

# $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ 射线辐照对东方百合鳞片不定芽诱导的影响

张冬雪, 王 丹, 张志伟

(西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000)

**摘 要:** 试验以东方百合索邦鳞茎为材料, 采用再裂区试验设计, 分别讨论了 3 个主因素及其交互作用对鳞片不定芽诱导情况的影响。试验结果表明: 低激素水平有利于不定芽的诱导; 辐射处理对百合鳞片出芽的抑制效应极显著; 在试验剂量范围内, 随着辐射剂量的增加, 出芽率、芽均数均急剧减少; 激素水平与辐射剂量、鳞片部位与辐射剂量的交互作用对不定芽诱导的影响均不显著; 随着培养时间的增加, 各辐射处理的出芽率和芽均数普遍增加, 且低剂量间的差异逐渐缩小, 高剂量间的差异逐渐增加;  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照东方百合索邦鳞片的适宜剂量约为 2.0Gy。

**关键词:** 百合; 离体培养; 诱变育种;  $\gamma$  射线

**中图分类号:** S335.2<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)02-0152-04

辐射与离体培养相结合的育种方式受到许多育种工作者的青睐, 从 20 世纪 80 年代末就已应用到小麦、甘蔗等农作物的育种工作中, 在观赏植物中的应用开始于上世纪 90 年代末, 至今已经成功培育出许多优良的花卉种质资源, 其中在菊花<sup>[1,2,3]</sup>、香石竹<sup>[4,5]</sup>种质资源创新方面的成就更是令人瞩目。

百合(*Lilium spp.*) 是世界上著名的观赏花卉。随着花卉市场的发展和人们观赏水平的提高, 对百合新品种的追求更加迫切。研究在前人探索百合辐射育种<sup>[6,7]</sup>的基础上, 结合百合组培<sup>[8-11]</sup>经验, 首次将百合辐射育种与组培技术相结合, 探索辐射处理对百合鳞片不定芽诱导的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

东方百合索邦(Sorbonne), 一代开花种球, 鳞茎周径为 16~18cm, 由云南隆格兰园艺有限公司提供。

### 1.2 方法

试验采用再裂区设计方案, 设有 A、B、C3 个试验因素, A 因素为主区, 代表百合鳞片诱导不定芽培养基种类, 具 2 个水平, A1: MS+6 BA 1.0+NAA 0.1(单位: mg/L, 以下同); A2: MS+6 BA 2.0+NAA 0.2。

B 因素为副区, 代表外植体类型(鳞片部位), 具有 2 个水平, B1: 外部鳞片; B2 中部鳞片。C 因素为再裂区, 代表辐射剂量, 具有 6 个水平, 0Gy、0.5Gy、1.0Gy、2.0Gy、4.0Gy、8.0Gy。共 24 个处理, 设 3 次重复。辐射源为  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线, 剂量率为 0.799Gy/min, 辐射处理在久远辐照中心进行。

**鳞片处理:** 首先拔除鳞茎最外层 2~3 片鳞片, 继续拨取 5~6 片为外层鳞片, 再向内拨取 5~6 片鳞片记为中层鳞片, 拨下的鳞片用清水洗干净后, 饱和洗衣粉溶液浸泡 25~30min, 自来水清洗 3~4 次后流水冲洗过夜。超净工作台表面灭菌程序为: 75%酒精灭菌 40s, 无菌水洗一次, 0.1%升汞 10~12min(外部鳞片 12min, 中部鳞片 10min), 加 2~3 滴吐温-80, 灭菌期间更换 1 次升汞灭菌液, 并不断摇动, 灭菌后无菌水洗 5~7 遍, 每次间隔约 2min。用灭菌的滤纸吸干鳞片表面水分, 用解剖刀将灭过菌的鳞片切成 0.5cm×0.5cm 小块, 凹面朝上, 4 块/瓶接种。

### 1.3 培养条件

以 MS 培养基为基本培养基, 蔗糖 30g/L, 琼脂 0.7%, 高压灭菌前调 pH 值为 5.8±0.02。培养温度 25±2℃, 光照时间 12h/d, 光照强度 2000Lx。

接种后先进行 5~7d 暗培养, 然后辐射处理, 辐射时各处理的三角瓶平放在相同大小的纸箱里,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线垂直照射。辐射处理后 1~2d 内转接到相同的新鲜培养基上, 并开始 12h 光照培养。

