

· 技术方法 ·

麻竹花药诱导再生植株的染色体倍性分析

李海莹, 乔桂荣, 刘明英, 蒋晶, 张玲, 卓仁英*

中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 富阳 311400

摘要 为阐明麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)花药培养再生植株的染色体倍性, 利用流式细胞仪和染色体标本制备方法对麻竹再生植株嫩叶DNA的含量和根尖染色体数目进行了研究。结果表明: 100株花药培养再生植株中有4株为六倍体, 96株为十二倍体。该结果进一步验证了麻竹花药培养体系, 对麻竹遗传改良和功能基因组学研究具有重要意义。

关键词 花药培养, 染色体, 麻竹, 流式细胞仪

李海莹, 乔桂荣, 刘明英, 蒋晶, 张玲, 卓仁英 (2011). 麻竹花药诱导再生植株的染色体倍性分析. 植物学报 46, 74–78.

竹子是重要的森林资源, 世界上有竹类植物70余属1 200余种, 主要分布于热带和亚热带地区, 少数种类分布于温带和寒带。中国是世界上最主要的竹子生产国, 素有“世界竹子看中国”的美誉。我国有竹类植物48属, 近500种, 主要分布于北纬40°以南的亚热带、热带地区, 尤以长江以南的浙江、福建、江西和湖南4省最为集中, 竹林面积约 7.2×10^6 hm^2 (江泽慧, 2002)。麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)隶属禾本科竹亚科、牡竹属麻竹亚属, 自然分布于福建、台湾、广东、广西、贵州、四川和云南等省, 是我国热带地区重要的优良、速生、笋材两用的大型丛生竹种之一。麻竹体细胞染色体数为 $2n=72 \pm 2$ (李秀兰等, 1999, 2001)。一般认为竹子染色体基数 $x=12$, 丛生竹为六倍体($2n=6x=72$), 而散生竹为四倍体($2n=4x=48$)(张光楚, 1985)。因麻竹开花间隔期长且开花具不可预测性, 杂交育种比较困难, 品种选育主要以无性系选育为主。利用花药离体培养可以在短期内获得性状丰富的单倍体或纯合的多倍体植株, 大大缩短了育种周期。Tsay等(1990)对麻竹花药诱导培养, 获得十几株单倍体植株, 但未见六倍体和十二倍体再生植株的报道。乔桂荣等(2010)建立了麻竹花药诱导培养体系, 获得了500多株花药诱导再生植株。

本研究以中国重要的丛生竹种——麻竹为实验材料, 比较了人工控制授粉实生苗和花药培养再生植株幼嫩叶片的DNA含量及根尖染色体的数目, 发现

花药培养获得的再生植株DNA含量与实生苗大致相同或者约是其亲本植株DNA含量的2倍, 根尖染色体数目为 $2n=72$ 或 $2n>135$ 。

1 材料与方法

1.1 材料

麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro)开花植株取自福建永安。乔桂荣等(2010)对其花药进行诱导培养获得再生植株, 在开花植株的枝条上获得麻竹种子, 播种获得实生苗。实验中所用的叶片和根尖均取自本实验室温室培育的实生苗和花药培养再生植株。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA含量的测定

利用FACSCalibur流式细胞仪系统(美国BD公司)测定麻竹实生苗与花药培养再生植株的基因组DNA含量。

首先采用Otto(1990)的方法制备细胞悬液样品。样品制备的具体步骤如下: (1) 取麻竹未展开的新叶1–2片, 洗净除中脉后置于培养皿中, 移取1 mL Otto I溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸, 0.5%吐温-20, 4°C下保存备用), 用双面刀片在Otto I溶液中将竹叶划碎; (2) 用移液枪吸取含有嫩叶细胞的Otto I溶液, 经 $0.54 \mu\text{m}$ 尼龙筛网过滤至1.5 mL Eppendorf管中; (3) 10 000

收稿日期: 2010-05-25; 接受日期: 2010-09-19

* 通讯作者。E-mail: zhuory@gmail.com

xg离心30秒; (4) 用1 mL移液枪移去上清至0.1 mL处, 加入新鲜的Otto I溶液100 μL 悬浮沉淀。在准备用流式细胞仪检测样品时, 向样品中加入600 μL Otto II溶液(0.4 mol·L⁻¹磷酸氢二钠, 室温下保存备用)和100 μL 碘化丙啶(PI)溶液, 然后利用FACSCalibur流式细胞仪系统进行样品检测(桂毅杰等, 2007)。

