

植物单倍体植株的倍性鉴定

李好琢^{1,2}, 张志宏¹

(1. 沈阳农业大学园艺学院 110161; 2. 辽宁省农业技术学校 沈阳 110161)

摘要: 单倍体植株在倍性育种中具有极大的优点和巨大的应用潜力, 快速、准确地筛选出单倍体植株对加速育种进程具有重要的意义。植株倍性的鉴定方法主要有直接鉴定法和间接鉴定法。现综述了直接鉴定法即染色体计数法和流式细胞分析法(flow cytometric measurement)、叶片气孔大小及保卫细胞叶绿体数目鉴定法、染色中心直径和异染色质数目以及植株形态观察等间接鉴定法的应用进展, 并对各自的优缺点作了简要的评述。

关键词: 再生植株; 单倍体; 倍性鉴定; 作物育种
中图分类号: Q 944.6 **文献标识码:** B
文章编号: 1001-0009(2007)01-0049-03

单倍体育种是 20 世纪 70 年代发展起来的一项新技术。其优点是: 控制单倍体性状的基因无论是显性还是隐性均可充分表达, 使单倍体植株群体呈现丰富的遗传多态类型。若对单倍体植株进行染色体人工加倍, 即可得到同质纯合的纯系。它可大大缩短育种年限, 加速育种进程, 提高选育效率, 在育种中具有极大的应用潜力。

单倍体植株的获得常通过花粉(花药)培养以及未授精子房或胚珠离体培养诱导孤雌生殖, 无论是小孢子培养还是大孢子培养, 单倍体植株的诱导频率都是比较低的, 且再生出的植株, 往往是单倍体、双单倍体及其他倍性植株的混合群体。通过对获得的再生植株的倍性进行快速而准确地鉴定, 以便尽早筛选出单倍体植株。目前鉴定植株倍性的方法主要有直接鉴定法和间接鉴定法。

1 直接鉴定法

直接鉴定法即染色体计数法, 这是确定倍性最基本和最可靠的方法。通常以根尖、茎尖、幼叶、叶片愈伤组织或卷须为材料, 采用压片法和去壁低渗法进行染色体标本制备, 需用卡宝品红、醋酸洋红或铁矾-苏木精等染色液进行染色、镜检和计数。

第一作者简介: 李好琢, 女, 1973 年生, 沈阳农业大学硕士研究生, 现任辽宁省农业技术学校讲师, 主要从事园艺植物生物技术方面的教学和研究工作。
收稿日期: 2006-08-10

韩雪梅等^[1]在草莓花药苗染色体观察方法及数目变异的研究试验中认为: 预处理药品以对二氯苯饱和液与加 A-溴萘的对二氯苯饱和液的预处理效果较好。前者处理时间比较自由, 在 2~20 h 之间效果都很好; 而加 A-溴萘后, 可获得显著缩短的染色体, 特别适用于染色体计数。相比之下, 用 8-羟基喹啉、秋水仙素细胞分散及拍片效果较差。通过铁矾-苏木精、碱性品红、醋酸洋红三种染色剂染色效果的对比试验, 结果表明铁矾-苏木精、碱性品红染色对比度大, 可供拍片。染色效果以铁矾-苏木精最佳, 但染色后常需再用 45% 醋酸分色软化 1 h 左右。杜胜利等^[2]以黄瓜未授精子房培养的再生植株群体为材料, 研究和比较了几种倍性鉴定方法, 认为体细胞染色体计数法是最可靠的直接方法。

总之, 许多文献都表明染色体计数法是可靠性最高的植株倍性鉴定的直接方法, 但操作复杂, 需要装备良好的实验室条件和熟练的细胞学操作技术, 鉴定速度慢, 费时费力, 而且当染色体数目太多时也可能造成误差。

2 间接鉴定法

与染色体计数法相比, 间接鉴定方法简便易行, 但可靠性有时不高。间接鉴定法主要有以下几种。

2.1 流式细胞分析法(flow cytometric measurement)

该方法是通过流式细胞分析仪对大量处于分裂期间染色体的细胞 DNA 含量进行检测, 经仪器的附设计算机自动进行统计分析, 绘制出 DNA 含量(倍性)的分布曲线图。以已知倍性的同类试材为对照, 确定待测植株的倍性^[3]。

