

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.01.004

藜麦品系的染色体数目及核型分析^①

何 燕¹, 邓永辉², 李梦寒¹, 冯西博¹, 卓 嘎¹

1. 西藏农牧学院 植物科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715

摘要: 为探明西藏目前主推藜麦的染色体数目及核型, 以西藏农牧学院植物科学学院提供的藜麦品系 W4 为材料, 对其进行根尖染色体常规压片法制片, 比较采用 8-羟基喹啉、秋水仙素和冰冻方法的预处理时间、1 mol/L HCl 酸解时间对藜麦染色体制片的影响, 探讨最优的根尖处理方法并进行核型分析。结果显示: 用 0.1% 秋水仙素溶液(离体)处理 3 h, 1 mol/L HCl 60 °C 酸解 13~14 min 的总体作用效果最佳; 藜麦 W4 的核型公式为 $2n=36=32m(2SAT)+4sm$, 核型不对称系数为 57.87%, 核型分类中属 2B 型。

关键词: 藜麦 W4; 染色体制片; 核型分析

中图分类号: S512

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)01-0027-05

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd), 一年生藜科谷物, 又称南美藜、印第安麦、奎藜、奎奴亚藜等, 原产于南美洲安第斯山区, 至今已有 5 000~7 000 年的种植和食用历史, 在玻利维亚、智利等国家一直是当地居民最主要的粮食, 适合生长在高海拔、少雨、空气稀薄、寒冷、日照强、土壤贫瘠的沙质甚至碱性地区, 这些地区一般作物较难生长, 环境污染很低^[1]。众多研究者认为, 无论在植物界还是动物界都没有一种食物能像藜麦那样提供全面平衡的人体所需营养元素^[2]。藜麦有极高的营养价值, 平均含蛋白质 16.7%、脂肪 7.0%、纤维素 1.39%、全钙 0.74%、全铁 0.73%、全磷 0.43%。除含有丰富的钙、磷和铁, 还含有丰富的维生素 E 和一些 B 族维生素^[3]。20 世纪 90 年代之后, 人们开始认识到藜麦的营养价值和它的发展潜力, 欧洲国家和美国、加拿大相继进行了引种和栽培。联合国大会将 2013 年定为“国际藜麦年”, 旨在让世界关注藜麦的生物多样性和营养价值在提供粮食和营养安全、消除贫困以及在支持实现千年发展目标等方面所能发挥的作用^[4]。近年来, 随着藜麦独特的营养价值被人们发现, 在国际市场身价倍增, 被誉为“粮食之母”而风靡全球, 成为时尚高端的营养食品, 美国宇航局甚至将藜麦选定为太空粮食^[5-6]。

1996 年, 西藏自治区农作物品种审定委员会审定出合格品种 21 个, 其中 3 个为藜麦引进驯化品种。自 2014 年开始, 藜麦在西藏进行了推广, 近 2 年的推广面积均在 667 hm² 左右, 推广面积较大的地区分别为日喀则、林芝和拉萨。从农牧民手中回收价格一般为 24~30 元/kg, 加工后售价可达 200~300 元/kg, 大大增加了当地农牧民种植积极性和经济收入。

由于藜麦突出的营养品质及抗旱性、耐寒性, 许多人对其进行了化学组成、营养价值、生物学特性、栽培技术、病害、苗期抗霜冻能力等方面的研究^[7-8]。尽管对藜属植物的染色体数已进行过一定研究^[9-11],

① 收稿日期: 2018-01-05

基金项目: 西藏自治区重点项目(XZXTX-2016)。

作者简介: 何 燕(1970-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事作物遗传育种研究。

通信作者: 卓 嘎, 副教授。

但至今依然缺乏对其染色体核型的详细分析^[12]。染色体是遗传物质的载体,植物染色体制片和核型分析技术是细胞遗传学中最基本、最常用的方法,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^[13]。关于藜麦细胞学方面的研究已有一些报道,但由于藜麦植物染色体较小使得核型分析的难度增大,目前只有少量研究报道了其染色体数目,对核型的研究极少,更没有人对西藏目前主推的藜麦品种(品系)进行深层次研究。因此,本实验采用不同处理方法进行藜麦核型分析,以期筛选出藜麦染色体制片的最适处理条件,探明其染色体数目及核型,为藜麦遗传育种工作等提供细胞学数据。

