

西藏光核桃种质资源的倍性鉴定

李媛蓉, 刘琳, 张姗姗, 曾秀丽

(西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所/农业部青藏高原果树科学观测实验站, 西藏 拉萨 850032)

摘要:光核桃是青藏高原一种古老的桃种质资源, 具有耐干旱, 耐寒冷, 适应性强等优良特性。本研究利用流式细胞仪对青藏高原作物种质资源果树圃内收集的光核桃群体的染色体倍性进行了检测, 以鉴定光核桃倍性是否发生变异。针对光核桃种质资源建立流式细胞仪检测体系, 利用 DAPI、PI 两种染液, 对 87 份光核桃种质资源样本的嫩叶和老叶进行多因素水平实验, 优化检测体系, 使效果图更加清晰、稳定。结果表明, 该流式细胞仪以使用 DAPI 染料、光核桃嫩叶的体系效果最优, 光核桃样品均为二倍体, 未发现染色体变异现象。目前收集的光核桃种质资源倍性较稳定。

关键词:光核桃; 种质资源; 流式细胞仪; 倍性检测

中图分类号:S662.1 **文献标识码:**A

Ploidy Identification of Germplasm Resources of Tibetan *Prunus mira koehne*

LI Yuan-rong, LIU Lin, ZHANG Shan-shan, ZENG Xiu-li

(Institute of Vegetables, Tibet Academy of Agriculture & Animal Husbandry Sciences, Tibet Plateau Fruit Tree Scientific Observation Experimental Station of Ministry of Agriculture, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract: *Prunus mira koehne* is an ancient peach germplasm resource on the Qinghai-Tibet Plateau. It has excellent characteristics such as drought tolerance cold tolerance and strong adaptability. In this study, flow cytometry was used to detect the chromosome ploidy of *P. mira koehne* population collected in the fruit tree nursery of the Qinghai-Tibet Plateau crop germplasm resources to identify whether the ploidy of *P. mira koehne* had been altered. A flow cytometry detection system was established for the germplasm resources of *P. mira koehne*, using two dyes, DAPI and PI, to conduct multi-factor level experiments on the tender and old leaves of 87 samples of germplasm resources of *P. mira koehne* to optimize the detection system and achieve the effect. The picture was clearer and more stable. The results showed that the flow cytometer used the DAPI dye and *P. mira koehne* tender leaf system to have the best effect. *P. mira koehne* samples were all diploid, and no chromosomal variation was found. The ploidy of the collected germplasm resources of *P. mira koehne* was relatively stable.

Key words: *Prunus mira koehne*; Germplasm resources; Flow cytometry; Ploidy detection

光核桃 (*Prunus mira koehne* Kov et. Kpst, $2n = 2x = 16$) 为蔷薇科乔木植物^[1], 在川西南地区被国家作物种质资源考察队^[2-3]所发掘出, 主要分布于海拔 2500 ~ 3500 m 的青藏高原, 分布地的年平均气温 6 ~ 13 ℃^[4], 平均海拔 3100 m 的林芝地区是主要分布地。小型或中型落叶乔木, 叶片披针形或卵状披针形, 枝条细长, 开展, 无毛, 嫩枝呈绿色, 老枝呈

灰褐色, 具有紫褐色小皮孔, 叶柄无毛, 常具紫红色扁平腺体, 托叶早落。花单生或两朵并生, 先于叶开放, 花瓣宽倒卵形, 果实近球形, 多生长于山坡杂木林中或山谷沟边, 花期 3 月下旬至 4 月上旬, 果期集中在 9 - 10 月。树体高大, 寿命长, 是世界上罕见的桃种质资源的“活化石群”^[5]。光核桃是西藏主要的野生果树之一, 耐干旱、耐寒冷、耐贫瘠、适应能力强、抗病虫害、长寿、结果力强, 是桃进行杂交育种的优异亲本。

光核桃具有丰富的遗传多样性, 丰富的基因池是开展育种工作的重要条件, 培育出符合市场需求的新品种, 对于发展壮大光核桃产业以及增加农牧民收入起着重要意义^[6], 因此对于光核桃种质资源的收集利用以及遗传信息的研究显得极其重要。

