

秋水仙素对蓝莓染色体加倍的效应及初步鉴定

张永福,赵海,岳绍雄,杨婷,包启凡,鲁桂芝,谢映美

(昆明学院农学院,云南昆明650214)

摘要:以高丛康维尔蓝莓组培苗为材料,用不同质量浓度的秋水仙素通过浸渍法和培养法进行染色体加倍研究,从形态学、生理生化学、解剖学及细胞学进行比较,以确定能够诱导出多倍体的最佳处理方法和处理质量浓度. 结果发现,在形态指标上,0.5,2.0,4.0 mg/mL 秋水仙素浸渍处理 1 d 及 0.4 mg/mL 秋水仙素培养 10 d 后,蓝莓的叶长、叶宽、茎直径、叶厚、茎直径的平均值均显著大于 CK;在解剖结构上,0.5 mg/mL 浸渍 1 d 和 0.4 mg/mL 培养 10 d 后,其气孔变大,密度变低,为椭圆形,保卫细胞的淀粉粒减少,0.5,2.0 mg/mL 秋水仙素浸渍 1 d 和 0.4 mg/mL 培养 10 d 后均使细胞核明显变大;在生理指标上,0.5 mg/mL 浸渍处理 1 d 后显著提高了蓝莓 SOD 酶活性,2.0,4.0 mg/mL 秋水仙素浸渍处理 1 d 能够显著提高可溶性蛋白质含量,其中后者还显著提高了其叶绿素 A 含量. 可见,0.5 mg/mL 浸渍 1 d 和 0.4 mg/mL 培养 10 d 后,蓝莓植株发生多倍性变异的可能性最大,但还需后续的大田鉴定,才能最终确定多倍体植株.

关键词: 蓝莓;秋水仙碱;诱变;多倍体;鉴定

中图分类号: S663.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2015)03-0072-05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2015.03.017

Effect of Colchicine on Blueberry Chromosome Doubling and Preliminary Identification

ZHANG Yong-fu, ZHAO Hai, YUE Shao-xiong, YANG Ting, BAO Qi-fan, LU Gui-zhi, XUE Ying-mei

(Agriculture College, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

Abstract: Taking High-bush Convair blueberry plantlets as materials, through impregnation and culture with colchicine of different concentrations, chromosome doubling was studied. From the morphology, physiology and biochemistry, anatomy and cytology were compared in order to determine the best treatment method and treatment quality concentration to induce polyploidy. The results showed that, in morphology and anatomy, the mean of blueberry the leaf length, leaf width, stem diameter and leaf thickness were significantly greater than CK after 0.5, 2.0 and 4.0 mg/mL colchicine soaking for 1 d and 0.4 mg/mL colchicine culture for 10 d; in anatomical structure, 0.5 mg/mL impregnated for 1 d and 0.4 mg/mL culture for 10 d, the stomatal density of blueberry becomes larger, low, oval, starch grains in guard cells reduced, and the nucleus becomes larger after 0.5, 2.0 mg/mL soaking for 1 d and 0.4 mg/mL colchicine impregnated culture for 10 d were significantly larger nuclear; in the physiological indexes, 0.5 mg/mL impregnated for 1 d significantly increased SOD activity of blueberry, colchicine soaking for 1 d and 4.0 mg/mL could significantly improve soluble protein content, the latter also significantly increased chlorophyll a content. Thus, after 10 d culture 0.5 mg/mL impregnated for 1 d and 0.4 mg/mL, the possibility of the occurrence of the blueberry plant polyploidy variant of the maximum, but need field identification of follow-up to ultimately determine the polyploid plants.

Key words: blueberry; colchicine; mutagenesis; polyploidy; identification

蓝莓为越橘科(Vacciniaceae)越橘属(Vaccinium)植物,是一种多年生灌木小浆果果树,其果实富含花色苷、维生素及其他营养物质,保健及药用价值较高,已被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一.但目前普遍栽培的康维尔蓝莓为二倍体,存在果实较小,营养物质含量和产量相对较低的

缺陷,而多倍体蓝莓不仅枝繁叶茂,生长势和抗性强,而且果实产量高、品质好、果大,为选育优质越橘新品种提供了重要途径.现在蓝莓品种的多倍体诱导是我国多倍体离体诱导的重要研究对象.目前,国内外也有一些利用秋水仙素进行蓝莓多倍体诱导的

收稿日期:2015-03-07

作者简介:张永福(1981—),男,云南弥勒人,副教授,博士,主要从事果树抗性生理方面的研究.

