

陈淑英,王玉英,李叶芳,等. 洋桔梗 Ceremony Orcmge 品种辐射诱变育种[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):134-137.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.035

洋桔梗 Ceremony Orcmge 品种辐射诱变育种

陈淑英¹,王玉英¹,李叶芳¹,何文俊¹,宗积意¹,宋 莲¹,张宇欢¹,李枝林^{1,2}
(1. 云南农业大学花卉研究所,云南昆明 650201; 2. 生物多样性与云南特色农业协同创新中心,云南昆明 650201)

摘要:以洋桔梗 Ceremony Orcmge 品种组培苗为材料,进行不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线照射,统计各处理植株死亡率、成活率及成活植株增殖率,并观察当代表型变异率和进行回归模型分析。结果表明:洋桔梗组培苗的半致死剂量为 103.63 Gy,出现了植株矮化、叶片变厚、扭曲、呈圆筒状,黄化、畸形等较明显的表型变化;在 0~150 Gy 剂量范围内,植株死亡率随照射射线剂量增加而增加,而增殖率与变异率呈负相关。

关键词:洋桔梗;辐射诱变;成活率;增殖率;变异率;半致死剂量;表型变化;回归模型分析

中图分类号:S682.1⁺90.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)10-0134-04

洋桔梗(*Enstoma grandiflorum*)别称草原龙胆、大花桔梗、丽钵花,是龙胆科龙胆属 1 年生观赏植物^[1],原生长于美国南部至墨西哥之间的石灰岩地带,是遍布北美草原的野花,后引种到欧洲和日本,经园艺工作者们多年的培育、杂交改良,近 10 年间洋桔梗的育种与生产有了迅速的发展,尤以日本为盛,现已成为花形、花色多样,株型妖媚多姿的鲜切花品种^[2]。洋桔梗种子细小,价格昂贵,且种子萌发缓慢、幼苗生长缓慢,从播种到定植(3 对叶)有 2~3 个月时间,其间受环境的影响很大,育苗技术要求很高,种苗供应受限制,我国洋桔梗育种工作仍处于停滞阶段^[3]。

辐射可以提高植物的突变率,在较短的时间内获得更多的优良变异植株,为进一步良种选育提供材料,缩短育种时间^[4]。相关报道表明,至今世界上已经有 50 多个国家在 150 多种植物上应用核诱变育种,已成功育成了 1 737 个品种,其中农作物比例最高,达 74%,约 1 275 个品种^[5]。我国已对 40 多种花卉进行核辐射育种改良,且已成功获得 60 多个突变种,主要集中在菊花^[6]、兰花^[7]、百合^[8]、月季^[9]、观赏性海棠^[10]、水仙^[11]和蝴蝶兰^[12]等。有关洋桔梗物理诱变育种的研究,目前国内尚未见任何报道。因此,本试验以洋桔梗组培苗为材料,进行不同剂量的 ⁶⁰Co γ 射线照射,探索适宜的处理剂量,为洋桔梗辐射育种提供技术依据和试验方法基础,以期创造出新、奇、特的洋桔梗变异类型,丰富洋桔梗种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

云南农业大学花卉研究所提供的洋桔梗品种 Ceremony Orcmge 组培苗,平均株高 4 cm。

1.2 方法

收稿日期:2016-12-12
基金项目:云南省国际合作项目(编号:20131A16)
作者简介:陈淑英(1991—),女,江西吉安人,硕士研究生,主要从事园林植物资源利用与创新研究。E-mail:891537007@qq.com。
通信作者:李枝林,教授,主要从事观赏植物资源利用及创新研究。E-mail:lzl-yn@sohu.com。

2015 年 10 月对处理材料在云南华源辐射有限公司进行 ⁶⁰Co γ 射线处理,剂量为 0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 Gy,剂量率为 1 Gy/min,急性照射后培育 4 个月,统计死亡数,进行形态观察和记录,直到损伤苗稳定为止。其中,变异指叶片变厚、扭曲、呈圆筒状、叶色变深或黄化等形态异常现象;变异率指变异苗数与处理苗数的比值。

