北方园艺 2010(20):136~138

辣椒根尖细胞微核制片方法的探讨

王德慧[1],郭长虹[1],郭亚华[2],耿月伟[2]

(1.哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150025;

2.黑龙江省农业科学院园艺分院 生物技术室,黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要:为了建立辣椒根尖微核技术,对辣椒种子萌发条件和辣椒根尖解离时间等环节进行了探索。结果表明:52 ℃和室温浸泡利于辣椒种子萌发,可以得到状态良好的根尖材料;在 60 ℃ 1N HCl 中解离 7 min,细胞分散和染色效果较好;利用辣椒根尖细胞可以获得理想的微核制片。

关键词:辣椒;微核;种子萌发;解离

中图分类号:S 641.3 文献标识码:A 文章编号:1001—0009(2010)20—0136—03

微核是指位于细胞中独立于主核的核小体,是染色体受到致畸物质损伤后,发生断裂,在细胞分裂后期残留在细胞质中的一些无着丝粒断片,脱离主核而形成的。其直径为主核的 1/3 或更小,形态为圆形或椭圆形,嗜色性与主核一致[1-2]。微核千分率可以作为检测某些物质是否是致畸或致癌剂,以及致畸性强弱的指标[3]。在国内外已广泛应用于环境诱变和致癌因子的监测和研究[4],在育种上也被用于辐射和航天诱变的效果评价[5-6]。

20 世纪 70 年代初 Matter 和 Schmid 等在研究人类和哺乳动物细胞损伤时,初步建立了间期细胞的微核测定技术。1978 年马德修先生以美国产紫露草(*Tradescantia paludosa*)为材料,通过花粉母细胞四分体微核数量作为测定环境污染技术,取得了良好效果。1980 年 Degrassi 和 Rizzoni 建立了蚕豆次生根尖微核监测系统[7]。1982 年 Degrassi 提出利用微核千分率技术作为诱变剂的监测系统。此后越来越多的人采用各种植物微核技术进行不同领域的监测研究[8-9]。但关于辣椒微核技术还未见报道。

该试验对辣椒根尖微核制片技术进行了系统研究,对材料培养、取材、固定、解离、染色、压片等环节进行了探索,对制片中存在的问题和解决办法进行了分析。

第一作者简介:王德慧(1986-),女,在读硕士,研究方向为植物遗传学。E-mail:swx04224wdh@126.com。

通讯作者:郭长虹(1968-),女,博士,教授,研究方向为植物遗传学。E-mail:kaku2008@hotmail.com。

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(ZD200818-02;ZD200818-01)。

收稿日期:2010—07—29

1 材料与方法

1.1 试验材料

“宇椒一号”,由黑龙江省农业科学院园艺研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发 设计了 3 种试验方法进行种子萌发试验(见试验结果部分)。

1.2.2 取材与固定 辣椒种子萌发后,待根尖长到 1~2 cm 左右时,剪根并将其放入卡诺固定液(V 酒精 ∶V 冰醋酸=3 ∶1)中固定 24~48 h。之后放入 70%的酒精中低温保存。

1.2.3 解离与染色 固定后的材料用蒸馏水充分漂洗后,用滤纸吸干,放入 1N HCl 中在 60 ℃恒温条件下解离。设置了不同的时间梯度,分别为 1、4、7、10、14 min,比较不同的解离时间的效果。解离后的材料用蒸馏水充分漂洗,用滤纸吸干。然后用希夫试剂进行染色。

1.2.4 压片与镜检 将染色后的材料置于载玻片上,切去根冠,切取少量分生组织滴加适量 45%醋酸,盖上盖玻片,在盖片的一角压 1 个刀片,并用左手食指压紧,右手持竹签用尖头部分轻轻敲击盖片,使细胞散开,最后在盖片上加滤纸,用大拇指压紧使染色体散布于同一平面。片子制好后,先在 10 倍显微镜下找到视野,换 40 倍显微镜下观察计数。将好的片子在液氮中冻片 10 min,截掉盖片,气干,中性树胶封片。由于辣椒细胞核较小,需要在 100 倍油镜下拍照。即先在低倍显微镜下找到视野,再在高倍显微镜下观察,在需要拍照制片部位滴上香柏油,放下 100 倍油镜镜头,旋转微调螺钮至清晰为止即可拍照。

2 结果与讨论

2.1 辣椒种子的萌发

设计了 3 种方法进行辣椒种子的萌发试验。方法 1:将辣椒种子播于铺有双层滤纸的培养皿中,保持培养

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

皿内滤纸湿润,30 ℃恒温条件萌发。方法 2:将辣椒种子先用 52 ℃温水浸泡 48 h 后放入铺有双层滤纸的培养皿中,保持培养皿内滤纸湿润,置 30 ℃恒温条件下萌发。方法 3:将辣椒种子先用 52 ℃温水浸泡,冷却至室温浸泡种子 24 h,将种子用纱布轻轻搓洗,再用 52 ℃温水浸泡,冷却至室温浸泡种子 24 h 后轻轻搓洗,放入铺有双层潮湿滤纸的培养皿中,置 30 ℃恒温条件下萌发。

