

甘蔗体细胞诱变育种研究

陆耀邦 徐建云

王敬驹 陈 晖

(广西农学院, 南宁530005)

(中国科学院植物研究所, 北京)

摘要 用 ^{60}Co - γ 射线, 甲基磺酸乙酯(EMS)处理组培甘蔗愈伤组织, 可提高再生植株的变异机率, 处理愈伤组织再生植株性状: 株高、茎径、锤度等明显偏离正常的正态分布, 差异达1%显著标准, EMS处理较 ^{60}Co - γ 射线变化大。连续试验观察表明: 一些变异性状具有遗传性。用 ^{60}Co - γ 射线或甲基磺酸乙酯处理甘蔗愈伤组织可作为一种甘蔗体细胞诱变育种手段加以利用。

关键词 ^{60}Co - γ 射线; 甲基磺酸乙酯; 组培; 愈伤组织; 再生植株; 正态分布; 突变育种

加强甘蔗良种的选育和繁殖推广是发展甘蔗糖业重要的一环。长期以来, 我国甘蔗良种选育都是在海南岛进行有性杂交, 然后分散到各省区选育, 尽管杂交容易, 但得到优良组合困难, 选育时间长, 且地点时间有限, 方法单一, 一定程度上制约了甘蔗育种的发展。研究多渠道选育甘蔗良种, 无疑对发展甘蔗糖业有一定意义。近年来, 随着生物技术的发展应用, 利用生物工程技术进行作物品种改良已为育种专家所重视^[1-3]。本文报道的是近几年来我们利用生物技术组织培养, 结合理化因素诱变处理甘蔗愈伤组织进行体细胞诱变育种初步结果, 旨在探索如何提高体细胞的突变机率 and 选择效果。

一、材料与方 法

(一) 材料:

1: 甘蔗(*Saccharum officinarum*)品种为桂糖1号、桂糖11号、粤蔗71/210、台糖134。

2: 理化诱变因子: ^{60}Co - γ 射线, 甲基磺酸乙酯(EMS)。

(二) 方法

从田间采取生长健壮的甘蔗尾梢。用组培方法^[5]将无菌的甘蔗尾梢心叶外植体接种于附加2mg/l 2,4-D的MS培养基中诱导形成愈伤组织, 愈伤组织长出后继代培养一次, 然后用 ^{60}Co - γ 射线、甲基磺酸乙酯分别处理生长旺盛的愈伤组织。 ^{60}Co - γ 射线处理辐照剂量率为525 ray/分, 照射处理了0、3、6、9、12、15、18、21k ray九个梯度剂量。EMS处理了0、0.005%、0.05%、0.1%、0.5%五个浓度, 浸泡愈伤组织24小时, 处理后愈伤组织缓冲培养一段时间转入去掉2,4-D附加激动素(kt)1mg/l、萘乙酸(NAA)0.5mg/l、蔗糖5%的MS分化培养基上分化小植株。所得小植株即为诱变苗, 健壮培养一段时间后植于苗圃, 待小苗长到5—6片叶时将其单株移栽大田, 按常规品种选育法种植筛选。无性世代以种茎植, 均为春植。成熟期调查其主要农艺性状表现, 用统计分析方法^[3]分析其差异显著性。

二、结果与分析

(一) 理化诱变处理甘蔗愈伤组织最佳半致死剂量及其分化苗效果

1. ^{60}Co - γ 射线辐照处理最佳半致死剂量：以辐照后愈伤组织的增殖速度测定其最佳半致死剂量。结果如图 1 所示，结果表明：愈伤组织的增殖倍数是随着辐射剂量的加大而下降，不同品种对辐射的反应不同。参试两个品种，粤蔗71/210对辐射反应比较敏感，各梯度间增殖倍数差异明显。台糖134不及粤蔗71/210明显。用生长指数（以CK为100%）测定其最佳半致死剂量，71/210在6—9k之间，F134在9—12k之间。辐射反应不同可能与愈伤组织质地有关。粤蔗71/210愈伤组织质地较松散颗粒性好，耐辐射穿透力可能差一些，F134愈伤组织结构大，含水量较多其耐辐射半致死剂量要大一些。两个材料辐照18k以上愈伤组织基本不长。

