

柑桔嫩叶染色体制片技术研究简报

A STUDY ON THE TECHNIQUE FOR CHROMOSOME PREPARATION IN CITRUS YOUNG LEAF — A BRIEF INFORMATION

杨子安

Yang zian

叶自行

Ye zixing

(园艺系)

(Department of Horticulture)

在进行柑桔选育种时对染色体的分析和鉴定,一般正如 Soost 和 Cameron 1975 年所报道的可以用花蕾、根尖、茎尖和胚制片观察。但是,目前我国柑桔类果树已普遍采用嫁接繁殖。对柑桔类果树的多倍体诱变育种和辐射诱变育种处理的嫁接苗的嫩芽或接穗时,要进行细胞学观察和鉴定,根本不可能采用根尖为材料,如用花蕾制片检查也要待嫁接幼苗生长 2~3 年开始开花时才能进行。综合一些报道,认为在短期作物观察体细胞的染色体,用根尖比茎尖方便,而用叶片又比根尖方便。到目前为止,除短期作物如西瓜和蚕豆等外,在柑桔方面还未有报道采用嫩叶检查染色体。对上述的柑桔处理苗,如果能用嫩叶检查染色体,就能尽早确定其诱变因素效应,这对诱变育种工作是很必要的。因此,我们对柑桔嫩叶染色体制片技术进行试验研究。

以红柠檬 (*Citrus limonia* Osbeck)、暗柳橙 (*C. Sinensis* (L.) Osbeck)、沙田柚 (*C. grandis* (L.) Osbeck) 三个柑桔类果树嫁接幼苗的嫩叶为试材。在探索嫩叶细胞分裂高峰期每天从 8 时至 17 时每隔半小时采样一次,采摘未自剪长度约 4 厘米的顶端生长旺盛的嫩梢。把摘下来的嫩梢立即放入 0.05% 秋水仙素或 0.002M 8-羟基喹啉中,置于 12~18℃ 处理 2—3 小时,用卡诺液固定 4~24 小时,1N 盐酸于 60℃ 处理 15 分钟,然后用 4% 硫酸铁铵于 40~50℃ 中媒染 1 小时,水洗 4~5 次,每次 5 分钟,务必使残留的硫酸铁铵冲洗干净(以上每个步骤完后都要用水冲洗,并用吸水纸吸干多余的水份),再加入 0.5% 的苏木精染色 4 小时以上。如加入苏木精后,溶液很快混浊,变黑,则表示硫酸铁铵未冲洗干净,需用水重新冲洗,再染色。染色后的材料在水中加入少量氨水洗数次,使颜色充分蓝化,最后用 45% 的冰醋酸分色软化 60~80 分钟。经染色的嫩梢,从其顶部向下算起,由第一片叶至第四片叶(图 1)可任意选取其中一片,放在载玻片上,滴一滴 45% 的冰醋酸压片镜检。

• 本文承黄昌贤教授和郑玉梅讲师审阅,电镜室章潜才同志帮助拍片,谨此致谢。

经过两年多来的反复试验,我们发现在柑桔嫩叶细胞分裂高峰时采样制片,就容易观察到分散可计算染色体数目的有丝分裂中期,见图2。经秋水仙素诱变处理的沙田柚,我们也能用嫩叶检查出由二倍体($2n=18$)倍加成四倍体($4x=36$)的染色体。这就说明了通过柑桔嫩叶染色体的检查是完全可以早期确定诱变因素效因。

我们以暗柳橙为材料,分别于1981年4月13日、5月24日、6月3日、10月23日、12月27日、12月30日采样观察,探索不同月份对柑桔嫩叶细胞分裂的影响,结果发现柑桔嫩叶细胞分裂是受温度制约的。在广州地区的4~10月是温暖季节,上午9时的气温大约是20~30℃,在这段期间暗柳橙嫩叶的细胞分裂,每天出现三次分裂高峰,第一次是上午9时,第二次是11时30分,第三次是12时30分。在这三次高峰期间分裂细胞所出现的频率差异不大。12月是寒冷季节,如果当日上午9时30分当苗圃气温上升到18℃时,也同样出现第一次细胞分裂高峰,12时30分又出现第二次细胞分裂高峰。但这二次高峰期间分裂细胞所出现的频率差异较大,12时30分的细胞分裂高峰所出现的频率比之在9时30分的细胞分裂高峰所出现的频率高。但是,1981年12月30日当日苗圃气温在12℃以下,则整天都没有发现细胞分裂。

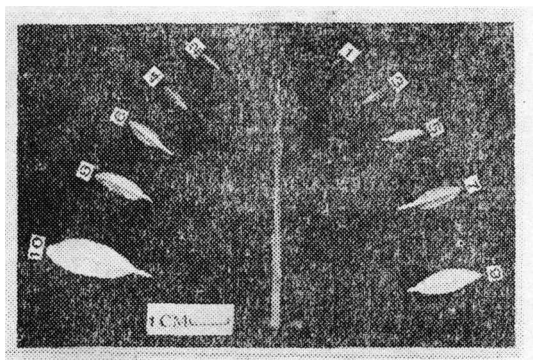


图1 取第一至第四片叶任意一片压片
(图中数字是叶片编号)

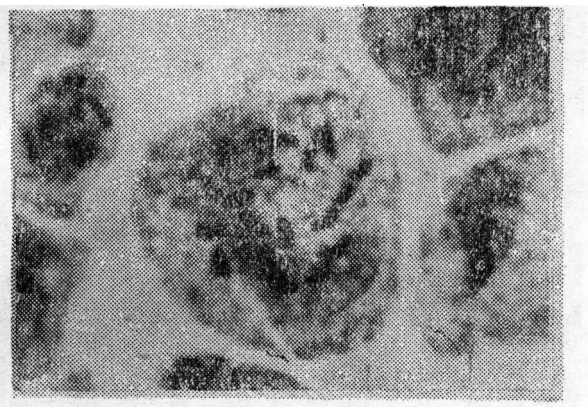


图2 红黎檬嫩叶细胞染色体,中期 $2n=18$

至于柑桔不同种的嫩叶细胞分裂高峰期是否一致,我们采用红黎檬、暗柳橙、沙田柚三个柑桔类的嫩叶制片镜检,结果发现它们之间都是在上午9时出现细胞分裂高峰。频率分别是:红黎檬 $68.30 \pm 21.85\%$ 、暗柳橙 $79.08 \pm 18.09\%$ 、沙田柚 $72.99 \pm 17.79\%$ 。

蒂吉 Tjio 和莱旺 Levan (1950) 首先证实8-羟基喹啉不仅能阻止纺锤体的活动,而且能赋予中期染色体在赤道面上保持相应的排列位置。我们于1981年6月4日上午9时用红黎檬的嫩叶经过0.002N 8-羟基喹啉前处理3小时所出现的中期细胞与无前处理的对比相差近9倍。

综合上述试验得出:由于柑桔一年可以抽多次梢,用嫩叶检查染色体,具有取材方便,重复系数大的优点,特别适用于诱变处理嫁接苗的嫩芽或接穗所需要的细胞学检查,以便能早期确定其诱变因素效应。