

张健,王莹,马祥建,等. 基于流式细胞术的旱柳染色体倍性与基因组大小测定[J]. 江苏农业科学,2018,46(22):40-43.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.22.008

# 基于流式细胞术的旱柳染色体倍性与基因组大小测定

张健,王莹,马祥建,谈峰,李敏,李玉娟

(江苏沿江地区农业科学研究所,江苏南通 226541)

**摘要:**旱柳是我国重要的乡土树种之一,具有很强的抗逆性,特别是耐旱与耐盐,但其染色体倍性和基因组大小还未知,限制了其分子育种的发展。利用流式细胞术对旱柳 3 个品种(沿江柳、海柳 1 号、9901 柳)进行染色体倍性测定,同时对这 3 种旱柳的基因组大小进行评估。结果表明,沿江柳、海柳 1 号、9901 柳均为四倍体,基因组大小约为 670 Mb。本研究的结果可以为旱柳全基因组测序提供重要的参考。

**关键词:**旱柳;染色体倍性;基因组大小;流式细胞术

**中图分类号:** S792.120.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)22-0040-04

柳树是杨柳科(Salicaceae)柳属(*Salix*)树种,为落叶乔木或灌木,主要分布在北半球温带及寒带地区,在北半球热带、亚热带地区及南半球也有少量分布。全球有 500 多个柳树品种,其中亚洲是柳树的起源中心,仅我国就有 275 种<sup>[1]</sup>。柳树树种间存在丰富的染色体倍性差异,包括二倍体( $2n=2x=38$ )、四倍体( $2n=4x=76$ )、六倍体( $2n=6x=114$ )甚至十二倍体( $2n=12x=228$ )<sup>[2]</sup>,其中灌木柳主要为二倍体,乔木柳多为异源多倍体<sup>[1,3]</sup>。

旱柳(*Salix matsudana*)是柳属最重要的树种之一,主要为乔木柳<sup>[4]</sup>,原产我国东北部,又被称为中国柳,以其高适应性特别是抗逆性已被引种推广到澳大利亚、欧洲与北美洲等地区<sup>[5]</sup>,是重要的能源、造林和绿化树种<sup>[6]</sup>。旱柳在土壤重金属修复、盐碱地绿化、生物燃料等方面发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>,其中海柳 1 号、9901 柳等品种已逐渐成为我国沿海林业开发中潜力巨大的战略树种<sup>[9-10]</sup>。目前,科研人员已开展了旱柳生理指标如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)活性、过氧化氢酶(peroxidase,简称 POD)活性、丙二醛(malondialdehyde,简称 MDA)含量在盐胁迫下的表现<sup>[9]</sup>以及转录组<sup>[11]</sup>、比较蛋白组<sup>[5]</sup>及 miRNA<sup>[12]</sup>等方面的研究,但旱柳的染色体倍性与基因组大小尚未见报道,这限制了旱柳分子育种的发展。

流式细胞术(flow cytometry,简称 FCM)是一种在液流系统中快速测定单个细胞或细胞器的生物学性质,并把特定的细胞或细胞器从群体中加以分类收集的技术,其特点是通过快速测定库尔特电阻、荧光、光散射和光吸收来定量测定细胞染色体倍性、DNA 含量、细胞体积、蛋白质含量等许多重要参

数<sup>[13]</sup>。流式细胞术已在山药、芭蕉等植物的染色体倍性检测与基因组大小测定中发挥了重要的作用<sup>[14-15]</sup>。

本研究运用流式细胞术对旱柳不同品种的染色体倍性与基因组大小进行测定,以期对旱柳全基因组测序提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

旱柳品种选用江苏省地方旱柳品种沿江柳、江苏沿江地区农业科学研究所育成的旱柳品种海柳 1 号、山东省林业科学研究院育成的旱柳品种 9901 柳。旱柳染色体倍性测定以东北地方灌木柳品种杞柳(已知为二倍体)为对照,基因组大小测定以基因组大小已知的水稻淮稻 5 号(江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所育成)和大豆品种通豆 7 号(江苏沿江地区农业科学研究所育成)为对照。

### 1.2 培养条件

染色体倍性测定时,分别取杞柳与旱柳各品种的茎段扦插条(粗 2~3 cm,长 8~10 cm),放入含 1/3 清水透明杯中并置于光照培养箱中培养,培养条件:光暗周期为 12 h—12 h,光照度为 3 300 lx,培养温度为 25 ℃。

