

组培法筛选高抗盐大花萱草品种的初步研究

张伟丽¹, 刘凤民², 许旭丹²

(1. 仲恺农业工程学院 生命科学院, 广东 广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院 实习农场, 广东 广州 510225)

摘要: 利用大花萱草的茎尖离体诱导愈伤组织, 先筛选出大花萱草组培离体再生系统, 在该培养基中添加不同浓度 NaCl 做胁迫条件, 统计组培苗的生长情况, 并测定了组培苗的脯氨酸含量的变化。试验表明: 金娃娃和江苏沭阳萱草在 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 4.0 mg/L 培养基上的诱导愈伤率较高。组培苗叶片生长量随盐浓度的增加而递减, 主要表现为叶片的生长受到抑制, 随着盐浓度的增高脯氨酸的含量表现越高, 相同 NaCl 胁迫浓度下江苏沭阳萱草脯氨酸含量高于金娃娃。

关键词: 大花萱草; 组织培养; 抗盐筛选; 脯氨酸

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0184-03

大花萱草是重要的花境植物, 属百合科萱草属 (*Heimerocallis* sp.)。全世界共约 14 种, 其中原产我国的就约 11 种, 20 世纪以来, 欧美园艺学家主要利用我国的萱草材料, 进行了大量的育种工作, 目前栽种品种多达 10 000 多种。近年来, 我国较多大城市从欧美引进一批杂种大花萱草在植物园、公园、路边广为栽种。广东沿海城市较多盐碱滩涂地, 高盐含量地区等急需高抗盐的萱草品种, 培育高抗盐的大花萱草品种, 是有效、经济且切实可行的措施^[1]。大花萱草的育种研究在我国尚属起步阶段, 在细胞或组织水平上进行抗盐突变体的筛

选, 变异频率高, 培养条件容易控制且不受季节限制^[2-3]。

组培法筛选高抗盐植物是现代生物技术之一, 利用离体再生系统结合选育新品种具有简便、速度快、准确的特点。为满足广东地区盐碱地绿化的需求, 先筛选出大花萱草组培离体再生系统, 在不同盐浓度梯度下进行筛选试验, 以期获得较满意的抗盐植株并初步确定其适宜的抗盐浓度。植物中脯氨酸的含量是植物抗逆性(旱、盐、冻等)的一项生理指标^[4], 所以通过测定组培苗的脯氨酸含量达到了有效筛选抗盐植株的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用大花萱草“金娃娃”和江苏沭阳萱草 2 个萱草品种。

1.2 外植体的处理

将萱草植株用自来水线型小水流冲洗 2~3 h 后, 用毛刷轻轻刷去植株表面及叶片间的泥土, 并用刀削去根系和叶片, 保留茎段 3~4 cm 长, 培养皿中晾干备用。在

第一作者简介: 张伟丽(1969-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现从事植物分子遗传学及生物技术的研究工作。E-mail: zhangwei-li7218@163.com。

基金项目: 仲恺农业工程学院大学生创新基金资助项目(H1407057)。

收稿日期: 2009-06-10

Genetic Difference of 18 *Lilium longiflorum* Genotypes with RAPD Markers

LIU Wei¹, ZHOU Hou-gao², HE Zhao-rong³

(1. Biochemistry Department of Wenshan University, Wenshan, Yunnan 663000, China; 2. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 3. School of Life Science, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: Fourteen primers were used for RAPD analysis and produced a total of 142 bands, of which 74.65% bands were polymorphic, this suggested that the relationships among genotypes were close. According to the results of cluster analysis, 18 *Lilium longiflorum* genotypes were divided into 4 groups. The 18 genotypes can be distinguished by the 14 primers, and displayed the difference of genetic site. So we can say RAPD was an effective molecular marker technic in identifying variety of *Lilium longiflorum*, and it could be used for DUS testing.