1 材料与方法

1.1 材料

2016年在西藏农牧学院种植的、代号为W4(当前生产表现良好)的藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd)种子,由西藏农牧学院植物科学学院旺姆教授提供。

1.2 方法

1.2.1 根尖材料的获取

将藜麦种子放入烧杯,用蒸馏水清洗去掉杂质及种子表层的水溶性皂角苷,浸泡10 min左右,置于垫有两层滤纸的培养皿中,放入温度23℃、湿度72%、无光照的生化培养箱中发根,期间注意保持培养皿中的湿度,当根长至1~2 cm时,于上午09:00—11:00之间取材。预处理设置不同的处理方法及处理时间(表1),以探讨最佳的藜麦根尖预处理方法。

表1 藜麦根尖预处理方法

| 处理方法 | 材料状态 | 处理时间 |
|----------------|------|----------------------|
| 0.002 M 8-羟基喹啉 | 非离体 | 分别处理 2,3,4,5,6,7,8 h |
| 0.05%秋水仙素 | 非离体 | 分别处理 3,4,5,6 h |
| 冰冻处理 | 非离体 | 冰水混合物, 5℃冰箱中保存 24 h |
| 0.1%秋水仙素 | 离体 | 处理 2,3 h、5℃冰箱中保存 |

注:未指明处理温度的,均为当季室温。

预处理之后,用新配制的卡诺固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)进行固定(24 h),然后依次用95%,85%,75%乙醇冲洗根尖,最终置于70%~75%乙醇中,(4~5)℃冰箱保存。

1.2.2 染色体制片

处理好的根尖用蒸馏水清洗2~3遍,再用酒精冲洗干净,控净水份,加入1 mol/L HCl、置入60℃预热好的恒温水浴锅中解离5~20 min,每分钟取样1次,将材料用蒸馏水清洗干净,取根尖分生区1~2 mm,使两片载玻片呈十字交叉法压片后打开,在每片载玻片上各滴加1小滴卡宝品红染色液染色3 min。将载玻片放在平整的桌面上,盖上盖玻片,盖玻片用左手手指压紧,防止盖玻片滑动,再用铅笔头垂直轻轻敲打盖玻片,使材料均匀分散后压片。

1.2.3 镜检及核型分析

将准备好的制片放在OLYMPUS CX41显微镜下观察,并选择分散较理想的中期染色体图像进行显微摄影。按照李懋学等^[14]的核型分析标准:统计的细胞数目应在30个以上,其中85%以上的细胞具恒定一致的染色体数,即可认为是该植物的染色体数目。将图片输入电脑中分别用Scopephoto和ImageJ软件进行测量,利用Excel计算臂比、着丝粒指数、核型不对称指数、染色体长度比等核型参数;有随体的染色体,其随体长度及次缢痕长度未计入全长。核型分类以Stebbins^[15]方法进行,并按照乔永刚等^[16]的方法利用染色体相对长度的参数在Microsoft Office Excel中绘出核型模式图。利用Adobe Photoshop及Excel制作核型图和核型模式图。

2 结果与分析

2.1 藜麦染色体制片方法优化

2.1.1 预处理方法优化

每种植物的根尖染色体大小及数目不同, 不同的预处理方式对同一植物的处理效果也不尽相同, 因此不同植物有不同的最佳预处理方式. 用 0.002 M 的 8-羟基喹啉分别处理 3~8 h, 镜检观测结果表明: 在低于 6 h 的处理中, 染色体前期分裂相比较多, 能辩清染色体数目, 但主缢痕不易辨明. 处理时间超过 6 h 后, 染色体弯曲、拉长, 边缘模糊. 因此, 在非离体情况下用 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉处理 6 h 为最佳处理时间. 用 0.05% 秋水仙素溶液非离体处理 3~6 h 时镜检显示: 总体上染色体分散程度不够, 虽能辩清染色体数目, 但主缢痕不易辨明. 处理 5~6 h 与处理 3~4 h 相比, 染色体结构相对清晰, 因此长时间、低秋水仙素溶液浓度处理相对较好. 冰冻处理法主要存在问题为主缢痕不清晰, 无法很好地辨明染色体结构. 用 0.1% 秋水仙素处理离体根尖, 处理 3 h 与处理 2 h 相比, 染色体结构更为清楚, 主缢痕清晰可辨. 因此, 在以上 4 种处理中, 0.1% 秋水仙素在 5 °C 下、离体预处理根尖 3 h 效果最佳.

