

卫星搭载苜蓿叶片愈伤组织对盐碱胁迫的响应

李 红¹, 李 波², 王 焱², 王 晨², 杨伟光¹, 杨 墨¹

(1. 黑龙江省畜牧研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161000; 2. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:以卫星搭载的苜蓿叶片为外植体, 诱导产生愈伤组织, 研究盐碱胁迫下苜蓿愈伤组织对盐和碱的半致死浓度和致死浓度, 及其生理指标的变化。结果表明: 苜蓿愈伤组织对 NaCl 的半致死浓度为 1.2%, 致死浓度为 1.8%。对 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 的半致死浓度为 0.4 mmol/L, 致死浓度为 1.0 mmol/L。卫星搭载提高了苜蓿愈伤组织 POD 活性、可溶性糖含量和脯氨酸含量, 降低了丙二醛含量和相对电导率, 差异显著。卫星搭载可以提高苜蓿愈伤组织对盐碱的抵抗能力, 且对碱抵抗能力强于对盐的抵抗能力。

关键词:苜蓿; 愈伤组织; 卫星搭载; 盐碱胁迫; 生理生化指标

中图分类号:S 551⁺.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0100-03

土壤盐渍化是一个全球性问题, 我国约有盐碱地 0.27 亿 hm^2 , 而且由于各种原因导致的土壤次生盐渍化仍在继续。保护和利用现有的草业资源, 提高草地生产力, 探索改良盐碱化草地的技术和途径已成为必然趋势, 如何利用大面积盐碱地已经成为全人类迫切需要解决的问题^[1]。在治理、改良盐渍化土地的各项技术措施中, 生物措施因其投资少、见效快、效益高等优点越来越受到关注。其目的是筛选适应高盐环境的优良抗盐植物来开发和利用盐渍化土地。利用卫星搭载技术, 通过在高盐碱浓度培养基上的培养, 筛选苜蓿耐盐突变体。以期获得新的耐盐碱、高品质苜蓿品种打下坚实的基础, 进而通过种植苜蓿改良已经盐碱化和正在盐碱化的土地。

1 材料与方法

1.1 试验材料

卫星搭载和未搭载的“龙牧 801”苜蓿种子均由黑龙江省畜牧研究所提供。种植于齐齐哈尔大学生物园, 以苜蓿叶片为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代培养 取卫星搭载和未搭载的苜蓿叶片, 流水冲洗 2 h, 经 0.1% 升汞消毒 10 min

后, 用无菌水冲洗 4~5 次。将处理后的叶切成大小为 1 cm^2 左右小块, 接种到 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+30% 蔗糖的琼脂培养基中, 于 25℃ 条件下培养, 光照时间 12 h/d^[2-3]。选取培养 20 d 左右的愈伤组织, 切取其中白色、新鲜、松嫩的部分切成 0.5 cm^3 大小的块, 然后转入继代培养基中(培养基同上), 愈伤组织需要继代 2 次。

1.2.2 愈伤组织盐碱胁迫 将愈伤组织割成 1.0 cm^3 左右的小块, 接种到含有 NaCl 浓度为 0.0%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8% 共 6 个梯度的胁迫固体培养基中培养 20 d 左右, 筛选抗盐愈伤组织, 确定盐半致死浓度和致死浓度。将愈伤组织割成 1.0 cm^3 左右的小块, 接种到含 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 共 6 个梯度的胁迫固体培养基中培养 20 d 左右, 筛选抗碱愈伤组织, 确定半致死浓度和致死浓度。

1.2.3 盐碱胁迫后愈伤组织的继代培养 将上述对照愈伤组织和卫星搭载愈伤组织切成 1.0 cm^3 大小, 分别接种到盐半致死浓度和碱半致死浓度的固体培养基中, 培养 10 d 左右, 选出有一定抗盐碱性的愈伤组织。

1.2.4 生理生化指标的测定 过氧化物酶活性测定采用愈创木酚法, 丙二醛(MDA)和可溶性糖的含量采取硫代巴比妥酸法, 游离脯氨酸含量采用茚三酮法进行测定^[4], 相对电导率的测定采用张志良^[5]方法。各指标重复 3 次, 取平均值。

1.3 数据分析

利用统计分析软件 SPSS 19.0 对测定的生理生化指标进行数据统计分析。

第一作者简介:李红(1960-), 女, 山东莱芜人, 研究员, 现主要从事牧草与饲料作物育种与栽培研究工作。E-mail: hljlhong@163.com。
基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2011BAD17B01-04); 国家公益性行业科研专项资助项目(201303066); 黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12521610)。

收稿日期:2012-11-06

2 结果与分析

2.1 不同浓度的盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织生长的影响

从表 1 可以看出,卫星搭载苜蓿和对照苜蓿的愈伤组织在不同盐碱浓度的 MS 培养基上的生长状况不同。对照组和卫星搭载组均具有一定的抗盐碱性,且卫星搭

表 1 NaCl、NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 胁迫下苜蓿愈伤组织的存活率

愈伤组织来源	NaCl 浓度/%						NaHCO ₃ 和 Na ₂ CO ₃ 浓度/mmole L ⁻¹					
	0.0	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
对照苜蓿	100	83.3	68.8	52.1	25.0	0	100	81.2	54.2	31.3	14.6	0
卫星搭载苜蓿	100	87.5	75.0	60.4	35.4	0	100	89.6	60.4	41.7	18.8	0