报道,如游来秋等^[1]用秋水仙碱处理半高丛品种组培苗茎段来诱导多倍体,陈冰心^[2]对杰兔品种取其叶片再生芽苗的茎尖进行培养诱导多倍体,但最终均没有后续报道和所获多倍体蓝莓苗成功应用于生产的报道.为了能够获得康维尔蓝莓多倍体并能够应用于生产,本研究选用康维尔蓝莓组培苗进行诱导,利用组织培养技术并结合秋水仙碱处理,通过浸渍法和培养法,选育多倍体康维尔蓝莓.旨在获得多倍体植株,使现有康维尔蓝莓的果实表现出巨大性,以及优质、高产的育种目标,使该品种单果小的缺陷得到改善,同时为蓝莓多倍体育种提供理论和实践依据.

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为昆明学院农学院组培室培育的“康维尔”蓝莓组培苗,最初原材料来自澳大利亚.

1.2 方法

在2014年3月初选取110瓶长势基本一致的康维尔蓝莓组培苗,进行诱导处理.浸渍法处理质量浓度为0.5,1.0,2.0,4.0 mg/mL,处理时间均为1 d,处理方法为选取健壮的蓝莓组培苗切断只保留茎中段,放置于不同质量浓度秋水仙素溶液中浸泡24 h,期间不时振荡摇动,之后用无菌水洗净后置于含有2 mg/L玉米素的WPM培养基中进行培养.培养法处理质量浓度为0.025,0.050,0.100,0.200,0.400,0.800 mg/mL,培养时间根据质量浓度依次为30,25,20,15,10,5 d,表示为0.025 mg/mL(30 d),0.050 mg/mL(25 d),0.100 mg/mL(20 d),0.200 mg/mL(15 d),0.400 mg/mL(10 d)和0.800 mg/mL(5 d),具体处理方法为选取健壮的蓝莓组培苗切断只保留茎中段,将茎段接种于含有上述不同质量浓度秋水仙素的WPM培养基(含2 mg/L玉米素)中进行培养.

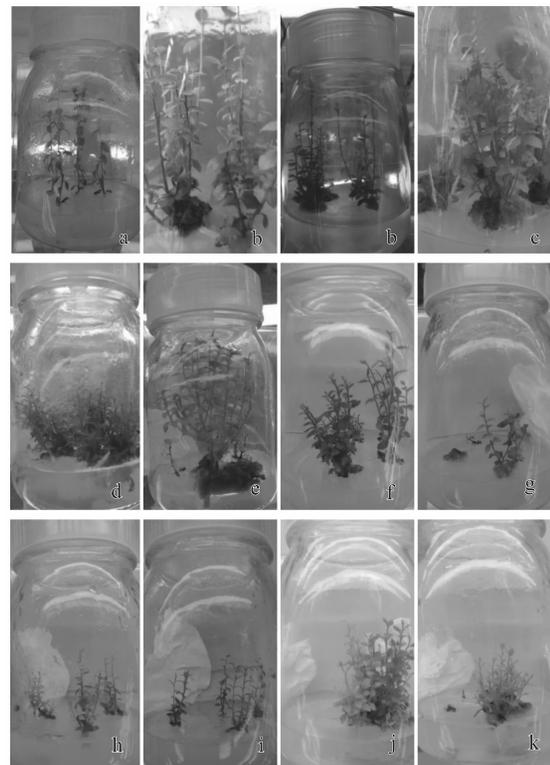
形态特征观察的方法为用游标卡尺测量各处理苗茎的直径、叶片厚度等;用刻度尺测量、叶宽、叶长等.叶表皮气孔密度和大小观测的方法为叶片剪成1.0 cm×0.5 cm的小块,置于碘-碘化钾液中进行染色,浸泡24 h,Olympus光学显微镜观察,并用测微尺测定气孔大小.茎尖细胞观察的方法为对处理材料茎尖先用FAA溶液固定24 h,随后用梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片,脱蜡,用苏木精-伊红染色^[3],观察细胞及核的大小.采用愈

创木酚-过氧化氢显色法测定POD活性,采用氮蓝四唑光还原法测定SOD活性,叶绿素含量(质量分数)的测定采用酒精提取法,蛋白质含量(质量分数)的测定采用考马斯亮蓝显色法^[4].

