

## 用流式细胞仪鉴定中华猕猴桃的多倍体

朱道圩<sup>1,\*</sup>, 杨宵<sup>1</sup>, 鄧玉宝<sup>2</sup>, 易明林<sup>2</sup>, 理莎莎<sup>1</sup>, 符真珠<sup>3</sup>

<sup>1</sup>河南农业大学林学院园艺学院, 郑州450002; <sup>2</sup>河南省农业科学院, 郑州450002; <sup>3</sup>广西大学农学院, 南宁530005

### Identification of Polyploidy in *Actinidia chinensis* Planch. by Flow Cytometer

ZHU Dao-Yu<sup>1,\*</sup>, YANG Xiao<sup>1</sup>, ZHI Yu-Bao<sup>2</sup>, YI Ming-Lin<sup>2</sup>, LI Sha-Sha<sup>1</sup>, FU Zhen-Zhu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; <sup>2</sup>Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; <sup>3</sup>College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China

摘要: 中华猕猴桃叶中酚类物质多而黏性较大, 对流式细胞仪检测多有不便。文章参照已有方法, 改进细胞核提取液配方和提取方法, 建立了快速、准确鉴定秋水仙素诱导中华猕猴桃多倍体的方法, 效果较好。

关键词: 秋水仙素; 中华猕猴桃; 流式细胞仪; 倍性鉴定

流式细胞仪(flow cytometer, FCM)也称倍性分析仪(ploidy analyzer), 它集电子技术、计算机技术、激光技术、流体理论于一体, 是比较先进的检测仪器。它可定量地测定某一细胞中的DNA、RNA或某一特异蛋白的含量, 以及细胞群体中上述成分含量不同细胞的数量, 近年来得到越来越广泛的应用。特别在植物育种方面, 采用流式细胞仪可快速准确地鉴定各种植物的倍性, 从而提高育种工作效率(朱道圩等2006)。流式细胞仪鉴定植物倍性的原理为, 待测细胞制成的单细胞悬浮液经特异性荧光染料染色后加入样品管中, 在气体压力推动下进入流动室, 流动室内充满鞘液, 在鞘液的约束下, 被包绕成细胞液柱。这种同轴流动的设计, 使鞘液和样品流组成一个圆形的流束, 并与水平方向的激光光束垂直相交。根据样品流和鞘液有气压差的层流原理, 使细胞依次排列成单行, 每个细胞以均等时间依次通过测量区, 经荧光染料染色的细胞受到激光照射后即发出荧光, 由于DNA含量与荧光信号强度成正比关系, 细胞发出的荧光信号强度可代表所测细胞核内的DNA含量, 因而可用于植物倍性鉴定。但流式细胞仪对细胞内黏性过高的样品测定效果较差。这些黏性物质分布在细胞质中, 细胞质紧密地和细胞核粘在一起, 分离的细胞核纯度会受到影响, 还会加速细胞核老化, 增加样品黏度, 阻碍流式细胞仪中鞘液流动, 以致不能准确地检测出待测样品的倍性。而中华猕猴桃叶中含有大量酚类物质, 黏性较大, 给流式细胞仪的检

测工作带来诸多困难。为此, 本文参照前人的方法(李赞等1998a, b; 张俊娥等2003; 马爱红等2005; 陈绪中和罗正荣2005; Lee和Lin2005), 改进了细胞核提取液配方和提取方法, 建立了一种快速、准确和高效鉴定秋水仙素诱导中华猕猴桃多倍体的方法。

### 材料与amp;方法

#### 1 材料

选取整齐一致的中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)的萌发种子, 接入加有0.5%二甲基亚砷和不同浓度的秋水仙碱的MS培养基中培养。秋水仙碱浓度分别为0(对照)、10、20、40、60、80和100 mg·L<sup>-1</sup>, 分别培养3 d后再接入不加任何生长调节物质的MS培养基中。培养1个月后, 转入MS+0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1 mg·L<sup>-1</sup> ZT的培养基(朱道圩1997)中, 不仅产生愈伤组织, 而且还分化出不定芽苗, 可用于流式细胞仪的检测。