2.1.2 酸解时间优化

用 1 mol/L HCl、恒温水浴锅预热至 60 °C 进行酸解. 酸解时间设置为 5~20 min, 每分钟取样 1 次, 每个处理选取 5 张制片进行观察. 结果显示: 当酸解时间低于 12 min 时, 根尖一般较硬, 在后期压片时材料不易分散, 细胞重叠影响对染色体形态和数目的观察. 当酸解时间超过 15 min 后, 制片中染色体染色较浅, 观察效果仍然欠佳. 酸解 13~14 min 时细胞易分散且染色体着色较深, 易于观察, 因此酸解 13~14 min 为最佳酸解时间. 在此过程中还发现, 用固定液固定 24 h 后立即进行酸解和制片, 酸解需要时间相对要短一些, 可以在 12 min 左右, 而且染色体形态及数目相对清晰. 如果固定时间相对较长, 则酸解需要的时间也要长一些, 但一般不超过 15 min. 这个结果说明固定后立即进行酸解和制片, 其观察效果比在 70%~75% 乙醇中保存一段时间的材料要好.

2.2 藜麦染色体数目

对根尖染色体制片进行镜检, 并选择 50 个染色体清晰而且分散良好的中期分裂相观察计数, 所有观察统计的细胞染色体数目均为 $2n=36$, 这个结果与文献[17-18]的结果一致. 未发现非整倍体细胞, 具体染色体分裂相及核型见图 1.

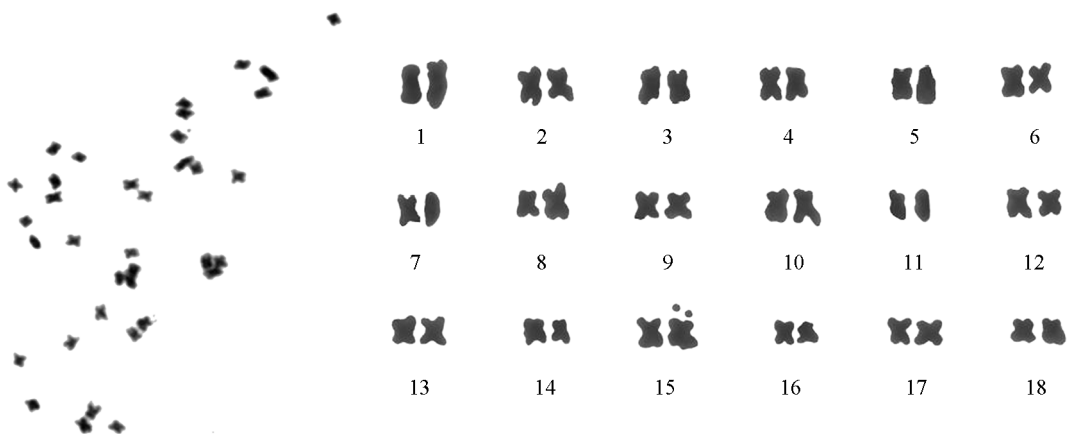


图 1 藜麦 W4 的染色体分裂相及核型图

2.3 藜麦染色体核型参数

各选取 5 张比较清晰的藜麦染色体中期分裂相图片进行核型分析, 确定 W4 的染色体数目为 $2n=36$. 在本实验中, 最长染色体与最短染色体的比值为 1.85 : 1. 臂比值大于 2 : 1 的染色体占全部染色体的 11.11%, 属于 2B 型. 核型不对称系数(长臂总长/全组染色体总长)为 57.87%. 在藜麦的 18 对染色体中, 16 对为中部着丝点染色体(m), 占总染色体数的 88.89%; 2 对为近中部着丝点染色体(sm), 占总染色体数的 11.11%. 核型公式为 $2n=36=32\ m(2SAT)+4\ sm$. 具体核型参数见表 2, 核型模式见图 2.

