

甜菜多倍体的人工引变处理方法的研究

隋文彬 徐兆成

(吉林农业大学)

一、前 言

甜菜的多倍体，特别是三倍体品种具有高度的丰产性和抗病性，且含有較少的有害氮和灰分^(1,2,3,8)，无论在产量上或品质上均优于二倍体品种。所以近年来，世界上盛产甜菜的国家都相繼扩大了三倍体甜菜的栽培面积^(3,4)。

我国目前作为生产资料的品种均为二倍体类型，尚无多倍体品种，因此，我們应尽快地育成我国生产上所需要的多倍体甜菜新品种，以便大幅度地提高甜菜的产量和品质。为此，我們自1962年以来，对引变方法和鑑定技术进行了探索性的試驗，以期为今后的多倍体的育种工作提供依据。

二、材 料 和 方 法

(一) 材料的准备

1. 供試品种：本研究用的两个标准型品种“CLR”和“KW—N”系由中国农业科学院甜菜研究所和黑龙江省輕工业厅甜菜試驗站供給的。

2. 秋水仙精水溶液的制备：將1克秋水仙精溶于100毫升的蒸溜水中，配成1%的原液，可長期保存而不失效⁽¹⁾，同时再稀釋成所需濃度。

3. 营养袋的制备：用牛皮紙或报纸糊成10×5×5的紙袋，內裝田土、腐植質和細砂等量混合均匀的床土。

(二) 方法和步驟

1. 乾种球浸泡处理

將CLR 乾种球450粒分三組，每組150粒分放在三个鋪有濾紙的培养皿中，分別注入0.2、0.3、0.4%的秋水仙精水溶液，以淹沒种球为度。在室溫条件下浸泡，以后按計劃時間分批取出，單粒播于营养袋中。待幼苗出現4、5片真叶时，定植田間，进行一般管理。过程如表1。

2. 萌发种球浸泡处理：將KW—N种球用水浸泡一晝夜，在室溫条件下催芽，选胚根剛突破种皮的种球225粒，分三組，放在三个鋪有濾紙的培养皿內，分別注入0.1、

表 1 CLR 乾种球浸泡处理的实际经过

秋水仙精溶液濃度(%)	浸泡時間(小时)	处理开始日期	最高气温(°C)	处理种球数	幼苗数	定植日期	收获日期	块根数
0.2	25	20/VI	25—28°C	50	72	28/VII	7/X	42
	48	20/VI	25—28°C	50	50	28/VII	7/X	32
	96	20/VI	25—28°C	50	21	28/VII	7/X	10
0.3	25	20/VI	25—28°C	50	59	28/VII	7/X	37
	48	20/VI	25—28°C	50	20	28/VII	7/X	14
	72	20/VI	25—28°C	50	5	28/VII	7/X	1
0.4	25	20/VI	25—28°C	50	30	28/VII	7/X	12
	48	20/VI	25—28°C	50	22	28/VII	7/X	18
	60	20/VI	25—28°C	50	22	28/VII	7/X	10
計				450	301	28/VII	7/X	176

0.2、0.3%的秋水仙精水溶液，至淹沒种球程度时为止。以后的操作管理与1法同。过程如表2。

表 2 KW—N 萌发种球浸泡处理的实际经过

秋水仙精溶液濃度(%)	浸泡時間(小时)	处理开始日期	最高气温(°C)	处理种球数	幼苗数	定植日期	收获日期	块根数
0.1	50	28/VI	26—32	25	10	28/VII	7/X	7
	55	28/VI	26—32	25	18	28/VII	7/X	1
	72	28/VI	26—32	25	17	28/VII	7/X	6
0.2	44	28/VI	26—32	25	7	28/VII	7/X	2
	48	28/VI	26—32	25	9	28/VII	7/X	2
	55	28/VI	26—32	25	8	28/VII	7/X	3
0.3	20	28/VI	26—32	25	5	28/VII	7/X	0
	44	28/VI	26—32	25	9	28/VII	7/X	2
	72	28/VI	26—32	25	5	28/VII	7/X	1
計				225	88			24

3. 蘸浸法：鑑于浸苗和滴苗处理法，操作复杂，易于失败。所以作者等在1963年把它們綜合在一起，命名为“蘸浸法”。

將萌动的 KW—N 种球，單粒播于营养袋中，待幼苗子叶張开后，往真叶間的莖端生長点上，放一小块用0.2、0.3%秋水仙精溶液浸泡过的脫脂棉，經24小时后，去掉棉块，并充水灌水。其过程如表3。

