

^{60}Co γ 射线诱变分化态紫叶酢浆草再生体系的研究

丁增成^{1,2} 任杰¹ 朱立武² 王艳¹ 刘祚军¹ 唐菲¹ 史丹¹ 徐宏青¹

¹ (安徽省农业科学院农业工程研究所 合肥 230031)

² (安徽农业大学果树学重点实验室 合肥 230036)

摘要 为探索紫叶酢浆草的诱变方法,利用 ^{60}Co γ 射线诱变,研究处于分化态的紫叶酢浆草叶片诱导形成的再生体系。结果表明,处于分化态的紫叶酢浆草再生体系的愈伤组织不定芽、不定根的诱导数量随剂量的升高而降低。再生苗株高测量显示,10 Gy的辐照剂量对再生苗株高的影响不显著,25 Gy、50 Gy的辐照剂量处理能显著抑制再生苗的株高,其中经50 Gy辐照处理的再生苗株高仅为对照的36%。 ^{60}Co γ 射线照射对分化态的紫叶酢浆草再生体系诱发的变异类型主要有叶数、叶形、叶色等表型变异,其中以叶数变异为主(占变异总数的76%)。 M_2 代表型变异频率为2.9%,表型变异仍以叶数变异为主。

关键词 γ 射线,紫叶酢浆草,分化态

中图分类号 Q691, Q256, Q254, Q319+.31

花卉辐射诱变育种是利用 γ 等射线诱发花卉基因和染色体畸变,获得有价值的新突变体,从而育成优良品种。该方法育种成本低,突变频率高,比自然突变频率高100—1000倍,引起花卉形态结构和生理生化多方面的变异,结合组培技术,可在较短时间内育出花卉新品种。

文献[1]报道,采用辐射诱变育种技术已在营养繁殖植物中育出465个突变品种,其中大多数是花卉植物,包括菊花、大丽花、杜鹃花、秋海棠、石竹、月季等花卉种类。辐照处理材料包括球茎、鳞茎、插条、种子、丛生芽、植株等,经组织培养产生的愈伤组织、胚状体、组培苗也可用于照射处理^[2]。组培技术与辐射诱变育种相结合大大发展了辐射诱变育种,并使育种效率得到很大的提高,原因是:利用离体培养技术可以有效地分离突变组织;可以在有限的空间处理大量材料,筛选后变异体立即可以扩繁;由不定芽发生或体细胞胚状体再生,可以得到单个细胞起源的同质变异体,突变性状易于稳定等。随着越来越多植物组培技术的建立,辐射与组培技术相结合的育种方式以其独特的优势,受到广大育种工作者的青睐。洪亚辉等^[3]研究认为,组织培养结合辐射诱变进行菊花育种,可以得到丰富的变异体,提高变异频率,增加选择机会,缩短育种周期。目前,组培与辐射技术相结合已在豆瓣绿^[4]、口红花^[5]、菊花^[6]、多枝赖草、高羊茅^[7]等少数几种植物上得以成功应用。

三角紫叶酢浆草(*Oxalis triangularis purpurea*)

又名感应草、浅紫花酢浆草、红叶酢浆草,为酢浆草科酢浆草属多年生草本,丛生叶长柄,三小叶倒阔三角形,顶端凹缺,常年紫红色,形似飞舞的紫蝴蝶,到了晚上,叶片合拢呈“睡眠状”,独具特色,是一种优良的彩叶地被植物,具有色彩鲜艳、观赏期长、易于形成大色块景观的特点,市场潜力广阔。分化态紫叶酢浆草再生体系DNA处于旺盛分裂状态,研究紫叶酢浆草再生体系对 ^{60}Co γ 射线的辐射敏感性,对探索新的诱变材料、诱变方法,提高诱变育种效率具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

紫叶酢浆草叶片。

1.2 方法

1.2.1 紫叶酢浆草再生体系的建立 利用本实验室建立的“一步法”诱导紫叶酢浆草再生体系(该体系为愈伤组织以及已经形成的不定根、不定芽等器官的总称)。“一步法”诱导紫叶酢浆草再生体系,即把外植体接种于一种培养基上,通过优化培养基的配方,使外植体诱导成愈伤组织,然后在同一培养基上诱导成苗,并高效增殖。培养基的配方为MS+KT 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L,详见文献[8]。

