

实验目的：

1. 加深学生对光周期与植物成花诱导的理解；
2. 系统掌握植物花药离体培养及再生植株倍型鉴定的实验流程和操作步骤；
3. 培养学生对单倍体育种技术的知识整合能力。

实验原理：

1. 光周期对植物成花的影响：

光周期：一天中白天和黑夜的相对长度，称为光周期。

光周期现象：植物对白天和黑夜相对长度的反应，称为光周期现象。

按照植物对光周期的反应，可将植物分成三类：

长日照植物（日照必须大于某一临界日长，一般 12 h 以上，或者暗期必须短于一定时数才能开花的植物）；

短日照植物（日照必须短于某一临界日长，一般 12 h 以下，或者暗期必须超过一定时数才能开花的植物）；

日中性植物（对光照长短没有严格要求，任何光照下都能开花的植物）
甘薯为短日照植物，需要满足特定周期才能开花。

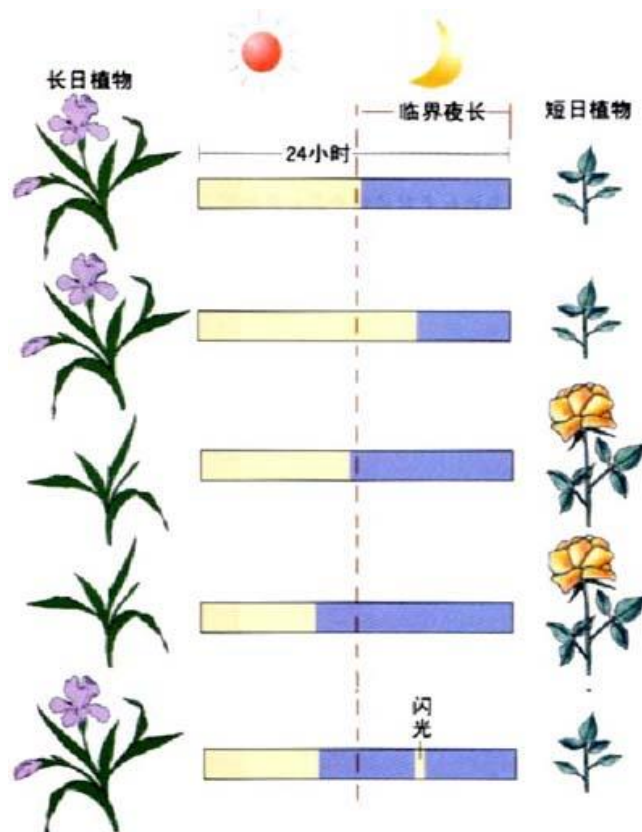


图 1. 光周期对植物开花的影响

2. 花药离体培养:

离体培养花粉处于单核时期（小孢子）的花药。把花粉发育到一定阶段的花药接种到培养基上，来改变花药内花粉粒的发育程序，使其分裂形成细胞团，进而分化成胚状体，形成愈伤组织，由愈伤组织再分化成植株。由于花粉已是单倍体细胞，诱发它经愈伤组织或胚状体发育而成的植株都是单倍体，且不受花药的药隔、药壁、花丝等体细胞的干扰。

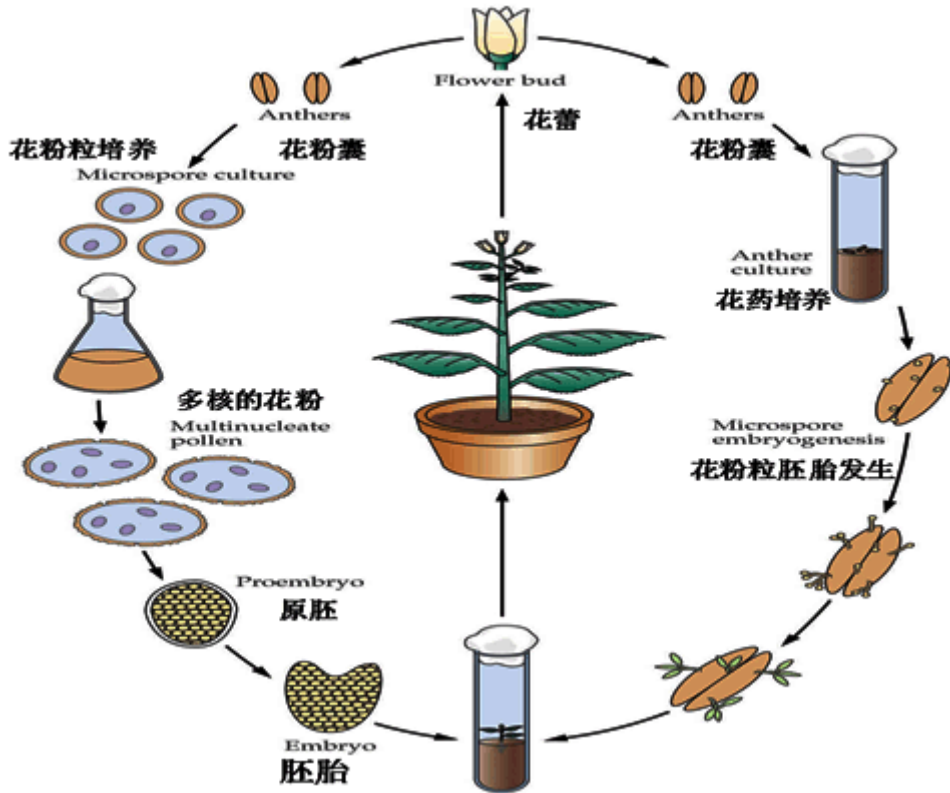


图 2. 花药离体培养过程

离体培养过程中，组成培养基的主要成分有五类：分别是无机营养物、碳源、维生素、生长调节物质和有机附加物等。其中，培养基中的激素比例至关重要。生长素/细胞分裂素的比值高时，促进根的分化，比值低时，促进芽的分化。本软件中推荐使用的激素比例为：

