

植物材料减数分裂染色体标本的快速制作

丁海燕

(大庆师范学院,大庆 163712)

摘要 探索一种简便快速的植物材料减数分裂染色体标本制作技术,获得良好的减数分裂染色体标本以供原位杂交研究、遗传学实验教学等方面研究使用。以植物材料小麦、黑麦花药为材料,卡宝品红染色,冰冻揭片法制得减数分裂染色体标本。结果表明,这些用快速简便的方法获得的标本效果良好,染色体图像清晰,可较好的用于本科生实验教学、染色体分带、原位杂交等方面的研究。

关键词 植物材料 减数分裂 染色体标本

中图分类号:Q243 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2017.05.021

Fast Manufacture of Meiotic Chromosome Specimens of the Plant Material

DING Hai-Yan

(Daqing Normal University, Daqing 163712)

Abstract In order to establish a set of simple techniques for meiosis chromosome specimen preparation of pollen mother cell for in situ hybridization study, genetics experimental teaching, etc. Wheat and rye anther was used as experimental materials, glass slides were prepared by the improved method, and the meiosis of pollen mother cell were observed under microscope and recorded by photograph. These permanent specimen were good, showing the dynamic continuous phases of meiosis. They could be better used in the experiment teaching and in situ hybridization study.

Key words plant material; meiosis; chromosome specimen

减数分裂是高等植物配子形成过程中的必要阶段^[1],是有性生殖过程中的重要步骤,是保持物种遗传物质稳定传递的手段。在减数分裂过程中,通过同源染色体的交叉互换,自由结合,增加了变异^[2]。增加了群体的遗传多样性,为自然选择提供原材料,而在减数分裂过程中染色体的行为异常(如染色体不分离)则可能导致遗传畸变^[3]。在作物品种改良中常常需要了解某一材料的染色体数目、倍性及在细胞分裂中染色体的行为特征^[4]。在利用三体进行基因的染色体定位和连锁分析中,染色体的准确鉴定尤其重要^[5]。减数分裂的行为也是遗传学中的重点内容^[6]。在学

生学习理论知识时对于减数分裂的过程会有所不解,通过实验课可以让学生更好的理解减数分裂过程中染色体的行为。但是由于实验课的时间有限,以及材料选取的限制,学生在实验课时往往不能观察到减数分裂各个时期的染色体行为,所以选择适于学生操作的植物材料、探索简单快速效果良好的制片方法,是提高教学质量的重要手段。良好的减数分裂染色体标本也是原位杂交技术、染色体变异研究中重要的环节^[7]。麦类作物,尤其小麦^[8](*Triticum aestivum*)、黑麦^[8](*Secale cereale*)的花药不仅容易获得,而且它们的花药比较长,很适合本科学生操作,关于小麦、黑麦材料用

基金项目:大庆师范学院科学研究基金项目(12ZR04);大庆师范学院教改项目(JY1511)

作者简介:丁海燕(1973—),女,博士,副教授,主要从事遗传学教学与研究。

收稿日期:2017-01-04

Foundation item: Natural Science Foundation of Daqing Normal University(12ZR04); Education Reform Foundation of Daqing Normal University (JY1511)

Author introduction: DING Hai-Yan(1973—), female, Ph. D., Associate Professor, mainly engaged in genetics teaching and research.

Received date: 2017-01-04

于教学方面的研究报道的较少,因此探索一套简单易行的染色体标本制作技术^[9~10],对于遗传学实验教学、分带技术等遗传学研究有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑麦花药、小麦花药。田间野生的胜利黑麦,在抽穗前取花苞。小麦花药材料来自大庆师范学院农田种植的小麦。

1.2 试验试剂

卡宝品红染液^[11],其他药品:45%醋酸、95%酒精、70%酒精、中性树胶。

1.3 研究方法

1.3.1 材料选取与处理方法

小麦、黑麦,麦类植物的麦穗,旗叶还未完全打开,距离第一节大约10 cm时^[12],剪取花苞,将麦穗剥出,将麦穗于卡诺固定液中4℃固定24 h^[13],之后用70%酒精冲洗,冲洗3次后可长期保存在70%酒精中于4℃冰箱里^[12],这样保存可以一年以上,备用。