表 3 KW—N 子叶期幼苗蘸浸处理的实际经过

秋水仙精溶液濃度(%)	处理時間(小时)	处理日期	最高气温(°C)	处理株数	定植株数	定植日期	收获日期	块根数
0.2	24	3/VII	28—32	20	6	28/VII	7/X	6
0.3	24	3/VII	28—32	20	3	28/VII	7/X	3
計				40	9			9

10月7日收获了209个小母根，將初步鑑定認為可能为多倍体的36个小块根，盆栽于溫室中，使之进行营养生長，并作細胞学檢查；另外，在外形上类似多倍体，而气孔、叶綠体与对照无差異的25个小块根，收藏窖中，其余一概淘汰。

(三) 多倍体的鑑定

在一般情况下，对成長植株，根据外部形态学特征进行一次淘汰，然后对选留株再作組織学和細胞学的檢查。这样，可使工作量大为減少。我們为了不漏掉一个变異株，对所有植株普遍地进行了組織学檢查。

1. 組織学的檢查法：在天气晴朗、溫、湿度适宜的条件下，午前10时至午后3时之間，用鑷子撕取成熟叶片的表皮組織，立即投入1% AgNO_3 的等滲溶液中（气孔能正常地張开），經短时浸染后，取出表皮組織制成裝片；在低倍鏡下进行鏡檢，由于保卫細胞对中的叶綠体被染成黑褐色，很容易数計；重复观察5—8个气孔，求出叶綠体的平均数^[5]。在数計叶綠体的同时，以按目測微尺的刻度为單位，測定气孔的長寬，并求出其平均数。

2. 細胞学的檢查法：醋酸奧辛压片法（Aceto—orcein squash method）对幼叶的分生組織进行了細胞学的研究。由于甜菜幼叶分生組織細胞过小着色又相当困难，制片曾多次失敗过。經反复試驗，初步探索到了我們認為較为理想的制片过程，詳記如下：

(1) 取样：在晴朗的午前9—11时切取腋芽，在解剖鏡下，割出去長点及其附近的幼叶，从中选取尙未現綠色的幼叶^[3]。

(2) 前处理：把选取的幼叶，投入0.1%秋水仙精溶液中，在室溫下保持1—5小时。这样，可使有絲分裂停留在中期阶段，在較好的制片中往往能遇到几十个分裂象。同时因紡錘体被破坏，致使染色体呈現分散状态，故便于数計。

(3) 固定：材料水洗后，用1:1:2的氯仿、95%酒精、冰醋酸的混合液^[6]（使用前混合），在室溫条件下固定1—12小时（但固定時間以短为宜）。如不能立即制片，可將固定后的材料用酒精冲洗后，保存在70%酒精中。

(4) 軟化：將新固定或保存在70%酒精中的材料取出投入1:1的95%酒精和濃鹽酸的混合液中，浸漬3—5分鐘，使細胞发生离析^[6]。

(5) 染色：將軟化过的料料移入45%冰醋酸溶液中，約10分鐘左右（能加强染色性）。然后取出材料，置載玻片上，滴一滴1%醋酸奧辛染色5—10分鐘^[6]。

(6) 挤压：加盖片后，把載玻片夾在濾紙中間，以手指用力挤压，使細胞充分散开。

(7) 封緘：盖片邊緣以石蜡、凡士林混合物（石蜡、凡士林各一分經煮沸制成）封緘。

另法是把經過前处理和固定好的材料，水洗后，直接置載玻片上，滴一滴2%醋酸奧辛加濃鹽酸的混合液（配方：9分2%醋酸奧辛+1分濃鹽酸），在火焰上微微加热，放置10—15分鐘，用濾紙吸去混合液，再滴1滴1%醋酸奧辛，照(6)、(7)規程制片，也取得了較好的效果。

三、結果分析和討論

(一) 乾种球浸泡处理

乾种球浸泡处理法为 Peto 等所首創^[1]，以后很少有人应用。根据我們二年来的試驗結果表明，此法不仅簡便易行，而且引变效果也較为显著，与其他一些处理法相比并无遜色之处，可能秋水仙精耗量多是其缺点之一。处理結果如表 4。