表 2 藜麦 W4 的染色体参数

| 编号 | 相对长度/% | | | 臂比值 | 类型 | 备注 |
|----|--------|------|------|------|----|-----|
| | 长臂 | 短臂 | 全长 | | | |
| 1 | 4.35 | 3.51 | 7.86 | 1.24 | m | |
| 2 | 3.12 | 3.00 | 6.12 | 1.04 | m | |
| 3 | 4.40 | 1.70 | 6.10 | 2.59 | sm | |
| 4 | 3.12 | 2.85 | 5.97 | 1.09 | m | |
| 5 | 3.12 | 2.65 | 5.77 | 1.18 | m | |
| 6 | 2.93 | 2.75 | 5.68 | 1.06 | m | |
| 7 | 3.25 | 2.43 | 5.67 | 1.34 | m | |
| 8 | 3.13 | 2.50 | 5.63 | 1.25 | m | |
| 9 | 2.90 | 2.71 | 5.61 | 1.07 | m | |
| 10 | 3.91 | 1.70 | 5.61 | 2.29 | sm | |
| 11 | 2.96 | 2.63 | 5.59 | 1.12 | m | |
| 12 | 2.87 | 2.59 | 5.46 | 1.11 | m | |
| 13 | 2.93 | 2.35 | 5.28 | 1.25 | m | |
| 14 | 2.79 | 2.17 | 4.96 | 1.28 | m | |
| 15 | 2.89 | 2.00 | 4.89 | 1.45 | m | 具随体 |
| 16 | 2.64 | 2.18 | 4.82 | 1.21 | m | |
| 17 | 2.46 | 2.26 | 4.72 | 1.09 | m | |
| 18 | 2.18 | 2.08 | 4.25 | 1.05 | m | |

注：随体长度未计算在内。

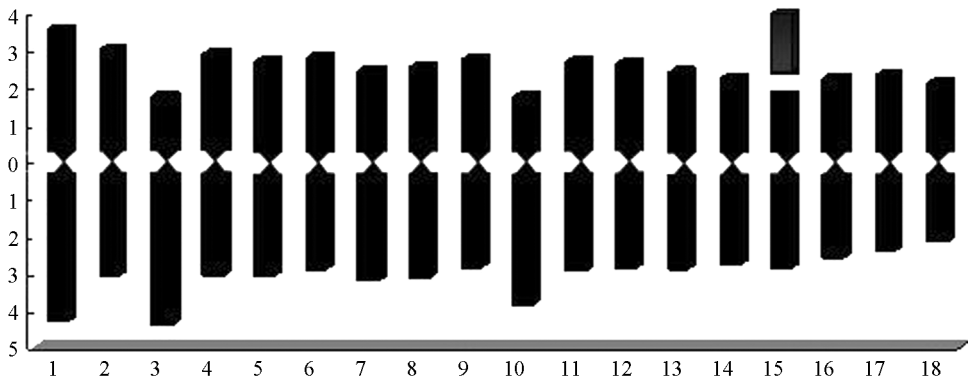


图 2 藜麦 W4 的核型模式图

3 讨 论

陈于和等^[19]曾用豌豆根尖做过离体与非离体的处理比较,认为在离体条件下药剂和低温预处理的中期分裂指数有所提高,且非离体条件的中期分裂指数要高于离体条件的中期分裂指数.本实验中离体处理效果却好于非离体处理,但因为本实验中秋水仙素溶液浓度不同,因此没有确切的比较标准,今后可对这个进行比较.藜麦根尖很小,离体后容易在清洗过程中丢失,且离体步骤相对耗时较多,非离体处理更利于节约实验时间成本.

有研究表明,对同一物种根尖有丝分裂进行阻断的方法和时间不同会产生不同凝缩程度的中期染色体,并导致染色体长度产生较大差异^[20].因此,在对西藏其他藜麦品种(品系)核型进行研究时,应采用同一处理方法进行比较,应当制定一套其核型分析步骤的标准,这样既方便进行同一个属或种内的核型比较,也方便学术交流.

实验中曾一度出现次缢痕无法观察到或无法看清的状况,主要原因在于藜麦染色体较小(未发现非整倍体细胞也可能与此有关).但在排除制片的操作问题及提升显微镜规格后,对目标的观察效果有较大改观.

此次实验仅采用了 1 个西藏的藜麦品系,今后应对更多藜麦品种(品系)核型进行探讨,以期对藜麦遗传育种研究提供更多、更详实的细胞学数据.

