

流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究

李 赟¹ 束怀瑞¹ 石荫坪² 王强生²

(1 山东农业大学园艺系, 2 山东省果树研究所, 山东泰安 271018)

摘 要 利用流式细胞光度术对草莓 3 个二倍体、1 个五倍体、2 个八倍体试管苗的细胞核 DNA 的相对含量进行测定。结果表明, 随着倍性水平的增加, 细胞核 DNA 相对含量随之成倍增加, 说明可利用流式细胞光度术测定细胞核 DNA 含量来进行倍性鉴定; 利用这一技术对草莓几个杂交后代及诱变植株的倍性水平进行了鉴定, 发现一诱变植株存在两群核 DNA 相对含量相差近一倍的细胞, 初步认为这一诱变植株为倍性嵌合体, 该结果进一步证明这种方法的可靠性。

关键词 流式细胞光度术, 倍性, 草莓

分类号 S668. 403. 2

鉴定倍性的方法包括染色体计数的直接鉴定法和比较一些器官、组织或细胞特征(气孔大小、花粉粒大小等)的间接鉴定法。染色体计数鉴定倍性可靠性最高, 但操作复杂, 不易掌握, 鉴定速度慢, 而且, 当染色体数目太多时也可能造成误差。利用间接鉴定方法虽然简便易行, 但可靠性有时不高。因此, 研究快速、准确的鉴定倍性的方法具有重要的应用价值。80 年代后, 国外学者对玉米^[1~3]、番茄^[4]、木薯^[5]、向日葵^[6]等作物细胞核 DNA 含量进行过测定, 在果树上也已在李属^[7]、猕猴桃^[8]上作了一些报道。结果表明, 通过比较细胞核 DNA 含量的高低可以进行倍性鉴定。然而, 关于草莓的研究至今尚未见报道。草莓种质资源中倍性类型很多, 不同倍体间杂交是草莓品种选育经常采用的方法之一, 然而不同倍体间杂交后代植株的倍性水平复杂多样, 了解后代植株的倍性水平在草莓育种实践中非常必要。本研究利用流式细胞光度术对草莓不同倍性及其杂交后代试管苗细胞核 DNA 含量进行了测定, 并将这一技术用于草莓的倍性鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 试材类型

所用试材均由沈阳农业大学草莓种质资源圃提供。其中森林草莓、云南草莓和日本草莓为不同生态型的二倍体, 黑龙江 1 号、5 号和 6 号为五倍体, 哈尼和宝交为八倍体; 9-2-4 为宝交和森林草莓的杂交后代, 3-1-1 为哈尼和二倍体新疆草莓的杂交后代; L₂ 和 L₅ 均为哈尼与黑龙江 1 号杂交后代经自然授粉获得的种子植株; L₂₋₁、L₅₋₆ 和 L₃₋₁ 分别是 L₂、L₅ 和黑龙江 6 号自然授粉获得的种子, 用 200 μL/L 秋水仙素处理后萌发生长的诱变植株; 不同倍性植株均为同一个种 (*Fragaria vesca* L.)。

收稿日期 1998-01-12

课题来源 山东省自然科学基金资助项目

作者简介 李赟, 男, 1967 年生, 讲师, 博士。现在青岛海洋大学工作, 266003

1.2 处理方法

细胞核悬液制备 称取 500~ 100 mg 试管苗嫩茎及幼叶,在滴有 2 mL提取缓冲液的培养皿中研碎,260目尼龙网过滤,离心(1 000 r/min)漂洗 3次,收集沉积细胞,以备染色。提取缓冲液成分:15 mol/L Tris-HCl(pH7.5), 80 mol/L KCl, 20 mol/L NaCl, 20 mol/L EDTA-Na₂, 15 mol/L巯基乙醇, 0.03%的 Triton X-100。

DN A特异性染色 制备的核悬液离心后弃去上层清液,加入 2 mL染色缓冲液,暗处常温下染色 30 min。500目尼龙网过滤,滤液用标准试管收集,随即上机测定。染色缓冲液为提取缓冲液内加入 3 000 mL/L的 RN A酶 A和 10 mL/L EB(溴化乙锭)。

