

百日草根尖和花药愈伤组织染色体制片技术

叶要妹, 陈天花, 齐迎春, 杨涛

(华中农业大学园艺林学学院 教育部园艺植物生物学重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 以种子萌发根尖和花药愈伤组织为材料, 研究了取样时间、预处理方法对百日草染色体制片的影响。结果表明: 根尖上午 8:00~9:00, 花药愈伤继代 3~5 d 上午 9:00~10:00 为最佳取样预处理时间; 采用三种药剂预处理活体根尖, 以 4 °C 下饱和对二氯苯溶液或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉液预处理 8 h 效果最佳, 花药愈伤则以饱和对二氯苯溶液预处理 6 h 效果最佳。本实验的预处理温度是固定的, 可克服预处理随季节和时间温度的变化而带来的不稳定性, 且百日草花药愈伤染色体观察为首次报道。

关键词: 百日草; 根尖; 花药愈伤组织; 预处理; 染色体制片

中图分类号: Q94-336; S681.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)05-0673-03

Chromosome technique of root tips and anther callus in *Zinnia elegans*

YE Yao-Mei, CHEN Tian-Hua, QI Ying-Chun, YANG Tao

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology of Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The roots of germinating seeds and anther callus were used to study the effects of the sampling time, the pretreatment on the slide-preparation of the chromosomes in *Zinnia elegans* Jacq. The results indicated that the optional root-sampling time was about 8:00~9:00 am, anther callus about 9:00~10:00 am for 3~5 d. Of the three chemicals used to pre-treating the intravital root tips, P-Dichlorobenzene solution or 0.002 mol/L 8-Hydroxyquinoline for 8 hours at 4 °C had the better effect, and anther callus P-Dichlorobenzene solution for 6 hours at 4 °C. These methods indicated that the number of metaphase chromosomes appeared more and chromosome spread well. The temperature of pretreatment in the study was fixed, overcame instability of effect with variance of season and time. Observation of chromosome of anther callus in *Zinnia elegans* Jacq. was first reported.

Key words: *Zinnia elegans*; apical root cell; anther callus; pretreatment; preparation of chromosome

百日草 (*Zinnia elegans* Jacq.) 原产美洲, 以墨西哥为分布中心。我国各大中城市常见栽培, 但种子都依赖国外进口, 且价格昂贵, 每年需要花费大量外汇, 因此, 培育具有自主知识产权的百日草新品种显得尤为重要。但是, 要培育新品种, 必须有育种材料。花药培养是创新育种材料的一种重要手段, 它可迅速得到纯合的双单倍体, 大大加速田间育种进程。通过鉴定染色体的来源和倍性方法, 可以识别花药培养的材料好坏。染色体是遗传物质的载体, 要观察染色体数目、大小、形态结构, 依赖于染色体

制片技术。在染色体制片技术的各个环节中, 预处理至关重要。预处理的效果优良, 既可以得到较多的处于早中期分裂相的染色体, 又可以使染色体分散开, 便于核型分析。预处理最常用的化学药物有饱和对二氯苯、8-羟基喹啉、秋水仙素等。低温也作为预处理, 不同的植物所需的最适宜温度不同, 如小麦、油菜 1~5 °C, 水稻、玉米 6~8 °C, 处理时间在 20~40 h 之间(利容千, 1989)。

国内外有报道百日草染色体数目都为 $2n=24$ (Ramalingam. 等, 1971; 胡成华等, 1991; 黄少甫等,

收稿日期: 2006-01-20 修回日期: 2006-11-18

基金项目: 国家“948”项目(2003-Z36)[Supported by the National“948”Plan of China(2003-Z36)]

作者简介: 叶要妹(1965-), 女, 湖南平江人, 硕士, 副教授, 在职博士生, 主要从事园林植物栽培、育种研究。(E-mail)yymld@mail.hzau.edu.cn.