1.2.2 根尖染色体标本的制备和观察

采用陈瑞阳等(1982)的去壁低渗法, 对3株实生苗和10株花药培养再生植株的根尖体细胞进行染色体观察计数, 对每株至少10个根尖分裂中期的细胞的染色体数目及所占比例进行统计分析。取生长旺盛的根尖, 在饱和 α -溴萘溶液中25°C处理3小时, 然后用新鲜固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)在4°C下固定24小时, 用清水漂洗后转移至70%乙醇中4°C保存备用。制片时, 用水洗净根尖后, 置于凹玻片中, 用20 μL 终浓度为3%的纤维素酶和20 μL 1%的果胶酶28°C酶解2.5–3小时。吸去酶液, 水洗3次, 用吸管或镊子将材料夹出并置于载玻片上, 加半滴卡宝品红, 用解剖针捣碎(轻捣)。盖上盖玻片, 压片(轻压)后在普通显微镜下观察计数。

2 结果与讨论

2.1 叶细胞DNA含量的比较

利用流式细胞仪可以对处于快速流动中的细胞或生物颗粒进行各种参数的快速定量分析。该技术首先利用特异荧光染料进行细胞核染色, 染色后的单细胞在鞘液的包被下单行排列, 依次通过激光照射区时, 受特异光源激发, 样品产生散射和激发荧光; 这些荧光信号被光电倍增管接收, 然后转换为电信号和可被计算机识别的数字信号, 荧光的强弱代表了核物质的浓度, 即荧光强弱与细胞核DNA含量成正比。流式细胞仪检测过程中变异系数(coefficient of variation, CV)

反映了测定结果的分辨率或精确度, 一般认为变异系数在5%以内的结果是可靠的(桂毅杰等, 2007; 李潞滨等, 2008)。在本研究的测定过程中该指标均控制在4.0%以下。

利用流式细胞仪测定麻竹实生苗和花药离体培养再生植株的DNA含量, 结果如图1所示。以麻竹实生苗植株DNA含量(图1A)为参照, 根据实生苗和组培苗G₀/G₁峰值的比较(表1), 对10株麻竹实生苗和100株花药培养再生植株的DNA含量进行对比发现, 4株花药培养再生植株的DNA含量大致与实生苗相同(图1B), 96株花药培养再生植株的DNA含量约为实生苗的2倍(图1C)。

2.2 根尖细胞染色体观察

通过对麻竹实生苗和花药培养再生植株的体细胞有丝分裂中期染色体数目进行观察, 发现实生苗的体细胞染色体数目在68–72条之间, 且染色体数为72的细胞占所观察的有丝分裂中期细胞总数的47.9%(表2)。流式细胞仪检测中DNA含量与实生苗相同的花药培养再生植株的体细胞染色体数目为68–72条, 且染色体数为72的细胞占观察细胞总数的48.8%(表2)。而流式细胞仪检测中DNA含量约为实生苗2倍的花药培养再生植株的体细胞染色体数目为73–120或>120, 而且染色体数>120的细胞占观察细胞总数的61.8%(表2), 因此麻竹根尖细胞学观察结果与流式细胞仪测定结果基本相符。麻竹属于丛生竹种, 体细胞染色体数为2n=72 \pm 2(李秀兰等, 1999, 2001)。经观察发现麻竹实生苗根尖有丝分裂中期细胞的染色体数为2n=72(图2A), 因此我们根据花药培养再生植株体细胞染色体数目和DNA含量将花药离体培养再生植株分为2类, 即六倍体(图2B)和十二倍体(图2C)。花药培养再生植株染色体数目加倍的机制可能是离体花药在诱导培养基上培养时间过长及愈伤组织继代次数过多。

胡含等(1978, 1980)在小麦(*Triticum aestivum*)

表1 麻竹实生苗和花药培养再生植株DNA含量的比较

Table 1 Comparison of DNA content between seedlings and anther regeneration plants of *Dendrocalamus latiflorus*

	Seedling (6x)	Anther regeneration plant (6x)	Anther regeneration plant (12x)
Number of tested samples	10	4	96
DNA content (Mb)	28.93–32.67	29.26–30.69	52.62–71.02

