

文章编号: 1001-1498(2008)01-0122-04

草地早熟禾耐盐愈伤组织筛选的适宜 NaCl浓度和继代次数研究

李银凤, 孙振元, 韩 蕾, 刘彩霞

(中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

关键词: 草地早熟禾; 愈伤组织; 耐盐; 继代培养

中图分类号: S543

文献标识码: A

Study on the NaCl Concentration and Subculture Times of Bluegrass Salt-tolerant Callus Selection

LI Yin-feng, SUN Zhen-yuan, HAN Lei, LIU Cai-xia

(Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: The calluses induced from bluegrass seeds were treated with different concentrations of NaCl to test their survival rate and quality. The results showed that the suitable concentration was $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for NaCl-tolerant callus selecting. The analysis of survival rate and growth of callus showed that the most optimal subculture times were 6 for NaCl-tolerant callus induction of bluegrass under the suitable NaCl concentration. NaCl-tolerant stability test proved that the gained bluegrass callus had steady NaCl-tolerance.

Key words: bluegrass; callus; NaCl-tolerant; subculture

草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 是禾本科早熟禾属多年生草本植物, 是我国北方地区应用最广泛的冷季型草坪草。近年来, 由于土壤的盐化问题日益严重, 培育耐盐的草地早熟禾品种显得尤为重要。体细胞无性系变异是来源于已经存在的细胞变异和培养过程中诱导的变异^[1]。变异的诱导与选择为提高植物的耐盐性提供了一条有效的途径。通过在富含 NaCl 或其它盐的培养基上选择, 已经在许多植物, 如苜蓿 (*Medicago sativa* Linn)^[2]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[3]、高粱属 (*Sorghum* Moench)^[4]、玉米 (*Zea mays* L.)^[5] 上获得了耐盐培养细胞系。有关草地早熟禾耐盐突变体的诱导与筛选尚未见报导。

Nabors 等^[6]对烟草耐盐离体筛选的研究认为,

在盐胁迫条件下能否产生耐盐突变体与添加盐的质量浓度和筛选时间有关。在低水平选择压力下有利于形成生理适应性细胞, 但不利于突变细胞的产生。选择压力必须大到足以抑制绝大多数细胞分裂和生长的程度, 正常细胞几乎不能生长、分裂的情况下才有可能筛选出突变的细胞。因此, 本实验以草地早熟禾种子为材料诱导愈伤组织, 研究了在继代培养过程中不同浓度 NaCl 胁迫对愈伤组织成活率和质量的影响, 以选择草地早熟禾耐 NaCl 愈伤组织的适宜浓度; 在适宜盐浓度下通过多次继代培养, 确定草地早熟禾耐盐愈伤组织筛选的最佳继代次数。以期获得真正的耐盐愈伤组织, 为草地早熟禾通过离体诱变筛选抗盐品种奠定基础。

收稿日期: 2007-04-23

基金项目: 国家“863 项目“优质、抗逆草坪草早熟禾新品种选育(2002AA241061)”

作者简介: 李银凤(1979—), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事草坪草组织培养技术研究。

通讯作者: 孙振元, Email: sunzy@263.net

1 材料与方 法

1.1 草地早熟禾愈伤组织诱导与增殖培养

取草地早熟禾纳苏 (*Poa pratensis* L. 'Nassau') 种子,流水冲洗 8~12 h,用 70% 的酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,1 g·L⁻¹ HgCl₂ 溶液消毒 8 min,无菌水冲洗 5 次。将种子横切后接种于诱导培养基 (MS 基本培养基每升附加 3 mg 2,4-D、2 mg CuSO₄、0.05 mg IDZ、300 mg CH、30 g 蔗糖、7.0 g 琼脂,pH 值 5.8) 中诱导愈伤组织;接种 40 d 后,选取生长状态一致的淡黄色、颗粒状愈伤组织转入继代培养基 (MS 基本培养基每升附加 2 mg 2,4-D、1 mg CuSO₄、0.25 mg IDZ、30 g 蔗糖、7.0 g 琼脂,pH 值 5.8) 中,于 (26 ± 2) 的条件下暗培养,30 d 继代 1 次,连续继代 3 次,使其大量增殖。

