

技术与方法 Techniques and Methods

大麦小孢子来源单倍体试管苗扩繁中的倍性检测

何婷^{1,2,*}, 郭桂梅^{1,2,*}, 陆瑞菊^{1,2}, 高润红^{1,2}, 陈志伟^{1,2}, 徐红卫^{1,2}, 李颖波^{1,2}, 黄剑华^{1,2}, 刘成洪^{1,2,**}, 王亦菲^{1,2,**}

¹上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106; ²上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106

摘要: 以大麦小孢子来源的单倍体试管苗扩繁再生植株为材料, 采用流式细胞术、气孔保卫细胞长度测定和根尖染色体计数三种方法对其倍性进行鉴定, 对大麦单倍体植株增殖继代中的倍性稳定性进行了研究。结果显示, 流式细胞术可对组织培养获得的试管苗做大批量倍性鉴定, 同时气孔保卫细胞长度测定可作为一个辅助检测手段, 两者对幼苗的损伤小、检测方便; 单倍体植株在离体扩繁继代5次后仍能保持单倍体倍性, 表明利用离体扩繁技术可以获得倍性稳定的单倍体再生植株群体。

关键词: 大麦; 单倍体; 组织培养; 倍性鉴定

Ploidy Determination of Plantlets Propagated from Barley Microspore Derived Haploids

HE Ting^{1,2,*}, GUO Gui-Mei^{1,2,*}, LU Rui-Ju^{1,2}, GAO Run-Hong^{1,2}, CHEN Zhi-Wei^{1,2}, XU Hong-Wei^{1,2}, LI Ying-Bo^{1,2}, HUANG Jian-Hua^{1,2}, LIU Cheng-Hong^{1,2,**}, WANG Yi-Fei^{1,2,**}

¹Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; ²Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: In order to determine the ploidy of plants propagated from barley microspore derived, three methods of ploidy identification were used such as the DNA flow cytometry, the length of stomatal guard cell and chromosome counting. The results showed that flow cytometry can be used as a quick identification method for the ploidy identification of a large number of seedlings in tissue culture, and the length of stomatal guard cell can be used as an auxiliary detection means, and both of two methods were easily used to detect the ploidy of plants and did not appear to influence the seedlings. The ploidy of haploids was stable after 5 generations *in vitro* propagation so that the method can be used in creating the stable haploid population.

Key words: barley; haploid; tissue culture; ploidy identification

单倍体具有普通二倍体无法比拟的一些优势, 只有一套染色体, 不存在等位基因的干扰, 易于诱发基因突变和外源基因的插入, 是非常有价值的遗传研究工具。单倍体水平上的突变或转基因经染色体加倍后可以获得纯合的加倍单倍体植株, 隐性基因控制的性状也可以在当代得到表现; 单倍体可以作为倍性操作的起始材料, 获得多倍体的种质资源; 单倍体(N)细胞融合杂交, 易于获得的杂交再生植株(2N)。单倍体的这些特点, 对于作物育种、遗传分析和基因功能研究具有重要意义(蒋苏等2004; 胡建斌等2007; 杜志钊等2010)。

在日常育种中, 小孢子来源再生植株缺乏早期倍性检测, 单倍体植株往往没有及时得到染色

体加倍处理, 最后因不能正常结实而死亡, 这部分单倍体植株的真正价值并未得到充分利用。因此, 对于小孢子培养获得的大量试管苗, 需要在幼苗早期建立一种快速倍性检测方法, 要求对幼苗损伤小、取材后仍可继续用于无菌培养。本实验主要采用流式细胞仪作为小孢子再生植株倍性鉴定

收稿 2015-09-21 修订 2015-11-16

资助 上海市种业发展项目[沪农科种字(2015)第3号]、上海市基础研究项目(14JC1405300)和大麦青稞产业技术体系(CARS-05)。

* 并列第一作者。

** 共同通讯作者(E-mail: chliu001@163.com, cs1@saas.sh.cn; Tel: 021-62202965)。

方法, 该方法近年来被运用在果树作物、多种蔬菜作物等倍性鉴定上, 对于花药、小孢子再生植株群体的各种倍性水平、多倍体诱导、杂交后代的倍性鉴定都取得了可靠、精确的结果(朱道圩等2006; 成妍等2011)。本文对大麦小孢子来源再生植株在初始筛选单倍体植株及继代后构建的单倍体群体中均采用此方法进行倍性鉴定, 并与早期的气孔保卫细胞长度、根尖染色体及成株后植株形态与花粉粒育性等方法相结合得到了统一、准确的鉴定结果。

