

速生杨愈伤组织染色体制片技术

王海燕 (新疆教育学院理学院, 新疆乌鲁木齐830043)

摘要 [目的] 探索速生杨愈伤组织染色体制片的可行措施。[方法] 以中林46号速生杨愈伤组织为材料, 取2 mm³左右生长旺盛的愈伤组织块, 采用不同的预处理方法、解离及染色方法制备永久封片, 对比不同方法的制片效果。[结果] 在5种预处理方法中, 愈伤组织用4℃冰水预处理24 h或用0.05%秋水仙素在8~16℃条件下预处理6 h时, 制片效果较好; 在2种解离方法中, 酸解和酶解愈伤组织效果相当, 较理想; 在3种染色方法中愈伤组织用吉姆萨染色2 h左右效果较好, 改良苯酚品红染色2 h效果次之, 醋酸洋红染色较浅, 其显微摄影效果不理想。[结论] 用4℃冰水或0.05%秋水仙素预处理、用盐酸或含果胶酶、纤维素酶的甘露醇溶液解离、用吉姆萨染色时, 速生杨愈伤组织染色体制片效果较好。

关键词 速生杨; 染色体; 愈伤组织

中图分类号 S792.11 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10895-02

Chromosome Preparation Technique of Callus of Fast-growing Poplar

WANG Hai-yan (School of Natural Science, Xinjiang Education Institute, Urumqi, Xinjiang 830043)

Abstract [Objective] The study was to explore the feasible measures on chromosome preparation of the callus of fast-growing poplar. [Method] With callus of fast-growing poplar of Zhonglin 46 as material, the eugenic callus with about 2 mm³ were taken to prepare the permanent chromosome preparation with different methods of pretreatment, dissociation and staining and their the preparation effects were compared. [Result] Among 5 pretreatment methods, the preparation effects were better when the callus was pretreated by ice water at 4℃ for 24 h or pretreated by 0.05% colchicine at 8-16℃ for 6 h. Among 2 dissociation methods, the effects of acidolysis and enzymatic hydrolysis on callus were equivalent, and they all were more perfect. Among 3 staining methods, the staining results of Gensa was better when the callus was stained for about 2 h, the second was that stained by improved phenol fuchsin for about 2 h, and the staining color by aceto carmine was lighter, so its effect of photomicrography was nonideal. [Conclusion] The chromosome preparation effect of fast-growing poplar callus was better when callus was pretreated by ice water at 4℃ or by 0.05% colchicine, and dissociated by hydrochloride or mannitol solution that contained pectinase and cellulase and stained by Gensa.

Key words Fast-growing poplar; Chromosome; Callus

对不同物种染色体的认识和掌握对了解生物分类、种群进化和亲缘关系以及系统发生有着十分重要的意义, 加之在染色体制片中能否获得形态良好、长度适宜、分散良好、足量中期分裂相的染色体常常是一个变数^[1], 因此, 染色体制片技术就显得尤为关键。植物染色体制片技术是植物生理学、细胞遗传学、染色体工程、植物生物学、植物细胞分类学和物种生物学等众多学科的基本实验技术^[2]。植物染色体的研究由于与农作物、林木树种的遗传育种工作的结合而显得尤为重要。植物的顶端分生组织(根尖和茎尖)、居间分生组织(禾本科植物的幼茎和叶鞘)、愈伤组织和胚乳、大小孢子母细胞的减数分裂时期以及小孢子发育成雄配子过程中的两次细胞分裂等都可用作染色体观察的适宜材料^[3-4], 但在染色体制片的方法上可以各不相同, 制备的难易程度相差很大。速生杨等林业树种的染色体较小, 运用常规方法难以得到满意的效果。该试验首次对中林46号速生杨愈伤组织的染色体制片方法进行了系统研究, 为以速生杨为亲本的体细胞杂交育种的细胞学鉴定奠定了基础, 也为该植物及其相关植物的起源^[5]、演化^[6-8]、良种培育^[9-10]等研究提供必要的细胞学资料。

1 材料与方

1.1 材料 中林46号速生杨为中国林业科学院人工杂交新品种, 其母本为I-69杨, 父本为抗寒的欧洲黑杨。树干干形笔直, 干皮灰色, 其顶端优势强, 树冠长卵形, 分枝较少, 叶三角形、较大。它有速生、育苗造林成活率高等优良特征, 在西北尤在新疆种植较广泛。中林46号速生杨(以下简称中林