Key words: *Lilium longiflorum*; Genetic difference; DUS; RAPD

超净工作台上,用 75%酒精浸泡 2~3 min,放入 0.1% HgCl₂ (0.02 %吐温)中浸泡 5~10 min,用无菌水漂洗 4 次后,放入无菌的培养皿中用灭菌的滤纸吸干水分,并用手术刀逐层剥去叶片,切出茎尖 0.2~0.5 cm 大小,备用。

1.3 萱草组培的培养基及培养条件

包括基本培养基附加不同激素组合,适用于不同组培阶段的培养基组成,基本培养基选用 MS 培养基或 1/2MS 培养基 以上培养基均加入 2%琼脂粉,2%蔗糖, pH 5.8 在人工控制条件的培养室内培养 先暗培养 7 d,培养温度 22~26℃,光照度 2 000~2 200 lx,光照 12 h/d.诱导增殖培养基、生根培养基分别是基本培养基附加不同的激素组成,其中生根培养基的基本培养基为 1/2MS 培养基(具体组成见表 1)。

1.4 抗盐植株的处理、筛选及脯氨酸的测定

在培养基中添加浓度分别为 0.25%、0.5%和 0.75%的 NaCl,对照不加 NaCl。取培养 30 d 的带部分愈伤组织组培苗,切去上部叶片,接种于抗盐筛选的培养基中。观察生长指标并测定其脯氨酸含量。

脯氨酸含量的测定:该试验采用茚三酮法对脯氨酸含量进行测定^[9]。分别取不同浓度梯度的组培苗各 0.5 g,用茚三酮法提取脯氨酸溶液后用 722 型分光光度计测定其 OD 值。并计算其脯氨酸含量。提前做好标准曲线,脯氨酸含量($\mu\text{g/g}$)= $[X \times 5/2]/\text{样重}(\text{g})$ 。 $Y=0.0661X-0.0081(R^2=0.989)$, Y 是吸光值, X 是脯氨酸含量。根据测定的 OD 和标准曲线公式计算出脯氨酸含量。

| 表 1 愈伤组织诱导培养基 | | | |
|---------------|-----|---|---|
| 品种 | 培养基 | 培养基组成 | |
| | 编号 | NAA 含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 培养基中 6-BA 含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 金娃娃 | 1 | 0.5 | 5.0 |
| | 2 | 0.4 | 4.0 |
| | 3 | 0.4 | 3.0 |
| | 4 | 0.3 | 3.0 |
| 沭阳萱草 | 1 | 0.4 | 4.0 |
| | 2 | 0.4 | 3.0 |
| | 3 | 0.3 | 3.0 |
| | 4 | 0.2 | 2.0 |

2 结果与分析

2.1 最佳培养基的筛选

每个梯度处理接种 10 瓶,每瓶接 2 个外植体。接种后在 25℃左右的培养室闭光培养,诱导愈伤产生。1 个月后的统计的结果(表 2)表明,4 个培养基中以 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 4.0 mg/L(单位下同)对金娃娃诱导愈伤率最高。

而江苏沭阳萱草情况略有不同,MS+NAA 0.4+6-BA 4.0 培养基诱导的愈伤组织最多,且生长最为旺盛。因此确定金娃娃和江苏沭阳萱草采用各自的最适培养基进行继代。待生长稳定后接种到含盐培养基中进行抗盐筛选。

| 表 2 各浓度梯度诱导愈伤形成情况 | | |
|-------------------|------|---------|
| 品种 | 处理编号 | 诱导愈伤率/% |
| 金娃娃 | 1 | 25 |
| | 2 | 42.8 |
| | 3 | 15.4 |
| | 4 | 0 |
| 沭阳萱草 | 1 | 50.0 |
| | 2 | 20.0 |
| | 3 | 21.4 |
| | 4 | 12.5 |

2.2 抗盐植株的筛选

2.2.1 不同盐浓度胁迫对组培苗生长的影响 NaCl 胁迫下对组培苗的影响主要是愈伤组织生长量和叶片生长量,表现在愈伤生长受遏制,叶片生长量随盐浓度的增加而递减,叶片的长度受到遏制,这一趋势同对照组比较尤为明显。但这一现象会因继代次数的增加而减弱(见表 3)。随着培养基中盐浓度的增加,生物量明显降低。但通过多次的继代培养发现,通过一定时间的盐胁迫之后,组培苗的生物量明显比第 1 次接种的要多,而且接种次数愈多,其生物量就越向对照趋近。对多次的继代培养后生长稳定的组培苗进行生根培养基的继代培养。待组培苗根生长到 1~2 cm,叶片长至 3~4 cm 后即可移栽。

