

改进的植物染色体制片方法

陈高^{1,2}, 孙航¹, 孙卫邦^{1,*}

¹中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204; ²中国科学院研究生院, 北京 100039

Improved Method for Observation of Chromosome in Plant

CHEN Gao^{1,2}, SUN Hang¹, SUN Wei-Bang^{1,*}

¹Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; ²Graduate College, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘要: 文章以外来物种肿柄菊和濒危物种三棱栎的根尖和茎尖为材料, 改进植物染色体制片技术的结果表明: 改进后的方法能明显提高植物染色体制片的质量和所需目的细胞的获得率。

关键词: 染色体制片; 肿柄菊; 三棱栎

染色体制片是指显示染色体形态和结构的技术, 目前常用的技术有两种, 即压片技术和去壁低渗火焰干燥技术(李懋学和张敦方 1991; 李懋学和张赞平 1996)。前者操作简便, 但在处理某些细胞壁较硬和难以软化的材料时, 不易获得良好的压片; 后者虽然制片效果较好, 但操作过程需要严格控制实验条件, 较为繁琐。改进后的技术在结合二者优点的同时对材料处理做了较大改动, 现介绍如下。

材料与方法

1 材料来源

肿柄菊(*Tithonia diversifolia* (Hemsely) A. Gray) 种子采自云南思茅, 三棱栎(*Trigonobalanus doichangensis* (A. Camus) Forman) 种子采自云南西蒙, 肿柄菊和三棱栎的茎尖采自昆明植物园苗圃, 凭证标本存放于昆明植物所植物园。

2 操作方法

2.1 材料制备 肿柄菊和三棱栎种子滤纸培养让其根长至 10~15 mm 后在解剖镜下取根尖 3~8 mm 并用解剖刀将根尖表面进行轻微划伤处理。肿柄菊和三棱栎茎尖取自生长旺盛的栽培植株, 在解剖镜下用解剖刀和镊子将茎尖分生组织(包括部分叶原基)剥离出来并去掉被毛, 同样进行轻微划伤处理, 然后将处理好的两部分材料用蒸馏水浸泡活化 5~10 min。

2.2 预处理 将浸泡后的肿柄菊和三棱栎的细胞学材料用 0.05% 的秋水仙素混合液($V_{\text{秋水仙素溶液}}$:

$V_{\text{二甲基亚砜}}=100:1$) 分别处理 2.5 和 1.5 h。

2.3 固定 将预处理后的根尖和茎尖用卡诺氏 I 固定液在 4℃ 的冰箱中固定 1~2 h。

2.4 解离和染色 固定后的根尖和茎尖用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸在 60℃ 的水浴锅中解离 1~3 min, 水洗 10~15 min 后将根尖和茎尖分别转入到卡宝品红中染色 1~2 h。如果材料较为坚硬, 取出后的材料也可用蒸馏水洗约 10 min 后用 1% 的纤维素酶和果胶酶混合液于 37℃ 恒温中酶解 0.5~1 h, 然后以水洗酶液、卡诺氏 I 固定约 10 min, 再以卡宝品红染色。

2.5 压片 解剖镜下剥离根冠, 同时沿取材时划伤处剥除根尖表皮, 挑出根尖端半透明果胶状分生组织, 解剖镜下分离茎尖分生组织, 然后将材料进行压片处理。或将处理好的根尖和茎尖组织放到二孔凹槽中用玻棒混合卡宝品红染液将材料捣碎, 然后用少量 45% 的醋酸溶液处理细胞液 2~3 min。在进行根尖和茎尖材料染色体制片时, 先用滤纸吸掉盖片周围多余的染液, 然后将干净的滤纸放在盖片上, 用玻棒沿盖片对角线来回擀动, 其间注意要用力均匀, 并由轻到重。