表 4 在不同濃度和時間的組合下浸泡“CLR”乾种球所得結果

組別	处理种球数	成活株数	成活率 (%)	变异株数	变异率 (%)	相对变异率 (%)
0.2/25	50	42	84	5	10	11.9
0.2/48	50	32	64	5	10	15.6
0.2/96	50	10	20	2	4	20.0
0.3/25	50	37	74	2	4	5.4
0.3/48	50	14	28	—	—	—
0.3/72	50	1	2	1	2	100.0
0.4/25	50	12	24	5	10	41.7
0.4/48	50	18	36	—	—	—
0.4/60	50	10	20	2	4	20.0

註：組別中的分子代表秋水仙溶液濃度，分母代表時間（小时）（以下同）

由表 4 可以看到，在一定的溫度条件下，溶液濃度的高低和处理時間的長短，对多倍体誘变效果具有一定的关系，低濃度長時間和高濃度短時間，可以作为一般規律。如 0.2/25, 0.2/48 和 0.4/25 具有相同的引变率，都是 10%。而其相对变异率（变异株数 × 100 ÷ 成活株数）則分别为 11.9%，15.6% 和 41.7%，說明伴随着濃度的增高和時間的加長，死亡率也相应地增加。另一方面，成活率高的組合，其变异率也可以是零，如 0.3/48 和 0.4/48，这可能由于处理种球数过少所致。因此，要确定适宜的处理方法应从三个方面来考虑，即成活率、变异率和相对变异率三者必須保持合理的比例关系。同时，还必須处理足够数量的种球才行。

同时还可以看出，0.2/25, 0.2/48, 0.4/25 三个組合基本上可以作为乾种球处理的依据。其中比較理想的是 0.4/25 組合，是符合高濃度短時間处理原則的，也与 Peto 等^[1]的結果相符合。

根据以上的分析可以得出初步結論：乾种球处理是一簡便易行而有效的方法；在平均溫度 20℃ 左右的情况下，以 0.2% 溶液濃度处理 25—48 小时，或用 0.4% 的溶液濃度浸泡 25 小时較为适宜，处理种球应多于 50 粒。

(二) 萌发种球的浸泡处理

此法曾被广泛采用^[2,3,4]。根据我們二年来的試驗証明，也是一种簡而易行的有效方法，从秋水仙精耗量上来看，較上法有其优越之处，現將試驗結果列于表 5。

表 5 清楚表明，原則上仍以低濃度長時間，高濃度短時間处理較为适宜，但其差異并不显著。随着濃度的增高和時間的延長，成活率也越来越低，相对变异率越高；相对变

表 5 在各种濃度和時間的組合下浸泡“KW—N”萌发种球所得結果

組 別	处理种球数	成活株数	成活率 (%)	变異株数	变異率 (%)	相对变異率 (%)
0.1/50	25	7	28	3	12	42.8
0.1/72	25	6	24	—	—	—
0.2/40	25	2	8	1	4	50.0
0.2/48	25	2	8	2	8	100.0
0.2/55	25	3	12	1	4	33.3
0.3/44	25	2	8	1	4	50.0
0.3/72	25	1	4	1	4	100.0

異率与变異率的差距也越来越悬殊,如0.2/48組合。但另一方面,成活率高而无变異的情况,也有出現,如0.1/72,与前法同样可能是处理种球数过少所致。我們認為在确定合理濃度和处理時間时,仍应以成活率、变異率和相对变異率三者的合理比例关系作出出发点。但本例所反映的三者比例关系不够理想。

从成活率、变異率和相对变異率三者的比值来看,相差只有0.1/50,原則上可以作为萌发种球浸泡处理的依据。同时,还可以看到在濃度、時間相差很大的情况下,三者的比值有較相近或完全相等的現象,如0.2/40同0.3/44則完全相等,0.2/48同0.3/72相差不大,而0.1/72的成活率并不低,但其变異率竟等于零。說明濃度、時間与成活率和变異率之間存在着錯綜复杂的关系。

文献中所載之濃度同时間的組合,因作者而有很大的出入,如B·B·沙哈洛夫等用0.05%溶液处理48小时,得到了兩株四倍体,同时他建議用0.1—0.2%溶液处理2—6小时,可能效果良好〔2〕。A·H·魯特森科等主張用0.1—0.2%溶液处理12—24小时〔4〕。显然我們的試驗結果与前比較,相差很悬殊;而与后者稍为接近,但还有很大的距离。产生差異的原因可能是影响因素不同,特别是溫度;不同品种也可能对处理具有不同的敏感性。有趣的是尽管差異很大,但都获得了多倍体。由此可見,秋水仙精的誘变幅度是相当大的,仅以萌发种球浸泡处理来看,有效濃度的幅度为0.05—0.3%。

