

秋水仙素对肇东苜蓿根尖细胞染色体的影响

曹惠美¹, 张月学², 刘凤歧², 唐凤兰², 韩微波², 刘杰淋², 朱瑞芬²

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省农业科学院 草业研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了探究秋水仙素对肇东苜蓿根尖细胞染色体的影响, 利用不同浓度的秋水仙素(0.01%、0.05%、0.10%、0.15%和0.20%)以及处理时间(12、24、36和48 h)分别对肇东苜蓿根尖细胞进行诱导, 观察肇东苜蓿根尖细胞染色体、细胞中期分裂指数和细胞加倍指数的变化。结果表明:秋水仙素诱导了肇东苜蓿根尖细胞染色体的变异, 细胞内染色体加倍, 数目不等(32、64及128条);在时间与浓度互作方面, 秋水仙素溶液浓度为0.15%时处理肇东苜蓿根尖12 h, 使细胞中期分裂指数达到最大值18.51%;利用浓度为0.10%的秋水仙素处理24 h, 细胞加倍指数达到最高值11.57%。

关键词:肇东苜蓿;秋水仙素;染色体;中期分裂指数;细胞加倍指数

中图分类号:S551+.7

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)05-0121-04

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生豆科牧草, 不仅具有营养丰富, 适口性好, 抗逆性强、分布广、产量高和品质好等特点, 而且还具备改土培肥、蓄水以及保持生态平衡的能力, 并兼有“牧草之王”的美誉, 是我国主要栽培牧草品种之一, 也是黑龙江省建立人工草场的主要种植品种^[1-5]。在牧草育种的过程中, 已有多种被成功诱导出的同源四倍体及同源多倍体物种的牧草, 其中在黑麦草(*Lolium perenne* L.)和三叶草(*Trifolium pretense* L.)上多倍体诱导已见成效。为了选育紫花苜蓿倍性新品种, 采用人工诱导植物多倍体, 其中最常用的人工加倍植物染色体的方法是利用化学药剂来诱导, 目前使用最广泛、最有效的试剂为秋水仙素^[6-12]。秋水仙素可诱导生物体遗传物质的变异, 作用机制为秋水仙素能够与分裂期细胞中的微管蛋白异二聚体相结合, 从而抑制了微管的组装, 阻碍了纺锤丝的形成, 从而影响了细胞分裂中期后的进程^[13], 使细胞染色体加倍。各种植物对秋水仙素的不同处理浓度、时间以及处理方法等产生不同程度的影响。基于此该试验初步探讨秋水仙素不同浓度以及不同处理时间对肇东

苜蓿根尖细胞染色体的影响, 对紫花苜蓿倍性育种具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为2009年黑龙江省农业科学院草业研究所培育基地收获的肇东苜蓿。

主要试剂为秋水仙素, 是由中国惠世生化试剂有限公司生产的分析纯, 根据秋水仙素不同浓度(0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%)配制成溶液。还有对二氯苯、卡诺固定液、1 mol·L⁻¹盐酸、45%醋酸和希夫试剂。

1.2 方法

1.2.1 根尖的处理及染色体制片 挑选大小均匀饱满的肇东苜蓿种子, 先用砂纸轻轻打磨种子的表皮, 之后放入蒸馏水中浸泡12 h, 然后把吸胀的种子整齐地摆放在铺有滤纸的培养皿中, 加入适量蒸馏水, 蒸馏水至不能流动为宜, 之后放到23.5℃恒温培养箱中培养至露白;将露白的种子取出, 放入4℃冰箱中进行低温处理48 h, 而后将培养皿重新放入23.5℃培养箱中培养至根尖长到0.5~1.0 cm时, 将根尖用滤纸吸干, 转到5个培养皿中, 分别用5种不同浓度(0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%)的秋水仙素溶液进行处理, 再放入23.5℃培养箱中继续培养, 每隔12 h(即12、24、36、48 h)取材1次。

剪取的根尖用蒸馏水冲洗2~3次, 用对二氯苯饱和水溶液预处理根尖2 h, 预处理后将根尖放入卡诺氏固定液中固定24 h, 之后将材料放入70%乙醇中可放于4℃冰箱保存。

