

## 大麦游离小孢子的活力与耐盐性

刘成洪<sup>1,2,\*</sup>, 何婷<sup>1,2,\*</sup>, 王亦菲<sup>1,2,\*\*</sup>, 郭桂梅<sup>1,2</sup>, 高润红<sup>1,2</sup>, 徐红卫<sup>1,2</sup>, 陈志伟<sup>1,2</sup>, 杨沙沙<sup>1,2,3</sup>, 黄亦辰<sup>1,2,3</sup>, 陆瑞菊<sup>1,2</sup>, 黄剑华<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106; <sup>2</sup>上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106; <sup>3</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306

**摘要:** 取田间种植的大麦品种‘花30’幼穗游离小孢子, 采用荧光素二醋酸酯(FDA)染色法测定其在不同NaCl浓度胁迫下的活力, 用Image-Pro Plus软件对显微系统拍摄的照片进行分析计数, 研究了大麦离体小孢子对盐胁迫的耐受性。结果表明: 利用FDA染色结合软件显微拍照系统分析可以快速、准确地测定和分析游离小孢子的活力和大小。对本年度大田种植的大麦‘花30’材料, 按照成熟方法游离小孢子, 获得40%具有活力的小孢子, 游离小孢子在含1% NaCl提取液中至少2 h内活力保持稳定。

**关键词:** 大麦; 游离小孢子; 细胞活力; 盐胁迫

## Viability and Salt Tolerance of Isolated Microspores from Barley (*Hordeum vulgare*)

LIU Cheng-Hong<sup>1,2,\*</sup>, HE Ting<sup>1,2,\*</sup>, WANG Yi-Fei<sup>1,2,\*\*</sup>, GUO Gui-Mei<sup>1,2</sup>, GAO Run-Hong<sup>1,2</sup>, XU Hong-Wei<sup>1,2</sup>, CHEN Zhi-Wei<sup>1,2</sup>, YANG Sha-Sha<sup>1,2,3</sup>, HUANG Yi-Chen<sup>1,2,3</sup>, LU Rui-Ju<sup>1,2</sup>, HUANG Jian-Hua<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; <sup>2</sup>Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China; <sup>3</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** The young spikes of barley (*Hordeum vulgare*) cultivar ‘Hua-30’ grown in field were used to isolate microspores, and cell viability of isolated microspores was measured under salt stress at different NaCl concentrations by the fluorescein diacetate (FDA) staining method. The salt tolerance of isolated microspores was evaluated based on the viability analysis by the software of Image-Pro Plus to capture the microscope pictures and count the cells. The results showed that it was convenient to analyze the microspore viability and size by cell staining with FDA and cell identification with the software. About 40% viable microspores could be achieved from barley cv. ‘Hua-30’ grown in field by established isolation procedures, and the isolated microspores were viable in the extraction buffer containing 1% NaCl for at least 2 h after isolation.

**Key words:** barley (*Hordeum vulgare*); isolated microspores; cell viability; salt stress

小孢子是植物的花粉母细胞经减数分裂形成的四分体释放出来的单倍体细胞(Bedinger 1992), 它是花粉发育的早期细胞, 在离体胁迫条件下可以转向雄配子体单性生殖, 经胚胎发育过程形成完整植株(Touraev 1997)。小孢子离体培养技术是近年来发展起来的一种非常重要的单倍体育种技术手段(Germanà 2011; Ferrie和Caswell 2011), 同时也为植物胚胎发育、胁迫响应和信号途径等研究提供了一个理想的实验系统(Maraschin等2005; 黄剑华2007; 赵建平和姚祥坦2009)。

小孢子是一类特殊的生殖细胞, 对外界胁迫刺激敏感, 因此小孢子适宜用于诱变与胁迫筛选

(顾宏辉等2003; 黄剑华2007)。小孢子培养体系用来进行大规模的胁迫筛选, 不仅可以方便应用统一的胁迫条件, 而且能对隐性性状进行筛选, 筛选后的性状通过染色体加倍得到快速纯合而稳定下来(陆瑞菊等2014)。