对于小麦、黑麦,同一穗中一般以长在中部的小穗最先发育^[14],依次向上向下推移,处于分裂期的花粉母细胞,从花药长度来看,大致在3毫米左右,这时的花药为黄绿色。处于绿色的花药则太嫩还未进行减数分裂,黄色的则已经完成减数分裂,通常观察到的都是成熟花粉粒。同一朵小花中3个花药几乎处于同一分裂时期^[15]。

1.3.2 花药染色与制片方法

取来保存在4℃冰箱的未染色的材料,从小花中取出花药,花药切一小段,放置在载玻片上,滴加一滴卡宝品红染液,盖片,在盖玻片右上方垫一刀片,将一块吸水纸覆于盖玻片左下方,左手食指中指按在此处,右手持一竹签在材料周围垂直的轻轻敲片^[16],让花药壁里的花粉母细胞散落出来就可停止敲片了,之后再次在盖玻片的一侧滴加少许卡宝品红染液,倾斜载玻片让滴加的染液浸入到整个盖玻片下,3~5分钟后,用酒精灯外焰烤片,之后立即在盖玻片上覆两块滤纸,拇指垂直按压制片^[17]。

1.3.3 脱片与干燥封片方法

镜检到分裂相较好的临时装片,为了长久保存,可以制作成永久装片^[18~19]。首先要进行脱片^[20],采用冰冻揭片法:把临时压制的片子放在-80℃的冰箱内使片子迅速冻结,有液氮的条件

下也可用液氮冻片;-80℃冰箱冻片至少2 h后从冰箱取出脱片,用刀片迅速揭开盖片,以免片上的水分融化,使材料丢失。

揭去盖玻片后,将载玻片有材料的一面朝上,放置在培养皿中,于60℃的烘箱中干燥。也可放在室温条件下的干净无灰尘的地方自然干燥,干燥至少10 h后封片,将一滴树胶滴在载玻片上的材料上,取一干净的盖玻片轻轻盖其上,平放即可,不可压片。于干净通风处等待树胶干燥即可,也可放于烘箱中烘烤干燥。

待树胶干燥后,获得的永久片即可用于教学与研究中。

2 结果与分析

2.1 小麦花药材料标本制作

小麦材料的花药比较长,学生容易剥取。小麦在我省各地种植很多,容易获得材料。在实验教学课堂上,学生自己操作制片,一个学生的制片往往很难观察到染色体行为的各个连续动态的过程。把连续动态的染色体标本同时呈现给学生,学生会深刻的理解减数分裂过程的动态连续性,会很容易区分和掌握它们的特征。因此,制作各个时期的永久标本,可以提供全面的观察。在以往的教学常常使用醋酸洋红染色,用这种方法对植物花药染色需要把花药一个个从小花中取出放在1.5 mL的离心管中用染液浸泡一周以上,这样染色的材料效果也可以,但是需要教师在上课之前提前一周以上的时间染色,学生往往没有亲自操作,教学效果和质量一般,图1中的A、B、C为用以往的醋酸洋红染色方法获得的小麦花药减数分裂的制片,效果可以,图像比较清晰。

2.2 黑麦花药材料标本制作

黑麦为田间野生的,在我省的农田周边很容易找到这种植物,取材容易。黑麦的花药比较长,比小麦的花药还要长一些,学生很容易剥取。而且黑麦的麦穗也较长,小花数量也较多,通常条件下一个麦穗可以供一个小组的使用,教学中使用也很节省材料。如果用以往的醋酸洋红染色往往需要的时间比较长,比小麦的花药需要的时间还长,因为它的花药比较长。所以用卡宝品红染色很好,不需要提取染色,上课时学生自己当堂染色即可。学生亲自操作,教学效果和质量很好,图1中的D、E、F为用卡宝品红染色获得的黑麦花药减数分裂的制片,效果良好,图像清晰,色泽鲜亮。

