

一种高效的蚕豆染色体加倍方法探讨

王晓雯, 桑贤春*

(西南大学 农学与生物科技学院, 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400716)

摘要: 为解决传统植物染色体加倍方法效率低、费工费时、中期分裂相细胞少等问题, 采用 4 种质量浓度秋水仙素对蚕豆侧根进行处理, 检测加倍效果。结果表明, 以 0.5~1.0 cm 长的蚕豆侧根为材料, 用 0.10 mg/g 的秋水仙素处理 48 h 时, 根尖的膨大率最高, 为 92.94%, 膨大根尖中部至根冠区的细胞诱导率为 28.20%, 显著高于中部至伸长区。侧根平均 8 条, 与传统的主根加倍方法相比, 工作效率提高了 8 倍, 且显微镜下观测到的中期分裂相细胞更多。因此, 该方法不仅适合植物染色体加倍试验的教学, 也为其他植物的染色体加倍提供了借鉴。

关键词: 秋水仙素; 蚕豆; 侧根; 染色体加倍

中图分类号: Q3-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)06-0042-04

An Efficient Method for Chromosome Doubling of Horsebean

WANG Xiao-wen, SANG Xian-chun*

(Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: To overcome the defects of inefficiency, labor consuming and lower induction rate in traditional chromosome doubling techniques, the lateral roots of horsebean were treated by 4 concentrations of colchicine and the doubling efficiency was tested. The results demonstrated that when the 0.5-1.0 cm lateral roots were used as material and treated for 48 h with 0.10 mg/g colchicine, the expanded rate of root tips reached to 92.94%. The cell induction rate of expanded root was 28.20% in the region from middle to root cap, which was significantly higher than in the region from middle to elongation zone. The present method displayed a higher doubling efficiency, increasing by 8 times compared with the traditional method (treating the taproot), and more metaphase cells were observed by means of microscope. Therefore, the method not only suits for teaching in plant chromosome doubling, but also offers a reference for chromosome doubling of other plants.

Key words: colchicine; horsebean (*Vicia faba*); lateral roots; chromosome doubling

目前, 植物染色体加倍试验多以洋葱、大蒜或蚕豆为材料, 秋水仙素为诱变剂。秋水仙素是一种生物碱, 味苦, 有毒。洋葱体积大, 受季节限制多经冷藏或辐射处理, 出根率较低, 培养所需时间久, 分裂相旺盛期持续时间短且不明显。大蒜体积小, 须根多, 劳动效率较高, 但细胞小, 染色体多, 不易分辨; 而且以低浓度秋水仙素处理时, 加倍的细胞少, 高浓

度处理时, 根又易褐化、腐烂, 对加倍方法要求较高。蚕豆体积小, 染色体大而数目少, 培养时间短, 既不受季节限制, 又取材方便, 效果也相对较好^[1]。因此, 蚕豆是植物染色体加倍试验的理想材料。传统蚕豆染色体加倍方法用秋水仙素处理主根, 以膨大的根尖整体制片观察, 检测到的中期分裂相细胞不仅较少, 也增加了试验成本和试验人员的劳动强度,

收稿日期: 2013-02-23

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(XDJK2011c016); 西南大学本科生试验教学改革项目

作者简介: 王晓雯(1975-), 女, 陕西户县人, 实验师, 硕士, 主要从事植物遗传学研究。E-mail: xwwang78@126.com

* 通讯作者: 桑贤春(1978-), 男, 山东郓城人, 副研究员, 博士, 主要从事水稻分子育种研究。

E-mail: sangxianchun@163.com

制约了蚕豆在染色体加倍试验中的广泛应用。因此,开发一种简单、高效、环保型植物染色体加倍方法具有重要意义。本研究针对传统试验存在的缺陷,以蚕豆侧根为处理对象,以膨大根尖的中部至根冠区部位为观测区,获得了较为理想的试验效果,报道如下。

1 材料和方法

1.1 试验材料

蚕豆种子购于重庆北碚天生桥市场。

1.2 处理设置与染色体加倍

将无霉变、无虫害的蚕豆种子用清水冲洗干净,浸泡 24 h 后平铺于含 3 层湿纱布的瓷盘中,并用 3 层湿纱布覆盖。25 °C 下培养至主根长 1 cm 时,切掉根尖培养侧根,待根长 0.5 cm 时,分成 5 组,每组 20 粒萌发种子,放入直径为 120 mm 的培养皿中。加入质量浓度分别为 0.05、0.10、0.50、1.00 mg/g 的秋水仙素,以清水处理为对照,25 °C 下继续培养。在培养 12、24、36、48、60、72 h 时分别检测膨大侧根数和总侧根数,计算膨大率。处理结束后,用自来水将供试材料冲洗干净,于上午 8:00—9:00 时剪下侧根置冰水混合物中,1~4 °C 下处理 24 h,再用卡诺氏固定液 I (无水乙醇:冰醋酸=3:1) 固定 24 h,然后用 95%、80%、70% 的乙醇逐级漂洗,直至无醋酸气味后置 70% 乙醇中,4 °C 保存。