46杨)愈伤组织由新疆大学计巧灵教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 材料准备。于9:00在解剖镜下剥离正在旺盛生长的愈伤组织, 使之形成2 mm³左右的小块。将其投入蒸馏水中浸泡5~10 min, 取出再进行预处理。

1.2.2 预处理。预处理药物和方法见表1, 处理毕, 蒸馏水洗2~3次。

1.2.3 固定。用新配制的卡诺固定液(Carnoy's I)固定材料24 h, 转入浓度70%的酒精中, 4℃保存。

1.2.4 解离。采用了2种方法: 酸水解。将材料先经蒸馏水漂洗后, 转入60℃预热的1 mol/L盐酸中, 于60℃恒温处理5~20 min, 解离后的愈伤组织材料很软, 易碎, 可采用离心法收集, 蒸馏水漂洗至中性。酶处理。用含1%果胶酶(Y-23)和1%纤维素酶(R-10)的0.6 mol/L甘露醇溶液处理材料10 h, 采用离心法收集, 之后用蒸馏水漂洗一下。

1.2.5 染色。材料分别经下列染液染色:Gensa染液;1%醋酸洋红染液;改良苯酚品红染液。材料在盛有新稀释的Gensa染液的小瓶中密闭(防染液氧化)染色2 h左右;或材料在盛有1%醋酸洋红染液的小瓶中密闭(防染液挥发)染色2 h;或材料在改良苯酚品红染液中染色2 h。

1.2.6 砸片。染色后, 离心收集材料, 蒸馏水洗涤材料后离心收集, 取一小团材料置于洁净的载玻片上, 用刀片剁碎, 使之分散, 再用另一洁净载玻片覆盖, 用滤纸裹紧, 用笔敲击载玻片, 使细胞核物质分散均匀, 后放置到冰箱冷冻室的冰盘上冷冻片刻, 取出, 迅速用单面刀片将扣合的两张玻片撬开, 材料面向上, 标记, 室温空气中干燥。

1.2.7 制备永久封片。将干燥的压片浸入100%乙醇中脱水数分钟, 取出, 沥干乙醇, 再浸入二甲苯中透明数分钟, 然后取出, 沥干二甲苯, 用稀释的中性树胶封片。

基金项目 新疆生物资源基因工程重点实验室资助项目。

作者简介 王海燕(1966-), 女, 山东烟台人, 讲师, 从事遗传学教学和研究工作。

收稿日期 2008-07-18

1.2.8 镜检、照相。首先在同倍物镜下统计各种预处理方法所得到的分裂相数目;其次看不同解离方法所产生的效果;最后看不同染色法的染色效果。经过反复比较后,取染色体分散良好、收缩适度,染色深、轮廓清晰的分裂相在 Olympus 显微镜下照相。

2 结果与分析

2.1 不同预处理方法的效果比较 预处理的目的是阻止分裂的细胞中纺锤体的形成,使细胞分裂停止于中期阶段,而且还可以导致染色体适度收缩,使染色体易于观察。从表1可见,对中林46 杨愈伤组织的不同预处理方法中,制片效果良好的是冰水低温处理和用0.05%秋水仙素处理(图1、2)。

表1 不同预处理方法所得分裂相及染色体的效果比较

Table 1 The effect comparison of the obtained division phase and chromosome by different pretreatment methods

预处理试剂 Pretreatment reagent	处理时间 Treatment time	处理温度 Treatment temperature	处理效果 Treatment effect
对二氯苯饱和水溶液 Saturated aqueous solution of p-dichlorobenzene	6	8~16	获得了一些中期分裂相,但染色体分散不好
0.05%秋水仙素 0.05% colchicine	6	8~16	获得较多的中期分裂相,染色体分散好,形态清晰,但染色体缩短
0.004 mol/L 8-羟基喹啉 0.004 mol/L 8-hydroxyquinoline	6	4	中期分裂相少,染色体分散不好
-溴萘液 100 ml 蒸馏水中加入1滴 -溴萘,现用现配 -bromonaphthalene solution (adding one drop of -bromonaphthalene into 100 ml distilled water, being prepared when needed)	6	4	中期分裂相少,染色体常粘连在一起
冰水低温处理 lowtemperature treatment	24	4	中期分裂相较多,染色体收缩适中,形态清晰