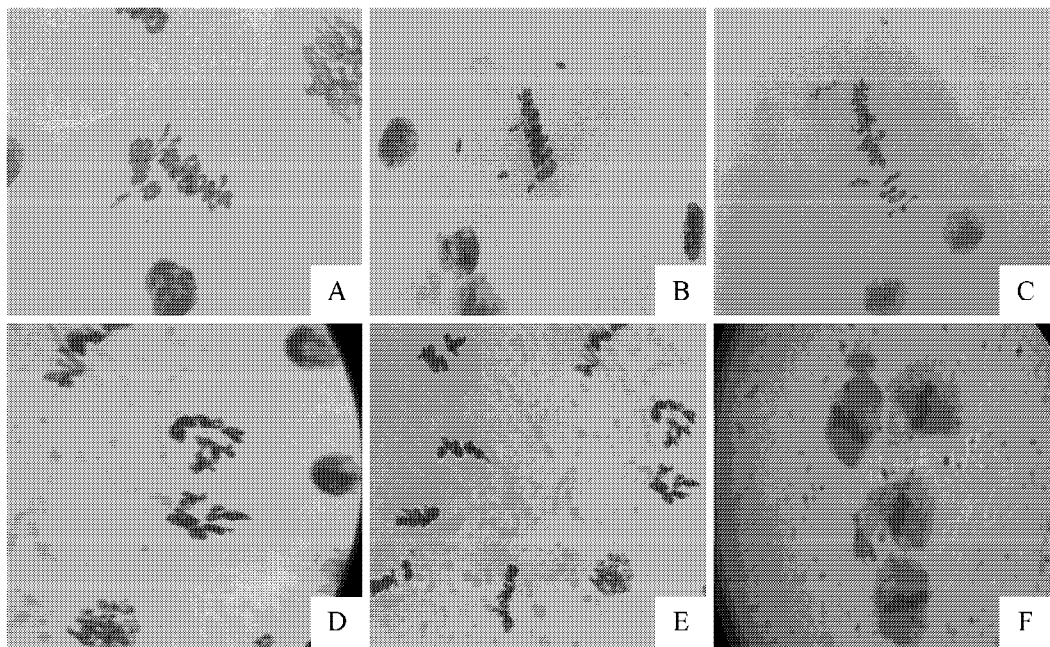


图 1 植物材料的花药减数分裂的标本图像 A. 中期 I (小麦花药, 醋酸洋红染色) ;B. 中期 I (小麦花药, 醋酸洋红染色) ;C. 中期 I (小麦花药, 醋酸洋红染色) ;D. 终变期 (黑麦花药, 卡宝品红染色) ;E. 中期 I (黑麦花药, 卡宝品红染色) ;F. 中期 I (黑麦花药, 卡宝品红染色)

Fig.1 Specimens image of meiotic of plant material A. Metaphase I (wheat anther acetic acid magenta dyeing); B. Metaphase I (wheat anther acetic acid magenta dyeing); C. Metaphase I (wheat anther acetic acid magenta dyeing); D. Diakineses (rye anther carbol fuchsin dyeing); E. Metaphase I (rye anther carbol fuchsin dyeing); F. Metaphase I (rye anther carbol fuchsin dyeing)

3 讨论

3.1 染色与揭片技术

卡宝品红染色所得的永久片中,染色体着色效果好,图像呈紫色,颜色鲜艳,易于观察。相比人们常用的醋酸洋红,染色的需要时间较长,一般至少 7 d 植物材料才能很好的上色,而且,对于植物花药材料,这种染色方法需要把个个花药从小花中取出再放入染液中染色,材料容易丢失;而卡宝品红染色时间很短 3 ~ 5 分钟即可,操作时,只要把植物材料的花药切成若干小段。卡宝品红染色法方便快捷,图像颜色饱满鲜艳,适合本科学生在遗传学实验课中使用。

