

木薯根尖染色体的观察技术

冯斗, 王建岭, 席世丽, 于洁, 秦延春 (广西大学, 广西南宁 530004)

摘要 [目的] 探索制作木薯二倍体根尖压片技术, 为多倍体的鉴定提供参考。[方法] 以木薯品种华南124 的根尖为试材, 在恒温水浴中用1 mol/L HCl 溶液处理, 进行细胞解离, 并进行11~15 min 的时间梯度试验以寻找最佳解离时间。通过木薯根尖染色体的解离观察试验, 探讨了木薯根尖染色体(二倍体)的观察方法。[结果] 木薯根尖的最佳取材时间在雨后或头天浇水第2 天上午9:00~10:00。解离时间梯度试验表明, 解离13 min 可达到木薯的最佳解离效果。通过比较4 种染色试剂(I-K 染液、改良苯酚品红、番红染液和醋酸洋红)的染色效果选出的最佳试剂为改良苯酚品红。[结论] 该研究为木薯多倍体的直接鉴定提供了新方法。

关键词 木薯根尖; 染色体; 解离时间; 染色试剂

中图分类号 S533 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03711-02

Observation Technology of Root Tip Chromosome in Cassava

FENG Dou et al (Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract [Objective] The research aimed to explore the root tip squash technique of diploid cassava and provide references for the identification of the polyploid. [Method] With root tips of cassava variety Huanan 124 as tested materials, they were treated with 1 mol/L HCl in water bath at constant temperature to conduct cell dissociation and time gradient test for 11~15 min so as to seek for the optimum dissociation time. The observation methods of root tip chromosome (diploid) in cassava were discussed through the dissociation and observation experiment on root tip chromosome in cassava. [Result] The optimum sampling time for cassava root tips was at 9:00~10:00 a.m. on the day after a rainy or watering day. The time gradient experiment of dissociation showed that the optimum dissociation effect of cassava could be got while dissociating for 13 min. The optimum reagent, which was selected out through comparing the staining effects of 4 staining reagents (I-K coloration solution, improved phenol fuchsin, safranine staining solution and acetocarmine), was improved phenol fuchsin. [Conclusion] The research provided a new method for the direct identification of polyploid cassava.

Key words Cassava root tip; Chromosome; Dissociation time; Staining reagent

木薯为多年生热带植物, 一般以茎秆进行无性繁殖, 以收获营养器官为主。木薯是世界上三大薯类作物之一, 是我国重要的旱地作物。广西是我国木薯的主要产区。木薯的染色体数为 $36^{[1-2]}$, 为二倍体作物。植物根尖压片法是观察植物染色体的一种常用方法。然而对木薯根尖染色体的观察及其简易制片技术至今仍未见报道。庄南生等采用银染显带技术观察木薯的染色体^[3]。参考赵惠玲等的报道^[4], 笔者摸索出一套制作木薯二倍体根尖压片技术, 以期对多倍体的鉴定提供参考。

1 材料与方

1.1 材料 供试木薯品种为华南124 木薯。

1.2 试验方

1.2.1 清洗。把田间取来的根尖用蒸馏水清洗干净(最好3遍以上), 重点是清洗掉根尖上的泥土, 剪短至2 cm 备用^[4]。

1.2.2 预处理。把洗净的根尖放在滤纸上以吸去多余的水分后, 放入盛有饱和对二氯苯水溶液中浸泡3~4 h。该试验预处理时间为4 h。

1.2.3 固定。固定所用的溶液一般为卡诺固定液, 由1:3 冰醋酸与纯酒精(V/V) 混合而成。固定时间一般为2~24 h, 该试验固定时间为24 h。

1.2.4 保存。将固定好的根尖用蒸馏水清洗3 遍, 再放入50% 酒精溶液中清洗, 最后放入70% 酒精溶液中, 4℃ 保存。

1.2.5 解离。采用酸解法除去细胞间的果胶层, 并使细胞壁软化, 以利于压片。其方法是在恒温水浴中用1 mol/L HCl 溶液处理11~15 min, 温度为 $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。该步骤是制片的关键。为了掌握最佳的解离时间, 在解离过程中开展了时间的梯度试验。

