

X射线及电子束照射对非洲紫罗兰叶片外植体 不定芽再生的影响

周利斌^{1,3} 李文建¹ 马爽¹ 董喜存¹ 李强¹ 高清祥²

¹(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

²(兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

³(中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 采用 X 射线(电子束能量 8 MeV)及 9 MeV 电子束对两个品系(Mauve and Indikon)的非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*)组培苗叶片外植体进行辐照处理,研究其组织增殖、芽分化及叶片形态学变化。结果表明,40 Gy 的 X 射线照射能使 Mauve 及 Indikon 的外植体新鲜组织增殖倍数为 27.3 和 26.3,相同剂量的电子束照射抑制组织增殖能力不如 X 射线照射,增殖倍数为 49.7 和 27.4。低于 20 Gy 的 X 射线和电子束照射诱发非洲紫罗兰叶片外植体增殖变化的规律不同于剂量高于 20 Gy 的照射,呈先降低后升高趋势。100 Gy 的电子束辐照处理使 Mauve 及 Indikon 的芽形成率降为 3.7%和 11.3%,而 100 Gy 的 X 射线辐照处理其芽形成率分别为 7.5%和 64.1%。就 Mauve 而言,60 Gy 的电子束辐照处理后畸形小苗百分比高达 22.2%,相同剂量的 X 射线辐照处理后为 14.8%;而对于 Indikon,40 Gy 的电子束辐照可使畸形小苗百分比升至 35.2%,该剂量条件下 X 射线的百分比仅为 5.8%。因此,本研究发现非洲紫罗兰叶片的电子束辐照的诱变效果要优于 X 射线辐照,电子束辐照非洲紫罗兰 Mauve 及 Indikon 叶片组织的推荐最佳诱变剂量为 40—60 Gy。

关键词 非洲紫罗兰,不定芽,组织培养,X射线,电子束

中图分类号 Q691.5, Q691.8, Q506

辐射诱变与离体培养技术相结合,可以在有限的时空内进行大群体筛选,从而提高辐照诱变育种的效率。近年来这种方法在园艺植物育种中显现出越来越多的优势,不少科研工作者开展了这方面的工作。Ibrahim 等^[1]通过 X 射线照射结合体外繁殖技术进行了玫瑰诱变育种工作,Arunyanart 等^[2]也使用 X 射线及 γ 射线辐照结合组织培养技术对荷花进行育种探索。国内也有不少科研工作者进行该研究,例如,宋恒等进行了 γ 射线辐照杜鹃试管苗诱发突变体的研究^[3]。除采用常见的低传能线密度(Linear energy transfer, LET)射线如 X 射线及 γ 射线等辐照处理植物组织进行育种外,Yamaguchi 等^[4,5]尝试了高 LET 射线辐射结合植物组织培养技术进行花卉育种工作,获得了不少花色、花型发生变化且遗传稳定的菊花及康乃馨等观赏花卉新品种,并申请了专利。

与国内外常采用 γ 射线和 X 射线等作为诱变源对观赏植物进行诱变育种相比,采用电子束诱变育种的研究还不多,但电子束在其他领域应用颇为广

泛。在工业领域,电子束常用于材料表面改性、医用器械消毒、橡胶交联等;在医学领域,电子束常用来进行浅层肿瘤放射治疗等;在园艺领域,也有人进行育种探索,文献[6]曾报道了电子束辐照菊花组培苗育种研究,该研究获得了多种与原始品种差异相当大的花色突变植株。在辐射联合植物组织培养技术中,组织培养往往选取较薄的叶片等作为实验材料,厚度约为几百微米,电子束应该在这个量级的深度具有良好的诱变特性。

因此,本工作对比了 X 射线辐照与电子束辐照对非洲紫罗兰组织培养的影响,说明电子束结合植物组织培养在花卉体外诱变育种中可能具有更多的优势。

1 材料与方法

1.1 无性系的建立

2 个品系非洲紫罗兰(Mauve 和 Indikon)在温室中生长 1 个月后,取其幼嫩叶片,70%乙醇浸泡 20s,0.1% HgCl_2 消毒 8min,无菌水冲洗 3 遍以上,

