

春兰离体根状茎辐射及 EMS 诱变方法建立

褚云霞^{1,2,3}, 张永春^{2,3,4,5}, 靖相密^{3,4}

(1. 上海市农业科学院 园艺所, 上海 201106; 2. 上海市农业科学院 花卉研究中心 上海 201106; 3. 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106; 4. 南京林业大学 森林资源与环境学院 南京 210037; 5. 上海市农业科学院 林木果树研究所, 上海 201106)

摘 要:以野生春兰茎尖培养所得根状茎为材料, 用 10、20、30、40 Gy ⁶⁰Co γ 射线进行辐照, 以不经辐照为对照。处理材料培养在 1/2MS+NAA 5 mg/L 上进行增殖, 经 30 d 后统计重量及生长点数, 同时转入 1/2MS+NAA 0.2 mg/L+BA 3 mg/L 进行分化培养, 经 45 d 后统计分化出的苗数。结果表明:随着辐照剂量增大, 根状茎的增殖特别是新生长点的形成受抑制, 苗分化均略有促进, 但未达显著水平, 高剂量(> 30 Gy)将严重抑制增殖与分化, 20 Gy 应为春兰根状茎辐照诱变的最适剂量。EMS 处理分别以 0.6%、0.8% 浸泡 6 h 和 8 h, 以磷酸缓冲液浸泡为对照, 结果表明, 处理与对照差异显著, 随着浓度的增大, 根状茎的死亡率明显提高, 0.8% 浸泡 6 h 与 8 h 之间差异不显著。

关键词:春兰; 根状茎; ⁶⁰Co; EMS
中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)01-0049-04

春兰是我国兰属植物中分布最广、最常见、最受人们喜爱并且栽培历史最久的一种兰花^[1]。在过去长期的栽培中, 由于春兰种子微小, 胚未分化, 无胚乳或仅有少量胚乳, 在自然条件下极难萌发, 因此一直沿用分株法进行无性繁殖, 变异极少, 难以获得兼具叶艺、花艺的优良品种, 受到技术条件和科学知识的限制, 长期以来只是从自然变异中选择出“品种”, 人工育种的研究很少, 仅有少数杂交育种的报道及用紫外线、秋水仙素进行人工诱变的尝试^[2]。化学诱变是人工获取突变体常用的手段之一, 目前化学诱变主要应用于对农作物的处理, 再通过多世代对突变体进行选择 and 鉴定, 直接或间接地培育成生产上能利用的农作物品种^[3]。观赏植物上化学诱变应用较多的例子是秋水仙素诱导多倍体^[4-5], EMS(甲基磺酸乙酯)作为一种新型诱变剂^[6], 在蝴蝶兰的类原球茎上进行了试验^[7], 在春兰上的应用尚未见报道。而核技术农业应用在我国始于 20 世纪 50 年代, 经历时间虽然不长, 但在理论研究和生产实践中取得了一批成果, 获得了较好的经济效益。利用辐射诱变, 培育出符合人们需要的新品种, 已成为当前观赏植物育种的一个重要手段, 我国通过核技术进行观赏植物诱变育种已育出许多花卉新品种^[8-15]。因此, 对适宜春

兰离体根状茎诱变的 EMS 浓度、处理时间及⁶⁰Co 辐照剂量进行了研究, 以期对春兰的人工诱变提供技术支持。

1 材料和方法

野生春兰通过茎尖培养获得根状茎^[1], 选择生长一致, 大小相似的根状茎进行试验。以 4 种剂量⁶⁰Co γ 射线进行辐照, 分别为 10、20、30、40 Gy, 剂量率 2.11 Gy/min (辐射剂量用硫酸亚铁化学剂量计进行测量)每处理 10 瓶, 重复 2 次, 以不经辐射为对照。以 1/2 MS+NAA 5 mg/L 为增殖培养基, 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+BA 3 mg/L 为分化培养基, 各组培养基中蔗糖浓度均为 2%, pH 为 5.4 用 100 mL 锥形瓶分装, 每瓶 40 mL 培养基。培养温度为(25 \pm 2) $^{\circ}$ C, 光照 14 h/d, 增殖培养 30 d 后统计培养前后的根状茎数(增殖率=新增根状茎数/(培养前的根状茎数-死亡根状茎数) \times 100%), 分化培养于 45 d 后统计分化出的苗数。同时用电子天平称重。求其平均生长速度[平均生长速度=每瓶绝对增长量/(培养前的重量-死亡根状茎重) \times 100%], 并进行方差分析。经分化培养 180 d 后测量其株高, 求得平均株高(分化出苗少于 50 株时, 全部测量, 大于 50 株时, 随机抽 50 株测量)。采用的 EMS 为美国 SIGMA 产品, 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.0 用前用 0.45 μ m 无菌微孔滤膜过滤灭菌。分别配成 0.6%、0.8% 的浓度, 浸泡根状茎 6 h 和 8 h, 以磷酸缓冲液浸泡 6 h 为对照, 每处理接种 5 瓶, 重复 2 次。其余同辐射诱变处理。