1.2.6 染色。染色的方法较多。通过对比I-K 染液、醋酸洋红、番红染液的染色效果, 筛选出最佳染色方法。

1.2.7 压片。切取根尖1.0~1.5 mm 长, 用滤纸吸干水后放于载玻片上, 滴1 滴改良苯酚品红溶液, 染色1 min 左右, 盖上盖玻片, 盖片上垫2 层吸水纸, 用拇指以适当的力度按压, 然后用铅笔一端敲击盖玻片, 使材料分散均匀。

1.2.8 镜检。将压片置显微镜下检查。先用低倍镜观察, 找到良好的细胞中期分裂相, 染色体计数, 并且观察染色体形态; 发现好的分裂相后, 再转到油镜下仔细观察、计数, 如需要则可用显微摄影拍片保存。

2 结果与分析

2.1 不同解离时间的处理效果 由表1 可知, 解离13 min 时分裂相多, 分散效果好, 分辨程度清晰。经

表1 不同解离时间的处理效果

Table 1 Treatment effect for different dissociation time

处理时间 Treatment time min	分裂相 Division phase	分散效果 Dispersing effect	分辨程度 Distinguishing degree
11	无 No	团状 Agglomerate	模糊 Mistiness
12	少 A little	少有分散 Rare dispersion	模糊 Mistiness
13	多 Much	好 Good	清晰 Clear
14	较多 More	较好 Preferable	不清晰 Illegibility
15	少 A little	团状 Agglomerate	模糊 Mistiness

表2 不同染色试剂的处理效果

Table 2 Treatment effect for different dyeing reagents

处理试剂 Reagents	染色效果 Dyeing effect	分辨程度 Distinguishing degree
I-K 染液 I-K dye	浅 Weak	不清晰 Illegibility
改良苯酚品红 Modified phenol fuchsin	较好 Preferable	清晰 Clear
番红染液 Safranine	染色较深 Relatively dark	模糊 Mistiness
醋酸洋红 Acetate magenta	深 Dark	不清晰 Illegibility

作者简介 冯斗(1963-), 男, 广西玉林人, 博士, 副教授, 从事作物遗传与品种选育、植物基因工程与分子生物学、植物组织培养等方面的研究。

收稿日期 2007-10-29

min 时效果最佳(图1、2)。

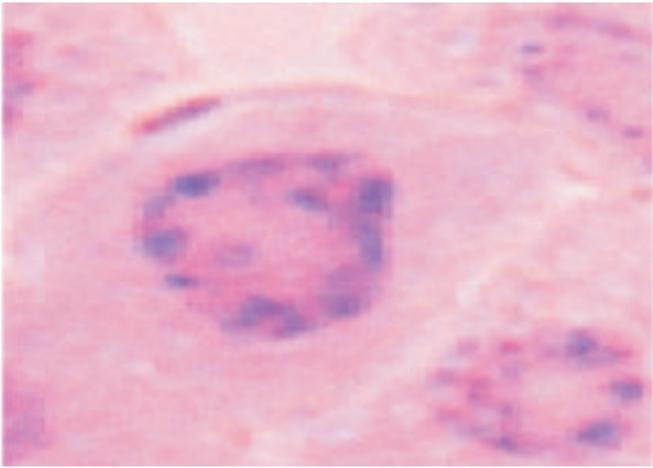


图1 解离时间不当的染色体片

Fig.1 Chromosome slide under improper dissociation time

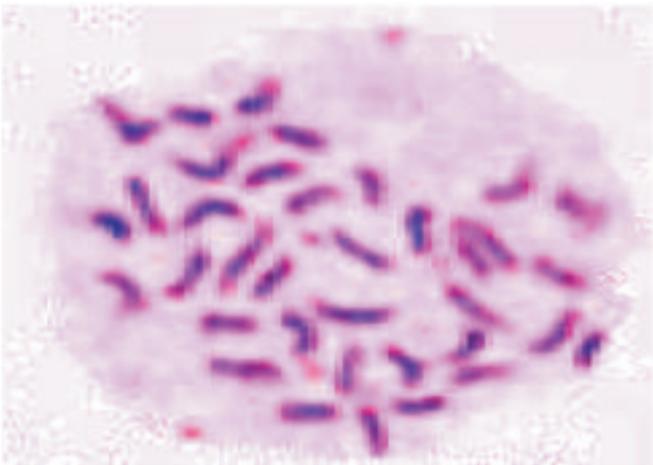


图2 解离13 min 时的染色体片

Fig.2 Chromosome slide with dissociation time of 13 min

2.2 不同染色试剂的处理效果 由表2可知,改良苯酚品红染色效果较好,分辨程度清晰。经比较,改良苯酚品红试剂的染色效果最佳(图3、4)。

3 结论

(1) 木薯根尖的取材时间最好在雨后第2天,也可以第1天浇水第2天取材,且以上午9:00~10:00为宜,此时分裂较多,易观察中期的染色体,有利于下一步工作的进行。