綜合上述資料,我們認為用0.1%溶液处理36—48小时,或以0.2%溶液处理24—36小时,可能得到較好的效果。

(三) 蘸浸法:

我們用0.2/24, 0.3/24的組合各处理20株子叶期幼苗。其中大部分在处理後,子叶变黃乃至枯萎脫落,終而引起植株的死亡。仅有少数植株,起初子叶发生黃变,但未达到枯萎脫落程度,这样过了一段时间之后又恢复了生長。在存活的9株中有1株发生了变異。所得結果列于表6。

表 6 以蘸浸法处理 KW—N 子叶期幼苗所得結果

組 別	处理幼苗数	成活株数	成活率 (%)	变異株数	变異率 (%)	相对变異率 (%)
0.2/24	20	6	30	—	—	—
0.3/24	20	3	15	1	5	33.3

这种处理法也是比較簡而易行，至于較适宜的濃度和時間，尚待进一步研究，才能作出結論。

(四) 組織学鑑定与細胞学鑑定結果的比較

如上三种处理植株的鑑定工作都是以保卫細胞对中的叶綠体数目和气孔的大小为指标进行的，以叶綠体数目的平均值18为初选的分界綫的标准。即叶綠体数平均值在18以上者为变異株，加以选留；18以下者为非变異株，原則上予以淘汰。为了証明这种机械划分法的准确度，对部分选留株作了細胞学的鑑定，抽查結果列于表7。

表7 部分变異株的組織学和細胞学的鑑定結果比較

組 別	編 号	保卫細胞的叶綠体数	气孔的大小(长×寬染)	色 体 倍 数	数 体 对
对 照		14.5±1.917	17.5±2.293×13.8±1.568	18	2×
0.2/25	8	18.3±0.2585	21.25±0.844×14.0±0.258	18	2×
0.2/25	6	19.8±1.789	21±1.325×15.0±0.236	18	2×
0.2/25	11	18.9±1.365	21.6±3.89×16.0±1.0	36	4×
0.2/25	13	29.4±1.517	22.0±2.65×19.0±1.414	18,36	2×, 4×
0.2/25	15	29.0±4.637	29.2±1.095×19.2±1.0	36	4×
0.2/25	16	27.0±3.873	24.2±1.304×19.6±1.746	36	4×
0.2/25	17	30.5±4.037	28.0±1.871×17.0±1.0	36	4×
0.2/48	1	26.4±1.987	—	36	4×
0.2/48	2	31.3±1.503	—	36	4×
0.2/48	3	20.8±1.575	—	36	4×
0.2/48	4	18.6±170.32	21.0±2.0×15.0±1.0	18,36	2×, 4×
0.2/48	5	19.2±2.28	19.0×14.0	18	2×
0.4/25	24	30.6±4.099	23.8±1.475×17.3±1.13	36	4×
0.4/25	25	29.7±1.51	24.4±1.061×14.6±1.34	18	2×

註：气孔的长寬是以目鏡測微尺的刻度为計算单位的。

由表7可以看到，凡叶綠体数多者，气孔長寬的数值亦相应地增加，反之則相应地減少。随着細胞体积的加大，單位面积內的細胞数也相应地減少⁽³⁾。

叶綠体数目与染色体数目成正比关系，凡叶綠体数平均值在26.25±2.487时，染色体数多为36(4×)，平均值为19.22±1.313时，染色体数多为18(2×)。但也有例外情形，如No.11，叶綠体平均值为18.9±1.365，而其染色体数却为36(4×)；又如No.4和No.13，則为36(4×)和18(2×)的混倍体。