每天用温水洗涤 1 次,以利发芽。7 d 后对辣椒种子发芽率进行了统计。结果表明,辣椒种子萌发的条件不同,其发芽率有一定的变化,其中方法 1 的发芽率为 25%,方法 2 的发芽率为 30%,方法 3 的发芽率为 99%。因此第 3 种方法比较适合辣椒种子萌发。

辣椒种子一般有 2～3 个月的休眠期,高温烫种的目的是利用水的高温热力,杀死种子表面和潜伏在种子内部的病菌,也是打破种子休眠,增加种子活力的重要手段。浸种时温度不宜过高,用 52 ℃水烫种,随着水温自然下降。浸种时间不宜过长,浸泡过程中要适当搓洗种子,以除去辣椒种皮上的粘液和油脂,增加渗透性。把浸好的种子置 30 ℃恒温催芽,催芽时要经常翻动种子,每天用温水洗净粘液,否则会影响种子透气性,使种子缺氧死亡[10]。方法 1 辣椒种子的发芽率之所以低是因为没有经过高温烫种就直接恒温催芽,没能打破种子的休眠,故发芽率低。方法 2 虽然经过高温烫种,但是浸泡时间太长,不利发芽。方法 3 经过高温烫种过程打破了种子的休眠同时浸泡时间又短,因此能够更有效的提高种子的发芽率。

2.2 辣椒根尖细胞的解离

解离的目的是为了去除细胞间的果胶层并使细胞壁软化,使细胞易于分散压平。解离时间的不同会导致染色结果的不同和细胞分散程度的不同。

该研究设置了不同的时间梯度,分别为 1、4、7、10、14 min,以摸索最佳解离时间。解离后的材料用蒸馏水充分漂洗,将材料中的残余盐酸彻底洗净,经希夫试剂染色后,比较解离效果。观察效果以差(－)、尚可(＋)、较好(＋＋)和很好(＋＋＋)表示。每个处理做 10 张片子,每张片子观察 5 个视野。

如表 1 所示,当解离时间为 1 min 时,细胞不分散,细胞核几乎不着色;当解离时间为 4 min 时,虽然细胞核有一定程度的着色,但细胞分散不好;当解离时间超过 10 min 时,尽管细胞分散情况较好,但染色效果欠佳。当解离时间为 7 min 时,细胞的分散程度和细胞核的染色情况均为最佳状态。这是因为细胞中的 DNA 在 1N HCl 60 ℃水解作用以后,核酸中的嘌呤碱很快完全被除掉,使脱氧核糖中潜在的醛基获得自由状态。水解后,组织要经水洗再移至希夫(Schiff)试剂中,希夫试剂中即同露出来的醛基发生反应,呈现紫红色。水解的时间很重要,因为核酸的水解有 2 个过程,第 1,嘌呤碱很快被除掉,脱氧核糖中潜在的醛基显露出来,第 2,组蛋白和核酸愈来愈多地被除掉。在短时间的水解作用以后,第 1 个过程占优势,这时候用希夫试剂染色,染色体的染色作用最强。随着水解作用的继续进行,第 2 个过程逐渐变成优势,因此水解液中的希夫反应增强,而染色体中的希夫应减弱。最后,第 2 个过程超过第 1 过程时,染色体也随之停止反应。因此解离时间过长或者过短染色效果不佳。

利用该研究的试验条件,对航天诱变的辣椒材料进行了微核检测,得到了很好的效果(图 1)。

表 1 解离时间对辣椒根尖微核制片效果的影响

管号	温度/℃	时间/t	细胞分散	染色效果
1	60	1	－	－
2	60	4	－	＋
3	60	7	＋＋	＋＋
4	60	10	＋＋	＋
5	60	15	＋＋＋	－