利用组织培养技术对小孢子来源的单倍体植株进行离体扩繁, 可用于构建单倍体株系。单倍体株系构建的意义在于小孢子及其愈伤的单倍体特征存在时间短, 并且需要的技术难度高, 构建单倍体株系后可以长时间保存和利用, 为单倍体的遗传改良研究提供长期稳定的材料基础。前期我们已开展了大麦小孢子来源的单倍体植株离体培养和快速繁殖研究(何婷等2014b), 但外植体取自试管苗移栽鉴定后的单倍体植株分蘖节, 需要对外植体进行灭菌处理, 本文在此基础上开展早期试管苗的倍性进行检测, 直接利用单倍体试管无菌苗进行扩繁和倍性评估, 构建一个可以长期稳定利用的单倍体株系。

材料与方 法

1 材 料

大麦(*Hordeum vulgare* L.) ‘花30’小孢子来源单倍体植株, 经离体培养获得3个单倍体扩繁株系(编号35-1、54-5和58-7), 均为无菌试管苗。上述小孢子培养方法参考文献(陆瑞菊2012), 离体培养扩繁方法见文献(何婷等2014b)。

2 方 法

2.1 流式细胞仪检测倍性

剪取约1.5 cm长大麦幼叶置于1.5 mL EP管中, 经液氮速冻后用研磨棒轻轻捣碎; 加入0.5 mL LB-01buffer (Tris 15 mmol·L⁻¹, Na₂EDTA·2H₂O 2 mmol·L⁻¹, Spermine 0.5 mmol·L⁻¹, KCl 80 mmol·L⁻¹, NaCl 20 mmol·L⁻¹, Trixon X-100 0.1%), 0.2 mL PI/RNase staining buffer (BD#3179921), 迅速上下混匀组织液; 冰水混合物上避光静置20 min后用400目尼龙筛网(孔径37.5 μm)过滤, 收集滤液于新的

EP管中, 采用BD Accuri C6流式细胞仪进行倍性检测, 使用BD Accuri C6 Software软件进行分析。

2.2 气孔保卫细胞长度鉴定倍性

剪取约1~2 cm长大麦幼叶置于1.5 mL EP管中, 加入1 mL卡诺氏固定液[无水乙醇:乙酸=3:1 (V/V)], 浸泡24 h后至叶片完全褪色, 在蒸馏水中漂洗后置于显微镜观测(目镜10×, 物镜40×)。在视野内选取闭合的气孔保卫细胞为读数对象, 每片叶通过目镜测微尺读取5个气孔保卫细胞长度值取平均值, 界定标准为37 μm (何婷等2014a), 小于该数值植株倍性为单倍体。

2.3 根尖染色体镜检鉴定倍性

在上午8:30~9:00间剪取待鉴定植株的根尖处2 cm左右, 置于1.5 mL EP管中加入0.1%秋水仙碱溶液1 mL, 在13 °C人工培养箱处理3 h后取出, 在蒸馏水中洗涤3~5次置吸水纸上吸干水分放入新的EP管中, 添加1 mL卡诺氏固定液24 h后即可制作切片。采用醋酸洋红溶液为染色剂, 染色过程中可加热至溶液微沸增强染色效果, 然后在45%冰醋酸压片中观察染色体数目, 大麦单倍体根尖染色体条数 $n=7$ 。

2.4 单倍体植株继代培养与移栽

经鉴定为单倍体的植株从壮苗培养基转入基本培养基(1/2MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+矮壮素1.0 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂粉6.0 g·L⁻¹), 增殖与继代阶段均采用此培养基, 4~6周继代一次。继代5次后, 单倍体植株转入壮苗培养基(1/2MS+NAA 0.05 mg·L⁻¹+矮壮素3.0 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂粉6.0 g·L⁻¹), 采用上述三种方法再次检查各株系倍性。

壮苗培养4~6周后将生根的单倍体苗固定于塑料泡沫浮板, 置于5 L清水的周转箱内炼苗3 d, 更换Hoagland营养液2~3周后移栽至钵钵中生长, 观察单倍体试管苗移栽成株后花粉育性。

