

文章编号: 1674-7054(2013)02-0198-05

文心兰染色体的制片技术

赵羿鸾^{1,2}, 黄琴^{1,2}, 贾贤^{1,2}, 王颖², 吴坤鑫², 陈雄庭²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要: 以文心兰根尖为材料, 采用常规制片法, 对染色体制片的取样时间、预处理液、固定液、解离时间、染色液及染色时间进行了研究。结果表明: 文心兰组织培养苗培养温度为 25 ℃; 适宜的取样时间为 5~6 月的上午 10:00; 材料放入 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秋水仙素 + $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉混合液中室温预处理 4 h 的效果最好, 用卡诺氏液固定 12~24 h, 可获得较多的细胞分裂相, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸 60 ℃ 水浴锅中恒温解离 8 min 的效果较好, 用改良的苯酚品红染色制片效果最好。

关键词: 文心兰; 根尖; 染色体; 制片技术

中图分类号: Q 343.2

文献标志码: A

文心兰(*Oncidium flexuosum* Lodd) 属热带附生兰, 是兰科(Orchidaceae) 瘤瓣兰属(*Oncidium* Sw.) 的热带复茎性陆生兰, 又名舞女兰、跳舞兰, 是重要的观赏植物之一, 也是世界上重要的切花品种之一^[1-3]。文心兰生长于美洲的热带地区, 地理分布广泛, 寒带、温带和热带等都有分布, 哥伦比亚、美国、秘鲁及厄瓜多尔等国家^[4-5]的种类最多。近 10 年来, 国内外对文心兰的组织培养及快速繁殖技术的研究占较大比例, 其次是栽培技术及生理方面的研究, 育种与采后的研究滞后^[6]。文心兰染色体数目从 $2n = 56$ 到 $2n = 140$ 不等^[7], 文心兰染色体制片用常用制片方法效果不理想, 其中, 取材时间、解离时间、染色液的选用以及染色时间等对文心兰染色体制片有重要的影响。目前, 对文心兰的染色体制片技术鲜有报道。因此, 笔者对文心兰染色制片技术进行了研究, 旨在为开展文心兰细胞学研究、弄清染色体数目、进行新品种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 文心兰(Wilsonara Tropic Breeze ‘Everglades’) 组织培养苗, 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。实验材料取其根尖。

1.2 实验方法 文心兰组织培养苗培养温度为 25 ℃。于 5~6 月份上午 8:00~11:00 取文心兰根尖(长度约为 1~5 mm), 每隔 1 h 取样 1 次。样品分别用 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素、饱和对二氯苯溶液, $V_{1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{秋水仙素}} : V_{0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{8-羟基喹啉}} = 1 : 1$, 进行预处理, 室温下预处理时间分别为 3 h, 5 h。样品预处理后, 用蒸馏水冲洗 4~5 次, 然后转入固定液中。固定液分别为 $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{冰醋酸}} = 3 : 1$, $V_{\varphi=95\% \text{乙醇}} : V_{\text{冰醋酸}} = 3 : 1$ (卡诺氏液), $V_{\text{无水酒精}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{冰醋酸}} = 6 : 3 : 1$ ^[8]。解离采用酸解法和酶解法。酸解法: 将材料浸泡于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸中, 并于 60 ℃ 水浴锅中恒温水浴 6, 8, 10, 12 min; 酶解法: 将材料置于室温 37 ℃ 下 $w = 1.75\%$ 的纤维素酶和 $w = 3.75\%$ 的果胶酶等比例混合溶液中, 时间梯度为 4, 5, 6, 7 h。利用常规压片法对处理的材料进行染色^[9-10], 取解离好的根尖用蒸馏水洗 3~5 次, 置于干净的载玻片上,

收稿日期: 2013-03-06

作者简介: 赵羿鸾(1989-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 陈雄庭(1957-), 男, 广东高州人, 研究员, 博士生导师, E-mail: cxt66988063@163.com

