

^{60}Co - γ 射线对菊花组培苗的诱变效应

王 晶, 刘录祥*, 赵世荣, 郭会君, 赵林妹, 陈文华

(中国农业科学院作物科学研究所, 农业部农业核技术与航天育种重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 对菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)品种秋之山的组培苗, 采用 5~30 Gy 的 ^{60}Co - γ 射线照射处理。研究了 γ 射线对组培苗生长、增殖和生根的影响以及对组培再生植株移栽后生长开花的影响。结果表明 20 Gy 是 γ 射线处理菊花组培苗的致死剂量; 从生根和继代培养生长和增殖的结果看, 诱变处理的最佳剂量在 10 Gy 左右; 组培再生植株移栽后发现, 10 Gy 处理的植株中花色变异率为 8.2%。与对照花鲜艳的纯黄色相比, 变异花增加了不同深浅的红色素, 且突变植株均为同质稳定突变。

关键词: ^{60}Co - γ 射线; 辐射诱变; 菊花; 组织培养

中图分类号: S183, S184 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-1304(2006) 02-0241-04

Effect of ^{60}Co - γ Rays on *In vitro* Mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* Ramat

WANG Jing, LIU Lu-xiang*, ZHAO Shi-rong, GUO Hui-jun, ZHAO Lin-shu, CHEN Wen-hua

(Key Laboratory of Agricultural Nuclear Technology & Space Breeding, Ministry of Agriculture; Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The microshoots of *in vitro*-cultured *Chrysanthemum morifolium* cv. Qiuzhishan were irradiated with 5~30 Gy ^{60}Co - γ rays. After irradiation the microcuttings were transferred to root-inducing medium and subculture medium respectively to study the inductive effects of γ rays on rooting, shoot growth and multiplication on media. The plant growth and flower characters were investigated after the regenerated plantlets were transplanted out of the protected aseptic environment. The results showed that 20 Gy was the lethal dose of ^{60}Co - γ rays to irradiate the microshoots of *in vitro*-cultured *Chrysanthemum morifolium* cv. Qiuzhishan, while 10 Gy was the optimum dose to induce mutations. After bloom, 8.2% of the plants in the treatment of 10 Gy were selected for their flower color mutations. In contrast with the bright yellow flowers of the control, different shades of red color were observed in those mutant flowers. All the mutant plants were homogeneous and stable mutants.

Key words: ^{60}Co -gamma rays; radiation induction; *Chrysanthemum morifolium*; *in vitro* culture

菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)是我国十大传统名花之一。菊花原产我国, 栽培历史悠久, 品种资源丰富,(戴思兰, 2004; 李辛雷和陈发棣, 2004)。花色鲜艳、花型丰满、易于栽培、具有较强的抗逆性应是品种选育的主要目标(戴思兰, 2004)。

辐射诱变是花卉种质创新和品种改良的重要手段之一。我国的花卉辐射育种起始于上世纪 80 年代初, 经过 20 多年的发展, 已取得很大进展(齐孟文和王化国, 1997; 李倩中和李惠芬, 2002)。栽培菊花是高度杂合的异源多倍体或非整倍体, 非常适合辐射诱变(李辛雷和陈发棣, 2004; 刘金勇, 2004)。根据

FAO/IAEA 突变品种数据库的不完全统计, 我国已对 6 种花卉育成 67 个突变新品种, 其中菊花就有 21 个(Liu *et al*, 2004)。本研究选用组织培养技术较为成熟的菊花, 用其组培苗作为诱变材料进行 γ 射线照射, 旨在明确 γ 射线照射菊花组培苗的适宜剂量及 γ 射线对菊花组培苗的诱变效应, 为离体组培技术与辐射诱变技术相结合的复合育种技术在无性繁殖植物诱变改良中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

作者简介: 王 晶, 女, 1968 年生, 副研究员。

* 通讯作者。Author for correspondence. Email: <luxiang@263.net.cn> Tel: 010-62122719

收稿日期: 2005-04-05 接受日期: 2005-05-23

黄色切花菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)品种秋之山(秋菊类、多头小花型)的组培苗共28瓶,每瓶4~5丛生、增殖良好的无根苗。