收稿日期: 2020 - 08 - 15

基金项目: 2018 年中央引导地方科技创新专项“边境地区果树绿色优质生产技术集成示范” (YDZX2018540C004077); 第二次青藏高原综合科学考察研究课题植物多样性可持续利用与评估 (2019QZKK0502) 子课题“传统农业植物资源调查与评估” (2019QZKK05020302)

作者简介: 李媛蓉 (1994 -), 女, 甘肃永昌人, 研究实习员, 硕士, 主要从事青藏高原果树资源示范推广工作。

倍性育种是利用自然变异或人工诱发植物染色体数目变异的材料选育新品种或新种质的育种技术,可大大缩短育种年限。染色体作为遗传物质的载体,其重组常常会导致新种的出现并在一定程度上能够反映生物的本质^[7],而倍性鉴定是倍性育种及其应用的重要环节^[8]。目前,传统的倍性鉴定方法有植株形态特征比较法、花粉母细胞或根尖染色体计数法、气孔保卫细胞叶绿体计数法等。植株形态特征比较法易受营养、光照、水分等因素的影响,染色体计数法是目前最直接和最准确的倍性鉴定方法。流式细胞术是近几年在植物细胞计数、基因组大小测量^[9]、细胞周期分析^[10]等应用方面发展起来的植株倍性分析方法。其检测原理是荧光染料可定量嵌合在细胞核内 DNA 双链分子上,在一定的压力下染色细胞进入流式细胞仪的流动室,滤片收集到的每个细胞相应的荧光强度与细胞内的 DNA 含量成正比,以此来反应细胞核内 DNA 含量^[11]。采用流式细胞仪进行倍性鉴定,在短时间内可以检测大量样品部位及细胞所处时期无特殊要求,操作简单,方便快捷,且数据分析结果较为准确,迄今为止已经对山楂^[12]、葡萄^[13]、桑树^[14]、猕猴桃^[15]、苹果^[16]、梨^[17]、草莓^[18]、枣^[19]、石榴^[20]等进行过研究,目前已成为现在的倍性鉴定的主流方法之一。本研究通过利用流式细胞仪对光核桃种质资源进行倍性鉴定,筛选出特异的种质资源,能够为桃的育种提供材料支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料保存于西藏自治区农牧科学院果树圃内,为项目组在西藏林芝、拉萨、昌都、日喀则等地收集的 87 份光核桃资源播种后的 2 年生实生苗。分别选取健康无病斑、大小适中的嫩叶、老叶进行试验。

1.2 药剂配制

1.2.1 裂解液的配制试验 过程中所用裂解液的配方如下(以配制 1L 为例):氯化镁($MgCl_2$) 9.148 g、柠檬酸钠($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 8.822 g、3-吗啉丙磺酸($C_7H_{15}NO_4S$) 4.186 g 和 TritonX-100(液体) 1 mL。将以上试剂溶解于无菌双蒸水中,并于 4℃ 保存,配制过程中一定要使 TritonX-100 充分溶解。

1.2.2 染色缓冲液 解离液缓冲液中加入 20 mg/L 碘化丙啶(PI)、20 mg/L DAPI。

1.3 仪器与设备

流式细胞仪型号为美国 BD(Becton, Dickinson and Company)公司生产的 BD660517 C6-Plus。染色体含量的分布图像由流式细胞仪自动测定,相关参数的调控参照仪器说明。光源由波长为 488 nm 氩离子激发,染色的 DNA 分子促发荧光,测定其荧光强度,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。本次实验所有测试样品的细胞核 DNA 含量是以二倍体对照为标准的相对值,每次检测至少收集 5000 个细胞颗粒。

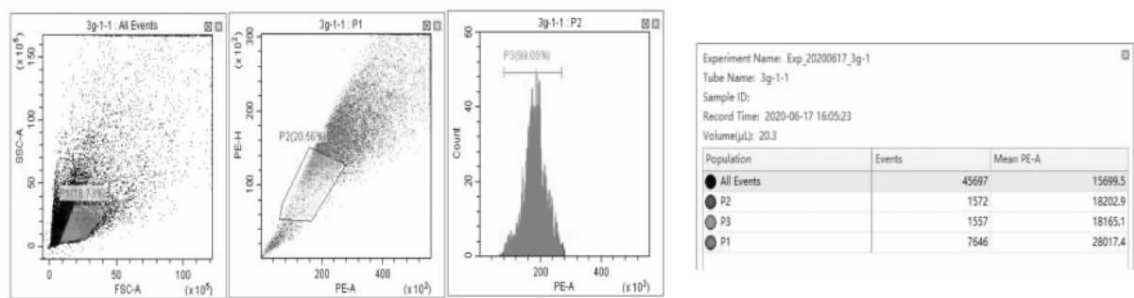


图 1 光核桃老叶倍性图(PI 染液)