基因组大小测定时,取水稻品种淮稻 5 号、大豆品种通豆 7 号的籽粒,用培养皿加水后放入光照培养箱内培养;同时取旱柳 3 个品种茎段,培养方式与上述一致。

### 1.3 染色体倍性及基因组大小测定

上述材料培养时间均为 20 d,培养后取新鲜嫩叶,采用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行染色体倍性和基因组大小测定,并用 CellQuest 软件(美国 BD 公司)获取数据,用 ModFit 软件(Yerity Software House 公司)分析结果。

单细胞悬液:取 1 g 植株新鲜叶片,在 2 mL 细胞裂解液后用锋利的刀片切碎,用 200 目尼龙网过滤,用试管收集滤液,经 1 000 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,收集沉淀细胞核。

混合液:先用碘化丙啶(propidium iodide,简称 PI)染液对细胞核重悬,将细胞核悬液 DNA 进行荧光标记,置于暗处染色 20 min。再将几个品种的染液进行混合形成混合液。

用已知染色体倍性或基因组大小的材料作为对照,将对材料横坐标固定,保持各个参数一致后对待测样品逐一检

收稿日期:2017-06-10

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)1004];江苏省第十二期“六大人才高峰”资助项目(编号:2015-NY-042);江苏省南通市“226 工程”培养资金资助项目(编号:2014008);江苏省南通市民生科技创新和示范推广项目(编号:MS2016064)。

作者简介:张健(1974—),男,博士,研究员,主要从事林木抗逆育种研究。E-mail:yjnkyy@163.com。

通信作者:李玉娟,副研究员,主要从事林木分子基因组研究。E-mail:381260896@qq.com。

测,根据峰的位置并参考对照样品的大小计算待测样的倍性与基因组大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 旱柳染色体倍性分析

用流式细胞仪测定杞柳(二倍体)的 DNA 含量时将其设

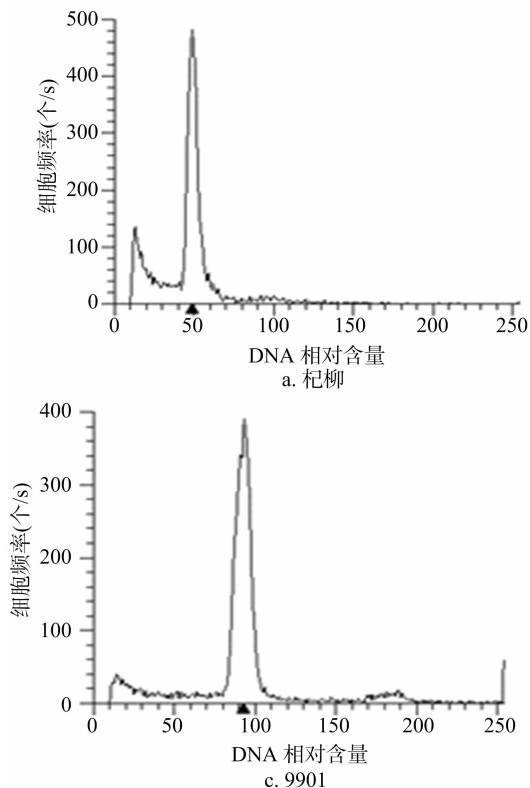
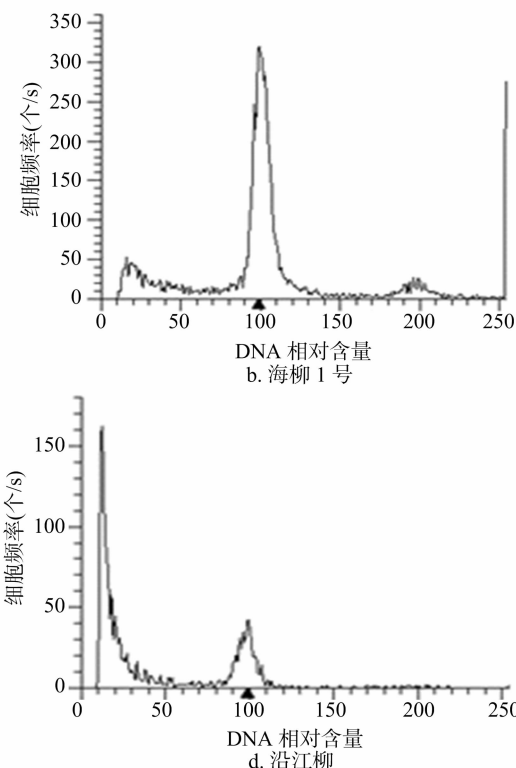