流式细胞分析仪最初主要用于医学领域, 自 20 世纪 80 年代后, 国外学者对玉米、番茄、木薯、向日葵等植物细胞核 DNA 含量已进行过测定, 在果树的苹果、梨、猕猴桃和草莓上也逐渐有一些报道, 通过比较细胞核 DNA 含量的高低可进行倍性鉴定^[4]。

与染色体计数直接鉴定法相比, 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; 另外, 这种方法对试材的需求量很少(50mg 左右)^[4], 这对于未授粉子房获得的再生植株的早期鉴定可能具有更大的应用价值。

可见, 利用流式细胞分析仪的特点是快速、方便、准确, 由于准备好的细胞核样品在数分钟内即可完成测定和分析, 特别适合用于样品较多的倍性检测分析。但流式细胞分析仪十分昂贵, 测定费用高, 目前国内拥有这种仪器的单位还不多; 另外, 利用流式细胞分析法测定倍性时, 样品制备时间不宜过长, 否则会影响鉴定结果。

2.2 叶片气孔大小及保卫细胞叶绿体数目鉴定法

关于植株叶片气孔大小及保卫细胞叶绿体数目与染色体倍性的关系已有许多文献报道。郭永强^[5]测定西葫芦未授粉胚珠的单倍体、双单倍体和四倍体叶片表皮保卫细胞的长度分别为 (20.31 ± 3.38) 、 (30.80 ± 2.19) 和 $(41.78 \pm 1.03) \mu\text{m}$, 其比例约为 1 : 1.5 : 2, 因而提出在胚囊再生植株倍性鉴定时也作参照。但韩毅科等^[6]认为不同倍性黄瓜叶片的气孔直径和长度差异不显著, 不能作为倍性鉴定的指标。

气孔保卫细胞叶绿体数能反应染色体倍性。陈士炎对不同倍性茶树品种的叶片保卫细胞叶绿体数目的观察结果表明, 不同倍性间保卫细胞中的叶绿体数目差异比同倍性内品种间的差异大得多, 达极显著水平。杨艳琼等^[7]以烟草为试材进行染色体倍性鉴定, 结果表明, 气孔保卫细胞叶绿体数受染色体倍性控制, 不同染色体倍性间气孔叶绿体数平均值差异极显著, 单倍体 95% 以上的叶绿体数在 14 个以下, 双倍体 95% 以上的叶绿体数则在 14 个以上, 经开花结实实验证其准确率达 91%, 而不同品种同一倍性内气孔保卫细胞叶绿体数平均值差异不显著。

杜胜利等以黄瓜未受精子房离体培养获得的 200 株再生植株为试材, 进行保卫细胞叶绿体数目法倍性鉴定, 认为保卫细胞叶绿体数几乎随植株倍性成正比增加, 单倍体、双单倍体和三倍体之间差异达极显著水平。

郭永强^[5]以西葫芦 (*Cucurbita pepo*) 未授粉胚珠为材料, 利用叶片保卫细胞叶绿体压片方法对西葫芦胚囊再生植株进行了倍性鉴定, 结果表明, 单倍体、二倍体和四倍体植株叶片表皮保卫细胞叶绿体数的均值分别为 (4.15 ± 0.37) 、 (8.05 ± 0.76) 和 (16.05 ± 0.69) , 其比例约为 1 : 2 : 4, 从而提出叶片保卫细胞叶绿体计数能有效用于西葫芦再生植株倍性鉴定。玉米、小麦、棉花、青花菜、甜菜、马铃薯、桑、苜蓿、三叶草、葡萄等作物的染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数目也存在着正相关^[8~10]。

刘仁祥和黄莺^[11]对倍性鉴定的最佳取样时期和取材部位进行了研究, 认为烟草植株染色体倍性的早期快速鉴定宜选用第 5 片叶, 通过测其气孔保卫细胞叶绿体数间接鉴定倍性, 这样可把鉴定时期提前到大田移栽前, 杨艳琼等也得出类似的结论。

用气孔大小和保卫细胞叶绿体计数测定染色体倍数的方法已应用于多种作物, 而且与根尖压片观察染色体数和开花结实实验证相比, 气孔保卫细胞叶绿体计数法简便、快速、准确。这种方法在花粉和胚囊植株生育早期就能及时准确地鉴定出减半的单倍体植株, 以便采取有效措施予以利用, 减少损失, 加快育种进程。

