

不同熟性大白菜小孢子植株倍性变异及倍性鉴定方法

方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 朱朝辉

(福建省福州市蔬菜科学研究所, 福建 福州 350012)

摘要: 对不同熟性的大白菜小孢子植株群体的倍性变异进行观察, 研究利用 DNA 流式细胞仪测定、形态学特征鉴定大白菜小孢子植株群体的倍性变异。结果表明, 小孢子植株是倍性水平不同的混合群体; 不同熟性的大白菜小孢子植株群体的倍性分布不同, 中晚熟大白菜小孢子植株双单倍体比例最高, 春大白菜最低; 单倍体植株在组培无性繁殖中部分会自然加倍; DNA 流式细胞仪和形态学方法均可以鉴定群体的倍性水平。

关键词: 大白菜; 小孢子植株; 倍性变异; 倍性鉴定

中图分类号: S 634. 1

文献标识码: A

Variation in microspore derived plant ploidy of Chinese cabbage with different maturation characteristics

FANG Shu gui, CHEN Wen hui, ZENG Xiao ling, ZHU Chao hui

(Fuzhou Institute of Vegetable Research, Fuzhou, Fujian 350012, China)

Abstract: Variation of microspore derived plant ploidy of Chinese cabbage with different maturation characteristics was investigated by means of DNA flow cytometry and morphological identification. The results showed that regenerated populations from the microspores were generally mixed ploidy. The ploidy distribution varied with maturing accessions. The microspore plants of the middle to late maturing Chinese cabbage had the highest proportion of double haploid, and the spring Chinese cabbage the lowest among all tested. Some haploid plantlets doubled naturally in tissue culture. It appeared that DNA flow cytometry and morphological observation could be used to determine the ploidy level.

Key words: Chinese cabbage; microspore derived plants; ploidy variation; ploidy identification

游离小孢子培养技术是获得纯系最快的方法, 是植物育种的主要手段之一。然而小孢子培养的再生植株群体, 往往是单倍体、双单倍体(DH)及其他倍性植株的混合群体, 如何快速有效鉴定植株的倍性、提高小孢子植株的利用率, 是植物育种的关键技术。倍性鉴定传统上主要根据解剖学和染色体计数法进行, 费工费时。近年来, 通过流式细胞仪测定 DNA 相对含量鉴定植物倍性, 已应用于十字花科蔬菜的倍性鉴定^[1-6]。本试验利用 DNA 流式细胞仪测定和形态学特征鉴定研究了不同熟性的大白菜小孢子植株群体的倍性变异, 以期指导不同熟性的大白菜小孢子植株的处理, 达到高效利用的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为不同熟性的大白菜小孢子植株群

体, 其中耐热类型的有: 白阳、庆农、夏阳、福白23、夏珍白; 秋冬类型的有: 181、魁5、丰抗70、95M、德阳01; 耐寒类型的有: 春夏王、春驹、喜春、春夏王、绿星。

在原有试验基础上取易出胚的早熟耐热大白菜和秋冬大白菜杂交种于9月份播种, 耐热基因型于11月开花、秋冬基因型于翌年2月份开花, 进行小孢子培养^[7-8]; 耐寒基因型由于南方冬天温度较高, 在正常季节栽培要在4月份开花, 开花期气温高不适合小孢子培养, 因此将耐寒春大白菜种子发芽经低温春化后于10月下旬播种, 翌年2月份开花进行小孢子培养, 获得小孢子植株后继代培养。不同熟性的小孢子植株根据熟性安排不同季节栽培。

1.2 试验方法

1.2.1 采用 DNA 流式细胞仪进行倍性鉴定

收稿日期: 2009-05-31 初稿; 2009-07-24 修改稿

作者简介: 方淑桂 (1956-), 女, 研究员, 主要从事生物技术与蔬菜遗传育种 (E-mail: fangshugui@126.com)

基金项目: 福建省科技计划重大专项 (2008NZ0002); 福建省重大科技项目 (2003N022); 福州市资助项目 (2000697)

DNA流式细胞仪是德国 Partec GmbH 公司生产的 PA-I, 该倍性分析仪带 PC 和自动分析及倍性判别软件。耐热、秋冬、耐寒大白菜的小孢子苗各取 20 株, 以普通的二倍体大白菜为对照。

