

制备黄豆花生染色体标本前处理的初步研究

马艳梅

林兆平

(农学系)

(广州师院生物系)

提 要

在染色体标本制备中,对黄豆离体根尖用0.002M 8-羟基喹啉、0.05%秋水仙碱及前二者的等量混合液分别在18℃恒温下前处理三小时,冷蒸馏水(4℃~5℃)中前处理22小时,以8-羟基喹啉在18℃处理出现的中期分裂相最多。用0.002M 8-羟基喹啉在18℃~20℃恒温下,对黄豆和花生根尖进行不同间隔时间前处理,结果观察到黄豆根尖的晚前期和中期分裂相以3~3.5小时最多;花生根尖的中期分裂相以2~4小时最多。

关键词 染色体标本制备;黄豆;花生;前处理

引 言

染色体制片技术是细胞学和遗传学研究的基础。近年来,随着对细胞微观结构研究的日益深入,在观察细胞分裂期中染色体的变化;染色体数目和结构变异;体细胞染色体联会;染色体组型以至带型分析;鉴定物种的亲缘关系以至鉴定各种代换系、附加系等方面的研究上都要求制备出较好的染色体标本,而且,大多数研究都以晚前期和分裂中期的染色体最适合于观察和分析。“前处理”是染色体标本制备中较关键的一步。采用合适的药物进行恰如其份的处理,使染色体标本积累较多理想的晚前期及中期分裂相。既要使染色体螺旋化而缩短加粗到一定程度,以便获得染色体数目齐全、分散而不重叠的细胞标本,又要使染色体保持合适的长度,以利观察每条染色体的个性特点,为根据需要而对染色体标本进行处理如分带处理创造前提。

前人对上述问题曾作过广泛的研究^[1],但常常由于作物不同、地点不同、温度不同、处理时间不同以及其他条件的差异,“前处理”的效果常常发生变化。

本实验拟在前人研究的基础上,谨对黄豆、花生两种作物的离体根尖,在恒定的温度下,了解采用某一种药物在一定浓度下,用多长处理时间能获得较多晚前期及中期分裂相。希望为以后的研究获得较稳定的效果提供参考。

1989年1月11日收稿

材料与方法

(一) 试验材料

广东博罗黄豆, 来源于广东省博罗县农家。花生: 粤油116号, 来源于广东省农科院经作所。

(二) 方法

取黄豆、花生种子分别用流水浸种法在常温下浸种约12小时, 置恒温箱内25℃催芽。在种子胚根长至1~2 cm时, 截取根尖按下面的设计分别进行离体前处理, 然后参照低渗去壁的染色体标本制备法^[2, 3], 进行前低渗、前固定、复水、酶解, 后低渗、后固定、火焰干燥制片、Giemsa染色, 把制备好的染色体标本在显微镜下检查观察结果。

前处理的设计如下:

1. 不同药物处理黄豆根尖: 采用四种不同处理: (1) 0.002M 8-羟基喹啉 18℃恒温下处理三小时; (2) 0.05%秋水仙碱 18℃恒温下处理三小时; (3) 0.002M 8-羟基喹啉+0.05%秋水仙碱 1:1 混合液 18℃恒温处理三小时; (4) 冷蒸馏水 4℃~5℃处理22小时。

每隔几天按上述四种处理进行一次实验, 作为一次重复, 共重复四次。每次重复的(1)(2)(3)处理在同天上午七时开始, (4)处理在前一天中午12时开始, 使四种处理基本同时进入前低渗。

2. 同一药物不同时间处理黄豆根尖。用0.002M 8-羟基喹啉为前处理药物, 在18~20℃恒温下分别按3小时、3.5小时、4.5小时、5.5小时四个处理四次重复。每次重复在同一天处理。

3. 同一药物不同时间处理花生根尖。用0.002M 8-羟基喹啉为前处理药物, 在18~20℃恒温下, 分别按下列时间处理:

第一次处理: 在2~8小时范围内, 每隔一个小时作一个处理, 共七个处理, 两次重复。

第二次处理: 在第一次处理镜检后, 淘汰分裂相少的处理, 取分裂相较多的在2~4小时范围内, 每隔半小时设一个处理, 共五个处理, 二次重复。

试验结果

(一) 不同药物对黄豆前处理的结果:

试验结果表明, 几种处理都能观察到中期分裂相, 但以0.002M 8-羟基喹啉为较多, 0.05%秋水仙碱+0.002M 8-羟基喹啉混合液次之, 秋水仙碱(0.05%)单独处理与低温4~5℃冷蒸馏水处理出现的中期分裂相较少(见表1)。方差分析表明: 区组间差异不显著, 说明各重复间结果接近, 处理间差异显著, 说明不同药物效果不同($F=6.753$; $F_{0.05}=3.86$; $F_{0.01}=6.99$)。处理1与处理2、3、4间差异显著, 而处理2、3、4间无显著差异(表1), 说明8-羟基喹啉是黄豆根尖(离体)前处理比

表1 不同药物产生分裂中期的细胞数目*

处 理 重 复	1 8-羟基喹啉 (0.002M)	2 秋水仙碱 (0.05%)	3 8-羟基喹啉+ 秋水仙碱(2)	4 低温 4—5℃	Tb
I	173	80	57	40	350
II	157	55	110	72	394
III	145	72	61	79	357
IV	85	60	93	68	306
Ti	560	267	321	259	1407
差异显著性 测验结果	a	b	b	b	
$\bar{X}$	13.6	6.5	7.8	6.3	

• I、II、III重复为10个片，IV为11个片的分裂中期细胞总数。

各处理间总和显著性测验结果，小写字母相同的表示差异不显著（表2、表3同）

表1中 $L.S.D_{0.05}=174.24$

$L.S.D_{0.01}=250.34$

较合适的药物。

从镜检观察，8-羟基喹啉处理的，每个片都能出现一定数目的分裂相细胞，染色体大小适中，分散较好。低温处理的从总数看出出现的中期分裂相较少，细胞多停留在间期及前期阶段。但个别片分裂相多达20个，染色体分散较好，着丝粒清晰，染色体缩得太短。处理2和处理3分裂相较少，但染色体长度较宜，所以分散度和均匀度也较合适。

（二）0.002M 8-羟基喹啉对黄豆根尖前处理的结果

表2 羟基喹啉不同处理时间观察到晚前期及中期细胞数目*

处 理 重 复	1 3小时	2 3.5小时	3 4.5小时	4 5.5小时	Tb
I	300	312	145	78	835
II	320	380	178	84	962
III	414	294	214	72	994
IV	317	428	183	89	1017
Ti	1351	1414	720	323	3808
差异显著性 测验结果	a	a	b	c	
$\bar{X}$	33.8	35.4	18.0	8.1	

• 每种处理为10个片的晚前期及中期分裂相累加数。

$L.S.D_{0.05}=278.94$

$L.S.D_{0.01}=400.83$

试验结果表明: 在18~20℃恒温下, 0.002M 8-羟基喹啉对黄豆根尖进行不同间隔时间处理, 以3~3.5小时出现的晚前期及中期分裂相比较多, 且染色体较粗短, 长度尚算合适。4.5—5.5小时出现的分裂相比较少。方差分析表明: 处理间差异很显著($F=36.03$; $F_{0.05}=3.86$; $F_{0.01}=6.99$)。处理1与处理2间差异不显著, 而处理1、2与处理3、4间差异却很显著(见表2), 说明3小时至3.5小时都是比较合适的处理时间, 而4.5小时与5.5小时出现分裂相少, 不宜采用。

(三) 8-羟基喹啉不同处理时间对花生分裂相的影响

表3 8-羟基喹啉不同处理时间观察到的分裂中期细胞数目*

试验次数	处理 重 复	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Tb
		2小时	2.5小时	3小时	3.5小时	4小时	5小时	6小时	7小时	8小时	
第一次	I	40		52		64	5	10	7	9	187
	II	60		38		93	25	25	16	9	266
	小计	100		90		157	30	35	23	18	453
	差异显著性 测验结果	a		a		b	c	c	c	c	
	$\bar{X}$	5.0		4.5		7.9	1.5	1.8	1.2	0.9	
第二次	I	51	117	56	86	43					353
	II	57	67	76	62	81					343
	小计	108	184	132	148	124					696
	差异显著性 测验结果	a	a	a	a	a					
	$\bar{X}$	5.4	9.2	6.6	7.4	6.2					
Ti		208		222		281					
$\bar{X}$		5.2		5.6		7.0					

