

芝麻染色体常规制片技术关键因子的优化研究

刘艳阳, 郑永战, 梅鸿献, 张海洋^{*}
(河南省芝麻研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了探索最佳的染色体制片方法, 以芝麻活体种子根尖为材料, 研究根尖预处理方法、解离时间、取材长度和染色方法等关键因子对芝麻染色体制片的影响。结果表明, 预处理方法为 40 mg/L 的放线菌酮溶液处理 3 h、饱和对二氯苯溶液处理 4 h 或 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液处理 3 h; 取材长度为 0.5~1.0 mm; 在 $V_{\text{无水酒精}}:V_{\text{浓盐酸}}=1:1$ 的解离液中解离 10 min; 染色液以改良石碳酸品红染色 8 min 染色体制片效果最佳。

关键词: 芝麻; 染色体制片; 处理因子

中图分类号: S565.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)08-0116-04

Optimization of Critical Treatment Factors in Chromosome Preparation Technique of Sesame

LIU Yan-yang, ZHENG Yong-zhan, MEI Hong-xian, ZHANG Hai-yang^{*}
(Henan Sesame Research Center, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The germinating roots of sesame were used to study the effects of the pretreatment methods, dissociation time, sampling length of roots tips and staining on the chromosome preparation. The results showed that the optimal pretreatment methods were as follows: 40 mg/L cycloheximide for 3 h, or saturated p-dichlorobenzene for 4 h, 0.002 mol/L 8-Hydroxyquinolin for 3 h; then dissociated with the solution (anhydrous alcohol: 37% concentrated hydrochloric acid = 1:1) for 10 min at room temperature; the sampling length of root tips was 0.5—1.0 mm, and stained with modified carboic acid-magenta solution for 8 min. With this method a very good effect of chromosome preparation could be obtained.

Key words: Sesame; Chromosome preparation; Treatment factors

芝麻(*Sesamum indicum* L.)具有悠久的栽培历史, 具有较高的营养和保健作用, 在中国种植比较广泛, 是重要的油料作物。国外首次对芝麻染色体数目的报道始于 20 世纪 20 年代, Morinaga 等首先报道栽培种芝麻的染色体数目是 $2n=26^{[1]}$ 。Kobayashi^[2] 和 Mukherjee 等^[3] 进行了芝麻染色体长度等的研究。我国对芝麻的细胞学研究始于上世纪 80 年代, 柳家荣等^[4]、何凤发等^[5-6]、詹英贤等^[7] 对不同粒色的栽培种和野生芝麻的染色体组型进行

了研究。近年来, 国内外对芝麻的种植和应用研究较多, 但主要集中在栽培技术、抗病抗逆性、种质资源表型鉴定和分子水平遗传多样性分析等方面, 对其细胞学方面的研究较少。

染色体常规制片是细胞遗传学研究的基础手段, 高质量的染色体中期分裂相是研究物种亲缘关系、遗传结构、倍性及细胞周期等的前提^[8]。随着现代生物技术发展产生的 DNA 原位杂交对染色体制片技术也提出了更高要求。作为供 DNA 原位杂交

收稿日期: 2011-01-14
基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-20); 公益性行业科研专项经费项目(3-42)
作者简介: 刘艳阳(1979-), 女, 河南汝阳人, 助理研究员, 博士, 主要从事芝麻种质资源及遗传育种研究。

E-mail: liuyanyang001@163.com
^{*}通讯作者: 张海洋(1963-), 男, 河南项城人, 研究员, 博士, 主要从事芝麻遗传育种研究。E-mail: haaszhy@yahoo.com
©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

之用的染色体, 需满足每一制片具有完整染色体的细胞较多、染色体在细胞中分布合理、数目结构完整这些基本条件^[9-12]。以往的芝麻细胞学研究, 只对试验结果进行描述, 针对芝麻染色体制片过程中关键因子进行全面、系统的研究目前尚未见到相关报道。为此, 研究了根尖预处理方法、取材长度、解离时间和染色方法对芝麻根尖染色体制片效果的影响, 以总结出一套行之有效的芝麻染色体制片技术, 为芝麻细胞学方面的深入研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为栽培种芝麻豫芝 11 号。