盐胁迫是目前世界范围内作物生长所面临的一类主要的非生物胁迫, 对农业生产往往造成严

收稿 2014-10-15 修定 2014-12-01

资助 大麦青稞产业技术体系(CARS-05)和上海市农业科学院学科建设专项(LY11)。

\* 共同第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: cs1@saas.sh.cn; Tel: 021-62200524)。

重威胁,使作物减产,带来巨大经济损失(Joseph和Jini 2010; Ladeiro 2012)。培育耐盐性强的作物品种将是提高作物耐盐性的一个可行措施(Yamaguchi和Blumwald 2005),目前,耐盐材料的筛选主要集中在植株水平,一些研究报道体细胞和愈伤组织筛选获得的耐盐性能够稳定地遗传到再生植株(Locy等1996; Ochatt等1999; Rai等2011)。前期的研究也表明,小孢子水平的耐盐性和植株水平的耐盐性存在相关性(陆瑞菊等2011),但利用小孢子培养体系进行耐盐性评价的报道还不多见。在棉花中,利用花粉粒液滴培养证实花粉耐盐性与植株耐盐性显著相关(沈法富等1997),在大麦中观察到耐盐材料的小孢子存活率下降幅度比盐敏感材料下降幅度小(孙月芳等2007)。花粉粒液滴培养萌发实验需要优化培养基和培养条件,技术上有一定难度,而直接对花粉粒细胞进行短时间游离,观察其稳定性和活力,可以快速对花粉的活力进行评价。荧光素二醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA)染色法已被广泛用于花粉、悬浮培养细胞和原生质体活力的测定(胡适宜1993)。FDA染色法需要对整个视野内的绿色荧光数目进行快速计数,反应时间不能太长,否则会不稳定(左丹丹等2007),对花粉粒细胞数目进行准确计数耗时、耗力,比较困难(常胜合等2009)。本文介绍一种利用Image-Pro Plus软件结合显微拍照系统对大麦游离小孢子进行快速识别和计数的方法,利用该方法对大麦游离小孢子的活力和耐盐性进行了初步评价。

## 材料与amp;方法

### 1 植物材料

2013~2014年,将大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种‘花30’种植于上海市农科院南门试验田,次年4~5月取材并游离小孢子。

### 2 方法

#### 2.1 小孢子游离

从大田选取中部小花(小孢子发育处于单核早期和中期)的幼穗。新鲜取材幼穗一部分直接游离小孢子,另一部分置于封闭容器内保湿存放于4℃度冰箱,低温预处理2周。接种前用饱和的漂白粉溶液消毒15 min,无菌水冲洗3~4次。每个试管接10个穗子的花药,倒入15 mL提取液(含6%甘

露醇、1.1 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>和0.976 g·L<sup>-1</sup> 2-*N*-吗啡啉乙磺酸),用高速分散器超速旋切,用150目筛网过滤,滤液以100×*g*离心5 min,重复3次,收集小孢子。

#### 2.2 离体小孢子盐胁迫处理

将新鲜游离的小孢子重悬于上述提取液中,每个培养皿加入3 mL小孢子重悬液,加入150 μL不同浓度的NaCl溶液,使离体小孢子重悬液中的NaCl浓度分别为0.1%、0.5%和1% (对幼穗低温预处理2周后获得的小孢子,将盐胁迫浓度提高到2%,去掉0.1%处理);以加入超纯水为空白对照。每个处理设置3个重复。

#### 2.3 FDA染色

将FDA母液(5 mg·mL<sup>-1</sup>丙酮溶液)用上述提取液稀释为4 μg·mL<sup>-1</sup>工作液。取10 μL小孢子悬浮液于载玻片上,加入等量的FDA工作液,混匀后于室温黑暗下放置10 min,盖上盖玻片,置于倒置荧光显微镜(Olympus IX71)下观察。采用Image-Pro Plus 6.0同时拍摄明场和荧光照片(目镜10×,物镜10×),保存照片。每个重复选择不同方向的5个视野进行拍摄。