*每种处理为10个片的中期分裂相累加数。

L.S.D 0.05=41.13; L.S.D 0.01=62.30

在第一次试验中, 5~8小时处理花生根尖细胞中期分裂相少, 方差分析表明: 处理间差异很显著($F=19.84$; $F_{0.05}=4.28$; $F_{0.01}=8.47$)。处理1、3与处理5、6、7、8、9间差异显著或很显著, 而处理6、7、8、9间无显著差异(见表3)。从显微镜观察, 5~8小时处理, 染色体极粗短, 且残缺不全, 说明处理时间过长, 对染色体产生药害。在第二次试验中, 淘汰5小时及更长时间的处理, 在2至4小时范围内的五个处理中, 以处理2.5小时为最佳(见表3)。进行方差分析的结果, 区组间及处理间均无显著差异($F<1$), 故各处理间无须再进行显著性测验, 说明0.002M 8-羟基喹啉处理花生根尖在2~4小时的范围内都较合适。进行显微镜观察发现, 在此期间内处理的不但胞细出现的中期分裂相比较多, 染色体长度适中, 分散也较好, 大多数分裂相细胞能看清40条染色体或接近于40条染色体。

讨 论

(一) 同一作物以不同药物进行前处理效果有差异。

差异的原因是由于不同药物对细胞分裂的作用机制不同。如秋水仙碱可能的机制是对纺锤丝有麻醉或毒害作用,也可能是抑制了ATP从而阻止和破坏纺锤体的形成及活动^[1]。而8-羟基喹啉能阻止纺锤体的活动,能赋予中期染色体在赤道面上保持其相应的排列位置。其作用机制可能是引起细胞质粘滞度的改变从而导致纺锤体的活动受阻^[1]。所以对于不同作物应考虑选择对该作物合适的前处理药物,才可能获得较好的效果。

(二) 同一药物不同时间处理效果有差异。

由于处理时间过短,积累的分裂相较少,时间过长引起药害,不仅染色体排列紊乱,还会使染色体残缺不全或变形,或使染色体缩得过短而影响前处理的效果。而不同作物由于染色体大小不同、个性不同、应采用不同的处理时间,每一种作物应确定一个较合适的处理时间范围。

本试验在设计时,希望做到各步骤均在恒定的条件下进行,使试验结果尽可能准确一些。但“条件不变”往往是相对的,不是绝对的,尤其是在制片步骤多的情况下。因此,本试验有一定的参考价值,也有其局限性。

引 用 文 献

- [1] 朱激主编.植物染色体及染色体技术.北京:科学出版社,1982:51—60
- [2] 朱激主编.植物染色体及染色体技术.北京:科学出版社,1982:99—114
- [3] 王正询,潘坤清,林兆平.遗传,1985:7(5):35—39

PRELIMINARY STUDY ON THE PRETREATMENT WHEN PREPARING CHROMOSOMAL SLIDES OF SOYBEAN AND PEANUT

Ma Yanmei

Lin Zhaoping

(Dept. of Agronomy)

(Dept. of Biology Guangzhou Normal College)

ABSTRACT

In the preparation of chromosomal slides, the root tips of soybean (*Glycine max*) in vitro were pretreated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline, 0.05% colchicine and the two solutions mixed (1:1v/v) at constant temperature of 18℃ for 3 hours as well as in cold distilled water (4~5℃) for 22 hours. The highest number of cells in metaphase of mitosis were observed with 8-hydroxyquinoline only at 18℃. When the root tips of soybean and peanut (*Arachis hypogaea*) were pretreated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline at constant temperature of 18~20℃ and for different durations, the results showed that the greatest number of cells in late prophase and metaphase of mitosis were observed for soybean pretreated 3~3.5 hours, and in metaphase of mitosis for peanut pretreated 2~4 hours.

Key words: Preparation of chromosomal slides; Soybean (*Glycine max*); Peanut (*Arachis hypogaea*); Pretreatment