

## 秋水仙素诱导同源四倍体萝卜的研究

张红亮<sup>1,2</sup>, 张蜀宁<sup>1\*</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 张振超<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院, 江苏 南京 210095;  
2. 山西省农业种子总站, 山西 太原 030001)

**摘要:** 采用不同质量浓度的秋水仙素处理子叶期二倍体萝卜茎尖生长点, 通过对突变株进行形态学、细胞学、农艺学及营养品质鉴定, 获得同源四倍体。结果表明: 经  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  秋水仙素处理 6 次获得同源四倍体的效果最佳, 四倍体诱导率达到 4.5%。与二倍体相比, 四倍体植株在叶片厚度、气孔大小、保卫细胞内叶绿体数目、花器官大小、花粉粒纵横径、种子单粒径等表现出“巨大性”; 四倍体植株株高、十叶厚、直根重等农艺学性状指标显著大于二倍体; 四倍体萝卜维生素 C、可溶性蛋白、有机酸、可溶性糖、还原糖等营养品质指标也高于二倍体。

**关键词:** 萝卜; 同源四倍体; 形态学; 细胞学; 农艺学; 营养品质

中图分类号: S631.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 03-0047-04

## Studies on the induction of autotetraploid radish with colchicine

ZHANG Hong-liang<sup>1,2</sup>, ZHANG Shu-ning<sup>1\*</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-chao<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Shanxi Agricultural Seed Station, Taiyuan 030001, China)

**Abstract:** The diploid radish (*Raphanus sativus* L.) was induced by treating the apical portion of cotyledon with different concentrations of colchicine solution. The autotetraploid plants were obtained by identifying the characteristics of morphology, cytology, agronomy, and nutrition quality. The results showed that the best effect of autotetraploid was obtained with  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  colchicine solution for 6 times, and the frequency was 4.5%. Compared with the diploid plants, the autotetraploid plants showed the ‘enormous characteristic’ in the thickness of leaves, the size of stomatas, the number of chloroplasts in a leaf guard cell, the size of flower organs, the length and the width of pollen grains, the size of seeds and so on. The height of plants, the thickness of ten leaves and the weight of taproot of autotetraploid were significantly higher than diploid. The nutrition quality of autotetraploid radish was also much better than diploid radish, such as vitamin C, soluble protein, organic acid, soluble sugar and reductive sugar.

**Key words:** radish; autotetraploid; morphology; cytology; agronomy; nutrition quality

多倍体因其“巨大性”的特点使多倍体育种逐渐成为园艺作物, 尤其是以营养器官或多汁多肉果实为食用器官的蔬菜作物育种的主要途径之一<sup>[1]</sup>。目前利用秋水仙素诱导四倍体的研究在白菜<sup>[2]</sup>、黄瓜<sup>[3]</sup>、番茄<sup>[4]</sup>、茄子<sup>[5]</sup>等蔬菜上已有报道。萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 为十字花科萝卜属植物, 染色体数  $2n = 2x = 18$ , 是我国最大的蔬菜作物之一, 在我国蔬菜周年供应中占有重要地位。20 世纪中期国外进行了四倍体萝卜的研究<sup>[6]</sup>, 我国张纪增等在 1976 至 1981 年也进行了萝卜多倍体育种的研究<sup>[7]</sup>。近几年对四倍体萝卜的研究报道较少。本试验采用染色体倍性操作技术, 利用秋水仙素诱变二倍体萝卜, 创制四倍体萝卜新种质, 为选育四倍体萝卜提供理论基础和种质资源。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

试验材料为二倍体萝卜 04RC-2 ( $2n = 2x = 18$ ), 由南京星光种业有限公司提供。试验于 2004 年 9 月至 2005 年 12 月在南京农业大学园艺站进行。

#### 1.2 方法

**1.2.1 诱导方法** 2004 年 9 月 27 日播种, 在幼苗子叶期用  $1.0$ 、 $1.5$ 、 $2.0$  和  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  秋水仙素点滴