1995;陈瑞阳等,2003)。黄少甫等(1995)在三种观赏植物的染色体研究一文中介绍到百日草根尖采用对二氯苯预处理 4h 有清晰的染色体,但未交待当时预处理环境的温度。实际上化学药剂处理的适宜时间依不同的季节、预处理环境温度而不同,一般温度高有利于药剂的渗透。本试验以百日草根尖和花药愈伤为材料,从取材时间、低温和药剂结合预处理等进行了比较,目的在于探索出一套适合百日草根尖和花药愈伤组织的染色体制片技术。

1 材料与方 法

1.1 材料

本试验采用的是百日草 J8 栽培品种种子和自交系 S3 代的花药愈伤组织,种子购于甘肃酒泉绿洲种子公 司。

1.2 方法

1.2.1 取材时间 取百日草 J8 种子在培养室 25 ℃ 萌发 24 h 以上,待根尖长至 0.5~1 cm 时分别在上午 8:00、8:30、9:00、9:30、10:00、11:00 等时间取活体根尖,用清水洗净待处理。取第 3、5、7、10、15 d 不同继代时间的百日草花药愈伤组织为材料(张宝红等,1996),每次 9:00~10:00 取样。

1.2.2 预处理试验 活体根尖长至 0.5~1 cm 时进行预处理,设 3 种药剂:饱和的对二氯苯液处理 4 h、6 h、8 h(黄少甫等,1995;李光涛等,2002);0.05% 的秋水仙素液处理 5 h、7 h、9 h(张国莉等,2002);0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉液处理 4 h、6 h、8 h(杨起筒等,2003;陈庆富,2001)。花药愈伤采用饱和对二氯苯液处理 4 h、6 h、8 h。预处理温度为 4 ℃。弃处理液后,用卡诺氏固定液固定材料 18~24 h。

弃固定液,将材料用蒸馏水清洗 2~3 次后置于 1 mol/L 盐酸中,在 60 ℃ 条件下水浴 10 min。酸解处理后及时将材料清洗 2~3 次,然后取根尖 2 mm 左右或花药愈伤组织,用卡宝品红染色 20 min。将处理好的材料盖上盖玻片,在盖玻片上盖两层吸水纸,用橡皮擦轻敲盖玻片,使材料充分分散均匀,取效果较好的玻片显微镜下观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 取材时间和取材部位

取材部位必须是植株生长活跃,分裂旺盛的部

位,一般为根尖的生长点。细胞处于分裂中期时,染色体浓缩最短且形态特征清晰,此时取材制片有利于染色体的观察和计数。大多数植物适宜的取材时间为早上 8:00~11:30。经过反复试验,百日草根尖的取材时间在 8:00~9:30,处于中期分裂相细胞最多。在最佳时间前取材,多数细胞核着色均匀,看不见处于间期的染色体,或可见较长的染色体相互缠绕,每条染色体包含 2 条染色单体,核仁完整处于前期;在最佳时间后取材,则染色体长度增长,移向两极,有的细胞甚至分裂成 2 个细胞。百日草花药愈伤组织不同继代天数细胞分裂显著不同,继代后 3~5 d 取材,可确保有丝分裂指数较高,得到较多可观察、有价值的愈伤组织细胞。继代 7~10 d 后有丝分裂指数也较高,也可观察染色体并计数,但数量减少。继代 15d 后很难观察到染色体。

2.2 预处理效果比较

根尖 9 种预处理方法的处理效果可以看出,用饱和对二氯苯液处理 4 h,染色体收缩不足,相互之间容易粘连(图版 I:A);6 h 的染色体分裂相较多,但染色体过长且交叉、重叠的较多(图版 I:B);以饱和的对二氯苯处理 8h 的效果最好,可观察到较多的早中期细胞分裂相,得到的染色体形态清晰、分散度适中,染色体不易断裂且易分散在细胞表面(图版 I:C);用 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉液处理 4、6 h 和 8 h 的效果也较好,分别与饱和对二氯苯各个时间处理的染色体比较,染色体较长,缢痕区比较清晰,同样处理 4 h、6 h 的分散度不好,染色体交叉粘连的较多,8 h 处理的染色体适中(图版 I:D);用秋水仙素处理 5、7h 和 9 h 的染色体清楚,但分裂相较少,染色体过于收缩,主缢痕和次缢痕不清晰,各条染色体之间的形态差别不明显,无法作核型分析。

