

大麻染色体制片技术

辛培尧^{1,2}, 萧凤回, 罗思宝, 杨明*

(1. 西南林学院资源学院, 云南昆明650224; 2. 云南省农业科学院, 云南昆明650205; 3. 云南农业大学中药材研究所, 云南昆明650201)

摘要 [目的] 探究大麻染色体的制片技术。[方法] 对大麻染色体制片技术的预处理液、解离时间、染色时间等进行试验研究, 并对其进行染色体数目观察。[结果] 研究表明: 用大麻根尖在常温下用0.003%的8-羟基喹啉溶液预处理2 h 或用饱和对二氯苯处理1.5 h, 经卡诺固定液固定30 min 后, 在1:1的1 mol/L HCl 和45%醋酸60℃下恒温水浴中解离30 s, 地衣红染液染色8 h 压片镜检, 能取得良好的制片效果。大麻染色体数目观察表明, 大麻染色体数目 $2n=2x=20$ 。[结论] 该研究为大麻细胞学方面的深入研究提供了资料。

关键词 大麻; 染色体; 制片技术

中图分类号 S563.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)01-0026-01

Study on the Squashing Technique of Chromosome in *Cannabis sativa* L.

XIN Pei-yao et al (College of Resources, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] The research aimed to discuss the squashing technique of chromosome in *Cannabis sativa* L. [Method] The pretreatment solution, the dissociation time and dyeing time in squashing technique of chromosome in *C. sativa* were studied. And its chromosome number was also observed. [Result] Under room temperature the root tips of *C. sativa* were pretreated with 0.003% 8-hydroxyquinoline solution for 2 h or treated with saturated p-dichlorobenzene for 1.5 h. After fixing with Carnoy stationary liquid for 30 min, they were dissociated in constant-temperature water bath of mixing 1 mol/L HCl with 45% acetic acid at 1:1 for 30 s at 60℃ and stained with orcein dyeing solution for 8 h for squashing and microscopic examination. Thus good squashing effects could be obtained. The observation on the chromosome number of *C. sativa* indicated that the chromosome number of *C. sativa* was $2n=2x=20$. [Conclusion] This research provided data for in-depth study on *C. sativa* from the cytological aspect.

Key words *Cannabis sativa* L.; Chromosome; Squashing technique

大麻, 学名 *Cannabis Sativa* L., 是大麻科(Cannabaceae)大麻属(*Cannabis*)1年生草本植物, 雌雄异株, 也有雌雄同株出现。大麻具有多方面的经济利用价值, 如造纸、制药、榨油、食用等, 是人类栽培利用最早的经济作物之一。我国在公元前3500~4500年就种植大麻用作绩绳和织布。大麻对环境的适应性较强, 对温度要求较宽, 因此分布范围广泛, 从热带到寒带地区都可种植。近年国内外对大麻的种植和应用研究较多, 但主要集中在栽培技术、性别转化、分子标记、毒品含量以及纤维利用等方面, 目前对其细胞学方面的研究较少。中国农业科学院麻类研究所曾对大麻染色体的数目及核型、带型等细胞学方面进行过研究^[1]。在20世纪早期国外也作了相关染色体方面的研究^[2], 然而近年来这方面的研究很少。上述研究均对相关结果作了阐述, 而对如何获得高质量的供研究用大麻染色体制片未作详细说明。笔者通过对低毒大麻新品种“云麻1号”的根尖进行染色体的制片观察, 提出一套行之有效的大麻染色体制片技术, 为大麻细胞学方面的研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验材料为云南省农业科学院经济作物研究所大麻课题组提供的低毒大麻新品种“云麻1号”原种种子。

1.2 方法 采用李懋学等提出的作物染色体制片技术^[3]。

1.2.1 取材。取2个不同大小的培养皿, 小的培养皿蒙上滤纸, 放于盛有水的大培养皿中, 水量以滤纸边缘浸入水中为宜, 使得滤纸始终保持湿润状态。选取饱满、健壮的大麻种子, 置于滤纸边缘, 使其根垂直向下生长以获得较直的根尖材料。在25℃恒温箱中培养, 待根长1.0~1.5 cm时, 截取

根尖。

1.2.2 预处理。分别用0.003 ml/L 8-羟基喹啉水溶液、饱和对二氯苯水溶液、0.05%秋水仙碱溶液作为预处理液, 分别对大麻根尖处理1.5、2.0、2.5、3.0 h, 从而确定最佳预处理组合。

1.2.3 固定。预处理后将根尖转入卡诺固定液(冰乙酸:无水乙醇为1:3), 在冰水混合物中固定30 min, 经95%乙醇浸润过渡, 再转入70%乙醇中, 置于4℃冰箱中保存备用。

1.2.4 解离。将固定好的材料先用蒸馏水浸泡15 min, 解离液用1 mol/L 盐酸和45%醋酸按1:1比例在60℃水浴锅内预热5 min, 将大麻材料分别在60℃恒温水浴锅中解离15、30、60、90 s, 以确定适宜的解离时间。

