014, 克鲁兹王莲在贵州的引种育苗初报及栽培建议, 北方园艺, (5): 62-64.)
- Smith L.T., Magdalena Carlos P.N.A.S., Pérez E.O.A., Melgar G.D.G., Beck S., and Monro A.K., 2022, Revised species delimitation in the giant water lily genus *Victoria* (Nymphaeaceae) confirms a new species and has implications for its conservation, (*Frontiers in Plant Science*), 13: 883151-883151.
- Sônia M.R.O., and Robson R., 2011, Morfologia da flor, frutão e plântula de *Victoria amazonica* (Poepp.) J.C. Sowerby (Nymphaeaceae) Morphology of flower, fruit and seedling of *Victoria amazonica* (Poepp.) J.C. Sowerby (Nymphaeaceae), (*Acta Amazonica*), 41 (1): 21-28.
- Stebbins G.L., ed., 1971, Chromosomal evolution in higher plants, Edward Arnold Ltd., London, UK, pp. 85-104.
- Wang J X., 2020, Establishment of regeneration system and chromosome karyotype analysis of *Solanum diphyllum* L Master's thesis, Mudanjiang Normal University, Supervisor: Zong X.C., (王佳兴, 2020, 黄果龙葵再生体系的建立及染色体核型分析, 硕士学位论文, 牡丹江师范学院, 导师: 宗宪春)
- Wei P.H., Chen W.P., and Chen R.Y., 1993, Observation of chromosome number in nymphaeaceae, *Xinan Shifan Daxue Xuebao* (*Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*), (3): 52-55. (韦平和, 陈维培, 陈瑞阳, 1993, 睡莲科植物的染色体数目观察, 南京师大学报(自然科学版), (3): 52-55.)
- Wei P.H., Chen W.P., and Chen R.Y., 1994, Karyotype analysis and taxonomic position of nymphaeaceae, *Zhiwu Fenlei Xuebao* (*Acta Phytotaxonomica Sinica*), (4): 293-300+389-390. (韦平和, 陈维培, 陈瑞阳, 1994, 睡莲科的核型分析及其分类地位)

置的探讨, 植物分类学报, (4): 293-300+389-390.)

Wen G.Q., Ning J.N., Li J.D., and Yang W.S., 2003, Seedling and cultivation management of *Victoria*, *Zhongguo Huahui Yuanyi* (Chinese Flower and Horticulture), (16): 40. (文光琪, 宁家南, 李济东, 杨万嵩, 2003, 王莲的育苗和栽培管理, 中国花卉园艺, (16): 40.)

Yan S.L., An Y.L., Sun F., and Li S.C., 2008, Research Progress of karyotype analysis and chromosome, *Shengwu Jishu Tongbao* (Micro-dissection Technology), (4): 70-74. (闫素丽, 安玉麟, 孙瑞芬, 李素萍, 2008, 染色体核型分析及染色体显微分离技术研究进展, 生物技术通报, (4): 70-74.)

Yang M., Zhang L.H., Yang L., Li L., and Wu L.F., 2013, Study of lead stress on mitotic chromosome aberration of broad bean root tip, *Ningxia Nonglin Keji* (Ningxia A&F Science and Technology), 54(9): 58-59+71+2. (杨铭, 张利红, 杨丽, 李鹭, 吴丽芳, 2013, 铅胁迫对蚕豆根尖有丝分裂染色体畸变的研究, 宁夏农林科技, 54(9): 58-59+71+2.)

Yang N., Tan Y.X., Li Q.X., Jia L.Y., Chen X.L., and Liu X.R., 2012, Optimization of chromosome preparation and karyotype analysis of *Thymus mongolicus*, *Caoye Xuebao* (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.)

Ye T.W., Li Y.M., Zhang J., Gong Q.Y., Yuan D.Y., and Xiao S.X., 2020, Optimization of chromosome mounting technique and karyotype analysis of *Camellia oleifera*, *Nanjing Linye Daxue Xuebao* (Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)), 44(5): 93-99. (叶天文, 李艳民, 张健, 龚倩颖, 袁德义, 肖诗鑫, 2020, 普通油茶染色体制片技术优化及核型分析, 南京林业大学学报, (自然科学版), 44(5): 93-99.)

Zhao H. J., Le J.H., Li H.X., and Wei L.J., 2000, Studies on the relationship between karyotypes and varieties (lines) of watermelon, *Beifang Yuanyi* (Northern Horticulture), (1): 22-23. (赵虎基, 乐锦华, 李红霞, 魏凌基, 2000, 西瓜种染色体核型与品种(系)间亲缘关系研究, 北方园艺, (1): 22-23.)

Zhou Q.Y., Fu D.Z., and Jin X.B., 2006, Floral biology of *Victoria cruziana* (Nymphaeaceae), *Xibei Zhiwu Xuebao* (Acta Botanica Borealiu Northwest), (8): 1526-1533 (周庆源, 傅德志, 靳晓白, 2006, 克鲁兹王莲(睡莲科)的开花生物学研究, 西北植物

学报, (8): 1526-1533.)

Zhou Y.H., Huo X.W., Liu X.Y., Tai L.H., Miao H.Q., and Zhang L.C., 2014, Optimization of chromosome preparation technology of

Dioscorea opposita Thunb, *Zhongguo Yuanyi Wenzhai* (Chinese Horticultural Abstracts), 30(8): 7-10+208. (周翼虎, 霍秀文,

刘向宇, 邵丽华, 苗慧琴, 张灵超, 2014, 山药染色体制片技术的优化, *中国园艺文摘*, 30(8): 7-10+208.)