1.2 不同浓度 NaCl 对愈伤组织的胁迫处理

将以上继代 3 次的愈伤组织切成 0.5 cm³ 左右的小块分别接种到 NaCl 浓度为 0、5、10、15、20 g·L⁻¹ 的继代培养基中,10 块·皿⁻¹,重复 8 次,于 (26 ± 2) 的条件下暗培养。30 d 后,统计愈伤组织的成活率。

愈伤组织成活率 = (成活愈伤组织块 / 接种愈伤组织块) × 100%

1.3 耐 NaCl 愈伤组织最佳继代次数的确定

将以上继代 3 次的愈伤组织切成 0.5 cm³ 小块接种到含适宜 NaCl 浓度 (15 g·L⁻¹) 的继代培养基中,10 块·皿⁻¹,重复 20 次,于 (26 ± 2) 的条件下暗培养。30 d 继代 1 次,每次继代前随机选取 10 块愈伤组织称鲜质量,继代后从中取 5 块成活的愈伤组织称鲜质量,统计愈伤组织生长量,并记录其生长状态。

愈伤组织生长量 = 继代后愈伤组织鲜质量 - 继代前愈伤组织的鲜质量

1.4 耐盐愈伤组织稳定性鉴定

将在 NaCl 浓度为 15 g·L⁻¹ 的继代培养基上继代 6 次后稳定生长的愈伤组织,转移到不含 NaCl 的培养基上,于 (26 ± 2) 的条件下暗培养,每 30 d 继代 1 次,连续继代 3 次,再回到 NaCl 浓度为 15 g·L⁻¹ 的继代培养基上培养,检验其耐盐稳定性。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NaCl 胁迫对愈伤组织成活率的影响

在不同浓度 NaCl 的继代培养基中愈伤组织的成活率和生长状况如图 1、2。随着 NaCl 浓度的增

加,愈伤组织的成活率逐渐降低,在不加 NaCl 的培养基中愈伤组织为淡黄色、颗粒状、生长较快,成活率为 100%; NaCl 浓度为 15 g·L⁻¹ 时,愈伤组织为淡黄色、颗粒状、生长较慢,成活率为 60.3%; NaCl 浓度为 20 g·L⁻¹ 时,愈伤组织变黄、粘稠状,基本上停止生长,无再生能力,成活率为 30.9%。这表明 NaCl 浓度在 15 g·L⁻¹ 时,达到或接近愈伤组织最大耐受范围,是耐盐愈伤组织筛选的适宜 NaCl 浓度。

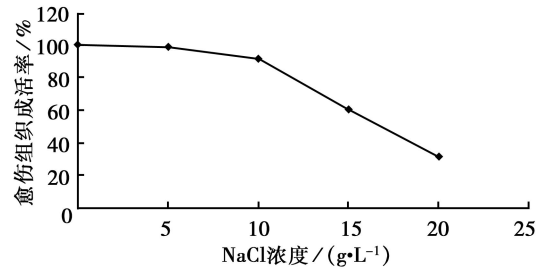


图 1 不同 NaCl 浓度胁迫对愈伤组织成活率的影响

2.2 NaCl 胁迫条件下继代次数对愈伤组织的影响

在 NaCl 浓度为 15 g·L⁻¹ 的继代培养基上,继代次数对愈伤组织的生长量和成活率有明显影响 (图 3、4),随着继代次数的增加,愈伤组织的生长量逐渐增加,成活率也逐渐提高。当继代到第 6 次时,草地早熟禾愈伤组织的生长量和成活率都基本趋于稳定,且仍保持淡黄色、颗粒状。

2.3 耐盐愈伤组织稳定性鉴定

在 NaCl 浓度为 15 g·L⁻¹ 的继代培养基中继代 6 次后稳定生长的愈伤组织转接到不加 NaCl 的继代培养基中再继代 3 次后,转到 NaCl 浓度为 15 g·L⁻¹ 的继代培养基中愈伤组织仍为淡黄色、颗粒状,长势良好,成活率 100%,且具有一定的分化能力 (图 2: F)。这表明所获得的耐 15 g·L⁻¹ NaCl 草地早熟禾愈伤组织在不含 NaCl 的培养基中再继代 3 次后,仍保持其耐盐的能力,具有稳定的耐盐性。