2 结果与分析

2.1 试验材料处理期间植株生长状况

通过观察处理后材料茎段和叶片受伤状况,浸渍法的植株在WPM培养基中培养5 d,2.0,4.0 mg/mL的茎段上有叶片脱落,且4.0 mg/mL的茎段上出现黑色.培养法的0.050 mg/mL(25 d),0.200 mg/mL(15 d),0.400 mg/mL(10 d),0.800 mg/mL(5 d)处理后发现其茎段下端变黑,伴有叶子脱落,生长出现停滞的现象,随后对浸渍法处理的进行转接.转接后各处理的蓝莓苗生长状况正常,见图1.



a. CK; b.浸渍法0.500 mg/mL; c.浸渍法1.000 mg/mL;
d.浸渍法2.000 mg/mL; e.浸渍法4.000 mg/mL;
f.培养法0.025 mg/mL(30 d); g.培养法0.050 mg/mL(25 d);
h.培养法0.100 mg/mL(20 d); i.培养法0.200 mg/mL(15 d);
j.培养法0.400 mg/mL(10 d); k.培养法0.800 mg/mL(5 d).

图1 各处理对蓝莓植株生长状况的影响

2.2 形态特征鉴定

从下表1可看出,在叶长、叶宽、叶厚、茎直径等几个指标中,浸渍法处理植株总体高于CK,而部分培养法却低于CK,且培养时间越长,植株受到的毒害作用越大.与CK相比较,浸渍法0.5 mg/mL处理

后,叶长为 0.74 mm、叶宽为 0.40 mm、叶厚为 0.04 mm;2.0 mg/mL 处理后,叶厚为 0.03 mm,茎直径为 0.34 mm;4.0 mg/mL 处理后,叶厚为 0.03 mm,且差异均有统计学意义;培养法中,仅 0.400 mg/mL

(10 d)处理的在叶长、叶宽、叶厚上显著大于 CK. 可见,从形态初步鉴定对蓝莓组培苗染色体加倍效果较好的有浸渍法 0.5, 2.0, 4.0 mg/mL 和培养法 0.400 mg/mL(10 d)秋水仙素处理的蓝莓组培苗.

表 1 秋水仙素处理后的形态特征鉴定结果

处理 方法	处理质量浓度 /(mg · mL ⁻¹)	处理时间 /d	叶长 /mm	叶宽 /mm	叶厚 /mm	茎直径 /mm
浸渍法	0.500	1	6.22 ± 160.00 a	3.81 ± 1.02 a	0.08 ± 0.02 a	0.61 ± 0.23 bcd
	1.000	1	5.51 ± 1.12 b	3.33 ± 0.76 c	0.08 ± 0.03 ab	0.65 ± 0.47 bc
	2.000	1	4.87 ± 1.24 cd	2.77 ± 0.79 e	0.07 ± 0.02 abc	0.89 ± 1.17 a
	4.000	1	5.50 ± 1.43 b	3.78 ± 0.86 ab	0.07 ± 0.02 abc	0.71 ± 0.49 ab
培养法	0.025	30	4.42 ± 0.89 de	2.84 ± 0.74 de	0.06 ± 0.01 bed	0.45 ± 0.13 cde
	0.050	25	4.19 ± 0.88 e	2.68 ± 0.60 e	0.05 ± 0.01 cde	0.39 ± 0.05 de
	0.100	20	4.76 ± 0.99 cde	3.11 ± 0.71 cde	0.07 ± 0.06 abc	0.40 ± 0.06 de
	0.200	15	4.46 ± 0.97 de	2.74 ± 0.67 e	0.06 ± 0.02 bed	0.39 ± 0.07 de
	0.400	10	5.11 ± 0.73 bc	3.19 ± 0.58 cd	0.07 ± 0.01 abc	0.43 ± 0.16 cde
	0.800	5	4.45 ± 0.78 de	2.74 ± 0.64 e	0.04 ± 0.01 e	0.34 ± 0.07 e
CK	0.000		5.48 ± 0.96 b	3.41 ± 0.64 bc	0.04 ± 0.01 de	0.55 ± 0.13 bcde

注:表中同一列数字旁不同字母表示通过 Duncan 新复级差检验差异显著($p < 0.05$),下表同.