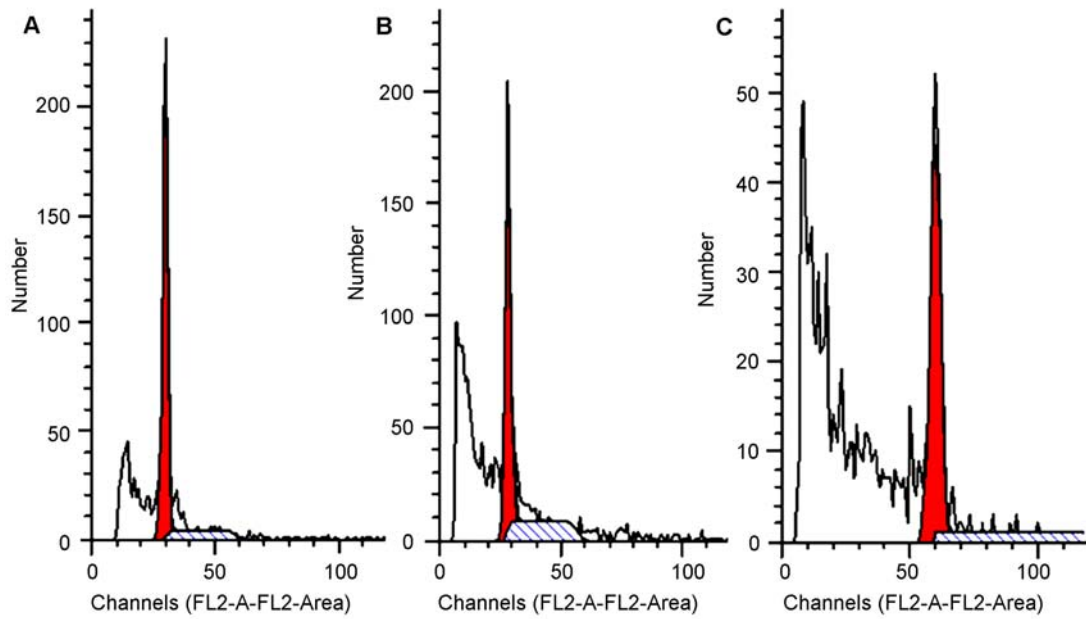


图1 麻竹实生苗和花药培养再生植株的流式细胞仪检测结果
(A) 实生苗(6x); (B) 花药培养再生植株(6x); (C) 花药培养再生植株(12x)

Figure 1 Comparison of DNA content between seedlings and anther regeneration plants of *Dendrocalamus latiflorus* using flow cytometry

(A) Seedling samples (6x); (B) Anther regeneration plants (6x); (C) Anther regeneration plants (12x)

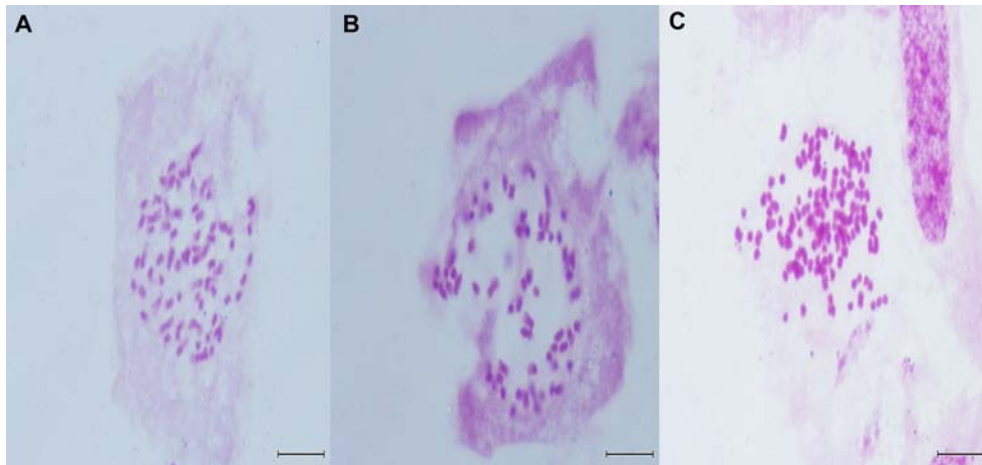


图2 麻竹实生苗和花药培养再生植株根尖有丝分裂中期细胞的染色体数目观察
(A) 实生苗(6x)植株根尖染色体压片, 染色体数为72; (B) 花药培养再生植株(6x)根尖染色体压片, 染色体数为72; (C) 花药培养再生植株(12x)根尖染色体压片, 染色体数>135。Bar=10 μ m

Figure 2 Images of mitotic metaphase chromosomes of the seedling samples and anther regeneration plants of *Dendrocalamus latiflorus*

(A) The chromosomes in seedling sample (6x), total number=72; (B) The chromosomes in anther regeneration plants (6x), total number=72; (C) The chromosomes in anther regeneration plants (12x), total number>135. Bar=10 μ m

表2 麻竹实生苗和花药培养再生植株染色体数目的比较**Table 2** Comparison of the chromosome number in the seedling samples and anther regeneration plants of *Dendrocalamus latiflorus*

	Number of tested samples	Number of chromosomes	Number of mitotic-metaphase cells
Seedling (6x)	3	68	5
		69	3
		70	11
		71	6
		72	23
Anther regeneration plant (6x)	2	68	7
		69	2
		70	6
		71	6
		72	20
Anther regeneration plant (12x)	8	73-100	16
		100-120	18
		>120	55