#### 2.4 细胞活力计数

对所拍摄的明场与荧光照片,利用Image-Pro Plus软件分析小孢子细胞大小及荧光亮度等参数,获得合适的参数后设置过滤参数范围,对照片中的细胞进行计数,然后利用软件自带的“宏录制”功能通过上述计数过程分析所有照片。

#### 2.5 数据处理

计算细胞活力=(发绿色荧光的细胞数/观察到的所有细胞数)×%,每个处理3个生物学重复,共计15个测定值的平均值。采用Microsoft Office Excel 2007和DPS 7.05软件对数据进行处理与统计分析。

## 实验结果

### 1 Image-Pro Plus软件对大麦小孢子细胞计数和大小分析

Image-Pro Plus软件可自动识别所获得的小孢子显微照片中的目标(图1-A),但也出现一些背景杂质。在4个与大小相关的参数中,选择“Area”(面积)参数对显微照片中小孢子细胞的识别最为简单有效,识别率达99%以上,可以有效地从明场拍照照片中去除背景杂质,识别小孢子并进行计数(图

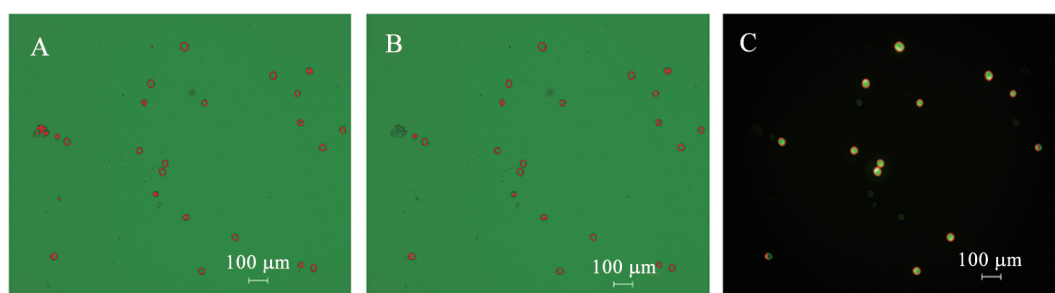


图1 明场照片中小孢子个体的识别计数(A和B)和荧光照片中活力小孢子的识别计数(C)

Fig.1 Identification and counting of isolated microspores in the photos taken in bright field (A and B) and fluorescence (C)

1-B)。对于荧光下拍摄的照片,选择“Automatic Bright Objects”(自动识别明亮物体)可以识别发荧光的活细胞(图1-C),同时添加“Area”(下限值 $100 \mu\text{m}^2$ )以去除个别亮点,添加参数“Density/Green”(光密度/绿色,下限值50)去除残留微弱荧光信号的死细胞。参数设置好后,使用软件的“Record Macro”(宏录制)功能设定操作步骤,对图片进行快捷地批量统计分析。

分析明场15幅照片共1 020个大麦新鲜游离的小孢子细胞,测定其面积、周长、长和宽,结果表明,小孢子的大小差异较大,细胞直径为 $12.3\sim 42.0 \mu\text{m}$ (表1),这可能与小孢子个体发育处于不同时期有关。另外,由表1可见,对于目标小孢子的细胞识别,可将“Area”参数范围设定为 $160\sim 1 180 \mu\text{m}^2$ 。值得一提的是,由于荧光成像影响,由荧光下拍摄的照片测得的小孢子大小比实际的要明显偏大。

表1 大麦新鲜游离小孢子的大小

Table 1 Size of freshly isolated barley microspores

参数	面积/ $\mu\text{m}^2$	周长/ $\mu\text{m}$	长/ $\mu\text{m}$	宽/ $\mu\text{m}$
最小值	160.7	54.3	16.7	12.3
最大值	1 178.3	233.0	42.0	38.0
平均值	500.5	116.8	29.6	24.7
变异系数	36.0%	24.7%	13.8%	17.9%