3 结论与讨论

获得耐盐愈伤组织一般有 2 种方法,一是将外植体直接接种到含盐培养基上诱导耐盐愈伤组织,二是将愈伤组织转移到盐质量浓度恒定或逐次递增的培养基上通过多次继代,选出稳定生长的愈伤组织^[7-9]。作者用这 2 种方法都做了研究,发现通过第 1 种方法在诱导培养基中加入不同浓度的 NaCl 对愈伤组织的诱导有明显抑制作用;随着培养基中

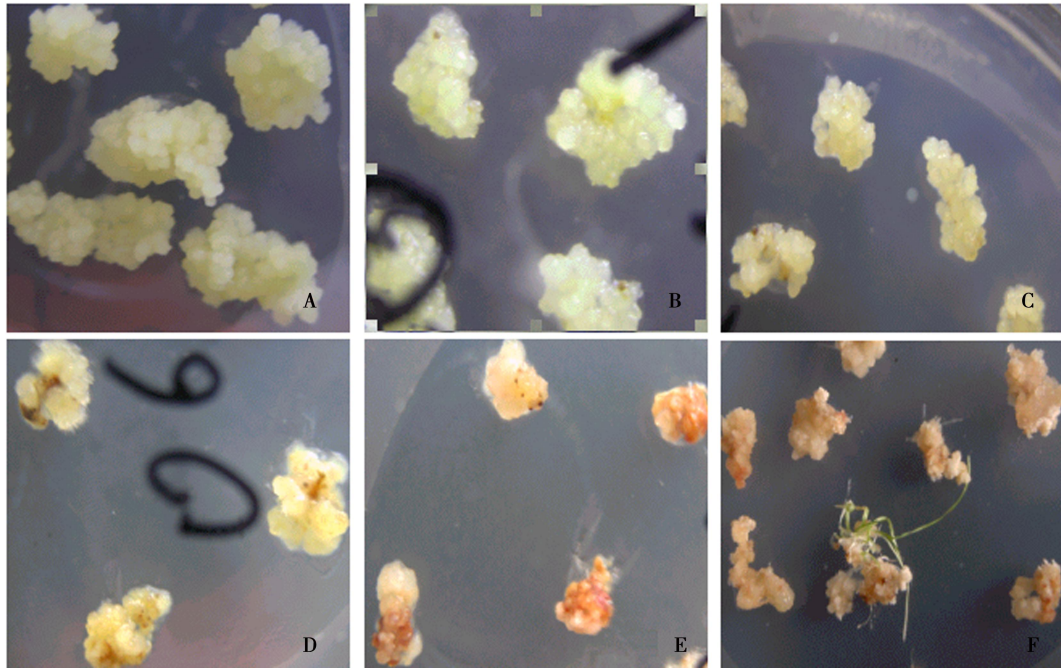


图 2 不同 NaCl 浓度对草地早熟禾种子愈伤组织生长状况的影响

A: NaCl 浓度为 $0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; B: NaCl 浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; C: NaCl 浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;
D NaCl 浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; E: NaCl 浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; F: 耐盐愈伤组织的分化情况

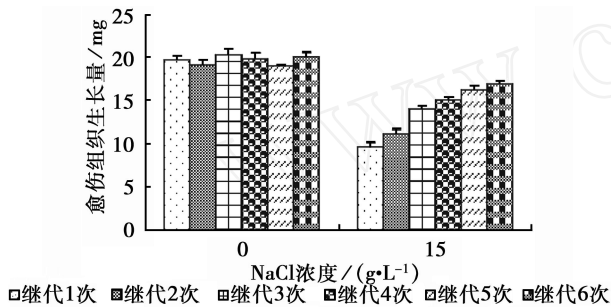


图 3 继代次数对愈伤组织生长量的影响

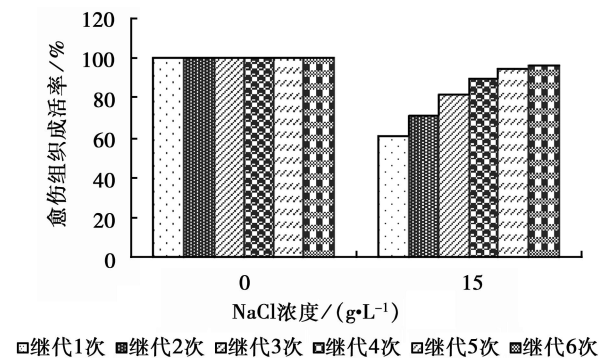


图 4 继代次数对愈伤组织成活率的影响

NaCl 浓度的不断上升,愈伤组织的诱导率明显降低,当培养基中 NaCl 浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,所诱导出的愈伤组织基部粘稠状、生长缓慢,其诱导率仅为 2.5%; $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,诱导率为 0。通过第 1 种方法没有得到草地早熟禾耐盐愈伤组织。

