

离子注入法诱变菊花及嵌合体分离的研究

宋 威, 祝朋芳

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:采用离子注入的方法对2个地被菊品种自交种子进行辐射处理,对后代的种子发芽率,株高,冠幅,花色和花径等进行观察统计。结果表明:经过处理后的菊花形状均发生变异,M1代平均株高明显矮化冠幅增大;花径与亲本相比发生广泛分离,性状变异率在8%左右。在 Fe^{+} 注入株中出现花色嵌合体的现象,该嵌合体的特征是一朵花上出现2种颜色的相嵌现象,并且通过组培技术对嵌合体进行分离得到与母株性状相同花色不同的新菊花品种。

关键词:菊花;离子注入;离体培养;嵌合体

中图分类号:S 682.1⁺1;S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0135-04

菊花(*Dendranthema morifolium* Ramat. Tzvel.)是我国传统名花,也是世界上四大切花之一^[1],随着花卉业的发展,人们对高品质的新奇菊花品种的需求与日俱增。目前人们对于菊花新品种的培育进行了大量研究工作,并取得了相当的成果^[2]。通过人工诱发突变改良菊花的技术,已被国内外育种工作者广泛应用,并取得了举世瞩目的成就^[3],由于菊花主要以观赏性为目标,又多以无性繁殖方法为主,因此辐射育种占相当重要的地位^[4]。菊花嵌合体花表现为在同一朵花上出现2种完全不同的颜色,菊花辐射突变嵌合体不能完全体现,所以组培技术的应用则是花卉诱变育种的一条新途径,如祝朋芳^[5]通过组培技术获得绿化菊优良变异体,填补了株型矮、花大、花色纯白、高度重瓣不漏心的绿化菊空白。赵若兰等^[6]利用组培法分离菊花嵌合体,将花色进行分离而分离后植株继续保持原来品种的优良性状。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验在沈阳农业大学菊花种质资源圃进行,以多年育种材料的中间材料为试材代号为“LZ-37”和“LZ-42”,以收获的上述自交种子为试材进行诱变处理。

1.2 试验方法

1.2.1 离子注入及实生苗培育 注入离子类型为(1) Cu^{+} ,能量为4 MeV,剂量为 1×10^{12} ions/ cm^2 。(2) Fe^{+} ,能量为4 MeV,剂量为 5×10^{12} ions/ cm^2 。(3) C^{+} ,能量为

4 MeV,剂量为 5×10^{12} ions/ cm^2 。每个类型处理的LZ-37的种子数均约为1 916、8 422、2 150粒(以称取千粒重方法估计,下同),空白对照约1 000粒。每个类型处理的LZ-42的种子数均约为735、2 718、674粒。处理种子和对照种子同时分别播种于温室播种箱中,及时调查发芽率(表1、表2),苗长到4片真叶后及时分苗到营养钵中。苗高约10 cm时移栽定植到露地,株行距30 cm \times 30 cm,常规管理。

1.2.2 诱变率调查与统计 采用大群体种植、抽样调查的方法,进行株高、冠幅等生长性状。以花变异(含花色、花茎、瓣型)作为突变指标,以实生苗单株为单位计算变异频率。

1.2.3 离体培养分离变异嵌合体 先用自来水冲洗选定的优良突变头状花序嵌合体,首先标记小花花色变异与花托对应部位,剪短舌状花,超净工作台上无菌条件下用70%的乙醇浸泡20 s后迅速放入0.1%升汞溶液中5~8 min,无菌水冲洗3次后取花托做外植体,切段接种于MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L上诱导愈伤组织,MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L上诱导不定芽,1/2 MS+NAA 0.01 mg/L上诱导不定根。离体培养(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,光照强度2 000~3 000 lx,光照时数16 h。根长约0.5 cm时开瓶于散射光下练苗4~5 d后移植于温室内常规管理,其后管理同实生苗(见1.2.1)。

1.2.4 扦插分离变异嵌合体 对于抽生出的不小于3~5 cm的变异侧枝,以细河沙为基质,采用常规扦插法进行分离。

2 结果与分析

2.1 高能离子诱导菊花变异

对不同离子类型和剂量的地被菊随机抽样调查70株,从表3可以看出不同离子类型和剂量处理在其株高、花色、花径、重瓣性方面有少数个体发生变异。其中

第一作者简介:宋威(1984-),男,在读硕士,现从事园林植物遗传育种研究。

通讯作者:祝朋芳(1971-),女,博士,副教授,现从事园林植物遗传育种研究。E-mail: pengfangzhu@yahoo.com.cn。

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A18)。

收稿日期:2009-09-29

表 1 不同离子注入剂量对夏乳黄发芽率的影响

离子注入类型	离子注入剂量 /ions·cm ⁻²	处理总粒数	出苗数	发芽率 /%
LZ-37CK		1 000	466	46.6
Cu ⁺	1×10 ¹²	1 916	145	7.39
Fe ⁺	5×10 ¹¹	8 422	735	8.73
C ⁺	5×10 ¹²	2 150	186	8.65

