

## 草莓花药苗染色体观察方法及数目变异的研究

韩雪梅 王艳 任吉君

(中科院黑龙江农业现代化研究所·哈尔滨)

**第一作者简介:** 韩雪梅, 副研究员, 1945年生, 吉林梨树人, 1968年毕业于东北农业大学园艺专业。70年代从事食用菌科研与生产工作。自1983年以来主持园艺作物的组织培养研究工作。其中主持研究的提高草莓花药再生植株诱导率的研究成果达到了国际领先水平。“九·五”期间又主持了省科委的生物技术攻关课题。

**摘要** 筛选了观察草莓花药苗染色体数目最佳方法和观察草莓花药苗染色体数目发生变异的情况。结果表明: 用加 $\alpha$ -溴萘的对二氯苯饱和液处理根尖, 再用铁矾-苏木精染色4小时以上的染色体计数效果好。利用这种方法我们观察了栽培种草莓 lateglow 的母本染色体数为  $2n=8x=56$ , 而花药再生植株的染色体数目变异很大。观察20个株系其中  $n=4x=28$  的3个株系,  $5x=35$  的2个株系,  $6x=42$  的4个株系, 其余的皆为混倍体。

**关键词:** 草莓花药 再生植株 染色体 变异

从理论上讲, 通过花药培养途径诱导出的再生植株, 可能是由花粉发育而来的单倍体植株, 也可能是由药壁或药隔诱导成的二倍体植株。本试验目的是通过草莓花药再生植株染色体数目的观察与分析, 确认各再生株系是由花粉还是由药隔或药壁发育而来, 进而确定再生植株染色体倍数, 为利用生物技术育种提供依据。

**试验方法与结果。** 供试材料: 1. 母株品种: Lateglow 代号  $S_4$  2. 花药苗: 代号  $S_4$  中<sub>1</sub>,  $S_4$  中<sub>2</sub>,  $S_4$  中<sub>3</sub>,

$S_4$  中<sub>4</sub>,  $S_4$  中<sub>5</sub>,  $S_4$  中<sub>6</sub>,  $S_4 中<sub>7</sub>,  $S_4$  中<sub>8</sub>,  $S_4$  中<sub>9</sub>,  $S_4$  中<sub>10</sub>,  $S_4$  中<sub>11</sub>,  $S_4$  中<sub>12</sub>,  $S_4$  中<sub>13</sub>,  $S_4$  中<sub>14</sub>,  $S_4$  中<sub>15</sub>,  $S_4$  中<sub>16</sub>,  $S_4$  中<sub>17</sub>,  $S_4$  中<sub>18</sub>,  $S_4$  中<sub>19</sub>,  $S_4$  中<sub>20</sub>,  $S_4$  中<sub>21</sub>,  $S_4$  中<sub>22</sub> 共20个株系。$

(一) 筛选观察草莓花药苗染色体数目最佳方法:

常规压片技术中, 由于作物不同, 处理的方法各异, 经过多次实验我们认为, 草莓取材的最佳时间为早9点~9点30分, 特别是雨后第二天晴天的上午根尖中细胞分裂相最多。预处理后的根尖用卡诺液(冰醋酸: 纯酒精=1: 3V/V)固定, 处理时间为2~24hr效果均可。我们针对以下三个关键环节在保证其它操作方法相同的条件下, 分别进行了筛选, 其试验内容如下:

1. 预处理药品的筛选试验。供筛选的药品有: 对二氯苯饱和水溶液、8-羟基喹啉、秋水仙素、加有 $\alpha$ -溴萘的对二氯苯饱和水溶液四种。供试验用的草莓苗是  $S_4$  母本苗。经过预处理药品效果对比试验(见表1)。从试验结果看, 对二氯苯饱和液与加 $\alpha$ -溴萘的对二氯苯饱和液的预处理效果较好。前者处理时间比较自由, 在 $\alpha$ -20小时之间效果都很好。而加 $\alpha$ -溴萘后, 可获得显著缩短的染色体, 特别适用于染色体计数。

表1 预处理药品筛选试验结果

对比项目 药品名称	浓度	处理 时间	分裂相	染色体 长短	分辨 能力	分散 效果	拍片 效果
对二氯苯	饱和	2hr	多	短	清晰	好	好
加 $\alpha$ -溴萘 对二氯苯	饱和	4hr	多	短(点状)	清晰	好	好
8-羟基喹啉	0.003M	3.5hr	多多	短	略差	密集	不好
秋水仙素	0.1%	2hr	多	略长	差	团状	不好

2. 解离时间的确定试验。供试材料: 花药苗  $S_4$  中<sub>3</sub> 的试管苗根尖和茎尖、露地栽培的  $S_4$  中<sub>3</sub> 根尖三种。方法: 采用盐酸水解法对固定后的试材进行解离。用1N盐酸在水浴箱内恒温60 $^{\circ}$ C条件下处理, 处理时

间分别为 5 分钟、10 分钟、15 分钟三种, 对比试验结果见表 2 试验结果说明: 解离时间与取材部位、生长环境有关。对于试管苗的根尖和茎尖以 15 分钟处理为宜, 而大地苗根尖则以 10 分钟的处理为宜。此外由于茎尖在处理前不可能将生长点外部的叶片全部剥净, 因此解离时间略长。

分散情况 处理部位	解离时间	5 分钟	10 分钟	15 分钟
试管苗根尖		细胞不分散	细胞分散不好	细胞分散好
大地苗根尖		细胞分散不好	细胞分散好	部分细胞破碎
试管苗茎尖		细胞不分散	细胞分散不好	细胞分散好