生长点进行诱变处理, 每个质量浓度处理 6 次。每天上、下午各进行 1 次。以蒸馏水处理作为对照。

**1.2.2 筛选和鉴定方法** 苗期形态学筛选: 幼苗 4~5 叶期, 根据植株生长势、叶形、叶厚等筛选突变株; 解剖学筛选鉴定: 测量叶片下表皮气孔大小、密度和保卫细胞内叶绿体数目; 花期性状鉴定: 测量花器官和花粉粒大小及角果结实率; 细胞学筛选鉴定: 参考万双粉等<sup>[8]</sup>的方法进行花粉母细胞染色体鉴定, 统计诱变率。

**1.2.3 二、四倍体植株农艺学性状比较** 2005 年 9 月将  $M_1$  代种子播种。试验采用完全随机区组设计, 3 次重复, 株行距 30 cm × 40 cm, 每小区 40 株。测定植株株高、开展度、叶片数、叶长、叶宽、直根大小、直根重等农艺学性状。

**1.2.4 二、四倍体萝卜营养品质比较** 2005 年 12 月采收时测定二、四倍体萝卜直根的营养成分: 维生素 C 含量采用 2,6-二氯酚靛酚滴定法<sup>[9]</sup>, 可溶性糖含量采用苯酚法<sup>[9]</sup>, 可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 法<sup>[10]</sup>, 还原糖含量采用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[9]</sup>, 有机酸含量采用酸碱中和滴定法<sup>[11]</sup>, 粗纤维含量采用酸性洗涤剂法<sup>[11]</sup>, 烘干法测定干物质含量。

### 1.3 数据处理分析

试验结果均采用 SPSS 软件进行 *t* 测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同质量浓度秋水仙素诱导同源四倍体萝卜的效果比较

由表 1 可以看出, 1.0~3.0 g · L<sup>-1</sup> 秋水仙素均可诱变获得四倍体, 以 2.0 g · L<sup>-1</sup> 秋水仙素处理 6 次诱变效果最好, 诱变率达到 4.5%。

表 1 不同质量浓度秋水仙素诱导同源四倍体萝卜的效果

Table 1 Effect of different colchicine concentration on induction of autotetraploid radish

$\rho$ (秋水仙素) / g · L <sup>-1</sup> Colchicine concentration	处理株数 Number of treatment	成活株数 Number of livability	成活率/% Rate of livability	变异株数 Number of variation	变异率/% Variation efficiency	四倍体株数 Number of tetraploid	诱变率/% Rate of tetraploid
0	200	200	100	0	0.0	0	0.0
1.0	200	186	93	100	50.0	1	0.5
1.5	200	170	85	110	55.0	5	2.5
2.0	200	150	75	135	67.5	9	4.5
3.0	200	110	55	85	42.5	4	2.0

### 2.2 二、四倍体萝卜形态学特征比较

与二倍体植株相比, 四倍体植株生长明显缓慢 (图 1-A), 叶片皱缩扭曲、增厚, 叶色加深, 锯齿明显 (图 1-B)。四倍体植株抽薹开花比二倍体晚 10~15 d, 花器官明显大于二倍体 (图 1-C)。花蕾纵横径较二倍体分别增加 18.14% 和 36.13%, 花瓣纵横径分别增加 9.32% 和 24.37%, 雄蕊和雌蕊长分别增加 6.11% 和 7.99%, 但单角结实率较二倍体减少 56.40% (表 2)。

表 2 二倍体与同源四倍体萝卜花器官比较

Table 2 Comparison of flower organs between diploid and autotetraploid radish

倍性 Ploidy	花蕾纵径/cm Length of bud	花蕾横径/cm Width of bud	花瓣纵径/cm Length of petal	花瓣横径/cm Width of petal	雄蕊长/cm Length of stamen	雌蕊长/cm Length of pistil	单角果种子粒数 Seeds per fruit
2x	0.838 <sup>B</sup>	0.238 <sup>B</sup>	2.038 <sup>B</sup>	0.788 <sup>B</sup>	1.146 <sup>B</sup>	1.101 <sup>bA</sup>	3.9 <sup>A</sup>
4x	0.990 <sup>A</sup>	0.324 <sup>A</sup>	2.228 <sup>A</sup>	0.980 <sup>A</sup>	1.216 <sup>A</sup>	1.189 <sup>aA</sup>	1.7 <sup>B</sup>

注: 每列数据后不同上标大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Note: The different superscript capital and small letters in each column indicate significant difference at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same as follows.