中国科学院西部之光联合学者基金(XL050616)资助

第一作者:周利斌,男,1979年8月出生,2001年毕业于兰州大学生命科学学院,现为中国科学院近代物理研究所博士生,辐射生物学专业

收稿日期:初稿 2005-08-16,修回 2005-11-18

接种到组织诱导培养基 (Inducing Media, IM) 上, 诱导 30d 后, 将组织转移到芽分化培养基 (Developing Media, DM) 上, 30d 后得到大量平均叶面积在 1 cm^2 以上的芽丛, 将芽丛接种到生根培养基 (Rooting Media, RM) 上使其根及叶进一步发育。培养基由 MS (Murashige and Skoog) 培养基添加不同种类及浓度的植物激素配制, IM: MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+3% sucrose+0.7% Agar, DM: MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+3% sucrose + 0.7% Agar, RM: 1/2MS+ NAA 0.02 mg/L+ 2% sucrose+0.7% Agar。组织培养温度为 (24 ± 2) , 光照强度为 1500lux, 光周期为 16h/d。

1.2 辐照处理

将无菌叶片切成 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 大小, 在芽诱导培养基上预培养 48h 后, 将外植体移至不含激素的 MS 培养基上接受 X 射线及电子束辐照。辐照在兰州军区总医院放射治疗科的医用电子直线加速器 (Varian Clinac 2100C) 进行, 使用 X 射线 (加速其运行在 8 MeV) 及 9 MeV 电子束。该直线加速器使用 Capintec 的 192X 剂量仪及圆柱形电离室进行剂量及剂量率测量, 测量精度为 $< \pm 2\%$ 。辐照剂量均为 0、5、10、20、40、60、80、100 Gy, 剂量率均为 4Gy/min, 每剂量 3 个重复, 每个重复照射 10 个外植体。

1.3 辐照后处理及数据统计

辐照完毕后立即将外植体移到新鲜 IM 培养基上进行组织诱导; 30d 后, 称重并记录组织增殖倍数, 更换为 DM 培养基进行继代培养; 30d 后, 进行芽形成率统计, 同时每皿随机抽取 5 块外植体进行每块外植体芽形成数统计, 30d 后, 将存活的外植体取其芽丛进行生根诱导, 30d 后进行畸形叶片形成率统计。计算公式如下:

$$\text{增殖倍数} = \frac{30\text{天后外植体重量}}{\text{外植体初始重量}}$$

$$\text{芽形成率} = \frac{60\text{d后有芽外植体数}}{\text{总外植体数}} \times 100\%$$

$$\text{畸形叶片形成率} = \frac{\text{具有畸形再生芽的外植体数}}{\text{有再生芽的外植体数}} \times 100\%$$

使用 SPSS 13.0 软件提供的最小显著性差异

(Least significant difference, LSD) 检测进行方差分析 (Analysis of variance, ANOVA), 使用 Origin 7.0 软件绘图。

2 结果

2.1 X 射线辐射对非洲紫罗兰叶片外植体增殖的影响

外植体品系的不同导致 2 种非洲紫罗兰品种叶片增殖倍数的不同, 从图 1 可以看到, Mauve 品系对照的增殖倍数为 62, 而 Indikon 的增殖倍数仅为 41。在 0 到 20Gy 区间内, 两种品系都出现增殖倍数先下降后上升的趋势, 就 Mauve 而言, 5Gy 时增殖倍数为 39, 而 10Gy 时为 50, 20Gy 又回落到 35; Indikon 情况大致相同, 5Gy 时增殖倍数为 39, 而 10Gy 时为 41, 20Gy 又回落到 34。这说明 X 射线辐射在 0 到 20Gy 的剂量范围所导致的组织增殖效应不同于大于 20Gy 的剂量效应。

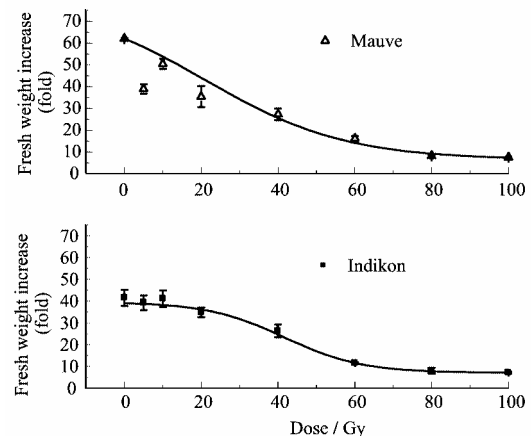


Fig.1 Effect of X-rays irradiation on weight of leaf explants of two *Saintpaulia ionantha* cultivars 4 weeks after culture