测定原理为细胞经荧光染料染色后, 在一定波长的光照下可以发出荧光, 荧光强度与细胞的 DNA 含量成正比。通过测定染色过的细胞发出的荧光强度就可测得其 DNA 的相对含量(即倍性水平)。

切取 1 cm² 左右的叶片绞成碎片, 然后置于有 0.5 mL · partec HR-A 溶液的培养皿中, 利用 Partec 公司的 30 μm CellTrics TM 滤网过滤, 然后转移至样品管中, 置于室温 1 min, 加入 2 mL 的 partec HR-B 溶液, 将样品管与 PA 连接, 约 25 s 后分析仪自动形成代表该样品倍性的 DNA 相对含量峰值图。

倍性确定以已知的二倍体大白菜为对照, 测定时先调整分析仪的放大倍数, 使对照的 DNA 峰值处在 100 线附近。每个待测植株分别测定 1 次, 峰值处在 100 线的被测样本即为二倍体, 而处在 50、200 线的分别为单倍体和四倍体, 其余的为非整倍体。

1.2.2 花粉母细胞压片观察细胞倍性 取直径 2 mm 左右的花蕾, 经 0.002 mol · L⁻¹ 羟基喹啉处理 2 h, 卡诺试剂固定 24 h, 4 ℃下保存于 70% 乙醇中。观察时, 剥取雄蕊, 移至载玻片上, 用解剖针挤出花粉母细胞, 卡宝品红或醋酸洋红染色。盖上盖玻片, 压片, 镜检。

1.2.3 植株形态鉴定 在苗期和生长期观察植株的形态特征(株高、茎秆粗细、绿叶片数、叶柄粗细、叶片厚度等), 成株期观察植株性状、花枝、花器、育性等。

2 结果与分析

2.1 DNA 流式细胞仪倍性鉴定

流式细胞仪倍性检测结果, 二倍体(对照)与双单倍体的分离峰都出现在荧光强度为 100 处(图 1A), 二者没什么区别; 单倍体的分离峰出现在荧光强度为 50 处(图 1-B); 四倍体分离峰出现在 200 处; 出现在其他位置则为其他倍性的材料。测定的 60 株小孢子植株群体中, 单倍体、双单倍体、四倍体及非整倍体同时存在(表 1)。其中, 双单倍体比例最高的是秋冬基因型, 达到 80%; 耐热基因型次高, 达到 75%; 耐寒基因型最低, 只有 55%。小孢子植株中的单倍体, 耐寒基因型比率最高为 30%; 耐热基因型和秋冬基因型一样, 都只

有 15%。四倍体植株不同熟性的大白菜出现比例一样。非整倍体植株是耐寒基因型最多, 达 10%。表明不同熟性的大白菜小孢子植株的自然加倍率有明显差异。用花粉母细胞染色体计数法对 60 株小孢子植株进行跟踪观察分析, 其中 56 株与 DNA 流式细胞仪鉴定结果一致, 有 4 株死亡, 即流式细胞仪测定法对成活植株倍性鉴定的准确率为 93.3%。

表 1 大白菜小孢子植株 DNA 流式细胞仪倍性鉴定结果

Table 1 Ploidy level of microspore derived plants in Chinese cabbage determined by DNA flow cytometry

基因型	总株数	单倍体		双单倍体		四倍体		非整倍体	
		株	%	株	%	株	%	株	%
耐热	20	3	15	15	75	1	5	1	5
秋冬	20	3	15	16	80	1	5	0	0
耐寒	20	6	30	11	55	1	5	2	10

2.2 小孢子植株的形态特征鉴定

以花粉母细胞染色体计数法鉴定验证植株形态特征鉴定, 准确率达 90% 以上。根据形态特征鉴定, 结果不同倍性的小孢子再生植株群体, 苗期和成株期形态特征均存在较大差异。苗期: 双单倍体植株与正常二倍体一样, 生长正常; 单倍体植株幼苗叶片瘦小、叶色黄, 植株较弱, 部分植株陆续死亡; 四倍体植株幼苗叶片肥大、叶色绿, 植株生长健壮; 非整倍体植株移栽不易成活。不同倍性的小孢子植株成株期、开花期形态和育性表现差异较大。双单倍体植株(DH)与二倍体(对照)一样, 生长正常, 自然开花结实正常; 单倍体植株表现植株矮小、分枝多、花枝细、花蕾小、花药小而透明无花粉, 人工授粉不结实; 多倍体植株外观性状表现巨大性, 植株、花枝、花蕾、花药、柱头均很大, 但花药内无花粉, 人工授粉能结实但无种子。