图1 柳树品种染色体倍性

定为 50 附近,以二倍体杞柳的 DNA 含量为对照,将其他待测旱柳品种的 DNA 含量与其进行比较,得到所测样品的相对 DNA 含量。从图 1 可以看出,杞柳在 50 左右有 1 个主峰(图 1-a),海柳 1 号、9901 柳和沿江柳 3 个旱柳品种均在 100 左右出现了主峰,代表其倍性约为杞柳的 2 倍,即 3 个旱柳品种均为四倍体。



### 2.2 旱柳基因组大小预测

2.2.1 水稻、大豆、沿江柳基因组比较 用流式细胞仪测试水稻细胞的单细胞悬液,已知水稻基因组大小约为 440 Mb<sup>[16]</sup>,所得的 DNA 含量定为 44 左右,并以此为对照,测定大豆(已知其基因组大小约为 1 150 Mb<sup>[17]</sup>)和沿江柳的 DNA 含量,并将沿江柳的 DNA 含量分别与水稻和大豆的 DNA 含量进行比较,得到沿江柳的相对 DNA 含量,结果见图 2-a、图 2-b、图 2-c。用流式细胞仪对沿江柳与水稻、大豆进行了混合样测定,将最小基因组的水稻 DNA 定为 50 左右,得出图 2-d 的混合样图。

从图 2-a、图 2-b、图 2-c 可以看出,水稻的 G<sub>1</sub> 期(细胞分裂间期 1)在图 2-a 中横坐标 46.49 处,大豆的 G<sub>1</sub> 期位置在 143.56 处,沿江柳的 G<sub>1</sub> 期位置在 75.60 处,从水稻推算沿江柳的基因组大小为 440/46.49 × 75.60 = 715.5 Mb;从大豆推算沿江柳的基因组大小为 1 150/143.56 × 75.60 = 605.6 Mb。

从图 2-d 可以看出,水稻 G<sub>1</sub> 期的位置在 52.27 处;大豆 G<sub>1</sub> 期位置在 138.74 处,沿江柳的基因组介于两者之间,峰值在 80.44 处。从水稻推算沿江柳的基因组大小为 440/52.27 × 80.44 = 677.1 Mb,从大豆推算沿江柳的基因组大小为 1 150/138.74 × 80.44 = 666.8 Mb。