第一作者简介: 褚云霞(1975-), 女, 硕士, 助理研究员, 长期从事花卉育种与栽培工作。E-mail: yy4@saas.sh.cn.
基金项目: 上海市科技兴农重点攻关资助项目[沪农科攻字(2003)第 4-3 号]。
收稿日期: 2008-08-10

2 结果与分析

2.1 物理诱变

2.1.1 不同剂量辐照对根状茎增殖的影响 培养 1 月后增重及生长点产生情况汇总成表 1。由表 1 可知 随辐照剂量增大, 根状茎的增重受抑制 而各处理对增殖率均有显著影响, 经辐照后, 增殖率呈先下降后上升的

的趋势。高剂量处理后的根状茎表现为较少产生新的生长点 根状茎逐渐转为深绿色, 不再进行生长, 并逐渐死亡, 统计死亡根状茎条数, 计算出剂量为 20 Gy 时, 死亡率为 47%, 说明半致死剂量在 20 Gy 附近, 以致死率进行方差分析表明各处理间差异达极显著水平(表 2)。

表 1 辐射处理对春兰根状茎增殖影响情况

Table 1 The effect of radiation on rhizome multiplication of *cymbidium goeringii* after a month

处理剂量	初始重	原根状茎数	1 月后重	死亡根状茎数	新生根状茎数	平均生长速度	平均增殖率
Dose treatment	Initial weight	Initial rhizome	Weight after	Died rhizome	New rhizome	Average of	Average
/Gy	/g	number/ 条	30 days/ g	number/ 条	number/ 条	growth / %	proliferous ratio/ %
CK	37.8	324	60.6	10	344	62	110
10	41.9	266	61.9	40	176	56	34
20	41.9	264	44.5	124	42	12	27
30	45.6	256	46.2	228	17	12	61
40	38.9	270	37.3	238	62	—35	94

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance result

差异源	离均差平方和	自由度	均方	组间均方/ 组内均方 F	P 值	F 临界值
Source	Variance	DF	MS		P-value	F crit
组间	12.17478	4	3.043694	133.4565	4.24E-38	2.467494
组内	2.16663	95	0.022807			
总计	14.34141	99				

表 3 辐照春兰根状茎分化情况

Table 3 The rhizome differentiation result of *cymbidium goeringii* after radiation

处理剂量	初始重	原根状茎数	培养后重	成芽数	平均生长速度	平均每克分化芽数	平均株高
Dose of treatment/ Gy	Initial weight / g	Growing rhizome / 条	Weight after culture/ g	Number buds obtained/ 条	Average rate of growth/ %	Average number of buds from each gram rhizome/ 条	Average height/ cm
CK	59.4	658	210.6	994	255	16.73	4.43
10	55.6	302	106.0	663	91	11.92	2.63
20	24.8	178	43.6	170	76	6.85	2.99
30	5.6	45	15.9	22	184	3.93	2.74
40	3.0	62	15.0	5	400	1.67	3.12

2.1.2 不同剂量辐照对根状茎分化的影响 由表 3 可知 辐射处理对分化起了抑制作用, 且随着剂量的加大, 抑制作用越明显, 可能是根状茎受辐射伤害后, 原来的细胞大部分死亡, 存活的细胞经修复后产生的新根状

茎, 正处于快速增长期, 影响了分化能力, 使根状茎分化出芽的概率急剧下降。调查结果显示 10 Gy 矮化效果最明显, 平均株高仅为对照的 59%, 最高材料仅为 5 cm, 而对照可达 10 cm。

表 4 EMS 处理对春兰根状茎增殖影响情况

Table 4 The effecte of EMS on rhizome multiplication of *cymbidium goeringii* after a month

处理 Treatment (浓度 时间)	初始重	原根状茎数	1 月后重	死亡根状茎数	新生根状茎数	平均生长速度	平均增殖率
	Initial weright	Initial rhizome	Weight after	Died rhizome	New rhizome	Average rate of	Average proliferous
	/g	number/ 条	30 days/ g	number/ 条	number/ 条	growth/ %	ratio/ %
0.6% 6h	9.5	100	17.7	36	109	135	170
0.8% 6h	9.7	100	14.3	49	84	93	165
0.6% 8h	9.8	100	17.9	51	124	169	253
0.8% 8h	9.6	100	14.4	47	110	94	208
CK	9.0	100	19.2	27	103	155	141