### 1.4 统计方法

**1.4.1 数据采集** 辐射处理后转接 6~7d 后进行染菌外植体数目统计(060123); 接种 28d 后统计存活外植体数目、出芽外植体数目、出芽数目的统计

第一作者简介: 张冬雪, 女, 1980 年生, 在读研究生, 研究方向为园艺植物遗传育种, E-mail: zhdx1980@126.com。

基金项目: 中国工程物理研究院横向合作研究课题, 项目编号: 200305。

收稿日期: 2006-09-22



(060208); 接种 42d 后再次统计出芽外植体数目、并按出芽大小分 4 个等级统计芽的数目(060221), 标准: 大芽: 芽高 $\geq 0.5\text{cm}$  或芽底部直径 $\geq 0.3\text{cm}$ ; 中芽: 芽高 $\geq 0.3\text{cm}$  或芽底部直径 $\geq 0.2\text{cm}$ ; 小芽: 芽高 $\geq 0.2\text{cm}$  或芽底部直径 $\geq 0.15\text{cm}$ ; 萌芽: 芽底部直径 $\leq 0.1\text{cm}$ 。

1.4.2 数据整理 存活率 $\%$  = 存活外植体数目 / 未污染外植体总数 $\times 100$ ; 出芽率 $\%$  = 出芽外植体数 / 未污染外植体总数 $\times 100$ ; 出芽数 = 出芽总数 / 未污染外植体总数。

1.4.3 数据分析 数据分析采用荣廷昭<sup>[12]</sup>主编的《田间试验与统计分析》中再裂区试验结果分析方法, 并用 spss11.5 进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对出芽率的影响

由表 1 中可以看出: 培养基 A1 对鳞片的出芽率高于培养基 A2, 中部鳞片的出芽率略高于外部鳞片。经过辐照的鳞片出芽率显著低于未经辐照的对照, 且 4.0Gy、8.0Gy 两个辐照处理的出芽率显著低于其余辐照处理。方差分析的结果表明, 辐射剂量对出芽率的影响达到极显著水平。培养基、外植体对出芽率的影响不显著, 且培养基、外植体与辐射剂量的两两交互作用对出芽率的影响不显著。

表 1 不同处理对百合鳞片出芽率的影响

因素	水平	出芽率(28d)	出芽率(42d)
培养基	A1	30.05	40.51
	A2	21.87	28.25
外植体	外	26.55	31.01
	中	26.36	37.75
辐射剂量 Gy	0.0	55.73aA	62.04aA
	0.5	38.96bAB	44.46bAB
	1.0	38.88bAB	47.49bAB
	2.0	23.54bB	33.79bB
	4.0	1.64cC	18.51cC
	8.0	0.00cC	0.00cC

注: 同一栏中, 不同大小写字母分别表示差异达 0.01 和 0.05 水平(以下同)。

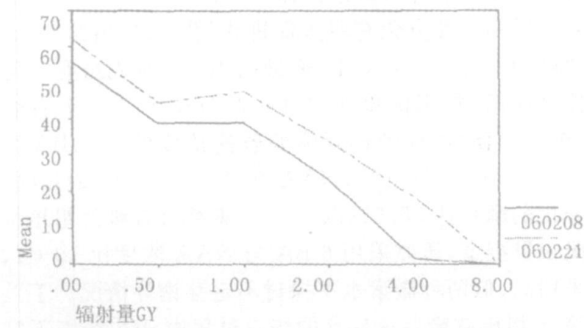


图 1 不同辐射剂量对百合鳞片出芽率的影响

从图 1 中可以看出, 辐射处理对鳞片外植体出芽有明显的抑制效果, 在本试验剂量范围内, 随着辐射剂量的增加, 鳞片出芽率逐渐减少。从出芽率来看, 辐射剂量 2.0Gy 处理中出芽率约为对照的 0.55 ~ 0.65 倍, 因此, 可认为索邦百合鳞片组培辐射的适宜剂量约为 2.0Gy。

2.2 不同处理对出芽数的影响

2.2.1 培养基和外植体种类对出芽数的影响 从表 2 可看出: 鳞片外植体培养 28 d 时, 外部鳞片芽均数高于中部鳞片, 且这种差异在培养基 A1 上表现的较 A2 明显。随着培养时间的延长, 中部鳞片出芽数超过外部鳞片, 且这种差异在培养基 A2 上表现的较 A1 明显, 因此可以认为, 在相同激素水平下, 外部鳞片出芽要早于中部鳞片; 中部鳞片芽诱导培养基中需添加相对较高的激素水平。

