

# 两种天南星科植物根尖组织染色体观察方法的优化

李庆玲<sup>1</sup>, 陈 荣<sup>1,2</sup>, 杨跃生<sup>1</sup>, 朱昌叁<sup>2</sup>

(1. 华南农业大学 生命科学院药用植物研究中心, 广东 广州 510642; 2. 广西生态工程职业技术学院, 广西 柳州 545004)

**摘 要:**以白掌和观音莲 2 种天南星科观赏植物为试材, 对其根尖组织染色体观察方法进行优化。结果表明: 2 种材料均在 12:00~14:00 取材较好; 对二氯苯的饱和液中预处理时, 白掌以在 8℃ 冰箱中预处理 6 h 效果好, 观音莲在 16℃ 环境下预处理 8 h 为最优条件; 40℃ 恒温水浴锅中 1 mol/L 盐酸酸解处理时, 白掌酸解 10 min, 观音莲处理 15 min 效果理想; 最后切取根尖白色分生组织部分于载玻片上使用卡宝品红染色 20 min 可以满足染色体计数和拍照的需要。

**关键词:**白掌; 观音莲; 染色体观察

**中图分类号:**S 682.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)02-0134-03

白掌 (*Spathiphyllum floribundum*) 和 观 音 莲 (*Alocasia indica* Schott) 是具有重要观赏价值和经济价值的天南星科花卉, 市场前景广阔。其中白掌以切花栽培为主, 也可做中小型盆栽; 观音莲叶形奇特, 叶色墨绿, 斑纹清晰醒目, 为时尚的观叶植物<sup>[1]</sup>。

我国天南星科花卉植物的产业开发起步较晚, 基础研究和育种工作滞后。近年来倍性育种技术在花卉育种中的应用受到植物育种家的重视, 其中天南星科花卉倍性育种, 包括单倍体育种和多倍体育种方面均有报道。在进行倍性育种研究工作时, 常需要鉴定植物的倍性, 而取根尖分生组织进行制片观察来确定倍性是常用的方法, 证据直接可靠, 如在红掌的单倍体和多倍体育种文献中, 均使用根尖材料进行制片来确定材料的倍性<sup>[2-3]</sup>。就该研究的 2 种材料来看, 白掌和观音莲均未见倍性育种相关报道, 也没有染色体观察方法方面的专门报道。基于此, 针对影响制片效果的各因素进行研究, 对 2 种材料根尖组织染色体观察方法进行优化, 旨在建立其制片方法, 满足倍性育种中 2 种材料染色体计数和拍照的需要, 为 2 种重要花卉的种质创新提供技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料白掌 (*Spathiphyllum floribundum*)、观音莲 (*Alocasia indica* Schott) 是由广西生态工程职业技术

学院生物技术中心提供的组培瓶苗。

### 1.2 试验方法

1.2.1 白掌及观音莲的染色体数目观察 试验采用常规压片法对 2 种材料的染色体数目进行观察, 并对好的细胞分裂相进行拍照, 处理的具体步骤: 12:00 取 2 种材料的根尖用自来水洗 2 次后放入对二氯苯的饱和液中进行预处理, 白掌处理温度为 8℃ 预处理 6 h, 观音莲处理温度为 16℃ 预处理 8 h, 预处理后用自来水冲洗 15 min 再用去离子水浸泡 5 min, 接着用卡诺固定液于 8℃ 冰箱固定 16~20 h, 自来水冲洗 15 min 后再用去离子水浸泡 5 min, 在 40℃ 恒温水浴锅中使用 1 mol/L 盐酸酸解处理, 其中白掌酸解 10 min, 观音莲处理 15 min, 酸解后在自来水下冲洗 15 min 后再用去离子水浸泡 5 min, 切取根尖白色分生组织部分于载玻片上使用卡宝品红染色 20 min, 压片后在莱卡显微镜下镜检计数和拍照, 3 次重复, 观察清晰可辨的分裂相细胞数目为 30 个以上。