2.3 生理指标鉴定

下表 2 显示,各处理均对 SOD, POD 活性及蛋白质和叶绿素含量(质量分数,下同)均造成较大的影响. 浸渍法 0.500 mg/mL 处理使蓝莓 SOD 活性比 CK 高 70.54 U/g,其余各处理均使 SOD 活性低于 CK,除 0.025 mg/mL(30 d)外,差异均有统计学意义;各处理均使蓝莓 POD 活性显著低于 CK;各处理均使蓝莓蛋白质含量(质量分数,下同)显著高于 CK,其中增加幅度最大的是浸渍法 2.0, 4.0 mg/mL,分别增加 4.05, 4.16 mg/g;浸渍法 4.0 mg/mL 处理使蓝莓叶绿素 A 质量分数增加了

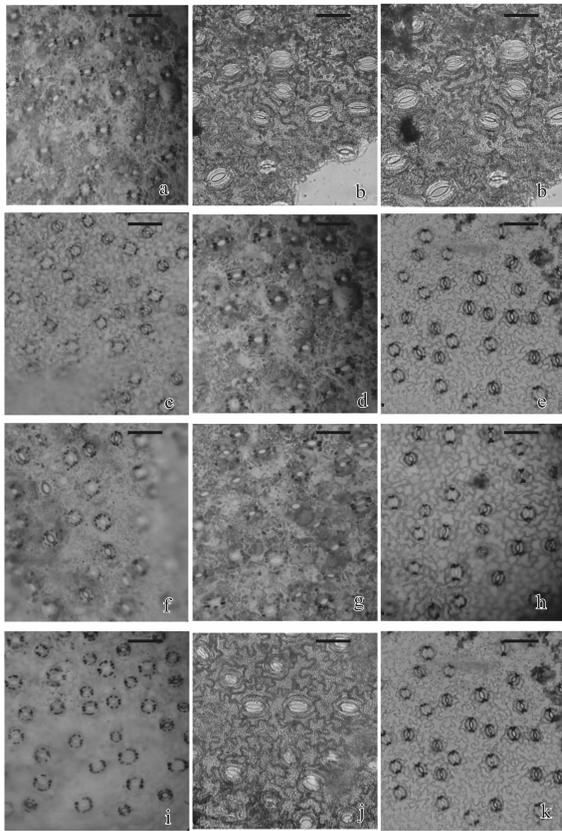
0.33 mg/g,达到差异显著性水平,其余几个浸渍法处理的差异均无统计学意义,而所有培养法处理的蓝莓叶绿素 A 含量均显著低于 CK;各处理对叶绿素 B 含量的影响情况较为复杂,浸渍法普遍使叶绿素 B 含量降低,其中降低幅度最大的是 1.0, 2.0 mg/mL 秋水仙素处理,其分别降低了 0.37, 0.40 mg/g,达差异显著性水平. 培养法则使蓝莓叶绿素 B 含量有不同程度的上升,除 0.4 mg/mL 处理外,其余差异均有统计学意义;浸渍法除 4.0 mg/mL 外,其余各处理均使叶绿素总含量下降,其中以培养法下降的幅度较大.