### 2.3 二、四倍体萝卜解剖学特征比较

四倍体植株叶片下表皮气孔增大 (图 1-D), 纵、横径较二倍体分别增加 67.34% 和 11.77%, 气孔密度较二倍体减少 47.09%, 保卫细胞内叶绿体数目较二倍体增加 66.88% (表 3)。四倍体花粉粒明显变大, 形状近长球形, 有些近圆球形, 且败育花粉增多; 而二倍体花粉粒较规则, 为狭长形 (图 1-E), 四倍体花粉粒纵、横径较二倍体分别增加 18.75% 和 45.83% (表 3)。四倍体角果增大 (图 1-F), 种子单粒径增加 (图 1-G)。

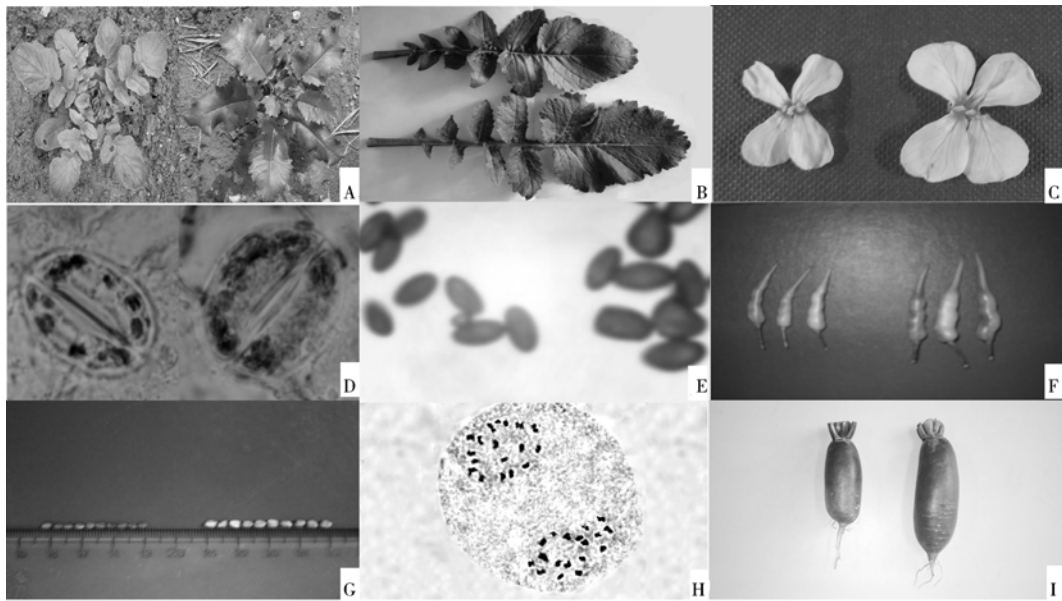


图1 二、四倍体萝卜形态学和解剖学特征比较及同源四倍体萝卜花粉母细胞染色体

Fig.1 Comparison of morphological and anatomy characteristic between diploid and tetraploid radish and chromosomes of pollen mother cells of autotetraploid radish

A. 植株 (左: 二倍体, 右: 四倍体); B. 叶片 (上: 二倍体, 下: 四倍体); C. 花朵 (左: 二倍体, 右: 四倍体); D. 气孔 (左: 二倍体, 右: 四倍体) ( $\times 1000$ ); E. 花粉粒 (左: 二倍体, 右: 四倍体) ( $\times 400$ ); F. 角果 (左: 二倍体, 右: 四倍体); G. 种子 (左: 二倍体, 右: 四倍体); H. 四倍体花粉母细胞减数分裂中期II染色体 ( $\times 660$ ) (极面观,  $n = 18$ ); I. 直根 (左: 二倍体, 右: 四倍体)

A. Plant (left: 2x, right: 4x); B. Leaf (above: 2x, below: 4x); C. Flower (left: 2x, right: 4x); D. Stomata (left: 2x, right: 4x) ( $\times 1000$ ); E. Pollen grain (left: 2x, right: 4x) ( $\times 400$ ); F. Fruit (left: 2x, right: 4x); G. Seed (left: 2x, right: 4x); H. Chromosomes of autotetraploid in meiotic metaphase II of the pollen mother cells ( $\times 660$ ) (polar view,  $n = 18$ ); I. Taproot (left: 2x, right: 4x)