诱导愈伤组织时，生长素：细胞分裂素为 1:1；

诱导不定芽时，生长素：细胞分裂素为 1:2 或 1:3；

诱导不定根时，生长素：细胞分裂素为 2:1 或 3:1；

3. 流式细胞仪检测植物倍性水平：

流式细胞术是一项广为使用、基于激光的技术，用于检测细胞或颗粒特性。流式细胞术广泛用于分析细胞表面和细胞内分子的表达，表征和定义异质细胞群中的不同细胞类型，评估分离亚群的纯度以及分析细胞大小和体积。该技术可同时对单个细胞进行多参数分析。

流式细胞仪利用散射光和发射荧光组合来产生数据。通过流式细胞仪运行样本（通常是细胞悬液）时，鞘液以流体动力学方式促使细胞悬液通过小喷嘴，并以单细胞方式通过激光（图 3）。随后，通过检测器收集前向和侧向散射光（分别为 FSC 和 SSC），以及染色细胞发射的荧光。FSC 与细胞大小有关，SSC 与细胞的粒度成正比，可以仅根据细胞大小和粒度来区分细胞群。

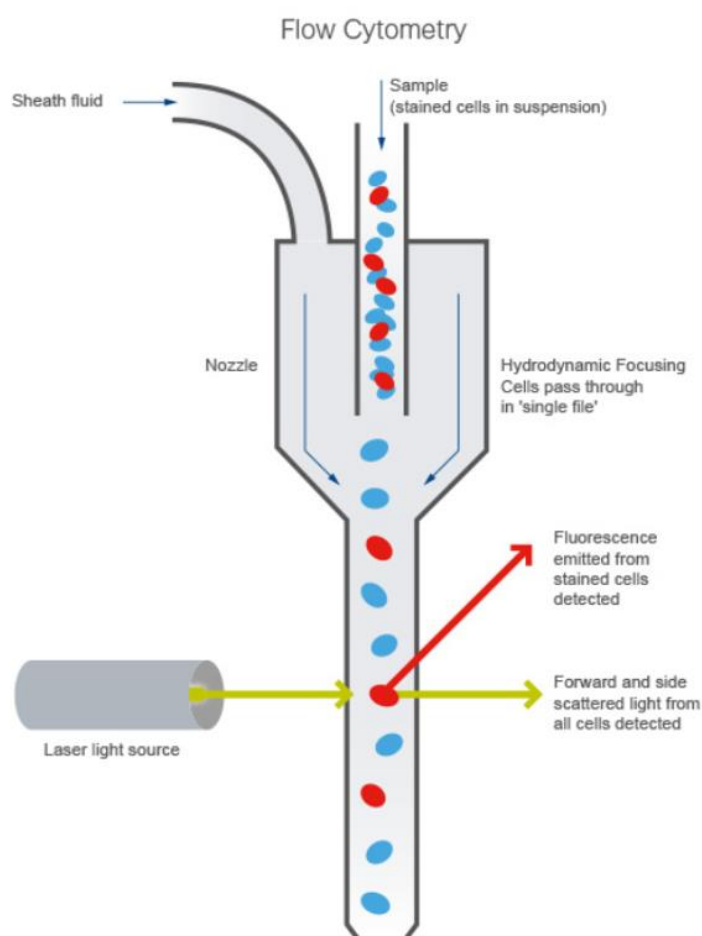


图 3. 流式细胞仪工作原理图

利用幼嫩植物的叶片提取细胞核，经荧光染料碘化丙啶（PI）染色后，用于流式细胞仪检测。

提取的细胞核在仪器中单个的流过一个细管，在 488 nm 激发光的照射下发出 620 nm 的橙色荧光，荧光强度与结合在 DNA 上的 PI 量成正比。根据每一个粒子的荧光强度，就可以快速地测定每个细胞核的 DNA 含量。通过统计分析，确定荧光强度最集中的一组（峰值）为 DNA 的相对含量（图 4）。

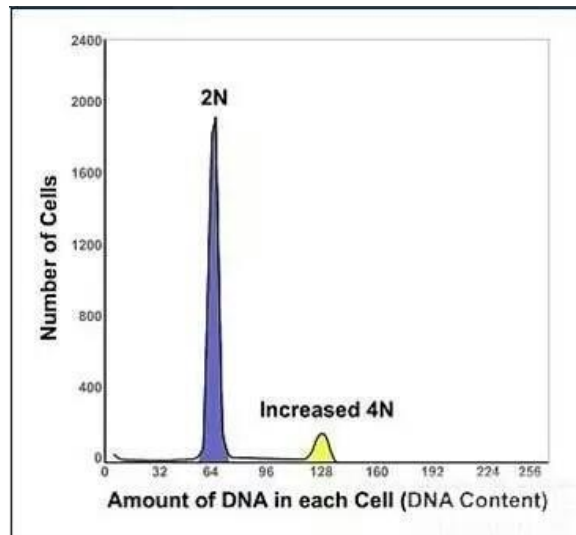


图 4. 流式细胞仪测定不同倍性细胞内 DNA 含量峰形图