

丹参组织培养材料的染色体显微鉴定技术

蔡朝晖 高山林 郭 蓓¹

(遗传育种研究室)

关键词 丹参; 组织培养; 染色体; 显微鉴定

染色体是遗传基因的主要载体。生物的遗传、变异、繁殖和发育都与染色体的结构和行为有密切联系。染色体的倍数性变化是导致植物发生遗传变异的主要途径,这也为育种工作者创造选择优良品种的机会。有关丹参的染色体显微鉴定技术,国内外还未见报道。用组织培养的根尖进行染色体鉴定,可以在短时间内获得大量的材料。为了探索丹参在组织培养条件下的染色体显微鉴定制片技术,我们进行了取材时间、预处理方法、离析方法三个方面的系统试验,以期找出最佳的制片方法。并用此方法对用秋水仙素诱导的丹参试管苗株系进行了染色体数目的鉴定,从中准确、有效地鉴定出多倍体株系。

1 材料与方法

试验材料为取自山东的丹参(*Salvia miltorrhiza* Bunge)的组织培养根尖。繁殖培养基为

MS, 附加 6BA 0.5 mg/L, 生根培养基为 1/2 MS, 附加 IBA 0.2 mg/L, 白糖 3%, pH 5.8, 培养温度 25±1°C, 每天光照 12 h。

将丹参试管苗转入生根培养基中诱发生根。一周后, 待根长至 4~6 mm 时, 切下幼根根尖, 用细胞学研究中常用的压片法^[1,2]制片, 用“OLYMPUS BH-2”显微镜观察并摄影。

2 结果和讨论

2.1 取材时间试验 从 5:30 至 15:00, 每隔 1 h 取材一次, 用 0.1% 秋水仙素溶液处理 1 h, 温度控制在 10~20°C, 水洗后固定 2 h, 依次用 95% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水各洗三次。用 1 mol/L HCl 在 60°C 下解离 15 min, 水洗后染色 30 min, 压片, 镜检。按高山林^[3]等人的方法判断最佳取材时间, 结果见表 1, 图 1。

Tab 1. Cell number of mitosis in different time of cutting material

Time	Root number	Cell number in mitosis (Average, Ratio %)				Total
		Prophase	Metaphase	Anaphase		
5:30	4	137(34.25, 30.58)	311(77.75, 69.42)	0(0,0)		448(112, 100)
6:00	5	200(40, 14.59)	1138(227.2, 83.0)	33(6.6, 2.4)		1371(274.2, 100)
7:00	5	245(49, 19.07)	988(197.6, 76.89)	52(10.4, 4.05)		1285(257, 100)
8:00	6	159(26.5, 10.05)	1374(229.86, 85)	49(8.17, 3.1)		1582(263.7, 100)
9:00	4	2920(72.5, 27.65)	746(186.5, 71.12)	13(3.25, 1.23)		1049(262.25, 100)
10:00	5	169(33.8, 14.57)	929(185.8, 80.09)	62(12.4, 5.34)		1160(232, 100)
11:00	6	207(34.5, 19.38)	801(133.5, 75.0)	60(10.5, 6.2)		1068(178, 100)
12:00	7	240(34.29, 22.14)	781(111.5, 72.05)	63(9.5, 8.1)		1084(154.86, 100)
13:00	4	64(16.9, 6.68)	541(135.25, 81.85)	56(14.8, 4.7)		661(162.25, 100)
14:00	5	50(10.8, 2.22)	463(92.6, 76.15)	95(19.15, 6.3)		608(121.6, 100)
15:00	7	88(12.57, 10.47)	704(100.57, 83.91)	47(6.71, 5.60)		839(119.86, 100)