1.2.2 不同取材时间对 2 种材料染色体观察效果的影响 于 8:00 开始第 1 次取材, 取到第 2 天 6:00, 连续 22 h 取材, 共取材 12 次。除取材时间不同外, 其余制片方法与 1.2.1 中染色体数目观察的制片方法相同。每一取材时间分别取 3 个不同植株的根尖, 统计根尖的分裂相细胞, 求平均数来确定分裂高峰期。

1.2.3 不同预处理温度对 2 种材料染色体观察效果的影响 该试验设 4 个不同处理条件, 预处理温度分别为 4、8、16、24℃, 其中, 前 2 个处理分别在 4℃ 和 8℃ 冰箱中进行, 后 2 个处理在空调房中进行。除预处理温度不同外, 其余制片方法与 1.2.1 中染色体数目观察的制片方法相同。每处理分别取 3 个不同植株的根尖, 统计根尖的分裂相细胞, 以个/根尖表示。

1.2.4 预处理时间对 2 种材料染色体观察效果的影响

**第一作者简介:**李庆玲(1987-), 女, 在读硕士, 现从事植物倍性育种研究工作。E-mail: chentianyi1@126.com。

**责任作者:**朱昌叁(1975-), 男, 硕士, 工程师, 现从事植物生物技术研究工作。

**基金项目:**广西自然科学基金资助项目(2010GXNSFB013024)。

**收稿日期:**2011-10-27

设4个不同预处理时间处理,分别为2、4、6、8 h,除预处理时间不同外,其余制片方法与1.2.1中染色体数目观察的制片方法相同,3次重复。

1.2.5 酸解时间对2种材料染色体观察效果的影响  
3个不同酸解时间处理,分别为5、10、15 min,除酸解时间不同外,其余制片方法与1.2.1中染色体数目观察的制片方法相同,3次重复。

1.2.6 染色时间对2种材料染色体观察效果的影响  
设3个染色时间处理,分别为10、20、30 min,除染色时间不同外,其余制片方法与1.2.1中染色体数目观察的制片方法相同,3次重复。

1.2.7 观察方法 以上各试验对制片中涉及的影响因素进行优化,以染色体收缩适当,底色浅,对比度大,易于分辨,分散好,能够满足染色体计数和拍照的需要为准。

2 结果与分析

2.1 白掌及观音莲的染色体数目

对白掌和观音莲染色体数目进行观察得出,白掌的根尖分生组织细胞染色体数目为30条的占到分裂相细胞总数的85.2%,据此可以初步确定白掌为二倍体(图1),染色体数目为 $(2n=2X=30)$ ;观音莲的根尖分生组织细胞染色体数目为28条的占到分裂相细胞总数的86.7%,可见观音莲也是二倍体(图1),染色体数目为 $(2n=2X=28)$ ,该试验中观音莲的染色体数目与Ishida对同属植物进行研究的结果一致<sup>[4]</sup>。2种材料观察到的染色体清晰,初步说明经过优化的制片方法可行。

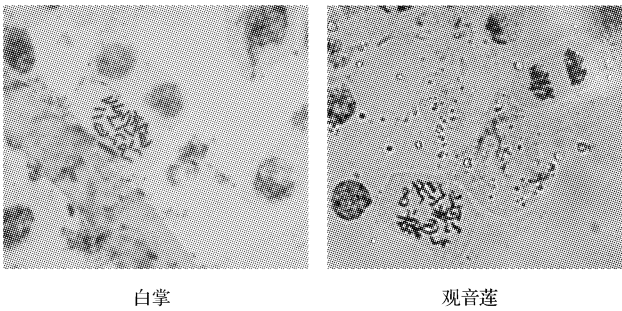


图1 白掌及观音莲根尖分生组织分裂相细胞

2.2 取材时间对2种材料染色体观察效果的影响

试验结果表明,白掌的分裂高峰期在凌晨4:00,观音莲的分裂高峰期在凌晨2:00,2种材料均在22:00至次日凌晨6:00分裂比较旺盛,考虑到白天取材比较方便,从结果来看,12:00~14:00取材分裂相细胞较多,8:00~10:00间分裂相细胞较少,可见与常规取材时间有所不同。