1.2.5 染色。解离过的根尖用蒸馏水冲洗后, 分别在醋酸地衣红染液中染色4、8、12 h, 以筛选适宜的染色时间。

1.2.6 染色体数目的观察。采用常规制片法压片, 在Olympus BX51型显微镜下制片观察, 选择50个染色体分散较好的细胞进行染色体数目统计, 并且拍照。

2 结果与分析

2.1 预处理效果 试验表明, 用0.003 ml/L 8-羟基喹啉水溶液处理根尖材料2.0 h的制片效果最好, 可以得到较多的染色体形态清晰、收缩较好的中期分裂相细胞; 其次为饱和对二氯苯处理1.5 h。而0.05%秋水仙碱溶液处理后未得到较好的制片效果。

2.2 解离时间 试验表明, 用0.003 ml/L 8-羟基喹啉水溶液处理根尖2.0 h 或用饱和对二氯苯处理1.5 h后, 在60℃水浴锅内解离30 s, 根尖软化程度较好, 压片时细胞易分散, 染色体形态自然, 细胞背景清晰; 解离15 s, 根尖软化程度不够, 细胞难以压散, 观察时杂质较多; 解离60 s以上, 材料过度软化, 细胞易压碎, 压片时常造成染色体丢失, 不便统计。

2.3 染色效果 用醋酸地衣红染液染色后, 发现染色时间为8 h的根尖只有细胞核和染色体染上紫红色, 细胞质不着

基金项目 国家科技支撑计划课题(2006BAK09603); 云南省省级重点专业西南林学院林学专业资助项目。

作者简介 辛培尧(1975-), 男, 甘肃临洮人, 讲师, 从事植物遗传育种与繁育方面的教学与研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-08-23

(下转第95页)

的,而是呈现出一定的变化规律。在最佳的浓度配比范围内,种子生长良好。

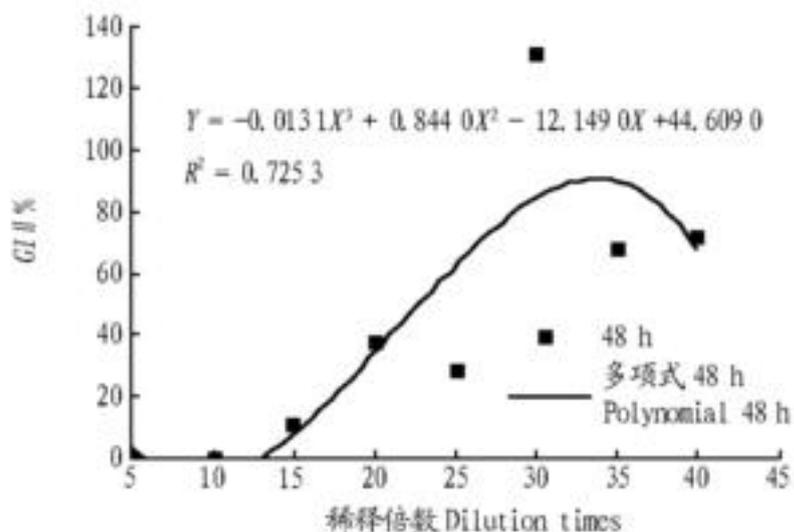


图7 油麦菜种子发芽指数拟合曲线

Fig. 7 fitting curve of germination index of seeds in Youmai lettuce

2.2 种子生长敏感点 种子发芽指数能反映肥料是否适宜种子生长的环境。种子发芽快、对环境敏感性高是检测种子发芽指数关键。由图5、6、7可知,黄瓜、白菜(舍掉最后一个异点)、油麦菜3种种子生长表现出不同的敏感点,敏感点分别为1 22.30、1 20.90和1 33.80。通常测定的时间是24或48 h,该文认为种子发芽指数在48 h测定更能反映种子对浸提液的敏感度。

(上接第26页)

色,染色体与细胞质对比度最大,效果最佳,拍片效果最好;醋酸地衣红染色12 h的根尖染色体与细胞质均着色,染色体与细胞质的颜色都较深,拍片效果不好;而染色4 h的根尖细胞核染色较浅,且背景不清晰,可用于染色体数目观察统计,但拍片效果差。

2.4 大麻染色体数目 结果表明,“云麻1号”大麻染色体数目为 $2n = 2x = 20$ (图1)。这与前人报道的结果相一致^[1-2,4-5]。观察中还发现,大麻根尖细胞中存在大量的四倍体细胞(图2),嵌合现象十分普遍,且四倍体细胞出现的频率在不同个体之间差异很大。