2.2.2 水稻、大豆、9901 柳、海柳 1 号单细胞悬液比较 为了更准确地测定出旱柳基因组大小,笔者重复测定了水稻、大

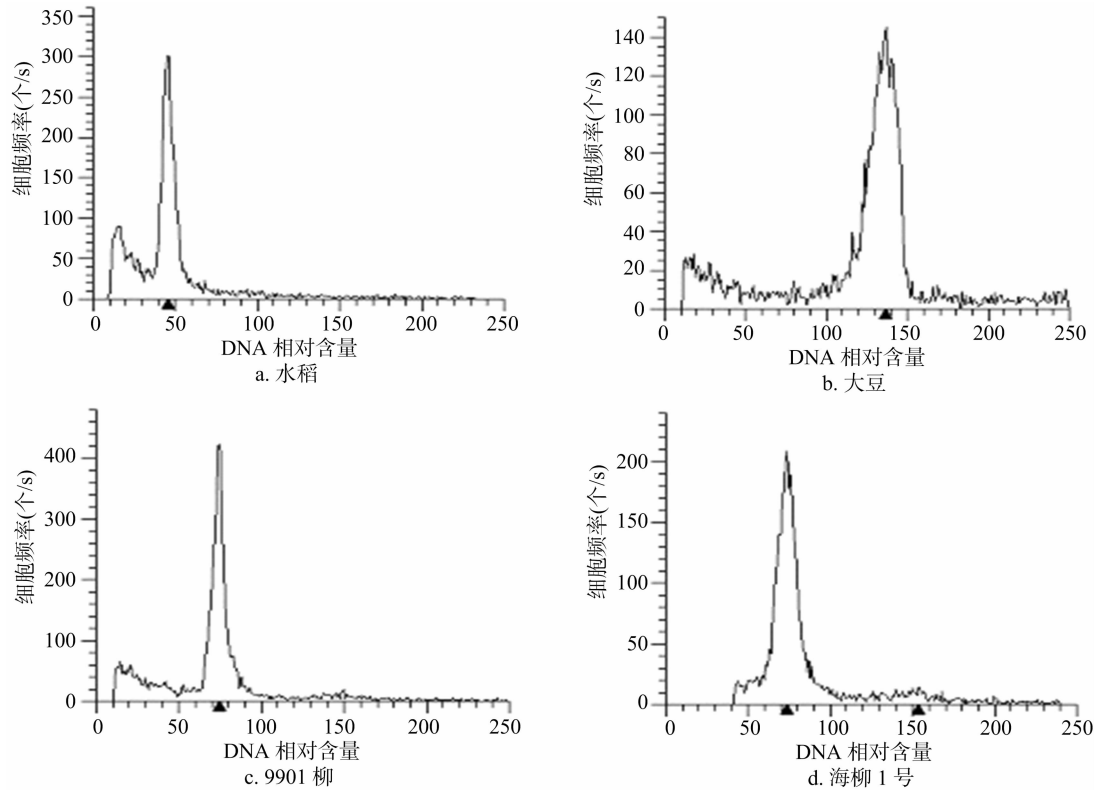
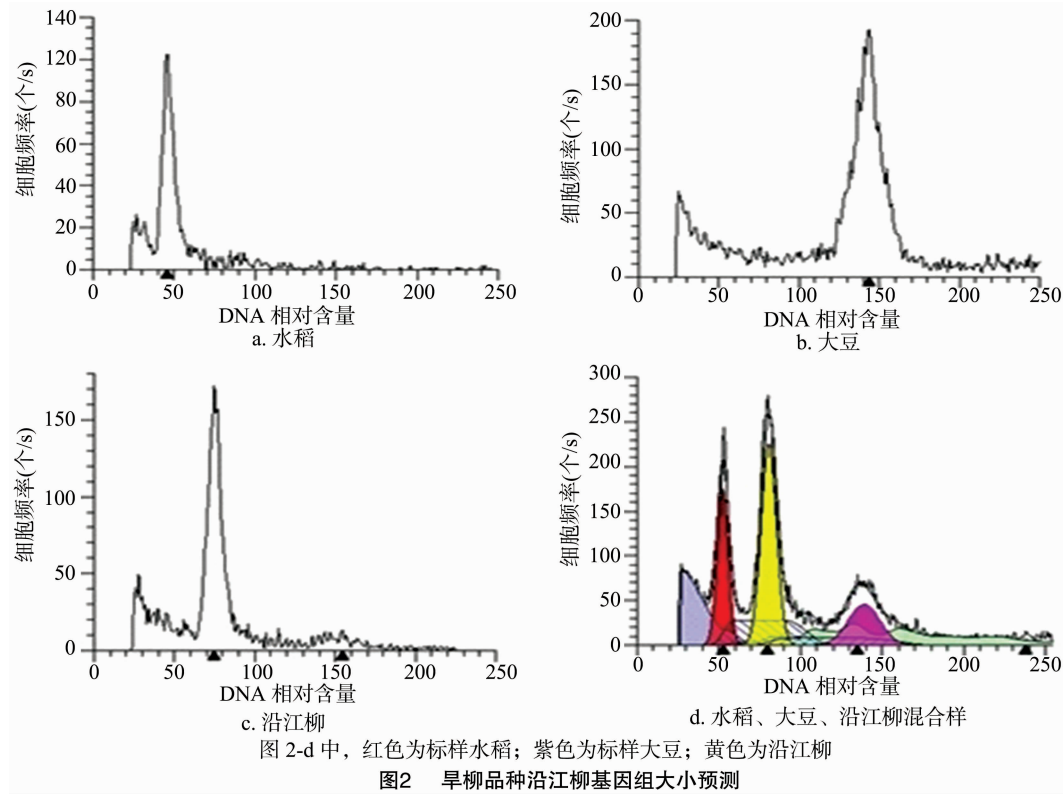
豆的单细胞悬液,并将 9901 柳、海柳 1 号这 2 个旱柳品种与其进行比较。

从图 3 可以看出,水稻 G<sub>1</sub> 期的位置在图中横坐标 45.10 处,大豆的 G<sub>1</sub> 期位置在 135.00 处,9901 柳的 G<sub>1</sub> 期位置在 74.32 处,海柳 1 号的 G<sub>1</sub> 期位置在 74.11 处。从水稻推算 9901 柳的基因组大小为 440/45.10 × 74.32 = 725.1 Mb;推算海柳 1 号的基因组大小为 440/45.10 × 74.11 = 723.0 Mb。从大豆推算 9901 柳的基因组大小为 1 150/135 × 74.32 = 633.1 Mb;推算海柳 1 号的基因组大小为 1 150/135 × 74.11 = 631.3 Mb。

