

## 秋水仙素诱导白萝卜试验研究初报

汪剑鸣 (宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西宜春 336000)

**摘要** [目的] 选择白萝卜变异株, 培育白萝卜多倍体品种。[方法] 以品种  $P_1$ (短叶青)、 $P_2$ (浙大长)、 $P_3$ (南畔洲), 秋水仙素浓度  $A_1$ (0.02%)、 $A_2$ (0.04%)、 $A_3$ (0.08%), 时间  $T_1$ (24 h)、 $T_2$ (48 h)、 $T_3$ (72 h) 组成 27 个处理, 比较植株形态, 显微镜下观察叶片气孔保卫细胞数量和花粉粒染色情况。[结果] 各处理均有不同程度的变异, 3 个品种的植株变异率依次为  $P_1 > P_2 > P_3$ , 处理时间对变异率没有明显影响。各处理变异株的叶片气孔数均低于对照, 保卫细胞大于对照。各处理的变异株经过一段时间生长之后, 变异株数显著减少, 即存在变异退化现象。 $P_3A_1T_3-2$ 、 $P_3A_2T_1-1$ 、 $P_3A_3T_1-4$ 、 $P_3A_3T_2-6$  号的花粉粒在碘化钾作用下都不能够染色。[结论] 秋水仙素浓度越高, 白萝卜的变异率越高。 $P_3A_1T_3-2$ 、 $P_3A_2T_1-1$ 、 $P_3A_3T_1-4$ 、 $P_3A_3T_2-6$  号是变异株。

**关键词** 秋水仙素; 白萝卜; 试验研究

中图分类号 S631.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-00985-03

### Primary Report on the Experimental Study of Inducing White Radish with Colchicine

WANG Jian ming (College of Life Science and Resources Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

**Abstract** [Objective] The purpose was to select the variant plant of white radish so as to breed its polyploid variety. [Method] 27 treatments were composed with varieties  $P_1$ (Danyeqing),  $P_2$ (Zhedachang),  $P_3$ (Nanpanzhou); colchicine concentrations  $A_1$ (0.02%),  $A_2$ (0.04%),  $A_3$ (0.08%) and time  $T_1$ (24 h),  $T_2$ (48 h),  $T_3$ (72 h). The plant shapes were compared and the quantity of stomata guard cells in leaf and the coloration of pollen grains were observed under microscope. [Result] There were differences to different degrees in each treatment, the plant variant rates of 3 varieties were  $P_1 > P_2 > P_3$ , and treating time had no obvious influence on variant rate. All the stomata numbers in leaf of variant plants in each treatment were lower than that in CK, with guard cells being bigger than CK. After the variant plants from each treatment grew for a period of time, the variant plant number decreased significantly, showing the degradation phenomena of variance. All the pollen grains of  $P_3A_1T_3-2$ ,  $P_3A_2T_1-1$ ,  $P_3A_3T_1-4$  and  $P_3A_3T_2-6$  couldn't be colored under the function of potassium iodide. [Conclusion] The higher the colchicine concentration was, the higher the variant rate of white radish was.  $P_3A_1T_3-2$ ,  $P_3A_2T_1-1$ ,  $P_3A_3T_1-4$ ,  $P_3A_3T_2-6$  were variant plants.

**Key words** Colchicine; White radish; Experimental study

白萝卜为十字花科萝卜属(Gruciferae Raphanus sativus L.)植物, 是一种重要的大众蔬菜。我国现大面积种植白萝卜为二倍体, 育种方面主要为常规育种和杂交优势育种。秋水仙素是一种诱导多倍体最普遍、最有效的化学药剂, 利用秋水仙素处理白萝卜种子, 选育出多倍体白萝卜品种(个体大、产量高), 是白萝卜育种主要寻求的目标。但由于秋水仙素为剧毒药品, 操作繁琐, 利用该途径育种的人很少。笔者利用秋水仙素处理白萝卜种子, 分析处理效果, 选择白萝卜变异株, 以期培育白萝卜多倍体品种。