2.3 染色中心直径和异染色质数目

有些作物的倍性与其体细胞染色中心大小、异染色

质数目密切相关, 是有效的间接鉴定方法。如瓜类栽培种的基因组含有较多的异染色质, 这些异染色质在细胞分裂间期的核中仍保留其固缩状态, 并常被染色剂染成深红色, 呈点状或棒状, 易于计数。不同倍性植株染色中心直径和异染色质数目与植株倍性呈正相关, 可作为黄瓜倍性鉴定的间接指标。杜胜利等以黄瓜未受精子房再生植株为试材, 取幼嫩卷须, 采用去壁低渗法进行染色体制片, 结果显示不同倍性植株染色中心直径和异染色质数目差异达显著水平, 而双单倍体和三倍体之间无显著差异, 说明染色中心直径和异染色质数目可用来鉴定单倍体, 但这种方法在区分双单倍体和三倍体时会有一定误差。

2.4 植株形态观察

随着细胞染色体倍性的增加, 植物各器官体积一般趋于增大, 如: 四倍体甜菜植株的花冠、花粉粒和种子均大于二倍体^[12]。与此同理, 单倍体植株各器官会比二倍体减小。单倍体西瓜植株的叶面积、茎长、茎粗显著低于二倍体, 单倍体植株的雌、雄花也明显小于二倍体, 且单倍体雄花中没有花粉粒^[10]。黄瓜单倍体能结果, 但果形多异常, 无正常的种子, 多空瘪籽。而双单倍体种子饱满。单倍体花粉粒在开花前即败育, 双单倍体花粉粒发育正常, 三倍体的花粉粒绝大多数败育, 仅有少量正常花粉粒, 大多数单倍体生长势明显弱于双单倍体和三倍体, 黄瓜单倍体植株较二倍体植株具有长势较弱、叶片较小、花瓣裂片深等特点, 单倍体不能正常结子、雄花败育、雌雄花花冠明显深裂等特征, 这些特征可作为区分黄瓜单倍体和二倍体植株的形态指标^[13]。

颖长可以作为水稻染色体倍数的又一指标。水稻单倍体与二倍体的颖长一般以 5.6mm 为界, 二倍体与三倍体的颖长以 7.8 mm 为界^[14]。周元昌^[15]以花培苗形态学鉴别法与 DNA 流式细胞仪测定法进行比较, 认为若以 DNA 流式细胞仪测定法鉴定结果为标准, 苗期形态学鉴定的准确率可达 94.2%。

植株的形态学观察也是间接确定植株倍性的重要方法之一, 形态学鉴定倍性具有简便、快捷、无需特殊仪器设备的优点, 但要在植株生长发育较晚时期鉴定, 致使育种材料不能得到及时利用。

综上所述, 不同方法对不同作物具有不同的适应性, 对不同作物需认真摸索, 综合一两种方法, 快速、准确、尽早鉴定出植株倍性, 筛选出单倍体植株, 以更好的利用种质资源, 加快单倍体育种进程。

参考文献:

- [1] 韩雪梅 王艳, 任古君. 等. 草莓花药苗染色体观察方法及数目变异的研究[J]. 北方园艺, 1997, 114(3): 44-45.
- [2] 杜胜利 韩毅科. 黄瓜倍性鉴定方法的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 280-281.

我国地被植物耐荫性研究

周 潇, 毛 凯, 干友民

(四川农业大学动物科技学院草业科学系, 雅安 625014)

摘 要: 地被植物作为园林绿化的重要材料逐渐引起人们的广泛关注, 而地被植物耐荫性研究在当今生态园林城市的建设中意义重大而任务紧迫。现介绍近 10 余年来我国各地区对耐荫地被植物的引种筛选、应用工作。并借鉴其它园林植物耐荫性的研究方法, 探讨地被植物耐荫性的评价指标体系、指出了我国在地被植物耐荫性研究方面存在的问题及今后的发展方向。

关键词: 地被植物; 耐荫性; 判断指标

中图分类号: S 688.4(2) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)01-0051-03

1 地被植物耐荫性的研究意义

近年来, 地被植物以其覆盖力强、易繁殖、适应性强、耐修剪、养护管理粗放、丰富的群落层次和视觉效果, 在城市园林中日益引起人们的广泛关注。而伴随着国民经济的发展和城市化进程的加快, 城市中一些绿地多处于建筑包围中, 由高层建筑、立交桥、林地等形成的荫蔽、半荫蔽土地不断增多, 据统计我国城市中 50% 以上绿地处于荫蔽环境中^[1]。所以地被植物耐荫性研究对于尽快解决这些地段的植物配置问题, 建立稳定而多样化的园林复层种植结构, 提高单位绿地的园林生态效益, 建设生态园林城市, 具有重要的现实意义。