吸去多余水分,保留分生区 0.2~0.3 mm,分别加铁矾苏木精、醋酸洋红、I-KI 和改良的苯酚品红^[11] 1~2 滴染色液,将材料用镊子夹碎弄散,去杂质,染色 5 min(保证染色液不干,材料全部浸在染色液中)后盖上盖玻片,注意排出气泡,先用大拇指按压一下,再用带橡皮的铅笔轻轻敲打,使组织充分分散后,使用显微镜观察染色体的数目,并对分裂相较好的细胞拍照。

2 结果与分析

2.1 不同取材时间染色体分裂相的比较 染色体制片选用的材料,一般为细胞分裂旺盛的根尖生长点,最佳时期是细胞分裂中期,此时期的染色体浓缩排列在赤道板上清晰可辨,有利于染色体的计数和观察。不同植物、不同季节、不同时期的细胞旺盛分裂的时间是不同的。本实验取材时间为 5~6 月份,经过多次试验证明(图 1),培养温度为 25℃,上午 10:00 中期分裂相最多,是制作文心兰染色体压片的最佳时期;上午 8:00 未见染色体;上午 9:00 染色体螺旋程度不够;上午 11:00 染色体变长,分 2 级或已分裂成 2 个细胞(见图 1)。

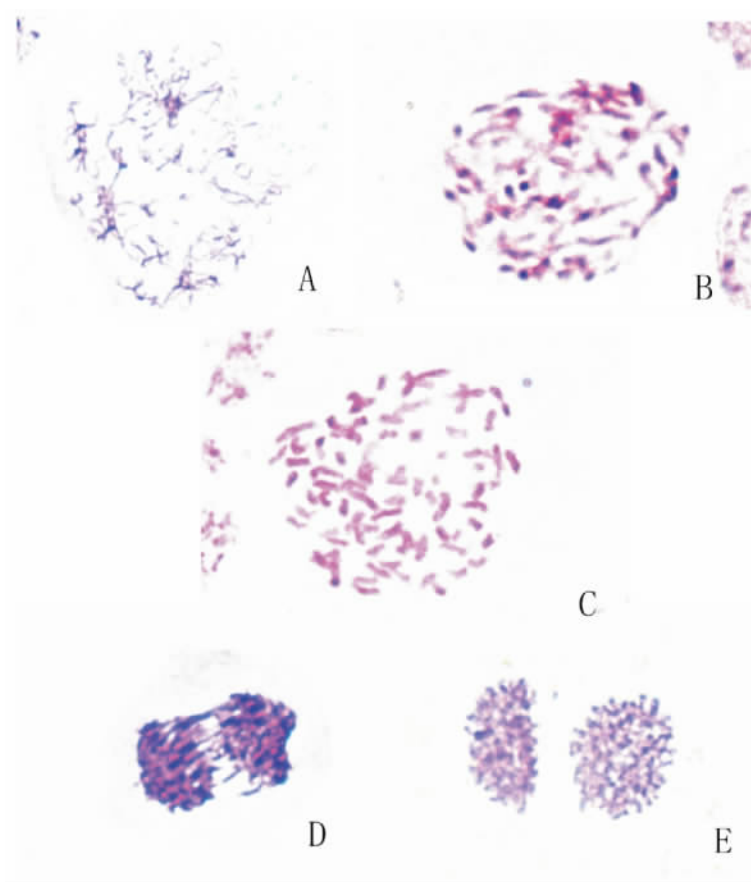


图 1 文心兰根尖不同取材时间的染色体制片效果比较

A: 上午 8:00 细胞多数处于细胞分裂间期; B: 上午 9:00 细胞多数处于细胞分裂前期;

C: 上午 10:00 细胞多数处于细胞分裂中期; D, E: 上午 11:00 细胞多数处于细胞分裂后期和末期

Fig. 1 Comparison of chromosome preparation effects of of *Oncidium*'s root tip at different sampling time.