表 2 主要生理指标鉴定结果

处理 方法	处理质 量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	处理 时间 /d	SOD 活性/ (U · g ⁻¹)	POD 活性/[U · (mg · min) ⁻¹]	蛋白质 量分数/ (mg · g ⁻¹)	叶绿素 A 质量分数/ (mg · g ⁻¹)	叶绿素 B 质量分数/ (mg · g ⁻¹)	叶绿素总 质量分数/ (mg · g ⁻¹)
浸渍法	0.500	1	370.54 ± 163.14 a	0.82 ± 0.43 c	1.31 ± 0.29 d	1.71 ± 0.41 b	0.65 ± 0.34 cd	2.35 ± 0.41 bc
	1.000	1	24.71 ± 27.12 f	0.88 ± 0.49 c	2.96 ± 0.35 b	1.45 ± 0.46 b	0.37 ± 0.19 de	1.82 ± 0.46 bcd
	2.000	1	17.85 ± 14.75 f	0.84 ± 1.65 c	4.55 ± 0.49 a	1.58 ± 0.30 b	0.34 ± 0.07 e	1.92 ± 0.30 bcd
	4.000	1	51.22 ± 37.04 fg	0.26 ± 0.09 c	4.66 ± 0.61 a	2.20 ± 0.91 a	0.72 ± 0.06 c	2.92 ± 0.91 a
培养法	0.025	30	230.69 ± 44.58 bc	0.29 ± 0.17 c	1.89 ± 0.24 c	1.45 ± 0.28 c	1.24 ± 0.31 a	2.69 ± 0.28 bcd
	0.050	25	114.57 ± 57.76 def	1.50 ± 0.95 b	3.03 ± 0.14 b	1.31 ± 0.24 c	1.10 ± 0.24 ab	2.41 ± 0.23 cde
	0.100	20	182.59 ± 63.40 cd	0.74 ± 0.33 c	1.77 ± 0.32 c	1.45 ± 0.30 c	1.27 ± 0.30 a	2.72 ± 0.30 bcd
	0.200	15	118.23 ± 67.36 def	1.68 ± 1.55 b	2.98 ± 0.36 c	1.35 ± 0.18 c	1.13 ± 0.20 ab	2.48 ± 0.18 cde
	0.400	10	132.85 ± 60.11 de	0.83 ± 0.76 c	3.05 ± 0.33 b	0.98 ± 0.22 c	0.79 ± 0.22 c	1.77 ± 0.22 e
	0.800	5	73.57 ± 127.13 efg	0.58 ± 0.39 c	2.82 ± 0.51 b	1.15 ± 0.39 c	1.12 ± 0.21 ab	2.27 ± 0.39 de
CK	0.000		300.10 ± 159.96 b	3.64 ± 1.74 a	0.50 ± 0.09 e	1.87 ± 0.20 b	0.74 ± 0.06 c	2.61 ± 0.20 ab

2.4 气孔及茎尖生长点细胞观察

从下页表3和图2中可以看出,各处理对蓝莓气孔大小和密度均有一定的影响,处理后总体上气孔变大,密度变低,尤其是浸渍法0.5 mg/mL和培养法0.400 mg/mL(10 d)这两个处理显著增大了气孔的长度和宽度,显著降低了气孔的密度.处理后对气孔保卫细胞淀粉粒数目的影响也较大,其中浸渍法1.0,2.0 mg/mL和培养法0.025 mg/mL(30 d),0.050 mg/mL(25 d),0.100 mg/mL(20 d)和0.200 mg/mL(15 d)使气孔保卫细胞淀粉粒数量显著增多,而浸渍法0.5 mg/mL和培养法0.400 mg/mL(10 d)则使细胞保卫细胞淀粉粒数目显著减少.此外,各处理的气孔多数呈椭圆形,而CK则呈圆形.