1.2.2 分化态再生体系及其诱变的剂量 接种后

安徽省科技攻关(06013119B)、国际合作项目(09080703043)资助

第一作者:丁增成,男,1964年6月出生,2008年毕业于安徽农业大学园艺系,副研究员,目前主要从事苗木花卉育种研究

收稿日期:初稿 2009-07-20,修回 2009-08-24

35 d 的紫叶酢浆草再生体系,此时,再生体系已经形成部分不定根,并刚刚开始形成不定芽,该时期再生体系处于最旺盛的分化状态,特称之为分化态再生体系。 ^{60}Co γ 射线辐照分化态再生体系的辐照剂量设三个梯度,分别为 10 Gy、25 Gy、50 Gy,剂量率 2 Gy/min,一次性照射,照射时把外植体连同三角瓶一起放入辐照室。每个处理 20 个三角瓶(40 块外植体),实验重复三次。 ^{60}Co γ 射线照射在本所辐照中心完成。

1.2.3 评价诱变效果的指标 “一步法”诱导紫叶酢浆草再生体系,不需进行继代培养就可对照射后植株生长情况进行统计,在接种后培养的第 42 天(因植株的诱导需要一段时间,统计时间不宜过早),统计每块外植体产生不定根、不定芽的数量;植株形成后,统计表型变异频率,表型变异频率指诱发的叶数、叶形、叶色、分支变异等不同于对照的表型的变异率。

1.2.4 变异株无性二代 (M_2) 变异的频率与变异类型 每次取 10 株当代表现为变异性状的单株,每株取两片叶片,接种于上述培养基上,进行无性 M_2 代遗传稳定性试验,接种后 50 d,统计 M_2 代表型变异频率与变异的类型。 M_2 观察群体数: 275 株,实验重复三次。

1.2.5 统计方法 本实验数据的统计方法采用 Student's t test 检验。“1”、“2”分别表示 1%、5%水平上差异显著。

2 结果与分析

2.1 ^{60}Co γ 射线辐照剂量对不定芽的诱导数量的影响

图 1 为辐照剂量对不定芽诱导数量的影响曲线图。

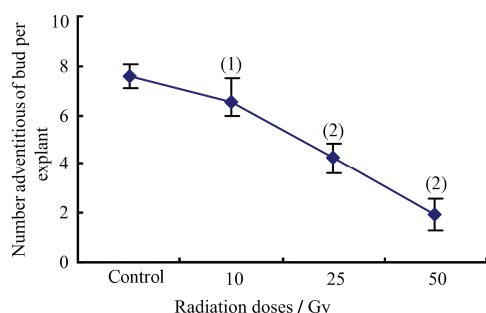


Fig.1 Effect of ^{60}Co γ -rays irradiation on the number of adventitious bud of *Oxalis triangularis purpurea* regeneration system Value (means $\pm$ standard errors of the mean, SEM) with (1) or, (2) is significantly ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) different from the non- irradiated control

从图 1 可以看出,当照射剂量分别为 10 Gy、25 Gy、50 Gy 时,平均每块外植体诱导产生不定芽的数量分别为 6.5、4.3 和 1.9 个/块,而对照为 7.6

个/块,随着剂量的升高,不定芽的诱导数降低。说明不定芽对 ^{60}Co γ 射线照射较为敏感。

2.2 照射剂量对不定根诱导数量的影响

图 2 为照射剂量对不定根诱导数量的影响曲线图。从图 2 可以看出,当辐照剂量分别为 10 Gy、25 Gy、50 Gy 时,平均每块外植体诱导产生不定根的数量分别为 11.8、10.5、8.3 条,而对照为 12.2 条,随着剂量的升高,不定根的诱导数也降低。

由于在第 35 天的再生体系,在照射前已经分化形成一定数量的不定根,因而不定根随辐照剂量增加而降低的幅度明显小于不定芽的降低幅度(见图 1 和图 2)。

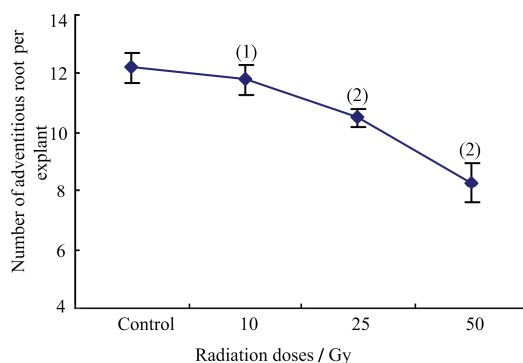


Fig.2 Effect of ^{60}Co γ -rays irradiation on the number of adventitious root of *Oxalis triangularis purpurea* regeneration system Value (means $\pm$ standard errors of the mean, SEM) with (1) or, (2) is significantly ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) different from the non- irradiated control