2.2.2 移栽和驯化 将试管苗培养瓶放在自然光照下练苗 3~5 d 后,打开瓶盖再练苗 3~5 d,轻轻取出试管苗,洗净培养基后,移栽到 0.1% KMnO₄ 溶液消毒过的细河沙中,保持一定的温度和湿度,驯化移栽后得到了抗盐性较高的组培苗。

| 表 3 不同盐浓度胁迫下对组培苗生长的影响 | | | | |
|-----------------------|------|--------|--------|-----------------|
| 品种 | 处理编号 | 盐浓度 /% | 成活率 /% | 叶片生长量(长×宽) / cm |
| 金娃娃 | 1 | 0.00 | 57.14 | 3.00×0.50 |
| | 2 | 0.25 | 57.14 | 1.20×0.40 |
| | 3 | 0.50 | 75.0 | 0.40×0.20 |
| | 4 | 0.75 | 33.33 | 0.30×0.20 |
| 沭阳萱草 | 1 | 0.00 | 100 | 3.50×0.20 |
| | 2 | 0.25 | 100 | 2.00×0.20 |
| | 3 | 0.50 | 100 | 0.30×0.17 |
| | 4 | 0.75 | 100 | 0 |

2.2.3 不同盐浓度胁迫下组培苗的脯氨酸含量的测定 在不同的 NaCl 浓度下,分别对在盐浓度 0.25%、0.50% 和 0.75%及对照中生长了 30 d 的组培苗进行了脯氨酸的含量的测定(见表 4)。表明脯氨酸的含量随盐浓度的增加而升高,在盐胁迫下植物为了防止细胞脱水而通过产生脯氨酸等渗透物质,来降低细胞渗透势和水势。从而提高了其抗盐能力,在一定程度下和逆境程度(盐浓度)表现正相关关系。江苏沭阳萱草的脯氨酸含量都比金娃娃高出几倍,这在先前的抗盐筛选中就表现出来其较高的抗性,虽然在浓度为 0.75%时江苏沭阳萱草的生长量很少甚至根本没有生长量,但其组培苗并没有出现死亡的现象。盐浓度越高其脯氨酸含量也越高

说明了脯氨酸能反应出盐胁迫过程中的生理变化。脯氨酸的测定可以对植物的抗盐性筛选提供指标的参考。根据组培苗在抗性培养基中的生长表现和统计指标,金娃娃在 0.5%~0.75% NaCl 浓度的培养基进行筛选较适宜,而范围江苏沭阳萱草在 0.75% NaCl 浓度的培养基进行筛选较适宜。

表 4 不同 NaCl 浓度下脯氨酸含量

| 品种 | NaCl 浓度 /% | 吸光 光度值 | 脯氨酸浓度 /μg·L ⁻¹ | 脯氨酸含量 /μg·g ⁻¹ |
|------|---------------|-----------|------------------------------|------------------------------|
| 金娃娃 | 0.00 | 0.045 | 0.803 | 8.03 |
| | 0.25 | 0.092 | 1.514 | 15.14 |
| | 0.50 | 0.187 | 2.952 | 29.52 |
| | 0.75 | 0.312 | 4.843 | 48.43 |
| 沭阳萱草 | 0.00 | 0.624 | 10.657 | 106.57 |
| | 0.25 | 0.832 | 12.710 | 127.10 |
| | 0.50 | 0.889 | 13.572 | 135.72 |
| | 0.75 | 1.147 | 17.475 | 174.75 |