2.2 电子束辐射对非洲紫罗兰叶片外植体增殖的影响

图 2 为电子束辐照对非洲紫罗兰叶片外植体增殖影响的结果, 与图 1 对比可以看到, 电子束辐照实验中 Mauve 及 Indikon 对照的增殖倍数略微不同于 X 射线辐照实验的增殖倍数, 这可能是由于叶片外植体初始质量不同导致的, 但仍可以看出 Mauve 的增殖倍数要高于 Indikon 的。同样, 由图 2 可以看到 Mauve 在 0 到 20Gy 的剂量范围内辐照效应也是先降后升, 这种规律同 Mauve 的 X 射线辐照效应一样。但 Indikon 情况则不同, 5Gy 时增殖倍数为 40, 10Gy 时为 37。同 X 射线辐照实验一样, 图 2 说明 X 射线辐照 0—20Gy 的剂量范围所导致的组织增殖效应不同于大于 20Gy 的剂量效应。

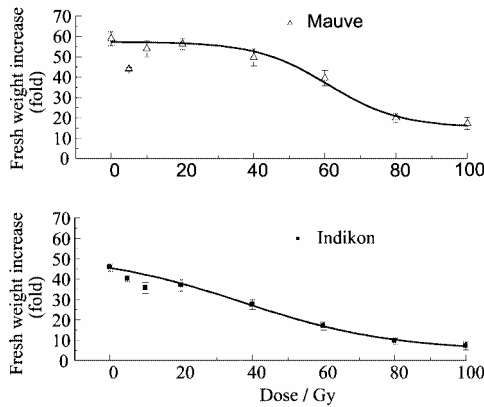


Fig.2 Effect of electron beam irradiation on weight of leaf explants of two *Saintpaulia ionantha* cultivars 4 weeks after culture

2.3 X 射线辐射对非洲紫罗兰叶片外植体芽分化的影响

从表 1 中可以看出，两种品系的非洲紫罗兰在低于 20 Gy 的 X 射线辐照处理后，其芽形成率与对照没有明显差异，但是每块外植体上的芽数与对照相比均出现了芽数降低的趋势。20 Gy 照射处理后，Mauve 的每块外植体出芽数由对照的 99.6 降为 68.1，Indikon 的每块外植体出芽数由对照的 74.0 降为 57.9。这里要强调的是，5 Gy 和 10 Gy 处理的 Indikon 样品其每块外植体再生芽数均高于对照，这可能是低于 20 Gy 的辐照生物学效应特殊导致的。100 Gy 的 X 射线基本上完全抑制了 Mauve 外植体形成芽，而 Indikon 可能具有较高的辐射抗性，100 Gy 时有 64.1% 的芽形成率，但其每块外植体芽数降为 5.7。

Table 1 Percentage of bud formation (%B.F.) and mean number of buds per regenerating explant (M.B.) irradiated to different doses with X-rays, eight weeks after culture

Irradiation dose / Gy	Mauve		Indikon	
	%B.F.	M.B.	%B.F.	M.B.
0	100.0 a	99.6 a	100.0 a	74.0 b
5	100.0 a	84.6 b	100.0 a	86.7 a
10	100.0 a	74.0 c	100.0 a	74.8 b
20	100.0 a	68.1 c	100.0 a	57.9 c
40	96.3 a	36.9 d	98.0 a	40.8 d
60	38.9 b	7.2 e	82.6 b	11.7 e
80	11.1 c	1.7 e	75.5 b	9.7 e
100	7.5 c	1.9 e	64.1 c	5.7 e

Data denoted with the same letter in a column do not differ significantly from each other (LSD test, $p < 0.05$)

2.4 电子束辐照对非洲紫罗兰叶片外植体芽分化的影响

从表 2 中可以看出，电子束辐照对非洲紫罗兰叶片外植体芽分化的影响明显不同于 X 射线辐照处理，Indikon 更为敏感。100 Gy 辐照处理使 Mauve 及 Indikon 的芽形成率降为 3.7% 和 11.3%。每块外植体芽数变化亦如此，100 Gy 电子束辐照处理其值为 0.3 和 3.2。

Table 2 Percentage of buds formation (%B.F.) and mean number of buds per regenerating explant (M.B.) irradiated to different doses with 9MeV electron beams, eight weeks after culture