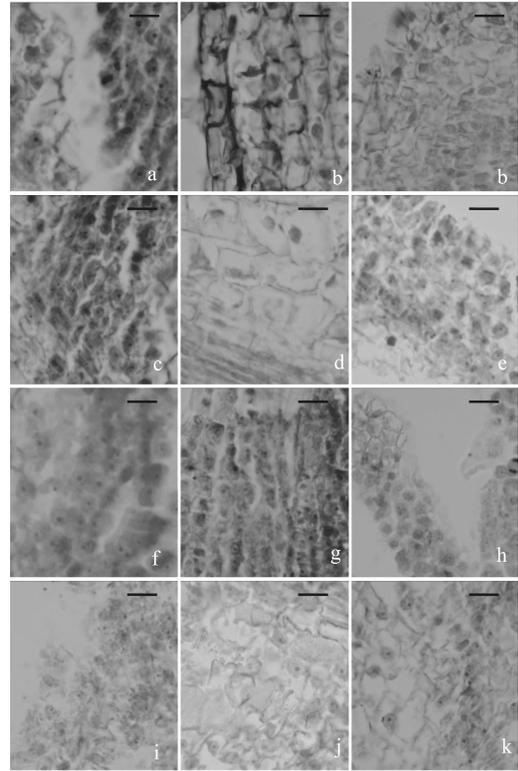


a. CK; b. 浸渍法0.500 mg/mL; c. 浸渍法1.000 mg/mL; d. 浸渍法2.000 mg/mL; e. 浸渍法4.000 mg/mL; f. 培养法0.025 mg/mL(30 d); g. 培养法0.050 mg/mL(25 d); h. 培养法0.100 mg/mL(20 d); i. 培养法0.200 mg/mL(15 d); j. 培养法0.400 mg/mL(10 d); k. 培养法0.800 mg/mL(5 d). 标尺长度=25 μm.

图2 气孔观察

图3为茎尖生长点石蜡切片图,从图3可看出,浸渍法0.5,2.0 mg/mL和培养法0.400 mg/mL(10 d)处理的细胞和细胞核明显大于CK.结合以上鉴定结果可知,浸渍法0.5,2.0 mg/mL和培养法0.400 mg/mL

(10 d)处理对蓝莓染色体加倍的效果最好.



a. CK; b. 浸渍法0.500 mg/mL; c. 浸渍法1.000 mg/mL; d. 浸渍法2.000 mg/mL; e. 浸渍法4.000 mg/mL; f. 培养法0.025 mg/mL(30 d); g. 培养法0.050 mg/mL(25 d); h. 培养法0.100 mg/mL(20 d); i. 培养法0.200 mg/mL(15 d); j. 培养法0.400 mg/mL(10 d); k. 培养法0.800 mg/mL(5 d). 标尺长度=25 μm.

图3 茎尖生长点细胞观察

3 讨论与结论

目前化学诱导多倍体分为活体诱导和离体诱导.活体诱导处理部位可为幼苗、芽等,此方法在蔬菜作物上获得了同源四倍体、三倍体品系,但其缺陷是诱变率低、嵌合率高等.离体培养结合化学诱变剂处理可以获得较高比例的多倍体,且离体诱导的实验条件更容易控制,实验结果重复性好,从而减小误差.本研究通过秋水仙素和组织培养相结合,采用浸渍法和培养法对康维尔蓝莓幼嫩茎段进行诱导处理,结果表明,浸渍法诱变率高于培养法,原因可能是浸渍法处理时茎尖与秋水仙素接触更密切,而培养法茎尖与秋水仙素接触时间过长,毒害作用大,且诱变剂用量大、成本高.

秋水仙素主要作用于细胞分裂旺盛的细胞,选取幼嫩、分化力强的蓝莓茎段作为处理材料,获得多倍体的可能性较大.材料经秋水仙素处理后,由于受到药剂的毒害作用,导致其前期生长缓慢,且处理质量浓度越大,毒害作用越大,材料的死亡率越

高^[5-9].但也有报道^[10]用高质量浓度秋水仙素进行短时间处理效果较好.而本研究显示,用0.5 mg/mL秋水仙素对蓝莓茎段进行浸渍处理1 d和用0.4 mg/mL秋水仙素培养10 d诱变效果最好.

表3 气孔观察结果

处理 方法	处理质量浓度 /(mg·mL ⁻¹)	处理时间 /d	气孔长度 /μm	气孔宽度 /μm	气孔密度 /(个·mm ⁻²)	气孔保卫细胞 淀粉粒数目/个
浸渍法	0.500	1	42.40 ± 5.05 a	8.22 ± 1.36 a	100.00 ± 21.30 d	1.31 ± 0.14 g
	1.000	1	9.69 ± 3.40 cd	6.43 ± 1.49 bc	262.13 ± 40.11 a	8.93 ± 1.09 b
	2.000	1	12.05 ± 1.00 c	7.03 ± 0.74 ab	200.65 ± 55.76 abc	7.48 ± 0.87 bc
	4.000	1	10.75 ± 1.29 c	5.04 ± 0.39 cd	150.87 ± 40.21 bcd	4.94 ± 0.55 e
培养法	0.025	30	9.89 ± 0.45 cd	5.50 ± 0.37 cd	250.25 ± 39.76 a	10.38 ± 1.36 ab
	0.050	25	9.47 ± 0.73 cd	5.37 ± 0.85 cd	225.86 ± 28.33 ab	8.47 ± 0.99 b
	0.100	20	11.89 ± 0.46 c	4.03 ± 0.43 d	227.32 ± 64.21 ab	7.21 ± 0.76 bc
	0.200	15	9.25 ± 1.55 cd	4.37 ± 1.88 d	175.31 ± 28.28 abc	12.31 ± 1.33 a
	0.400	10	20.67 ± 0.22 b	7.12 ± 0.47 ab	110.31 ± 20.45 d	2.53 ± 0.32 f
	0.800	5	11.32 ± 9.87 c	5.12 ± 0.85 cd	125.67 ± 28.37 cd	6.23 ± 0.76 cd
CK	0.000		9.14 ± 1.59 cd	5.41 ± 0.61 cd	212.90 ± 64.11 abc	5.21 ± 0.82 de