#### 1 材料与方 法

**1.1 试验材料** 参试白萝卜品种 3 个, 为短叶青(60 d)、浙大长(90 d)、南畔洲(120 d), 分别用  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  表示; 化学药剂秋水仙素为国药集团化学试剂有限公司生产; 试验地设在生科院试验基地, 土地肥力中等, 且较均匀。

**1.2 试验方法** 试验因子 3 个, 为品种(P)、秋水仙素溶液浓度(A)、秋水仙素溶液浸渍种子时间(T)。每个因子设 3 个水平, 即品种为  $P_1$ (短叶青)、 $P_2$ (浙大长)、 $P_3$ (南畔洲); 浓度为  $A_1$ (0.02%)、 $A_2$ (0.04%)、 $A_3$ (0.08%); 时间为  $T_1$ (24 h)、 $T_2$ (48 h)、 $T_3$ (72 h), 组成 27 个处理组合, 另设用清水浸渍(24 h), 3 个品种种子为对照(CK<sub>1</sub>、CK<sub>2</sub>、CK<sub>3</sub>), 共计 30 个处理组合, 每个处理浸渍种子 50~100 粒, 试验于 2006 年 10 月 8 日开始处理种子, 10 月 9~11 日陆续播种。记载各阶段生长时期、植株变异率、生物产量; 显微观察叶片气孔大小、数量; 花粉染色情况。

#### 2 结果与分析

**2.1 苗期变异** 10 月 9~11 日分 3 期播种, 3~5 d 后出齐苗, 出苗后发现一部分植株不正常, 并于 10 月 27 日和 11 月 23 日调查。由表 1 可知, 不同浓度不同时间的各处理均有不同程度的变异, 10 月 27 日调查, 各浓度小计  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  的变异率分别为 22.6%、25.9%、35.7%, 表明秋水仙素溶液浓度越高变异率越高, 但差异不是很明显; 萝卜生长达到 4~8 片真叶时, 11 月 23 日第 2 次调查, 各浓度小计  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  的变异率分别为 19.8%、17.8%、17.6%, 变异株数和变异率均比第一调查明显减少, 其中浓度  $A_3$  的变异株数和变异率减少最明显, 变异株数减少了 43 株, 变异率降低 18 个百分点,  $A_1$ 、 $A_2$  两次比较差异相对较小, 其中主要原因是浓度  $A_3$  处理 85 株变异株, 经过一段时间生长, 有 43 株死亡, 而  $A_1$ 、 $A_2$  处理分别为 5 株和 14 株死亡, 说明秋水仙素溶液浓度越高变异率越高; 虽然开始看到的变异株多、变异率高, 但由于浓度高, 秋水仙素溶液对种子和植株伤害也重, 其染色体加的倍数太高, 自然难以成活。从形态上比较, 变异株在苗期表现出叶片小, 叶片少, 且下胚轴明显增粗。

品种  $P_2$ 、 $P_3$  同样呈现秋水仙素溶液浓度越高, 变异株数和变异率也越高, 11 月 23 日第 2 次调查, 品种  $P_2$  各处理变异率 11.6%~15.9%, 品种  $P_3$  变异率 7.4%~8.8%, 各处理 3 品种之间比较, 植株变异率依次为短叶青( $P_1$ ) > 浙大长( $P_2$ ) > 南畔洲( $P_3$ ), 其原因可能与品种成熟度有关。

表 1 中  $P_2A_1T_2$ 、 $P_2A_1T_3$ 、 $P_2A_2T_3$ 、 $P_3A_1T_3$ 、 $P_3A_2T_3$  处理没有死亡株, 2 次调查变异株均有不同程度增加, 其原因可能是该品种在某浓度、某时间的处理条件下, 经过一段时间生长, 秋水仙素处理的作用效果才显示出来, 这部分变异株(20 株)可能其染色体加的倍数相对较低, 是今后观察的重要材料, 而品种  $P_1$  就没有这种情况出现。