收稿日期:2012-01-08

基金项目: 农业科技成果转化资金资助项目(2011GB2B200005);黑龙江省农业科技创新工程种子创新基金资助项目(2010-10)

第一作者简介:曹惠美(1986-), 女, 黑龙江省牡丹江市人, 在读硕士, 从事牧草遗传与育种研究。E-mail: caohuimei_lucky@sina.cn。

通讯作者:张月学(1953-), 女, 黑龙江省巴彦县人, 硕士, 研究员, 从事牧草种质资源和育种研究。E-mail: l_fq2003@163.com。

固定后的材料转入蒸馏水中充分洗涤,将材料放入已预热至 $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 的 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 中,保温 $9\sim 10\text{ min}$,用蒸馏水充分洗涤,将剩余的 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 洗干净,在希夫试剂中染色,一般 2 h 左右,制片观察。

1.2.2 数据统计分析 从每个处理组的染色体制片中选择具有代表性的5张制片,每张制片中统计300个细胞,一共统计1500个细胞,根据马育华编写的《田间试验与统计分析》^[15]统计出总的观察细胞数、加倍细胞数和中期有丝分裂细胞数并进行分析。

按公式计算中期有丝分裂指数和细胞加倍指数:中期有丝分裂指数/ $\%$ =中期有丝分裂细胞总数/观察细胞总数 $\times 100$;细胞加倍指数/ $\%$ =加倍细胞总数/观察细胞总数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素对肇东苜蓿根尖细胞染色体的影响

肇东苜蓿是四倍体植物($2n=32$),未经秋水仙素处理肇东苜蓿染色体数目为32条染色体(见图1)。当经过不同浓度和不同时间的秋水仙素处理后,肇东苜蓿根尖细胞会出现不同程度的变异,部分处于有丝分裂时期的细胞染色体发生了变化,产生了 $2n>32$ 的变异类型。同一根尖细胞

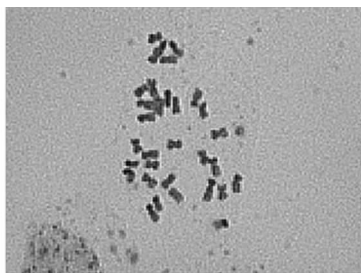


图1 未经处理肇东苜蓿($2n=32$)的染色体
Fig.1 The cell chromosome of the control Zhaodong alfalfa ($2n=32$)

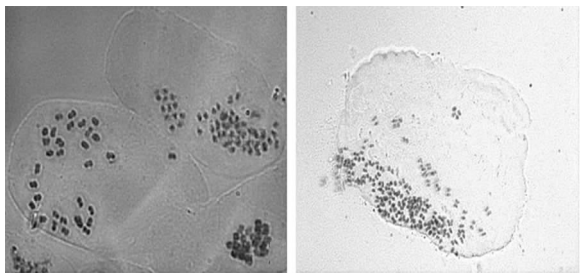


图2 经秋水仙素处理根尖细胞染色体变化的情况
Fig.2 Change of root tip cell chromosome after treating with colchicines

受秋水仙素的影响程度不同,导致细胞染色体加倍不同步,因此不同细胞的染色体数有差异(见图2)。

2.2 秋水仙素对肇东苜蓿根尖细胞有丝分裂的影响

秋水仙素不同浓度及处理时间对肇东苜蓿根尖细胞有丝分裂的影响(见表1,表2)。由表1可知,经过秋水仙素处理的肇东苜蓿根尖 12 h ,细胞有丝分裂指数较高,随着浓度的升高,有丝分裂指数先升高后降低,低浓度的秋水仙素可以促进细胞处于分裂期,但当秋水仙素浓度超过 0.10% 时,抑制了细胞进入分裂期,使细胞分裂指数下降。随着处理时间的延长,由于处于分裂期的细胞越来越少,秋水仙素对细胞的毒害作用加强,致使肇东苜蓿根尖细胞有丝分裂指数随时间的推移而下降。经方差分析(见表2)表明,不同处理浓度以及时间与浓度交互差异不显著,不同处理时间对肇东苜蓿根尖细胞染色体变异达到极显著水平。

