

万寿菊根尖染色体观测方法的优化

赵 庆, 唐道城

(青海大学 高原花卉研究中心, 青海 西宁 810016)

摘 要:以万寿菊‘QU2-2’为试材,从取材时间、根的长度、预处理方法、解离时间、染色时间、压片工具 6 个方面对根尖染色体制片方法进行了筛选和优化。结果表明:万寿菊根尖染色体观测采用室内催根培养,于上午 9:14,剪取根长 1.0 cm 的根尖,利用低温(0~4℃)水浴进行预处理 24 h、1.0 mol/L 盐酸解离 7 min、染色 25 min、结合带橡皮头铅笔压片,可以获得高质量的有丝分裂前中期临时片。

关键词:万寿菊;根尖;染色体;分裂相

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0098-03

万寿菊(*Tagetes erecta* L.)属菊科万寿菊属 1a 生草本植物,用途十分广泛,既可用于园林绿化,也可用于提取食用色素^[1]。目前,针对菊科植物染色体观测的研究较多,对万寿菊属植物染色体细胞学的研究也有相关报道^[2-4]。但根尖染色体制片受多种因素的影响,包括取材时间、根的长度、预处理方法、解离时间、染色时间、压片工具等。该试验以有丝分裂前中期的细胞数目、细胞轮廓清晰度、染色体的清晰度和分散度、染色体效果深浅度作为衡量观测效果优劣的标准,对比不同条件下的观测效果,优化万寿菊染色体制片过程中的各个要素,以期形成一套完整而有效的万寿菊制片及观测技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试万寿菊‘QU2-2’种子由青海大学高原花卉研究中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 制片步骤 种子播种在垫有滤纸的培养皿中→置于 23℃光照培养箱中催芽→9:00~9:30 剪取根长 0.5~1.5 cm 的幼根根尖→低温(0~4℃)水浴处理 24 h→卡诺固定液固定 24 h→用 1.0 mol/L 盐酸溶液于 60℃恒温水浴锅中解离 5~10 min→卡宝品红染色→压片→观察。

1.2.2 取材时间的优化 将上午 9:00~9:30 的取材设

定为 4 个时间梯度即 9:00、9:10、9:20 和 9:30,分别剪取根尖进行预处理、固定、解离、染色,制作临时片观察。然后取其在细胞中期附近的 2 个时间点,在此区间再设计 4 个时间梯度重复上述步骤,以期找到最佳中期分裂相的取样时间。

1.2.3 根尖长度的优化 在最佳取材时间的前提下,分别剪取根长 0.5、1.0、1.5 cm 的根尖进行预处理、固定、解离、染色、压片,在 Nikon ECLIPSE 80i 的 40 倍物镜下观察,随机选取 3 个视野拍照,并统计照片处于前中期的细胞数所占总细胞数的比例。

1.2.4 预处理方法的优化 试验设化学和物理 2 种预处理方法。化学方法:选择最佳取材时间和最佳根长的根尖,经 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液在室温下处理 4 h,然后固定、解离、染色、压片,观察。物理方法:即低温水浴法。选择最佳取材时间和最佳根长的根尖,低温水浴处理 24 h,然后固定、解离、染色、压片,观察。

1.2.5 解离时间的筛选 在选择最佳取材时间、最佳根长和预处理方法前提下,设计 5、7、9 min 3 个解离时间,进行压片观察。

1.2.6 染色时间的优化 在上述过程最佳水平下,分别染色 20、25、30 min 进行压片观察。

1.2.7 压片工具的筛选 供验选用镊子和橡皮头作为压片工具,比较压片效果。

2 结果与分析

2.1 取材时间对染色体状态的影响

由图 1 可知,细胞分裂分别处于间期(图 1A)、前期(图 1B)、后期(图 1C)、末期(图 1D)。前中期的时间点应该处于 9:10~9:20。观察 9:12、9:14、9:16、9:18 4 个时间点的根尖细胞,由图 1E~H 可知,9:14 的分裂相分散度最好。因此,9:14 取材为有丝分裂前中期观察的最佳时期。