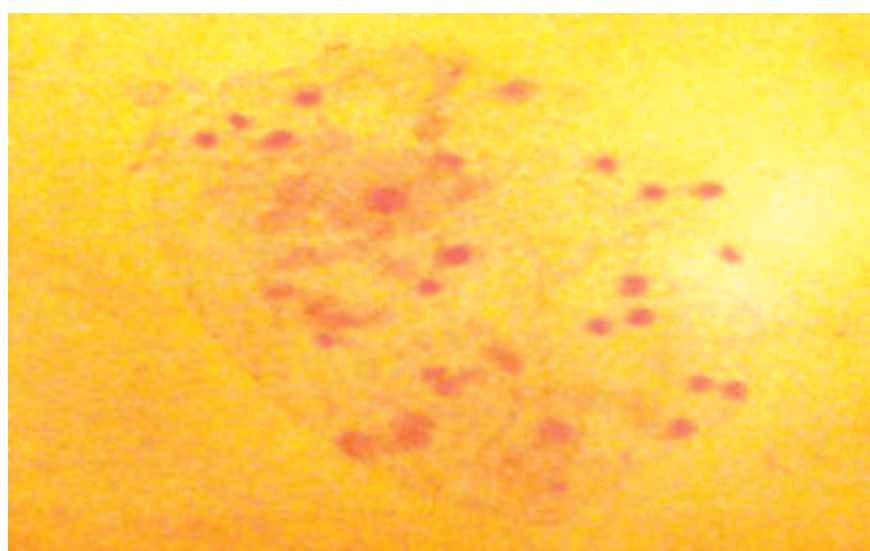


图1 经秋水仙素溶液处理愈伤组织染色体

Fig.1 The calli chromosomes after the treatment with colchicine solution

2.2 解离 解离的目的是破坏细胞壁,软化组织,使细胞易分散。该试验中酸解和酶处理愈伤组织的效果都相仿,都能得到较理想的效果。

2.3 染色 经试验证明中林46号杨用文中提及的各种染液染色呈现出不同效果特点,其中用吉姆萨染液染色效果较好,改良苯酚品红次之,醋酸洋红染色较浅,着色不深的片子显微摄影效果不甚理想。

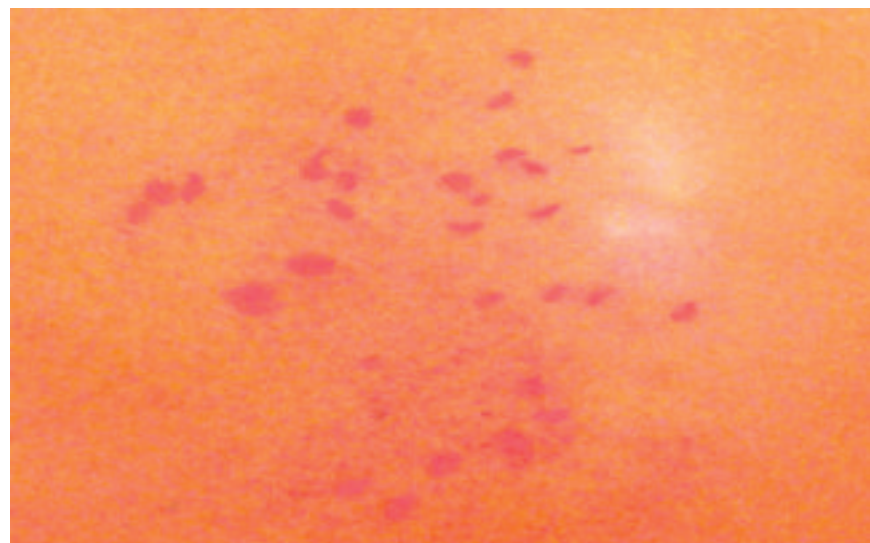


图2 经冰水低温处理愈伤组织染色体

Fig.2 The calli chromosomes after lowtemperature treatment with icy water

3 结论与讨论

(1) 在制片的每一个环节都有许多关键技巧,如取材时传统方法是以茎尖为材料,因而得到的中期分裂相细胞相对较少,改用愈伤组织为材料可获得较多的中期分裂相^[3]。对愈伤组织进行取材时,不宜取用整块愈伤组织来压片,因为整块愈伤组织中,通常包含已木质化的管状分子和已成熟并贮存大量淀粉的细胞,带有这2种细胞很难压片。所以,该试验是在解剖镜下仔细识别正在生长和已老化的组织块,挑取正在生长的小块组织进行处理。