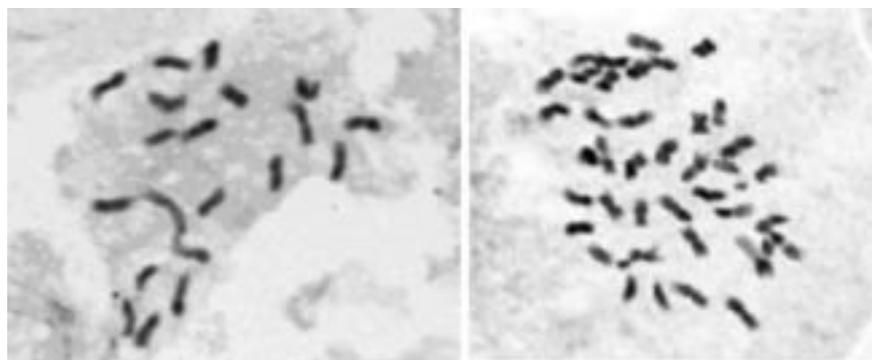


图1 大麻根尖二倍体细胞

图2 大麻根尖四倍体细胞

Fig.1 The diploid cell of the hemp root part

Fig.2 The tetraploid cell of the hemp root part

3 讨论

(1) 一般植物细胞染色体的分裂高峰期在上午8:00~10:00^[6]。由于该试验的根尖材料是在恒温状态下培养的,所以取材时间不受影响。一般认为,在一天中气温较高时段取材能获得较多的中期分裂相细胞。

(2) 在大麻核型分析时,观察到同一根尖中的细胞除了

3 结论

(1) 种子发芽指数测定不仅与肥料性质有关,而且与肥料固液比和培养时间有关。种子发芽指数测定要根据一系列固液比来确定种子对肥料浸提液的敏感点,寻找最佳的浓度配比和时间。结果表明,种子对生态厕所最终产物敏感时间以48 h为佳,黄瓜种子、白菜种子、油麦菜种子敏感点分别为1 22.30、1 20.90、1 33.80。

(2) 有机肥料固液比不同,适宜种子生长情况也不同。在48 h内,黄瓜、油麦菜种子生长表现出不同的配比范围,其配比范围分别为1 14.17~1 34.37、1 24.34~1 41.26。由于肥料对白菜种子的毒性较大,白菜种子没有表现出适宜生长范围。该研究为进一步应用免水资源综合利用型生态厕所的有机肥料提供了依据。

参考文献

- [1] 张雪英,周立祥,沈其荣,等.城市污泥强制通风堆肥过程中的生物学和化学变化特征[J].应用生态学报,2002,13(4):467-470.
- [2] 汤江武,吴逸飞,薛智勇,等.畜禽固废弃物堆肥腐熟度评价指标的研究[J].浙江农业学报,2003,15(5):293-296.
- [3] 黄国锋,钟流举,张振铤,等.有机固体废弃物堆肥的物质变化及腐熟度评价[J].应用生态学报,2003,14(5):813-818.
- [4] 牛俊玲,崔宗均,李国学,等.城市生活垃圾堆肥的成分变化及腐熟度的评价[J].农业环境科学学报,2006,25(1):249-253.
- [5] 李承强,魏源送,樊耀波,等.堆肥腐熟度的研究进展[J].环境科学进展,1999,7(6):1-12.
- [6] 国家标准局.GB/T 3543.1-3543.7-1995 农作物种子检验规程[S].北京:中国标准出版社,1995.

染色体有 $2n = 20$ 的细胞外,还看到了 $2n = 20 \sim 36$ 条染色体。这种细胞在同一根尖中约占10%,认为可能与大麻存在雌雄同株有关^[1]。该研究也发现大麻同一根尖细胞中存在二倍体与四倍体细胞嵌合现象。这种现象在其他植物染色体制片时也有发生。这是由于材料在药物低温预处理过程中产生染色体加倍现象,是人工化学诱变的产物^[7]。

(3) 大麻是雌雄异株植物,具有性染色体,雌株为 $2n = 20 = 18A + x + x$,雄株为 $2n = 20 = 18A + x + y$,还存在雌雄同株现象。该试验仅观察了大麻体细胞的染色体。大麻雌雄株核型的差异有待进一步观察其性别分化植株的根尖细胞。

(4) 一般,秋水仙素对染色体有较强的作用,常用作植物染色制片的预处理液,但是在该试验中没有得到较好的处理效果。这可能与浓度、处理时的温度以及处理时间有关。常用的方法是在一定浓度下,将材料置于4℃的冰箱中处理24 h。但是,具体效果会因材料不同而产生差异。

参考文献

- [1] 郭运玲,熊和平,唐守伟,等.大麻染色体核型分析[J].中国麻作,1999,21(2):21-22.
- [2] SAKAMOTO K, SHIMOMURA K. Analysis of the structure of sex chromosomes in a dioecious part, *Cannabis sativa* L. [J]. J. L. Hart Physiol, 1997, 114(S): 243.
- [3] 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.
- [4] 陈其本,余立惠,杨明,等.大麻栽培利用及发展对策[M].成都:电子科技大学出版社,1993.
- [5] YAMADAI. The sex chromosome of *Cannabis sativa* L. [J]. Saiken Zho, 1943, 2: 64-68.
- [6] 李国珍.染色体及其研究方法[M].北京:科学出版社,1985.
- [7] 李懋学,张赞平.植物染色体研究技术[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,1991.