1.3 数据分析

应用 Excel 2003 整理数据,SPSS 20.0 计算半致死剂量, LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线对洋桔梗组培苗死亡率的影响
在 4 个月内连续对辐射处理后的洋桔梗进行观察,其生长和死亡统计情况见表 1。

表 1 不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线对洋桔梗组培苗死亡率的影响

处理剂量 (Gy)	接苗数 (株)	死亡数 (株)	死亡率 (%)	成活率 (%)
0	100	0	0	100a
5	100	2	1	99a
10	100	5	3	97ab
20	100	9	5	95b
30	100	13	13	87c
40	100	18	18	82cd
50	100	22	22	78de
60	100	26	26	74e
70	100	33	33	67f
80	100	40	40	60g
90	100	46	46	54g
100	100	53	53	47h
110	100	61	61	39i
120	100	68	68	32i
130	100	73	73	27j
140	100	78	78	22jk
150	100	84	84	16k

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。下同。

由表 1 可知,不同剂量射线对洋桔梗组培苗成活率[成活率=(1-死亡株数/总株数)×100%]影响显著。处理剂量为 90、100 Gy 时,成活率分别显著低于对照组 46.53 百分点($P<0.05$)。随着辐射剂量的增加,影响程度变大,两者呈正相关关系。辐射剂量越小,死亡的植株越少,成活率越高;辐射剂量越大,死亡植株越多,成活率越低。高剂量不仅增加了洋桔梗的死亡率,而且加快了植株的死亡速度,死亡首先从植株的茎尖部开始,然后叶片死亡,最后整株死亡,幼嫩的植株最先死亡。上述结果表明,辐射对幼嫩的器官组织损伤最大,成熟组织损伤较小。

2.2 洋桔梗组培苗的半致死剂量

为了达到较多变异,又不致过于损伤植株,实际应用中经常用半致死剂量(semi-lethal dose)作为衡量指标。计算半致死剂量,常用概率单位回归法分析死亡率与辐射剂量之间的关系。通过卢纹岱 SPSS 软件得到辐射效果模型为: $Probit(P) = -2.00 + 0.019[\lg(dose)]$ 。得出洋桔梗的半致死剂量计算式 $\lg(semi-lethal\ dose) = 2.00/0.01$,得到半致死剂量为 103.63。皮尔逊拟合优度的卡方检验显示,它们的显著水平为 0.978(大于 0.15,SPSS 默认),由此判断方程式满足数据的拟合优度。

表 2 表明,辐射效果模型所期望观察到的每个剂量的死亡数与实际观察到的死亡数完全在误差允许范围内,由此可

表 2 观测与期望数频

剂量 (Gy)	主体数 (株)	观测的响应 (株)	期望的响应 (株)	残差 (株)	概率
0	100	0	2.295	-2.295	0.023
5	100	1	2.872	-1.872	0.029
10	100	3	3.564	-0.564	0.036
20	100	5	5.359	-0.359	0.054
30	100	8	7.804	0.196	0.078
40	100	13	11.015	1.985	0.110
50	100	17	15.078	1.922	0.151
60	100	21	20.032	0.968	0.200
70	100	28	25.854	2.146	0.259
80	100	35	32.448	2.552	0.324
90	100	41	39.644	1.356	0.396
100	100	48	47.212	0.788	0.472
110	100	56	54.883	1.117	0.549
120	100	63	62.375	0.625	0.624
130	100	68	69.427	-1.427	0.694
140	100	73	75.823	-2.823	0.758
150	100	79	81.414	-2.414	0.814

