

龙葵杂8号向日葵染色体核型分析

马 军¹, 丁海燕^{2,3*}, 辛 颖², 任国领², 黄绪堂¹, 关洪江¹, 王文军¹,
梁春波¹, 徐长君², 翟祖欢²

(1. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 哈尔滨 150086; 2. 大庆师范学院生物工程学院, 黑龙江 大庆 163712; 3. 黑龙江省油田应用化学与技术重点实验室/大庆师范学院, 黑龙江 大庆 163712)

摘 要:为了探索向日葵染色体核型和染色体制片技术,以龙葵杂8号向日葵根尖为试验材料,探讨低温处理向日葵根尖细胞对染色体制片效果的影响。使用Photoshop和Microsoft Excel软件辅助对龙葵杂8号根尖细胞有丝分裂中期染色体图像进行核型分析。结果表明:低温预处理向日葵根尖细胞容易获得较为理想的可用于核型分析的染色体制片,龙葵杂8号体细胞染色体数目为 $2n=34$,其核型分析公式为: $2n=2x=34=24m+6sm+4st$ 。

关键词:向日葵;染色体;核型分析;龙葵杂8号

中图分类号:S565.5

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)04-0024-03

Karyotype Analysis of Chromosome of Sunflower Longkuiza 8

MA Jun¹, DING Haiyan^{2,3*}, XIN Ying², REN Guoling², HUANG Xutang¹, GUAN Hongjiang¹, WANG Wenjun¹,
LIANG Chunbo¹, XU Changjun², ZHAI Zuhuan²

(1. Industrial Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. School of Biological Engineering, Daqing Normal University, Daqing 163712; 3. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Oilfield Applied Chemistry and Technology/Daqing Normal University, Daqing 163712, China)

Abstract: In order to analyze the chromosome karyotype and chromosome production techniques of Longkuiza 8, the effects of low temperature pretreatment of sunflower root tip cells production was studied by using Longkuiza 8 as the experimental material. Photoshop and Microsoft Excel software were used to assist in the analysis of chromosome images. The results showed that the low temperature pretreatment of sunflower root tip cells could obtain more ideal chromosome production for karyotype analysis, and the chromosome number of somatic cells of Longkuiza 8 was $2n=34$, whose karyotype analysis formula was $2n=2x=34=24m+6sm+4st$.

Key words: Sunflower; Chromosome; Karyotype analysis; Longkuiza 8

向日葵(*Helianthus annuus* L.)是一年生菊科、向日葵属植物。向日葵作为世界各国重要的油料作物之一,也是一种供食用的经济作物。向日葵在世界各地被广泛种植,在中国主要分布于东北、华北和西北的半干旱或轻盐碱地区^[1]。龙葵杂8号是一种栽培型油用向日葵杂交种,适宜我国东北地区哈尔滨、白城、沈阳等多个地区种植,

对改善盐碱地区生态环境,合理利用改造中低产田,提高经济价值方面有重要作用^[2]。

植物染色体制片和核型分析技术在物种亲缘关系鉴定、染色体变异、杂种分析等方面得到广泛应用^[3]。国内关于向日葵细胞学、形态学、生理学、生物技术等方面的研究已有一些报道^[4-13],不同向日葵品种的染色体组型不同,表明不同基因型向日葵染色体核型有一定差别^[14-19]。目前,对龙葵杂8号的染色体数目、形态及核型公式等细胞遗传学方面的研究还没有详细的研究报道。因此,本研究旨在探明龙葵杂8号染色体的组成及核型特征,以期筛选出龙葵杂8号染色体制片的最适处理条件,为向日葵遗传育种工作等提供细胞遗传学实验数据。

收稿日期:2019-09-27

基金项目:黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z17204);黑龙江省农业科学院青年基金项目(2018YYF033);国家特色油料作物产业体系(CARS14-1-06)

作者简介:马 军(1981-),男,助理研究员,博士,主要从事种质资源评价利用与遗传改良研究。

通讯作者:丁海燕,女,博士,教授,E-mail: dinghaiyan2004@126.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验用向日葵种子龙葵杂8号由黑龙江省农业科学院保存并提供。龙葵杂8号向日葵种子经水培生根获得根尖细胞,对根尖细胞进行染色体制片和核型分析。