2 我国对耐荫地被植物的引种筛选、应用研究

从 20 世纪 90 年代初开始, 我国一些城市根据本地不同的自然生态环境, 相继开展了对耐荫地被植物的引种筛选、应用研究工作。如武汉地区, 伍世平等筛选出

耐荫性较强的: 土麦冬(*Liriope spicata*)、阔叶麦冬(*Liriope platyphyllus*)及沿阶草(*Ophiopogon japonicus*); 半耐荫地被: 莲叶点地梅(*Androsace henryi*)、剪刀股(*Lx-eris debilis*)、聚花过路黄(*Lysimachia congestiflora*)、菖蒲(*Acorus calamus*)及石菖蒲(*Acorus gramineus*)^[2]。刘艳玲等重点选择出耐荫性强、绿期长、观赏性高且能密伏地面的种类: 蛇莓(*Duchesnea indica*)、活血丹(*Glechoma longituba*)和过路黄(*Lysimachia christinae*)^[3]。车生泉针对上海地区实际情况, 通过 3 次对浙江西天目山野生地被的野外调查和引种试验的基础上, 对有开发利用价值的 59 种野生耐荫地被做了报道^[4]。北方地区, 白伟岚等曾选取北京市 50 种园林植物进行耐荫性研究, 筛选出强耐荫的地被植物: 富贵草(*Pachysandra terminalis*)、玉簪(*Hosta Plantaginifolia*)、紫萼(*Hosta ventricosa*)、涝峪苔草(*Carex giraldiana*)、蛇莓、麦冬等^[5]。王和祥等通过对 54 种地被植物在天津市区适应性观察, 最后推荐了适合作为楼后、立交桥下、复层林下以及疏林下的耐荫地被植物^[5]。康俊水等通过对 57 种地被植物在山东东营市的引种试验及适应性观察, 筛选出适合滨海

第一作者简介: 周潇, 女, 1981 年生, 四川农业大学动物科技学院草业科学系在读硕士研究生, 研究方向为草地生态与草坪学。

收稿日期: 2006-09-18

[3] Bino R J. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination [J]. Annals of Botany, 1992, 69: 231-236.

[4] 李赞, 束怀瑞. 流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究 [J]. 西北农业大学学报 [J]. 1998 26(4): 45-48.

[5] 郭永强, 王建设. 西葫芦胚囊再生植株倍性鉴定方法研究 [J]. 华北农学报. 2004 19(3): 80-83.

[6] 韩毅科, 杜胜利, 王鸣. 黄瓜染色体制片及倍性研究 [J]. 华北农学报. 2003, 18 (1): 72-74.

[7] 杨艳琼, 何丽萍. 用气孔保卫细胞叶绿体计数法鉴定烟草染色体倍性方法初探 [J]. 种子. 2002 122(3): 24-25, 56.

[8] 李春红, 孟祥启. 玉米花药培养及再生植株倍性鉴定 [J]. 华北农学报. 1993, 8 (2): 64-68.

[9] 杜丽璞, 徐惠君. 用保卫细胞长度鉴别小麦花粉植性研究 [J]. 北京农业科学, 1996 , 14(6): 10-12.

[10] Sai N. Comparison of ploidy level screening methods in water melon [J]. Scientia Horticulture, 1999, 82 : 265-277.

[11] 刘仁祥, 黄莺. 烟草花粉植株染色体倍性的早期快速鉴定 [J]. 贵州农业科学, 1998, (6): 4-7.

[12] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养再生植株中的四倍体变异 [J]. 园艺学报, 1999 26 (2): 128-130.

[13] 杜胜利, 魏惠军. 通过辐射花粉诱导获得黄瓜单倍体植株 [J]. 中国农业科学, 1999 32(2): 107.

[14] Nakamura K. Identification of ploidy level of the regenerated plants by anther culture in rice [J]. Breeding Science, 1994, 44(1): 19-22.

[15] 周元昌. 孢子甘蓝花培苗倍性的快速鉴定. 福建农林大学学报(自然科学版) [J]. 2002, 31(1): 55-58.