表 2 培养基和外植体对出芽数的影响

	培养基	外植体	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
出芽数	A1	外	2	0.22	1.55	2.44
		中	2.02	0.22	1.57	2.47
	A2	外	1.08	0.22	0.63	1.53
		中	1.33	0.22	0.88	1.78
出芽数	A1	外	1.47	0.18	1.11	1.82
		中	1.28	0.18	0.93	1.64
	A2	外	0.84	0.18	0.49	1.2
		中	0.76	0.18	0.4	1.11

从表 3 可以看出, 接种 28d 后出芽数受培养基中激素水平影响极显著, 低水平激素量培养基(A1) 的出芽数在 0.01 水平显著高于高水平激素量(A2) 的出芽数。但随着培养时间的延长, 出芽数普遍增加, 低激素水平刺激出芽的正面效应减缓或消失。不同鳞片部位对出芽数的影响不显著。

表 3 不同处理对百合鳞片出芽数的影响

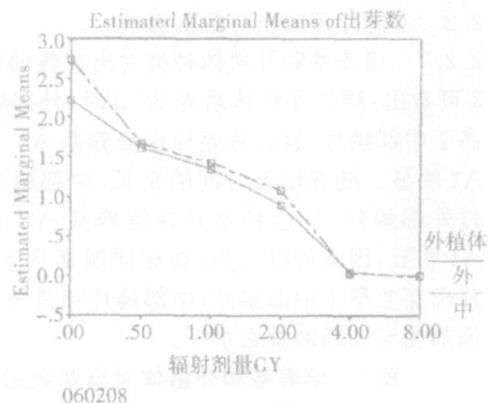
因素	水平	出芽数(28d)	出芽数(42d)
培养基	A1	1.374aA	2.007
	A2	0.801bB	1.206
外植体	外	1.156	1.537
	中	1.020	1.676
辐射剂量 Gy	0.0	2.468aA	3.007aA
	0.5	1.645bAB	1.949bCAB
	1.0	1.388bB	2.515abAB
	2.0	0.988bB	1.553cBC
	4.0	0.039cC	0.616dCD
	8.0	0.000cC	0.000dD

2.2.2 辐射处理对出芽数的影响 从图 2 - A、C 可看出: 辐射处理与外植体类型的交互作用对出芽数的影响微小, 不同外植体的最适宜辐射剂量均在 2.0Gy 左右。辐射剂量与培养基的交互作用对鳞片出芽数有一定影响(图 2 - B、D), 与低激素水平的培养基 A1

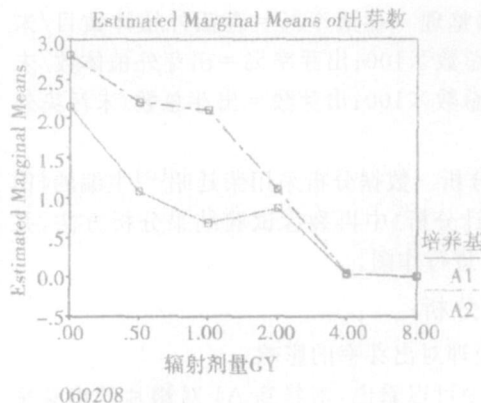
比较, 高激素水平培养基 A2 与辐射剂量的互作抑制鳞片的出芽数, 随培养时间延长, 抑制作用减缓。方差分析结果表明辐射剂量与培养基相互作用效果未达到显著水平。

出芽数的方差分析可以看出, 辐射处理对出芽数

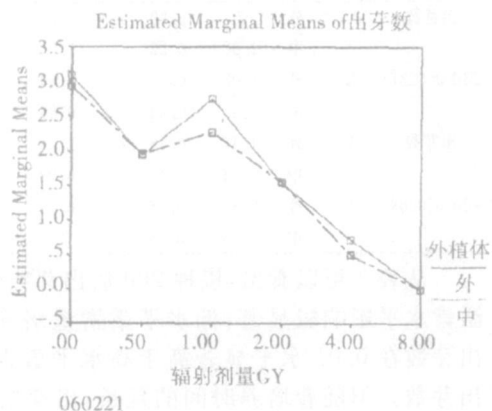
的影响极显著, 且不随培养时间的延长而消失。在试验剂量范围内, 随着辐射剂量的增加, 出芽数急剧减少, 在辐射剂量为 2.0Gy 时出芽数为对照的 0.4~0.5 倍(表 4), 因此 2.0Gy 可以作为索邦百合鳞片组培辐射的适宜剂量。