2. EMS 诱变处理甘蔗愈伤组织最佳浓度：用同样方法测定不同 EMS 浓度处理甘蔗愈伤组织的生长效果，结果 EMS 浓度越大愈伤组织增殖越小，浓度到0.5%时浸泡24小时愈伤组织停止生长；浓度在0.05%以下时愈伤组织损伤较少；在0.1%时愈伤组织生长指数在50%左右，是比较合适的诱变处理浓度（图 2）。

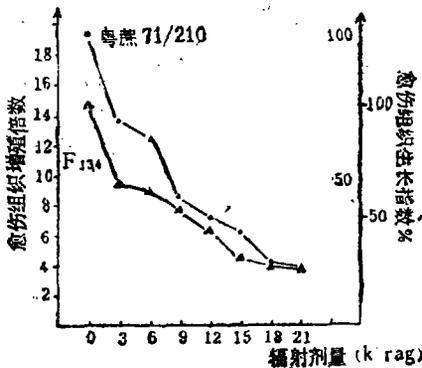


图1 辐照甘蔗愈伤组织效果
Fig. 1 Effect of irradiated sugarcane callus

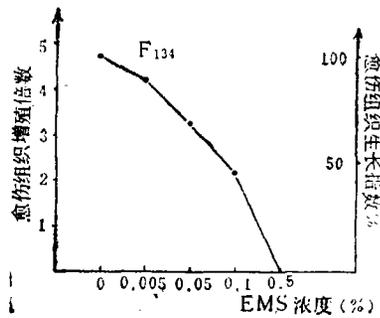


图2 EMS 处理甘蔗愈伤组织效果
Fig. 2 The effect of treated sugarcane callus with EMS

3. 处理愈伤组织分化苗效果：将处理愈伤组织缓冲培养一段时间后直接转入分化培养基中分化小苗。结果辐射处理超过12k ray的愈伤组织未能分化出小苗。6—9k ray的有10—30%分化出小苗，6k ray以下的分化苗较高。EMS处理的愈伤组织转入分化培养基以后，大部分变黑死亡，成活的愈伤组织有80%分化出绿苗。两种方法处理愈伤组织分化出的小苗都比较弱小，需健壮培养才能移栽。

(二) 诱变苗大田农艺性状表现

观察了诱变苗M₀代株高、茎径、锤度、有效茎数及形态特征表现。调查数据统计分析表明：诱变苗表现出较大的分离。 χ^2 检验，诱变苗明显偏离正态分布，差异达1%显著标准。诱变苗大部分植株性状变劣，只有小部分植株性状变异超过供体2个标准差，这些变异

表1 诱变苗主要农艺性状表现

Table 1 The expression of main agronomical characters of plantlets from callus treated by ⁶⁰Co-γ ray and EMS

品种 Cultivars	锤度 Brix		株高 Plant height		茎径 Stalk diameter		有效茎 Valid stalk	
	调查株数 No. of plants observed	变异系数 Coefficient of variation	调查株数 No. of plants observed	变异系数 Coefficient of variation	调查株数 No. of plants observed	变异系数 Coefficient of variation	调查株数 No. of plants observed	变异系数 Coefficient of variation
F134(CK)	19	17.89±1.41 7.9	19	320.8±17.8 5.5	19	3.30±0.37 11.2	19	1.4±0.6 42.8
△Mo	96	18.30±1.18 6.4	43	331.9±14.2 4.2	44	2.95±0.25 8.4	55	2.7±1.0 37.0
粤蔗71/210(CK)	21	16.40±1.02 6.2	21	280.2±17.6 6.3	21	2.99±0.29 9.7	21	1.7±0.3 17.6
CGD71/210(CK)	186	16.76±1.23 7.3	56	297.0±14.6 4.9	59	2.55±0.22 8.6	56	1.9±0.7 36.8
桂糖11号(CK)	62	18.53±0.92 4.9	65	229.5±21.8 9.5	66	3.27±0.32 9.8	65	2.2±0.9 40.9
CGS-11(CK)	270	17.60±1.76 10.0	279	223.8±19.9 9.0	272	2.42±0.24 9.9	279	4.2±1.5 35.7