致谢:本实验是在西南大学农学与生物科技学院殷家明副教授的指导下进行的,并提供了相关仪器及药品.谨在此对殷老师表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] 贡布扎西. 古老而神秘的作物—南美藜(*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. 西藏科技情报, 1993(4): 12—15.
- [2] 贡布扎西, 旺姆. 西藏南美藜营养品质评价 [J]. 西北农业学报, 1995, 4(1): 85—88.
- [3] 工布扎西, 旺姆, 张崇玺. 南美藜在西藏的生物学特性研究 [J]. 西北农业学报, 1994, 3(4): 81—86.
- [4] STIKIC R, GLAMOCLJA D, DEMIN M, et al. Agronomical and Nutritional Evaluation of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an Ingredient in Bread Formulations [J]. Journal of Cereal Science, 2012, 55(2): 132—138.
- [5] 秦改梅, 李润青. 中国藜麦的先行者 [J]. 科学之友, 2016(5): 34—36.
- [6] 阿图尔·博汗格瓦, 希尔皮·斯利瓦斯塔瓦, 于晓娜, 等. 藜麦生产与应用 [C]. 北京: 藜麦生产与应用中国作物学会论文集, 2014.
- [7] HERNÁNDEZ B J E, LEÓN J. Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective [C]. Rome: FAO-Plant Production and Protection Series, 1994.
- [8] 高兰. 加快藜麦栽培技术推广促进高原特色农业升级 [J]. 农业与技术, 2017, 37(3): 111—113.
- [9] 李娜娜, 丁汉凤, 郝俊杰, 等. 藜麦在中国的适应性种植及发展展望 [J]. 中国农学通报, 2017, 33(10): 31—36.
- [10] KOLANO B, GARDUNIA B W, MICHALSKA M. Chromosomal Localization of Two Novel Repetitive Sequences Isolated from the *Chenopodium quinoa* Genome [J]. J Appl Genet, 2008, 49(4): 313—320.
- [11] WARD S M. Allotetraploid Segregation for Single-Gene Morphological Characters in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Euphytica, 2000, 116(1): 11—16.
- [12] MAUGHAN P J, BONIFACIO A, COLEMAN C E, JELLEN E N. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants (Volume 3): Pulses, Sugar and Tuber Crops [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2007.
- [13] 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.
- [14] 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, 3(4): 297—302.
- [15] STEBBINS G L. Chromosome Evolution in High Plants [M]. London: Edward Arnold Ltd., 1971.
- [16] 乔永刚, 宋芸. 利用 Excel 制作核型模式图 [J]. 农业网络信息, 2006(10): 97—98.
- [17] 刘永安, 冯海生, 陈志国, 等. 植物染色体核型分析常用方法概述 [J]. 贵州农业科学, 2006, 34(1): 98—102.
- [18] OHRI D. The Taxonomic Riddle of *Chenopodium album* L. Complex (Amaranthaceae) [J]. The Nucleus, 2015, 58(2): 131—134.
- [19] 陈于和, 秦素平, 林小虎. 离体与非离体条件对豌豆根尖有丝分裂的影响 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 230—232.
- [20] SHE C W, JIANG X H, OU L J. Molecular cytogenetic Characterisation and Phylogenetic a-Nalysis of the Seven Cultivated *Vigna* species (Fabaceae) [J]. Plant Biol, 2015, 17(1): 268—280.

Chromosome Number and Karyotype Analysis of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)

HE Yan¹, DENG Yong-hui², LI Meng-han¹,
FENG Xi-bo¹, ZHUO Ga¹

1. College of Plant Science, Xizang Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi Tibet 860000, China;

2. School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To investigate the chromosome number and karyotype of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) cv. W4, the main line of the species in Tibet, its seeds provided by College of Plant Science of Xizang Agriculture and Animal Husbandry College were used as the plant material. The traditional chromosome tabling technique was adopted and the effects of the time of pretreatment with 8-hydroxyquinoline and colchicine and with freezing and acidolysis time with 1 mol/L HCl on chromosome preparations were compared so as to explore the best method of root tip treatment and karyotype analysis. Treatment with 0.1% colchicine solution (in vitro) for 3 hours, and acidolysis with 1 mol/L HCl at 60 °C for 13~14 minutes gave the best results. The karyotype formula of quinoa W4 was shown to be $2n(\textit{Chenopodium quinoa Willd})=36=32\text{ m}(2\text{SAT})+4\text{ sm}$, with an asymmetrical coefficient of 57.87%. In classification, it belonged to the category of karyotype 2B.

Key words: *Chenopodium quinoa* Willd W4; chromosome preparation; karyotype analysis