表1 不同时间和浓度的秋水仙素对肇东苜蓿根尖细胞有丝分裂的影响

Table 1 Interaction of treating time and concentrations of colchicines on root tip mitosis

处理时间/h	有丝分裂指数 Mitosis index				
Treating time	0.01%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
12	14.20	15.49	20.01	19.95	13.77
24	12.94	11.78	12.84	11.17	9.46
36	7.62	6.25	6.55	8.29	9.00
48	3.00	5.33	4.73	2.93	2.46
CK	9.48	9.25	9.44	9.51	9.28

表2 不同时间和浓度的秋水仙素对肇东苜蓿有丝分裂的影响

Table 2 Interaction of treating time and concentrations of colchicines on root tip mitosis

变异来源 Source of variation	自由度 df	均方差 MS	
		中期分裂指数 Metaphase index	细胞加倍指数 Cell doubling index
区组间 Interblock	1	0.534	0.256
处理间	19	0.006	0.003
Treatment combination			
时间 Time	3	0.034 **	0.014 **
浓度	4	0.000	0.001
Concentration			
时间 \times 浓度	12	0.001	0.000
Interaction of concentration and time			
误差 Error	40	0.001	0.001

2.2.1 秋水仙素的浓度对中期分裂指数及细胞加倍指数的影响 随着秋水仙素浓度的升高,细胞中期分裂指数随之上升,当秋水仙素浓度为0.15%时,肇东苜蓿根尖细胞中期分裂指数达到最大值10.08%,而当秋水仙素浓度为0.05%时,细胞加倍指数达到最大值7.83%,之后随浓度的升高而降低(见表3)。

表3 秋水仙素的浓度对肇东苜蓿中期分裂指数和细胞加倍指数的影响

浓度/% Concentration	中期分裂指数 Metaphase index			细胞加倍指数 Cell doubling index		
	X/%			X/%		
	X/%	0.05	0.01	X/%	0.05	0.01
0.01	9.22	a	A	5.69	a	A
0.05	9.51	a	A	7.83	b	A
0.10	9.81	a	A	7.11	ab	A
0.15	10.08	a	A	6.63	ab	A

2.2.2 处理时间对中期分裂指数和细胞加倍指数的影响 由表4可知,随着处理时间的延长,中期分裂指数下降,12 h时细胞中期分裂指数最高达到14.69%。而细胞加倍指数随处理时间的延

长先上升后下降,细胞加倍指数达到最高值(10.40%)的处理时间为24 h。由表4可以看出,秋水仙素处理肇东苜蓿根尖的时间对中期分裂指数的影响极显著,处理时间12~36 h对细胞加倍指数影响极显著,处理时间12 h和48 h对细胞加倍指数的影响不显著。

表4 不同处理时间对肇东苜蓿中期分裂指数和细胞加倍指数的影响

时间/h Time	中期分裂指数 Metaphase index			细胞加倍指数 Cell doubling index		
	X/%			X/%		
	X/%	0.05	0.01	X/%	0.05	0.01
12	14.69	a	A	5.12	a	A
24	11.69	b	B	10.40	c	C
36	7.67	c	C	7.55	b	B
48	2.93	d	D	3.52	a	A

2.2.3 处理浓度与时间互作对肇东苜蓿根尖细胞的影响 0.15%的秋水仙素溶液处理肇东苜蓿根尖12 h时,中期分裂指数达到最大值18.51%;而用浓度为0.10%的秋水仙素处理24 h时,细胞加倍指数达到最高值11.57%(见图3)。因此,想