花药愈伤的三种处理中,以饱和对二氯苯处理 6h 的效果较 4 h、8 h 的好,染色体形态清晰、分散度适中,染色体不易断裂且易分散在细胞表面,观察到百日草花药愈伤组织继代后染色体的数目有单倍体 12(图版 I:E)、二倍体 24(图版 I:F)、三倍体 36(图版 I:G)、四倍体 48(图版 I:H)。

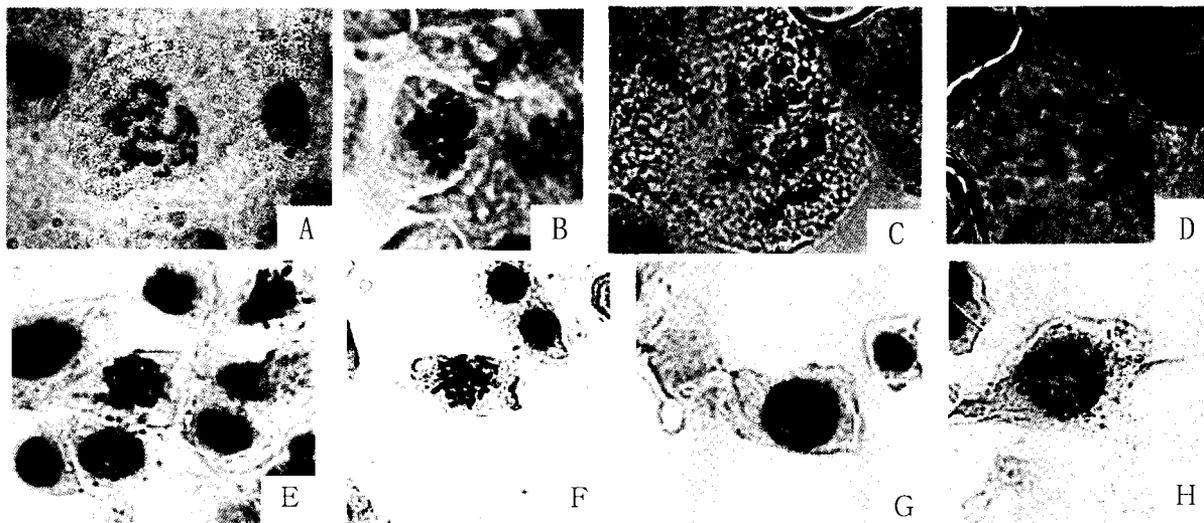
3 讨论

3.1 取材时间

取材时间的准确是染色体制片的关键。经过反复验证发现,百日草的根尖最佳取材时间在 8:00~

9:00。但在实验过程中也发现外界的环境,栽培品种的差异对取材时间都有影响。例如冬季 9:00 左右取材,可观察到较多的中期相;而春季取材的时间则需要稍稍提前,在 9:00 时取材基本上只能观察到末期相甚至细胞已经完成分裂。栽培品种差异的影

响表现在不同的栽培品种其发芽势不同,而且有丝分裂周期不完全相同,即同时间选取的材料可能其细胞处于不同的有丝分裂时期。为避免这种情况的发生,对取材的时间设立时间梯度即能保证得到适宜的材料。



图版 I 上排:根尖染色体形态图 对二氯苯处理 A:4h; B:6 h; C:8 h; 八羟基喹啉液处理 D:8 h;
下排:花药愈伤细胞染色体数目; E:12; F:24; G:36; H:48。

Plate I Up: The morphology of chromosome P-Dichlorobenzene treatment A: 4 h, B: 6 h, C: 8 h. 8-Hydroxyquinoline treatment D: 8 h. Down: The number of chromosome of anther callus cells E: 12; F: 24; G: 36; H: 48.

3.2 预处理

从百日草根尖不同预处理方法的比较和经济节约的原则来看,用饱和对二氯苯液或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉液在 4 °C 下处理 8 h 的效果最佳,染色体分散度高,分裂相较多,染色体浓缩适中。本实验也采用了饱和对二氯苯液在 4 °C 下及室内环境下各处理 4 h,但效果比黄少甫等(1995)报道的要差,这可能与当时黄少甫等实验时室内的温度有差异相关,本实验的预处理温度是固定的,且为低温。低温和药剂的结合,不会随着季节和时间的不同而不同,这可克服预处理随季节和时间温度的差异而带来效果的不稳定性。