表 2 不同离子注入剂量对晚粉发芽率的影响

离子注入类型	离子注入剂量 /ions·cm ⁻²	处理总粒数	出苗数	发芽率 /%
LZ-42CK		1 000	435	43.5
Cu ⁺	1×10 ¹²	735	43	5.85
Fe ⁺	5×10 ¹¹	2 718	129	4.74
C ⁺	5×10 ¹²	674	40	5.93

表 3 不同辐射剂量对地被菊性状变异的辐射效应

离子类型	注入剂量	株高		冠幅		花色		花茎		重瓣性	
		变异数目	百分率/%	变异数目	百分率/%	变异数目	百分率/%	变异数目	百分率/%	变异数目	百分率/%
品种代号		LZ-37									
Fe ⁺	5×10 ¹¹	11	15.7	10	14.2	11	15.7	7	10	10	14.2
C ⁺	5×10 ¹²	6	8.6	4	5.7	8	11.4	7	10	5	7.1
Cu ⁺	1×10 ¹²	5	7.1	9	12.9	7	10	9	12.9	6	8.6
品种代号		LZ-42									
Fe ⁺	5×10 ¹¹	13	18.6	11	15.7	11	15.7	9	12.9	9	12.9
C ⁺	5×10 ¹²	8	11.4	6	8.6	10	14.2	6	8.6	8	11.4
Cu ⁺	1×10 ¹²	8	11.4	10	14.2	14	20	9	12.9	7	10

株高和冠幅变异率较大。利用这些变异,可以进一步获得不同花形和花期的新品种或品系。

不同品种地被菊性状变异的差异,对 LZ08-37 和 LZ08-42 各观察了 210 株。观察发现 LZ08-37 变异率低于 LZ08-42,而 LZ08-37 的种子成活率却高于 LZ08-42。说明离子注入剂量越大,种子成活率越低,相反变异的几率增大。在株高上 LZ08-37 和 LZ08-42 变异株低于对照株占总变异株的 78.3%和 82.5%,冠幅为 73.1%和 75.2%。由此可看出 M1 代植株明显矮化、冠幅缩小,辐射抑制效应在株高和冠幅上得到了明显体现。

2.2 辐射后菊花再生植株的性状变化

经过辐射处理后,菊花植株的性状发生显著变化:其株高和冠幅所受到的影响很大,在离子为 Fe⁺ 剂量为 5×10¹¹ ions/cm² 处理下 LZ08-42 枝条发生扭曲,有的甚至横向生长,使整体株高下降,株高和冠幅均表现出比亲本更适合作地被菊的优良性状。在离子为 C⁺ 剂量为 5×10¹² ions/cm² LZ08-37 叶片出现不同程度的变异,主要表现为缺刻变浅或消失,个别的植株叶片缺刻变深,甚至出现掌状分裂;叶片颜色深浅不一,叶片大小也有差异见(图 4、5)。尤其在离子为 C⁺ 剂量为 5×10¹² ions/cm² LZ-42 花瓣的瓣型由平瓣变为匙瓣(图 6)。

2.3 离体培养法分离突变嵌合体

田间调查中发现,LZ-37(图 1)Fe⁺ 注入株发现辐射株出现了花色嵌合体,出现的嵌合体花表现为在同一朵花上出现 2 种完全不同的颜色(图 2),其中花朵的一边

花瓣全部表现为黄色,和亲本 LZ-37 的颜色相同。

花托接种 2 周后产生愈伤组织,3 周后从愈伤组织处有少量芽产生。切割诱导愈伤组织块,转接到 MS+6-B 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上,不久,有的愈伤组织由黄变绿并伴有少量不定芽长出,有的出现大量不定芽。待不定芽长至约 3 cm 时,转接到生根培养基中,经 10~20 d 左右长出大约 5~15 条 3~5 cm 的白根。练苗 5 d 后栽入苗床。将成活的 15 株组培苗栽到试验地,与 LZ08-37 管理方法一致。经田间跟踪调查,其株型、花期、花型等与 LZ08-37 相同,嵌合现象消失,仅花色分离成 2 种,其中有 9 株为黄色,与原品种花色相同,另 6 株开花为白色,与原镶嵌的白色花瓣颜色相同(图 3),且株系间整齐一致,将其命名为该 LZ08-37b。