1.2 根尖培养和预处理

挑选籽粒饱满、大小均一的种子用10%次氯酸钠消毒10 min,用蒸馏水冲洗干净后,将种子放在25℃的蒸馏水中浸泡1~2 h。待种子吸水膨胀后,将种子取出用吸水纸吸干表皮水分,然后用镊子将种子均匀地铺在经过无菌蒸馏水处理的三层滤纸的培养皿中,置于培养箱中25℃进行催芽,期间每8 h观察一次,保持培养皿中滤纸始终处于湿润状态。待根尖刚刚冒出,将材料放于8℃低温处理48 h,之后将材料放回25℃培养箱中培养,待幼根长到约1.5 cm时,在8:00~10:00或者13:00~15:00切取根尖。取下的根尖放在0~4℃的冰水混合物中处理24 h,之后放在卡诺固定液中固定24 h后转入70%乙醇中,放在4℃冰箱中备用。

1.3 根尖细胞染色体制片

将根尖从70%乙醇中取出后,用蒸馏水冲洗2~3次,用吸水纸吸干表面水分,然后放在离心管中加入1 mL 1 mol/L的HCl,放在水浴锅中,65℃处理5 min左右取出。将解离后的材料用蒸馏水漂洗2~3次,移至载玻片上,用刀片切取根尖分生组织,滴加卡宝品红染液,从一侧缓慢盖上盖玻片,避免出现气泡,再将多余的卡宝品红染液吸去,将载玻片在酒精灯外焰烤片。采用压片法压片。在光学显微镜下进行观察制片。镜检时,将制好的片子首先在10×物镜下找到清晰的细胞,然后将能清晰看到细胞的位置置于显微镜的视野中间,再将物镜调到40×,在视野中找到清晰的细胞,轻轻将物镜转换至100×,滴上松柏油进行观察,找到染色较深,分散较清晰的染色体细胞进行拍照记录,并用直接鉴定法进行计数。可以将分散较好的片子进行封片保存。

1.4 测量与计算

选取形态清晰、分散较好的染色体标本片图像在Photoshop 7.0软件中测量染色体长度,再用Microsoft Excel计算染色体绝对长度、相对长度、臂比等参数。

利用Photoshop 7.0软件中的套索与变形工

具,进行染色体的配对及排列。依据李懋学^[20]、Levan^[21]的方法计算核型公式,参照Arano^[22]和Stebbins^[23]的方法计算核型实验参数。

1.5 核型模式图绘制

参照文献[19]的方法利用Microsoft Excel软件绘制核型模式图。

2 结果与分析

2.1 龙葵杂8号种子根尖培养

龙葵杂8号向日葵种子籽粒黑色,种子吸水后容易萌发,在培养箱中25℃培养8 h后发现种子开始萌发。向日葵的主根一条比较粗壮,在前期预试验中观察发现各根尖的细胞分裂时间不同步,很难找到足够多理想的有丝分裂中期分裂相的材料,因此采用低温浴处理的方法对根尖材料进行预处理,试验发现在8℃处理48 h可以使之后的根尖生长整齐一致,便于获得更多的处于有丝分裂相的细胞,适用于染色体的核型分析。

2.2 龙葵杂8号根尖染色体制片

选取分散较好的有丝分裂中期根尖细胞染色体制片进行拍照,统计染色体数目。对100个龙葵杂8号染色体分散较好的根尖细胞照片进行染色体数目观察,其中34条染色体的根尖细胞有72个,占统计总细胞的72%,因此确定龙葵杂8号向日葵体细胞染色体数目为 $2n=34$ 。

2.3 龙葵杂8号染色体核型

选取10个细胞进行测量和计算,认为龙葵杂8号向日葵核型公式表示为: $2n=2x=34=24m+6sm+4st$,染色体基数可能为 $x=17$,染色体数目为 $2n=34$,臂比值范围为1.15~3.54,平均臂比值为1.70。依据表1数据在Microsoft Excel工作表中作图,得到龙葵杂8号染色体的标准模式图(图1),在龙葵杂8号的全部染色体中,有24条染色体属于中着丝粒染色体(m型),6条染色体属于近中着丝粒染色体(sm型),4条染色体属于近端着丝粒染色体(st型),没有发现随体染色体。