多倍体育种前景广阔,蓝莓的传统繁殖难度高,时间长,生长环境受限等,采用组织培养技术结合秋水仙素处理,可以较快选育出一批高品质、高产量、适应性增强的种质资源.本研究目前得到的疑似加倍小苗还处于炼苗期,要确定所处理植株是否为多倍体的植株,尚需要进行有效的倍性鉴定.本研究通过对处理后发生变异的康维尔蓝莓植株与CK相比较发现,浸渍法0.5,2.0,4.0 mg/mL和培养法0.4 mg/mL(10 d)处理后植株茎秆变粗,叶片颜色加深,叶面积增大,叶片茸毛增多等特征;多倍体与二倍体相比具有气孔大、密度低的特征,浸渍法0.5 mg/mL处理1 d和培养法0.4 mg/mL(10 d)处理可得到气孔长度和宽度均较大,而密度较小,以及淀粉粒较少的蓝莓苗;在浸渍法0.5,2.0 mg/mL和培养法0.4 mg/mL(10 d)处理的细胞核明显大于CK,表现出细胞的巨大性;SOD和POD是植物的抗氧化酶,相对而言浸渍法处理后蓝莓苗SOD,POD活性和蛋白质含量高于培养法.

本研究利用秋水仙素作为诱导剂结合离体培养技术诱导康维尔蓝莓得到了较好的效果.浸渍法0.5 mg/mL处理1 d和培养法0.4 mg/mL处理10 d诱变效果较好.这两个处理的植株在叶宽、叶长、叶厚、茎粗、SOD活性、蛋白质含量、气孔大小及细胞核大小等方面均高于CK,气孔密度和气孔保卫细胞淀粉粒数目则少于CK.但本研究获得的疑似多倍体植株还需进行大田移栽,通过一段时间的观察,利用最可靠的染色体计数法和流式细胞仪分析^[11],才能确定是

否为多倍体植株,并为筛选高产、优质的蓝莓多倍体提供种质资源.

[参考文献]

- [1]游来秋.越橘离体培养倍性育种研究[D].长春:吉林农业大学,2008.
- [2]陈冰心.兔眼蓝莓叶片再生及多倍体诱导的研究[D].长沙:湖南师范大学,2014.
- [3]朱薇.植物染色体及染色体技术[M].北京:科学出版社,1982.
- [4]邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [5]陈延惠,刘丽,李洪涛.果树倍性育种研究进展[J].河南农业科学,2009(6):15-17.
- [6]徐小万,石雪晖,谢林.化学诱导果树多倍体研究进展[J].山西果树,2004(6):28-30.
- [7]申馥玉.花生种间三倍体杂种染色体加倍技术的研究[J].中国农业科学,1984(4):21-25.
- [8]李贵全,尚春树.同源四倍体玉米叶片细胞机构特征的观察[J].山西农业大学学报,1993,13(2):98-101.
- [9]FRIDERQUE O S, LEGAVE J M, MIEHAUX F N. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*[J]. *Sci Hort*, 1994, 57:303-313.
- [10]张俊莲.秋水仙素处理对当归愈伤组织生长的影响[J].草业科学,1995,12(6):43-66.
- [11]DOLEZEL J, BINAROV D P, LUCETTR S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry[J]. *Biol Plant*, 1989, 31:113-120.