2.3 辐照剂量对再生苗株高的影响

图 3 为辐照剂量对再生苗株高的影响曲线图。由图 3 可以看出,10 Gy、25 Gy、50 Gy 的剂量照射紫叶酢浆草再生体系,再生苗的株高分别为 2.4 cm、1.9 cm、0.9 cm,对照为 2.5 cm,10 Gy 的辐照剂量对株高的影响不显著,25 Gy、50 Gy 的剂量辐照能显著抑制再生苗的株高,其中经 50 Gy 辐照处理的再生苗株高仅为对照的 36%。

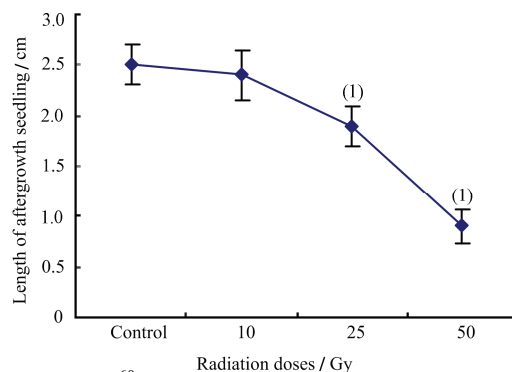


Fig.3 Effect of ^{60}Co γ -rays irradiation on length of regenerated seedling of *Oxalis triangularis purpurea* Value (means $\pm$ standard errors of the mean, SEM) with (1) is significantly ($p < 0.05$) different from the non-irradiated control

2.4 照射剂量对表型变异频率及变异类型的影响

图4为辐照剂量对表型变异频率的影响曲线图。从图4可以看出, ^{60}Co γ 射线辐照处于分生生态的紫叶酢浆草再生体系能大幅度提高诱变效果, 10 Gy、25 Gy、50 Gy 的照射剂量的表型变异频率分别为 3.1%、4.8%、5.6%, 对照为 0.08%。随着辐照剂量的升高至 50 Gy, 表型变异频率亦随之升高。当剂量为 50 Gy 时, 植株的分化率及分化苗的生长速度显著降低。因而, 本文认为 25 Gy 的剂量是辐照分化态紫叶酢浆草再生体系的最适宜剂量。

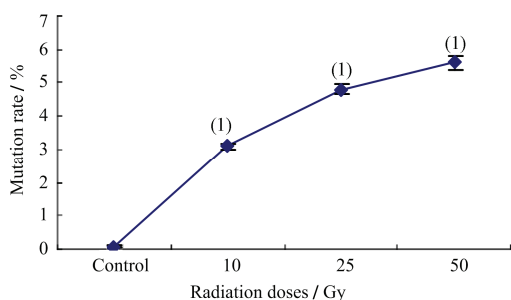


Fig.4 Effect of ^{60}Co γ -rays irradiation on the phynotype mutation rate of *Oxalis triangularis purpurea* regenerated Value (means $\pm$ standard errors of the mean, SEM) with (1) is significantly ($p<0.05$) different from the non-irradiated control

图5为辐照剂量对几种变异类型的影响, 从图5可以看出, ^{60}Co γ 射线辐照诱发产生丰富的变异类型, 表型变异主要有叶数、叶形、叶色等变异, 叶数变异 (主要有单叶变异、复叶变异、四叶变异、五叶变异等 36 株)、叶形变异 (对称型缺口变异等 5 株)、叶色变异 (桃红色变异 2 株), 所占的比例分别为 76.6%、10.6%、4.2%, 其它类型的变异 (诱导开花变异、分支变异等 4 株), 占 8.6%。