Fig. 1 The ploidy diagram of the old leaves of *Prunus mira* (PI dye solution)

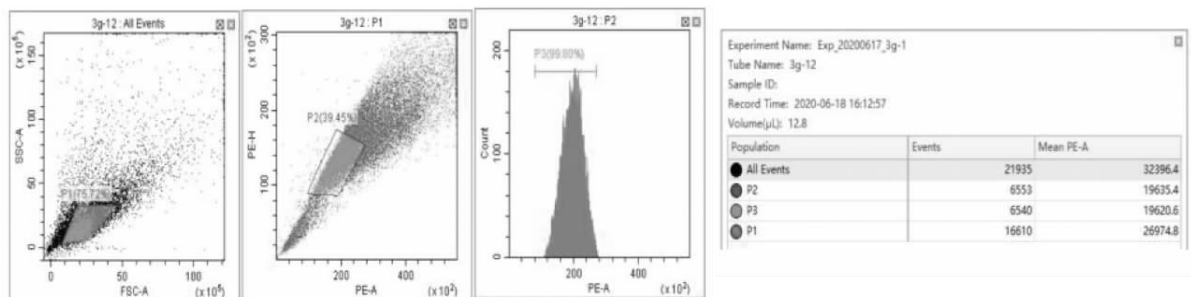


图 2 光核桃老叶倍性图(DAPI 染液)

Fig. 2 The ploidy diagram of the old leaves of *Prunus mira* (DAPI dye solution)

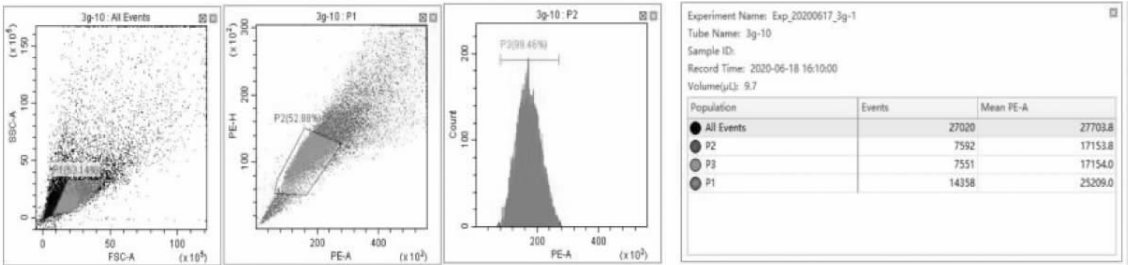


图 3 光核桃嫩叶倍性图 (PI 染色)

Fig. 3 Ploidy of young leaves of *Prunus mira* (PI dye solution)

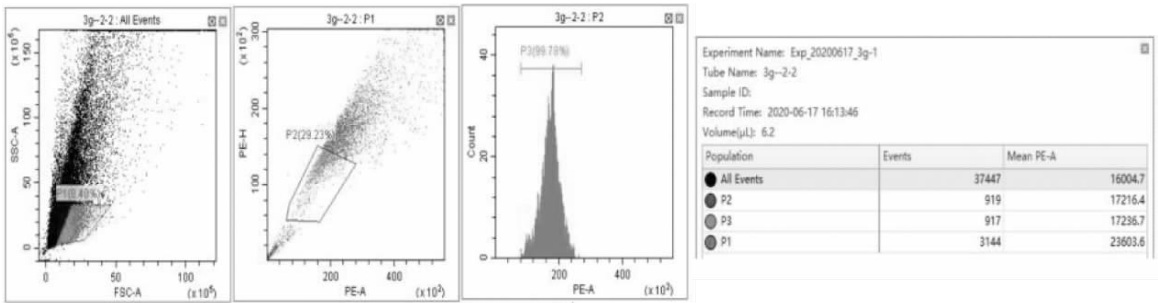


图 4 光核桃嫩叶倍性图 (DAPI 染色)

Fig. 4 Ploidy of young leaves of *Prunus mira* (DAPI dye solution)