△, γ 射线处理
※ EMS 处理

性状有选种价值。用EMS处理的愈伤组织再生植株变异较大。锤度、株高、茎径的 X^2 值高达1530.7、312.6、2488.7、远远超出 $X^2_{0.01}(11)$ 时的标准显著值24.72。辐照处理的愈伤组织再生植株变异相对较小, X^2 值虽达1%显著标准,但两个品种的锤度、株高 X^2 值均未超过100,茎径变异稍大也在400以下。他们的变异系数,化学处理方法较大, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线处理较小(表1)。就锤度、株高、茎径而言,变异较大的是茎径,次为锤度,株高变异较小。不同品种,不同处理表现不同。处理愈伤组织再生植株Mo代茎径普遍变小,参试品种很少有超过对照一个标准差的,这可能经由组培以后产生植株较弱小分蘖多有关。锤度变异:辐照处理愈伤组织再生植株Mo代锤度较供体表现好,参试2个品种锤度平均数均超过对照(表1),单株超过对照2个标准差以上的株系较多,虽然品种不同有差异但辐射处理提高了愈伤组织再生植株的锤度,这对选育高糖突变株是一个好现象。EMS处理愈伤组织再生植株Mo代锤度较供体差(表1),大部分植株表现为低糖,但也有少部分植株超过对照1.5个标准差以上的,这些株系有选种价值。株高变异: $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线处理较供体高,EMS处理较供体矮。因其受环境条件影响较大,在无性世代的遗传稳定性观察中,未发现其具有遗传稳定性。除诱变苗的锤度、株高、茎径与供体有明显差异外,在植株形态上也表现出变异。主要形态变异有茎变、色变、芽变、缩节等。调查了600株 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线处理的愈伤组织Mo代再生植株,发现有3株茎开叉,4株芽变,5株茎色条纹和1株缩节共13株形态变异,变异率为2.2%。在939株EMS处理再生植株中有芽变25株,茎变30株,色变4株,缩节3株共73株形态变异,变异率为9.8%。变异大多数是交错在一起的,即一株植株中既有芽变又有节

表2 高糖突变株的遗传稳定性和选择效果

Table 2 The selection effect and genetic stability of high-sucrose mutagenic plants from callus treated with $^{60}\text{Co}-\gamma$ ray or EMS

诱变材料 Mutagenic materials	M1			M2			M3		
	种植 株系 No. of lines cultivated	入选 株系 No. of selected lines	入选 机率 (%) Selection percentage	种植 株系 No. of lines cultivated	入选 株系 No. of selected lines	入选 机率 (%) Selection percentage	种植 株系 No. of lines cultivated	入选 株系 No. of selected lines	入选 机率 (%) Selection percentage
桂糖1号※	77	23	29.8	10	1	10.0	1	1	100
桂糖11号※	19	9	47.4	9	2	22.2	2	1	50
F134 ※	19	6	31.6	6	0	0	—	—	—
桂糖11号△	21	7	33.3	7	4	57.1	4	1	25
粤蔗71/210△	7	5	71.4	5	4	80.0	—	—	—
F134 △	68	32	47.1	32	5	15.6	—	—	—

※ EMS 处理: EMS treatment

△ $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线处理: $^{60}\text{Co}-\gamma$ ray streatment

表3 高糖株系主要农艺性状表现

Table 3 The main agronomical characters of high - sucrose plants from sugarcane callus treated by γ - ray and EMS.

亲本 Parent	无性 世代 Gene- ration	突变株 代号 Code of mutant	株高 Plants height	茎径 Stalk diameter	亩有效茎数 No. of valid stalk per mu	锤度 Brix	甘蔗蔗糖分 Sucrose content of cane	亩产蔗量 (公斤) Yield of cane per mu (kg)	指数 Index	亩产糖量 (公斤) Yield of Sugar per mu (kg)	指数 Index
※桂糖1号	CK	CK	229±21.8	3.27±0.32	2450	18.50±0.80	13.82	7399.4	100	1022.6	100
CGS, No.1	M ₅	83/86	224±13.5	2.60±0.21	4500	18.10±0.90	14.80	7612.5	102.9	1126.6	110.2
△桂糖11号	CK	CK	302±16.0	3.01±0.27	4110	19.91±1.51	14.78	7149.8	100	1056.7	100
CGS, No.11	M ₃	85/3	295±19.6	2.43±0.24	6101	20.21±1.09	14.39	8287.0	115.9	1192.5	112.9
△粤蔗71/210	CK	CK	226±13.2	2.95±0.45	3890	17.71±1.40	12.71	5073.3	100	664.8	100
CGD71/210	M ₂	86/8	219±16.1	2.54±0.34	4558	19.63±0.98	14.98	4538.9	89.5	679.9	102.3
	M ₂	86/11	248±11.2	2.69±0.27	4067	19.53±0.94	14.55	5276.0	104.0	767.6	115.5
	M ₂	86/12	213±19.7	2.42±0.33	4312	19.45±0.94	13.37	4937.2	97.3	660.1	99.3
	M ₃	86/17	215±18.5	2.64±0.32	4263	19.91±0.92	14.20	4982.6	98.2	707.5	106.4

※ EMS 处理 EMS treatment

△ 辐射处理 γ -ray treatment.

