

# 植物细胞有丝分裂实验条件优化

黄永莲

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

**摘要:** 结合生物学实验教学, 对植物细胞有丝分裂实验的取材、预处理条件、染料以及染色方法选择进行了比较研究。结果表明: 选用洋葱根尖作为试材; 材料预处理选用 4℃低温预处理 24~36 h; 选择 Schiff 试剂作为染料; 用 Feulgen 染色法染色为观察植物细胞有丝分裂实验最优化的条件。

**关键词:** 有丝分裂; 预处理; 条件; 优化

**中图分类号:** Q 942.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0129-04

植物细胞有丝分裂实验是生物学实验教学的一个重要内容。目前在对材料选择、预处理条件、染料及染色方法选择上进行了研究报道。没有对整个实验条件的系统研究报道, 现结合实验教学, 选最常用的洋葱、大蒜为材料, 对试验取材、预处理条件、染料以及染色方法的选择进行了系统的研究, 为生物学实验教学提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

洋葱和大蒜鳞茎从市场购买。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 洋葱和大蒜根尖的培养** 取新鲜大蒜和洋葱的鳞茎, 剥去外层干枯的鳞片, 切去残余老根。大蒜按瓣取材, 洋葱则按鳞茎取材。按照水培法生根, 将材料分别放在装有清水的烧杯上(杯中清水刚好浸到鳞茎盘为宜), 置 25℃的培养箱中培养, 每天上午 8:00 左右换水 1 次, 4 d 左右即能生出 2~3 cm 长的幼根。

**1.2.2 洋葱和大蒜根尖的预处理** 选用目前效果最佳的秋水仙素处理和低温处理。秋水仙素处理: 用 0.05%、0.1%、0.2% 的秋水仙素溶液于室温下处理离体洋葱和大蒜根尖数小时, 再置于卡诺固定液中固定 0.5 h, 放入 70% 的酒精中, 置于 4℃ 的冰箱保存备用。低温处理: 将离体洋葱和大蒜根尖置于蒸馏水中, 放在 4℃ 冰箱内处理数小时, 再置于卡诺固定液中固定 0.5 h, 放入 70% 的酒精中, 置于 4℃ 的冰箱保存备用。对照离体的洋葱和大蒜根尖不作任何处理, 直接置于卡诺固定液中固定

0.5 h, 放入 70% 的酒精中, 置于 4℃ 的冰箱保存数小时备用。

**1.2.3 染料及染色法的选择** 用 Schiff 试剂和改良碱性品红作为染料; 选择 Feulgen 染色法对 2 种染料染色效果进行比较。参考文献[1] 方法。从 70% 乙醇中取出根尖 3~5 条, 用蒸馏水冲洗 2 次; 放入 2 mL 离心管, 加 1.4 mL 左右的 1 mol/L HCl 在 60℃ 的水浴锅中水解(洋葱水解 8~10 min, 大蒜 6~8 min); 取出后再用蒸馏水冲洗 2~3 次, 洗去残留在根尖上的 HCl 解析液; 置载玻片并滴加 Schiff 试剂染色 15~20 min; 用亚硫酸漂洗液漂洗 3 次(每次 1 min), 再水洗 1 次; 最后按常规方法压片, 显微镜下观察、拍照。统计有丝分裂时期的细胞数目, 计算有丝分裂指数(有丝分裂指数=视野中有丝分裂的细胞数目/视野中观察到的细胞总数目×100%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 染色效果对比

染色效果的对比见图 1。

### 2.2 试验材料对试验效果的影响

从图 1 可看出, 洋葱染色体比大蒜粗, 染色后在显微镜下容易观察, 洋葱根尖比大蒜根尖肥大、笔直, 易于操作, 在压片时把根尖撕开两半很容易压成单细胞层。大蒜虽然比洋葱生根率高, 但实验过程中较洋葱不易操作, 市场上现价洋葱 3 元/kg, 大蒜 9 元/kg, 从经济角度来看, 大蒜的实验成本不比洋葱低。用小麦、蚕豆做试材效果更差。因此, 洋葱是该实验的最佳选择。