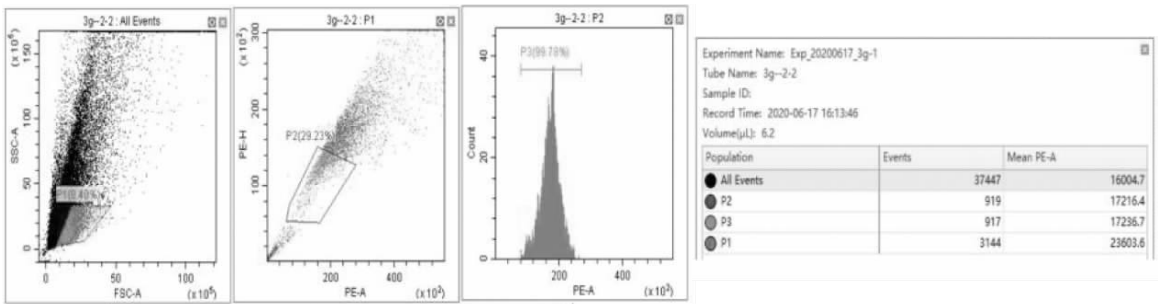


图 5 已知光核桃二倍体倍性图

Fig. 5 The diploid ploidy of known *Prunus mira*

1.4 试验方法

(1)称取约 50 mg 的叶片组织,蒸馏水洗净表面尘土,滤纸吸干后放入预冷的培养皿内,加预冷的解离液 1 mL 解离缓冲液;用锋利的刀片一次性快速切碎,整个过程材料需浸没在解离液中,以便更好地游离细胞核。

(2)吸取培养皿内的解离液,用 300 目的滤膜过滤至 1.5 mL 离心管中,15 000 r/min 离心 15 ~ 20 s,弃上清。

(3)加 200 μ L 预冷的染色缓冲液重悬,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,上机检测。

2 结果与分析

以已知的通过基因组分析为二倍体光核桃种质资源老叶为检测样本,采用 PI (图 1)和 DAPI(图 2) 2 种染液做对比,观察其峰图,重复 3 次。图 2 与图

1 相比,其峰图更符合正态分布,杂峰较少,因此 DAPI 染液的效果较好,且对实验员的毒性较小。

以已知二倍体光核桃嫩叶为检测样本,采用 PI (图 3)和 DAPI(图 4)2 种染液做对比,重复 3 次。图 4 峰型分布更为集中,峰型明显,结果显示 DAPI 染液的效果依旧比 PI 的效果好。综上,流式细胞仪检测优化取嫩叶、DAPI 较为适宜。

用已知二倍体光核桃作为对照,然后采用优化后的体系对其 87 份光核桃种质资源进行倍性检测,如图 5 ~ 6 所示,PE-A 的峰值均在 200×10^2 左右,故两个样本均为二倍体,光核桃种质资源染色体倍性未发生变异。