**作者简介** 汪剑鸣(1958-), 男, 江西宜春人, 研究员, 从事植物诱导育种研究。

鸣谢 03 园艺班刘金荣、唐春兰、王红同学的帮助。

收稿日期 2007-08-15

**2.2 叶片气孔变异** 叶片气孔保卫细胞数量多少和大小是判断植株是否为多倍体较可靠的鉴定方法,为了进一步核实和验证白萝卜苗期变异情况,12月24~26日用显微镜观察在形态上初步确定了变异株的叶片气孔大小和数量,每株3次重复,取平均。由表2可见,几乎所有变异株的气孔数均低于CK,变异株叶片单位面积气孔数平均为11.5个,而对照为23.3个,处理比对照少11.8个,差异非常明显;同时观叶片气孔保卫细胞的大小变异株平均 $38.2 \pm 6.5 \mu\text{m} \times (25.2 \pm 4.6) \mu\text{m}$ ,而对照品种为 $(25.2 \pm 3.5) \mu\text{m} \times (18.7 \pm 3.6) \mu\text{m}$ ,处理变异株的保卫细胞明显大于对照品种。初步可以肯定,在268株变异株中一定有多倍体变异株。其中,有4个处理变异株( $P_1A_2T_2$ 、 $P_3A_1T_1$ 、 $P_3A_2T_1$ 、 $P_3A_3T_1$ )的保卫细胞数量分别为

30、24、22、30个,均高于或接近对照品种,且气孔大小与对照品种差异不大。翌年1月24~27日再次用显微镜单株定点观察各处理变异株(268株)叶片的气孔大小和数量,结果表明(表3),其结果与表2完全不同,各处理组合变异株差异明显,其中 $P_3A_1T_3$ 、 $P_3A_2T_1$ 、 $P_3A_3T_1$ 、 $P_3A_3T_2$ 处理组合的气孔数分别为6、8、10、9个,比对照品种( $P_3$ )的35个显著减少,其次有 $P_1A_2T_1$ 、 $P_1A_3T_1$ 、 $P_1A_3T_2$ 、 $P_2A_1T_2$ 、 $P_2A_1T_3$ 、 $P_2A_3T_1$ 处理的气孔数分别为12、16、13、15、15、17个,分别比对照品种( $P_2$ 、 $P_3$ )也有所减少,这10株初步断定为变异株,是下阶段观察的重点;经过1个月生长,一些初步认定的变异株恢复为正常生长状态,以致变异株明显减少。

表1 白萝卜品种苗期变异情况

Table 1 The variation situation of white radish seeding

处理				差异率 Difference rate			死亡率 %													
Treatment				10-27	11-23	Mortality rate														
$P_1$	$A_1$	$T_1$		15.7	15.7	0	$P_2$	$A_1$	$T_1$		6.8	4.5	2.3	$P_3$	$A_1$	$T_1$		5.1	1.7	3.4
		$T_2$		20.7	18.9	1.9			$T_2$		7.1	11.8	0			$T_2$		7.3	3.6	3.6
		$T_3$		28.8	23.3	5.5			$T_3$		15.4	19.2	0			$T_3$		6.6	14.5	0
	小计 Subtotal		22.6	19.8	2.8	小计 Subtotal			9.6	11.6	0.8	小计 Subtotal			6.3	7.4	2.1			
$P_1$	$A_2$	$T_1$		18.0	14.8	3.3	$P_2$	$A_2$	$T_1$		12.2	11.1	1.1	$P_3$	$A_2$	$T_1$		6.7	6.7	0
		$T_2$		25.4	15.9	9.5			$T_2$		27.5	12.5	15.0			$T_2$		6.8	5.5	1.3
		$T_3$		36.0	20.0	12.0			$T_3$		20.3	23.2	0			$T_3$		7.2	13.3	0
	小计 Subtotal		25.9	17.8	8.0	小计 Subtotal			19.7	15.1	5.4	小计 Subtotal			6.9	8.8	0.5			
$P_1$	$A_3$	$T_1$		34.8	10.1	24.7	$P_2$	$A_3$	$T_1$		38.2	11.8	26.4	$P_3$	$A_3$	$T_1$		25.3	9.3	16.0
		$T_2$		32.4	17.6	1.3			$T_2$		38.3	13.6	24.7			$T_2$		15.9	6.1	9.8
		$T_3$		38.9	23.2	15.7			$T_3$		36.8	21.1	15.7			$T_3$		32.5	13.0	19.5
	小计 Subtotal		35.7	18.3	18.1	小计 Subtotal			22.4	14.2	9.4	小计 Subtotal			24.4	9.4	15.0			
合计 Total		28.9	18.3	10.5	合计 Total		22.4	14.2	9.4	合计 Total		13.1	8.6	6.3						