1.2 实验方法

1.2.1 辐射处理 利用中国农业科学院原子能利用研究所⁶⁰Co源产生的 γ 射线对秋之山菊花的组培苗进行不同剂量的照射处理,处理剂量为5、10、20和30 Gy,剂量率为0.98 Gy/min,5 Gy处理4瓶,其余每处理6瓶。未经照射的6瓶作对照。

1.2.2 组织培养 将 γ 射线照射后的组培苗于当天进行处理:①直接进行生根培养。选用生根培养基1/2MS+NAA 0.1 mg/L,调查生根进程和生根率,研究 γ 射线对照射后直接转生根培养基的组培苗生根的影响。②继代培养。选用继代培养基MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L,继代培养1个月后,调查苗高和增殖率,研究 γ 射线对继代1次的组培苗增殖生长的影响。然后将一部分组培苗转入继代培养基MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L进行2次继代;其余的则转入生根培养基1/2MS+NAA 0.1 mg/L,观察 γ 射线对继代培养1次的组培苗生根及再生植株移栽后生长开花的影响。

1.2.3 炼苗与盆栽 将继代培养1次后在生根培养基上生根的组培苗置于温室中炼苗,2周后集中移栽到盛有珍珠岩的苗盘中,1个月后分株盆栽,盆栽基质为3份草炭土+1份珍珠岩,并加适量烘干鸡粪。生长期精细管理、适时摘心,观察记载 γ 射线对植株生长,特别是对开花的影响。

2 结果和分析

2.1 γ 射线对转生根培养基组培苗生根的影响

秋之山菊花组培苗经 γ 射线照射后直接转入生根培养基,对不同处理的生根和生长情况进行了观察和测定。结果表明:对照绝大多数苗在接种后1周已生根(生根率92.93%),生根数4条/株,根细长而白,根长0.5~3.0 cm。至接种后3周,对照生根率

达到98.99%,苗高10 cm。与对照相比, γ 射线10 Gy处理的组培苗生根明显变缓,且生根率显著下降。接种后1周 γ 射线10 Gy处理的生根率仅为7.07%,生根数1条/株,根较对照粗,根长0.5~1.0 cm。随培养时间加长,10 Gy处理的生根苗数增加,生根率在接种后3周上升至61.62%,苗高长至5 cm。而 γ 射线20和30 Gy两处理直至接种后3周始终无一生根,接入的茎段渐渐发黄,后死亡。从不同处理的生根进程和生根率结果可看出, γ 射线对照射后直接转生根培养基的组培苗生根具有明显的推迟和抑制作用。处理剂量以10 Gy较适宜,超过20 Gy则导致组培苗死亡(表1)。

2.2 γ 射线对继代培养1次的组培苗的影响

不同剂量 γ 射线处理的秋之山菊花组培苗,经过1次继代培养后的生长和增殖情况见表2和图版I图1。当 γ 射线剂量为5 Gy时,苗高明显降低,但对组培苗增殖影响不大,增殖率虽有下降,但不显著。随着 γ 射线剂量的加大,组培苗的生长和增殖受到显著抑制,苗高和增殖率均显著下降。剂量大于10 Gy的各处理的平均苗高与对照相比,极显著地降低,而剂量大于20 Gy时平均增殖率亦极显著地低于对照。经过 γ 射线处理的组培苗经过1次继代培养后,生根进程比较一致,接种后1周和2周的生根率差别不大(表3)。但随照射剂量增加, γ 射线对生根的抑制作用明显加强。从接种后2周的生根率看,5 Gy处理与对照无明显差异,分别为96%和98%;10 Gy处理的组培苗生根率明显降低,2周后为对照的47%;20和30 Gy处理的生根率则降为0。每株生根数、根长和苗高也受 γ 射线的影响,接种后1周,对照平均每株生根4.3条,根长1.0 cm左右,苗高4.0~5.0 cm,生长整齐; γ 射线5 Gy处理平均每株生根3.6条,根长0.2~1.5 cm,苗高2.5~5.0 cm,生长不整齐,已生根、生根好的苗生长较好,未生根者则无生长; γ 射线10 Gy处理生根数平均为1.7条,根长0.2~1.5 cm,苗高2.0~5.0 cm,生长不整