结果与讨论

1 大麦‘花30’小孢子再生植株的倍性鉴定

为构建单倍体株系, 我们用流式细胞仪、气孔保卫细胞长度、根尖染色体镜检三种方法从大麦‘花30’小孢子再生植株群体中筛选单倍体再生植株, 最终获得35-1、54-5、58-7三株单倍体植株。如图1所示, 三株材料流式细胞仪峰值均位于

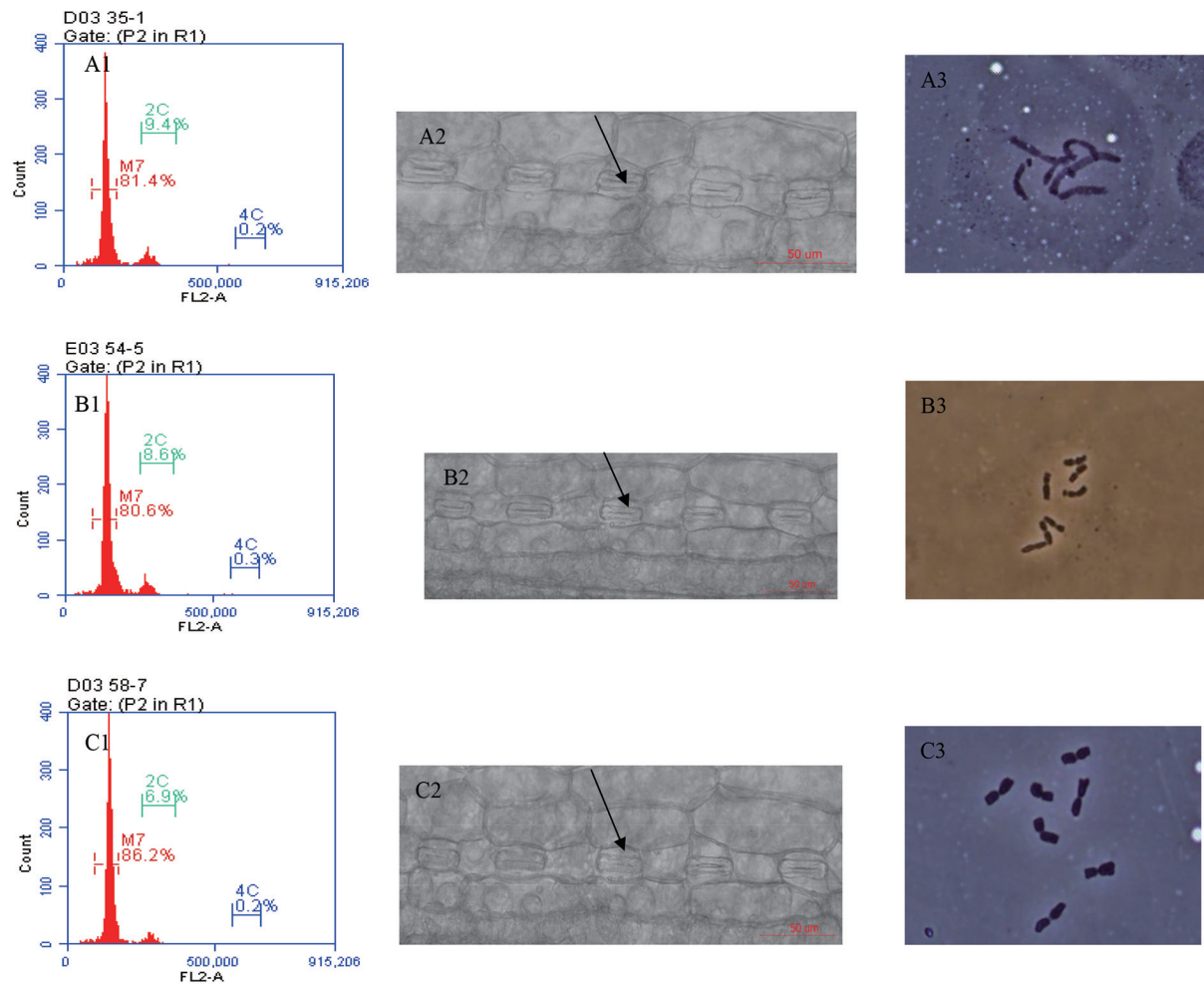


图1 大麦单倍体流式细胞仪、气孔保卫细胞长度、根尖染色体图片

Fig.1 Pictures of the DNA flow cytometry, the length of stomatal guard cell and chromosome counting of barley haploid
A1、B1、C1分别为材料35-1、54-5和58-7流式细胞仪图片; A2、B2、C2分别为材料35-1、54-5和58-7气孔保卫细胞长度照片; A3、B3、C3分别为材料35-1、54-5和58-7根尖染色体照片。