膨大率 = 膨大的侧根数/观察总侧根数 × 100%。

1.3 细胞学鉴定

根据形态特征,切取鼓槌状根尖膨大部分。以膨大部位中央为基准线把材料分为两部分,区段 I 为中部至根冠区,区段 II 为中部至伸长区,常规制片法压片制标本。具体如下:1 mol/L 的 HCl 60 °C 解离 15 min 后,蒸馏水漂洗干净,置于载玻片上,滴 1 滴改良石碳酸品红染色液,捣碎组织并染色 5 min 左右,烤片,盖上盖玻片,敲片。显微镜下随机观察 60 个细胞,统计分析诱导率。

诱导率 = 中期分裂相细胞数/总的观察细胞数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度秋水仙素对蚕豆侧根生长的影响

据测定,25 °C 下清水处理的蚕豆侧根在 72 h 内增长了 2.4 cm,而 0.05、0.10、0.50、1.00 mg/g 的秋水仙素处理后,侧根增长量分别为 2.10、0.50、

0.40、0.37 cm,均低于清水对照。0.10、0.50、1.00 mg/g 秋水仙素处理的蚕豆侧根生长均缓慢,3 个质量浓度之间差异不明显(图 1),表明秋水仙素对蚕豆侧根的生长具有明显的抑制作用。

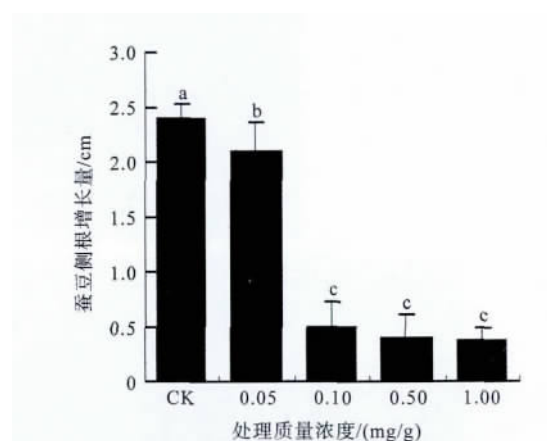


图 1 不同质量浓度秋水仙素对蚕豆侧根生长的影响

2.2 秋水仙素对根尖膨大率的影响

用 0.05、0.10、0.50、1.00 mg/g 的秋水仙素处理 12 h 时,未检测到膨大的蚕豆根尖;24 h 时,蚕豆根尖的膨大率分别为 32.18%、67.67%、65.67%、61.17%;48 h 时达到最大值,分别为 74.44%、92.94%、80.30%、79.60%;其后,各质量浓度下的蚕豆根尖膨大率逐渐下降。清水处理的蚕豆根尖自始至终未见膨大(图 2)。