表3 二倍体和同源四倍体萝卜解剖学比较

Table 3 Comparison of anatomy between diploid and autotetraploid radish

倍性 Ploidy	气孔纵径/ $\mu\text{m}$ Length of stomata	气孔横径/ $\mu\text{m}$ Width of stomata	气孔密度/ 个·视野 <sup>-1</sup> Stomata density	叶绿体数/个 Number of chloroplasts	花粉粒纵径/ $\mu\text{m}$ Length of pollen grain	花粉粒横径/ $\mu\text{m}$ Width of pollen grain
2x	23.902 <sup>B</sup>	16.585 <sup>a</sup>	62.0 <sup>A</sup>	7.88 <sup>B</sup>	31.219 <sup>B</sup>	17.561 <sup>B</sup>
4x	39.998 <sup>A</sup>	18.537 <sup>a</sup>	32.8 <sup>B</sup>	13.15 <sup>A</sup>	37.073 <sup>A</sup>	25.610 <sup>A</sup>

### 2.4 花粉母细胞染色体鉴定

从变异植株花粉母细胞染色体鉴定结果 (图1-H) 可见: 花粉母细胞减数分裂中期II每极各有18条染色体, 即小孢子细胞染色体数为  $n = 2x = 18$ , 证明诱变后所得到的植株为四倍体植株。

### 2.5 二、四倍体萝卜农艺学性状比较

从表4可以看出, 四倍体萝卜的十叶厚、叶长、直根直径、直根重较二倍体分别增加21.5%、34.6%、35.9%、49.4%, 差异极显著; 株高、叶片数、叶宽、根长较二倍体分别增加39.9%、9.1%、25.3%、21.1%, 差异显著; 植株开展度较二倍体增加0.9%。四倍体直根较二倍体大 (图1-I)。

表4 二倍体与同源四倍体萝卜农艺学性状比较

Table 4 Comparison of the traits of agronomy between diploid and autotetraploid radish

倍性 Ploidy	株高/cm Plant height	开展度/cm Degree of expand	叶片数 Number of leaf	十叶厚/cm Thickness of ten leaves	叶长/cm Length of leaf	叶宽/cm Width of leaf	根长/cm Length of root	直根直径/cm Diameter of taproot	直根重/g Weight of taproot
2x	14.8 <sup>ba</sup>	22.0 <sup>a</sup>	11.0 <sup>ba</sup>	0.521 <sup>B</sup>	21.1 <sup>B</sup>	8.7 <sup>ba</sup>	11.6 <sup>ba</sup>	12.3 <sup>B</sup>	166.0 <sup>B</sup>
4x	20.7 <sup>a</sup>	22.2 <sup>a</sup>	12.0 <sup>aA</sup>	0.633 <sup>A</sup>	28.4 <sup>A</sup>	10.9 <sup>aA</sup>	14.7 <sup>aA</sup>	19.2 <sup>A</sup>	328.0 <sup>A</sup>

### 2.6 二、四倍体萝卜营养品质比较

从表5可以看出, 四倍体萝卜的维生素C含量较二倍体增加69.05%, 差异极显著; 可溶性蛋白和有机酸含量较二倍体分别增加84.16%和111.43%, 差异显著; 可溶性糖和还原糖含量较二倍体分别增

加 47.04% 和 48.56%；而干物质和粗纤维含量较二倍体分别减少 4.75% 和 19.89%。

表 5 二倍体与同源四倍体萝卜营养品质比较

Table 5 Comparison of the nutrition qualities between diploid and autotetraploid radish