单倍体区域, 气孔保卫细胞长度平均值分别为29.9 μm、29.25 μm和32.25 μm, 均小于37 μm, 三株材料根尖染色体数 $n=7$ 。

经判定为单倍体的35-1、54-5、58-7转入增殖培养基, 4~6周继代一次, 继代5次后各单倍体株系均为100左右, 使用该方法构成35-1、54-5、58-7三株材料的单倍体株系。

2 继代后单倍体株系倍性的鉴定

2.1 不同株系继代后倍性的鉴定

35-1、54-5、58-7各继代5次, 随机各选取5株材料进行倍性鉴定, 鉴定方法使用流式细胞仪。如图2所示, 15株材料峰值均在单倍体区间, 鉴定材料

均为单倍体植株, 说明经多次继代所获得的株系倍性稳定、统一, 均保持初始材料的单倍体倍性。

2.2 不同继代次数对单倍体株系倍性的影响

对材料35-1继代3、5、7次, 各继代次数选取5株继代植株为鉴定倍性。鉴定结果(图3)显示, 所有材料均为单倍体, 表明继代次数不影响株系中植株的倍性, 使用该继代方法可获得倍性稳定统一的单倍体株系。

3 单倍体多次继代植株对流式细胞仪峰值偏移的影响

选取35-1继代5次材料5株, 每株3片叶, 观测不同叶片间流式细胞仪峰值的偏移情况。图4所

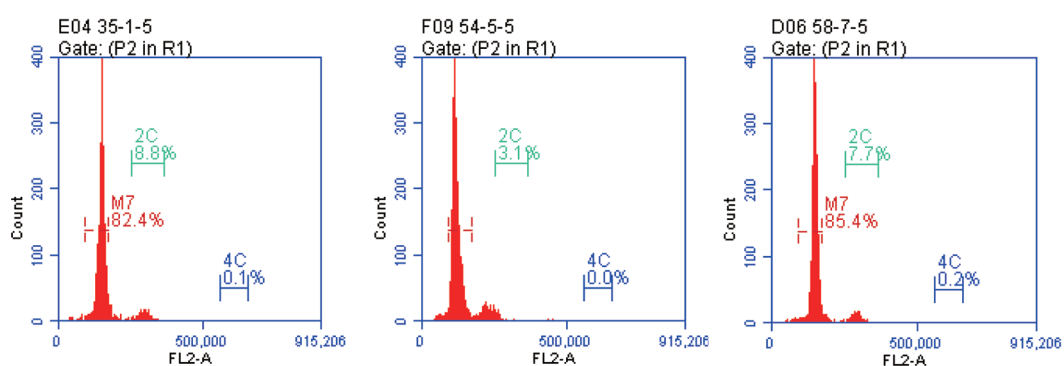


图2 35-1 (左)、54-5 (中)、58-7 (右)继代5次流式细胞仪鉴定图片

Fig.2 The DNA flow cytometry result of 35-1 (left), 54-5 (middle) and 58-7 (right) after 5 generations

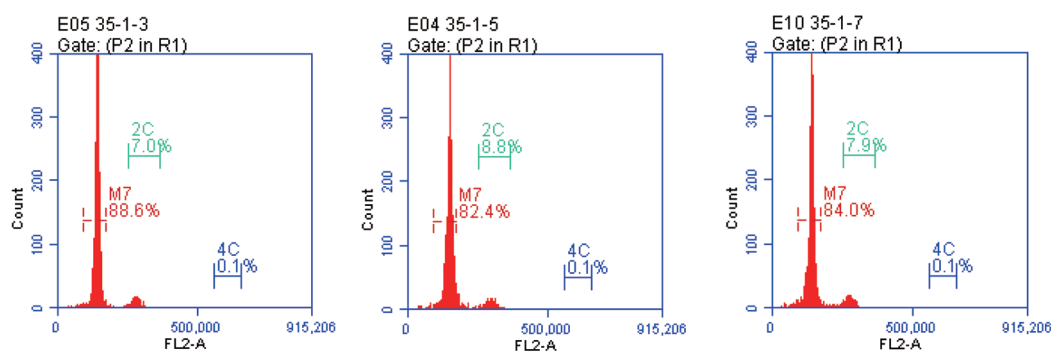


图3 35-1继代3 (左)、5 (中)、7 (右)次细胞流式仪鉴定结果

Fig.3 The DNA flow cytometry result of 35-1 after 3 (left), 5 (middle) and 7 (right) generations