以判断辐射效果模型是可靠的。

由辐射效果的模型在 95% 置信区间内求得的各死亡率的辐射剂量见表 3,由此可知各辐射剂量都在上限与下限之间。

表 3 因子变量 95% 的置信区间

概率	各死亡率的辐射剂量(Gy)			概率	各死亡率的辐射剂量(Gy)		
	估计	下限	上限		估计	下限	上限
0.010	-17.133	-28.298	-7.718	0.550	110.153	106.061	114.632
0.020	-2.982	-12.828	5.351	0.600	116.782	112.413	121.647
0.030	5.996	-3.028	13.658	0.650	123.633	118.924	128.953
0.040	12.750	4.334	19.918	0.700	130.852	125.738	136.700
0.050	18.244	10.313	25.018	0.750	138.644	133.049	145.102
0.060	22.920	15.396	29.366	0.800	147.320	141.153	154.496
0.070	27.020	19.847	33.185	0.850	157.433	150.561	165.484
0.080	30.691	23.826	36.609	0.900	170.157	162.358	179.349
0.090	34.030	27.439	39.729	0.910	173.230	165.202	182.703
0.100	37.103	30.761	42.606	0.920	176.569	168.290	186.348
0.150	49.828	44.448	54.582	0.930	180.240	171.683	190.359
0.200	59.941	55.223	64.202	0.940	184.340	175.471	194.840
0.250	68.617	64.363	72.559	0.950	189.016	179.788	199.954
0.300	76.408	72.462	80.173	0.960	194.510	184.857	205.965
0.350	83.628	79.857	87.339	0.970	201.264	191.084	213.359
0.400	90.479	86.767	94.246	0.980	210.243	199.356	223.194
0.450	97.107	93.353	101.028	0.990	224.394	212.383	238.707
0.500	103.630	99.745	107.792				

从图 1 可知,不同剂量的散点图呈线性关系,说明用 Log Base10 的选项进行转换是合适的。

2.3 ⁶⁰Co γ 射线辐射处理对洋桔梗组培苗表型的影响

由图 2 可知,经过辐射后,对洋桔梗植株的形态等会产生一定程度的影响,辐射剂量越大,对植株的影响程度越大,辐射剂量越小,对植株的影响程度越小。没有经过辐射的洋桔梗苗叶色是绿色的,植株形态正常,经过辐射的植株出现了黄化,叶片变小、变厚、变黑、有斑,有的叶片像水浸状,植株出现畸形等现象。随着辐射剂量的增加,黄化、叶片变黑情况加重,叶色黄绿或黄白。从表型变化上看,⁶⁰Co γ 射线对洋桔梗

组培苗的诱变效果明显。

由表 4 可知,不同剂量射线对洋桔梗组培苗株高的影响差异显著。处理剂量为 90、100 Gy 时株高分别显著低出对照组 47%、50% ($P<0.05$)。随着处理剂量的升高,洋桔梗组培苗株高逐渐降低,可见 ⁶⁰Co γ 射线对矮化植株有明显效果。

2.4 不同剂量的 ⁶⁰Co γ 射线对洋桔梗组培苗变异率的影响

由表 5 可知,不同剂量射线对洋桔梗组培苗变异率的影响差异显著。处理剂量为 90、100 Gy 时,变异率分别显著高出对照组 51%、45% ($P<0.05$)。随着处理剂量的升高,洋桔梗组培苗的变异率先升高后降低。植株变异率的峰值出现在