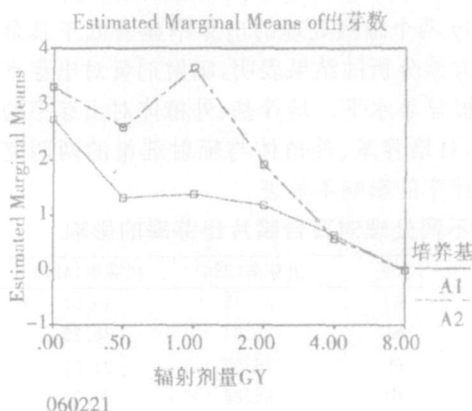
A



B



C



D

图2 出芽数随培养时间的变化趋势

### 2.3 不同处理对芽大小的影响

由图 3-A 看出, 培养种类影响鳞片不定芽的大小, 低激素水平(A1)的各级别的芽数均大于高激素水平的培养基(A2), 且大芽数相差较明显, 因此该试验中, A1 为索邦百合鳞片不定芽诱导的适宜培养基。

由图 3-B 看出外植体部位影响芽的大小, 中部鳞片的大芽数和中芽数都明显高于外部鳞片, 由此看来, 与外部鳞片相比, 中部鳞片更适于作索邦百合鳞片不定芽诱导的外植体。由图 3-C 看出辐射剂量对芽大小的影响非常明显, 芽越大受辐射剂量的抑制作用越强。

### 3 小结与讨论

百合属植物组织培养成败的关键是激素种类和激素浓度的选择与搭配。前人的研究结果表明 6 BA 对诱导不定芽分化有明显促进作用<sup>[13]</sup>, 常用的 6 BA 浓度为 0.4~2.0mg/L, 适量的 NAA 对成苗有一定促进作用, 常用浓度为 0.1~0.5mg/L<sup>[14]</sup>。火百合(东方百合)鳞片的诱导需要较高浓度的 BA, BA 浓度在 1.5~2.0mg/L, NAA 在 0.05~0.1mg/L 时, 分化的鳞片达 75.5%以上<sup>[15]</sup>。索邦百合鳞片组培情况未见报道, 研究采用 6 BA 与 NAA 浓度比 10:1, 采用高、低两种激素水平探讨不定芽诱导情况。丁兰等<sup>[16]</sup>指出在鳞茎诱导芽的培养过程中, BA 浓度不宜过高(1mg/L), 否则, 会导致外植体产生大量愈伤组

织。但在该试验过程中,高激素水平未经辐照处理中仅有极少数鳞片外植体产生愈伤组织,在低激素水平中未曾见到愈伤组织产生,可见不同百合品种对激素的需求存在一定差异;但高剂量辐照处理中鳞片出愈率高于未辐照处理,在 4.0Gy 处理中表现明显,可见

辐射改变器官发生途径,使有序的芽生长点结构变为非胚性愈伤组织的不定型结构,通过这种方式的转变抵御辐照引起的损伤,大量的繁殖细胞以加速修复损伤,达到个体生存繁衍的目的。