表1 γ 射线对转生根培养基的组培苗生根的影响

Table 1 Effect of γ rays on rooting of microcuttings of *in vitro*-cultured *Chrysanthemum morifolium*

处理 /Gy	接种茎段数 / 根 Number of inserted microcuttings	接种1周		接种2周		接种3周	
		One week after inserting		Two weeks after inserting		Three weeks after inserting	
		生根小苗数 / 株 No. of rooted plantlets	生根率 / % Rooting rate	生根小苗数 / 株 No. of rooted plantlets	生根率 / % Rooting rate	生根小苗数 / 株 No. of rooted plantlets	生根率 / % Rooting rate
CK	99	92	92.93	97	97.98	98	98.99
γ -10	99	7	7.07	39	39.39	61	61.62
γ -20	69	0	0	0	0	0	0
γ -30	99	0	0	0	0	0	0

齐。当 γ 射线剂量加大到 20 和 30 Gy 时,与照射后直接转生根培养基的效果一样,经过 1 次继代培养的组培苗既无生根,亦无生长,叶片渐黄,后死亡。说明 γ 射线处理组培苗的致死剂量为 20 Gy, 10 Gy 可作为 γ 射线处理组培苗的半致死剂量。

2.3 γ 射线对继代培养 2 次的组培苗的影响

对继代培养 2 次的秋之山菊花组培苗的生长进

行了观察,结果表明: γ 射线 5 Gy 处理的苗高为对照的 2/3, γ 射线 10 Gy 处理苗高为对照的 1/2, γ 射线 20 和 30 Gy 处理茎段不再增殖,亦无生长,叶片逐渐变黄、死亡。从成活和生长量上再次证明 20 Gy 是 γ 射线照射组培苗的致死剂量,10 Gy 则是 γ 射线诱变处理的适宜剂量。

2.4 γ 射线对组培再生植株生长、开花的影响

表 2 γ 射线对继代培养 1 次的组培苗生长和增殖的影响

Table 2 Effect of γ rays on microshoot growth and multiplication of 1st subculture of *Chrysanthemum morifolium*

处理 /Gy Treatment	平均苗高 /cm Microshoot height	平均增殖率 /% ¹⁾ Mean propagation ratio	最大增殖率 /% Maximum propagation ratio
CK	6.1 a A	12.3 a A	33
γ -5	5.2 b A	11.7 a A	26
γ -10	3.2 c B	9.4 a A	18
γ -20	2.8 cdB	3.7 b B	12
γ -30	2.2 d B	3.0 b B	8

1)增殖率为每次继代培养每个培养物增殖的新苗数。The propagation ratio (PR) is the number of new microshoots that can be produced per microculture per subculture (Hartmann et al., 1997). A and B, $P < 0.01$; c~d, $P < 0.05$.

表 3 γ 射线对继代培养 1 次的组培苗生根的影响

Table 3 Effect of γ rays on rooting of microcuttings of 1st subculture of *Chrysanthemum morifolium*

处理 /Gy Treatment	接种茎段数 / 根 Number of inserted microcuttings	接种 1 周 One week after inserting		接种 2 周 Two weeks after inserting	
		生根小苗数 / 株 No. of rooted plantlets	生根率 / % Rooting rate	生根小苗数 / 株 No. of rooted plantlets	生根率 / % Rooting rate
		CK	100	91	91.00
γ -5	100	89	89.00	96	96.00
γ -10	100	41	41.00	46	46.00
γ -20	80	0	0	0	0
γ -30	70	0	0	0	0

植株性状调查表明,继代培养 1 次的组培再生植株受 γ 射线影响,株型和叶片性状发生不同程度的变异,主要表现在矮化、节间紧缩、株型紧凑,叶片变异主要表现在叶片变小、叶形变长或变窄。

γ 射线对花性状的影响主要表现在花色上,对花型、花径等影响不大。对照花为鲜艳的纯黄色,变异花的花色中加入了不同深浅的红色素,按红色深浅可分为三个等级,且这种颜色变化均表现为同质突变,在花蕾上更明显(图版 I:图 2)。花色变异均出现在 10 Gy 处理中,总变异频率为 8.2%。