⊗ 理论糖产量 The yield of sugar per mu is a theoretical yield.

变等几种变异,引起变异的机理是不清楚的。选有代表性的各种形态变异株系 32 个于 M₁ 代种植观察。结果大部分形态变异性状消失。只有 3 株形态变异表现出来。M₁ 代表现出来的形态变异在以后的无性世代中基本不变。

(三) 诱变苗遗传稳定性及其选择效果

在诱变苗 M₀ 代中选择了一些性状较好的高糖、高株、大茎、多茎突变株系进行遗传稳定性观察。结果入选多茎突变株系连续三代均表现出多茎,有效茎数明显高于对照,遗传比较稳定。大茎株系 M₁ 代表现不明显,因其 M₀ 代茎径小,入选大茎株系本身跟供体差不多,因此在 M₁ 代未表现出有超亲的现象,但有些大茎株系还是表现出大茎。株高表现跟供体差不多,未表现出优势,不具有遗传性。高锤度突变株系大部分无遗传性,随着无性世代的延长,高糖性状消失,小部分有遗传性,在无性世代中可以保持下来。高糖突变株的选择效果见表 2。从表 2 中可以看出,不同品种不同处理方法选择效果不一样,低糖品种粤蔗 71/210 和老品种台糖 134 选择机率要比高糖品种,桂糖 1 号和 11 号好一些。辐射处理材料比 EMS 处理材料选择效果好一些,但其稳定性较 EMS 处理慢。

(四) 入选突变株的农艺性状表现

两种方法选择获得的优良高糖突变株主要农艺性状表现见表 3, 突变材料亩有效茎数均高于供体,茎径则小于供体,甘蔗蔗糖分不同品种表现不同,桂糖 1 号、粤蔗 71/210 突变材料高出供体,幅度在 0.66—2.27 个百分点(绝对值),粤糖 71/210 提高比较明显。桂糖 11 号突变株比供体略低。明显表现出低糖品种糖分提高较大,老品种次之,新品种较小。虽然突变材料茎径比供体小,但由于其有效茎数多,在构成产量上 6 个高糖突变株系有 3 个比供体增产,幅度在 2.9—15.9%, 3 个减产,幅度在 1.8—10.5%。由于突变株含糖量比供体高,最后在构成糖产量上, 6 个突变株有 5 个理论糖产量比供体高,幅度在 2.3—15.5%, 有一个减产 0.7%, 结果表明: 高糖突变材料农艺性状表现并不很完美,在育种中要区别对待。本试验有 3 个高糖突变材料表现较好,目前试验正在进行中,有待进一步观察鉴定。

讨 论

利用生物技术进行品种改良在抗性育种^[10] 脱毒^[4] 等方面取得的成绩是无可置疑的。但在经由组织培养出现的细胞自发突变选育新品种上,人们还持有怀疑态度^[6]。在甘蔗育种上存在有认为可以^[1,7,8,12] 和意义不大^[6] 两种分歧。据我们以往试验^[2],经由组培产生的甘蔗组培苗确实存在有变异,只是机率较小不稳定,但不否认可选育出适合人们需要的突变材料,因在这方面已有成功的例子^[13]。本试验旨在探索如何提高细胞的突变机率和加大选择机会。结果用组织培养方法结合理化诱变处理甘蔗愈伤组织其再生植株表现出较大的变异,这无疑对突变育种是有意义的。连续试验观察表明:有些植株的表型变异,如糖分、茎径等具有一定的遗传性。经过认真选择可望得到适合人们需要的优良株系。用此种方法至少可加大用生物技术进行育种的突变机率,作为一种辅助手段还是有意义的。

在我们所用的诱变剂中,化学诱变剂 EMS 诱变机率较大,表型变异较多,但大多数变异植株性状变劣,优良的突变植株选择机率少。物理因素 ⁶⁰Co-γ 射线诱变表型变异不及 EMS 大,但诱变植株好的表型变异比 EMS 多。再生植株后代大部分表现为高糖,高糖突变株选择机率较大,容易获得理想的材料。