4 结论

通过本试验总结出百日草根尖和花药愈伤组织的压片方法,即选取 8:00~9:00 根尖或继代 3~5 d 上午 9:00~10:00 的花药愈伤组织→根尖 4 °C 下饱和对二氯苯或 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉液处理 8 h,花药 4 °C 下饱和对二氯苯预处理 6 h→卡诺氏固

定液固定材料 18~24 h→1 mol/L 盐酸 60 °C 水浴 10 min→卡宝品红染色 20 min,常规压片。采用这种程序进行百日草根尖和花药愈伤细胞压片,可获得理想的结果。该方法简单、可靠、稳定、重复性强,且成本低、效率高。

参考文献:

- 陈瑞阳,宋文芹,李秀兰,等. 2003. 中国主要经济植物基因组染色体图谱(第 3 册)[M]. 北京:科学出版社:235-236
- 利容千. 1989. 中国蔬菜植物核型研究[M]. 武汉:武汉大学出版社:30
- Chen QF(陈庆富). 2001. Karyotype analysis of five *Fagopyrum* species native to China(五个中国荞麦种的核型分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **21**(2): 107-110
- Hu CH(胡成华), Fang JZ(方建忠). 1991. Karyotype analysis of chromosome in *Zinnia elegans*(百日草染色体核型分析)[J]. *J Nanjing Univ*(南京大学学报), **27**(2): 412-414
- Huang SP(黄少甫), Zhao ZF(赵治芬). 1995. Studies on chromosomes of three garden plants(三种观赏植物的染色体研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **15**(1): 43-46
- Li GT(李光涛), Liang T(梁涛), Zhang ML(张梅莉). 2001. Studies on karyotype of 5 species of *Camellia*(五种山茶属植物的核型研究)[J]. *J Tea*(茶叶), **27**(2): 17-21
- Ramalingam R S, Scree Rangasomy S R, Raman V S. 1971. The cytology of an interspecific hybrid in *Zinnia*[J]. *Cytologia*, **36**: 522-528
- (下转第 740 页 Continue on page 740)

察中,其从花侧面进入花内的频率达 90%,极少数从花顶端钻入。由此可见,单性木兰这种花瓣顶端半合拢状的结构特征影响着昆虫的访花行为。单性木兰雄花和雌花均有芳香气味,但雌花的访花昆虫种类和访花频率比雄花少,且雌花和雄花共有的访花者仅 6 种,被证实传粉昆虫只有花蓟马,说明雌花授粉的机会少,这可能是其结实率较低的主要原因。

(3)许多因素如光照、大风、温度、阴雨天气等都可以影响访花者的数量、行为和频率并进而影响植物的传粉和座果(Wyatt,1983)。由于历年气象资料的缺乏,参照临近地区的历年气象记录推算出木论国家级自然保护区 4~8 月为雨季,降雨量占全年的 73.7%(郑颖吾,1999)。从连续两年的气象因子观测并参照历年气象记录,单性木兰花期正值雨季,这就有可能影响其访花种类、数量和传粉效率,从而影响其结实率。同时,同花期植物种类和数量也会对单性木兰的访花者种类和数量、访花频率产生影响。因此,对传粉不利的花期天气、传粉昆虫种类少及存在同花期植物的竞争和外界不良环境是单性木兰濒危的一个重要原因。

参考文献:

- 杨成华,孔志红. 2003. 9 种木兰科种子的场圃发芽率试验[J]. 贵州林业科技,31(3):19-43
- 郑颖吾. 1999. 木论喀斯特林区概论[M]. 北京:科学出版社:2-3
- 赵天林. 1994. 广西环江县首次发现大面积珍稀濒危植物——单性木兰林[J]. 广西植物,(2):121
- 覃文更,韦国富,谭卫宁,等. 2004. 单性木兰采种、育种方法[J]. 广西林业,(2):25
- Dafni D. 1992. Pollination Ecology: A Practical Approach[M]. Oxford:Oxford University Press,45-98
- Guo BS(郭柏寿),Yang JM(杨继民),Xu YB(许育彬). 2001. Problems and research advance of the pollination insects(传粉昆虫的研究现状及存在的问题)[J]. Southwest China J Agric Sci(西南农业学报),14(4):102-108
- Huang SQ(黄双全),Guo YH(郭友好),Pan MQ(潘明清),et al. 1999. Floral syndrome and insect pollination of *Liriodendron chinense*(鹅掌楸的花部综合特征与虫媒传粉)[J]. Acta Bot Sin(植物学报),41(3):241-248
- Jiang H(姜华),Bi YF(毕玉芬),He CG(何承刚),et al. 2003. A study on alfalfa pollinating mechanism and relationship of pollinating insects(苜蓿授粉机理及其与传粉昆虫的关系)[J]. Prat Sci(草业科学),20(1):1-6
- Liang QB(梁其彪),Li RT(李瑞棠),Tang RQ(唐润琴),et al. 1998. Preliminary analysis on the element background values of rares and endangered plants in Mulun Forest Area(木论林区稀有濒危植物元素背景值初步分析)[J]. Guihaia(广西植物),18(3):237-246
- Lin Q(林祁),Duan LD(段林东),Yuan Q(袁琼). 2005. Taxonomic notes on the genus *Kmeria*(Pierre)Dandy(Magnoliaceae)(单性木兰属(木兰科)植物的分类学订证)[J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究),23(3):236-238
- Liu YH(刘玉壶),Zhou RZ(周仁章),Zeng QW(曾庆文). 1997. Ex situ conservation of Magnoliaceae including its rare and endangered species(木兰科植物及其珍稀濒危种类的迁地保护)[J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报),5(2):1-12
- Liu LD(刘林德),Chen L(陈磊),Zhang L(张丽),et al. 2004. Flowering characteristics and pollination ecology of *Scabiosa tschiliensis*(华北蓝盆花的开花特性及传粉生态学研究)[J]. Acta Ecol Sin(生态学报),24(4):718-723
- Wang LL(王立龙),Wang GL(王广林),Liu DY(刘登义). 2005. Pollination biology of endangered *Magnolia sieboldii*(珍稀濒危植物小花木兰传粉生物学研究)[J]. Chin J Ecol(生态学杂志),24(8):853-857
- Wu YQ(吴彦琼),Li XD(黎向东),Hu YJ(胡玉佳). 2004. Reproductive biology of *Malania oei fera*(蒜头果生殖生物学特性研究)[J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni(中山大学学报),43(2):81-83
- Wyatt R. 1983. Plant-Pollinator interactions and the evolution of breeding systems[C]//Real L ed. Pollination Biology. Florida: Academic Press:51-95
- Xi YZ(席以珍),Zhang YL(张玉龙),Lin Q(林祁),et al. 2000. A study of pollen wall ultrastructure of *Kmeria septentrionalis*(单性木兰花粉壁超微结构的研究)[J]. Bull Bot Res(木本植物研究),(4):385-389
- Xiao YA(肖宜安),He P(何平),Li XH(李晓红). 2004. Floral syndrome and breeding system of the endangered plant *Disanthus cercidiifolius* Maxim. var. *longipes*(濒危植物长柄双花木的花部综合特征与繁育系统)[J]. Acta Phytoecol Sin(植物生态学报),28(3):333-340
- Xu FX(徐凤霞). 1998. Study on pollen morphology of *Kmeria*(单性木兰属花粉形态观察)[J]. Guihaia(广西植物),(1):29-32
- Yang QJ(杨起简),Zhou H(周禾),Sun Y(孙彦),et al. 2003. Compare on technique of making chromosome in Garden Pea(豌豆染色体制片技术的比较研究)[J]. J Beijing Agric Coll(北京农学院学报),18(7):172-174
- Zhang BH(张宝红),Feng R(丰嵘),Zhang WS(张文胜),et al. 1996. Study of the method for smearing of cotton callus and the steady of chromosome in cotton tissue culture(棉花组织培养染色体制片方法的探讨及其染色体稳定性研究)[J]. J Agric Biotech(农业生物技术学报),3:224-229
- Zhang GL(张国莉),Gong X(龚洵). 2002. The karyotype analysis of *Anemoclema glaucifolium* and *Heteroplexis microcephala* both endemic to China(中国特有罂粟莲花和小花异裂菊的核型分析)[J]. Acta Bot Yunan(云南植物研究),24(6):765-768

(上接第 675 页 Continue from page 675)