### 2.3 染料对实验效果的影响

孚尔根染色法自发明以来的 60 余年里, 在世界范围内被公认为是最好的鉴定核酸 DNA 的细胞化学方法。Feulgen 染色显示 DNA 的特异性在于 DNA 键可被酸水解断开暴露出醛基, 醛基的还原作用与 Schiff 试剂中失去颜色的无色品红结合形成醌型结构(紫红色化

**作者简介:** 黄永莲(1962-), 女, 土家族, 实验师, 现从事生物学实验技术研究工作。E-mail: swxhyl@163.com。

**基金项目:** 广东省科技计划资助项目(2006B20101011); 湛江市科技攻关资助项目(2008C08022)。

**收稿日期:** 2010-03-11

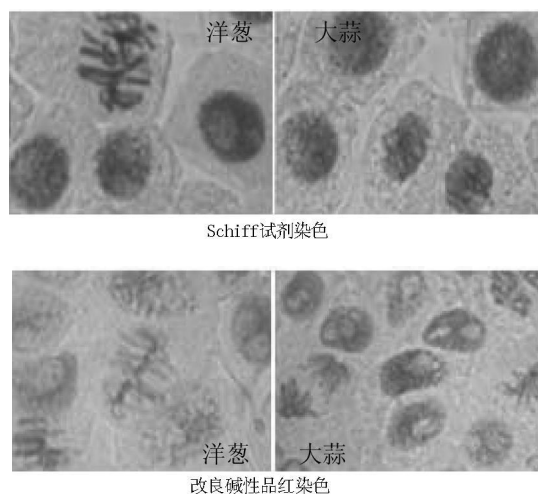


图 1 2 种染料对洋葱、大蒜染色效果显微图

合物<sup>[12]</sup>。孚尔根染色法的优点是通常只对细胞核和染色体着色,染色均匀一致,染色体与其背景形成的反差较大,易于观察细胞的有丝分裂,比较适合显微摄影。缺点:(1)染色体经过染色后,由于染色时间较长, Schiff 试剂中所含的盐酸往往使其过度软化,所以在压片时应注意力度。(2)水解条件要严格控制,温度应在  $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$  范围内,因为温度过高或时间过长会造成水解浓度、糖和醛基间的键破坏过大,醛基流失到水解液中,则染色体不均匀,着色稍深,而细胞质着色或者出现大小不等的红色小粒;反之,染色体着色浅淡,细胞质中可能有其它醛基存在,而呈现扩散的颜色。只有水解合适,才能使染色体着色较深,而细胞质浅着色或不显示任何颜色。改良碱性品红染色颜色暗,观察不清晰,特别是对染色体较小的植物在有丝分裂间期显微摄像效果不理想。而其它染液如:龙胆紫染液,苏木精染液,卡宝品红染液,醋酸洋红染液其染色时间较长,过程较复杂<sup>[3]</sup>。

#### 2.4 实验材料的预处理对实验效果的影响

在实验中,观察染色体形态和统计染色体数目需要较多的中期分裂相细胞,因此必须对植物材料进行预处理。预处理可以改变细胞质的粘度,使染色体适度缩短,并有利于分散,促进细胞有丝分裂<sup>[4]</sup>。低温预处理和化学药剂预处理是常用的 2 种预处理方法,该实验就最常用的秋水仙素处理和低温处理进行综合比较,对 2006 级生物专业学生实验课程教学的实验数据进行统计,共 179 人,分成 2 大组,分别观察 2 种材料用秋水仙素和低温 2 种预处理的细胞有丝分裂状况,统计有丝分裂指数,以得出最佳预处理方案。

秋水仙素预处理。秋水仙素(Colchicine)是一种生物碱,因最初从百合科植物秋水仙(*Colchicum autumnale*)