Irradiation dose / Gy	Mauve		Indikon	
	%B.F.	M.B.	%B.F.	M.B.
0	100.0 a	104.3 a	100.0 a	78.5 a
5	100.0 a	95.9 ab	100.0 a	75.7 ab
10	100.0 a	79.7 bc	100.0 a	71.3 b
20	100.0 a	77.1 c	100.0 a	36.8 c
40	94.1 a	53.4 d	92.6 ab	18.1 d
60	77.8 b	25.7 e	81.8 b	12.0 e
80	20.2 c	6.8 f	42.2 c	5.5 f
100	3.7 d	0.3 f	11.3 d	3.2 f

Data denoted with the same letters do not differ significantly from each other (LSdD, $p < 0.05$)

2.5 X 射线与电子束辐照对非洲紫罗兰叶片发育的影响

从图 3 中可以看到，电子束辐照诱发的含有畸形叶的小苗百分比要明显高于 X 射线辐照诱发的。对于 Mauve，60 Gy 的电子束辐照处理后畸形小苗百分比高达 22.2%，相同剂量的 X 射线辐照处理为 14.8%；同样，40 Gy 的电子束辐照处理 Indikon 可使该百分比升至 35.2%，该剂量条件下 X 射线的百分比仅为 5.8%，X 射线辐照诱发突变率在 80 Gy 时最高，但仍低于电子束诱变率最高值，为 14.0%。

从图 4 中可以看到，40 及 60 Gy 的电子束诱发的非洲紫罗兰叶片突变包含多种类型，有的叶片形态畸形，有的叶片颜色加深，有的叶片出现白斑，这种白斑可以出现在叶片周缘，也可出现在叶脉处。

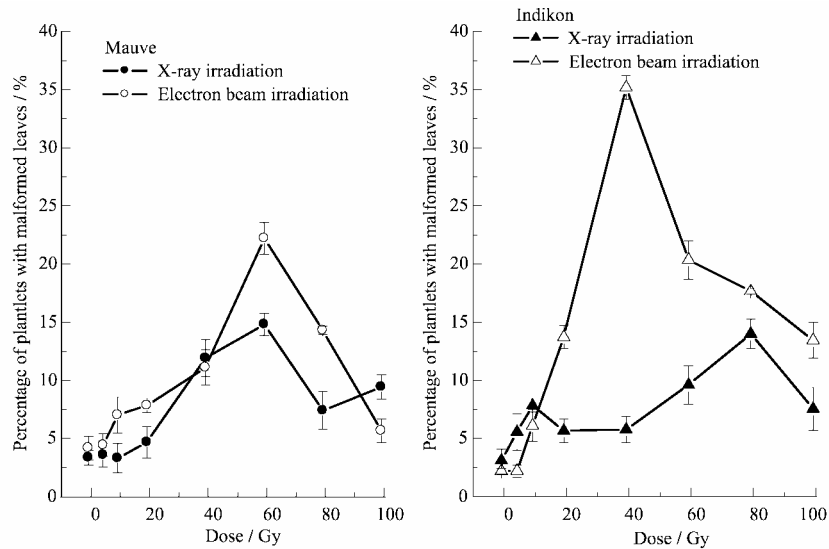


Fig.3 Percentage of plantlets with malformed leaves of *Saintpaulia ionantha* irradiated with X-rays and electron beams

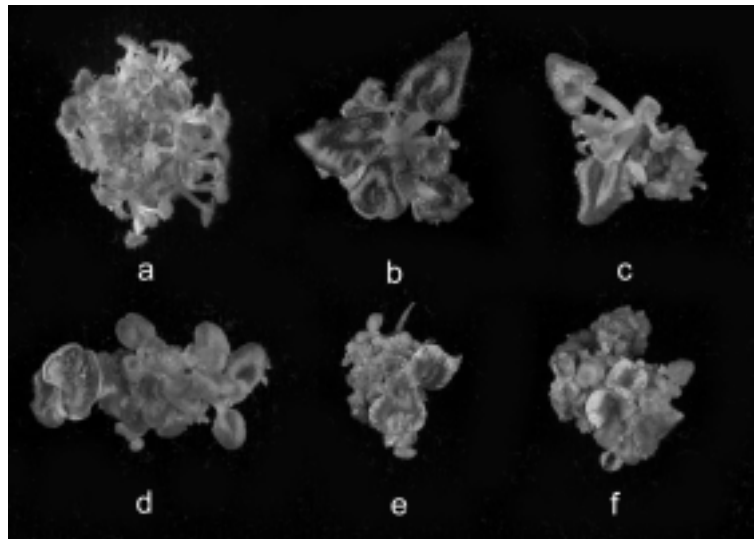


Fig.4 Types of plantlets with malformed leaves of *Saintpaulia ionantha* irradiated with electron beams at 40 and 60 Gy. a: control, b—d: 40 Gy, e—f: 60 Gy