2.2.3 水稻、大豆、9901 柳、海柳 1 号混合样比较 试验同时用流式细胞术对水稻、大豆与 9901 柳或海柳 1 号三者的混合样进行测定,并根据测定图计算其基因组大小值。

从图 4-a 可以看出,水稻 G<sub>1</sub> 期位置在图中横坐标 50.56 处,大豆 G<sub>1</sub> 期位置在 139.83 处,9901 柳的基因组介于两者之间,峰值在 81.02 处。从水稻推算 9901 柳的基因组大小为 440/50.56 × 81.02 = 705.1 Mb,从大豆推算沿江柳的基因组大小为 1 150/139.83 × 81.02 = 666.3 Mb。

从图 4-b 可以看出,水稻 G<sub>1</sub> 期位置在图中横坐标 51.28 处,大豆 G<sub>1</sub> 期位置在 144.61 处,海柳 1 号的峰值在 81.87 处。从水稻推算海柳 1 号的基因组大小为 440/51.28 × 81.87 = 702.5 Mb,从大豆推算海柳 1 号的基因



组大小为  $1\ 150/144.61 \times 81.87 = 651.1\ \text{Mb}$ 。

3 讨论与结论

柳树是我国主要的乡土树种之一,在我国有着悠久的栽

培历史。多倍体现象在柳树的物种形成中非常普遍,在已知染色体数目的 65 种柳树中,2 倍体有 16 种,3 倍体有 10 种、4 倍体有 43 种、5 倍体有 3 种、6 倍体有 10 种、8 倍体有 7 种、10 倍体有 3 种、12 倍体有 1 种<sup>[2]</sup>。了解柳树的倍性对其重要性

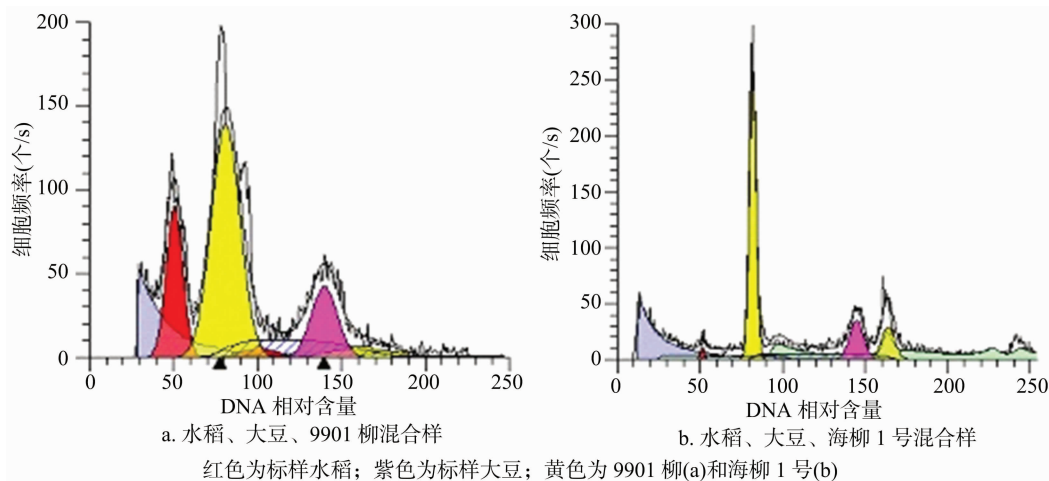


图4 旱柳品种 9901 柳、海柳 1 号与水稻、大豆混样预测基因组大小

状的数量性状座位分析以及全基因组测序有着重要意义,本研究利用流式细胞术以已知二倍体杞柳为对照,测定出旱柳 3 个品种海柳 1 号、9901 柳和沿江柳均为四倍体。