#### 2 方法

取约0.2 g的不定芽苗顶部叶为多倍体检测材料。采用BD FACS Calibur流式细胞仪进行倍性鉴定。检测工作在河南省农业科学院河南省农作

收稿 2007-06-13 修定 2007-08-27

资助 河南农业大学重点学科建设基金(10466-S090201)。

\* E-mail: zhudaoyu@yahoo.com; Tel: 0371-63555837

物新品种重点实验室进行。为了防止中华猕猴桃叶中酚类和黏性物质的干扰,在前人工作基础上,修改和优化了细胞核提取液配方和提取方法。操作流程如下。

(1)缓冲液的配制。 $MgSO_4$ 缓冲液的组成为:  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} MgSO_4\cdot 7H_2O + 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} KCl + 5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} HEPES$  ( $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} HEPES$ : 将  $23.8\text{ g}$  HEPES 溶于约  $90\text{ mL}$  的水中,用  $NaOH$  调至  $pH\ 8.0$ ,然后用水定容至  $100\text{ mL}$ ) +  $0.25\% (V/V)$  Triton X-100。

(2)提取液的配制。提取液 A:  $MgSO_4$  缓冲液中附加  $1\% (W/V)$  聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-30,贮藏于  $4^\circ\text{C}$  中备用;提取液 B:  $MgSO_4$  缓冲液附加  $0.40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  碘化丙锭(propidium iodide, PI)和  $0.04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNase (DNase-free),现配现用。

制备无 DNA 酶的 RNA 酶时,将 RNA 酶 A 溶于  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl ( $pH\ 7.5$ )、 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 中,配成  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液,于  $100^\circ\text{C}$  中加热  $15\text{ min}$ ,缓慢冷却至室温后分成小份,保存于  $-20^\circ\text{C}$  中。

(3)取中华猕猴桃叶片加入  $1\text{ mL}$  0 的提取液 A 中,在培养皿里用锋利的刀片快速将其切碎,以二倍体中华猕猴桃或六倍体的美味猕猴桃叶片作对照。

(4)溶液用  $30\ \mu\text{m}$  尼龙网过滤至  $1.5\text{ mL}$  离心管中,以  $180\times g$  的转速离心  $5\text{ min}$ ,弃去上清液至  $0.1$  刻度处。

(5)加入  $500\ \mu\text{L}$  提取液 B,此时避光适温保存。

(6)荧光染色液染色  $5\sim 15\text{ min}$ ,并充分混匀。

(7)进行流式细胞仪检测并通过与之连接的电

脑软件 BD FACS Calibur Software Package 分析检测结果、绘制成图。

上述为一步离心法。两步离心法为:在做完步骤(4)后,再加入  $1\text{ mL}$  提取液 A 于沉淀中,充分混匀,以  $180\times g$  的转速离心  $5\text{ min}$ ,弃去上清液至  $0.1$  刻度处,以后的操作步骤与一步法相同。

## 实验结果

### 1 黏性物质含量不同的植物出峰效果的比较

一般提取液中不加 PVP,对黏性较小的大花高代(*Godetia grandiflora*)来说,不加 PVP 也能很好地出峰(图 1)。而中华猕猴桃叶中含有大量酚类物质,黏性较大,不加 PVP 的出峰效果很差,且容易堵塞机器。由图 1 可知,提取液不加 PVP 的中华猕猴桃叶中 DNA 含量分布不能正确显示出来,在荧光通道值为  $200$  和  $400$  处都没有明显的尖峰出现,但杂峰则很明显。而大花高代叶中 DNA 在荧光通道值  $200$  处有一条很明显的尖峰。

### 2 一步离心法与两步离心法的检测结果比较

由图 2 可知,一步离心法由于细胞碎片过多,杂峰明显,影响检测结果;两步法在荧光通道值  $200$  处有一条很明显的  $G_1$  (DNA 合成前间期, DNA 尚未加倍)细胞尖峰,在荧光通道值  $400$  处  $G_2$  (DNA 合成后间期, DNA 已加倍)细胞的小峰明显。据此认为两步离心法比一步离心法的结果更清晰,且不容易阻塞机器。