3 讨论

本研究发现在 0—20 Gy 区间内,两种品系的非洲紫罗兰都出现增殖倍数先下降后上升的趋势。因此我们认为,剂量低于 20 Gy 的 X 射线和电子束辐照诱发非洲紫罗兰叶片外植体增殖变化的规律不同于剂量高于 20 Gy 的辐射。众所周知,哺乳动物细胞在 1 Gy 以下的辐照处理存在细胞超敏感性^[7],使其辐射生物学效应不同于高于 1 Gy 的辐照处理效应。植物细胞也存在超敏感性,早期的细胞超敏感性曾对玉米花粉细胞进行研究过^[8],但是植物组织是否也存在超敏感性及多少剂量的辐射处理才出现该效应,还无从得知,尚须进一步研究。

大于 20 Gy 的 X 射线或电子束辐照处理对非洲紫罗兰组织增殖的规律遵循 Sigmoidal-Boltzmann 函数变化,使用该函数拟合得到了非常不错的结果。该函数公式如下:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

X 射线辐照 Mauve 和 Indikon 增殖曲线的 R^2 值分别为 0.99569 和 0.99966,电子束辐照 Mauve 和 Indikon 的增殖曲线的 R^2 值分别为 0.99319 和 0.99910。S 曲线拟合结果优于指数函数的拟合结果,

这一点不同于 Witjaksono^[9]的研究,同样是辐射对于组织增殖的影响,该研究用指数函数对试验数据进行了拟合。

高剂量的 X 射线及电子辐射使愈伤组织出愈率明显降低,而且抑制芽再生的数量。本研究发现辐射处理植物体外无性系电子束具有更强的辐射生物学效应,100 Gy 辐照处理使 Mauve 及 Indikon 的芽形成率降为 3.7% 和 11.3%,而 100 Gy 的 X 射线辐照处理其芽形成率分别为 7.5% 和 64.1%。每块外植体芽数变化亦如此,100 Gy 电子束辐照处理其值为 0.3 和 3.2,而 100 Gy 的 X 射线辐照处理其值为 1.9 和 5.7。

X 射线及电子束辐射非洲紫罗兰产生了许多叶型、叶色的突变体,叶色突变体主要是叶绿素缺失,但本研究发现电子束辐照能产生不少叶色加深的突变体(见图 4a),这在以往的研究中很少报道。对于 Mauve,60 Gy 的电子束辐照处理后畸形小苗百分比高达 22.2%,相同剂量的 X 射线辐照处理后为 14.8%;而 40 Gy 的电子束辐照 Indikon 可使该百分比升至 35.2%,该剂量条件下 X 射线的百分比仅为 5.8%。最终得到的非洲紫罗兰辐照处理组培苗生根率与移栽成活率与对照没有明显差异,辐照对再生非洲紫罗兰生殖器官发育的影响正在进一步观测中。芽形成率与畸形苗率的乘积反映了总外植体产生畸形苗百分比。本研究发现,就非洲紫罗兰 Mauve 品系而言,电子束辐射处理后,总外植体畸形苗百分比最高值出现在 60 Gy,为 17.3%,而 X 射线处理,最高值出现在 40 Gy,但仅为 11.5%;对于 Indikon 品系,电子束辐射处理后,最高值出现在 60 Gy,为 32.6%,而 X 射线处理,最高值出现在 80 Gy,但仅为 10.6%。在无性繁殖植物诱变育种实践中,常采用 LD₆₀₋₇₅(使植株存活 60%—70%的剂量)作为适宜诱变剂量指标^[10],我们认为就非洲紫罗兰 Mauve 及 Indikon 叶片组织的电子束诱变而言,40—60 Gy 的是推荐的最佳诱变剂量。