张建华等^[10]在番茄耐盐体细胞变异体的离体筛选时,通过在培养基中分别附加 $225、300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 直接高盐筛选,获得了耐盐的番茄植株,并且发现经过系列 NaCl 浓度胁迫筛选到的耐盐植株大多属生理适应性,直接高盐胁迫下筛选到的耐盐植株才有可能成为真正的耐盐突变体。因此,本文作者通过在继代培养基中添加不同浓度 NaCl,研究了培养基中 NaCl 含量对愈伤组织的成活率和生长状态的影响,发现 NaCl 浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,达到或接近草地早熟禾愈伤组织最大耐受范围,选择效果好;在 NaCl 浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的继代培养基中连续继代筛选 6 次后,愈伤组织的生长量和存活率已基本趋于稳定,是草地早熟禾耐盐突变体筛选较为适宜的继代次数。继续继代培养会使愈伤组织的变异频率增加,影响愈伤组织的分化。

耐盐性鉴定结果也表明,所获得草地早熟禾耐盐愈伤组织变异体能保持稳定的耐盐性,但耐盐稳定性检验是一个长期的过程,要经过大田实际检验才能进一步验证,本研究的检验只是证明了在一定的时间内选择出的草地早熟禾耐盐愈伤组织的耐盐能力在细胞水平上能够稳定保持,对由此诱导出的再生植株的耐盐能力是否能够稳定保持,还有待做进一步的探讨。草地早熟禾品种纳苏的无融合生殖率达 95% 以上,其母体获得的某种抗性不会因为在

繁殖过程中丧失,故能保持较长的时间,因此在草地早熟禾上进行耐盐变异体的筛选是很有意义的,并为进一步在大田耐盐变异体的验证及筛选奠定了基础。

参考文献:

- [1] Evans D A, Sharo W R, Medina F H P. Somaclonal and gametoclonal variation[J]. *Am J Bot*, 1984, 71: 759 - 774
- [2] Winicov I. Characterization of salt tolerance alfalfa of *Medicago sativa* L. plants regenerated from salt tolerant cell lines[J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 561 - 564
- [3] Winicov I. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt tolerant cell lines[J]. *Plant Sci*, 1996, 113: 105 - 111
- [4] Bhaskaran S, Smith R H, Scherzt K F. Progeny screening of *Sorghum* plants regenerated from sodium chloride-selected callus for salt tolerance [J]. *J Plant Physiol*, 1986, 122: 205 - 210
- [5] 郑霞, 韦小敏, 季月良, 等. 玉米体细胞抗盐突变体的筛选及耐盐性鉴定 [J]. *河南农业大学学报*, 2004, 38 (2): 139 - 143
- [6] Nabors M W, Gibbs S E, Bemstein C S. NaCl-tolerant tobacco plants from cultur cell[J]. *Z Pf Lanzenphysiol*, 1980, 13 (2): 7 - 12
- [7] Piqueras A, Hemandez J A, Omos E, *et al*. Changes in antioxidant enzymes and organic solute associated with adaptation of citrus cells to salt stress[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1996, 45: 53 - 60
- [8] Basu S, Gangopadhyay G, Gupta S, *et al*. Screening for cross tolerance against related osmotic stress in adapted calli of salt sensitive and tolerant varieties of rice[J]. *Phytomorphology*, 1996, 46: 357 - 364
- [9] Hasson E, Poljakoff-Mayber A. Callus culture from hypocotyls of *Kosteletzkya virginica* seedlings [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1995, 43: 279 - 285
- [10] 张建华, 陈火英, 庄天明. 番茄耐盐体细胞变异体的离体筛选 [J]. *西北植物学报*, 2002, 22 (2): 257 - 262

www.cnki.net