2.4 常规扦插法分离突变嵌合体

课题组在不同时间作了 2 组扦插和组培分离的比较试验,结果见表 4,扦插分离平均纯合体保存率为 42.8%,而组培分离平均变异保存率为 71.8%,由此证明组培分离明显优于扦插分离。菊花因其遗传基础比较复杂,不容易用种子繁殖来保持其品种特性,故常用扦插法。几年来观察到,辐照菊花母株的花变异均以嵌合状态出现,表现不一,或一株上出现变异枝,或一枝上出现变异花,或一花上出现变异花瓣,这都是细胞突变的表现形式。若优良突变仅在花瓣等处出现,常规扦插法则无法获取插条。因此想得到纯合体离体培养法则显得非常重要。

表 4 突变嵌合体分离方法比较

组号	分离方法	外植体数/株	插穗数	成活数	成活率/%	变异植株分离数/株	纯合体保存率/%
组一	扦插		133	31	23.3	50	37.6
	组培	9		7	77.8	6	66.7
组二	扦插		114	29	25.4	13	48.1
	组培	13		11	84.6	10	76.9



图1 LZ-37



图2 LZ-37 出现白色舌状花变异



图3 LZ-37b

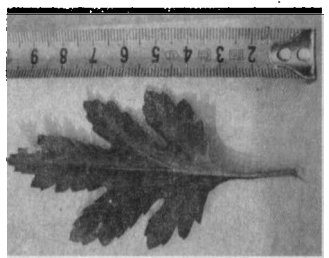


图4 未辐射植株叶片

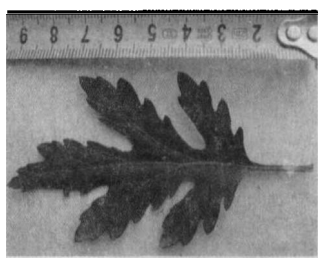


图5 辐射后植株叶片

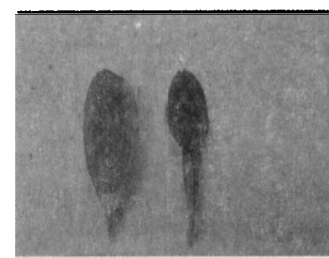


图6 LZ-42 瓣形发生变化

3 讨论

离子注入所诱发的生物学效应非常显著,这在各种植物处理当中就可观察到,其外部形态随注入剂量、注入离子种类的不同而不同^[8]。菊花是高度杂合体,在长期的选育过程中,其染色体数目及结构复杂多样,存在着大量的单体、缺体等,这也是菊花容易产生物理诱变的主要因素之一。由此可以初步判断 LZ-37 是由辐射造成的细胞突变,而产生的嵌合体状态^[10]。

在无性繁殖植物的诱变育种中,都十分重视嵌合体的形成和分离。几年观察到,辐照菊花母株的花变异均以嵌合状态出现,表现不一,或一株上出现变异枝,或一枝上出现变异花,或一花上出现变异花瓣,这都是细胞突变的表现形式^[11]。关于嵌合体形成的机理,目前的研究结果不尽相同,一般认为嵌合体形成的原因是由于植物的顶端分生组织细胞分裂过程中体细胞发生突变形成的^[7]。由于辐射诱发突变具有单细胞突变的特点,所以突变细胞在分裂增殖时在细胞群中会发生彼此之间的竞争,通常突变细胞被大量淘汰,这一过程称之为“二倍体选择”^[12]。辐射诱发突变具有随机性、嵌合性和单细胞突变的特点^[13],突变不能完全显现。就无性繁殖植物而言,大部分嵌合突变伴随着“二倍体选择”或个体衰老等生物学过程而减少或消失^[12],组培可克服“二倍体选择”提高细胞突变的显现机率^[14]。

根据试验所得嵌合体突变的分离,组培优于扦插。杨保安等^[15]在已育成的 14 个菊花品种中,经组培分离 1 次成功的占 13 个(另 1 个为花托愈伤组织诱导的自发变异),连同稳定性观察、扩繁和鉴定在内,育成时间为

2~3 a。其中 5 个品种是在组培与扦插 2 种分离方法的比较中育成的,尽管二者都达到了育种目标,但扦插分离的育成时间为 4~5 a。

该试验主要报道了对菊花嵌合体用组培方法如何分离,而对它们在辐照后的选育方法未作详细说明,将另作报道。在辐射育种中要选育到好的诱变品种,关键要选择有特色优点的好亲本,经辐照后使优点基本保持,缺点得到明显改善,或某一方面缺点的改善;其次要同时选择几个合适的辐照突变剂量进行辐照和育种,因为种子对射线的敏感性是受许多因素影响而变化的,不能简单地参照别人某一个剂量数据进行辐射育种试验,而且辐照剂量的试验误差有时比较大,在剂量的选定上要作认真考虑。