(2) 取2~10 ml 后苯酚品红染液,加入90~98 ml 45%冰醋酸和1.8 g 山梨醇,即得改良苯酚品红。改良苯酚品红配

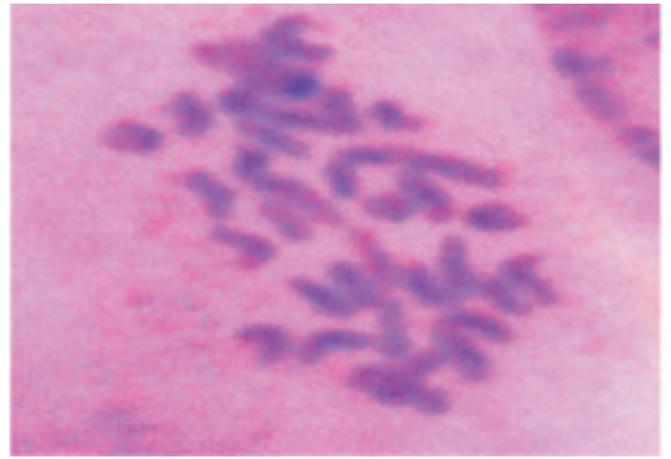


图3 醋酸洋红染色体片

Fig.3 Chromosome slide dyed by acetate magenta



图4 改良苯酚品红染色体片

Fig.4 Chromosome slide dyed by modified phenol fuchsin

成后可立即使用,但着色能力较差;一般,在室温下配制2周后使用,染色效果会更好;室温下保存不会出现沉淀或褪色。

参考文献

- [1] ROGERS D J. Studies on *Manihot esculenta* Gaertn (cassava) and related species[J]. *Bill Torrey Bot*, 1963, 90: 42-54.
- [2] JENNINGS D L. Cassava *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) [J]. *African Agri J*, 1994, 10: 34-39.
- [3] 庄南生, 曾霞, 唐燕琼, 等. 木薯体细胞染色体银染显带的带型特点[J]. *热带作物学报*, 2003, 24(1): 52-54.
- [4] 赵惠玲, 王青. 改良植物根尖压片法观察染色体[J]. *太原师范专科学校学报*, 2001(3): 26-27.
- [5] 冯斗, 刘丕庆, 冯世康. 遗传学实验指导[J]. 广西大学内部教材, 2005(8): 3.

(上接第3676页)

核与后囊之间要有一定的粘弹剂充填,才能使角膜内皮不受损伤,且后囊不致破裂。

4.6 挽核 挽核时要双手一致,做到稳、准、轻,双手用力适当,起到夹持作用。

4.7 冲洗 冲洗干净前房内及晶状体囊袋内粘弹剂是一个极为重要的手术步骤。粘弹剂在眼内残留,常会引起术后高眼压,给患者造成不必要的损害。

总之,非超声乳化小切口晶体摘除术经济实惠,简便易

学,易于掌握,在未植入人工晶体的条件下,术后可恢复一定的视力,适合现有的动物医疗状况,可以在动物医院推广。

参考文献

- [1] 王云, 付亚平. 非超声乳化小切口人工晶状体植入术71例分析[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2006, 9(1): 74-75.
- [2] 谢立信, 董晓光. 人工晶体植入学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 80-159.
- [3] 邓承, 刘荣华. 白内障手术不同切口对视力和屈光力的影响[J]. *中华眼科杂志*, 1997, 33(3): 197.
- [4] 王亚娜, 骆彦丽, 魏表, 等. 小切口白内障囊外摘出人工晶状体植入的应用[J]. *眼外伤职业眼病杂志*, 2004, 26(4): 244-245.