由于倍性的关系,使得柳树基因组大小差距较大,已知柳树基因组的大小在 342 ~ 841 Mb 之间,如三蕊柳(*Salix triandra*, 二倍体)的基因组大小为 386 Mb<sup>[18]</sup>,簸箕柳(*Salix suchowensis*, 二倍体)的基因组大小为 425 Mb<sup>[19]</sup>,垂柳(*Salix babylonica*)的基因组大小为 748 Mb<sup>[20]</sup>,白柳(*Salix alba*, 四倍体)的基因组大小为 807 Mb<sup>[18]</sup>。本研究中,笔者运用流式细胞术将旱柳 3 个品种(沿江柳、9901 柳、海柳 1 号)与基因组大小已知的水稻(基因组大小为 440 Mb)和大豆(基因组大小为 1 150 Mb)分别进行了对比测定,单液测定结果显示旱柳的基因组大小为 605.6 ~ 725.1 Mb,混合液测定结果显示的旱柳的基因组大小为 651.1 ~ 705.1 Mb。综合以上数据,推测旱柳的基因组大小应该在 670 Mb 左右。

#### 参考文献:

- [1] Argus G W. Infrageneric classification of *Salix* (Salicaceae) in the new world[J]. Systematic Botany Monographs, 1997, 52: 1 - 121.
- [2] Suda Y, Argus G W. Chromosome numbers of some North American *Salix*[J]. Brittonia, 1968, 20(3): 191 - 197.
- [3] Macalpine W J, Shield I F, Trybush S, et al. Overcoming barriers to crossing in willow (*Salix* spp.) breeding[J]. Aspects of Applied Biology, 2008(90): 173 - 180.
- [4] Zhang J, Yuan H W, Li M, et al. A high - density genetic map of tetraploid *Salix matsudana* using specific length amplified fragment sequencing (SLAF - seq)[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e157777.
- [5] Qiao G R, Zhang X G, Jiang J, et al. Comparative proteomic analysis of responses to salt stress in Chinese willow (*Salix matsudana* Koidz)[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(4): 814 - 827.
- [6] Gullberg U. Towards making willows pilot species for coppicing production[J]. The Forestry Chronicle, 1993, 69(6): 721 - 726.
- [7] Lindegaard K N, Barker J A. Breeding willows for biomass[J]. Aspects of Applied Biology, 1996, 49: 1 - 9.
- [8] Shu Y, Li K L, Song J F, et al. Single and competitive adsorption of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solution by activated carbon prepared with *Salix matsudana* Koidz[J]. Water Science and Technology, 2016, 74(12): 2751 - 2761.
- [9] Li M, Yu C M, Wang Y Y, et al. Cloning and characterisation of two H<sup>+</sup> translocating organic pyrophosphatase genes in *Salix* and their expression differences in two willow varieties with different salt tolerances[J]. Current Genomics, 2014, 15(5): 341 - 348.
- [10] Wang Y, Yuan H W, Li M, et al. Phenotypic and physiological responses of two willow varieties to salt stress[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2013, 61(1/2/3/4): 73 - 82.
- [11] Yang J L, Li K, Zheng W, et al. Characterization of early transcriptional responses to cadmium in the root and leaf of Cd - resistant *Salix matsudana* Koidz[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 705.
- [12] Rao G D, Sui J K, Zeng Y F, et al. De novo transcriptome and small RNA analysis of two Chinese willow cultivars reveals stress response genes in *Salix matsudana*[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109122.
- [13] Galbraith D W, Harkins K R, Maddox J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220(4601): 1049 - 1051.
- [14] Dansi A, Mignouna H D, Pillay M, et al. Ploidy variation in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis* - *Dioscorea rotundata* complex) from Cameroon as determined by flow cytometry[J]. Euphytica, 2001, 119(3): 301 - 307.
- [15] Roux N, Toloza A, Radecki Z, et al. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(5): 483 - 490.
- [16] 万建林, 翟虎渠, 万建民. 水稻基因组研究的现状和展望[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2002, 24(2): 213 - 219.
- [17] 张乐, 郭政阳, 陈曦, 等. 大豆基因组研究进展[J]. 科技致富向导, 2012(9): 103 - 131.
- [18] Thibault J. Nuclear DNA amount in pure species and hybrid willows (*Salix*): a flow cytometric investigation[J]. Canadian Journal of Botany, 1998, 76(1): 157 - 165.
- [19] Dai X G, Hu Q J, Cai Q L, et al. The willow genome and divergent evolution from poplar after the common genome duplication[J]. Cell Research, 2014, 24(10): 1274 - 1277.
- [20] Horjales M, Redondo N, Blanco A, et al. Cantidades de DNA nuclear en árboles y arbustos[J]. NCC: Nova Acta Científica Compostelana (Biología), 2003, 13: 23 - 33.