3 结论与讨论

染色体制片技术是研究细胞遗传学的基本方法,实验过程中许多因素都可能影响制片效果,包括取材时间、根尖长度、预处理、解离、染液选择和压片等各个环节。在这一过程中,预处理是影响染色体制片质量的关键。预处理就是通过阻断、抑制和破坏纺锤丝的形成使细胞分裂停滞在中期,以获得更多的中期分裂相细胞;预处理还

表1 龙葵杂8号向日葵染色体核型参数

染色体 编号	相对长度(%)			臂比	类型
	长臂	短臂	全长		
1	3.99±0.06	3.29±0.04	7.28±0.07	1.21±0.02	m
2	4.82±0.06	2.35±0.08	7.17±0.11	2.05±0.05	sm
3	5.41±0.07	1.52±0.07	6.93±0.08	3.54±0.19	st
4	3.99±0.07	2.70±0.06	6.69±0.06	1.48±0.05	m
5	4.35±0.09	2.11±0.02	6.46±0.02	2.06±0.17	sm
6	3.88±0.10	2.47±0.08	6.35±0.10	1.57±0.07	m
7	3.41±0.08	2.47±0.05	5.88±0.10	1.26±0.04	m
8	3.41±0.07	2.47±0.05	5.88±0.10	1.38±0.03	m
9	3.41±0.06	2.35±0.08	5.76±0.07	1.45±0.06	m
10	3.40±0.06	2.35±0.05	5.76±0.05	1.45±0.04	m
11	3.06±0.05	2.47±0.03	5.52±0.04	1.24±0.03	m
12	3.17±0.07	2.23±0.03	5.41±0.07	1.42±0.04	m
13	3.06±0.03	2.35±0.06	5.41±0.07	1.30±0.03	m
14	3.88±0.04	1.29±0.06	5.17±0.08	3.00±0.12	st
15	2.70±0.09	2.35±0.06	5.05±0.10	1.15±0.06	m
16	3.17±0.18	1.53±0.11	4.7±0.27	2.08±0.09	sm
17	2.47±0.18	1.88±0.06	4.35±0.17	1.31±0.11	m

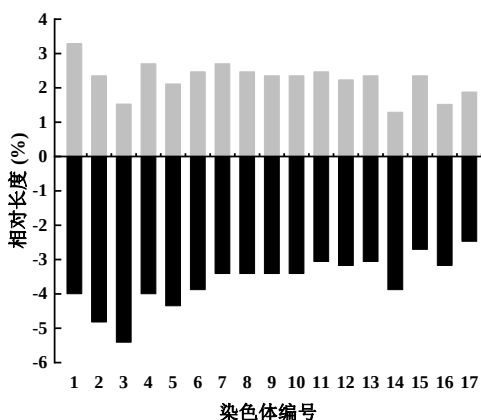


图1 龙葵杂8号向日葵核型模式图

可以改变细胞质的黏度,促使染色体分散和收缩,方便压片和观察^[2]。本试验采用两次低温处理(8℃ 48 h, 0~4℃ 24 h)方式使体细胞有丝分裂时间趋于同步化,获得了较多有丝分裂中期的染色体细胞,更适宜染色体配对,满足了核型分析的实验要求。在以往的试验报道中^[14-19],采用8-羟基喹啉、秋水仙素、4℃低温等预处理的方式都得到了理想的中期染色体形态,本试验将两步低温处理的方法成功运用在龙葵杂8号染色体制片和核型分析中,操作简单易行,无毒环保。

向日葵不同类型品种的染色体一般是 $2n=2x=34$,本研究表明龙葵杂8号染色体数目为: $2n=2x=34$,这与报道中栽培向日葵染色体数目是一致的。本研究得到龙葵杂8号核型公式为: $2n=2x=$