辐射诱变结合体外无性繁殖技术产生的突变体多以嵌合体形式存在,因此分离筛选是获得纯质突变体的关键。本研究不同于其它辐射联合体外无性

系繁殖技术诱变工作,选取叶片外植体为材料进行辐照处理可能比选用腋芽更具有优势,因为文献[11]已报道,以叶片为外植体进行无性繁殖时,最终得到的小芽可能来源少数几个细胞,这大大增加了得到纯合突变体的几率。综上所述,本文认为非洲紫罗兰叶片外植体的电子束诱变效果要优于 X 射线。

参考文献

- 1 Ibrahim R, Mondelaers W, Debergh P C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, **54**(1): 37-44
- 2 Arunyanart S, Soontronyatara S. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, **70**(1): 119-122
- 3 宋恒, 王长泉, 巩向忠, 等. *核农学报*, 2003, **17**(5): 347-349
SONG Heng, WANG Changquan, GONG Xiangzhong. *Acta Agric Nucl Sin*, 2003, **17**(5): 347-349
- 4 Yamaguchi H, Nagatomi S, Morishita T, *et al.* *Nucl Instrum Meth Phys Res B*, 2003, **206**(1): 561-564
- 5 Okamura M, Yasuno N, Ohtsuka M, *et al.* *Nuclear Nucl Instrum Meth Phys Res B*, 2003, **206**(1): 574-578
- 6 林祖军, 孙纪霞, 崔广琴, 等. *山东农业科学*, 2000, **7**(5): 10-11
LIN Zujun, SUN Jixia, CUI Guangqin, *et al.* *Shandong Agric Sci*, 2000, **7**(5): 10-11
- 7 Michael C, Joiner, Brian Marples, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, **49**(2): 379-389
- 8 Eriksson G. *Hereditas*, 1963, **50**(2): 161-178
- 9 Witjaksono, Richard E. Litz. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, **77**(2): 139-147
- 10 徐冠仁, 王琳清, 王翌善, 等. *核农学导论*. 北京: 原子能出版社, 1997. 151-152
XU Guanren, WANG Linqing, WANG Yishan, *et al.* *Introduction to nuclear agriculture*, Beijing: Atomic Energy Press, 1997. 151-152
- 11 H S 乔拉. *植物生物技术导论*. 北京: 科学出版社, 2004. 39-56
Chawla H S. *Introduction to plant biotechnology*. Beijing: Science Press, 2004. 39-56

Effects of X-ray and electron beam irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Saintpaulia ionantha*

ZHOU Linbin^{1,3} LI Wenjian¹ MA Shuang¹ DONG Xicun¹ LI Qiang¹ GAO Qingxiang²

¹(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

²(Life Science School of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

³(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

ABSTRACT Adventitious buds from *in vitro* leaf explants of two different *Saintpaulia ionantha* (Mauve and Indikon) cultivars were irradiated with X-rays or 9 MeV electron beams, the tissue increase, buds differentiation and leaf morphology changes were studied. The results showed that the fresh weight of leaf explants of Mauve and Indikon irradiated to 40 Gy with the X-rays increased by 27.3 and 26.3 times, whereas they increased by 49.7 and 27.4 times with the E-beam irradiation of the same dose. Changes of fresh weight increase of explants irradiated to less than 20 Gy by both X-rays and electron beams demonstrated a tendency of going down first and then increasing, which differed from those irradiated to higher than 20 Gy. The percentage of bud formation of Mauve and Indikon irradiated to 100 Gy with the electron beams were 3.7% and 11.3%, respectively, while they were 7.5% and 64.1% with the X-ray irradiation of the same dose. The percentage of plantlets with malformed leaves in Mauve irradiated with 60 Gy E-beam irradiation was 22.2%, while it was 14.8% with X-ray irradiation of the same dose. For *Saintpaulia ionantha* Indikon with 40 Gy E-beam irradiation, the percentage was 35.2%, whereas it was 5.8% for X-ray irradiation of the same dose. The results show that the effect of mutation induction by the electron beam irradiation on *Saintpaulia ionantha* is better than by the X-ray irradiation. An optimal mutagenic treatment is 40 - 60 Gy irradiation with the electron beams.

KEYWORDS *Saintpaulia ionantha*, Adventitious buds, Tissue culture, X-ray, Electron beam

CLC Q691.5, Q691.8, Q506