## 2 新鲜取材的幼穗游离小孢子活力与耐盐性

取大田种植的大麦‘花30’幼穗,不经低温预处理直接游离小孢子并检测其活力与耐盐性,结果表明,新鲜游离的小孢子平均活力为41.3%;离体小孢子经不同浓度(最高浓度为1%)的NaCl溶液处理2 h后活力稳定,处理4 h后活力略有下降但无显著差异,处理6 h后活力显著下降(图2)。

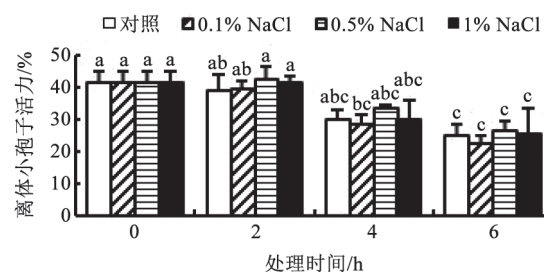


图2 新鲜取材的幼穗游离小孢子经不同浓度NaCl处理后的细胞活力

Fig.2 Cell viability of microspores isolated from freshly-collected young spikes and treated with different concentrations of NaCl  
不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ); 图3同此。

## 3 经低温预处理的幼穗游离小孢子活力与耐盐性

大田种植的‘花30’穗子经低温预处理2周,新鲜游离的小孢子平均活力为32.5%,2 h内活力稳定;0.5%和1%的NaCl处理2 h后离体小孢子活力略有下降,与对照相比差异不显著;将NaCl的浓度提高至2%时,与对照相比小孢子活力出现显著下降,说明2%的NaCl浓度已经对离体小孢子的活力造成严重伤害(图3)。

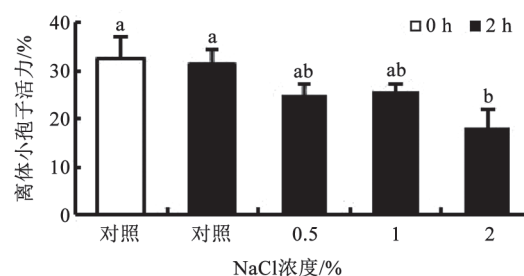


图3 不同浓度NaCl对经低温预处理的幼穗游离小孢子细胞活力的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of NaCl on cell viability of microspores isolated from cold-pretreated young spikes

## 讨 论

由于大田环境复杂,目前进行小孢子培养的供体材料多采用温室种植来提供稳定一致的生长条件(Ferrie和Caswell 2011)。大田种植可以在当季获得大量的小孢子培养供体材料,在很大程度上降低了生产成本。在实际育种中,需要获得大量小孢子再生植株进行种植与筛选,而小孢子培养往往会受到育种材料基因型的限制,小孢子脱分化和再分化频率不高,解决方法一方面是优化培养方法,另一方面也需要扩大供体植株的取材数目。然而,大田种植大麦材料的小孢子活力并不高,本研究中新鲜取材的幼穗游离小孢子平均活力仅为40%左右,早期的研究中大田种植的大麦‘花30’游离小孢子活力最高为48.7%,而其他几个大田种植大麦材料‘S22’、‘沪麦8号’和PDJ游离小孢子的最高活力分别为55.3%、36.2%和43.7%(陆瑞菊等2001)。因此,除加强田间种植管理以增强供体植株生活力外,还应优化小孢子游离程序,从而获得尽可能多有活力的小孢子(陆瑞菊等2001)。本研究为了减少纯化步骤对小孢子的损伤,观察离体小孢子对盐胁迫的敏感性,未对小孢子作纯化处理以提高其活力。

作为单倍体细胞,离体小孢子对外界环境更为敏感,只有具有一定群体数量稳定活力的小孢子,才有可能通过离体培养形成胚,最终形成完整植株。因此,在提取与分离中,需要最大可能保持小孢子的活力。我们通过长期摸索,建立了一套高效的大麦小孢子离体培养程序,从本研究结果可以看出,小孢子游离程序能很好地保持离体小孢子的活力,并且在离体环境2 h内表现稳定,适宜于小孢子的培养操作。