中提取出来,故名秋水仙素,分子式  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}$ 。味苦,有毒。在农业领域,秋水仙素常用于多倍体诱变育种。秋水仙素能抑制微管的组装,使已有的微管解聚,从而阻止纺锤体的形成或破坏已形成的纺锤体,使细胞的染色体加倍而不分离。当细胞进行分裂时,一方面能使染色体的着丝点延迟分裂,于是已复制的染色体 3 条单体分离,而着丝点仍连在一起,形成“X”形染色体图象(称为 C—有丝分裂,即秋水仙效应有丝分裂)。秋水仙素作为预处理剂,其主要作用有二方面:其一是抑制微管蛋白组装成纺锤丝,但并不抑制前期的细胞分裂,因此凡进入中期的染色体均被阻而不能进入分裂后期,这样便可以积累大量处于分裂中期的染色体;其二是它可以使染色体缩短变直,便于染色体分散和计数<sup>[5]</sup>。用 0.05%、0.1%、0.2% 的秋水仙素处理后,洋葱根尖有丝分裂指数明显高于对照组,说明这几种浓度的秋水仙素对细胞进入分裂期有明显的促进作用。但随着处理时间的增长,可以看到秋水仙素对有丝分裂有抑制作用,甚至使细胞分裂完全停止。秋水仙素在洋葱细胞分裂中期的时候,由于破坏了细胞中微管的组装,阻止了纺锤体的正常形成。秋水仙素使细胞在分裂中期滞留,而间期的细胞继续进入分裂期,从而使细胞分裂指数增加<sup>[6]</sup>。随着处理时间的延长,洋葱根尖细胞的分裂指数又不断下降,说明滞留在分裂中期的细胞继续分裂,进入间期,在间期由于受到秋水仙素的抑制而使细胞难以再进入正常的分裂期。0.2% 浓度的秋水仙素的细胞分裂指数比对照组的低,说明该浓度的秋水仙素对洋葱根尖有较高的毒害作用,从而抑制了细胞的有丝分裂。黄永莲等对秋水仙素处理洋葱的最佳时间进行了研究,研究表明,处理 12 h 洋葱根尖细胞有丝分裂指数最高<sup>[7]</sup>。该研究直接处理 12 h,对处理时间不再研究。对 90 人用不同浓度秋水仙素预处理 12 h 的数据进行统计,计算有丝分裂平均分裂指数,见表 1。结果表明,不同浓度的秋水仙素对洋葱和大蒜根尖细胞有丝分裂指数的影响,在试验的 3 个浓度组(0.05%、0.1%和 0.2%)中,以 0.05% 的秋水仙素为最佳浓度,处理洋葱和大蒜根尖 12 h,有丝分裂指数达到最高,为对照的 4 倍左右,随浓度升高或随处理时间延长,有丝分裂指数均呈现下降趋势,见图 2。

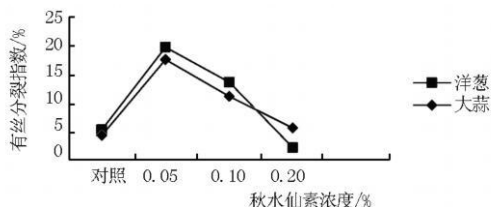


图 2 秋水仙素处理对有丝分裂指数的影响

低温预处理,常用的观察有丝分裂的材料对微管的装配对温度十分敏感,通常在4℃的低温下发生解离,解聚为二聚体,从而使染色体不能向两极移动。造成有丝分裂过程停留在中期,并积累大量的中期分裂细胞<sup>[8]</sup>,因此,低温预处理是植物细胞染色体制片的一种处理方法。对89名学生试验结果进行统计,计算出细胞有丝分裂平均指数,见表2。

由图3可知,低温处理也能够极显著地提高洋葱根尖有丝分裂指数。与对照相比,12 h低温预处理与对照的差异不大,随着预处理时间的延长,24~36 h预处理的有丝分裂指数达到峰值段,均极显著高于对照,平均每个视野中可以观察的分裂细胞为11%左右,是对照的3~4倍,随着预处理时间的延长,有丝分裂指数呈下降趋势。说明这2种材料在4℃低温预处理24~36 h都能极显著提高有丝分裂指数。

表 1 经秋水仙素处理平均每个视野中有丝分裂指数

材料	秋水仙素浓度/%	平均有丝分裂指数/%
对照	0.0	5.33
洋葱	0.05	19.89
	0.1	13.73
	0.2	2.21
对照	0.0	4.32
大蒜	0.05	17.70
	0.1	11.23
	0.2	5.62