### 3 不同倍性植物的检测结果比较

由图 3 可以看出,3 种植物的荧光通道值不同。二倍体中华猕猴桃在荧光通道值  $200$  处,六

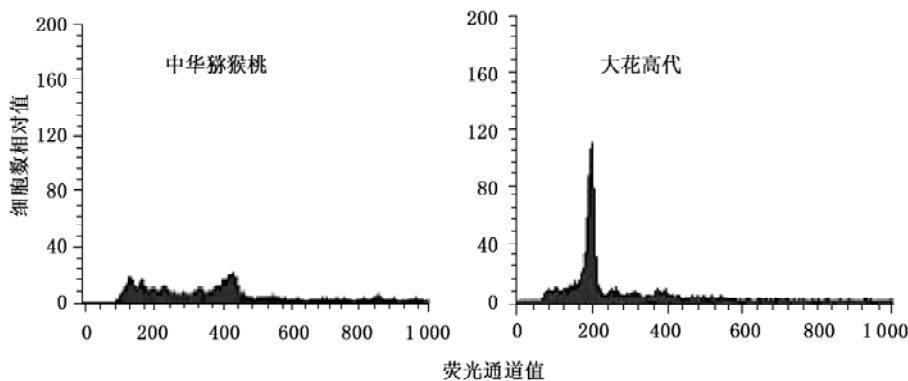


图 1 黏性物质含量不同的植物出峰效果的比较  
中华猕猴桃叶片经过  $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  秋水仙素处理,大花高代则没有处理。

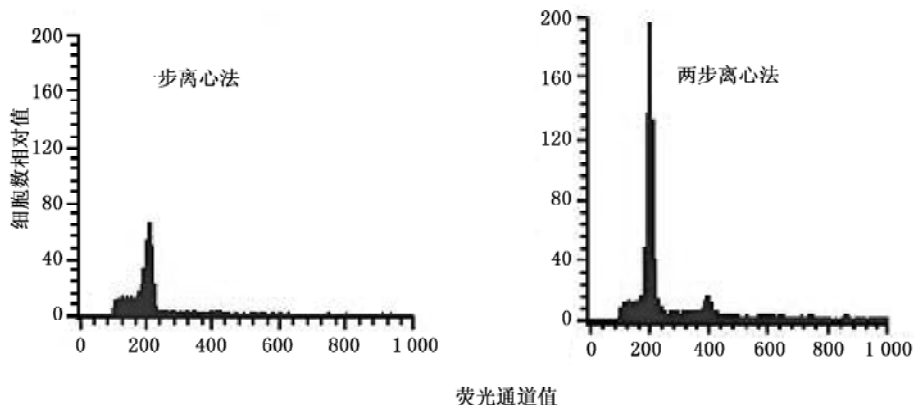


图2 二倍体中华猕猴桃叶中的DNA含量分布

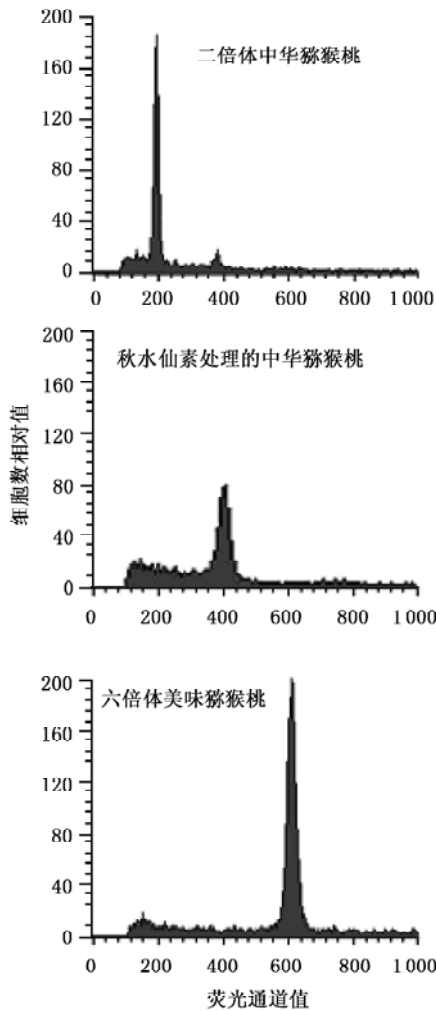


图3 不同倍性植物检测结果的比较

倍体美味猕猴桃在荧光通道值 600 处和经 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  秋水仙素处理的中华猕猴桃在荧光通道值 400 处各有一个尖峰, 说明秋水仙素处理的中华

猕猴桃为四倍体。

#### 4 加倍植物的倍性鉴定

采用上述改良的实验配方, 用流式细胞仪检测所有经过秋水仙素处理得到的中华猕猴桃(各个处理均为 20~30 棵植株)倍性的结果(图4)表明, 秋水仙素的诱变效果因浓度不同而异。在一定范围内, 加倍率随着秋水仙碱浓度的增加而增加, 超过 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 加倍率下降。本文的最适浓度为 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 加倍率可达 76%。