2.6 永久封片 液氮冷冻后用刀片将盖片和载片分离, 分别干燥后用“光学树脂胶”进行封片处理。

收稿 2007-03-15 修定 2007-06-22

* 通讯作者(E-mail: wbsun@mail.kib.ac.cn; Tel: 0871-5223622)。

结果与讨论

按照上述方法制得的肿柄菊和三棱栎根尖、茎尖染色体图见图1;按常规植物染色体方法制片过程中出现的情况见图2。

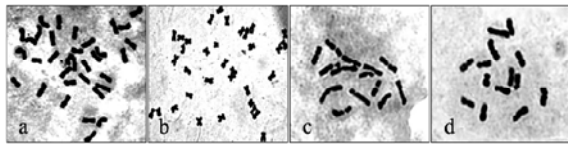


图1 肿柄菊和三棱栎根尖、茎尖染色体图

a: 肿柄菊根尖 $2n=34$; b: 肿柄菊茎尖 $2n=34$; c: 三棱栎根尖 $2n=14$; d: 三棱栎茎尖 $2n=14$ 。

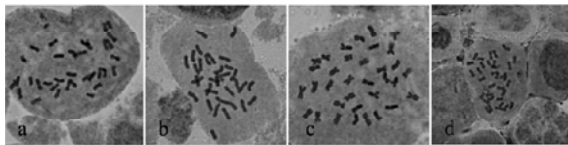


图2 常规方法制片容易出现的问题

材料为肿柄菊。a: 染色体不在同一平面上, 不容易分开; b: 染色体分开较好, 且在同一平面上, 但易发生重叠; c: 染色体分开, 但不在同一平面上; d: 细胞没有分散开, 染色体发生重叠, 且不在同一平面上。

按常规方法进行植物染色体制片通常是直接将植株的根尖和茎尖取下放入预处理液中处理。本文中的改进之处是:(1)在解剖镜下能更准确地取材, 并将材料进行划伤处理、去除被毛、用蒸馏水浸泡活化植物组织, 这些措施都有助于秋水仙素进入到受处理的材料中。同时, 此法在预处理液中加入有提高细胞壁透性的化学试剂二甲基亚砜(DMSO)能明显促进秋水仙素对材料的效应, 增加预处理的效果, 最终可提高中期细胞的获得率。(2)盐酸溶液能解离细胞壁之间的果胶物质及部分细胞质, 酶溶液能分解细胞壁。在处理较坚硬的材料时, 将盐酸和酶结合使用既可以扩大处理材料的范围, 又可以简化酶处理过程, 能更好地发挥二者的效果, 充分软化分散细胞。此外, 染色体预先染色后还可增加自身的强度和对酶解的抵抗力。(3)材料解离后, 由于根冠和根尖其他部

分细胞性质不同, 两者容易分离, 这样可以轻易地将根冠剥除。此外, 从预处理划伤处也容易用镊子将根尖表皮剥除下来, 得到质地柔软的半透明果胶状分生组织, 易于后期制片。

常规的植物染色体压片过程是直接取植株的根尖或茎尖取下进行压片处理。本文中的改进法既可以将处理好了的柔软根尖和茎尖组织直接进行压片处理, 还可将处理好了的材料放到二孔凹槽中用玻棒混合卡宝品红染液将材料捣碎, 这样能更好地分散分生组织细胞, 制得质量优良的染色体玻片。此外, 改进法可摒弃常规法中用手指压片后再用解剖针敲击来分散染色体并使其处于同一平面上。采用隔着滤纸用玻棒沿盖片对角线来回擀动盖片的方法来分散染色体, 可以使盖片受力更均匀, 能更好地让染色体分散并处于同一平面上, 减少不能压片, 重叠和不容易分散等问题, 这对染色体较小和数目较多的植物进行核型和记数分析时更有效, 同时还可以防止盖片被压碎。

总之, 采用本文中的改进法在优化前期处理条件的同时既可以降低染色体不在同一平面、不容易分散和容易发生重叠的问题, 还可明显提高目的细胞的获得率。通过比较 10×4 光学显微镜下单位视野中的目的细胞的数目表明: 改进法获得目的细胞的数目大约是常规法获得目的细胞数目的 2~6 倍。

最后, 本文中的改进法用茎尖获得良好的制片, 不仅可以将此法用于难以得到种子的植物中(如杂交育种和多倍体育种的鉴定等), 还可以消除野外取材时受到季节变化的限制(分裂的茎尖材料比种子材料容易获得)。从我们研究的 20 多种植物材料来看, 本文中的改进法对用其他能进行细胞分裂的植物器官或组织(茎尖、幼叶、非离体材料等)作染色体分析也是行之有效的。

参考文献

- 李懋学, 张敦方(1991). 植物染色体研究技术. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1~53
李懋学, 张赞平(1996). 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1~40