表 2 经低温处理平均每个视野中有丝分裂指数(倍10×40倍视野)

材料	4℃处理时间/h	平均有丝分裂指数/%
洋葱	12	8.76
	24	18.96
	36	17.15
	48	2.10
对照	0	5.56
大蒜	12	7.55
	24	18.28
	36	15.21
	48	1.93
对照	0	5.02

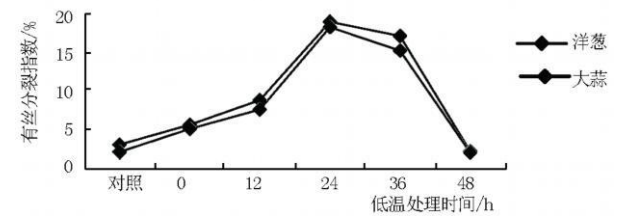


图 3 低温处理对有丝分裂指数的影响

把以上2种方法进行对比:秋水仙素处理,对环境污染大。如果采用将洋葱带根一起放入不同浓度的秋

水仙素溶液浸泡处理,秋水仙素能充分发挥作用,但因为秋水仙素为剧毒药品,用量不能太多,既不环保、也不经济。该实验采用将根部剪下放入秋水仙素溶液中进行处理,虽然比不离体少用试剂,但由于本科学生人数多,也存在对环境污染的问题,故也不是最好的办法。低温处理既能够极显著地提高洋葱根尖有丝分裂指数,又经济、环保。虽然比用秋水仙素预处理效果稍微差一点,但差别不大,只是预处理时间较长,从学生实验考虑,这部分准备工作可由实验技术人员完成,不影响学生实验课时。从经济成本、环境污染和毒副作用来说,低温处理比秋水仙素处理更适合学生实验。其它预处理剂,如羟基喹啉,对二氯苯等均没有低温处理经济、环保。综合考虑,低温处理是目前观察细胞有丝分裂最有效的方法之一,是大批量学生实验的最佳方法。

另外,根尖剪下的时间对实验效果也有影响。植物细胞有丝分裂活动是有节律性的,受生物钟的制约,根尖细胞有丝分裂24 h内细胞分裂的旺盛期不同<sup>[9]</sup>。细胞分裂活动最旺盛的时间是上午9:00~11:00,几乎所有细胞都处于分裂状态,其中前期和中期的分裂相个数较多。在不同时间剪下根尖制作装片,实验的效果不一样。在做植物细胞有丝分裂实验时,为提高成功率,应在植物细胞有丝分裂活动的旺盛期剪取根尖材料,剪下的根尖的时间在上午9:00~11:00时实验效果最好。

3 结论

观察植物细胞有丝分裂实验优化的条件是,选用洋葱根尖作为试材,上午9:00~11:00剪到根,材料预处理选用4℃低温预处理24~36 h;选择Schiff试剂作为染料;用Fuegen染色法染色。

参考文献

[ 1 ] 王金发,何炎明.细胞生物学实验教程[M].北京:科学出版社,2004:56-57.

[ 2 ] 唐历波,张青峰,姬可平,等.细胞内DNA和RNA显色反应的改进[J].实验室研究与探索,2006,25(11):1358-1359.

[ 3 ] 任艳,王辉,石延茂,等.不同预处理对花生根尖细胞有丝分裂制片的影响[J].花生学报,2008,37(2):28-31.

[ 4 ] 陈于和,秦素平,林小虎.离体与非离体条件对豌豆根尖有丝分裂的影响[J].植物生理科学,2006,22(6):230-232.

[ 5 ] 李光明,刘文海,何波.四种预处理对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响[J].湘潭师范学院学报,2005,27(1):82-87.

[ 6 ] 谢晓玲,邓自发.秋水仙素对大蒜生长的影响及多倍体诱导效应分析[J].安徽农业科学,2009,37(9):4191-4194.

[ 7 ] 黄永莲,胡木林.秋水仙素对洋葱根尖细胞的诱变效应[J].亚热带植物科学,2005,34(1):42-45.

[ 8 ] 高汝勇.低温预处理对大蒜根尖细胞有丝分裂的影响[J].农业科技与装备,2009,181(1):3-5.