表2 12月各处理变异株叶片单位面积气孔保卫细胞数 个

Table 2 The number of guard cells per unit leaf area of mutant lines in each treatment in December

P	$A_1$			$A_2$			$A_3$			平均 Man	CK
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_1$	$T_2$	$T_3$		
$P_1$	10	12	5	10	30	8	2	8	8	10.3	29
$P_2$	8	15	14	13	7	7	15	13	9	11.2	18
$P_3$	24	8	0	22	10	4	30	8	11	13.0	23
小计 Subtotal	42	35	19	45	47	19	47	29	28	70.0	
平均 Man	14	11.6	6.2	15	15.6	6.2	15.6	9.6	9.3	11.5	23.3
总平均 Total mean	10.7			12.3			11.5			23.3	

表3 翌年1月各处理变异株叶片单位面积气孔保卫细胞数 个

Table 3 The number of guard cells per unit leaf area of mutant lines in each treatment in January the next year

P	$A_1$			$A_2$			$A_3$			平均 Man	CK
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_1$	$T_2$	$T_3$		
$P_1$	32	34	35	12	30	31	16	13	33	26.2	36
$P_2$	35	15	15	23	28		33	17	29	25.2	30
$P_3$	30	29	6	8	34	31	10	9	21	19.8	35
小计 Subtotal	97	78	56	43	92	95	43	41	86	101	
平均 Man	32.2	26	18.7	14.3	30.7	31.7	14.3	16.7	28.7	23.7	33.7
总平均 Total mean	25.7			25.6			19.9			23.7	33.7

**2.3 花粉粒染色** 据资料介绍,多倍体植株与二倍体植株

比较,多倍体花粉粒体积大、生活力低,有的甚至不孕。3月14~18日取各处理变异株花粉粒染色显微镜观察,重点观察前期初步断定的10株变异株,结果表明,各处理变异株绝大多数花粉粒在碘化钾作用下能够染色,仅初步断定的10株变异株中的4株不能够染色,为 $P_3A_1T_3$  2、 $P_3A_2T_1$  1、 $P_3A_3T_1$  4、 $P_3A_3T_2$  6号株,进一步断定这4株为变异株。

几次显微观察,为什么1月13日显微观察的变异株大多叶片气孔保卫细胞数量少且大,而经过50多天生长之后,变异株显著减少?究其原因可能是大部分变异株经过一段时期生长之后,当时的变异株性状慢慢退化,恢复至二倍体植株的生长特性,而通过叶片气孔保卫细胞数量多少和大小与花粉粒是否染色确定的几株变异株是今后观察的重点。一是对 $P_3A_1T_3$  2、 $P_3A_2T_1$  1、 $P_3A_3T_1$  4、 $P_3A_3T_2$  6号4株变异株采取套袋自交,观察结果为不结籽,完全肯定是多倍体变异植株,但不知道是几倍体;二是在前者不结籽的情况下,采用相对应的对照品种花粉,二者杂交收种子,待下半年播种进一步观察研究。

**3 小结**

- (1) 秋水仙素处理白萝卜种子,溶液浓度越高变异率越高,但处理时间对变异时间不明显。
- (2) 各处理的变异株经过一段时间生长之后,变异株数显著减少,即存在变异退化现象。
- (3) 通过显微镜观察叶片气孔保卫细胞和花粉粒染色,可以断定 $P_3A_1T_3$  2、 $P_3A_2T_1$  1、 $P_3A_3T_1$  4、 $P_3A_3T_2$  6为变异株,其

特性有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 景士西. 园艺植物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 220 - 230.