A: More cells in interphase at 8:00 am; B: More cells in prophase at 9:00 am;

C: More cells in metaphase of 10:00 am; D, E: More cells in anaphase and telophase at 11:00 am

2.2 不同药剂和不同预处理时间的效果比较 为了便于对有丝分裂期间染色体形态的观察和数目统计,先对供试的根尖材料进行预处理,抑制细胞中期纺锤丝形成,加快染色质的浓缩与螺旋,有效地分散染色体。由表 1 可见,采用 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秋水仙素 + $0.002\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉混合液,预处理 4 h 时的效果最好,细胞分裂相较多,染色体螺旋程度适中且形态清晰易辨。秋水仙素抑制纺锤丝的形成,但不阻碍细胞前期的分裂,使细胞只能进入分裂中期而不能进入分裂后期,从而使大量的中期细胞积累。饱

和对二氯苯与秋水仙素的作用机理相似,但染色体过度浓缩,重叠较多,不利于观察和计数。8-羟基喹啉中期分裂相不多,但与秋水仙素共同作用下效果最好。

表 1 不同药剂和不同预处理时间的效果比较

Tab. 1 Comparison of pretreatment effects of different pretreatment chemicals and different treatment time

预处理药剂 Pretreatment chemicals	预处理时间 /h Pretreatment time		
	3	4	5
0.002 mol · L ⁻¹ 8-羟基喹啉 0.002 mol · L ⁻¹ 8-hydroxyquinoline	染色体浓缩程度不足,细胞分散程度差 Chromosome not well condensed, and the cells poorly dispersed	细胞分裂相少,染色体螺旋程度适宜,形态模糊 Few cells in metaphase, chromosome spiral coiling appropriate, morphology not clear	染色体过度浓缩,形态模糊 Chromosome condense excessively, morphology not clear
1 g · L ⁻¹ 秋水仙素 1 g · L ⁻¹ colchicine	染色体浓缩程度不足,细胞分散程度较差 Chromosome not well condensed, and the cells not highly dispersed	细胞分裂相比较少,染色体螺旋程度适宜,形态较清晰 Fewer cells in metaphase, chromosome spiral coiling appropriate, and the morphology is much clear	染色体过度浓缩,形态模糊 Chromosome condense excessively, and the morphology is not clear
饱和对二氯苯 Saturated p-dichlorobenzene	染色体浓缩程度不足,细胞分散程度较好 Chromosome not well condensed, and the cells highly dispersed	细胞分裂相少,染色体螺旋程度适宜,形态清晰 Few cells in metaphase, chromosome spiral coiling appropriate, and the morphology clear	染色体过度浓缩,形态模糊 Chromosome condense excessively, and the morphology not clear
1 g · L ⁻¹ 秋水仙素 + 0.002 mol · L ⁻¹ 8-羟基喹啉混合液 1 g · L ⁻¹ colchicine + 0.002 mol · L ⁻¹ 8-hydroxyquinoline	染色体浓缩程度不足,细胞分散程度好 Chromosome not well condensed, and the cells highly dispersed	细胞分裂相比较多,染色体螺旋程度适宜,形态清晰 More cells in metaphase, chromosome spiral coiling appropriate, and morphology clear	染色体过度浓缩,形态模糊 Chromosome condense excessively, the morphology not clear

2.3 不同固定液对细胞完整性的影响 固定是为了使固定药剂迅速渗入组织并将细胞杀死,使其形态结构及其他结构都尽量保持生活时状态,其方法主要有物理方法和化学药剂处理等。本实验中,文心兰根尖需常温固定 12~24 h,即分别放在 φ=95%、85%、70% 的酒精中 0.5 h 后染色,如需存放,可将其转入 φ=70% 的酒精 4℃ 下保存,在观察时最好再固定 1~2 h。结果(见表 2)表明,固定液Ⅱ卡诺氏液 (V_{φ=95%乙醇}:V_{冰醋酸}=3:1) 固定效果最好,细胞完整且界线清晰。