2.3 预处理温度对2种材料染色体观察效果的影响

由表1可知,在4个不同预处理温度中,随着处理

温度依次降低,2种材料的分裂相细胞均逐渐减少但是染色体分散效果逐渐变好;当预处理温度为8℃时,白掌取得了较好的制片效果,此时染色体分散效果好,清晰可辨,可以满足染色体计数及拍照的需要,分裂相细胞为7个/根尖,没有发现染色体粘连密集的情况,4℃时制片效果好但是分裂相细胞较少;而观音莲在预处理温度为16℃取得了较好的制片效果,此时分裂相细胞为12个/根尖,染色体分散好且清晰可辨,可以满足染色体计数及拍照的需要,大于该预处理温度时染色体团状粘连,分散效果差导致不易分辨,小于该预处理温度时制片效果好,但是分裂相细胞较少。

表1 不同预处理温度对2种材料制片效果的影响

| 预处理温度/℃ | 白掌                       |      |      | 观音莲                      |      |      |
|---------|--------------------------|------|------|--------------------------|------|------|
|         | 分裂相细胞/个·根尖 <sup>-1</sup> | 分辨能力 | 分散效果 | 分裂相细胞/个·根尖 <sup>-1</sup> | 分辨能力 | 分散效果 |
| 24      | 15                       | 差    | 团状粘连 | 16                       | 差    | 团状粘连 |
| 16      | 10                       | 略差   | 密集   | 12                       | 清晰   | 好    |
| 8       | 7                        | 清晰   | 好    | 9                        | 清晰   | 好    |
| 4       | 3                        | 清晰   | 好    | 4                        | 清晰   | 好    |

2.4 预处理时间对2种材料制片效果的影响

由表2可知,在4个不同预处理时间情况下,2种材料的分裂相细胞随着预处理时间的增加而逐渐增加,2、4 h预处理由于处理时间不够而导致2种材料的染色体收缩小,染色体长而存在缠绕和重叠现象,不能达到计数和拍照的要求;就白掌来说,当预处理时间为6 h的时候,染色体收缩适当,比较适合染色体的计数和拍照,当预处理8 h时,染色体收缩过多,染色体有变为点状的趋势,当然此时计数比较容易,但是可能会存在由于预处理时间过长而带来染色体断裂的不良影响从而导致计数不准确的现象发生,该现象在点状染色体计数时尤其难以区分;观音莲在预处理8 h的情况下制片效果好,能够满足染色体计数和拍照的需要,在预处理6 h的情况下,染色体略长,此时染色体缠绕情况不多,但是比较密集,计数相对困难,拍照效果较差。

表2 不同预处理时间对2种材料制片效果的影响

| 预处理时间/h | 白掌                       |       |      | 观音莲                      |       |      |
|---------|--------------------------|-------|------|--------------------------|-------|------|
|         | 分裂相细胞/个·根尖 <sup>-1</sup> | 染色体长短 | 分辨能力 | 分裂相细胞/个·根尖 <sup>-1</sup> | 染色体长短 | 分辨能力 |
| 2       | 2                        | 长     | 差    | 4                        | 长     | 差    |
| 4       | 5                        | 略长    | 差    | 6                        | 长     | 差    |
| 6       | 7                        | 短     | 清晰   | 9                        | 略长    | 略差   |
| 8       | 8                        | 短(点状) | 清晰   | 10                       | 短     | 清晰   |

2.5 酸解时间对2种材料制片效果的影响

在设定的3个不同酸解时间处理中,5 min酸解处

理 2 种材料的细胞分散差,根先端组织较硬导致压片困难,同时底色深不易拍照;在 10 min 处理情况下,白掌的细胞分散好,压片容易,底色浅,可以满足染色体计数和拍照的需要,此处理下观音莲的细胞分散好,但是底色深,计数工作可以进行但是照片对比度不够,照片质量不高;在 15 min 酸解处理时,白掌的染色体色浅,照片质量不高,此时观音莲的照片质量较高,可以满足染色体计数和拍照的需要,但是由于酸解时间过长导致部分细胞破碎。