3 讨论

试验表明大花萱草 2 个品种“金娃娃”和江苏沭阳萱草最适的诱导继代培养基是 MS+NAA 0.4+6-BA 4.0,生根培养基是 1/2MS+NAA 0.2。诱导继代培养基中加入不同浓度的 NaCl 进行抗盐筛选。但试验证明大花萱草无性系各继代苗生长指标与盐浓度具相关性。在一定试验浓度下,大花萱草组培苗随继代次数的增多抗盐能力有增大的趋势。王汉海等认为大花萱草无性系继代苗的生长量与盐浓度呈负相关^[9]。该试验结果与之表现一致。

植物中脯氨酸的含量是植物抗逆性的一项生理指标^[4]。据研究表明,关于脯氨酸在植物抗盐性中的作用机制,可以认为是由于它的高水溶性产生的渗透效应而使植物细胞能经受土壤中高盐分产生的渗透压。研究结果表明,脯氨酸的含量随盐浓度的增加而升高,在一定程度上和逆境程度(盐浓度)正相关关系。江苏沭阳

萱草的脯氨酸含量都比金娃娃高出几倍,这在先前的抗盐筛选中就表现出来其较高的抗性,虽然在浓度为 0.75%时江苏沭阳萱草的生长量很少甚至根本没有生长量,盐浓度越高其脯氨酸含量也越高,说明了脯氨酸的变化表现出盐胁迫过程中的生理变化。

近年来,利用植物组织培养技术,成功地获得了许多植物的抗盐培养细胞系,并且选择出了水稻、小麦和冰草等植物的耐盐植株^[4]。该试验对大花萱草抗盐愈伤组织的选择试验表明,利用浓度逐级增高的含盐培养基诱导和选择的愈伤组织,在盐份浓度较高的培养基上,无论生长率还是存活率均明显提高。抗盐性大小与在含盐培养基上培养的时间长短有关。愈伤组织的这种抗盐性具一定程度的稳定性。抗盐变异产生的原因可能有两个方面,一是在低水平选择压力下,可能产生了生理适应的细胞;二是在高水平选择压力下经长时间选择培养,可能产生遗传上变异的细胞。这种遗传上发生的变异一般是稳定的,该试验通过大花萱草组培苗的抗性培养基上抗性比较,证明了盐胁迫与繁殖系数、生物产量有一定的相关性,并确定的适合的盐筛选浓度,并确定脯氨酸能反应出组培苗在盐胁迫过程中的生理变化。

参考文献

[1] 王长泉,宋恒,杜鹃抗盐突变体的筛选[J].核农学报,2003 17(3):179-183.
[2] 徐乃瑜.培养抗性植物的细胞/组织培养途径[J].武汉植物研究,1987,5(3):34-36.
[3] 周荣仁,杨燮荣,余叔文.利用组织培养选择烟草耐盐愈伤组织变异体并分化再生植株[J].实验生物学报,1986,19(3):79-81.
[4] 沈银柱,刘植义.诱发小麦成熟胚愈伤组织及其再生植株抗盐性变异的研究[J].遗传学报,1993 20(3):253-261.
[5] 张宪政.作物生理研究法[M].北京:农业出版社,1992:136-156.
[6] 王汉海,程贵召.大花萱草新品种“金娃娃”的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,38(5):458.

The Primary Study on Selection High Salt Resistane *Hemerocallis middendorffii* by Tissue Culture Methods

ZHANG Wei-li¹, LIU Feng-min², XU Xu-dan²

(1.College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 5102251, China; 2.Practice Teaching Fam, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 5102251, China)

Abstract: The calli were induced by shoot tip of *Hemerocallis middendorffii*. The results showed that rate of inducing calli of *Hemerocallis middendorffii* were high by using medium of MS+NAA 0.4 mg/ L+6-BA 4.0 mg/ L. The growth of tissue culture plant were abserved and proline of tissue culture plantwere determined on the medium added different concentration *Sodium chloride*. With concentration of *Sodium chloride* increasing. The experimnet showed that the growth rate of tissue culture plant declined, growth of leave were inhibited and the content of proline were increasing . The content of proline of Jiangsu Shuyang was higher that of *Hemerocallis fulva* var. flore-pleno at same concentration of *Sodium chloride*.

Key words: *Hemerocallis middendorffii*; Tissue culture; Salt resistance; Proline