表 2 不同固定液的固定效果比较

Tab. 2 Comparison of fixation effect among different fixation buffers

固定液 Fixation buffer	固定效果 Effect of fixation
V _{甲醇} :V _{冰醋酸} =3:1 V _{Methanol} :V _{acetic acid} =3:1	细胞不够完整,且细胞缩小 The cell not complete, and shrank
V _{φ=95%乙醇} :V _{冰醋酸} =3:1 V _{φ=95% ethanol} :V _{acetic acid} =3:1	细胞完整度好,界线清晰,大小不变 Cell integrity good, boundaries clear, cell size the same
V _{无水酒精} :V _{氯仿} :V _{冰醋酸} =6:3:1 V _{Anhydrous alcohol} :V _{chloroform} :V _{acetic acid} =6:3:1	细胞不完整,界线不清晰 The cell not complete, boundaries not clear

2.4 不同解离药剂及解离时间的解离效果比较 解离是使细胞中分生组织的果胶质分解,将细胞壁软

化或使其部分分解,这样便于细胞压片及染色体的分散。若解离不好,就会导致后面的染色以及染色体计数的困难,因此,适宜的解离条件至关重要。采用酶解法,原生质体可以从细胞壁里压出,但操作过程繁琐、解离时间较长,且不易控制。时间过短,酶解不充分,细胞分散不好;时间过长,染色体容易丢失,不好计数。室温下酶解4~5 h,细胞分散程度不够,染色体未散开;酶解6~7 h,细胞分散程度较好,但染色体有缺失;酶解8 h以上,细胞分散程度好,染色体严重缺失。笔者经多次试验后,发现采用酸解法简便易操作,且染色效果较好。 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸解离6 min软化不够,细胞粘连,不利于后期的观察计数;解离8 min软化较好,单细胞数量较多,分散效果较好,且染色体清晰可辨,分裂相较多;解离10 min,细胞过度分散,部分细胞破裂,染色体丢失(见图2)。

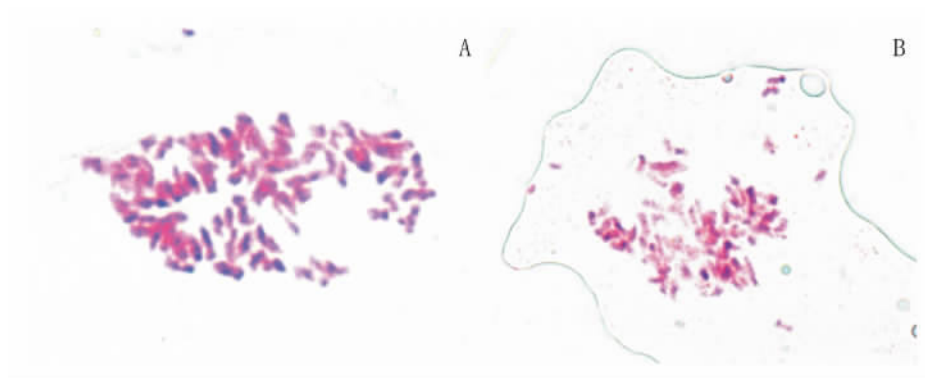


图2 不同解离时间的效果比较

A. 解离8min; B. 解离10min

Fig. 2 Comparison of cell dissociation among different time durations

A: Cell dissociation for 8min; B: Cell dissociation for 10min

2.5 不同染色液的染色效果比较 实验结果表明,醋酸-盐酸洋红的染色较深,细胞质着色,不易分辨染色体;I-KI的染色较浅,不利于观察计数;铁矾-苏木精的染色过深,不易计数,且操作繁琐;改良的苯酚品红的染色效果较好,细胞核和染色体染色较深,细胞质不着色,对比清晰,染色体易分辨,且操作简单,并可长期保存,是最好的染色液。

2.6 染色体观察 将压好的染色体片置于显微镜下观察,由低倍镜到高倍镜,分别为 $10\times$ 、 $25\times$ 、 $40\times$,最后置于 $100\times$ 油镜下仔细观察并计数。文心兰因品种不同,染色体数目也不尽相同。本实验采用的文心兰材料染色体数量($2n=76$)如图3所示。