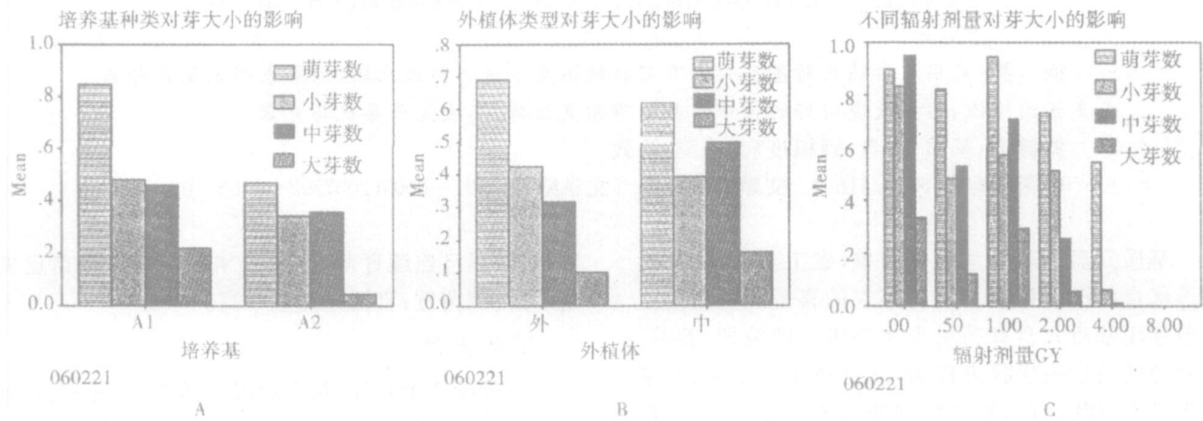


图3 不同辐射剂量对鳞片芽大小的影响

辐射剂量达到 8.0Gy 时,鳞片外植体受到严重的辐射损伤,直至培养 42 d 时出芽数全部为零,在培养近 60 d 时发现 8.0Gy 辐射处理中有个别外植体出芽,与对照(0Gy)相比出芽时间延后约 40 d,且芽生长状况极差,生长几乎停滞在小米粒大小阶段。推测辐射处理除具有抑制出芽的作用,还可能有推迟鳞片出芽、抑制芽发育的作用,有待进一步验证。

该试验首次探索百合离体培养鳞片的适宜辐射剂量,并初步探索不同培养基(不同激素水平)与辐射效应的交互作用。在该试验中,鳞片生长的环境——培养基中激素水平与辐射效应交互作用不明显,并不显著影响鳞片的辐射敏感性。鳞片不同部位(中部鳞片、外部鳞片)的辐射敏感性基本一致,从出芽率、出芽数考虑,可认为索邦百合鳞片组培<sup>60</sup>Co γ射线辐射的适宜剂量约为 2.0Gy。

参考文献:

[1] 林祖军,孙纪霞.电子束辐射菊花离体培养苗诱变育种研究.山东农业科学,2000(5):10-11.  
[2] 王海燕,何小弟,黄永高.菊花组织培养技术在育种上的应用研究[J].江苏林业科技,2003,30(4):25-26,30.  
[3] Lamseejan S; Jompuk P; Wongpiyasatid A, et al. Gamma rays induced morphological changes in chrysanthemum. (Chrysanthemum morifolium) [J]. Kasetsart Journal Natural Sciences, 2000, 34: 3, 417-422.  
[4] Wang ChangQuan, Song Heng, Wang XiFeng, et al. Selection of salt tolerant variants from China pink [J]. Acta Horticulturae Sini

ca, 2001, 28: 5, 469-471.  
[5] Singh KP, Singh B, Raghava SPS, et al. In vitro induction of mutation in carnation through gamma irradiation [J]. Journal of Ornamental Horticulture New Series, 1999, 2: 2, 107-110. 17 ref. English.  
[6] 张克中,赵祥云,黄善武,等.辐射百合鳞片扦插诱生的不定芽植株变异研究[J].核农学报,2003,17(3):215-220.  
[7] 周斯建.百合幼苗高温胁迫反应及辐射鳞片对其扦插苗耐热性影响[D].中国农业大学硕士学位论文,2005:30-39.  
[8] 陆春霞.百合组织培养与多倍体研究[D].广西大学学位论文,2004:46-48.  
[9] 董志渊.百合的组织培养及其育种中的应用[J].西部林业科学,2004,33(2):64-68.  
[10] 赵庆芳,李巧峡,丁兰,等.西伯利亚百合的组织培养和离体快繁[J].甘肃科学学报,2003,15(4):52-55.  
[11] Duong Tan Nhut, Bui Van Le, Michio Tanaka, et al. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of Lilium longiorum [J]. Scientia Horticulturae 87 (2001): 131-138.  
[12] 荣廷昭.田间试验与统计分析[M].北京.中国农业科技出版社.1998年2月:238-243.  
[13] 刘选明,周朴华,屈妹存,等.百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚[J].园艺学报,1997,24(4):353-358.  
[14] 蒋细旺,司怀军.百合的组织培养技术综述[J].湖北农业科学.2004(1):78-82.  
[15] 张施君,王凤兰,周厚高,等.火百合的组织培养及快速繁殖[J].江苏农业科学,2004(4):72-73.  
[16] 丁兰,刘国安,田卫东,等.新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究[J].西北师范大学学报(自然科学版),2001,37(1):80-82.