第一作者简介:赵庆(1989-),女,硕士研究生,现主要从事园林植物遗传育种工作。E-mail:zhaoping8811@126.com。

责任作者:唐道城(1954-),男,硕士,教授,博士生导师,现主要从事高原花卉研究工作。E-mail:tangdaocheng6333@163.com。

基金项目:青海省科技厅重点攻关资助项目(2007-N-114)。

收稿日期:2013-05-15

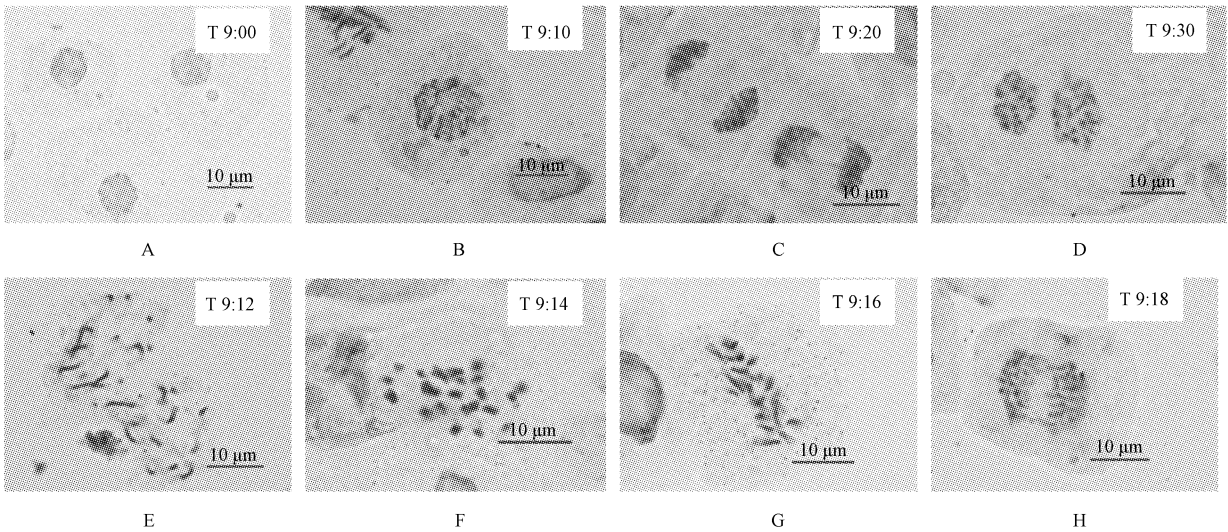


图1 取材时间对染色体状态的影响

2.2 根尖长度对细胞有丝分裂状态的影响

由表1可知,当根长达到1.0 cm时,根尖的前中期细胞数目最多,所占比例为14.0%。经Tukey法显著性比较,1.0 cm根长时的前中期细胞极显著多于0.5 cm和1.5 cm根长时的数目。

2.3 预处理方法对染色体观测的影响

预处理是通过抑制微管形成纺锤体,使有丝分裂阻断于中期,得到大量中期分裂相。由图2可知,分别用0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液处理(图2A)和低温水浴处理(图2B),后者处理细胞较大,有前中期分裂相的细胞也相对较多。由此可见,物理处理优于化学处理。

表1 根尖长度对细胞有丝分裂状态的影响

根的长度 /cm	前中期细胞数目 /个	总细胞数目 /个	前中期细胞所占 百分率/%	
0.5	2	40	5.0	5.0bB
	2	41	4.9	
	3	82	3.7	
1.0	6	41	14.6	14.0aA
	6	47	12.8	
	8	60	13.3	
	1	80	1.3	
1.5	1	50	2.0	2.00cB
	1	51	2.0	

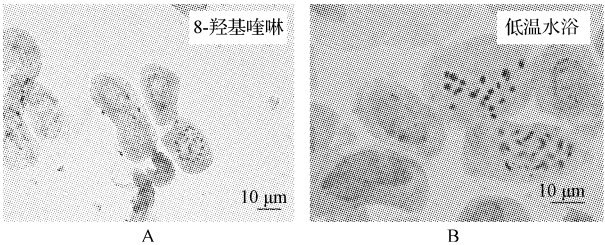


图2 预处理方法对染色体观测的影响

2.4 解离时间对染色体观察的影响

由图3可知,解离5 min,细胞壁未完全打开,细胞质浓厚,染色体着色不均匀(图3A);解离9 min时,细胞壁完全打开,细胞单位不再存在,染色体散逸(图3C);而解离7 min时,细胞轮廓清晰,但细胞壁已经全部解离,细胞质呈薄而透明状态,染色体着色效果良好(图3B)。

2.5 染色时间对染色体着色效果的影响

由图4可知,染色20 min时,染色体着色较浅(图4A);染色25 min时,染色体着色较深,且细胞质呈透明状,染色体与细胞质色差明显(图4B)。染色30 min时,不仅染色体着色,细胞质也着色,染色体与细胞质的色差不明显(图4C)。