如果用于遗传学实验等本科教学使用,可以把效果好的标本制作成永久标本。低温冷冻揭片法效果很好,如果有液氮,在液氮中冻片 30 分钟就可揭片;如果放入 - 80℃ 的冰箱中冷冻数小时之后取出揭片;如果没有 - 80℃ 的冰箱, - 20℃ 的冰箱也可以,只是冷冻的时间要长一些。冷冻揭片操作简单、安全、快速。如果用于遗传学研究,不需要制作永久片,那么可将标本冷冻在 - 80℃

的冰箱或 - 20℃ 的冰箱里,等需要后续实验时再取出进行揭片干燥,在这样的冷冻条件下可以贮存几个月甚至更长时间。

3.2 植物材料在本科学学生实验中的应用

植物材料花药,在本科学学生实验中的操作应用比较多,植物材料相对动物材料更安全容易些,因此比较适合本科生实验使用,例如有丝分裂观察、减数分裂观察、染色体分带技术、原位杂交技术等实验材料。植物花药材料对于本科学生操作来讲,又比较有难度,因为植物花药相对于植物根尖等器官的材料又比较小不易剥取,因此在上本科生实验时,更适合选取一些比较长的容易剥取和操作的植物花药,例如黑麦花药、小麦花药就比较长容易操作,而且一个麦穗基本就可以供一个小组的使用,所以在教学中应用非常方便、制片容易快速,教学效果良好。

参 考 文 献

1. 刘祖洞,江绍慧.遗传学实验 2 版[M].北京:高等教育出版社,1987 3-4.
Liu Z D, Jiang S H. Experiment of genetics 2nd ed [M].

