制备天麻染色体有丝分裂中期标本的组织筛选

杨通静，王 沁*

（贵州省农作物品种资源研究所，贵州贵阳　550006）

摘要：通过对天麻原球茎、初生块茎、柱头、花粉帽等组织，在不同时间段制备染色体有丝分裂中期标本。比较发现，上午9：00—11：00期间，用柱头制备的标本最好。

关键词：天麻；柱头；染色体；有丝分裂

天麻是具有内生菌根的兰科植物。它的植物体没有根与绿叶，种子萌发后，主要依靠分解侵入其体内的蜜环菌菌丝生活[1]。因此，天麻的有丝分裂标本制作不能像其他植物那样选用根、叶等组织结构制备[2-4]。1984年梁汉兴[5]以花粉小孢子观察了原天麻染色体单倍体数目。2010年王德信[6]也以花粉小孢子为材料，观察减数分裂过程中的细胞学特征。鉴定出天麻单倍体的染色体数目为18，但天麻染色体特征不能较好的呈现，也无法鉴定天麻的染色体倍数。为了有效观察天麻染色体特征和鉴定其倍性，笔者拟从天麻不同组织、不同时间取样制片，筛选出最佳取材部位，用于观察天麻染色体有丝分裂中期的结构特征。

1　材料与方法

1.1　材料

品种：纯化4代以上的红秆天麻。培育地点：天麻种质资源圃。种质来源：贵州省农作物品种资源研究所真菌室课题组。

1.2　方法

1.2.1　材料培养方法

（1）天麻花柱头培养

将成熟天麻（鹦哥嘴完整无损伤）块茎埋于湿度在40%左右沙土中，置于22-25℃，相对湿度60%的环境下，让其抽薹。

（2）花粉帽培养

将成熟天麻（鹦哥嘴完整无损伤）块茎埋于湿度在40%左右沙土中，置于22-25℃，相对湿度60%的环境下，让其抽薹。

（3）原球茎培养

将刚采摘（每年的5-7月）的成熟的天麻种子与萌发菌进行拌种，置于培养好的固定菌床中覆土培养，自然条件下萌发，取不同大小的原球茎在不同时间段进行观察比较。

（4）初生茎

成熟天麻块茎的鹦哥嘴人为掰断后，将其块茎埋于湿度在40%左右沙土中，自然条件下生长，在不同时间取不同块茎大小制片观察。

1.2.2　标本制备方法

制片基本流程：取材——预处理——固定——解离——清洗——染色——压片——镜检。

1.3　制片

取材：1）柱头：分别在不同开花期和同一天不同时间段取柱头；2）花粉帽：分别在不同开花期和同一天不同时间段取材；3）原球茎：分别在不同发育期和不同时间段取原球茎；4）初生块茎：分别在不同发育期和不同时间段取初生块茎。

预处理：将材料置于0.002%-0.004%/L 8-羟基喹啉中，室温处理50min左右，取出用蒸馏水漂洗2-3次。

固定：然后用新配的卡诺固定液进行固定，时间为1h。

酸解：将清洗好的材料取下柱头，因为天麻花的柱头异于其他花，取时轻用镊子进行提取，置于1M盐酸中60℃条件下酸解5min。

清洗：吸去酸解液，用蒸馏水轻轻洗2-3次。

染色：将固定后的材料（组培材料取茎尖0.2cm）置于干净载玻片上，加改良后的卡宝品红染液1-2滴，染色50min。

基金项目：贵州省联合基金“天麻核型分析研究”［黔科合J字LKN[2013]17号］；贵州省科学技术基金[2014]7697 号，项目名称：鲜天麻保存过程中生理特性变化研究。

作者简介：杨通静，硕士，助理研究员，主要从事食用菌方面研究。

通讯作者：王沁，硕士，副教授，主要从事中药材方面的研究。

制片：用45%的冰醋酸洗1-2次，取干净的盖玻片盖在材料上，先用铅笔头或者镊子轻轻敲打，再用拇指压片。

镜检：制备好后的标本在显微镜下观察，对有丝分裂相好的细胞进行观察、拍照。

1.3.1　分裂中期细胞计数方法

分别在10×10倍和10×100倍显微镜下观察、统计单张标本中处于有丝分裂中期细胞总数。每个组织同时制备3份染色体标本进行镜检，计算平均数。

1.3.2　制备染色体有丝分裂标本的组织及时间段优劣比较

通过比较不同时间段、不同组织制备的标本中处于染色体有丝分裂中期的细胞数量越多，说明越利于制片观察。

2　结果与分析

2.1　不同组织部位制备天麻有丝分裂标本观察对比结果

表1、表2及图1、2的结果表明，天麻花粉帽在自然情况下，开花前5天花粉帽分裂处于高峰期，每天的 9：00-11：00处于有丝分裂中、后期的细胞较多，但是，总体数量相对较少。天麻花柱头在自然情况下，开花前5天的上午9：00-11：00处于中期分裂相的细胞较多，单张制片中处于有丝分裂中期细胞数相对较多。