2.2 化学诱变

由表 4.5 可知, EMS 处理对根状茎的增重影响较大(方差分析时 F 值为 2.83, 置信度为 0.05 时 F 值为 2.59), 且随浓度加大抑制作用越明显, 而浓度为 0.8%

时浸泡时间延长 2 h, 差异不明显; 0.6% 的 EMS 处理时间延长, 根状茎的死亡率明显加大; 对新根状茎的产生则起到促进作用, 特别时较长时间浸泡处理。浓度为 0.8% 的 EMS 浸泡处理 6 h、8 h 或 0.6% 浸泡 8 h 均可使

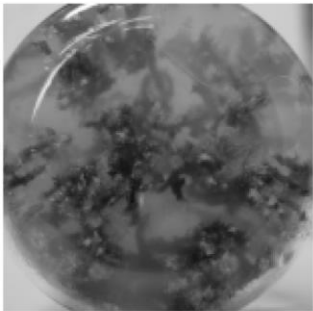
根状茎的半数死亡, 因此认为, 春兰 EMS 诱变的适宜条 件为 0.8‰的EMS 浸泡 6~8 h 或 0.6‰浸泡 8 h。

表 5 EMS 处理对春兰根状茎分化影响情况

处理 Treatment (浓度 时间)	初始重 Initial weight / g	原根状茎数 Initial growing point number/ 个	培养后重 Weight after culture/ g	成芽数 Number of buds obtained/ 个	平均生长速度 Average rate of growth/ %	平均每根状茎分化芽数 Average number of buds from each rhizome/ 个
0.6‰ 6h	14. 3	173	17. 3	280	21	1. 6
0.8‰ 6h	9. 5	135	11. 8	256	25	1. 9
0.6‰ 8h	12. 9	173	19. 8	330	54	1. 9
0.8‰ 8h	9. 9	163	14. 5	286	46	1. 8
CK	16. 8	176	19. 8	320	18	1. 8

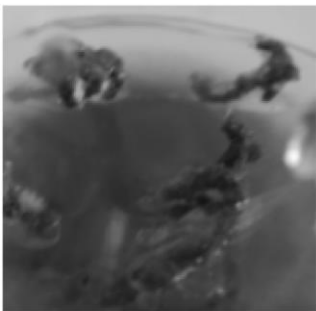
进一步观察分化情况发现, 经分化培养重量增加均不明显, 8 h EMS 浸泡反而促进了重量的增加, 但对每条根状茎分化芽数影响不大。

3 讨论 春兰茎尖培养获得原球茎 之后部分突起拉长成为 根状茎^[6], 根状茎⁶⁰Co 辐射诱变的适宜剂量为 20 Gy, 这与陈华等人用剑兰、报岁兰、四季兰的芽进行试验的结果较符合^[7]。经辐射诱变的根状茎分化出的苗中出现了 4 株叶片边缘白化苗, 是否属于可遗传变异尚有待进一步的研究。



对照材料增殖培养情况

The effect of radiation on rhizome multiplication



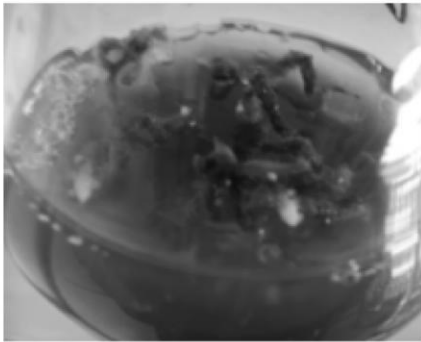
40 Gy处理材料

40 Gy treatment



10 Gy处理材料

10 Gy treatment



0. 6% EMS 处理材料

0.6%EMS treatment



经辐射诱变出的叶艺材料

Leaf induced by radiation

EMS 处理效果不仅与浓度有较大关系, 也受处理时间影响, 所以不同作物上应用浓度差异很大, 在蝴蝶兰类原球茎的试验中, 0.4‰EMS 处理 6~8 h, 就已接近或达到接种类圆球茎的半致死剂量(LD₅₀)^[7], 可能是类圆球茎生长活跃, 更易于吸收药剂, 所以耐药性也更差。长时间浸泡处理反而促进新根状茎的产生, 可能是因为药物的致死作用, 使不连续存活的细胞产生较多的新根

状茎。 包括春兰在内的国兰除在我国拥有数以百万计的爱好者外, 在日本、韩国和东南亚等国家也很受欢迎。由于野生春兰的过度采挖, 使得野生资源已越来越稀少, 已很难提供丰富多彩的自然变异品种^[8], 人工培育新品种的工作还处于起步阶段, 种子杂交还有很长的一段路要走, 因此人工诱变技术将是春兰育种的有效补