参考文献

- [1] 章玉平,黄运凤,张芳.食用色素对菊花的染色效应[J].亚热带植物科学,2004,33(2):25-27.
- [2] 卢钰,刘军,丰震,等.菊花育种研究现状及今后的研究方向[J].山东农业大学学报(自然科学版),2004,35(1):145-149.
- [3] 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.
- [4] 李雅志.花卉辐射育种的成就与前景[J].原子能农业应用,1986(3):57-60.
- [5] 祝朋芳.利用组培技术获得绿化菊优良变异体[J].辽宁农业科学,1998(4):44-45.
- [6] 赵若兰,张道旭.利用组培法分离菊花嵌合体研究初探[J].辽宁农业科学,1992(4):56.
- [7] Jene I. Medford. Studies on mechanism and research progress of plant chimera[J]. The Plant Cell,1992(4):1029-1039.
- [8] 宋云.离子束用于诱变育种的研究进展[J].分子植物育种,2004(2):301-305.

大花蕙兰组织培养技术

蔺红苹, 李 培

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘 要:以 1/2MS 为基础培养基, 以添加 2.5%、5%、10%、15% 的椰乳为生长调节剂, 研究大花蕙兰组织培养的最适培养基。结果表明: 1/2MS 为基础培养基添加 10% 的椰乳增殖效果最好; 对受到污染的原球茎进行消毒, 发现 5% 的次氯酸钠 25 min 消毒效果最好; 对不同大小的原球茎进行增殖, 发现较小的原球茎产生的新原球茎覆盖率较高, 2~3 mm 的原球茎较为适合快繁; 在增殖培养基的基础上加入泥土或木屑进行生根培养, 效果较好; 对根长达到 3 cm 以上的试管苗进行练苗及移栽, 效果良好。

关键词:大花蕙兰; 组织培养; 生长调节剂

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0138-03

大花蕙兰(*Cymbidium*)是指原产于印度、缅甸、泰国、越南和我国南部等地区的兰属中的一些附生性较强的大花种和主要以这些原种为亲本获得的人工杂交种。由于它们与蕙兰(*C. faberi*)较相似而花朵硕大, 故称为

“大花蕙兰”^[1]。大花蕙兰花大, 花型规整丰满, 色泽鲜艳, 花茎直立, 花期长, 栽培容易, 生长健壮, 具有很高的观赏价值, 在亚热带及温带广泛栽培, 是深受各国人民喜爱的一种洋兰^[2], 为近几年在我国花卉市场上流行的高档室内盆栽花卉。由于大花蕙兰多为杂交种, 种子繁殖无法保持其品质特性, 其结实率也相当低, 分株能力弱, 因而繁殖系数低, 繁殖速度慢, 远远不能满足商品化生产的需求^[3]。

第一作者简介:蔺红苹(1979-), 女, 硕士, 实验师, 现从事实验室教学工作。

收稿日期:2009-10-09

- [9] 惠友权, 黄建新, 孔锁贤. 离子注入选育 $\alpha 2$ 乙酰乳酸脱羧酶菌株[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2001, 31(3): 251-254.
- [10] 陈树国, 李瑞华, 杨秋生. 观赏园艺学[M]. 北京: 北京中国农业科技出版社.
- [11] 洪亚辉, 朱兆海, 黄璜. 菊花组织培养与辐射诱变的研究[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(6): 457-461.
- [12] 许耀奎. 作物诱变育种[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 101-

- 109.
- [13] 李雅志. 花卉辐射育种的成就与前景[J]. 原子能农业应用, 1986(3): 57-60.
- [14] 栗茂腾, 余龙江, 王丽梅. 菊花花色遗传及花色嵌合体发现[J]. 遗传, 2005, 27(6): 948-952.
- [15] 杨保安, 范家霖, 张建伟, 等. 辐射与组培复合育“霞光”等 14 种菊花新品种[J]. 河南科学, 1996(1): 57-60.

Study on Ion Implantation Method Mutation on Chrysanthemum and Separation of Chimera

SONG Wei, ZHU Peng-fang

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: This test method of using ion implantation is two varieties of chrysanthemum into seeds from radiation treatment, the descendants of seed germination rate, plant height, crown, and carries on the observation and statistics, etc. Results showed that processed chrysanthemum shape variation are found, M1 average height increases obviously reduced crown; compared with the parent flower diameter widely separated, characters mutation rate at around 8%. Fe^{+} injection strains in the phenomenon in color, The characteristics of flower is chimeras appear on the two kinds of color are embedded phenomenon, through the tissue culture technology to separate the chimeric with different color of the same maternal characters of new varieties of chrysanthemum.

Key words: chrysanthemum; ion implantation; invitro culture; chimeras