### 2.6 染色时间对 2 种材料制片效果的影响

在 3 个不同染色时间处理下,当染色时间为 10 min 时,2 种材料染色效果均不理想,色浅对比度不够,不能满足染色体计数和拍照的需要;2 种材料在染色时间为 20 min 时均取得很好的效果,此时染色体清晰,细胞边缘明显,可以满足染色体计数和拍照的需要;当染色时间为 30 min 时,染色过深,对比度不够,清晰度下降。由于染色时间较长,故染色时要求补充染色液,避免染液干后形成染料颗粒,颗粒形成后即使重新滴入染液也很难溶解,在压片后影响观察效果。

### 3 讨论与结论

该试验中使用饱和对二氯苯溶液为预处理药剂,获得了理想的观察效果,与染色体观察常用的预处理药剂

秋水仙素相比,价格低廉易得,优化后的制片方法可以满足染色体计数及拍照的需要,证明方法可行。

优化后白掌的根尖组织染色体观察方法为:取材时间为 12:00~14:00,对二氯苯的饱和液中预处理,预处理温度为 8℃,预处理时间为 6 h,40℃ 恒温水浴锅中使用 1 mol/L 盐酸进行酸解,酸解时间 10 min,卡宝品红染色 20 min,压片镜检观察。优化后观音莲的根尖组织染色体观察方法为:取材时间为 12:00~14:00,对二氯苯的饱和液中预处理,预处理温度为 16℃,预处理时间为 8 h,40℃ 恒温水浴锅中使用 1 mol/L 盐酸进行酸解,酸解时间 15 min,卡宝品红染色 20 min 效果较好。

### 参考文献

- [1] 黄玉源,张施君. 天南星科观赏植物重要品种及其繁育技术[J]. 仲恺农业技术学院学报,2002,15(4):54-59.
- [2] 杜宝贵,黄丽娟,张志胜,等. 红掌花药培养[J]. 生物技术通报,2009(增刊):189-195.
- [3] 张志胜,黎扬辉,姜蕾,等. 红掌四倍体的离体诱导及其鉴定[J]. 园艺学报,2007,34(3):729-734.
- [4] Ishida G. Karyomorphological observations on some aroids cultivated in the Hiroshima Botanical Garden I. *Alocasia* [J]. Bull Hiroshima Bot Gard, 2001,20:1-33.
- [5] 齐秀玲,郭二辉,王会民. 不同制片方法对草莓染色体观察效果的影响[J]. 山西果树,2007(5):7-9.

## Optimization of Chromosome Observing Method of Root-tip Tissue in Two Species of Araceae

LI Qing-ling<sup>1</sup>, CHEN Rong<sup>1,2</sup>, YANG Yue-sheng<sup>1</sup>, ZHU Chang-san<sup>2</sup>

(1. Center for Medicinal Plant Research, College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642;

2. Guangxi Eco-engineering Vocational and Technical College, Liuzhou, Guangxi 545004)

**Abstract:** *Araceae* plants *Spathiphyllum floribundum* and *Alocasia indica* Schott were used in this study to optimize the chromosome observation method of root-tip tissue. The results showed that both materials were better collected at the time period of 12:00~14:00. *Spathiphyllum floribundum* achieved better result with a pretreatment of 6 h in fridge at the temperature of 8℃ and *Alocasia indica* Schott reached optimum condition with a pretreatment of 8 h in fridge at the temperature of 16℃ when pretreated in saturated dichlorobenzene. *Spathiphyllum floribundum* and *Alocasia indica* Schott reached ideal results when respectively treated for 10 min and 15 min with HCl 1 mol/L for 40 min in water bath. White meristematic tissue at the root-tip was cut and put on glass slide for chromosome number observation and photographing after 20 min dyeing with carbolfuchsin.

**Key words:** *Spathiphyllum floribundum*; *Alocasia indica* Schott; chromosome observation