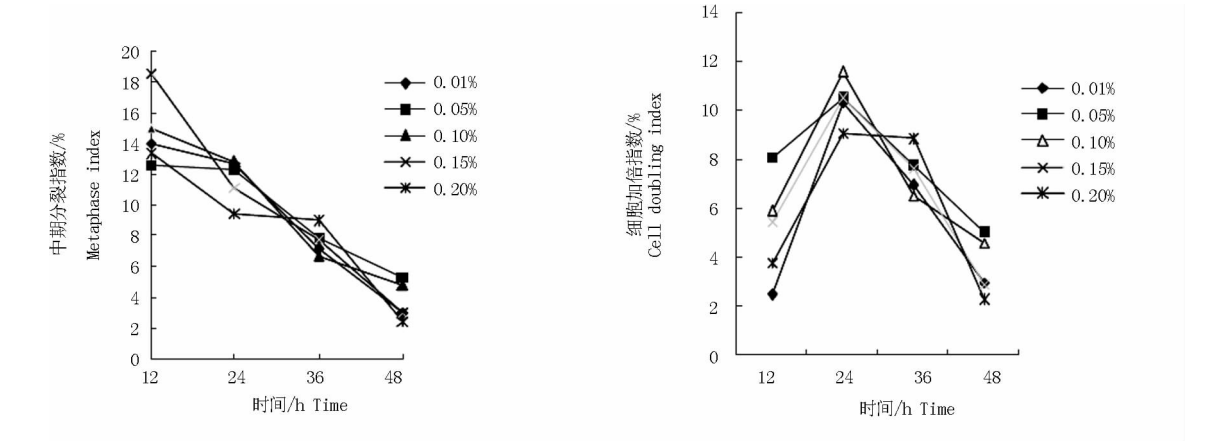


图3 处理时间和浓度的互作对肇东苜蓿中期分裂指数及细胞加倍指数的影响

Fig.3 Interaction of treating time and concentrations on metaphase index and cell doubling index of Zhaodong alfalfa

要获得更多的分裂期及染色体加倍的细胞,可选用浓度在0.10%~0.15%的秋水仙素处理根尖12~24 h。

3 结论与讨论

多倍体育种已广泛得到人们的关注,而自然界染色加倍的频率很低,为了满足遗传改良和育种的需要,要获得更多、更高倍性的植物作为遗传变异的基础,人们开始探索人工诱导多倍体植物的途径,已有许多成功利用秋水仙素诱导出多倍

体植物的报道^[14-18]。该试验是首次采用肇东苜蓿作为材料进行不同浓度、不同处理时间对其根尖细胞有丝分裂及多倍体诱导的影响进行研究。用0.15%的秋水仙素处理12 h时,可以获得更多的中期分裂细胞。而用秋水仙素浓度为0.10%处理24 h时,细胞加倍指数较高,更易于培育出多倍体植株。利用秋水仙素溶液处理植物体时,采用的方法、处理的浓度以及处理时间长短等方面在同行中有着不同的观点^[19],在探究浓度与时间的组合是偏向高浓度短时间还是低浓度长时

间^[20],应根据材料的不同选择适宜的浓度和时间以获得更多理想的材料。在该试验中,选用不同处理时间的秋水仙素对肇东苜蓿根尖细胞有丝分裂的影响极显著。然而秋水仙素的浓度对肇东苜蓿中期分裂指数及细胞加倍指数影响不大,有可能是设计的浓度梯度差异不大而导致的。苜蓿是异花授粉,多年生,四倍体草本植物。栽培苜蓿是一种高度多变的杂合品种,通过亲本表型随机杂交来筛选令人满意的农艺学性状^[20-23]。随着生物技术的发展,近些年来科研工作者利用秋水仙素诱导染色体加倍运用到多倍体育种的研究报道越来越多。这使得利用秋水仙素成功诱导出多倍体这一技术日渐成熟。未来,当出现某一植物亲本具有不利的基因时,可以用植物多倍体诱导使染色体加倍,从而得到同质性或纯合性的群体,这为构建分子遗传图谱提供了基础素材。肇东苜蓿多倍体的获得,将为紫花苜蓿倍性育种奠定基础。

参考文献:

- [1] 杨恒山,曹敏建,范富,等.紫花苜蓿生长年限对土壤理化性状的影响[J].中国草地学报,2006,28(6):29-32.
- [2] 杨起简,周禾,孙彦.紫花苜蓿的愈伤组织的诱导及组织培养[J].北京农学院学报,2004,19(2):28.
- [3] 李世林,杨舸,易秀莉,等.根瘤农杆菌介导的盐生杜氏藻 *DsNRT2* 基因转化紫花苜蓿的初步研究[J].四川大学学报:自然科学版,2004,45(2):409.
- [4] 黎茵,黄学林,肖洁凝,等.根瘤农杆菌介导苜蓿体胚转化及转基因植株再生[J].中山大学学报:自然科学版,2004,43(4):79.
- [5] 肖艳云,杨恒山,张宏宇,等.磷酸二氢钾叶面不同喷施时期对紫花苜蓿的影响[J].中国草地学报,2008,30(1):61-65.
- [6] Evans G M. Polyploidy and crop improvement[J]. J. Agric. Sot. niv. Wales, 1981, 62: 93-116.
- [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.
- [8] 王桂花,云锦凤,米福贵.秋水仙素诱导巨大赖草染色体加倍的研究[J].内蒙古草业,2006,18(1):6-8,12.
- [9] Geoffrian E, Kahane R. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clone of onion[J]. Plant Science, Limerick, 1997, 122(20): 201-208.
- [10] 宋智青,梁运章,李玉峰,等.药用植物的多倍体育种[J].生物学通报,2006,41(7):13-14.
- [11] 李懋学,张赞平.作物染色体及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [12] Chakraborti S P, Vijayan K. *in vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(10): 799-803.
- [13] 彭晖,张良波,彭晓英,等.秋水仙素在植物倍性育种中的应用进展[J].湖南林业科技,2004(5):22-25.
- [14] 齐志广,秘彩莉,柏峰,等.不同预处理对有丝分裂的影响[J].河北师范大学学报:自然科学版,2003,27(1):88-91.
- [15] 李光明,刘文海,何波.四种不同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):82-83.
- [16] 黄永莲,胡木林.秋水仙素对洋葱根尖细胞的诱变效应[J].亚热带植物学报,2005,34(1):42-45.
- [17] 孔舒颖,王照兰,杜建材,等.扁蓿豆新品系的多倍体诱导研究[J].中国草地学报,2010(4):31-34.
- [18] 马育华.田间试验与统计分析[M].北京:中国农业出版社,1978.
- [19] 连雪斌.兰州百合多倍体诱导试验报告[J].甘肃农业科技,1995(6):14-15.
- [20] 吴丽芳,张鸭关.紫花苜蓿离体组织染色体加倍技术及在育种中的应用[J].草业与畜牧,2009(5):7-9.
- [21] Chase S C. Analytical breeding of *Solanum Tuberosum* [J]. Can. J. Gen. 1963, 5: 359-363.
- [22] Wenzel G O. Comparison of single cell culture derived *Solanum Tuberosum* plant and model for their application in breeding programs [J]. Theor. Appl. Genet, 1979, 55: 49-55.
- [23] 于品华,曲秀兰,戴朝曦.用秋水仙素对马铃薯-单倍体和双倍体染色体加倍的研究[J].甘肃农业大学学报,1991,26(3):264-269.

Effect of Colchicine on Root Tip Chromosome in Zhaodong Alfalfa

CAO Hui-mei¹, ZHANG Yue-xue², LIU Feng-qi², TANG Feng-lan², HAN Wei-bo², LIU Jie-lin², ZHU Rui-fen²

(1. Life Science and Technology College of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150080; 2. Pratacultural Sciences Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to understand the effect of colchicine on root tip chromosome of Zhaodong alfalfa, root tip cells of Zhaodong alfalfa were induced by different colchicines concentration (0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%) and treatment duration (12, 24, 36, 48 h). The change of chromosome, mitosis index and cell doubling index of Zhaodong alfalfa root tip cell were observed. The results showed that colchicine induced variation in Zhaodong alfalfa root tip cell chromosome doubling and the observed chromosome number was 32, 64 and 128. The metaphase mitotic index was as high as 18.51% when root tip cell was treated for 12 hours in 0.15% colchicine. The cell doubling index reached 11.57% as tip cell was treated for 24 hours in 0.10% colchicine.

Key words: Zhaodong alfalfa; colchicine; chromosome; metaphase mitotic index; cell doubling index

(该文作者还有陈晶,单位同第一作者)