[ 9 ] 赵东利,周清波,蔡娜,等.秋水仙素对大蒜根尖细胞有丝分裂的影响[J].北京农学院学报,2009,24(1):79-80.

# ‘南月’蓝浆果实生优株组培苗瓶外生根研究

邓桂秀, 宋鹏飞, 姜燕琴, 於虹

(中国科学院植物研究所 江苏 南京 210014)

**摘要:**以南方高丛蓝浆果(*V. corymbosum hybrids*)品种‘南月’(Southmoon)实生优株 A7、A18、A47、A119 和 A167 增殖培养若干代的组培苗为试材,研究了不同优株组培苗的生根能力以及扦插基质、IBA 浓度对组培苗瓶外生根的影响。结果表明:A18 的生根率最高,为 92.2%,A167 的生根率最低,为 83.6%;以苔藓为扦插基质时,组培苗的生根率较高,均达到 88%以上;而在泥炭+珍珠岩( $v:v=1:1$ )基质上生根苗的长势最好;当 IBA 浓度为 1 000 和 2 000 mg/L 组培苗的生根率和生根苗的长势较 IBA 浓度为 3 000 mg/L 好。

**关键词:**蓝浆果;扦插基质;IBA 浓度;瓶外生根

**中图分类号:**S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)13-0132-03

良种繁育是品种选育工作的组成部分。在蓝浆果实生选育中,采用组织培养技术对优选单株进行扩繁,可扩大优选单株群体,加快其评价步伐。组培苗的生根培养是组织培养的一个重要部分,也是衔接实验室操作与田间栽培管理工作的关键环节。蓝浆果组培苗的瓶内生根速度较慢,一般需 30~60 d,有的品种甚至长达 90 d<sup>[1-2]</sup>。此外,瓶内生根苗比较幼嫩,脆性大,从培养瓶取苗到移栽的过程中容易损伤茎、叶柄和根系,影响移

栽成活率<sup>[3]</sup>。采用瓶外生根技术可将组培苗生根培养与生根苗移栽驯化结合起来,简化了程序和操作方法,缩短了生根时间,可起到降低成本和提高工作效率的作用<sup>[3-5]</sup>。蓝浆果组培苗瓶外生根的研究主要集中在 IBA 浓度和基质 2 个方面,二者对组培苗的生根率和生根苗的生长状况均有一定的影响<sup>[4,6]</sup>。

现以南方高丛蓝浆果(*V. corymbosum hybrids*)品种‘南月’(Southmoon)5 个实生优株增殖培养若干代的组培苗为材料,研究了不同优株组培苗的生根能力以及扦插基质和 IBA 浓度对 A18、A47、A119 组培苗瓶外生根的影响,旨在为实生优株组培苗的瓶外生根提供生产指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

南方高丛蓝浆果‘南月’实生优株 A7、A18、A47、A119 和 A167 增殖培养若干代的组培苗。

### 1.2 试验方法

**第一作者简介:**邓桂秀(1983-),女,湖南蓝山人,在读硕士,现主要从事小浆果类植物的生物技术研究工作。E-mail: dengdx@126.com。

**通讯作者:**於虹(1968-),女,研究员,现主要从事蓝浆果的引种,栽培,加工和推广等研究工作。E-mail: njyuhong@vip.

**基金项目:**农业部“948”资助项目(2006-G25);农业部公益性行业(农业)科研专项资助项目(nyhyzx07-028);南京市科技局现代农业重大技术研究与应用资助项目(200901018)。

收稿日期: 2010-02-26

## Optimizing Experiment Conditions for Plant Cell Mitosis

HUANG Yong-lian

(Life Science and Technology School, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang, Guangdong 524048)

**Abstract:** The presented article performs a comparison study on the selection of experimental material, the preprocessing condition, the selection of dye, and the selection of dyeing method in the of plant cell mitosis. The results showed that when onion root-tip was selected as the experimental material and preprocessed in 4 °C for 24~36 h, Schiff reagent as the dye, and using Fuelgen dyeing method, the optimal experiment condition for observing the plant cell mitosis was obtained.

**Key words:** mitosis; preprocessing; condition; optimizing