收稿日期 1992-11-25 本校 1992 届毕业生 本研究为国家医药局科研项目的部分内容

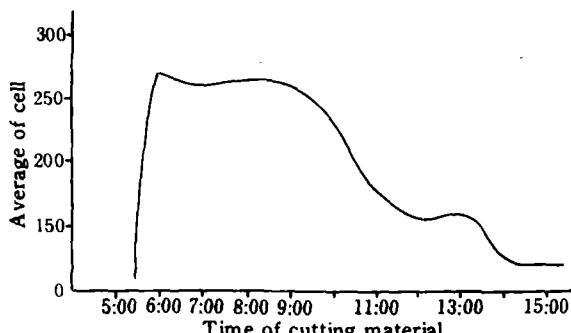


Fig 1. Cell number of mitosis per root tip in different time of cutting material

由图1可见,上午取材,尤其是6:00至9:00,分裂细胞数形成一个近似平台的高峰段,即处于分裂活动旺盛的时期。下午取材,分裂细胞数则逐步递减,说明组织培养条件下丹参细胞的有丝分裂存在着高峰时间,这与一般植物细胞的有丝分裂规律相符。但由于组织培养是在恒温和人工光照条件下,提供了细胞生长分裂的最适条件,因此分裂高峰较持久。10:00以后处于有丝分裂的细胞数明显减少,这是由于植物细胞生长分裂规律的保守性在组织培养条件下仍然存在的原因。从分裂前期、中期和后期的细胞数看,7:00 am以前处于前期的细胞数较多,10:00 am以后处于后期的细胞数逐步增多。由于前期的染色体细长且相互缠绕,后期和末期的染色体又移向两极,均难以计数,只有处于中期的染色体排列在赤道面上,明晰可数。根据表1,8:00 am则处于中期的平均细胞数最多,占86.85%。因此,选择该时为最佳取材时间。

2.2 预处理试验 于最适取材时间8:00 am取材,随机分组,分别按以下方法进行预处理,其它步骤同前。结果如下:

1. 未预处理:处于中期的细胞染色体细长缠绕,分散度也差(图2-1)。
2. 10~20℃ 0.1%秋水仙素溶液处理1 h;中期细胞多,染色体缩短的长度适宜,分散度好,染色体明晰可数,2n=14(图2-2)。
3. 10~20℃ 0.1%秋水仙素溶液处理

1.5 h;中期细胞多,但染色体分散度较差,大多聚成团。可能处理时间过长。

4. 10~20℃ 0.1%秋水仙素溶液处理2 h;中期细胞染色体缩短过度,聚成团状(图2-3),表明处理时间过长。

5. 10~20℃ 0.05%秋水仙素溶液处理1 h;中期细胞的染色体分散度较好,但细长弯曲。预示处理时间不够。

6. 10~20℃ 0.2%秋水仙素溶液处理1 h;中期细胞的染色体缩短过度。可能浓度过高造成。

7. 10~20℃ 饱和对二氯苯溶液处理3 h;中期分裂相少。染色体长度缩短较适宜,分散度也较好。

8. 0.002~0.004 mol/L 8-羟基喹啉10~20℃分别处理4 h;后期、末期细胞数多,中期细胞少,且染色体缩短不够,细长。

9. 4~5℃条件下冷冻24 h;中期少,且染色体分散不好。

比较上述各种预处理方法,用秋水仙素进行预处理,可以有效地抑制纺锤体形成,使更多的细胞处于中期分裂相。其中,又以0.1%秋水仙素处理1 h效果较好。染色体长度适宜,分散度好。所以,选用0.1%秋水仙素溶液处理1 h为宜。

2.3 离析试验 在以上二项试验的基础上,于8:00 am取材,0.1%秋水仙素预处理1 h,固定2 h后,随机分组,分别用以下方法离析,然后水洗,染色压片,镜检。结果如下:

1. 加2.5%纤维素酶和果胶酶的混合液,在20℃下酶解2 h;细胞聚集在一起。(图2-4)。

2. 加45%醋酸-1 mol/L盐酸-1%硫酸(100:10:1)混合酸溶液,在20℃时酸解60 min;边缘细胞解离开,但大部分中间细胞仍挤压在一起,解离不够。