项目 染色剂	处理时间	分色	染色体与细胞质着色对比
铁矾—苏木精	4hr 以上	45% 醋酸	对比度大, 可供拍片
碱性品红	立即观察	/	对比度小, 可观察, 不易拍片
碱性品红	12hr 以上	/	对比度大, 可供拍片
醋酸洋红	立即观察	/	对比度小, 可观察, 不易拍片

注: 1N 盐酸解离 10 分钟

细胞数 类别 种	染色体数目 (个)							同一根尖中可计数的细胞个数
	8 <sub>x</sub>	7 <sub>x</sub>	6 <sub>x</sub>	5 <sub>x</sub>	4 <sub>x</sub>	3 <sub>x</sub>	2 <sub>x</sub>	
	56	49	42	35	28	21	14	
花药再生植株	S <sub>4</sub> 中 <sub>1</sub>			3				3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>2</sub>	1		1	1	2		6
	S <sub>4</sub> 中 <sub>3</sub>			1		2		3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>4</sub>			4				4
	S <sub>4</sub> 中 <sub>7</sub>	1		2		1		4
	S <sub>4</sub> 中 <sub>8</sub>			3				3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>9</sub>			2				2
	S <sub>4</sub> 中 <sub>10</sub>				4			4
	S <sub>4</sub> 中 <sub>11</sub>			3				3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>12</sub>			1	1			2
	S <sub>4</sub> 中 <sub>13</sub>			4	2	1		7
	S <sub>4</sub> 中 <sub>14</sub>					2		2
	S <sub>4</sub> 中 <sub>15</sub>				3			3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>16</sub>					6		6
	S <sub>4</sub> 中 <sub>17</sub>		1			4		5
	S <sub>4</sub> 中 <sub>18</sub>			2		1		4
	S <sub>4</sub> 中 <sub>19</sub>						2	3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>20</sub>			1	1			2
	S <sub>4</sub> 中 <sub>21</sub>					3		3
	S <sub>4</sub> 中 <sub>22</sub>	1	1					2
	S <sub>4</sub> 母本	5						5

3 几种染色剂染色效果的对比试验。供试材料: 铁矾—苏木精、碱性品红、醋酸洋红三种染色剂。种苗 S<sub>4</sub> 中, 露地苗。经染色效果对比试验, 结果见表 3 从试验结果看, 染色效果以铁矾—苏木精最佳。如果染色时间加长, 染色体颜色就会加深, 用 45% 醋酸分色软

化 1 小时左右, 染色体与细胞质着色程度对比度也加大, 拍片效果也好。

综上所述, 我们认为适宜草莓花药苗根尖染色体观察的方法可归纳如下: 上午 (9 点~ 9 点半) 取带新根的草莓苗→经自来水冲洗干净后取白嫩根尖 (1~ 1.5cm)→1.5cm 溶液浸泡 20 分钟→对二氯苯饱和水溶液如果计数可加入 α—溴萘一滴) 处理 2hr 以上→自来水冲洗 10 分钟→卡诺液固定 2hr 以上→自来水冲洗 10 分钟→1N 盐酸 60± ℃条件下解离 10 分钟 (试管苗 15 分钟)→自来水冲洗 10 分钟→硫酸铁铵媒染在 30~ 40℃下, 1hr→自来水冲洗 5 次, 约 30 分钟, 最后用蒸馏水冲洗一次 (冲洗干净)→苏木精染色 4hr 以上→45% 醋酸分色软化 1hr 左右→切取根尖 1~ 1.5mm 放载玻片上, 加一滴 45% 的醋酸, 放上盖玻片压片 (适当敲击使染色体分散均匀)→镜检 (显微摄影)

### (二) 草莓花药苗根尖染色体数目的观察

在草莓 S<sub>4</sub> 母本苗和 20 个株系的花药苗中, 随机各取 5 株带新根的苗, 取根尖染色处理, 并进行染色体数目观察。对其中有代表性的根尖观察统计与拍片, 从统计结果 (表 4) 看到花药苗染色体数有变异发生。

结论与分析。综合上述试验、观察、统计结果, 可得结论为:

1. 经过大量观察, 确定花药苗母本品种 S<sub>4</sub> 的染色体数为 2n= 8x= 56 条。

2. 从大量根尖中观察到 S<sub>4</sub> 各株系花药苗的染色体既存在纯 6<sub>x</sub> 5<sub>x</sub> 4<sub>x</sub> (n= 4x= 28), 同时也看到在同一根尖中同时存在着有不同倍数染色体的多种细胞混合现象。以此可推断: (1) S<sub>4</sub> 的各株系花药苗均由花粉发育而来。(2) 由于草莓 Latéglow 母株染色体数是 2n= 8x= 56 属于同源多倍体植株, 因此在花粉母细胞减数分裂时, 各同源染色体的配对往往很不规则, 致使多数配子含有的染色体数很不正常。加之在花药培养过程中激素的种类和水平也可能对再生植株染色体数目造成影响。因而再生植株中有从 2x→ 8x 的各种不同倍数的染色体组数目变异现象发生。(3) 从在同一根尖中同时观察到有不同倍数染色体的多种细胞的现象中, 我们认为草莓花药苗染色体有自然加倍趋于稳定的可能性。这与 Rosati 得出的结论: “草莓花药苗生长过程中存在着自然加倍现象。”相吻合。

3. 草莓花药再生植株中染色体数目变异的多样性, 为育种提供了丰富的试验材料。这一点已在我们的生物技术培育草莓新品种研究中得到了证实。(参考文献 2 篇略 邮编: 150046)