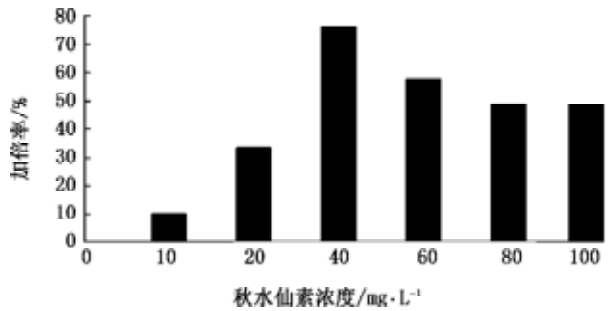


图4 不同浓度秋水仙碱诱导中华猕猴桃的加倍率

### 讨 论

流式细胞仪的最大特点是可以自动快速地测定同一个细胞的多种相关参数, 并同时可以获得细胞的2种散射光强以及3种不同波长荧光强度的信息。这些信息可以代表细胞或细胞器的各种形态参数、生物学特性、生化成分以及细胞功能, 因而可用于多种用途的检测工作, 近年来得到越来越广泛的应用(李琳等 1996; 中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会 1999)。

流式细胞仪对细胞内黏性过高的样品检测效果较差。此前,我们曾用流式细胞仪做过豌豆、红薯、辣椒、花生、大花高代等作物的倍性检测,由于这些植物含有的黏性物质较少,在不加PVP的情况下都能很好地出峰,其中豌豆(资料未列出)和大花高代的效果最佳(图1)。而中华猕猴桃叶中含有大量酚类物质,黏性较大,不加PVP时的出峰效果很差,且容易堵塞机器(图1)。为此,我们对已有方法进行了改进。主要改进之处为:(1)加入PVP;(2)去掉常用方法的配方中常用的巯基乙醇,改进配方的效果很好;(3)常用方法的配方中在提取液A和B中均加入Trion X-100,改进的配方只加在 $MgSO_4$ 缓冲液中,且不必分别加入,步骤简化了许多;(4)改变碘化丙锭和RNA酶的用量,效果良好;(5)一步离心法改为二步离心法,对粘性物质含量较大的植物的效果更好。

流式细胞仪鉴定植物倍性的可靠性已得到众多实验的证实,本文用流式细胞仪鉴定出的四倍体中华猕猴桃与二倍体中华猕猴桃的差异很明显,可从以下两方面得到证明。(1)从形态学来说,鉴定出的四倍体植株比二倍体植株的叶片显著增大、增厚,叶色加深,叶缘缺刻明显,叶毛长而多,植株健壮,生长势强。(2)四倍体植株的叶片保卫细胞长度和宽度均显著大于二倍体的。前者的保

卫细胞大小为 $42.45\ \mu m \times 26.16\ \mu m$ ,长宽比为1.62;后者为 $24.86\ \mu m \times 14.78\ \mu m$ ,长宽比为1.68,叶片气孔的密度较大,为四倍体的1.94倍。总之,流式细胞仪鉴定的四倍体植物符合多倍体的特征,结果准确可靠。

### 参考文献

- 陈绪中, 罗正荣(2005). 鄂柿1号离体叶片秋水仙素诱导和再生植株倍性鉴定. 果树学报, 22 (5): 554~556
- 李琳, 陈思学, 焦新之, 张利华(1996). 流式细胞术在植物细胞学研究中的应用. 植物生理学通讯, 32 (6): 441~443
- 李赞, 束怀瑞, 石荫坪, 王强生(1998a). 流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究. 西北农业大学学报, 26 (4): 45~48
- 李赞, 石荫坪, 束怀瑞, 王强生(1998b). 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究. 西北植物学报, 18 (4): 499~503
- 马爱红, 范培格, 孙建设, 李绍华(2005). 四倍体葡萄诱导技术的研究. 中国农业科学, 38 (8): 1645~1651
- 张俊娥, 刘继红, 邓秀新(2003). 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异. 遗传学报, 30 (2): 169~174
- 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会(1999). 现代植物生理学试验指南. 北京: 科学出版社, 17~22
- 朱道圩(1997). 软枣猕猴桃叶片愈伤组织分化再生植株. 植物生理学通讯, 33 (2): 127~128
- 朱道圩, 杨宵, 理莎莎, 符真珠, 毛俊(2006). 流式细胞仪在果树作物倍性鉴定上的应用. 安徽农业科学, 34 (24): 6480~6482
- Lee HC, Lin TY (2005). Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue by use of a filtration column. Plant Mol Biol Rep, 23: 53~58