1.2 方法与步骤

1.2.1 材料培养 在培养皿内铺上 2 层滤纸, 在湿润的条件下将种子培养萌根, 在 25℃左右的温度下, 待萌发后根长达 0.5~1.5 cm 时进行取材。

1.2.2 预处理液及处理时间的比较 采用根尖不离体处理, 用秋水仙素(0.01%、0.05%、0.10%)、8-羟基喹啉水溶液(0.001mol/L、0.002mol/L、0.004mol/L)、0.05%秋水仙素:0.002mol/L 8-羟基喹啉水溶液=1:1(体积比)、饱和对二氯苯(含α-溴奈)、0.002mol/L 8-羟基喹啉水溶液(添加饱和对二氯苯)、放线菌酮水溶液(40mg/L、70mg/L)、40mg/L 的放线菌酮水溶液(添加饱和对二氯苯)、2.5mL/L 风油精, 分别处理 1h、2h、3h、4h 和 6h, 冰水混合物分别处理 12h、24h 和 48h, 共 68 个处理, 以确定适宜的预处理方法。

1.2.3 解离 在 V_{无水酒精}:V_{浓盐酸}=1:1 的解离液中解离 5min、10min、15min、20min, 以确定适宜的解离时间。

1.2.4 取材长度 分别切取根尖 0.5mm、1mm、2mm、3mm 进行压片观察, 以确定适宜的取材长度。

1.2.5 染色 分别加一滴醋酸洋红或改良石碳酸品红染色 3min、5min、8min、10min 和 15min, 以确定适宜的染色液和染色时间。

1.2.6 染色体数目观察 采用常规压片法压片, 选择

30 个以上染色体分散较好的细胞, 确定该材料的染色体数目。

1.3 数据统计

选择有代表性的制片, 每张制片随机选取 5~6 个视野, 分别统计被观察的细胞总数和分裂中期的细胞数, 计算中期分裂相指数。中期分裂相指数是指处于分裂中期细胞数与被观察的细胞总数之比, 用千分数表示, 以表征根尖细胞经预处理后处于分裂中期相细胞数的比例。利用 Leica DM 2500 显微镜及其采图软件进行拍照、计数、统计和分析。

2 结果与分析

2.1 芝麻染色体制片技术的优化

2.1.1 预处理方法对芝麻染色体制片效果的影响 从表 1 可见, 根尖用 0.01%秋水仙素预处理 3h 获得的中期分裂相指数最高(160.41%), 其次是 0.01%秋水仙素进行预处理 4h 和 6h, 中期分裂相指数分别是 155.35%和 150.46%。0.05%秋水仙素处理 4h 和 6h、0.1%秋水仙素预处理 2h 和 3h、饱和对二氯苯处理 4h、40mg/L 和 70mg/L 放线菌酮水溶液处理 3h、4h 和 6h、冰水混合物处理 24h 均能得到较多的中期分裂相。0.01%秋水仙素预处理 3h、4h 和 6h, 0.05%秋水仙素处理 4h 和 6h, 0.1%秋水仙素预处理 2h 和 3h 虽然能得到较多中期分裂相, 但染色体容易聚集成团, 不利于进行核型分析。40mg/L 和 70mg/L 放线菌酮水溶液预处理 6h 容易引起染色体收缩, 尽管利于染色体计数但不利于染色体形态观察。0.05%秋水仙素预处理 4h 和 6h, 冰水混合物处理 24h 虽然能得到较多中期分裂相, 但染色体容易聚集成团, 制片效果不好。0.01%秋水仙素溶液处理 1h(图 1-A)、饱和对二氯苯处理 3h(图 1-B)、40mg/L 的放线菌酮水溶液(添加饱和对二氯苯)处理 3h(图 1-C)得到的制片染色体分散良好, 适宜进行核型分析, 但中期分裂相指数较低。综合染色体制片效果及中期分裂相指数, 确定 40mg/L 的放线菌酮处理 3h(图 1-D)、饱和对二氯苯溶液处理 4h(图 1-E)和 0.002mol/L 8-羟基喹啉溶液处理 3h(图 1-F)适宜进行芝麻染色体预处理。

表 1 不同处理组制片得到的中期分裂相指数

处理	处理时间/h	中期分裂相指数/%	处理	处理时间/h	中期分裂相指数/%
0.01%秋水仙素	1	33.28	饱和对二氯苯	1	21.53
	2	78.77		2	56.50
	3	160.41		3	44.78
	4	155.35		4	76.92
	6	150.46		6	62.68