充。有效的⁶⁰Co 辐射诱变及 EMS 诱变技术建立将有助于推动春兰的新品种培育。

参考文献

- [1] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京: 金盾出版社, 1994.
- [2] 林芬, 邓国础. 春兰人工诱变的研究[J]. 湖南农业大学学报, 1997, 23(4): 336-340.
- [3] 安学丽, 蔡一林. 化学诱变及其在农作物育种上应用[J]. 核农学报, 2003, 17(3): 239-242.
- [4] 马新才, 戴建民. 虞美人多倍体化学诱变研究初报[J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(3): 172-174.
- [5] 李辛雷, 陈发棣. 菊花种质资源与遗传改良研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 40(21): 392-401.
- [6] VanHarten A M. Mutation breeding[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- [7] 陈超, 王桂兰. 蝴蝶兰类圆球茎的化学诱变试验[J]. 核农学报, 2006, 20(2): 99-102.
- [8] 李宏彬, 黄建昌. 菊花辐射育种研究初报[J]. 广东园林, 2002(1): 35-37.
- [9] 张建伟, 杨保安. 河南省植物诱变育种的研究概况[J]. 核农学报,

- 2002, 16(4): 252-256.
- [10] 孙纪霞, 林祖军. 唐菖蒲辐射诱变育种研究[J]. 莱阳农学院学报, 2001, 18(1): 37-40.
- [11] 郭安熙, 范家霖. 菊花花色辐射诱变研究[J]. 核农学报, 1997, 11(2): 65-73.
- [12] 高健, 卢惠萍. 花卉辐射诱变育种研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(3): 228-230.
- [13] 许伟, 李春涛. 园林彩叶地被植物品种与辐射诱变育种[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(3): 435-436.
- [14] 李惠芬, 陈尚平. 月季的辐射育种及其新品种霞晖[J]. 江苏农业科学, 1997(3): 50-51.
- [15] 陈秀兰, 包建忠. 观赏荷花辐射诱变育种初报[J]. 核农学报, 2004, 18(3): 201-203.
- [16] 石乐娟, 张放. 植物生长调节剂对线艺春兰根状茎的增殖与分化的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 887-890.
- [17] 陈华, 林兵. 国兰辐射诱变效应研究初报[J]. 福建农业科技, 2005(4): 24-25.
- [18] 罗毅波. 国兰产业化发展中的几个问题[J]. 中国西部科技, 2006, 15: 14-17.

The Method for Radiation and EMS Induced Mutationon *Cymbidium goeringii* Rhizomes in Vitro

CHU Yun-xia^{1,2,3}, ZHANG Yong-chun^{2,3,4,5}, JING Xiang-mi^{3,4}

(1. Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China; 2. Flower Reasearch Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai, 201106, China; 3. Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201106, China; 4. College of Forest Resources and Environment Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 5. Forestry and Fruit Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China)

Abstract: ⁶⁰Co γ -Ray radiated on rhizomes of *Cymbidium goeringii* at four dose, there were 10, 20, 30, 40 Gy. The rhizomes were proliferated on 1/2MS+NAA5 mg/L for a month. Then they were transferred to differentiation media, 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+BA 3 mg/L. After 45 days, the weight of rhizomes and buds' number were investigated. The results showed that low dose of ⁶⁰Co γ -Ray (< 10 Gy) can promote the multiplication and differentiation, but its affect was not salience, high dose (> 30 Gy) would restrain the multiplication and differentiation severity on the other hand. The optimum treatment dose for breeding was 20 Gy. On the other hand, rhizomes were dipped in 0.6%, 0.8% ethyl methanesulfonate (EMS) solution for 6 or 8 hours, then there were transferred to medium. The results were compared with it of phosphate buffer solution. It revealed that EMS could restrain its growth speed, and the mortality was raising with the increasing of EMS concentration.

Key words: *Cymbidium goeringii*; Rhizomes; ⁶⁰Co γ -Ray; Ethyl methanesulfonate

两种萝卜莫同吃

胡萝卜和白萝卜并不适合调配在一起食用。因为白萝卜的维生素C含量极高,对人体健康非常有益,但是和胡萝卜混合就会使维生素C丧失殆尽。其原因是胡萝卜中含有一种叫抗坏血酸的解酵素,会破坏白萝卜中的维生素C。不仅如此,胡萝卜与所有含维生素C含量高的蔬菜配合烹调时,如果加一些食用醋,抗坏血酸的作用就会急速减弱。另外,西红柿、茄子等含有阻止这种作用的物质。