大麦‘花30’本身对盐分胁迫相对比较敏感,游离小孢子在培养中添加1% NaCl会严重影响胚性愈伤组织的形成(陆瑞菊等2011)。为了从小孢子水平研究供试材料对盐胁迫的耐受性,本研究利用FDA染色法测定小孢子活力,建立了图像软件对小孢子识别的参数条件,可以比较方便地对离体小孢子进行快速计数与大小分析。结果表明,大麦‘花30’的离体小孢子在含1% NaCl的提取液中可以稳定存活至少2 h,对供体材料幼穗的低温处理会在一定程度上降低游离小孢子的活力,同时对盐胁迫的耐受性上略有降低(无显著差异)。本研究为利用小孢子体系开展胁迫耐受性评价和响

应机制的研究奠定了基础。

## 参考文献

- 常胜合,陈彦惠,苏明杰,秦广雍(2009). 鉴定玉米花粉活力4种方法的比较. 安徽农业科学, 37 (30): 14562~14563, 14620
- 顾宏辉,张冬青,张国庆,周伟军(2003). 油菜离体小孢子诱变育种研究进展. 浙江农业学报, 15 (5): 318~322
- 胡适宜(1993). 植物胚胎学实验方法. (一)花粉生活力的测定. 植物学通报, 10 (2): 60~62
- 黄剑华(2007). 小孢子和花药培养技术在作物定向遗传改良上的应用. 作物研究, (3): 167~169
- 陆瑞菊,陈志伟,何婷,王亦菲,杜志钊,高润红,邹磊,黄剑华,陈佩度(2011). 两份大麦品种单倍体细胞与植株水平耐盐性的关系. 核农学报, 25 (2): 226~230
- 陆瑞菊,黄剑华,孙月芳,王亦菲,周润梅(2001). 秋水仙碱对大麦离体培养小孢子存活与成苗的影响. 植物生理学报, 27 (2): 135~140
- 陆瑞菊,刘成洪,何婷,陈志伟,徐红卫,杜志钊,高润红,王亦菲,邹磊,郭桂梅等(2014). 源于大麦小孢子诱变-氮胁迫培养的DH株系田间耐低氮性表现. 核农学报, 28 (3): 412~417
- 沈法富,尹承侑,于元杰,刘凤珍,程立(1997). 棉花植株和花粉耐盐性的鉴定. 作物学报, 23 (5): 620~625
- 孙月芳,陆瑞菊,王亦菲,单丽丽,黄剑华(2007). 不同基因型大麦离体培养的花药及小孢子对低温和NaCl预处理的反应. 中国农学通报, 23 (4): 46~48
- 赵建平,姚祥坦(2009). 植物小孢子胚胎发生机理. 生物技术通报, (6): 7~11
- 左丹丹,明军,刘春,王丽娜(2007). 植物花粉生活力检测技术进展. 安徽农业科学, 35 (16): 4742~4745
- Bedinger P (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, 4: 879~887
- Ferrie AMR, Caswell KL (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss Org*, 104 (3): 301~309
- Germanà MA (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30 (5): 839~857
- Joseph B, Jini D (2010). Salinity induced programmed cell death in plants: challenges and opportunities for salt-tolerant plants. *J Plant Sci*, 5: 376~390
- Ladeiro B (2012). Saline agriculture in the 21st century: using salt contaminated resources to cope food requirements. *J Bot*, 2012: doi: 10.1155/2012/310705
- Locy RD, Chang CC, Nielsen BL, Singh NK (1996). Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants. *Plant Physiol*, 110 (1): 321~328
- Maraschin SF, De Priester W, Spaink HP, Wang M (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot*, 56 (417): 1711~1726
- Ochatt SJ, Marconi PL, Radice S, Amozis PA, Caso OH (1999). *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell Tiss Org*, 55 (1): 1~8
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—an overview of the recent progress. *Environ Exp Bot*, 71 (1): 89~98
- Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci*, 2 (8): 297~302
- Yamaguchi T, Blumwald E (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci*, 10 (12): 615~620