植株的形态特征综合鉴定结果, 不同熟性的大白菜培养的小孢子再生植株倍性表现不同(表 2)。耐热基因型 180 株中双单倍体有 136 株, 占 75.6%; 单倍体有 25 株, 占 13.9%; 四倍体 2 株; 17 株中期死亡。在秋冬基因型 256 株中双单倍体 200 株, 占 78.1%; 单倍体 33 株, 占 12.9%; 四倍体 5 株, 占 2.0%; 18 株中期死亡。耐寒基因型 140 株中双单倍体只有 58 株, 占 41.4%; 单倍体 54 株, 占 38.6%; 四倍体 4 株, 死亡 24 株。形态特征鉴定的结果与流式细胞仪测定的相一致, 即秋冬基因型双单倍体比例最高, 耐

寒基因型单倍体比例最高。

表 2 大白菜小孢子植株形态学鉴定结果

Table 2 Ploidy level of microspore derived plants in Chinese cabbage identified by morphological characteristics

基因型	总株数	单倍体		双单倍体		四倍体	
		株	%	株	%	株	%
耐热	180	25	13.9	136	75.6	2	1.1
秋冬	256	33	12.9	200	78.1	5	2.0
耐寒	140	54	38.6	58	41.4	4	2.9

同时还发现同一个胚状体的无性繁殖的再生植株倍性产生变化。耐寒基因型中有 3 个单倍体胚经无性繁殖产生 19 株中有 8 株是双单倍体, 占 42.1%, 10 株是单倍体, 死亡 1 株; 秋冬基因型有 5 个单倍体胚的无性繁殖 35 株中有 10 株是双单倍体, 占 28.6%, 单倍体 21 株。耐热基因型只有 1 个胚 8 株无性繁殖苗中的 1 株产生加倍。说明单倍体植株在无性繁殖中染色体会自然加倍。