表3、表4及图3、4的结果表明，自然状态下，原球茎、天麻初生茎的细胞活跃期较为集中在10：00-12：00期间，此时，处于染色体有丝分裂中期的细胞数量相对较多，但是，在下午13：00-14：00

表1　不同开花期花粉帽及不同时间处于染色体分裂中期细胞数统计表

取材时间 / 花发育期及大小	8：00	9：00	10：00	11：00	12：00	13：00	14：00
开花前6天（1＜2mm）	4	3	8	9	2	0	0
开花前5天（1-2mm）	2	7	14	8	3	0	0
开花前4天（2-3mm）	1	13	8	6	4	3	0
开花前3天（2-5mm）	3	8	17	18	2	4	0
开花前2天（3-6mm）	2	11	8	15	4	0	0
开花前1天（4-8mm）	1	7	6	11	3	0	0
开花前当天（4-10mm）	0	3	7	12	0	0	0
开花后1天(5-10mm)	0	3	6	2	0	0	0
开花后2天(5-10mm)	0	0	0	0	0	0	0
开花后3天（5-10mm）	0	0	0	0	0	0	0

表2　不同开花期柱头及不同时间处于染色体分裂中期细胞数统计表

取材时间 / 花发育期及大小	8：00	9：00	10：00	11：00	12：00	13：00	14：00
开花前6天（1-2mm）	5	13	15	12	2	0	0
开花前5天（1-2mm）	10	24	16	72	11	5	0
开花前4天（2-3mm）	14	8	21	68	3	3	0
开花前3天（2-5mm）	11	16	34	27	8	0	1
开花前2天（3-6mm）	13	26	35	63	2	0	0
开花前1天（4-8mm）	12	18	56	40	3	0	0
开花前当天（4-10mm）	8	17	28	12	4	0	0
开花后1天(5-10mm)	6	3	13	4	0	0	0
开花后2天(5-10mm)	2	1	2	4	3	0	0
开花后3天（5-10mm）	0	0	1	1	2	0	2

表3　原球茎不同时期不同时间处于染色体分裂中期细胞数多少比较表

发育状态＼取材时间	8：00	9：00	10：00	11：00	12：00	13：00	14：00
刚萌发（水珠状）	1	2	7	13	6	0	0
萌发1天（水珠状）	3	4	6	8	3	3	0
萌发2天（水珠状）	5	3	6	7	1	0	2
萌发3天（水珠状）	2	5	3	9	8	0	0
萌发4天（水珠状）	2	4	8	12	2	5	3
萌发5天（水珠状）	0	0	4	4	0	0	0
萌发6天（水珠状）	0	3	0	2	7	0	0

表4　天麻初生茎不同时期不同时间处于染色体分裂中期细胞数多少比较

发育阶段＼时间	8：00	9：00	10：00	11：00	12：00	13：00	14：00
＜1mm	0	2	6	15	6	3	0
1-2mm	3	7	11	6	7	4	1
2-3mm	6	3	12	15	2	5	5
4-6mm	3	4	7	17	13	0	0
7-10mm	2	2	6	3	2	1	0
＞10mm	0	0	1	4	0	0	0