续表 1 不同处理组制片得到的中期分裂相指数

处理	处理时间/h	中期分裂相指数/ ‰	处理	处理时间/h	中期分裂相指数/ ‰
0. 05%秋水仙素	1	75. 95	0. 002 mol/ L 8- 羟基 喹啉水溶液(添加 饱和对二氯苯)	1	32. 03
	2	98. 59		2	25. 00
	3	101. 27		3	26. 60
	4	122. 99		4	62. 50
	6	110. 17		6	40. 25
0. 10%秋水仙素	1	75. 16	40mg/ L 放线菌酮	1	69. 58
	2	115. 59		2	70. 24
	3	139. 90		3	78. 98
	4	79. 23		4	46. 31
	6	88. 07		6	77. 92
0. 001 mol/ L 8- 羟基喹啉	1	15. 60	70mg/ L 放线菌酮	1	67. 36
	2	31. 06		2	46. 45
	3	34. 65		3	89. 91
	4	52. 10		4	79. 33
	6	59. 52		6	92. 18
0. 002 mol/ L 8- 羟基喹啉	1	41. 49	40mg/ L 放线菌酮 水溶液(添加饱 和对二氯苯)	1	65. 49
	2	30. 70		2	49. 12
	3	53. 16		3	38. 96
	4	103. 45		4	47. 90
	6	76. 92		6	78. 95
0. 004 mol/ L 8- 羟基喹啉	1	22. 95	2. 5 m L/ L 风油精	1	32. 64
	2	35. 00		2	25. 18
	3	62. 83		3	23. 90
	4	65. 83		4	23. 52
	6	80. 72		6	22. 06
0. 05%秋水仙素： 0. 002 mol/ L 8- 羟基 喹啉水溶液= 1：1	1	14. 93	冰水混合物	12	69. 17
	2	33. 61		24	73. 17
	3	69. 15		48	49. 28
	4	12. 05			
	6	50. 78			

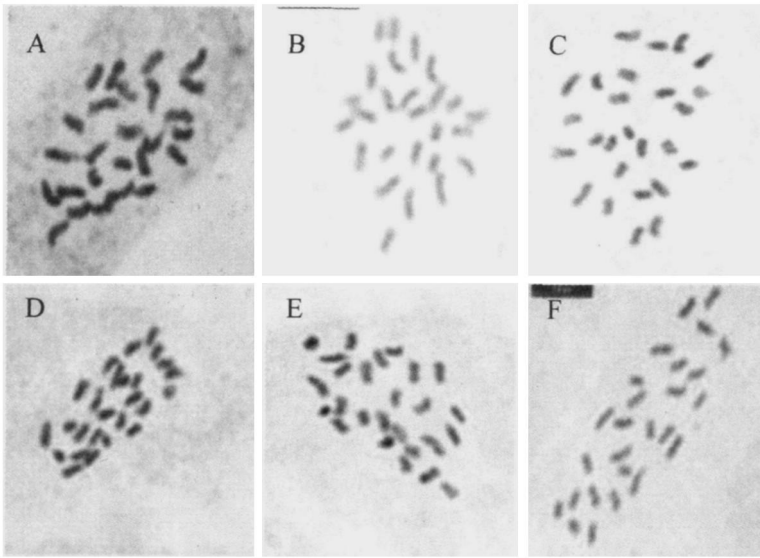


图 1 不同预处理方法对芝麻染色体制片的影响

2.1.2 解离时间对芝麻染色体制片效果的影响
通过对解离液($V_{\text{无水酒精}}:V_{\text{浓盐酸}}=1:1$)解离 5 min、10 min、15 min 和 20 min 的染色体制片效果的研究发现,解离 10min 效果较好,细胞容易分散、不易粘

连在一起,染色体染色较深,呈深红或紫红色,细胞质无色或只有极浅的红色,易于染色体的辨认。而解离 5min,由于根尖软化程度不够,细胞不易压散,往往造成许多细胞粘在一起,中间细胞由于未接触

染色液而着色非常浅;分散开的细胞却由于细胞质也着色,使反差降低。解离 15 min 以上,分生组织会与伸长区脱离,这时分生区已经被解离过软,很难操作,而且染色效果不好,而且由于染色体过于分散,常造成丢失,给计数带来困难。试验过程中发现,室温对解离时间的影响较大,室温 15 ~ 25 ℃解离 10 min 效果较好,室温低于 15 ℃或高于 25 ℃时应根据具体情况适当增加和减少解离时间。