将花色变异植株于第二年进行分株繁殖,花期观察,花色表现与组培再生植株一致,仍为黄色带有不同深浅红色,初步证明 γ 射线辐射处理秋之山菊花组培苗产生的花色变异是稳定的。

3 讨论

近年来,在菊花的辐射诱变研究中,将诱变技术与离体组培技术相结合越来越受到重视。国内外育种工作者通过对菊花叶片 (Jerzy and Zalewska, 1996; Nagatomi et al, 2000)、芽(郭安熙等, 1997; Nagatomi et al, 2000)、生根插条(Mandal et al, 2000)、花器官(Nagatomi et al, 2000)等外植体照射后进行组织培养,或对无菌苗(Ahloowalia, 1992)、不同外植体诱导形成的愈伤组织(范家霖等, 1996; 洪亚辉等, 2003)等组织培养物进行辐射诱变,或对辐射诱变产生的扇形嵌合体变异采用离体组织培养的方法进行分离纯化(郭安熙等, 1997),研究了离体诱变效应,并培育出一批菊花新品种。这些研究表明,组织培养结合辐射诱变进行菊花育种,可以提高突变显现机

率、丰富变异谱、直接获得同质突变体或使嵌合体变异快速分离纯合,从而缩短育种周期。本实验选用茎段培养的丛生苗为照射材料,是为了避免组织培养本身发生的体细胞无性系变异,便于明确 γ 射线对组培苗以及组培再生植株的直接诱变效应。在应用离体诱变复合技术的育种实践中,由于花卉主要以观赏性为目标,又多以无性繁殖方法为主,所以产生的变异越多越好,诱变材料用易于发生体细胞无性系变异的愈伤组织有可能更好。

菊花不同品种、不同器官间的辐射敏感性差异显著(林音等,1988;郭熙熙等,1997)。郭熙熙等(1997)在研究菊花花色辐射诱变时认为, ^{60}Co - γ 射线辐照愈伤组织的适宜剂量为8~16 Gy,辐照植株、根芽和枝条为20~30 Gy。Jerzy *et al.* (1996)分别用15 Gy的X射线和 γ 射线照射菊花品种Richmond的叶片外植体,获得了12个菊花新品种。本研究通过对 γ 射线照射后的组培苗直接进行生根培养和对继代培养1次的组培苗生根情况的观测,以及对继代培养2次的组培苗生长增殖情况的调查,在组培的不同阶段对 γ 射线照射剂量得出相同的结论,即在本实验条件下, γ 射线处理秋之山菊花组培苗的致死剂量为20 Gy,10 Gy可作为辐射诱变处理的适宜剂量。在实际应用时,将照射后的组培苗直接转生根培养基,可以早确定辐射处理的致死剂量,减小以后的工作量。

关于花色诱变规律,有研究认为粉红(或粉紫)色品种最易变异,且变异谱宽,复色品种次之,纯色(如绿花、白花、黄花)品种一般不易变异(齐孟文和王化国,1997;郭熙熙等,1997)。本实验选用的秋之山菊花为纯黄色品种,其组培苗经 γ 射线辐射处理后,从再生植株中选出了黄色加入不同程度红色素的花色变异,且所发生的花色变异均为同质稳定突变。

参 考 文 献

- Ahloowalia B S. *In-vitro* radiation induced mutations in chrysanthemum(J). *Mutation Breeding Newsletter*, 1992, 39: 6
- Dai S L (戴思兰). Chinese florist's chrysanthemum and the world flower horticulture(J). *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology* (河北科技师范学院学报), 2004, 18(2):1~5, 9 (in Chinese with English abstract)
- Fan J L (范家霖), Yang B A (杨保安), Zhang J W (张建伟) and Wang B N (王柏楠). Study on application of tissue culture for radiation breeding in chrysanthemum(J). *Henan Science* (河南科学), 1996, 14(4): 455~459 (in Chinese with

English abstract)

