

文章编号: 1674 - 7054(2012)02 - 0135 - 03

木薯嫩叶染色体的制片方法

凡杰^{1,2}, 安飞飞², 郑峰^{1,2}

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 采用改良苯酚品红压片法, 对华南 124 多倍体木薯品种的嫩叶染色体标本制备方法进行了探讨, 比较了 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉 3 种温度 3 种时间的预处理效果、不同的解离方法以及取样部位对制片效果的影响。结果表明, 于上午 9:00 ~ 10:00 摘取 1.5 ~ 2 cm 长的嫩叶, 用 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预处理 4 h, 再置于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中, 于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解离 1 h, 挑取嫩叶中部叶肉用改良苯酚品红染色, 然后进行压片观察, 能获得分散良好、清晰的染色体图像。

关键词: 木薯; 染色体制片; 嫩叶

中图分类号: S 533 文献标志码: A

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 系大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属 (*Manihot* Miller) 植物, 其块根富含淀粉, 素有“淀粉之王”的美称。木薯的染色体数为 $2n = 36$ ^[1], 为二倍体作物, 人们通过人工诱导的方法也培育出了一些多倍体品种, 如: 华南 205 多倍体、华南 6068 多倍体、华南 124 多倍体等。而人工诱导的多倍体多属于嵌合体^[2], 需要鉴定其倍性, 寻找稳定遗传的多倍体。由于某些木薯品种生根比较困难, 以根尖为材料对其进行倍性鉴定, 存在一定的局限, 选用嫩叶则比较方便。目前, 对木薯根尖染色体的观察技术已有报道^[3-4], 但嫩叶染色体的制片方法报道很少, 且不尽详细^[4]。本实验以华南 124 多倍体木薯品种的嫩叶为研究材料, 采用改良苯酚品红染色法进行压片, 旨在摸索一套行之有效的木薯嫩叶染色体的制片方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 选用中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质圃中的华南 124 (SC124) 多倍体的嫩叶为材料, SC124 茎秆粗壮, 芽生长速度较快, 便于取材。

1.2 方 法

1.2.1 **取材** 将切成 10 cm 长的 SC124 多倍体茎段洗净, 置于人工气候箱中进行水培, 白天温度 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 光照 16 h, 晚上温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 黑暗 8 h, 湿度 50%。2 周后, 于上午 9:00 ~ 10:00^[5] 摘取刚长出的 1.5 ~ 2 cm 长的嫩叶作为实验材料。

1.2.2 **预处理与固定** 按文献 [4] 的方法, 使用 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉进行预处理, 处理时间及温度见表 1, 然后将嫩叶置于卡诺固定液中固定 24 h。

表 1 8-羟基喹啉预处理的时间及温度

处理编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
时间/h	2	3	4	2	3	4	2	3	4
温度/ $^{\circ}\text{C}$	25	25	25	4	4	4	35	35	35

1.2.3 **解离** 采用 3 种解离方法解离木薯嫩叶, 并进行时间梯度试验, 共 9 个处理。方法 A: $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸解离, 处理时间分别为 30、45、60 min; 方法 B: $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸解离, 处理时间分别为

收稿日期: 2012 - 03 - 07

基金项目: 现代农业产业技术体系 973 项目 (2010CB126606); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (PZS - 062)

作者简介: 凡杰 (1984 -), 男, 湖北襄阳人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 安飞飞 (1985 -), 女, 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所助理研究员。E-mail: aff85110@163.com

15, 18, 20 min; 方法 C: 25 °C $\mu = 2.5\%$ 纤维素酶 + $w = 2.5\%$ 果胶酶解离, 处理时间分别为 30, 45, 60 min。每个水平处理 10 片嫩叶。

1.2.4 染色体观察 嫩叶经预处理、固定、解离后, 用改良苯酚品红染色液染色 5 min, 压片后在油镜下观察并拍片。

2 结果与分析

2.1 嫩叶不同部位取材效果比较 对叶尖、叶中部、叶基部(靠近叶柄处)的分裂相、细胞密度、纤维含量进行了观察, 结果见表 2。从表 2 可知, 叶尖部虽然可以找到较多处于分裂中期的染色体, 但其细胞密度大, 细胞间连接紧密, 压片时不易分散, 且纤维含量高, 往往干扰视野; 叶基部的细胞大多已经停止分裂, 分裂相很少; 叶片中部的细胞分裂相多, 染色体分散, 纤维干扰少, 视野较清晰。因此, 选用嫩叶中部叶肉进行染色压片, 效果较理想。

表 2 嫩叶不同部位的比较结果

部位	分裂相数	细胞密度	纤维含量
叶尖	很多	很密	多
中部	多	密	少
基部	很少	宽松	少

2.2 不同预处理效果的比较 从表 3 可以看出, 在不同时间与温度的处理组合中, $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉 4 °C 处理 4 h 效果最佳, 中期分裂相较多, 染色体分散且染色体质量较好; 其次是 25 °C 处理 4 h 和 4 °C 处理 3 h; 最差的是 35 °C 处理 2 h。4 °C 有利于 8-羟基喹啉对中期相的积累, 温度升高则效果减弱。

表 3 8-羟基喹啉不同时间和温度处理的结果

处理编号	中期相积累	染色体分散情况	染色质量	总体效果
1	+	-	-	-
2	+	+	-	+
3	++	+	+	++++
4	+	-	-	-
5	++	+	+	++++
6	++	++	++	+++++
7	-	-	-	-
8	+	-	-	-
9	+	+	+	+++

注: ++ 表示中期相积累多, 染色体分散效果好或染色体质量好; + 表示中期相积累较多, 染色体分散较好或染色体质量较好; - 表示中期相积累少, 染色体分散效果不好或染色体质量差。