2.1.3 取材长度对芝麻染色体制片效果的影响
通过切取根尖 0.5 mm、1 mm、2 mm、3 mm 的部分进行染色体压片观察发现,芝麻根尖 0.5 ~ 1 mm 乳白色区域为分生区,该区域多为等直径的分裂细胞,细胞分裂旺盛,不同分裂相较多,适合进行染色体制片。

2.1.4 染色液对芝麻染色体制片效果的影响
通过对醋酸洋红和改良石炭酸品红染色 3 min、5 min、8 min、10 min 和 15 min 效果比较发现,改良石炭酸品红染色 8 min 效果较好,染色体着色深,呈紫红色,轮廓较清晰,细胞质着色浅,反差明显,拍片效果最好,易于观察;醋酸洋红溶液染色后,染色体与细胞质均着色,染色体与细胞质不易分开,拍片效果较差。

2.2 芝麻染色体数目

选取 30 个染色体形态清晰、分散较好的分裂中期细胞对芝麻染色体进行计数,结果发现,豫芝 11 号细胞染色体数均为 26 条,未发现非整倍体细胞,因此,豫芝 11 号染色体数目为 $2n=2x=26$ 。

3 讨论

一般来说,凡是进行分裂的分生组织、器官甚至单个细胞,都可用于染色体观察。但并非任意取材都可获得期望的结果,而且细胞的分裂是不同步的,使用某些理化因素,对材料进行预处理可使细胞同步分裂,提高细胞分裂指数^[13]。通过对芝麻染色体制片关键因子的研究,摸索出一套简单、快速的染色体制片方法,这对今后研究芝麻染色体的数目、大小、形态、结构和染色体之间的遗传与变异的关系,以及研究品种的遗传演进和分类鉴定提供了基本的技术手段。在研究过程中发现,制片过程中的压片步骤至关重要,即使在所有关键因子都处于最优化的状态下,压片技术掌握不好,也很难得到较好的制片效果。因此,在制片的过程中要多摸索,对大量染色体制片进行观察,结合本试验得出的关键因子的

最优化处理,一定会大大提高染色体制片效率。同时,在实际操作中,要根据具体试验目的选择这些关键因子的参数。比如,如果以染色体数目变异为研究目的,用 40 mg/L 或 70 mg/L 放线菌酮水溶液预处理 6 h 将会得到很好的效果。

参考文献:

[1] Morinaga T, Fukushima E, Kano T, *et al.* Chromosome numbers of cultivated plants[J]. Bot Mag, 1929, 43: 589.
[2] Kobayashi T. Secondary pairing in *S. orientale*[J]. Bot Mag, 1949, 62: 71.
[3] Mukherjee S. Chromosome type of *Sesamum orientale* L.[J]. Indian Oilseeds Jour, 1959, 3: 41-42.
[4] 柳家荣, 丁法元, 屠礼传. 芝麻体细胞染色体的初步观察[J]. 河南农业科学, 1980(1): 14-15.
[5] 何凤发, 何丽玫, 侯磊, 等. 芝麻的核型与系统演化[J]. 西南农业大学学报, 1994, 16(6): 573-576.
[6] 何凤发, 何丽玫, 田丰炉, 等. 芝麻细胞遗传的研究[J]. 河南农业科学, 1995(5): 9-12.
[7] 詹英贤, 程明, 晏爱惠, 等. 芝麻细胞遗传的研究 III. 新的分类体系[J]. 北京农业大学学报, 1990, 16(1): 11-18.
[8] 黎明, 王嫣, 顾志峰, 等. 双壳贝类染色体标本制备技术的优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 515-518.
[9] Gill B S, Kimber G. Giemsa C-banding and evolution of wheat[J]. Proc Nat Acad Sci, 1974, 71: 4086-4090.
[10] Fride B M, Cermenio C, Zeller F J. C-banding polymorphism and analysis of nucleolar activity in *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy, and its added chromosomes to hexaploid wheat and the amphidiploid *Triticum dicocum* D. villosum[J]. Theor Appl Genet, 1987, 73(3): 337-342.
[11] Jiang J, Gill B S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis[J]. Genome, 1993, 36: 792-795.
[12] Mirzaghaderi G. A simple metaphase chromosome preparation from meristematic root tip cells of wheat for karyotyping or *in situ* hybridization[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(3): 314-318.
[13] 任艳, 王辉, 石延茂, 等. 不同预处理对花生根尖细胞有丝分裂制片的影响[J]. 花生学报, 2008, 37(2): 28-31.