流式细胞光度术测定 在济南军区总医院流式细胞室进行。所用机型为美国 B-D公司生产的 FAC流式细胞光度计,其激发光源为 15 mW 氩离子。经激发,染色的 DN A分子促发荧光,测定装置测定荧光强度,与测定装置相连的计算机分析软件即可对荧光强度进行分析。本试验以二倍体森林草莓为对照,所有测试样品细胞核 DN A含量是以对照为标准的相对值。

2 结果与分析

2.1 不同倍体细胞核 DN A的相对含量比较

对 1个二倍体种 1个五倍体种和 2个八倍体栽培品种细胞核 DN A含量同时进行测定。结果(表 1)表明,随着倍性水平的增高,细胞核 DN A含量明显增加,如五倍体黑龙江 5号细胞核 DN A含量为二倍体种森林草莓的 2.52倍,两个八倍体品种细胞核 DN A相对含量又为五倍体的 1.4倍。同一倍性内,两个八倍体品种细胞核 DN A的相对含量仅相差 2.18%。这表明随着染色体数目的成倍增加,核 DN A含量亦相应增加

表 1 不同倍性水平草莓试管苗细胞核 DN A相对含量

品 种	倍 性	DN A 荧光值 /pg	DN A相对含量 %
森林草莓	2x	14.77	100.00
黑龙江 5号	5x	37.23	252.06
宝交	8x	52.37	354.57
哈尼	8x	51.23	346.85

2.2 杂交后代及诱变植株的倍性水平检测

两个八倍体和二倍体的杂交后代的细胞核 DN A相对含量的测定结果(表 2)表明,这两个杂交后代均为五倍体,其中 9-2-4细胞核 DN A相对含量为 238.79,与亲本八倍体宝交和二倍体种森林草莓细胞核 DN A相对含量的平均值 227.29((354.57+ 100.00)/2)仅相差 5%。3-1-1细胞核 DN A相对含量略低于 9-2-4。对 3-1-1进行染色体计数,认为该植株为五倍体类型,所以两者应都是五倍体。八倍体母本哈尼细胞核 DN A相对含量与宝交相似,新疆草莓也是二倍体,依照 DN A含量推测 9-2-4也是五倍体。

L₂和 L₅虽均为哈尼和黑龙江 1号杂交后代经自然授粉获得的种子后代,但两植株细胞核 DN A相对含量差异较大,已有的研究^[9]表明,草莓八倍体品种减数分裂时可形成较正常的二价体,染色体分离可均等进行。而五倍体黑龙江 1号则可能因染色数目为草莓基本染色体组数目的 5倍,性细胞形成时染色体进行非均等分离,而且,这两株杂交后代

自然授粉时外来花粉粒染色体数目也不能肯定完全相同。因此, L_2 和 L_5 细胞核 DNA 相对含量差异较大应是可能的。根据其细胞核 DNA 相对含量的测定结果, L_2 可能为四倍体, L_5 则可能为六倍体类型。

表 2 草莓多倍体杂交后代及诱变植株细胞核 DNA 相对含量及倍性鉴定

品系	来 源	DNA 荧光值 /pg	DN A 相对含量 %	估计倍性
9-2-4	8x $\times$ 2x	35. 27	238. 79	5x
3-1-1	8x $\times$ 2x	30. 94	209. 48	5x
L_{3-1}	5x	35. 67	241. 50	5x
L_2	8x $\times$ 5x	25. 81	174. 75	4x
L_{2-1}	L_2 种子诱变	28. 53	193. 16	4x
L_5	8x $\times$ 5x	40. 09	271. 43	6x
L_{5-6}	L_5 种子诱变	42. 46	287. 47	6xC

注: 以森林草莓 (2x) 为参照标准, 其 DNA 相对含量为 100。

L_{2-1} 为 L_2 的种子经秋水仙素处理的诱变植株, 其细胞核 DNA 含量测定的直方图上出现两个大小一致的峰, 而且, 这两个峰荧光值相差近一倍, 其中一个峰荧光值与 L_2 相近, 这表明这一诱变植株存在两群细胞核 DNA 含量相差一倍的细胞, 说明该诱变植株为倍性嵌合体, 其嵌合体形式为 4-8 型。 L_5 的种子经秋水仙素处理的诱变植株 L_{5-6} 细胞核 DNA 相对含量与 L_5 相似, 说明 L_{5-6} 可能没有发生染色体数目的加倍效应, 其倍性仍可能与 L_5 相同。