3 讨论与结论

流式细胞仪能够对细胞的物理或者化学性质,如细胞大小、细胞内部结构、染色体、RNA 等进行快

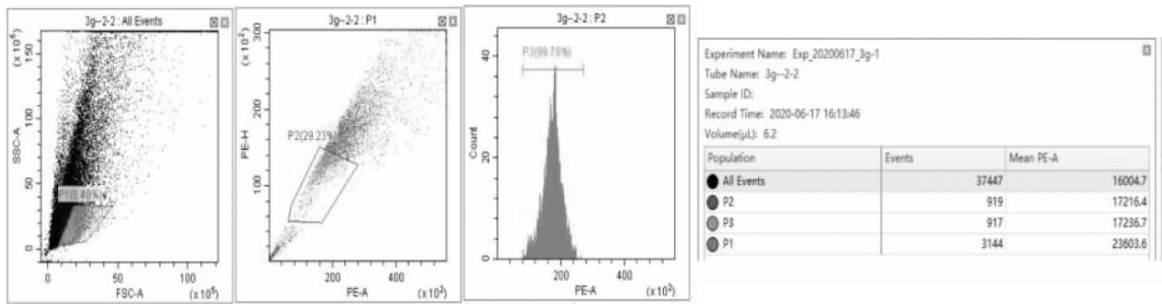


图 6 未知光核桃二倍体倍性图

Fig. 6 Unknown *Prunus mira* diploid ploidy diagram

速检测并分类收集。然而针对不同作物采用不同型号的流式细胞仪进行倍性检测时,需要对样品处理条件、仪器参数等进行优化,建立相应的检测体系。流式细胞仪型号为美国 BD(Becton, Dickinson and Company)公司生产的 BD660517 C6-Plus,对光核桃倍性检测方法进行优化,结果发现不同电压处理对检测结果影响较大,电压过大主峰容易跑出检测界面,又可成为偏锋现象。偏锋现象是流式细胞仪检测中一种常见现象,属于检测误差。如果样品荧光染色后放置的时间太长可能会导致偏锋现象,这种现象通过重复检测和缩短样品荧光染色后放置的时间有时可以消除。

建立了光核桃种质资源倍性流式细胞仪鉴定体系,该方法采用 DAPI 染液,嫩叶为样品的体系;目前所测 87 份光核桃资源均为二倍体,尚未发生染色体变异。该体系的建立及光核桃种质资源倍性的明确为后续光核桃倍性育种奠定了基础。

参考文献:

[1]汪祖华,庄恩及. 中国果树志: 桃卷[C]. 北京:中国林业出版社,2001:79-85.

[2]周建涛,钟永模,王天云,等. 川西南珍稀核果类果树资源[J]. 作物品种资源,1995(2): 21-22.

[3]周建涛,钟永模,王天云,等. 川西南光核桃类型及桃的起源[A]. 见:张上隆,陈昆松. 园艺学进展[M]. 北京:农业出版社,1997:74-77.

[4]董国正. 西藏光核桃的调查[J]. 中国林副特产,1991(3):44-45.

[5]宗学普,段玉春. 光核桃的分布及类型初探[A]. 西藏作物品种资源考察文集[M]. 北京:中国农业科技出版社,1987:184-185.

[6]付深造,张恩瑜,陈超. 我国作物种质资源保护利用现状及发展建议[J]. 种子世界,2013(10):1-3.

[7]关雪莲,董连新. 新疆蓝刺头属两种植物的染色体核型分析[J]. 新疆农业科学,2012,49(6): 1048-1052.

[8]刘莹,赵翠荣,王立峰,等. 小麦根尖染色体制片及植株倍性鉴定[J]. 安徽农业科学,2012,40(25): 12349-12350.

[9]Trávníček P, Ponert J, Urfus T, et al. Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication[J]. Cytometry A, 2015, 87(10): 958-966.

[10]Pouřfěková A, Mazalová P, Vaut R J, et al. DNA content variation and its significance in the evolution of the genus *Micrasterias*[J]. PLoS One, 2014,9(1):86247.

[11]Kron P, Husband B C. Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: improved methodology and applications[J]. Ann. Bot., 2012, 110(5): 1067-1078.

[12]崔金鑫,李月梅,张蕊,等. 利用流式细胞仪鉴定山楂种质资源的倍性[J]. 北方园艺,2016(1):84-86.

[13]裴丹,葛孟清,董天宇,等. 208 个葡萄品种染色体倍性的流式细胞分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2019(5):21-28.

[14]黎月娟,邱长玉,林强,等. 应用流式细胞技术鉴定桑树倍性的样品选择[J]. 蚕业科学,2019,45(1):9-16.

[15]施春晖,徐兰兰,王晓庆,等. 流式细胞仪鉴定猕猴桃倍性技术研究[J]. 植物研究,2014,34(6):845-849.

[16]邓舒,张春芬,肖蓉,等. 流式细胞术鉴定苹果花药培养再生植株倍性的方法[J]. 山西农业科学,2020,48(9):1379-1382.

[17]刘凤霞,李京一,王志刚,等. 适合流式细胞仪分析的梨叶片细胞核提取缓冲液筛选[J]. 农业生物技术学报,2018,26(6):1034-1042.

[18]周历萍,王淑珍,阮松林,等. 草莓流式细胞检测提取方法的优化[J]. 浙江农业学报,2015,27(11):2024-2028.

[19]王利虎,吕晔,罗智,等. 流式细胞术估测枣染色体倍性和基因组大小方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报,2018,26(3):511-520.

[20]潘宏兵,罗玲,冯娟,等. 石榴同源四倍体诱导及评价[J]. 河南农业科学,2020,49(5):111-117.