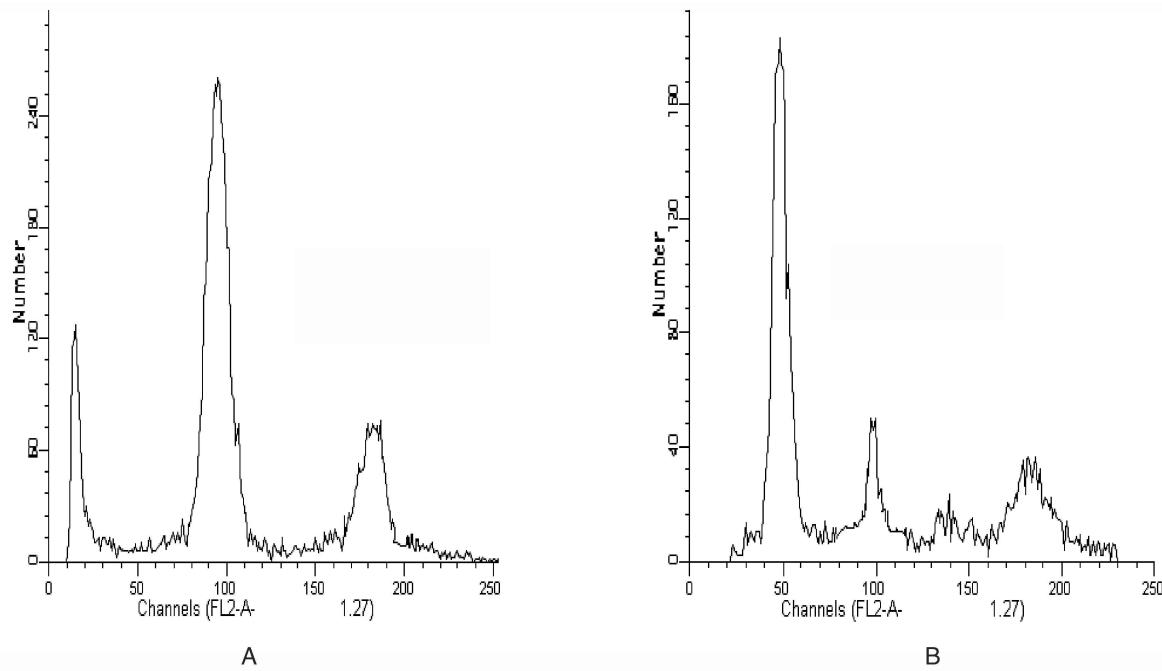


图 1 不同倍性植株的 DNA 含量峰值

Fig 1 DNA content of plants with different ploidy

注: A- 双单倍体; B- 单倍体。

3 结论与讨论

本试验以 DNA 流式细胞仪和形态学差异鉴定不同熟性的大白菜小孢子植株群体的染色体倍性, 准确率可达 93%。试验表明两种方法都可用于苗期的倍性鉴定。综合鉴定结果, 不同熟性的大白菜小孢子植株自然加倍率不同, 耐热和秋冬基因型自然加倍率在 70%~80%, 耐寒基因型自然加倍率只有 55%。

DNA 流式细胞仪测定快速、可靠, 通过早期鉴定, 可大量淘汰非双单倍体植株, 节省人力物力, 但仪器昂贵, 一般单位承受不了。植物形态学差异鉴定方法简单、快捷、实用性强, 但要求有一定的专业水平, 对苗期不易区别的植株可种入大田

进行成株期鉴定。成株期的形态特征差异明显, 鉴定简单准确。

对于耐热和秋冬基因型小孢子培养出胚率高, 自然加倍率也较高, 完全没必要进行繁琐的人工加倍, 因此只要通过形态鉴定, 淘汰非双单倍体植株。而耐寒基因型, 由于出胚率低、自然加倍率也较低, 就必须用 DNA 流式细胞仪和形态学在苗期进行鉴定, 并尽早处理单倍体植株, 提高利用率。本试验耐寒大白菜小孢子培养出胚率低、再生植株自然加倍率低, 是否由苗期春化引起还需进一步探讨。

关于大白菜游离小孢子培养胚胎发生的加倍机制, 李菲等^[9]认为胚状体的自然加倍是在胚胎诱导的初期, 即从小孢子诱导启动开始就完成核的自然

加倍。笔者试验中发现,大部分胚状体加倍是在诱导初期完成,但有部分单倍体胚芽在组培快繁中能自然加倍,并随着组培的代数增加自然加倍率也随着上升,这与胡含等^[10]提出的通过增加继代培养次数以提高加倍率相一致。

致谢:本研究得到国家蔬菜工程技术研究中心刘凡研究员的悉心指导,特此致谢。

参考文献:

- [1] 周元昌, Kennedy S. 孢子甘蓝花培苗倍性的快速鉴定 [J]. 福建农业大学学报: 自然科学版, 2002, 31 (1): 55- 58.
- [2] 周伟军, 毛碧增, 唐桂香, 等. 甘蓝型油菜小孢子再生植株染色体倍数检测研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35 (6): 724- 727.
- [3] 张振超, 张蜀宁, 张伟, 等. 四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定 [J]. 西北植物学报, 2007, 27 (1): 28- 32.
- [4] 韩阳, 叶雪凌, 冯群. 大白菜小孢子植株的倍性变异及倍性鉴定方法的研究 [J]. 中国蔬菜, 2006 (11): 9- 11.
- [5] FARNHAM M W, CANIGLIA E J, THOMAS C E. Efficient ploidy determination of anther-derived broccoli [J]. Hortscience, 1998, 32 (2): 323- 327.
- [6] WANG M, FARNHAM M W, NANNES J S P. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture [J]. Plant Breeding, 1999, 118: 249- 252.
- [7] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 大白菜游离小孢子培养技术研究初报 [J]. 福建农业学报, 2003, 18 (2): 123- 126.
- [8] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 大白菜游离小孢子培养若干因素探讨 [J]. 福建农业学报, 2004, 19 (4): 243- 246.
- [9] 李菲, 张淑江, 章时蕃, 等. 大白菜游离小孢子培养胚胎发生中的加倍机制 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (5): 947- 978.
- [10] 胡含, 郴子英, 贾双娥. 小麦花粉愈伤组织植株体细胞的变异 [J]. 遗传学报, 1978, 5 (1): 23- 30.

(责任编辑: 林海清)