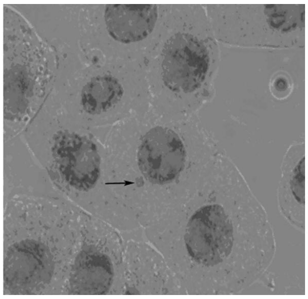

图 1 航天诱变辣椒根尖细胞的微核

3 结论

建立了辣椒根尖微核制片方法。具体操作步骤为:(1)将辣椒种子先用 52 ℃温水浸泡,冷却至室温浸泡种子 24 h,将种子用纱布轻轻搓洗,再用 52 ℃温水浸泡,冷却至室温浸泡种子 24 h 后轻轻搓洗,放入铺有双层潮湿滤纸的培养皿中。置 30 ℃恒温条件下萌发。每天用温水洗涤 1 次,以利发芽。(2)待根长到 1～2 cm 时,取根尖,在蒸馏水充分漂洗后放入卡诺固定液中固定 24～48 h。(3)固定好的材料用蒸馏水清洗 10 min,滤纸吸干覆水,放入 1N HCl 中 60 ℃水浴解离 7 min,自来水清洗 10 min。(4)将清洗后的材料放入希夫试剂中染色。(5)取适量材料用 45%冰醋酸压片,显微镜下观察。

参考文献

[1] 杜峰涛,李林.细胞微核形成机理探讨[J].现代检验医学杂志,2007,22(4):19-21.

[2] Angela E. Mutagenicity test schemes and guidelines: USEPA office of pollution prevention and toxics and office of pesticide programs [J]. Environ Mole Mutagen, 1993, 21: 38-45.

[3] Sofuni T. Japanese guide lines for mutagenicity testing [J]. Environ Mole Mutagen, 1993, 21: 2-7.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

东方百合X射线急性辐照后代的生长及POD同工酶特性研究

黄海涛[1],王 丹[2],周丽娟[3]

(1.四川省绵阳市农业科学研究所,四川 绵阳 621000;2.西南科技大学 生命科学与工程学院 四川 绵阳 621010;
3.西安外事学院,陕西 西安710004)

摘 要:运用X射线对东方百合"索邦"离体不定芽进行急性辐照,并对辐照后的百合不定芽继代材料的生长及过氧化物(POD)同工酶酶谱进行分析。结果表明:1.76 Gy剂量处理东方百合芽高增量较对照显著增大,不定芽增殖无显著性变化,其它剂量处理相关生长指标与对照无显著性差异。POD同工酶酶谱分析发现,1.76 Gy剂量处理与对照相似系数较小,POD同工酶与对照的差异最大。

关键词:X射线;急性辐照;东方百合;POD
中图分类号:S 682.2⁺9 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)20-0138-03

百合以其极高的观赏价值及食品药用价值近年来越来越受到人们的广泛关注。我国野生百合资源丰富占世界的一半,而我国观赏用百合栽培生产中使用的种球,多数来源于国外进口,因此百合育种有非常好的市场前景及社会效益。百合育种手段较多,有杂交育种、分子育种、原生质体融合育种、诱变育种等[1-3]。辐射诱变育种作为较新的育种方法,具有简单、方便、易行、突变率高特点,一般可达千分之几,有时可达1/30,比自然突变率高出几百倍甚至上千倍,容易引起花卉形态结构和相关酶特性多方面的变异[4]。目前国内外关于百合

第一作者简介:黄海涛(1983-),男,湖南新宁人,硕士,研究方向为植物遗传育种。E-mail:cet_ch@163.com。
基金项目:中国工程物理研究院军民两用开发技术资助项目(200305)。
收稿日期:2010-07-19

[4] 阮萃才,梁远,刘锦玲,等.蚕豆根尖微核技术监测环境污染物的诱变活性[J].环境科学,1992,13(4):56-58.
[5] 杨茹冰,张月学,徐香玲,等.^{60}Co-γ射线辐照紫花苜蓿种子的细胞生物学效应[J].核农学报,2007,21(2):136-140.
[6] 任卫波,徐柱,陈立波,等.紫花苜蓿种子卫星搭载后其根尖细胞的生物学效应[J].核农学报,2008,22(5):566-568.
[7] Degrassi F, Rizzoni M. Micronucleus test in Vicia faba root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution[J]. Mutat Res, 1982, 97:19.
[8] 胡振东.蚕豆微核测定技术及其应用[J].自然科学,2000,16(4):1-6.
[9] Grant W F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals[J]. Mutat Res, 1999, 426:107-112.
[10] 门晓云.辣椒种子发芽率低的原因及措施[J].辣椒杂志,2005(1):40-41.

A Method for Micronucleus Preparation Using Pepper Root Tips

WANG De-hui[1], GUO Chang-hong[1], GUO Ya-hua[2], GENG Yue-wei[2]
(1. Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. Horticultural Sub-academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: In order to establish micronucleus technology of pepper root tips, the germination conditions of pepper seeds and the dissociation time of pepper roots were investigated. The results showed that 52 ℃ treatment and soaked at room temperature were beneficial for germination of pepper seeds, the root tip material in good condition may be acquired; Cell dispersion and dyeing was better when dissociating pepper root tips 7 min at 60 ℃ with 1N HCl; Using pepper root tips can get ideal micronucleus preparation.

Key words: pepper; micronucleus; seed germination; dissociation

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net