(2) 取下的愈伤组织用蒸馏水浸泡可活化组织,有助于秋水仙素等预处理液进入到愈伤组织材料中^[11]。预处理过程中,选用冰水低温处理材料,或用0.05%秋水仙素溶液处理材料适当时间,得到了较多的分裂相,染色体收缩适度,染色体轮廓清晰,便于形态观察。鉴于秋水仙素的毒副作用,以冰水低温处理中林46号杨愈伤组织24h更适宜。不同方法预处理后的材料用蒸馏水洗,一方面可除去预处理液,另一方面有低渗作用,之后固定。

(3) 愈伤组织的解离用了2种方法,均得到较好的效果,但考虑到降低经费开支,用1 mol/L 盐酸在60℃解离一段时间,可破坏细胞壁的中胶层,使细胞较容易地解离出。但之后用蒸馏水漂洗至中性很重要,否则,吉姆萨染液和改良苯酚品红染液不能很好地使材料着色,这与牛西午等^[12]的研究结果一致。

(4) 染色时,醋酸洋红对于整染色体染色均匀,由于它对RNA也有染色效果,以此染液染色的染色体十分饱满,倘若制片操作合适,能够制出背景清晰、效果良好的装片,并可制作染色体组型。但由于染料原因,染色体与细胞质反差小,不易于照相,这与杨起简等^[2]的研究结果一致。经试验证实,Gensa染液、改良苯酚品红染液适用于中林46号杨愈伤组织的细胞核和染色体的染色。材料放入Gensa染液中染色时间不宜过长或过短,过短会使染色程度不够,过长也易使染色颗粒沉淀在材料上,影响观察。试验中染色2h即可。材料用两片载玻片夹着,用滤纸裹紧,砸片可用力大一点,能很快使染色体分散,又可避免盖玻片易碎的问题。在日常染色体制片过程中,影响制片质量的因素很多,经验在保证染色体制片质量中占有不可忽视的地位,同时在染色体常规制片技术基础上积极探索、大胆实践、不断尝试在制片

胸膜肺炎阳性率分别为26.61%、21.96%、16.30%、20.67%，全年平均阳性率为22.38%。由此可知，在猪传染病的临床感染中传染性胸膜肺炎具有较高的感染率^[5]，养猪场应重视对该病的预防；猪接触传染性胸膜肺炎一年四季均可发生，但以第1、4季度检测阳性率高，表明该病在气候多变及寒冷的季节多发；在2007年4个季度传染病胸膜肺炎的感染率均

高于2006年，表明2007年河南省猪接触传染性胸膜肺炎的发病率呈上升趋势。

2.2 猪传染性胸膜肺炎与其他疾病混合感染情况 对检测为传染性胸膜肺炎感染的病猪，采用IHA、ELISA、LAT等方法分别进行猪瘟、圆环病毒、蓝耳病、弓形体、伪狂犬感染的检测。由表2可知，传染性胸膜肺炎的患猪可同时感染多种疾

表2 猪接触传染性胸膜肺炎与其他疾病混合感染的统计结果

Table 2 The statistical results of the mixed infection with porcine contagious pleuropneumonia and other diseases

疾病 Diseases	检测方法 Detection methods	2006年			2007年		
		检测数量 Detection number	头 Positive number	阳性头数 Positive number	阳性率 % Positive rate	检测数量 Detection number	头 Positive number
猪瘟 Swine fever	IHA	93	43	46.24	143	59	41.25
圆环病毒病 Porcine circovirus disease	ELISA	90	64	71.11	152	124	81.58
蓝耳病 Porcine reproductive and respiratory syndrome	ELISA	86	33	38.37	138	45	32.61
伪狂犬 Pseudorabies	LAT	65	6	9.23	82	7	8.54
弓形体 Toxoplasma	IHA	86	18	20.93	107	20	18.69

注:IHA. 间接血凝反应; ELISA. 酶联免疫吸附试验; LAT. 乳胶凝集试验。

Note :IHA stands for indirect hemagglutination; ELISA stands for enzyme linked immunosorbent assay; LAT stands for latex agglutination test.