- Beijing :Higher Education Press ,1987 3-4.
2. 杨大翔. 遗传学实验 :2 版[M]. 北京 :科学出版社 , 2010 80-83.
Yang D X. Genetics laboratory investigations 2nd ed[M]. Beijing Science Press 2010 80-83.
 3. 李惟基 陆漱韵 ,周海鹰. 甘薯小孢子母细胞减数分裂过程的观察简报[J]. 北京农业大学学报 ,1992 ,18(2) : 146 ,168.
Li W J ,Lu S Y ,Zhou H Y. Observation in meiosis course of sweet potato PMC[J]. Journal of China Agricultural University ,1992 ,18(2) :146 ,168.
 4. 蔡明锋. 四倍体水稻减数分裂期基因表达谱分析[D]. 武汉 :湖北大学 2000 362-368.
Cai M F. Analysis on gene expression profile of tetraploid rice in meiosis course[D]. Wuhan :Hubei University , 2000 362-368.
 5. 刘晓林. 拟南芥 DNA 修复蛋白 MSH5 在减数分裂过程中的功能研究[D]. 北京 :中国农业科学院 2008 33-34.
Liu X L. Functional characterization of *Arabidopsis* DNA mismatch repair protein MSH5 during meiosis[D]. Beijing :Chinese Academy of Agricultural Sciences ,2008 :33-34.
 6. 周娇. 影响多倍体水稻减数分裂稳定性相关基因的分析[D]. 武汉 :湖北大学 2010 25-63.
Zhou J. Study of genes which affect polyploid rice meiosis stability[D]. Wuhan :Hubei University 2010 25-63.
 7. 赵伟 汝明权. 用蝶螈表皮装片制作永久制片技术[J]. 生物学通报 ,1999 34(2) :13.
Zhao W ,Ru M Q. Techniques of permanent slices of salamander epidermis[J]. Bulletin of Biology ,1999 ,34(2) : 13.
 8. 丁海燕 ,于永忠 ,陈霞 ,等. 小麦—黑麦易位系的研究[J]. 植物研究 2009 29(1) 86-90.
Ding H Y ,Yu Y Z ,Chen X ,et al. Study on wheat-rye translocation lines[J]. Bulletin of Botanical Research , 2009 29(1) 86-89.
 9. 潘新法 许宏庆. 不同浓度的苯酚品红对果蝇唾腺染色体的染色效果[J]. 生物学杂志 2002 19(5) 26-27.
Pan X F ,Xu H Q. Staining effect of carbol fuchsin on chromosome of salivary gland in fruit-fly[J]. Journal of Biology 2002 ,19(5) 26-27.
 10. 刘广发 游兰英. 永久装片的简易制作法[J]. 生物学通报 1992 27(12) 26.
Liu G F ,You L Y. Simple production method of permanent slices[J]. Bulletin of Biology ,1992 27(12) 26.
 11. 丁海燕 营晓雪. 黑麦减数分裂染色体标本制作实验研究[J]. 麦类作物学报 2016 36(12) :1629-1634.
Ding H Y ,Zi X X. Study on experimental specimen making of meiotic chromosome of rye[J]. Journal of Triticeae Crops 2016 36(12) :1629-1634.
 12. 黄远新. 黑麦减数分裂时期的定位观察[J]. 生物学通报 2008 43(11) 53-55.
Huang Y X. Localizable observation of meiosis phases in pollen maternal cells of *Secale cereale* L. [J]. Bulletin of Biology 2008 43(11) 53-55.
 13. 王明艳 韩秀玲. 玉米花粉母细胞减数分裂永久压片技术的改进[J]. 生物学通报 2005 40(5) 22.
Wang M Y ,Han X L. Improvement of permanent slices technology of corn pollen mother cell meiosis[J]. Bulletin of Biology 2005 40(5) 22.
 14. 李森华. 野黑麦减数分裂的规律性及其染色体的分析[J]. 中国草地学报 ,1987(4) 37-42.
Li S H. The Analysis on the meiosis regularity of *hordeum grevisubulatum* and its chromosome[J]. Chinese Journal of Grassland ,1987(4) 37-42.
 15. 孔令娜 冯金侠 ,陈卫平. 黑麦—遗传学实验的常用材料[J]. 实验科学与技术 2011 9(2) 56-58.
Kong L N ,Feng J X ,Chen W P. *Secale cereale* a good material of genetic experiments[J]. Experiment Science and Technology 2011 9(2) 56-58.
 16. 张建琪 ,于洪浩. 压制植物有丝分裂及减数分裂永久片的新方法[J]. 生物学通报 ,1998(4) 52.
Zhang J Q ,Yu H H. New method of permanent slices about mitosis and meiosis in plant[J]. Bulletin of Biology ,1983 (4) 52.
 17. 苏月梅. 植物学实验中几种改进的制片方法[J]. 陕西师范大学学报 :自然科学版 2002 30(S1) :180-182.
Su Y M. Several improvement methods of producing sheet glass in botanical experiment[J]. Journal of Shaanxi Normal University :Natural Science Edition ,2002 ,30(S1) : 180-182.
 18. 姚珍. 黑麦减数分裂染色体 Giemsa 显带[J]. 遗传学报 ,1980 7(3) 289-290.
Yao Z. Giemsa banding in meiotic chromosomes of rye[J]. Acta Genetica Sinica ,1980 7(3) 289-290.
 19. 李正理 李懋学. 怎样制作植物细胞减数分裂的压片[J]. 植物杂志 ,1978 (3) :18-19.
Li Z L ,Li M X. How to make tablet of plant cell meiosis [J]. Life World ,1978 (3) :18-19.
 20. 高娟 伊华林 胡志勇. 柑橘体细胞杂种有性后代花粉母细胞减数分裂的观察[J]. 果树学报 2010 27(1) 8-12.
Gao J ,Yi H L ,Hu Z Y. Meiotic observations on pollen mother cells of sexual progenies of citrus somatic hybrid [J]. Journal of Fruit Science 2010 27(1) 8-12.