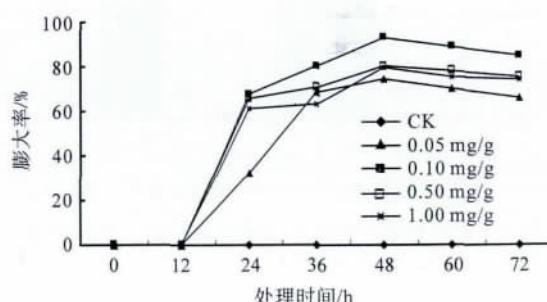


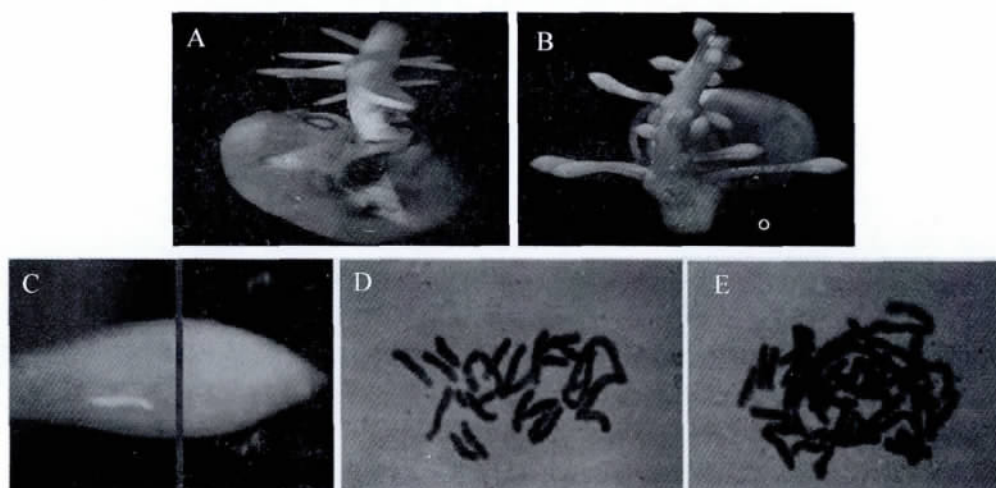
图 2 秋水仙素质量浓度和处理时间对蚕豆侧根根尖膨大率的影响

2.3 秋水仙素对蚕豆侧根中期分裂相的影响

由图 3 可见,蚕豆主根根尖切除后,侧根大量长出,一般 8~10 条。秋水仙素处理后,与对照相比,根尖明显变大,呈鼓槌状,染色体具有不同程度的加倍。把膨大的根尖分为区段 I 与区段 II (图 3C)。在 0.05、0.10、0.50、1.00 mg/g 4 种秋水仙素质量浓度处理下,蚕豆根尖在区段 I 的诱导率分别为 8.19%、28.20%、22.50% 和 19.83%,在区段 II 的诱导率分别为 2.03%、19.20%、11.40%、2.21%,0.10 mg/g 的秋水仙素诱导率为最高,与其他质量

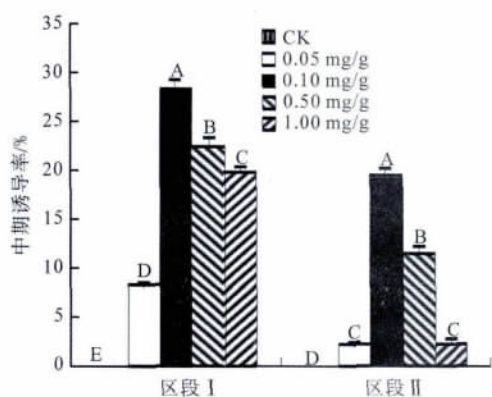
浓度相比,差异均达极显著水平($P < 0.01$,图 4)。区段 I 与区段 II 相比,4 种质量浓度处理下,均为区段 I 的诱导率较高,且差异也均达到了极显著水平