$34=24m+6sm+4st$,且没有随体染色体,这一结果与其他品种向日葵的染色体核型研究报道有差异。崔秋华^[15]对白向日葵品种核型分析得到的核型公式为: $2n=2x=34=24m+6Sm(4SAT)+4St(4SAT)$,其中有4对染色体带有随体。我们先前研究发现龙葵杂10号染色体数量为 $2n=34$,核型公式为: $2n=34=30m+2sm+2M^{[19]}$,本试验说明龙葵杂8号与龙葵杂10号的染色体核型不同。由此可见,不同向日葵品种的染色体核型存在差别,说明向日葵栽培品种之间存在着细胞学上的异质性^[24]。

在核型分析中使用Photoshop 7.0和Microsoft Excel软件辅助测量和计算,在实践过程中实用性更强灵活方便,减少了手工测量的误差,结果更准确,实用性强。

参考文献:

- [1] 庞俊峰,马德宁,王德寿,等.向日葵列当生物学特性及抗列当向日葵分子育种研究进展[J].生物技术进展,2012,2(6):391-396.
- [2] 王文军,黄绪堂,马军,等.油用向日葵杂交种龙葵杂8号及栽培技术[J].中国种业,2017(5):70-71.
- [3] 丁鸿,邱东萍,陈少雄.植物染色体标本的制备和染色体核型分析研究进展[J].南方农业学报,2012,43(12):1958-1962.
- [4] 景岚,王丽芳,康俊,等.向日葵品种对锈病抗性的组织学和超微结构研究[J].中国油料作物学报,2013,35(3):313-316.
- [5] 刘海学,张卫国,刘海臣,等.NaCl胁迫对向日葵幼苗生长及茎组织解剖结构的影响[J].中国油料作物学报,2012,34(2):201-205.
- [6] 郭园,张玉霞,杜晓艳,等.盐碱胁迫对油用向日葵幼苗生长及含水量的影响[J].东北农业科学,2016,41(2):20-24.
- [7] 孙瑞芬,闫素丽,安玉麟.向日葵单染色体显微分离及特异文库的构建[J].中国细胞生物学报,2014,36(1):33-38.
- [8] 张劲松,杨弘远,朱绫,等.向日葵柱头、花柱和珠孔中钙分布的超微细胞化学定位[J].植物学报,1995(9):691-696,749-750.
- [9] 孙敏,梁秀丽,李慧英,等.向日葵幼胚培养技术及其在育种中的应用[J].吉林农业科学,1997(1):11-14.
- [10] 牛庆杰,李伟,李慧英,等.向日葵耐盐碱材料筛选的新途径[J].吉林农业科学,1998(3):28-29.
- [11] 张维琴,路立平,马彦昆,等.向日葵对氮、磷、钾营养素的吸收、运转和分配规律的研究[J].吉林农业科学,1998(4):64-66.
- [12] 高君亮,罗凤敏,赵英铭,等.乌兰布和沙漠绿洲两种农作物叶片性状特征研究[J].东北农业科学,2016,41(1):38-42.
- [13] 郝水.向日葵子叶发育过程中细胞的有丝分裂与核酸动态[J].Journal of Integrative Plant Biology,1962(3):233-244.

(下转第78页)

弱问题,这可能与草莓茎尖的离体发育受多种激素协同调控有关^[12-13],多数研究结果一致也证实了这一推测^[14-15]。

增殖培养中丛生芽的大小对增殖倍数及增殖培养中激素浓度的要求有很大的影响^[16]。分割时芽小,尽管可提高丛生芽增殖倍数,但芽苗生长相对缓慢,在随后的调整中发现,即使调节6-BA和NAA浓度,也很难达到理想的增殖倍数,故在丛生芽快繁过程中,选择大小适宜的丛生芽进行分割是十分重要的。

多数研究已证实^[17-19],当草莓茎尖组织足够小时,可获得脱毒苗。但受条件限制,本试验未能对草莓茎尖培养苗脱毒效果做进一步研究,今后将继续研究解决草莓茎尖组织培养中茎尖取材大小与脱毒效果、丛生芽大小与分割时期、适宜激素比例以及驯化移栽成活率低等问题,以期建立稳定的脱毒快繁体系,为高原低气压环境下草莓脱毒种苗工厂化生产提供参考。

参考文献:

- [1] 王忠红,关志华,李 丹.基于地域资源优势的西藏设施农业发展分析[J].中国农学通报,2010,26(20):388-392.
- [2] 张华国,李宝海.西藏草莓生产现状、存在问题及对策研究[J].农业工程技术(温室园艺),2013(1):16-18.
- [3] 席家军,聂凯华.草莓愈伤组织诱导的几个影响因素研究[J].甘肃农业科技,2008(12):5-8.
- [4] 张 静,连丽艳.有关草莓研究的学位论文文献统计分析[J].东北农业科学,2019,44(1):84-86.
- [5] 吴鹏飞,王丽娟,切岩祥和,等.设施草莓组培快繁研究现状分析[J].北方园艺,2016(1):195-199.
- [6] 邓 渊.两个草莓品种茎尖脱毒快繁体系的建立[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [7] A Passey, K Barrett, D James. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch) using a range of explant types[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(5): 397-401.
- [8] 陈 英,张西英.草莓品种红颜组培快繁体系的优化[J].新疆农业科学,2016,53(12):2210-2216.
- [9] 连 朋,杜梦卿,王丽娟.草莓茎尖组培消毒方法及激素配比的优选[J].天津农学院学报,2019,26(3):21-25.
- [10] Gregory C Phillips, Martina Garda. Plant tissue culture media and practices: an overview [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2019, 55(3): 242-257.
- [11] 吕树立,孙喜云,周玉玲,等.草莓组织培养与快速繁殖技术[J].山东农业科学,2010(3):109-110.
- [12] 姚思扬,赵春莉,刘子平,等.红颜草莓组培快繁体系优化[J].福建农业学报,2018,33(9):950-956.
- [13] 陶阿丽,曹殿洁,华 芳,等.植物组织培养技术研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2018,15(18):31-35.
- [14] 翟婷婷,刘成连,原永兵,等.草莓茎尖培养快繁体系的研究[J].安徽农业大学学报,2015,42(4):545-548.
- [15] 袁惠燕,谈建中,黄秀勤,等.激素条件对不同品种草莓组培快繁效果的影响[J].苏州大学学报(自然科学版),2007(3):75-79.
- [16] 李 闯,张海燕,谭 化,等.马铃薯新品种‘吉薯1号’茎尖脱毒及组培快繁研究[J].东北农业科学,2019,44(6):62-64,73.
- [17] 陈 英,肖春林,罗燕娜,等.红颜草莓脱毒优化及病毒检测的研究[J].浙江农业学报,2017,29(6):966-970.
- [18] 刘庆忠,赵红军,姜君军,等.无病毒草莓良种繁育技术体系的建立[J].落叶果树,2000(4):1-4.
- [19] 张志宏,肖 敏,杨洪一,等.草莓病毒脱除方法的比较与评价[J].果树学报,2006(5):720-723.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第26页)

- [14] 王新风,朴铁夫. EDTA对向日葵根尖细胞染色体的诱变分析[J].吉林农业科学,2007,32(1):8-9,13.
- [15] 崔秋华,蔚荣海,韩立军.向日葵染色体核型分析[J].吉林农业大学学报,1989(2):23-25,31,121.
- [16] 赵慧博.高蓄能作物油葵的染色体核型分析及遗传转化[D].天津:天津大学,2007.
- [17] 张新玲,张佩玲,尹 洁.6个向日葵品种的核型分析[J].八一农学院学报,1995(3):100-103.
- [18] 李懋学.几种油料植物的核型分析[J].西北植物学报,1987(4):246-251,287.
- [19] 丁海燕,汪春林,武 燕,等.龙葵杂10号向日葵染色体核型分析[J].作物杂志,2019(2):1-3.
- [20] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物学研究,1985(4):297-302.
- [21] Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [22] Arano H. Cytological studies in subfamily (Carduoideae) of Japan: IX. The karyotype analysis [J]. Botanical Magazine(Tokyo), 1963, 76(895):32-39.
- [23] Stebbins G L. Chromosomal and evolution in higher plants[M]. London: Edward Aronld, 1971: 87-89.
- [24] 刘惠荣,曾子申,利容千.向日葵三个品种的染色体组型分析[J].中国油料,1984(3):26-30.

(责任编辑:刘洪霞)