倍性 Ploidy	可溶性糖含量/% Soluble sugar content	还原糖含量/% Reductive sugar content	可溶性蛋白含量/ $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ Soluble protein content	维生素 C 含量/ $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ Vitamin C content	有机酸含量/ $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ Organic acid content	干物质含量/% Dry substance content	粗纤维含量/% Cellulose content
2x	2.978 <sup>a</sup>	3.056 <sup>a</sup>	0.221 <sup>bA</sup>	7.722 <sup>B</sup>	1.05 <sup>bA</sup>	8.63 <sup>aA</sup>	17.6 <sup>A</sup>
4x	4.379 <sup>a</sup>	4.540 <sup>a</sup>	0.407 <sup>aA</sup>	13.054 <sup>A</sup>	2.22 <sup>aA</sup>	8.22 <sup>bA</sup>	14.1 <sup>B</sup>

### 3 讨论

本研究表明,不同质量浓度 ( $1.0 \sim 3.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 秋水仙素处理萝卜生长点诱导四倍体的效果不同,随着秋水仙素质量浓度增高,总变异株率升高,但植株受伤害程度也加大,导致成活率降低;四倍体诱变率则先升高后降低,以  $2.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 6 次效果最好。

形态鉴定法是直观简易的鉴定植株倍性的方法<sup>[12]</sup>。测定花粉粒大小和检查花粉母细胞染色体法是直接可靠的鉴定方法<sup>[13]</sup>。本研究表明,叶片形态和花器官大小可作为快速有效鉴定四倍体的主要形态指标,与染色体鉴定法高度相关。

在本研究中,四倍体萝卜结实率较二倍体低。这与邓云等<sup>[14]</sup>对白菜同源四倍体的研究结论一致。笔者在四倍体萝卜开花期采用人工蕾期自交和多次授粉技术,单株选择,观察到  $M_1$  代单角果平均种子数为 1.7,  $M_2$  代则提高到了 2.2,表明获得的四倍体萝卜经单株选择、多代驯化,其结实率有提高的趋势。这在白菜同源四倍体中也得到了证实<sup>[6]</sup>。

由于基因剂量的增加,多倍体植株在产量、品质、抗性等方面优于二倍体<sup>[3]</sup>。本试验获得的同源四倍体萝卜,其直根维生素 C、可溶性蛋白、有机酸、可溶性糖和还原糖的含量均较二倍体提高,而粗纤维和干物质含量降低,营养品质明显改善,这与对同源四倍体白菜<sup>[2]</sup>、同源四倍体茄子<sup>[5]</sup>等蔬菜的研究结果相一致。本试验所获四倍体萝卜新种质,2006 年夏秋进行田间试验,各设 3 次重复,株行距  $30 \text{cm} \times 40 \text{cm}$ ,每小区 50 株,四倍体小区平均产量为 32.95 kg,较二倍体增产 31.75%,四倍体直根红皮白肉,不糠心,商品性好,将具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 孙敏红,张蜀宁.多倍体育种在园艺作物中的应用[J].江苏农业科学,2004(1):68-72
- [2] 刘惠吉,曹寿椿,王华,等.南农矮脚黄四倍体白菜新品种的选育[J].南京农业大学学报,1990,13(2):33-40
- [3] 陈劲枫,雷春,钱春桃,等.黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定[J].植物生理学通讯,2004,40(2):149-152
- [4] 饶升土,徐根娣,周建华.秋水仙素处理番茄幼苗染色体加倍的研究[J].浙江师大学报:自然科学版,1996,19(1):62-64
- [5] 李树贤,吴志娟,李明珠,等.同源四倍体茄子诱变技术的研究[J].西北农业学报,2000,9(4):26-29
- [6] 刘惠吉.蔬菜作物多倍体研究及应用[J].长江蔬菜,1995(3):3-5
- [7] 张纪增,赵德培.国光萝卜多倍体育种的研究[J].园艺学报,1984,11(4):274-276
- [8] 万双粉,张蜀宁,张杰.青花菜花粉母细胞减数分裂及雄配子体发育[J].西北植物学报,2006,26(5):970-975
- [9] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [11] 牛森.作物品质分析[M].北京:农业出版社,1990:65-66
- [12] 张全美,张明方.园艺植物多倍体诱导研究进展[J].细胞生物学杂志,2003,25(4):223-228
- [13] 赵德培.萝卜多倍体的诱导[J].农业科技通讯,1979(3):21-22
- [14] 邓云,张蜀宁,孙敏红,等.采用秋水仙碱创制优质、抗热同源四倍体不结球白菜[J].武汉植物学研究,2006,24(2):159-162