(上接第972页)

现有丝分裂的异常, 导致各种倍性细胞的产生<sup>[5]</sup>。因此, 该试验中愈伤组织细胞出现的明显的染色体数目变异现象, 与愈伤诱导培养基中2,4-D、NAA的作用密不可分。

以种胚为外植体诱导得到的愈伤组织细胞中, 染色体数目的变异频率最高, 可能是由于种胚具有更强的分化潜能, 在激素的作用下, 细胞更容易发生各种分化变异。同时也说明雪莲不同外植体对激素的敏感性不同, 导致愈伤组织细胞中染色体变异程度不同。在该试验中, 以种胚为外植体的愈伤组织细胞染色体变异频率高, 但难以得到分化的不定芽, 针对种胚的这一特性, 一方面, 可通过改变试验条件, 特别是激素配比, 进一步提高愈伤组织中各种染色体数目的细胞, 如果能将这些细胞游离, 就能获得各种染色体数目变异的无性系<sup>[8]</sup>, 这对于染色体的研究及丰富雪莲遗传多样性都有重要意义。另一方面, 一些植物分子生物学试验需要结合组织培养, 由于分子水平上的试验, 要求材料具有稳定的染色体状态, 所以在以雪莲为对象的分子生物学试验上, 应尽量避免采用种胚为材料, 以保证染色体的稳定性。

#### 3.2 雪莲不定芽茎尖、根尖细胞中染色体数目异常的分析

在该试验中, 虽然以种胚为外植体得到的愈伤组织中, 染色体数目变异的细胞比例高(非整倍体细胞比例高), 但其愈伤组织却难以分化出芽。而以根部、真叶、下胚轴为外植体得到的愈伤组织中, 染色体数目变异的细胞比例低, 但其愈伤组织却大量出芽。这证实了愈伤组织得以分化的前提是染色体的整倍性<sup>[6]</sup>, 对于雪莲而言, 愈伤组织中变异的细胞, 特别是非整倍性的细胞比例越高, 愈伤组织越难分化。前人的研究也证实了这一结论, 王伦山<sup>[6]</sup>在对伊贝母的研究中发现, NAA+KT的组合中, 由于非整倍性细胞的比例低, 使得愈伤组织分化的能力高; Ziauddin<sup>[7]</sup>对大麦的研究进一步支持了这一观点, 正常的芽不可能来自于异常的细胞。

不定芽是由表皮单细胞或邻近几个细胞共同发育而来, 在嵌合体不定芽中难以发现非整倍性的细胞, 进一步说明了非整倍性细胞分化能力低, 难以分化出不定芽。可通过调整培养基配方, 特别是调整各种激素配比, 达到提高愈伤组织中整倍体细胞比例, 降低非整倍体细胞比例的目的, 从而提高愈伤组织的分化潜能。

#### 3.3 雪莲细胞有丝分裂行为的分析

有文献报道, 愈伤组织中存在有丝分裂异常的现象, 如染色体桥、染色体落后、微核现象等。这些异常的有丝分裂现象同样存在于雪莲的愈伤组织中。外源激素对这些异常的有丝分裂现象影响很大, 如A. Ziauddin<sup>[7]</sup>对大麦的研究指出, 外源激素导致大麦愈伤组织细胞产生异常的有丝分裂行为, 其表现为NAA > 2,4-D。这些异常的有丝分裂行为是导致染色体数目变异的途径之一。胡含等<sup>[9]</sup>认为, 离体培养容易引起植物体细胞的核内有

244 - 248.