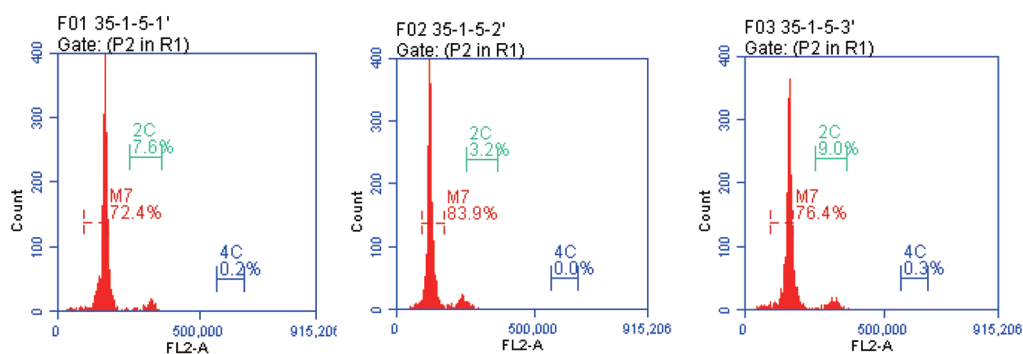


图4 35-1同一植株不同叶片细胞流式仪鉴定结果

Fig.4 The DNA flow cytometry result of different leaves with the same plant

示为同一植株的不同叶片流式细胞仪峰值位置, 可见即使是同一植株的不同叶片峰值位置也会有所不同。本实验所选5株材料均有此现象, 流式峰值位置偏移在不同株系、不同继代次数的植株也都有类似的情况出现。峰值位置的偏移虽没有影响对单倍体倍性的判定, 但引起偏移的原因上不

确定, 可能由于叶片经过液氮的处理或是小孢子再生植株本身的原因。

4 单倍体试管苗成株后花粉育性鉴定

选取15株35-1继代材料转入壮苗培养基, 4~6周后生根开始水培, 2~3周移栽至塑料桶继续生长, 进入花粉授粉阶段观测植株形态、子房及花药形

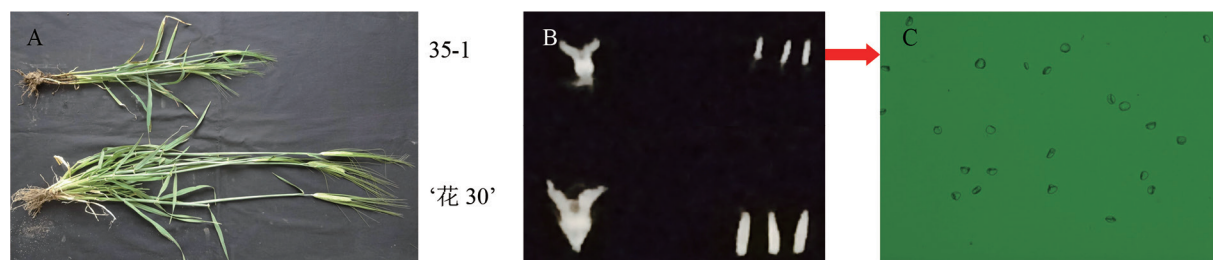


图5 单倍体与二倍体材料形态学比较

Fig.5 Comparison of morphological characteristics of haploid and double haploids

A: 单倍体与二倍体植株株高比较; B: 单倍体与二倍体材料子房及花药比较; C: 显微镜下单倍体材料花粉粒。

态、花粉粒形态。

和二倍体材料‘花30’相比,单倍体植株高度较正常二倍体植株矮小、细弱,子房、花药较二倍体子房、花药弱小,400倍显微镜下观察发现单倍体材料花粉粒形状畸形,没有观察到正常二倍体圆形或椭圆形花粉粒,用KI染色没有蓝色淀粉颗粒,这表明单倍体材料花粉败育。