病,其中以猪瘟、圆环病毒病、蓝耳病、伪狂犬、弓形体病等最为常见。因此,临床上在治疗和预防猪传染性胸膜肺炎的同时,还应加强对多种疾病的预防和治疗。猪传染性胸膜肺炎常见的混合感染性疾病的感染率在不同年份发生了一定的变化。2006、2007年传染性胸膜肺炎与猪瘟的混合感染率分别为46.24%和41.25%,与圆环病毒病的混合感染率分别为71.11%和81.58%,与蓝耳病的混合感染率分别为38.37%和32.61%,与伪狂犬病的混合感染率分别为9.23%和8.54%,与弓形体的混合感染率分别为20.93%和18.69%。

3 小结

猪在发生一种或几种传染病的情况下,由于机体抵抗力下降,往往可以继发多种疾病。以上结果是在猪感染胸膜肺炎情况下的检测结果,不表示健康猪群以上各种疾病的可能感染率。猪接触传染性胸膜肺炎的预防和治疗应采取以下措施。加强饲养管理。注意通风换气,保持舍内空气清新;减少各种不良应激因素的影响,保持猪群足够均衡的营养水平;采用“全进全出”饲养方式,猪出栏后舍内要彻底清

洁消毒,空栏3周后再投入使用;加强猪群检疫工作,发现病猪,及时隔离处理。疫苗预防。国内以血清7型菌制成的灭活苗对断奶后仔猪进行免疫,有一定效果;发病猪场也可从病猪中采取病料培养,制成自家苗使用。药物预防和治疗。该病病原是放线杆菌。该菌对氟苯尼考、多西环素、林可霉素、泰乐菌素等敏感性较强,可用于该病的预防和治疗。

引种前检疫。对无该病的猪场,应防止引进带菌猪。在引进前,应用血清学试验进行检疫,对感染猪场进行血清学检查,以清除血清学阳性带菌猪。

参考文献

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4版. 北京:中国农业出版社,2001:196-198.
- [2] B·E·斯特劳. 猪病学[M]. 8版. 赵德明,张中秋,沈建忠,译. 北京:中国农业出版社,2000:369-406.
- [3] 逮忠新,柳纪省,赵萍,等. 猪传染性胸膜肺炎血清抗体检测[J]. 中国兽医科技,2001,31(5):16-17.
- [4] 王亚军,段艳萍,邱翔宁. 猪传染性胸膜肺炎的研究进展[J]. 兽医导刊,2008(1):13-17.
- [5] 许如苏,沈焯,蔡雄丹,等. 用IHA试验进行猪传染性胸膜肺炎的血清学调查[J]. 中国兽医杂志,2003,39(2):16-17.
- [6] 蔡华,乔玉强,王业精,等. 麦田杂草节节麦染色体核型分析研究[J]. 种子,2006,25(6):4-6.
- [7] 王跃华,马丹炜,余昶镔. 川黄柏染色体制作和核型分析研究[J]. 中药材,2005,28(1):3-4.
- [8] 吴松权,王立平,孙丽娜,等. 黄芪染色体核型分析[J]. 湖北农业科学,2006,45(5):631-633.
- [9] 何子灿,李勇,闫斌,等. 五种紫萁属植物的核型分析[J]. 植物分类学报,2006,44(6):617-626.
- [10] 蔡华,黄鑫龙. 一种野生燕麦的染色体核型分析[J]. 种子,2007,26(1):35-37.
- [11] 袁文焕,王新娥,刘建敏,等. 几种芸薹属蔬菜的核型分析与比较[J]. 河北农业大学学报,2008,31(2):27-30.
- [12] 陈高,孙航,孙卫邦. 改进的植物染色体制片方法[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):759-760.
- [13] 牛西午,田如霞,李贵全,等. 锦鸡儿属植物染色体制片与3个种的核型分析[J]. 西北植物学报,2006,26(5):1043-1047.

(上接第10896页)

各个环节进行改革和创新,可以为中林46速生杨等优良树种及染色体较小的植物的染色体制片提供切实可行的制片技术和关键技巧,为进一步研究这些植物的种群进化、物种之间亲缘关系的远近、变异特点及指导科学育种提供重要依据。

参考文献

- [1] 黄国香,桂俊豪,王瑞,等. 染色体制备环节的量化及效果评价[J]. 中国优生与遗传杂志,2007,15(9):38-39.
- [2] 杨起简,周禾,孙彦,等. 豌豆染色体制片技术的比较研究[J]. 北京农业学院学报,2003,18(3):172-173.
- [3] 王跃华,马丹炜,汪苏,等. 喜树染色体制作与核型分析[J]. 成都大学学报:自然科学版,2004,23(3):27-29.
- [4] 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