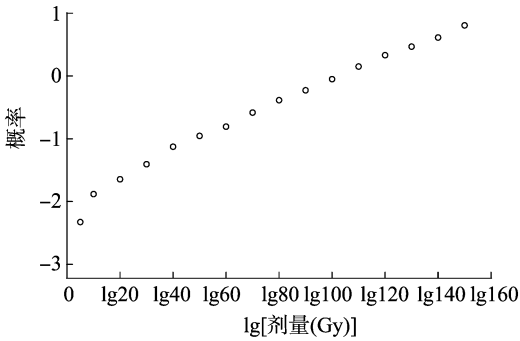


图1 概率和不同剂量的散点图示

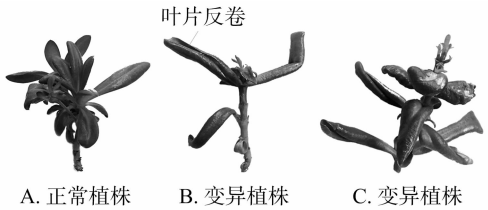


图2 材料处理后形态变化

表 4 不同剂量射线对洋桔梗组培苗株高的影响

处理剂量 (Gy)	接苗数 (株)	平均株高 (cm)
0	100	6.0a
5	100	5.8ab
10	100	5.6abc
20	100	5.5abcd
30	100	5.3abcd
40	100	5.0abcd
50	100	4.8abcd
60	100	4.5abcd
70	100	4.0abcd
80	100	3.3abcd
90	100	3.2abcd
100	100	3.0bcd
110	100	2.9bcd
120	100	2.8cd
130	100	2.7cd
140	100	2.6d
150	100	2.5d

90~100 Gy,50 Gy 后升高的趋势比较明显,100 Gy 后随剂量的升高变异率降低。由于死亡率随剂量的升高而增加,故变异率并非随着剂量升高而增加。但相对变异率(处理后存活苗中变异苗数与存活苗数的比值)随着剂量的升高而升高。原因是辐射剂量越高,损伤越重,分化出来的芽体越容易发生变异。但过高剂量处理后存活的材料常因细胞严重损伤造成劣性突变或致死突变而掩盖其他突变,不利于辐射育种。

2.5 不同剂量的⁶⁰Co γ 射线对洋桔梗组培苗增殖率的影响

由表 6 可知,不同剂量射线对洋桔梗组培苗增殖率的影响差异显著。处理剂量为 90、100 Gy 时,增殖率分别显著低于对照组 49%、59%(*P*<0.05)。随着处理剂量的升高,洋桔梗组培苗的增殖率逐渐降低。这应该是因为辐射后表面的细胞造成较严重的损伤,从而使其恢复生长的能力受到严重的破坏,分化能力也随之下降。

表 5 不同剂量射线对洋桔梗组培苗变异率的影响

处理剂量 (Gy)	接苗数 (株)	变异数 (株)	变异率 (%)
0	100	0	0
5	100	0	0
10	100	2	2i
20	100	4	4i
30	100	7	7h
40	100	9	9h
50	100	16	16g
60	100	22	22f
70	100	31	31e
80	100	42	42c
90	100	51	51a
100	100	45	45b
110	100	36	36d
120	100	30	30e
130	100	24	24f
140	100	18	18g
150	100	16	16g

表 6 不同剂量射线对洋桔梗组培苗增殖率的影响

处理剂量 (Gy)	接苗数 (株)	增殖数 (株)	增殖率 (%)
0	100	368	368a
5	100	355	355b
10	100	330	330c
20	100	316	316d
30	100	301	301e
40	100	280	280f
50	100	264	264g
60	100	241	241h
70	100	227	227i
80	100	202	202j
90	100	186	186k
100	100	150	150l
110	100	132	132m
120	100	113	113n
130	100	98	98o
140	100	82	82p
150	100	70	70q

3 讨论与结论

不同材料对射线的敏感性不同,对射线的敏感性大小依次为愈伤组织>试管苗>田间苗>根芽>插条>种子。组培苗含水量较高,在射线处理下会产生很多氧自由基,破坏核酸和蛋白质等生物大分子,是辐射诱变育种的理想材料。此外,辐射育种与组织培养结合可以提高变异保存率,克服扦插分离不彻底的缺点,加快变异的纯合,从而缩短育种周期。王晶等研究⁶⁰Co γ 射线对菊花的诱变效应选用的是组培苗^[13];潘宏用兰花组培苗进行兰花辐射诱变育种^[14];张兴等进行丰花月季⁶⁰Co γ 辐射育种选用材料也是月季组培苗^[15]。因此,本试验选用洋桔梗组培苗为处理材料。