(图 5)。以上结果显示,0.10 mg/g 质量浓度的秋水仙素处理蚕豆侧根,利用区段 I 进行制片观察,效果较好。



A. 秋水仙素未处理侧根; B. 秋水仙素处理后的膨大侧根; C. 侧根膨大部位的分区:区段 I (右)和区段 II (左); D. 加倍后的蚕豆染色体,4n=24; E. 加倍后的蚕豆染色体,8n=48

图 3 蚕豆根尖的诱导及鉴定



上标不同字母表示 0.01 水平上差异显著,下同

图 4 不同质量浓度秋水仙素对蚕豆根尖的诱导率

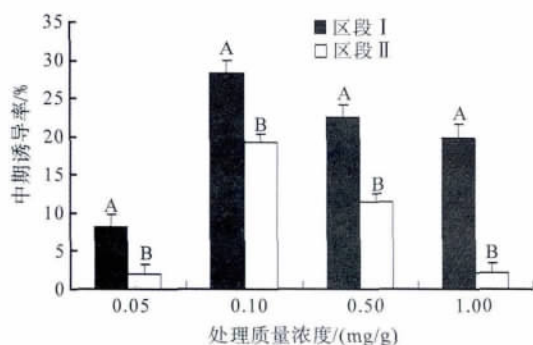


图 5 蚕豆根尖不同部位的诱导率

3 讨论

秋水仙素是一种生物碱,能抑制有丝分裂,破坏

纺锤体,使染色体停滞在分裂中期,导致细胞不分裂;但当质量浓度很低时,却能加快染色体运动,使其更快到达两极,因此,适宜质量浓度的秋水仙素是植物染色体加倍试验的关键。在染色体加倍试验中,需制片检测染色体数目以确定是否加倍,处于中期分裂相的细胞染色体易于观察统计。因此,在植物染色体加倍试验中,观察到的中期分裂相细胞越多,试验效果越好。通常,植物染色体加倍试验选用的材料有洋葱、大蒜、黑麦和蚕豆,洋葱和大蒜各 16 条染色体,黑麦 14 条,蚕豆 12 条。就染色体数目而言,蚕豆是最适合染色体倍性观察的材料,其次为黑麦,最后是洋葱和大蒜。进行染色体加倍,不同材料需要的秋水仙素质量浓度不同,一般认为,黑麦为 1.50 mg/g^[2],洋葱为 2.00 mg/g^[3],大蒜为 0.10 mg/g^[4],蚕豆主根为 0.50 mg/g^[5]或 1.00 mg/g^[6]。本试验采用梯度处理的方式,发现 0.05 mg/g 的秋水仙素对蚕豆侧根的生长基本没有抑制作用,0.10、0.50、1.00 mg/g 的具有极显著影响,但 3 个质量浓度之间的抑制力无显著差异。鉴于秋水仙素有剧毒,因此认为,0.10 mg/g 质量浓度的秋水仙素处理蚕豆侧根效果较好,与传统的蚕豆主根处理相比,秋水仙素质量浓度降低了 5~10 倍。

在秋水仙素处理黑麦根尖试验中,中期分裂相细胞随时间延长和浓度增加呈先增后减的变化过程^[7]。本研究中,蚕豆侧根的膨大率也出现了一个先增后减的过程,均在 48 h 时达到顶峰,这与前人

以蚕豆主根为材料的处理结果一致^[5-6]。处理质量浓度之间相比,0.10 mg/g 下的膨大率最高,处于中期分裂相的细胞也最多。同时发现,区段Ⅰ的中期分裂相细胞显著多于区段Ⅱ。因此认为,0.10 mg/g质量浓度的秋水仙素处理蚕豆侧根效果较好,且最佳观测区为根尖膨大部位中部至根冠区,这一方法是否也适用于洋葱、大蒜、黑麦等材料,有待进一步研究。

蚕豆侧根约8~10条,与1条主根相比,试验效率至少提高了8倍。侧根处理的最佳秋水仙素质量浓度为0.10 mg/g,仅为传统处理质量浓度(0.5~1.00 mg/g)的1/5~1/10,极大降低了对环境和研究人员的危害。蚕豆根尖膨大部位,中部至根冠区的中期分裂相细胞显著多于中部至伸长区,因此,利用区段Ⅰ检测染色体倍性比传统的利用整个膨大根尖效果更好。本方法具有简便、高效、低污染、效果好等优点,在植物遗传学染色体加倍试验中具有广泛的应用价值,同时也为其他植物多倍体的创制提供了借鉴。

参考文献:

- [1] 张丽敏,姜会学. 常见豆科植物种子作有丝分裂实验材料的探索与比较[J]. 和田师范专科学校学报,2009,28(5):176-177.
- [2] 陈于和,秦素平,林小虎,等. 秋水仙素对黑麦有丝分裂及多倍体诱导的影响[J]. 核农学报,2006,20(4):321-323.
- [3] 黄永莲,胡木林. 秋水仙素对洋葱根尖细胞的诱变效应[J]. 亚热带植物科学,2005,34(1):42-45.
- [4] 孙天国,张建,于天飞. 植物细胞多倍体诱导实验方法的改进[J]. 生物学通报,2010,45(7):53-54.
- [5] 李光明,刘文海,何波. 4种预处理对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响[J]. 湘潭师范学院学报:自然科学版,2005,27(1):82-87.
- [6] 闫秋洁,杨琼. 秋水仙素对蚕豆胚根生长的影响及多倍体诱导效应分析[J]. 广西植物,2012,32(5):386-391.
- [7] 秦素平,陈于和,林小虎,等. 秋水仙素处理对黑麦根尖细胞有丝分裂的影响[J]. 麦类作物学报,2006,26(4):142-144.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准,本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位,为便于读者阅读,现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km=千米, m=米, cm=厘米, mm=毫米;换算: 1 km=1 000 m, 1 m=100 cm, 1 cm=10 mm
- 2 重量单位: t=吨或 1 000 kg, kg=千克, g=克, mg=毫克;换算: 1 t=1 000 kg, 1 kg=1 000 g, 1 g=1 000 mg
- 3 面积单位: m²=平方米, hm²=公顷, cm²=平方厘米;换算: 1 hm²=10 000 m²
- 4 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d、h、min、s”表示

(本刊编辑部)