2.3 解离方法的确定 不同解离方法的处理结果见表 4。从表 4 可以看出, 25 °C 使用酶解离 30 min(处理 7), 细胞解离比较充分, 但压片后发现细胞已破裂, 未观察到染色体, 且随着时间延长, 部分叶片开始解体; 60 °C 水浴 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸解离 20 min(处理 6) 解离效果较好, 细胞均匀分散, 但有的会出现染不上色的情况; 25 °C, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液解离 60 min(处理 3), 细胞均匀分散, 容易着色。总体来说, 25 °C, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液解离 60 min 效果较好。

表 4 不同解离方法处理的结果

处理编号	处理叶片数/片	充分解离叶片数/片	充分解离叶片所占比例/%
1	10	2	20
2	10	5	50
3	10	8	80
4	10	1	10
5	10	6	40
6	10	9	70
7	10	8	80
8	10	10	100
9	10	10	100

2.4 染色体观察 压片后先置于低倍镜下观察,在发现好的分裂相后,再转到油镜下仔细观察并计数。结果发现,华南124多倍体部分细胞中的染色体为二倍体(见图1)部分细胞中的染色体为四倍体(见图2)二倍体细胞约占40%,四倍体细胞约占60%。鉴定其多倍体为嵌合体。

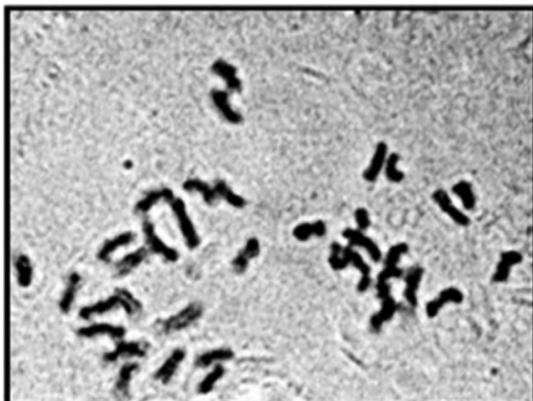


图1 华南124木薯二倍体染色体数($2n=36$)

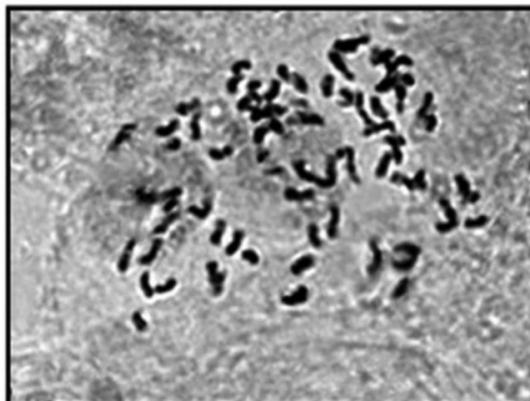


图2 华南124木薯四倍体染色体数($4n=72$)

3 讨 论

以木薯根尖为材料,60℃,1 mol·L⁻¹盐酸只需解离15 min^[3],而木薯嫩叶则需要20 min,这可能是由于木薯嫩叶的纤维含量较高的原因。嫩叶用盐酸解离20 min后,有时会染不上色(使用酶解离未发生这种情况),这可能是氯离子残留过多的原因。虽然嫩叶细胞小,染色体分散程度不如根尖,但并不影响染色体观察,所以用改良苯酚品红染色压片法观察木薯嫩叶染色体是可行的。其技术要点为:上午9:00~10:00摘取1.5~2 cm长的木薯嫩叶,用0.002 mol·L⁻¹的8-羟基喹啉4℃预处理4 h,置于卡诺固定液中固定24 h,常温下置于1 mol·L⁻¹盐酸溶液中解离60 min,蒸馏水漂洗3次后浸泡30 min,挑取嫩叶中部细胞,用改良苯酚品红染色5 min,然后压片、镜检、拍照。

参考文献:

- [1] JENNINGS D L. Cassava *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) [J]. African Agri J, 1994(10): 34-39.
- [2] 陈显双, 韦丽君, 田益农, 等. 木薯多倍体植株的诱导研究[J]. 热带农业科学, 2008, 28(1): 17-20.
- [3] 冯斗, 王建岭, 席世丽, 等. 木薯根尖染色体的观察技术[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3711-3712.
- [4] 陈显双, 韦丽君, 杨琴, 等. 木薯染色体数目的鉴定技术[J]. 广西热带农业, 2009(4): 1-3.
- [5] 曹芳, 阮金玉, 郑惠宝, 等. 取材时间和预处理方法对大蒜有丝分裂指数的影响[J]. 漳州师范学院学报: 自然科学版, 2010(4): 113-117.

Chromosome Observation Method for Cassava Tender Leaves

FAN Jie^{1,2}, AN Fei-fei², ZHENG Feng^{1,2}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 571737, China;
2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, CATAS, Danzhou 571737, China)

Abstract: Modified phenol fuchsin squashing method was used to prepare chromosome specimens of tender leaves of polypoidy cassava SC 124. The tender leaves were pretreated with 0.002 mol·L⁻¹ 8-hydroxyquinoline at three different temperatures for different time by using different solution methods and sampled from different parts of the plant. The tender leaves collected 1.5-2 cm long in the morning at 9:00 am-10:00 am were pretreated with 0.002 mol·L⁻¹ the 8-hydroxyquinoline at 4℃ for 4 h, and then put in 1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid solution at 25℃ for 1 h for maceration, and the mesophyll in the central part of the tender leaves were stained with modified phenol suchsin and then squashed for observation. This method produced a well dispersed, clear chromosome image.

Key words: cassava; chromosome preparation; tender leaves