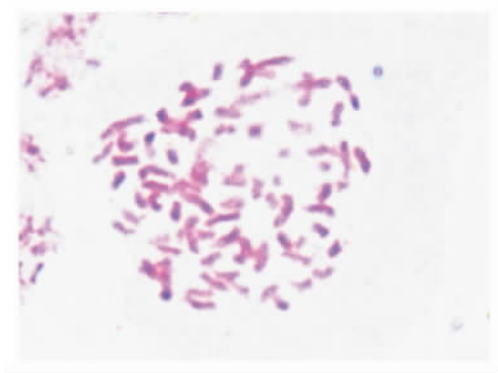


图3 文心兰染色体数($2n=76$)

Fig. 3 Chromosome number of *Oncidium* ($2n=76$)

3 结论

用根尖制片是一种传统、高效的鉴定染色体的方法,此法便于深入细致地进行细胞遗传的研究。因此,笔者以根尖为材料,采取常规制片法对文心兰的取材时间、预处理液、固定液、解离时间、染色液及染

色时间进行了研究。结果表明:培养箱温度为 25 ℃,5~6 月份的上午 10:00 是文心兰根尖制作染色体的最佳时间;1 g · L⁻¹的秋水仙素 + 0.002 mol · L⁻¹的 8-羟基喹啉的混合液处理 4 h 的预处理效果最好;选用卡诺氏液将材料固定 12~24 h,可以得到较多的处于细胞分裂中期的分裂相。采用酸解法在水浴锅中 60 ℃ 恒温解离 8 min 的解离效果较好,用改良的苯酚品红溶液染色效果好,且染色体清晰可辨。由于文心兰品种繁多,不同种类的文心兰染色体制片存在一定差异,因此,其染色体制片技术的研究较罕见。本研究结果填补了文心兰 *Wilsonara Tropic Breeze* 'Everglades' 染色体制片技术的空白。

参考文献:

- [1] 段左俊,白旭华.文心兰的研究现状[J].热带林业,2006,34(1):24-26.
- [2] 潘英文,林明光,陈施明.文心兰切花产业化栽培基质的筛选研究[J].热带农业科学,2009,29(7):32-35.
- [3] 叶炜,周辉明,罗庆国,等.文心兰不同类型外植体对启动培养影响[J].三明农业科技,2009(2):15-16.
- [4] 陈心启,吉占和,郑远方.中国兰花全书[M].北京:中国林业出版社,1998:226.
- [5] 李江渝,莫饶,朱文丽,等.文心兰花梗外植体形态建成初步研究[J].热带农业科学,2010,30(10):33-36.
- [6] 刘晓荣,王碧青,朱根发.文心兰研究进展[J].亚热带植物科学,2007,36(3):85-90.
- [7] 吕复冰,周芳,朱根发,等.文心兰品种染色体数目分析[J].广东农业科学,2010,11:209-214.
- [8] 郑连生.巴西橡胶树叶片染色体的制片方法——石炭酸品红压片法(Carbol-fuchsin)[J].福建热作科技,1983(1):27-28.
- [9] 李懋学,张学方.植物染色体研究技术[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,1991:31-46.
- [10] 李贵全.细胞学研究基础[M].北京:中国林业出版社,2001:36-44.
- [11] 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.

Preparation of Microscopic Slides of *Oncidium* for Chromosome Observation

ZHAO Yiluan^{1,2}, HUANG Qin^{1,2}, JIA Xian^{1,2}, WANG Ying², WU Kunxin², CHEN Xiongting²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: The root tips of *Oncidium flexuosum* Lodd were used to study the effects of sampling time, pretreatment chemical solution, fixed solutions, hydrolyzing time and staining on the chromosome observation slides. The results showed that the optimal temperature for tissue culture of the *Oncidium* was at 25 ℃ and that the optimal sampling time of root tip was about 10:00 a. m in May to June. The samples were pretreated with a solution of 0.1% colchicine and 0.002 mol · L⁻¹ 8-hydroxyquinoline at room temperature for 4 hours, and fixed with the Carnoy's fixative for 24 hours, and then hydrolyzed with 1 mol · L⁻¹ HCl for 8 min at 60 ℃ and stained with modified Carbol fuchsin solution. The slides thus prepared for chromosome observation were proved to be optimum.

Key words: *Oncidium flexuosum* Lodd; root tip; chromosome; preparation of microscopic slides