- Guo A X (郭熙熙), Fan J L (范家霖), Yang B A (杨保安), Wang B N (王柏楠), Zhang J W (张建伟), Chen S G (陈树国), Wang S R (王世荣) and Wang R (王然). Study on the technique of inducing mutation breeding in chrysanthemum (J). *Acta Agriculturae Nuclaeatae Sinica* (核农学报), 1997, 11 (2): 65~73 (in Chinese with English abstract)
- Hartmann H T, Kester D E, Davies F T and Geneve R L. *Plant Propagation: Principles and Practice* (6th edition)(M). New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1997. 559
- Hong Y H (洪亚辉), Zhu Z H (朱兆海), Huang H (黄璜), Zhao Y (赵燕) and Xu F (徐锋). Study on tissue culture and irradiation variation of chrysanthemum(J). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)* (湖南农业大学学报(自然科学版)), 2003, 29(6): 457~461 (in Chinese with English abstract)
- Jerzy M and Zalewska M. Polish cultivars of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev and *Gerbera jamesonii* Bolus bred *in vitro* by induced mutations(J). *Mutation Breeding Newsletter*, 1996, 42: 19
- Li Q Z (李倩中) and Li H F (李惠芬). The progress and way of flowers breeding in China(J). *Journal of Anhui Agricultural Sciences* (安徽农业科学), 2002, 30(5): 797~798 (in Chinese with English abstract)
- Li X L (李辛雷) and Chen F D (陈发棣). Advances of genetic improvement and germplasm resources for chrysanthemum (J). *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 2004, 21(4): 392~401 (in Chinese with English abstract)
- Lin Y (林音), Zhu Y L (朱跃兰) and Liu H Y (刘宏跃). Study on sensitivity of different organs of chrysanthemum to radiation(J). *Journal of Nuclear-Agricultural Sciences* (核农学报), 1988, 9(5): 213~214 (in Chinese)
- Liu J Y (刘金勇). Advances of genetic improvement of chrysanthemum varieties(J). *Hunan Forest Science and Technology* (湖南林业科技), 2004, 31(1): 49~52 (in Chinese)
- Liu L, Van Zanten L, Shu Q Y and Maluszynski M. Officially released mutant varieties in China(J). *Mutation Breeding Review*, 2004, 14: 1~62
- Lu Y (卢钰), Liu J (刘军), Feng Z (丰震)*, Zhang M R (张美蓉), Han J (韩进) and Yang C Q (杨传强). Recent advances and research focus on chrysanthemum breeding(J). *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)* (山东农业大学学报(自然科学版)), 2004, 35(1):145~149 (in Chinese with English abstract)
- Mandal A K A, Chakrabarty D and Datta S K. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum(J). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 60: 33~38
- Nagatomi S, Miyahira E, Degi K and Cadic A. Induction of flower mutation comparing with chronic and acute gamma irradiation using tissue culture techniques in *Chrysanthemum morifolium* Ramat(J). *Acta Horticulturae*, 2000, 508: 69~73
- Qi M W (齐孟文) and Wang H G (王化国). Progress and analysis of radiation breeding of ornamental plants in China(J). *Journal of Nuclear-Agricultural Sciences* (核农学报), 1997, 18(6): 288~290 (in Chinese)

图版说明见附页

王 晶等:⁶⁰Co-γ 射线对菊花组培苗的诱变效应

WANG Jing *et al*: Effect of ⁶⁰Co-γ Rays on *In vitro* Mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* Ramat.

图版 I

Plate I



图 1. γ 射线照射后的组培苗继代培养 1 次的生长和增殖

Fig. 1. Growth and multiplication of microshoots of 1st subculture of *Chrysanthemum morifolium* after irradiation with γ rays



图 2. γ 射线诱发‘秋之山’菊花的花色变异

Fig. 2. Flower color mutations of *Chrysanthemum morifolium* cv. Qiuzhishan induced by γ rays

1、2. 对照花蕾和花, 鲜艳的纯黄色; 3、4. 浅红色变异的花蕾和花; 5、6. 深红色变异的花蕾和花。

1 and 2. Flower bud and flower of the control with bright yellow color; 3 and 4. Flower bud and flower of the mutation with a little red color; 5 and 6. Flower bud and flower of the mutation with deep red color