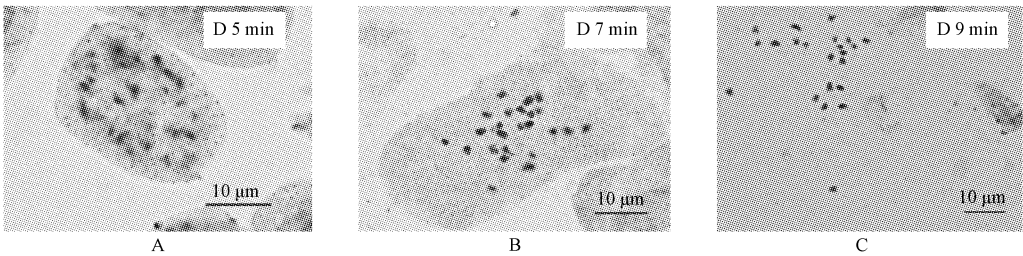


图3 解离时间对染色体观察的影响

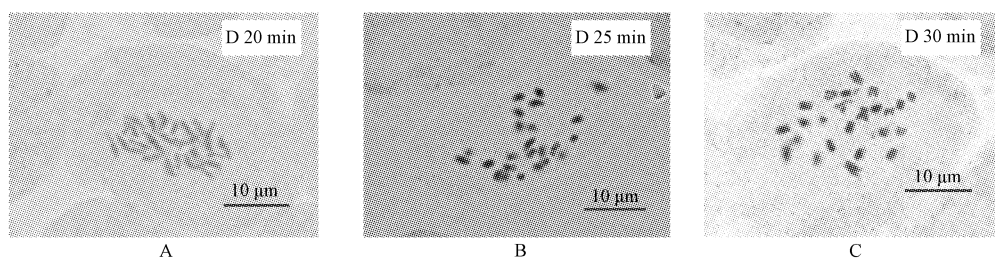


图4 染色时间对染色体着色效果的影响

2.6 压片工具对制片质量的影响

采用镊子的尖端压片,细胞的分散度良好,但是由于细胞受力不均匀,容易导致染色体不在一个平面上,且颜色深浅不一(图5A)。而用带有橡皮头的铅笔压片,不仅细胞分散度良好,染色体绝大多数均匀分布于同一平面上,着色清晰(图5B)。

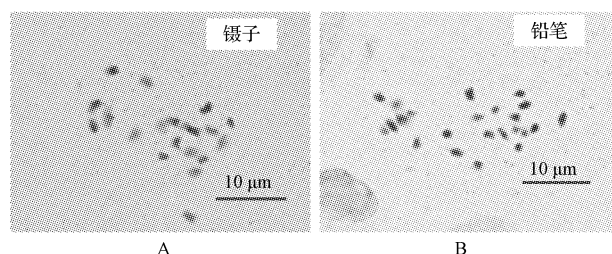


图5 压片工具对制片质量的影响

3 结论与讨论

万寿菊根尖染色体观测受多种因素的影响,既包括根尖培养方式、取样时间,也包括制片过程中各个环节的处理技术。齐迎春等^[4]采用室内催根培养对孔雀草根尖长度作了研究,但对根长没有研究;对取材时间做了较大范围的筛选,但没有对更小范围的时间进行研究;对预处理方法进行了化学药剂的研究,但未与物理方法对比。在解离时间、染色以及制片所采用的工具方面都众说纷纭,观点和意见很不一致。该试验对材料

培养、取材方式和制片过程做了更为细致的要素优化,寻找一套模式化的制片技术,即于上午9:14剪取根长1.0 cm的根尖,利用低温水浴进行预处理24 h、卡诺固定液固定24 h、1 mol/L盐酸解离7 min、染色25 min、结合带橡皮头的铅笔压片,可以获得高质量的有丝分裂前中期分裂相。观测过程中,会出现细胞重叠,染色体不在一个平面上的现象。造成此问题的原因与盐酸解离细胞壁的时间以及压片工具都有一定的关系。当解离时间较短,若用带橡皮头的铅笔压片,无法使细胞分散,且容易造成染色体不在一个平面上;若是用尖头的镊子压片,细胞容易分散,但是染色体不在一个平面上。当解离时间较长,又容易造成细胞壁完全打开,染色体散逸无法统计其数目。所以,解决此问题的关键是把握好解离的时间,当细胞壁解离到一定程度,细胞足够软化,再用带橡皮头的铅笔压片,便可得效果最佳的临时片。

参考文献

- [1] 张继冲,续九如,李福荣,等. 万寿菊的研究进展[J]. 西南园艺, 2005, 33(5):17-20.
- [2] 张继冲. 万寿菊雄性不育的形态学特征及染色体数目研究[D]. 北京:北京林业大学, 2006.
- [3] 张妮. 万寿菊属植物染色体核型分析及万寿菊 *psv* 基因遗传转化体系影响因素的研究[D]. 上海:上海交通大学, 2012.
- [4] 齐迎春,周光来,高扬. 孔雀草根尖压片技术及染色体形态分析研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2008, 26(3):261-265.

Optimization of Microscope Observation Method on Root-tip Chromosomes of Marigold

ZHAO Qing, TANG Dao-cheng

(Plateau Flower Research Center, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Taking the root-tip of *Tagetes erecta* L. 'QU2-2' as the experimental material, the material taking time, length of the root, material pretreatment method, dissociating time, dyeing time and squashing tools were screened and optimized. The results showed that using indoor root culture, observed the high-quality images of the chromosomes of root-tips at 9:14, 1.0 cm of the root length, the cool water pretreatment (0~4℃), 1.0 mol/L HCl for dissociation in 7 minutes, dyeing in 25 minutes, squashing the slides with a rubber head pencil, could observe clear mitotic prometaphase.

Key words: *Tagetes erecta* L.; root-tip; chromosome; mitotic split-figure