3. 加混合酸溶液(成分同上),在20℃时酸解90 min;分散开的细胞较多一些,但仍有许多细胞聚在一起。

4. 加混合酸溶液离析 120 min, 大部分细胞分散开来, 但中间细胞仍然聚集。

5. 加 3% 果胶酶, 在 20℃ 时离析 30 min, 然后在 60℃ 下 1 mol/L 盐酸离析 5 min; 细胞间分散开, 同时染色体分散也较好(图 2-5)。

6. 在 60℃ 下, 1 mol/L 盐酸解 15 min;

大部分细胞离散开来, 染色体分散较好。

综合对比, 果胶酶和盐酸双重离析, 效果最佳。1 mol/L 盐酸 60℃ 时解离 15 min, 效果尚可且简便省时, 成本也较低。

为了进一步提高制片效果, 我们又用近几年报道的制片过程中的另一新技术——去壁低渗法^[1,4]进行试验, 加入了前、后低渗两

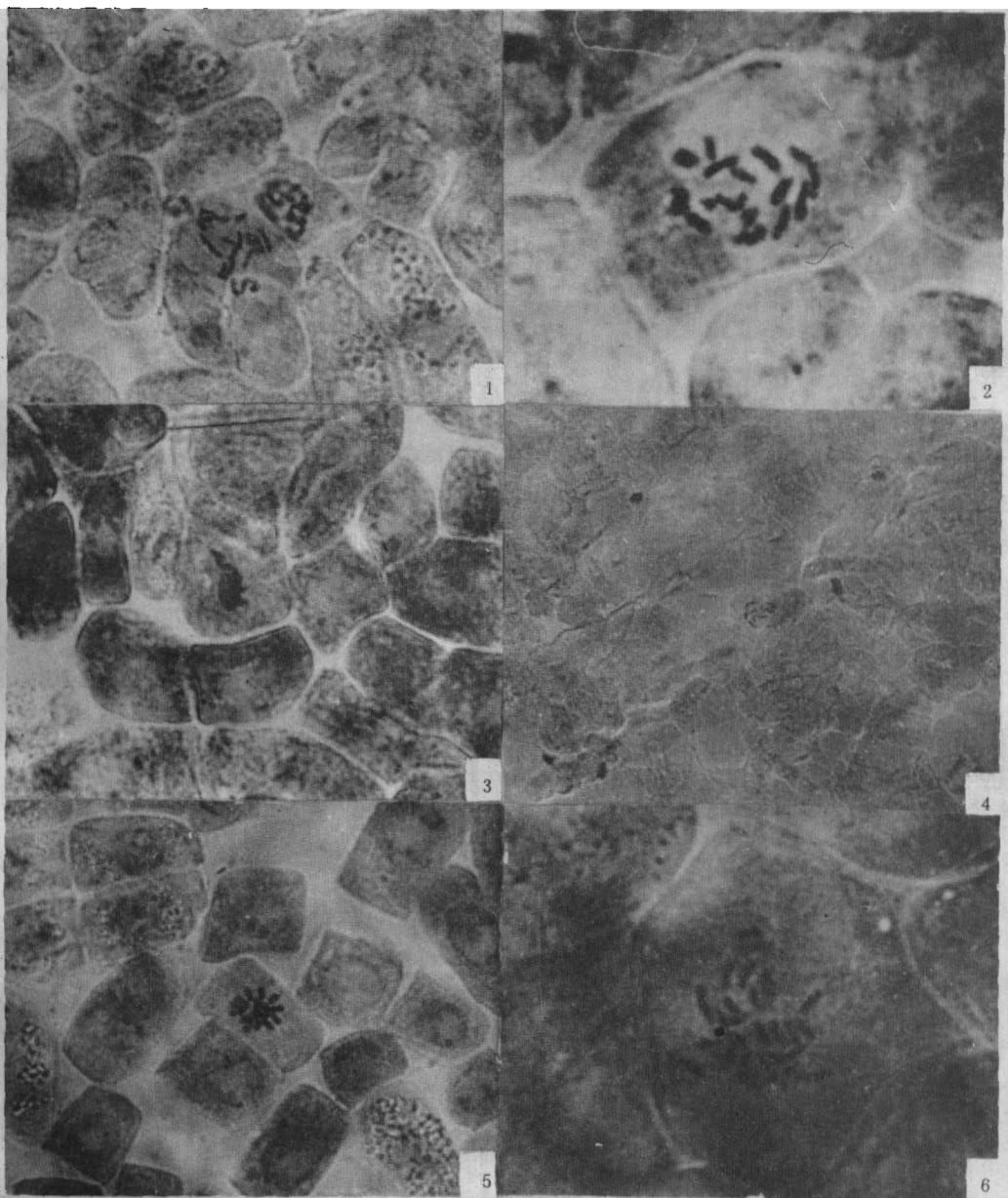


图 2 显微观察结果

2-1 未进行预处理的染色体($\times 3000$) 2-2 预处理适宜的染色体 $2n=14$ ($\times 9000$) 2-3 预处理过度的染色体($\times 3000$)
2-4 离析不够的细胞挤压在一起($\times 1200$) 2-5 离析适宜的细胞分散开($\times 3000$) 2-6 四倍体细胞 $4n=28$ ($\times 9000$)

个步骤,即在固定后,用 0.075 mol/L 氯化钾室温下前低渗 30 min,离析后,用蒸馏水后低渗 30 min。结果发现,前低渗对试验结果无太大影响,后低渗则可以使细胞吸收水分,充分膨胀,加强了细胞间的离散程度,同时染色体的分散也更好。

2.4 适宜的制片方法 综合以上试验结果,丹参组织培养材料较好的制片方法如下:

8:00 am 取丹参幼嫩根尖,蒸馏水洗 3 次,0.1% 秋水仙素溶液 10~20℃ 预处理 1 h,水洗 3 次,95% 乙醇-冰醋酸(3:1)冰箱中固定 2 h,依次用 95% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水各洗 3 次,20℃ 下 2.5% 果胶酶离析 30 min,然后在 60℃ 条件下,1 mol/L 盐酸解离 5 min,蒸馏水后低渗 30 min,压片。