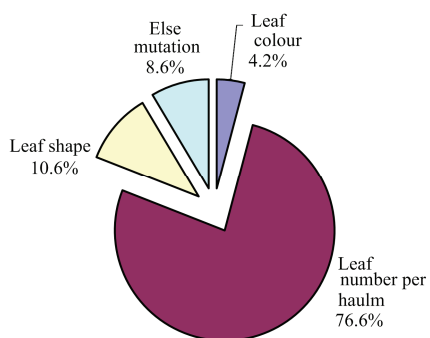


Fig.5 The proportion of mutation type of *Oxalis triangularis purpurea*

2.5 M_2 代表型变异频率及类型

当代表现为变异性状的单株的叶片接种在培养基上诱导成植株(M_2), 在 825 株 M_2 代观察群体中, 变异性状能够遗传的单株为 24 株, 大多数 M_2 单株 (801 株) 变异性状不能够遗传。 M_2 代表型变异频率为 2.9%。图6为 M_2 群体变异类型, 从图6可以

看出, 发生叶数变异的为 17 株, 占变异总数 (M_2 发生变异的共 24 株) 的 70.9%, 仍表现为以叶数变异为主; 发生叶色与叶型变异的均为 2 株, 占变异总数的 8.3%; 其它类型的变异为 3 株。

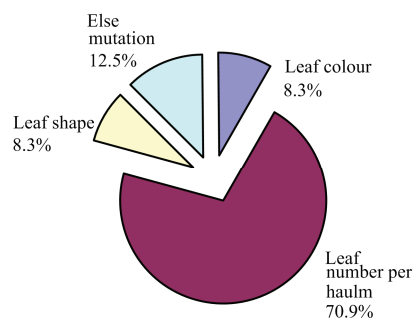


Fig.6 The proportion of several mutations generated from M_2 group

3 讨论

多数研究表明愈伤组织对外界环境较为敏感。郑维鹏等^[5]研究认为采用 γ 射线辐射口红花幼芽, 辐照剂量率为 $1.72 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$, 剂量为 40—45 Gy 时, 诱变频率可达 6%。葛荣朝等^[7]研究认为 EMS 溶液对多枝赖草、高羊茅愈伤组织的半致死体积分数分别为 6 mL/L 和 8 mL/L。文献^[9]研究认为, 经白桦愈伤组织 γ 射线和 EMS 处理后, 愈伤组织的生长受到抑制, 分化率显著降低。

愈伤组织 (再生体系) 的诱变研究已有一些报道^[3-7], 本文进一步研究了愈伤组织 (再生体系) 所处的培养状态对 ^{60}Co γ 射线辐射敏感性的差异。处于旺盛分生生态的愈伤组织 (再生体系), 其 DNA 处于更为旺盛的复制状态, 对 ^{60}Co γ 射线等诱变因子更为敏感。

本研究显示, 即使是 10 Gy 的较低剂量也能抑制不定芽及不定根的形成, 当辐照剂量增大时, 不定芽、不定根的诱导数量随之降低, 株高受到抑制。实验中不定根数随剂量降低幅度显然小于不定芽的降低幅度, 这可能与照射时紫叶酢浆草再生体系所处的状态有关, 在外植体接种后的第 35 天, 再生体系处于分化态, 这时已经有若干不定根形成, 而不定芽刚开始萌动, 因而辐照对不定根、不定芽的影响表现为不定根数随剂量升高而降低幅度小于不定芽的降低幅度。10 Gy 的剂量对再生苗的株高影响不大, 但当剂量增大时, 再生苗的株高随之降低。

据报道^[4,6,10], 花卉愈伤组织诱变育种取得了可喜的成绩。马燕等^[4]通过组织培养手段, 用 ^{60}Co γ 射线辐照豆瓣绿愈伤组织, 获得了变异植株。林祖军等^[6]研究认为电子束辐射菊花组培苗的适宜剂量为 30—50 Gy, 后代变异频率高、性状稳定, 且变异程度大、幅度广, 在诱发花色、花瓣、开花期变异上效果较好。陈香波等^[10]对金边瑞香组培苗

实施 ^{60}Co γ 射线诱变,确立适宜的辐射剂量为7 Gy,并获得少数耐低温变异体。

本研究认为对分化态的愈伤组织(再生体系)进行诱变更为有效。分化态紫叶酢浆草再生体系诱变的适宜剂量为25 Gy,当剂量较小时变异频率降低;当剂量较大时,紫叶酢浆草分化率及再生苗的生长都受到抑制,不利于育种工作的开展。照射分化态的紫叶酢浆草产生丰富的变异类型,变异以叶数变异为主,其诱变机理还有待于进一步研究。