间，也能观察到处于有丝分裂中期的细胞存在，但是相对较少。

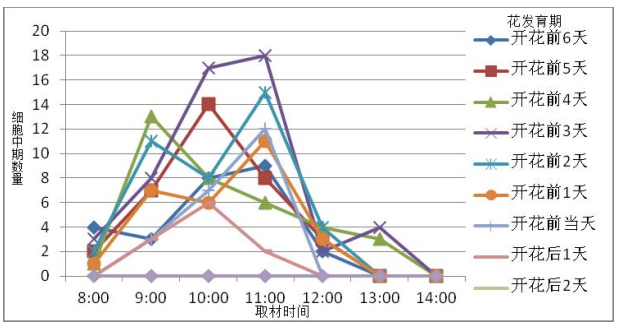

图1　不同开花期花粉帽在不同时间段处于染色体分裂中期细胞数分布图

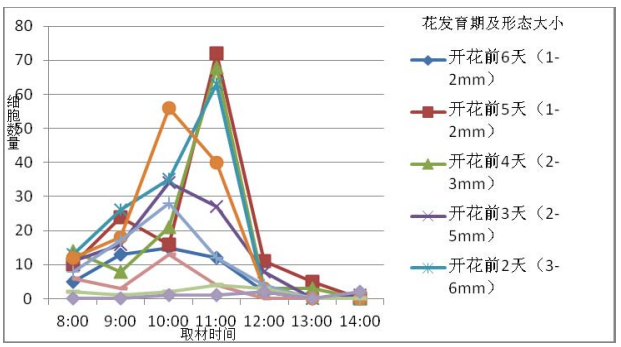

图2　不同开花期柱头及不同时间处于染色体分裂中期细胞数分布图

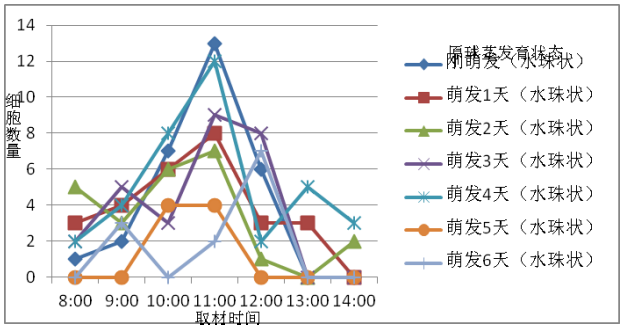

图3　原球茎不同时期不同时间处于染色体分裂中期细胞数分布图

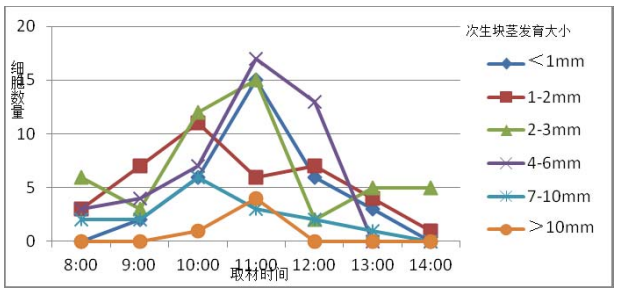

图4　天麻初生茎不同时期不同时间处于染色体分裂中期细胞数多少比较

2.2　天麻不同组织部位制备的标本难以程度结果

表5结果表明，四种组织中，花粉帽、原球茎和初生茎细胞壁难以解离，细胞不易分散，压片难度

表5　天麻不同取材部位制片难易程度比较

取材部位	取材难度	细胞壁解离难度	着色程度	背景色情况	压片难度
花粉帽	易	难	易	清且浅	难
柱头	易	易	易	清且浅	易
原球茎	易	较难	易	杂	难
初生茎	易	非常难	难	杂	难

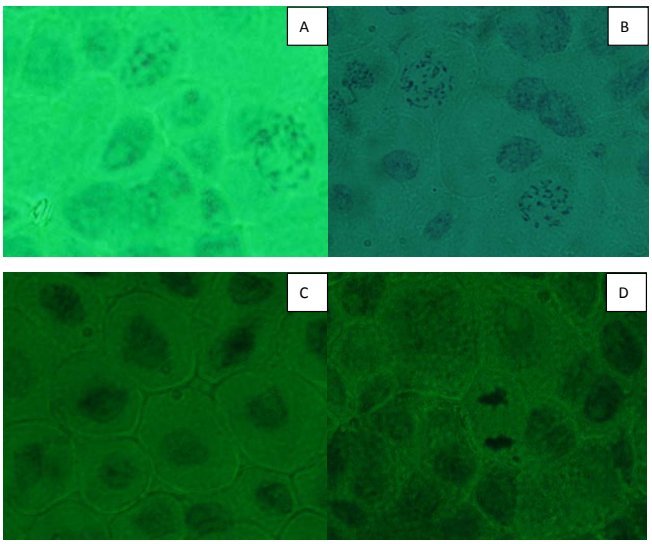

图5　天麻不同取材部位制片效果

注：上述图片均为10x100倍下观察：A为花粉帽镜检图片，B为柱头镜检图片；C为原球茎组织镜检图片；D为初生茎镜检图片

大。柱头制片各环节都较为容易，镜检结果较好。

3　结论与分析

1）用天麻柱头制备染色体有丝分裂标本最佳。天麻初生块茎和次生块茎中活跃的细胞数量大大增加。但是，制片难度大，可能与细胞壁纤维化程度大有关系，且细胞活跃期分布不是太明显可能是与由于土壤温度回升较慢所致。

2）天麻开花当天至开花前5天，上午9：00-11：00，柱头细胞分裂处于活跃期，且柱头组织比较软，有利于染色体标本的制备。天麻开花后随着时间的推移，其柱头表面黏性逐渐减弱，组织结构逐渐变硬，导致制备染色体有丝分裂中期标本过程中解离难度增加，开花3天后的柱头很难获得分散较好的细胞标本。这可能是柱头暴露在空气中后，水分挥发导致其组织结构收缩变硬，同时制片过程中没有促使细胞膜扩张处理所致。

3）花粉帽、原球茎、初生茎虽然在不同的时间段有少数细胞可以观察到处于有丝分裂中期的细胞，这可能与细胞活跃程度直接相关。且解离难度较大，背景色脚深，很难找到较为理想的染色体有丝分裂中期图片，细胞壁纤维化程度增加以及细胞内含物质增加相关。

参考文献

[1]　周铉.国产天麻属植物的整理[J].云南植物研究，1983，5（4）:361-368.

[2]　孙音，李兆鹏，房义福，等.大叶女贞染色体制片及核型分析[J].山东林业科技，2019（4）:1-5.

[3]　王凯琪，王珺华，王凯，等.矮牡丹染色体核型分析[J].延安大学学报(自然科学版)，2019，38（2）:87-91.

[4]　倪妍妍，杨文娟，刘建锋，等.崖柏属植物的核型分析[J].林业科学研究，2017，30（2）:189-193.

[5]　梁汉兴.原天麻染色体数目的观察[J].云南植物研究，1984，6（3）:311-312.

[6]　王德信.天麻减数分裂及染色体构型分析[J].生物技术，2010，10（2）:20-22.