我们按上述方法,对经人工诱导的山东产丹参试管苗的 102 个株系进行根尖染色体鉴定,将经过三次以上重复鉴定为多倍体的株系进行繁殖。表明该方法效果好、速度快、重复性好,已准确地鉴定出十四个多倍体株系(图 2-6),为多倍体育种奠定了基础。

参考文献

- 1 朱微.植物染色体及染色体技术.北京:科学出版社,1982;42-83
- 2 李国珍.染色体及其研究方法.北京:科学出版社,1985;108-144
- 3 高山林,赵爱平,徐德然.浙江贝母组织培养材料的染色体显微鉴定技术.中国药科大学学报,1990;21(6):345
- 4 张自立,俞新大.植物细胞和体细胞遗传学技术与原理.北京:高等教育出版社,1990;13-15

Technique of Chromosome Microscopic Determination in Cultured Material of *Salvia miltorrhiza*

Cai Zhaohui, Gao Shanlin, Guo Pei

Department of Plant Genetics and Breeding

The method in chromosome determination of cultured material of *Salvia miltorrhiza* Bag. ssp was studied in order to obtain good separation of chromosome for microscopic determination. A series of experiments, such as the time of cutting material, the pretreatment method and the hydrolytic method were conducted. Based on the results of experiments, a good method was developed. By using the method, polyploids were obtained by chromosome microscopic determination of *Salvia miltorrhiza* plantlets induced artificially.

Key words *Salvia miltorrhiza*; Tissue culture; Chromosome; Microscopic determination