花药离体培养中除得到三倍体植株外, 也得到了六倍体、八倍体和不同染色体数目的非整倍体植株。Collins等(1972)对大麦(*Hordeum vulgare*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)花药离体培养再生植株的染色体倍性进行了研究, 也得到单倍体、多倍体及非整倍体植株。迄今为止, 在玉米(*Zea mays*)花药离体培养过程中, 多倍体和结构变异的植株均尚未得到。这可能与不同物种的遗传背景、倍性和进化程度有关。许多学者认为在离体培养条件下, 容易引起植株体细胞的核内有丝分裂、核融合、核内复制以及多极有丝分裂, 这些有丝分裂的异常过程是产生混倍体、染色体加倍以及染色体数发生变异的重要原因(胡含和陈英, 1977)。本实验中所观察到的染色体数大于135的细胞其产生的具体机制还有待进一步研究。在杨树、小麦、大麦、烟草和水稻(*Oryza sativa*)的花药离体培养研究中均发现了非整倍体现象, 但由于麻竹染色体数目较多, 在压片过程中有一定的困难, 因此麻竹花药离体培养再生植株染色体的非整倍现象不容易鉴定。

参考文献

- 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰 (1982). 植物染色体标本制备的去壁、低渗法及其在细胞遗传学中的意义. 遗传学报 **9**, 151-159.
- 桂毅杰, 王晟, 全丽艳, 周昌平, 龙士豹, 郑华军, 金亮, 张宪银, 马乃训, 樊龙江 (2007). 毛竹基因组大小和序列构成的比较分析. 中国科学C辑: 生命科学 **37**, 488-492.
- 胡含, 陈英 (1977). 花药培养学术讨论会论文集. 北京: 科学出版社. pp. 166-172.
- 胡含, 郝子英, 欧阳俊闻, 郝水, 何孟元, 徐宗尧, 邹明谦 (1980). 小麦花粉植株花粉母细胞染色体的变异. 中国科学A辑: 数学 **23**, 485-491.
- 胡含, 郝子英, 贾双娥 (1978). 小麦花粉愈伤组织植株体细胞染色体的变异. 遗传学报 **5**, 23-30.
- 江泽慧 (2002). 世界竹藤. 沈阳: 辽宁科学技术出版社. pp. 3-4.
- 李潞滨, 武静宇, 胡陶, 杨学文, 彭镇华 (2008). 毛竹基因组大小测定. 植物学通报 **25**, 574-578.
- 李秀兰, 林汝顺, 冯学琳, 祁仲夏, 宋文芹, 陈瑞阳 (2001). 中国部分丛生竹类染色体数目报道. 植物分类学报 **39**, 433-442.
- 李秀兰, 刘松, 宋文芹, 陈瑞阳, 王云珠 (1999). 40种散生竹的染色体数目. 植物分类学报 **37**, 541-544.
- 乔桂荣, 李海营, 蒋晶, 孙宗修, 卓仁英 (2010). 麻竹花药培养及再生植株的获得. 植物学报 **45**, 88-90.
- 张光楚 (1985). 丛生竹染色体数目的研究. 广东林业科技 (4), 16-21.
- Collins GB, Legg PD, Kasperbauer MJ (1972). Chromosome numbers in anther-derived haploids of two *Nicotiana* species. *J Hered* **63**, 113-118.
- Otto F (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman HA, Darzynkiewicz Z, eds. *Methods in Cell Biology*, Vol. 33. New York: Academic Press. pp. 105-110.
- Tsay HS, Yeh CC, Hsu JY (1990). Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of bamboo (*Sinoealam latiflorus* Munro). *Plant Cell Rep* **9**, 349-351.

Analysis of Ploidy in *Dedrocalamus latiflorus* Plants Obtained by Anther Culture

Haiying Li, Guirong Qiao, Mingying Liu, Jing Jiang, Ling Zhang, Renying Zhuo*

Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China

Abstract Regeneration plants were initiated from bamboo (*Dedrocalamus latiflorus*) anthers, and chromosome number and nuclear DNA content were detected by chromosome analysis and flow cytometry. Among 100 regeneration plants, 4 were hexaploid, and the chromosome number of the other plants was twice that of the parents. These results demonstrate the anther culture of bamboo and have importance for functional genomics research and genetic improvement.

Key words anther culture, chromosome, *Dedrocalamus latiflorus*, flow cytometry

Li HY, Qiao GR, Liu MY, Jiang J, Zhang L, Zhuo RY (2011). Analysis of ploidy in *Dedrocalamus latiflorus* plants obtained by anther culture. *Chin Bull Bot* **46**, 74–78.

* Author for correspondence. E-mail: zhuory@gmail.com