用于处理愈伤组织的最佳半致死剂量, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线为 6—9k ray, EMS 浓度为 0.1% 浸泡 24 小时, 过高过低效果不理想。

在材料的选择上, 选择低糖高产品种和推广时间长的品种作诱变材料, 较高糖新品种容易获得优良高糖突变株系。

参 考 文 献

- [1] 陈子云, 1987: 甘蔗组织培养再生品系的变异与遗传。甘蔗糖业甘蔗分刊, (1): 8—14.
- [2] 陆耀邦, 1989: 组培蔗在无性世代中农艺性状表现。广西农学院学报, 8(3): 8—12.
- [3] 钟平安, 1983: 生物统计, 112—157。湖南科学技术出版社。
- [4] 陶国清等, 1981: 马铃薯无病毒植株的大量繁殖和栽培。植物学报, 23(1): 75—78.
- [5] 韩光禧, 陆耀邦, 1983: 甘蔗愈伤组织和胚性细胞团的诱导与分化因素的研究。广西农学院学报, (2): 83—94.
- [6] Kresovich, S., R. E. Megee, et al., 1986: 甘蔗组织培养及营养繁殖群体间农艺性状的变异性。国外农学甘蔗, 1987, (1): 34—36.
- [7] Miller, J. D., 1983: 组织培养在甘蔗育种上的用法和功效。国外农学甘蔗, 1986, (1) 19—23.
- [8] Heinz, D. J. and Mee, G. W. P. 1971: Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derive from callus tissue. Amer. J. Botany, 58: 257—262.
- [9] Heinz, D. J. et al., 1977: Cell tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: "Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture" (Renert, J. and P. S. Bajaj eds.) Springer verlag, Berlin, pp. 1—16.
- [10] Krishnamurthi, M., and J. Tlaskal, 1974: Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var Pindar subclones from tissue culture. Proc. Int. Sugarcane Technol., 15: 130—137.
- [11] Liu, M. C. and W. H. Chen., 1976: Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding I. Creation of genetic Variation through callus. Euphytica, 25: 293—403.
- [12] Liu, M. C. and W. H. Chen, 1978: Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding I. Performance and yield potential of callus derived Lines. Euphytica, 27: 273—282.
- [13] Liu, M. C., H. S. Yeh and W. H. Chen, 1984: Tissue culture and cell culture as aids to sugarcane breeding, IV: A high-sucrose and vigorously growing calliclone 71—4829. Taiwan Sugar. 31(3): 77—83.
- [14] Larkin, P. J. et al., 1984: Heritable somalonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet., 67: 443—445.
- [15] Nickell, L. G., and Heinz, D. J., 1973: Potentials of cell and tissue culture techniques as aids in economic plant improvement. In: "Genes enzymes and populations" (Srb, A. M. ed.,) New York pp 109—128.
- [16] Sievert, R. C. and A. C. Hildebrandt, 1965, Variation within single cell clones of tobacco tissue culture. Amer. J. Bot., 52: 742—750.
- [17] Sun Z. X., et al., 1983: Somaclonal genetics of rice (*oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet., 67: 67—73.

- (18) Louie, G. Niekell., 1977: Crop Improvement in sugarcane; Studies using in vitro methods. Crop Science 17(5): 717—719.

STUDY ON INDUCTION OF MUTATION BREEDING OF SUGARCANE SOMATIC CELL

Lu Yaobang Xu Jianyun

(Guangxi Agricultural College, Nanning, 530005)

Wang Jingju and Chen Hui

(Institute of botany, Academia Sinica, Beijing, 100044)

Abstract When sugarcane regeneration plants from tissue-culture sugarcane-callus were induced by ^{60}Co - γ rays and ethyl-methane sulfonate (EMS), the variation frequency of characters such as Brix, plant height, stalk diameter etc. can be raised. The treatment different deviated from normal distribution. There was significant at 1% level between treatments. Difference induced by EMS was more than these by ^{60}Co - γ rays. The continued test determination showed that some variation of characters can be heredity. The result indicated that treated sugarcane callus with ^{60}Co - γ rays or EMS can be a useful way for sugarcane somatic cell mutation breeding.

Key words ^{60}Co - γ rays; ethyl-methane-sulfonate (EMS); tissue-culture; callus; regeneration plants; normal distribution; mutation breeding