- [2] 包满珠. 园林植物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 139 - 159.  
[3] 汪隆植, 何启伟. 中国萝卜[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2005.

丝分裂、核融合、多极有丝分裂以及染色体断裂等现象。而这些有丝分裂的异常过程, 是产生染色体加倍、混倍体以及染色体变异的各种新类型的重要原因; Saesh<sup>[10]</sup>也认为, 染色体落后、纺锤体不分离可导致形成染色体数目低的细胞核; 总之, 针对雪莲愈伤组织中出现的有丝分裂异常的现象, 可以认为是外源激素影响了植物正常的生理生化过程, 从而干扰了正常有丝分裂过程, 导致变异的有丝分裂行为产生, 变异的有丝分裂行为进一步促使了不同染色体数目的细胞核形成, 但具体的作用机制还需要进一步探讨。另外, 该试验以种胚为外植体得到的愈伤组织细胞中, 染色体数目变异的细胞比例最高, 同时异常的有丝分裂行为出现的频率也是最高, 这也与上述的观点相吻合, 即异常有丝分裂行为是导致异常的染色体数目途径之一。

#### 4 小结

该试验中, 笔者观察了从雪莲愈伤组织到不定芽根尖的染色体变化, 根据试验结果, 虽然最终得到的组培苗中包含有少量的嵌合体植株, 但这些嵌合体植株中的四倍体细胞比例很低。由于二倍体细胞较四倍体细胞分裂速度快, 若四倍体细胞不占到绝大比例, 则最终会在长期的生长过程中被二倍体细胞所“淹没”, 嵌合体植株最终变为二倍体植株<sup>[11]</sup>。因此, 组培苗中少量的嵌合体植株是可以忽略, 从而认为该组织培养的配方能保证雪莲组培苗染色体的稳定性, 有利于对雪莲做进一步的研究分析。另外, 优化激素配比、通过组织培养途径得到多倍体植株多有报道。并且该途径较之采用秋水仙素诱导法, 能显著降低嵌合体的比例, 得到大量纯合的多倍体植株。可以进一步调整激素比例, 尝试通过组织培养途径得到多倍体雪莲。

#### 参考文献

- [1] 马兴华, 覃若林, 刑文斌. 新疆某些药用植物的染色体观察[J]. 植物分类学报, 1984, 22(3): 243 - 249.  
[2] 陈玉珍, 李凤兰. 药用资源植物雪莲化学成分及药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(3): 1 - 4.  
[3] 杨林, 筱燕. 新疆雪莲的组织培养及植株再生[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2006, 15(1): 26 - 29.  
[4] 赵德修. 雪莲花组织培养的初步研究[J]. 中草药, 1997, 28(11): 682 - 684.  
[5] BINGUO, MINGAO, CHUNZHAO HU. In vitro propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir[J]. *Hort Cell Reports*, 2006, 26(3): 261 - 265.  
[6] 王伦山, 王亚馥, 杨汉民, 等. 不同激素对伊贝母组织培养中染色体不稳定性研究[J]. 西北植物学报, 1987, 7(4): 226 - 234.  
[7] ZIAUDDIN A, KASHA K J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*) II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants[J]. *Euphytica*, 1990, 48: 279 - 286.  
[8] 王清, 王蒂, 戴朝曦, 等. 萘乙酸、2,4-D对马铃薯愈伤组织细胞染色体倍性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 1997, 32(4): 304 - 307.  
[9] 胡含, 郡子英, 贾双娥. 小麦花粉愈伤组织植株体细胞染色体的变异[J]. 遗传学报, 1978, 5(1): 23 - 29.  
[10] SAIYESH CHANDRA ROY. Chromosomal variations in the callus tissues of *Allium tuberosum* and *A. Cepa*[J]. *Protoplasma*, 1980, 102: 171 - 176.  
[11] 匡全, 梁国鲁. 秋水仙素诱导牛蒡多倍体[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 157 - 158.