总的看来，我們認為以叶綠体平均值18，作为汰选分界綫的指标，基本上是正确的。

問題在于平均值为19.2±1.313的一些个体較对照14.5±1.917多4.7±0.604，比

26.25±2.487相差7.05±1.74之多，而其染色体数却有三种不同情况，如No.11，叶绿体数为18.9±1.365，染色体数为36(4×)；No.6和No.8，叶绿体分别为19.8±1.789和18.3±0.2585，而其染色体数均为18(2×)；No.4，叶绿体数为18.6±0.1732，而其染色体数则为36(4×)和18(2×)的混倍体^[3, 4]。如何解释这种现象和产生的原因呢？通过No.4和No.13反复研究的结果表明，这些植株都是二倍性和四倍性的镶嵌体(Chimera)。即第一次检查No.4时为2×，而第二次检查时则为4×No.13的两次检查也出现了同样的结果。看来，这两株是区分镶嵌体(differential chimera)是没有疑问的了。但仔细观察后，却发现同一制片(分裂象多的)中，既有36根染色的四倍核，又有18根染色体的二倍核，形成所谓周边镶嵌体(Perichial chimera)^[3, 4, 8]。估计另外一些编号也可能有同样现象存在，所以有必要作更详细的观察。

根据原套、原体学说，表皮组织起源于原套，而叶内部组织则起源于原体。如果原套和原体具有相异的倍数性，其结果将产生周边镶嵌体。据此可以推知，No.4和No.13将产生倍数性相反的后代，即前者产生四倍体，后者产生二倍体^[8]。

根据上述的分述，可以得出如下结论：(1)多倍体的鉴定工作是综合性的，染色体数的鉴定是根本的，其他方法只起辅助性作用。(2)在处理较大群体时，应首先根据形态学指标进行初选；其次，对变异株进行组织学鉴定，再次淘汰；最后进行细胞学鉴定，并对同一植株的不同部分应反复研究^[3]。

四、摘 要

1. 干种球浸泡处理是一种简单易行的有效诱变方法。平均温度20℃左右时，以0.2%溶液处理25—48小时，或以0.4%溶液处理25小时，都获得了良好效果，而以0.4%溶液处理25小时，效果更为显著。

2. 萌发种球浸泡处理也是一种简单有效的诱变方法。在平均温度20℃左右时，以0.1%溶液处理50小时，得到较好的效果。如果用0.1%溶液处理36—48小时，或用0.2%溶液处理24—36小时，可能会获得更好的效果。

3. 蘸浸法操作简单，秋水仙精耗量低是其优点之一。至于浓度和时间对诱变效果的关系有待进一步的研究。

4. 任何一种处理法，供试种球或幼苗均要有足够的数量。

5. 保卫细胞对中的叶绿体数目与气孔大小成正相关性，而叶绿体数与染色体数的相关性也较显著，叶绿体平均值在26.25±2.487时，染色体数多为36(4×)；在19.22±1.313时，染色体数多为2×，故保卫细胞对中的叶绿体数可作为多倍体的鉴定指标。

6. 染色体数是最可靠的鉴定指标，但必须对同一植株的不同部位进行反复的观察，才能得出最后的结论。

参 考 文 献

- [1] Peto, F. H. and Hill, K. W.: Colchicine treatments of sugar beets and the yielding capacity of the resulting polyploids. Proc. 3rd Amer. Soc. Suc. Beet. Techn., 304—309, 1943.
- [2] Сахаров, В. В., Мансурова, В. В., Платнова, Р. Н. и Шербаков, В. К.: Получение полиплоидной сахарной свеклы. Доклады Академии наук СССР, том, 128, №6, 1283—1285, 1959.
- [3] Сахаров, В. В., Платнова, Р. Н., Шербаков, В. К., Мансурова, В. В.: Полиплоидия в селекции сахарной свеклы. Вестник сельскохозяйственной Науки, 9, 55—60, 1960.
- [4] Лутков, А. Н., Панин, В. А., Панина, Е. Б., Карташева, Э. П., Щипачева, Э. Н.: Методика получения полиплоидных гибридов сахарной свеклы. Селекция и семеноводство, 4, 58—60, 1963.
- [5] Mochizuki, A., Sueoka, N.: Genetic studies on the number of plastid in stomata. I. Effect of autopoloidy in sugar beets. Cytologia, 20, 258—366, 1955.
- [6] Shindo, K. and Kamemoto, H.: Chromosome number and genome relationships of some species in the *Nigrohirsutae* section of *Dentrobium*. Cytologia, 25, №1, 68—80, 1963.
- [7] Nirad, K. Sen and Vidyabhushan, R. V. Studies on Tetraploid Cluster Beam Varieties and their Triploid and Aneuploid Progenies. Cytologia, Vol. 25, №3—4, 426—436, 1960.
- [8] П. А. А.巴拉諾夫等: 植物多倍体 (中譯本) 科学出版社, 146頁, 360—364頁, 1959。