流式细胞仪测定法已经被多次应用于鉴定花培再生苗的倍性鉴定而且准确、可靠(韩阳等2006;陈斌等2007;耿小丽等2010;米哲等2011),本实验在单倍体再生植株早期进行鉴定,叶片量少不损伤植株,每叶片细胞核检测数量2 000~3 000个,与气孔保卫细胞长度鉴定再生植株倍性的方法相比较,后者每片叶测量5个气孔保卫细胞长度取平均值检测数量多、检测结果更全面,后者可用于流式细胞仪测定结果有偏移时进一步验证。根尖染色体计数方法准确、可靠,但对根尖生长状况要求较高,而早期再生植株根部生长较弱往往无法取得合适的根尖,根尖染色体观察需要较高的细胞学操作技术,再生植株数量众多时难以一一鉴定,更适合作为流式细胞仪或气孔保卫细胞长度鉴定后的验证手段。

本实验中采取液氮研磨叶片的方法与刀片破碎有所不同,液氮冷冻叶片后再将其研磨至碎片能大大提高研磨速度,可以大幅度增加倍性鉴定的植株数量,但在研磨过程中需注意叶片充分破碎与细胞核完整性之间的平衡,在实验操作中可能出现因过度研磨而导致散峰增加,从而影响判定的结果。

大麦小孢子高频再生技术可以获得约5%的单倍体植株,通过准确的倍性鉴定对已获得的单

倍体植株进行快速繁殖,进一步构建单倍体株系,这样获得的单倍体种质资源就能得到长期保存和利用。本文在前期研究基础上直接利用单倍体幼苗进行株系扩繁结合倍性鉴定,构建一个长期稳定利用的单倍体株系,同时计划在下一步的工作中,利用该株系开展单倍体原生质体制备和基因瞬间表达工作。

参考文献

- 陈斌,赵泓,耿三省,张宝玺,张月云,刘凡(2007). 辣椒花药培养再生植株群体染色体倍性构成的多样性. 华北农学报, 22 (1): 123~128
- 成妍,马蓉丽,焦彦生,吴海涛(2011). 流式细胞术在蔬菜倍性鉴定中的应用. 山西农业科学, 39 (8): 911~913, 921
- 杜志钊,陆瑞菊,黄剑华(2010). 以单倍体材料为转化受体的植物转基因研究进展. 核农学报, 24 (2): 302~306
- 耿小丽,魏臻武,姚喜红,赵艳(2010). 苜蓿花药培养再生植株染色体倍性检测研究. 草地学报, 18 (5): 714~718
- 韩阳,叶雪凌,冯辉(2006). 大白菜小孢子植株的倍性变异及倍性鉴定方法的研究. 中国蔬菜, 11: 9~11
- 何婷,郭桂梅,陈志伟,杜志钊,高润红,徐红卫,邹磊,朴姝明,黄亦辰,刘成洪(2014a). 大麦小孢子再生植株气孔保卫细胞长度与倍性的相关性. 麦类作物学报, 34 (2): 175~180
- 何婷,陆瑞菊,高润红,郭桂梅,黄亦辰,杨沙沙,陈志伟,徐红卫,李颖波,刘成洪,黄剑华(2014b). 大麦单倍体离体培养与快速繁殖. 植物生理学报, 50 (12): 1780~1784
- 胡建斌,李建吾,孙守如,孙治强(2014). 植物单倍体材料创制方法及其应用. 华北农学报, 35 (4): 135~137
- 蒋苏,陈彩艳,程祝宽,蔡润,翟文学,朱立煌(2004). 用花药愈伤组织作为转化受体的水稻转基因植物的分析. 遗传学报, 31 (12): 1381~1387
- 陆瑞菊(2012). 大麦游离小孢子培养技术的优化及单倍体耐盐、耐低氮胁迫筛选体系的建立[学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- 米哲,李云昌,梅德圣,李英德,徐育松,陈玉峰,胡琼(2011). 甘蓝型油菜小孢子培养影响因素研究及再生苗早期倍性鉴定. 华北农学报, 26 (5): 97~102
- 朱道圩,杨宵,理莎莎,符真珠(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