辐射产生诱变有 2 个方面主要原因:一是辐射后引起遗

传物质的突变,如染色体的畸变、DNA 分子的变异;二是 RNA、蛋白质的生物合成受到抑制,生长素及酶等生理活性物质的代谢受到破坏,表现出细胞死亡、细胞突变,从而对生物产生抑制作用。刘丽强等在探讨 ^{60}Co γ 辐射对观赏海棠组培苗的辐射诱变效应时发现,生根和继代组培苗的生根率、平均根长、苗高、增殖等随着 ^{60}Co γ 射线剂量的增加而明显下降^[10]。高年春等用 ^{60}Co γ 辐射非洲菊组培苗,结果发现,经辐射处理后非洲菊的株高、生根率、黄化率与辐射剂量呈负相关^[16]。本试验发现,在 0 ~ 150 Gy 射线范围内,洋桔梗组培苗死亡率随照射射线剂量增加而增加,而增殖率与变异率呈负相关,这与前人的研究结果一致。

由于辐射诱变是随机事件,因此对一定的靶标照射剂量越大,引起诱变的概率越大,并且电离辐射对植物的损伤和抑制作用也越大。因此有一些学者建议,其诱变成功率由植物成活率与突变率的乘积决定,对应最大概率积的剂量才是最适剂量。本次试验中辐照剂量为 90 Gy 时,洋桔梗的死亡率为 46%,变异率为 51%,达到最高,因此 90 Gy 作为洋桔梗的辐射剂量更适宜。彭绿春等用 ^{60}Co γ 射线对 4 种兰花作辐照处理,结果发现,冬凤兰、竹叶兰、碧玉兰、西藏虎头兰组培苗的半致死剂量分别为 20.72、26.31、29.88、41.04 Gy^[17]。杨静坤等用 ^{60}Co γ 射线作诱变剂发现,碧玉兰组培苗半致死剂量为 28.88 Gy^[18]。而本试验发现,洋桔梗组培苗半致死剂量为 103.63 Gy。彭绿春等选用的材料是兰花原球茎^[17-18],而本试验的辐照材料是具有根、茎、叶的组培苗,这可能与植物种类、不同组织器官对辐射敏感不同有关。

参考文献:

- [1] 李群,刘光勇,王丽. 激素对洋桔梗植株再生的影响及生根培养的研究[J]. 广西植物,2004,24(1):40-42.
- [2] 李尚旺. 浅谈洋桔梗的离体培养[J]. 福建热作科技,2012,37(1):37-40.
- [3] 凌青,孙启文,白丽. 洋桔梗 701 品种组培快繁技术研究[J]. 现代农业,2011(9):5-9.
- [4] 王少平. 辐射育种在园林植物育种中的应用[J]. 种子,2008,27(12):63-68.
- [5] 赵利坤,强继业. ^{60}Co - γ 射线辐射对花卉的影响研究[J]. 安徽农业科学,2013(30):11950-11951,11993.
- [6] 王晶,刘录祥,赵世荣,等. ^{60}Co γ 射线对菊花组培苗的诱变效应[J]. 农业生物技术学报,2006,14(2):241-244.
- [7] 陈秀兰,孙叶,包建忠,等. 君子兰辐射诱变育种研究初报[J]. 江苏农业科学,2006(6):226-228.
- [8] 孙丽娜. ^{60}Co γ 射线辐照百合诱变育种研究[D]. 南京:南京林业大学,2009.
- [9] 李惠芬,陈尚平,李倩中,等. 月季的辐照育种及其新品种霞晖[J]. 江苏农业科学,1997(3):50-51.
- [10] 刘丽强,刘军丽,张杰,等. ^{60}Co - γ 辐射对观赏海棠组培苗的诱变效应[J]. 中国农业科学,2010,43(20):4255-4264.
- [11] 高健. ^{60}Co γ 射线辐照中国水仙的诱变效应和机理研究[D]. 北京:北京林业科学研究院,2000.
- [12] 章宁,苏明华,刘福平,等. 蝴蝶兰 ^{60}Co γ 射线诱变育种研究(简报)[J]. 亚热带植物科学,2005,34(2):63,62.
- [13] 王晶,刘录祥,赵世荣,等. ^{60}Co γ 射线对菊花组培苗的诱变效应[J]. 农业生物技术学报,2006,14(2):241-244.
- [14] 潘宏. 兰花辐射诱变与组织培养技术初步研究[D]. 福州:福建农林大学,2008.
- [15] 张兴,唐焕伟,车代第. 丰花月季 ^{60}Co γ 辐射育种研究及后代变异的初分析[J]. 国土与自然资源研究,2010(3):73-74.
- [16] 高年春,蒋贤权,房伟民,等. ^{60}Co - γ 辐射对非洲菊组培苗苗期生长的影响[J]. 广东农业科学,2007(12):40-42.
- [17] 彭绿春,黄丽萍,余朝秀,等. 四种兰花辐射诱变育种研究初报[J]. 云南农业大学学报,2007,22(3):333-336.
- [18] 杨静坤,黄丽萍,唐敏,等. 碧玉兰试管植株辐射诱变初探[J]. 现代园艺,2008(10):6-9.
- [9] 欧清华. 叶面喷施不同浓度硫酸钾对烤烟生长和品质影响[J]. 天津农业科学,2014,20(7):69-73.
- [10] 周道金,郑开强,黄光伟. 烤烟生长后期喷施叶面肥对上部叶质量的影响[J]. 福建农业科技,2006(1):48-50.
- [11] 郑州大学. 一种液体型烤烟专用叶面肥:CN201510420405.5[P]. 2015-07-17.
- [12] 李国富. 烟草油分的物质基础研究[D]. 郑州:郑州大学,2015.
- [13] 杨玉玲,卢晓延,周先国,等. 喷施含腐殖酸与微量元素的叶面肥对烤烟产质量的效应[J]. 西南农业学报,2013,26(5):1966-1970.
- [14] 郑宪滨,刘国顺,邢国强,等. 腐殖酸对烤烟化学成分和经济性状的影响[J]. 河南农业科学,2007(12):43-45.
- [15] 蔡宪杰,王信民,尹启生. 烤烟外观质量指标量化分析初探[J]. 烟草科技,2004(6):37-39,42.
- [16] 王能如. 烟叶调制与分级[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,2002:221-227.
- [17] 孟丽霞. 腐殖酸钾对烤烟主要生理指标及钾含量的影响[D]. 昆明:云南农业大学,2009.
- [18] 黎根,毕庆文,汪健,等. 烤烟主要化学成分与烟叶品质关系研究进展[J]. 河北农业科学,2007,11(6):6-9,41.
- [19] 胡战军,马林,程昌新,等. 烤烟外观质量与感官评吸指标间的关系分析[J]. 云南农业大学学报,2011,26(6):809-814.

(上接第 88 页)

- [3] 凌爱芬,陈学壮,邢小军,等. 腐殖酸对烤烟关键生理指标影响的研究[J]. 腐殖酸,2012,22(1):42-42.
- [4] Maibodi N D H, Kafi M, Nikbakht A. Effect of foliar applications of humic acid on growth, visual quality, nutrients content and root parameters of perennial ryegrass (*Lolium Perenne* L.) [J]. Journal of Plant Nutrition, 2015, 38(2):224-236.
- [5] Schnitzer M, Poapst P A. Effect of a soil humic compound on root initiation[J]. Nature, 1967, 213(5076):598-599.
- [6] Stabrowska J, Dziewulska J. The effect on tomato growth of aerating nitrate and ammonium salt nutrient solutions in the presence of humate, EDTA, copper and manganese [J]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 1970, 39:123-140.
- [7] He Y T, Wang C Q, Li B, et al. Effect of humic acid application on the yield and quality of Flue-Cured tobacco [J]. Journal of Agricultural Science, 2014, 6(11):8-13.
- [8] 钟晓兰,张德远,李江涛,等. 不同烤烟专用肥对烟叶产量和品质的影响[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(3):342-346.