M_2 代表型变异频率为2.9%,叶数变异仍占大多数,这可能与紫叶酢浆草的遗传特性有关。接近于10 Gy处理的当代表型变异频率,相对于自然变异表现为较高的变异频率,但大多数表型变异不能在后代遗传,给育种工作增加了工作难度。

参考文献

- Ahloowalia B S, Maluszynski M. *Euphytica*, 2001, **118**(2): 167-173
- 王丹, 任少雄, 苏军, 等. 核农学报, 2004, **18**(6): 443-447
WANG Dan, REN Shaoxiong, SU Jun, *et al.* *Acta Agri Nucl Sin*, 2004, **18**(6): 443-447
- 洪亚辉, 朱兆海, 黄璜, 等. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, **29**(6): 457-461
HONG Yahui, ZHU Zhaohai, HUANG Huang, *et al.* *J Hunan Agric Univ (Natural Science Edition)*, 2003, **29**(6): 457-461
- 马燕, 程金水. 北京林业大学学报, 1987, **9**(3): 325-326
MA Yan, CHENG Jinshui. *Journal of Beijing Forestry University*, 1987, **9**(3): 325-326
- 郑维鹏, 王志洁, 赖喜荣, 等. 福建林业科技, 1999, **26**(4): 18-21
ZHENG Weipeng, WANG Zhijie, LAI Xirong, *et al.* *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*, 1999, **26**(4): 18-21
- 林祖军, 孙纪霞, 崔广琴, 等. 山东农业科学, 2000, (5): 10-11
LIN Zujun, SUN Jixia, CUI Guangqin, *et al.* *Shandong Agric Sci*, 2000, (5): 10-11
- 葛荣朝, 赵宝存, 秘彩莉, 等. 河北师范大学学报(自然科学版), 2007, **31**(4): 531-534
GE Chaorong, ZHAO Baocun, BEI Caili, *et al.* *Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)*, 2007, **31**(4): 531-534
- 任杰, 丁增成, 刘祚军, 等. 中国农学通报, 2009, **25**(3): 60-62
REN Jie, DING Zengcheng, LIU Zuojun, *et al.* *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, **25**(3): 60-62
- 唐敬轩. 白桦愈伤组织的 ^{60}Co γ 射线和EMS诱变研究. 硕士学位论文, 东北林业大学, 2007
TANG Jingxuan. Study on ^{60}Co γ -rays and EMS Mutagenesis on Callus of *Betula Platyphylla*. Master's degree thesis, Northeast Forest University, 2007
- 陈香波, 罗玉兰, 李团锦, 等. 园林科技, 2004, (3): 19, 26-27
CHEN Xiangbo, LUO Yulan, LI Tuanjin, *et al.* *Yuan Lin Ke Ji*, 2004, (3): 19, 26-27

Study on the radiation research of differentiation state *oxalis triangularis purpurea* regeneration system by ^{60}Co γ -rays

DING Zengcheng^{1,2} REN Jie¹ ZHU Liwu² WANG Yan¹
LIU Zuojun¹ TANG Fei¹ SHI Dan¹ XU Hongqing¹

¹(Institute of Agricultural Engineering, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

²(Key Laboratory of Pomology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT To study the mutation method of *Oxalis triangularis purpurea*, the *Oxalis triangularis purpurea* regeneration system generated from the leaf was irradiated by ^{60}Co γ -rays. It shows that the number of adventitious bud and root induced from the differentiation state *Oxalis triangularis purpurea* regeneration system are cut down with the increment of absorbed doses. After growth seedling length has not distinctly reduced while the absorbed dose is 10 Gy. And it has reduced at 25 Gy and 50 Gy of ^{60}Co γ -rays irradiation with the differentiation state tissue of *Oxalis triangularis purpurea*. The mutation, such as leaf number, leaf colour and leaf shape mutation, mainly the leaf number mutation (76% of the total mutation) occur in the ^{60}Co γ -rays irradiated group. The M_2 mutation rate is 2.9%, and the main mutations are leaf number mutations.

KEYWORDS γ -rays, *Oxalis triangularis purpurea*, Differentiation state

CLC Q691, Q256, Q254, Q319+.31