3 讨 论

DNA 荧光试剂 PI 和 EB 可定量结合在 DNA 双链的碳架结构上, 细胞核内 DNA 分子数目越多, DNA 分子链越长, PI 和 EB 嵌入碳架结构中的量就越多, 经激光照射, 这些 DNA 促发荧光的强度也就越强。 因此, 在同一条件下, 经荧光度剂处理的细胞核 DNA 所发荧光强度的强弱, 就反映了细胞核 DNA 含量的高低^[5, 7, 10]。 理论上认为, 随着染色体数目的成倍增加, 细胞核 DNA 含量也必然成倍增加, 通过比较细胞核 DNA 含量来鉴定倍性应是可能的。 本研究表明, 细胞核 DNA 相对含量的高低与细胞的倍性密切相关, 根据细胞核 DNA 含量的高低可进行倍性鉴定。

与利用染色体计数进行鉴定倍性相比, 流式细胞光度术测定核 DNA 含量试样处理简单, 测量较精确、 快速, 而且可以同时许多样本的大量细胞核 DNA 含量进行测定, 以此为基础鉴定倍性, 是一种较好的方法。 另外, 染色体计数只能对少量细胞进行统计分析, 这种方法显然对确定倍性嵌合体易发生误差, 因此, 流式细胞光度术用于倍性鉴定将更全面^[3]。 这种方法试材用量很少 (50 mg 左右), 这对于经细胞融合获得的多倍体细胞团块的早期鉴定可能具有更大的应用价值。

致谢: 所有试材均为沈阳农业大学雷家军先生提供, 并进行了 3-1-1 品系的染色体计数; 在实验过程中得到济南军区总医院流式细胞研究室的尹格平副主任及孙小明先生的帮助; 北京师范大学生物系宋平根教授和肖尊安副教授也曾给予有益的建议。 在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Rayburn A L, Eaton W G. C band heterochromatin and DN A content in *Zea mays*. Amer J Bot, 1985, 72(10): 1610 ~ 1617
- 2 Rayburn A L. Nuclear DN A content in F₁ hybrids of maize. Heredity, 1993, 70 294~ 300
- 3 Biradar D P. Endopolyploidy in diploid and tetraploid maize(*Zea mays* L.) . Annals of Botany, 1993, 71 417~ 421
- 4 Deniel G P, Proctor A J, Murr L V, et al. DN A content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lyopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. Genome, 1996, 39 77~ 82
- 5 Peggy O A, Robert L J. Nuclear DN A content and plidy levels in the genus ipomoe. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119 (1): 110~ 115
- 6 Michaelson M J, Reily E E, Shiry C G. Nariation of nuclear DN A content in helianthus. Amer J Bot, 1991, 78(9): 1238~ 1243
- 7 Vance B W, Birch H G. Estimating nuclear DN A content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DN A hybridization. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119(6): 1312~ 1316
- 8 Frederique O S, Stiger H C M. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus actinidia. Scientia Horticulturae, 1994, 57 303~ 313
- 9 Atef M F, Byall W T, Morrison N F. Chromosomal behavior in octoploid straw berry progenies and their parental clones during meioses. J Amer Soc Hort Sci, 1981, 106(4): 522~ 526
- 10 宋平根,李素文主编.流式细胞术的原理和应用.北京:北京师范大学出版社, 1989

Use of Flow Cytometry for Ploidy Identification in Strawberries (*Fragaria vesca* L.)

Li Yun¹ Shu Huairui¹ Shi Yinpings² Wang Qiangsheng²

(1 Shandong Agricultural university, Taian, shandong 271018)

(2 Shandong Institute of Fruit Trees, Taian, shandong 271018)

Abstract The relative nuclear DN A of diploid, pentaploid and octoploid was measured by flow cytometry. The results showed that cell nuclear DN A content increased with ploidy increasing. Therefore, the flow cytometerg could be used for ploid identification of some cross progenies, and differentiation of induced various plants, with this method found that there were two cell groups in which nuclear DN A content diverged almost a half, and this induced plant could be a ploid chimera. The result of the method offered a better proof of reliability.

Key words flow cytometry, ploidy, straw berry