2.2 盐碱胁迫对苜蓿叶片愈伤组织生理生化的影响

2.2.1 盐碱胁迫对过氧化物酶活性的影响 过氧化物酶(POD)是存在于植物细胞中一种清除自由基的酶类,它可以减轻膜脂过氧化程度,保持膜系统的稳定性,使生物自由基维持在一个比较低的水平上,从而防止自由基毒害,保护酶系统。由图 1 可知,盐碱胁迫下卫星搭载组高于对照组 20.33 $\Delta_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,碱胁迫下卫星搭载组高于对照组 22.35 $\Delta_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,分析表明,盐碱胁迫下卫星搭载的苜蓿愈伤组织中的过氧化物酶(POD)活性与对照相比差异都达到了极显著的水平($P < 0.01$)。可见,在受到盐碱胁迫的条件下,卫星搭载的酶保护系统比对照组酶保护系统受到的损害要小,提高了酶保护系统稳定。卫星搭载组比对照组更具有对盐碱环境的抵抗力。

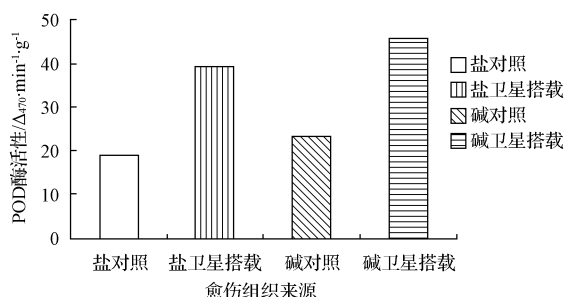


图 1 盐碱胁迫下愈伤组织过氧化物酶活性的变化

2.2.2 盐碱胁迫对可溶性糖含量的影响 可溶性糖是很多非盐生植物的主要渗透调节剂,是植物遭受逆境时主要的渗透调节物质,它对细胞膜和原生质胶体有稳定作用,而且它还作为合成有机物质的碳架和能量来源,对细胞膜和原生质胶体也有稳定作用,在细胞内无机离子浓度过高时起保护酶类的作用,在盐碱胁迫下可溶性糖的大量积累对植物健康生长有重要意义。由图 2 可知,盐碱胁迫下卫星搭载组高于对照组 3.63 mmol/L,碱胁迫下卫星搭载组高于对照组 5.11 mmol/L。方差分析表明,盐碱胁迫下卫星搭载的苜蓿愈伤组织中的可溶性糖含量与对照相比差异都达到了极显著水平($P < 0.01$)。可见,卫星搭载苜蓿愈伤组织的渗透调节能力和抵御伤害能力强于对照苜蓿愈伤组织,在盐碱的环境下更适合生长发育。

载组抗盐碱性高于对照组。盐碱的半致死浓度分别为 1.2% 和 0.4 mmol/L,致死浓度分别为 1.8% 和 1.0 mmol/L。在盐碱半致死浓度下存活率对照组分别为 52.1% 和 54.2%,卫星搭载组均为 60.4%,卫星搭载组在盐碱胁迫下生长能力高于对照组。

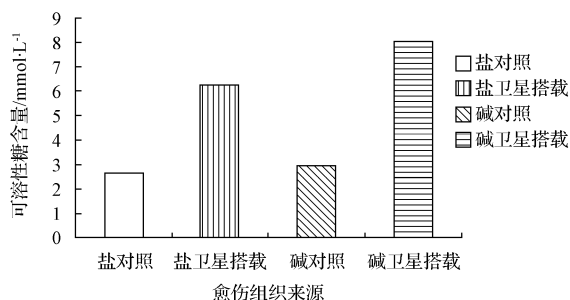


图 2 盐碱胁迫下愈伤组织可溶性糖含量的变化

2.2.3 盐碱胁迫下丙二醛含量的变化 丙二醛(MDA)是植物细胞膜脂质过氧化反应的重要产物。植物器官衰老或在逆境下遭受伤害,往往发生膜脂过氧化作用。其含量可以反映植物遭受伤害的程度,MDA 积累越多,活性氧、自由基等含量越高,表明细胞膜脂过氧化程度越高,质膜被损害程度越严重,进而将 MDA 作为脂质过氧化损伤的指标鉴定植物抗逆性。相同水分胁迫条件下,MDA 含量低或者相对于对照增加幅度小的植物被认为是抗盐碱性强的植物。由图 3 可知,盐胁迫下卫星搭载组低于对照组 1.47 $\mu\text{mol/g}$,碱胁迫下卫星搭载组低于对照组 2.03 $\mu\text{mol/g}$ 。方差分析表明,盐碱胁迫下卫星搭载的苜蓿愈伤组织中的丙二醛含量与对照相比差异都达到了显著的水平($P < 0.05$)。可见,卫星搭载组与对照组相比膜脂过氧化作用缓慢,使细胞遭受迫害程度较低,具有较强的抗盐碱性。

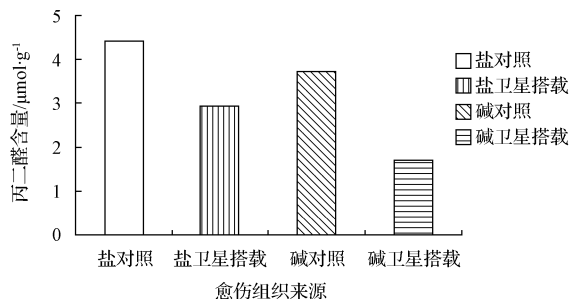


图 3 盐碱胁迫下愈伤组织丙二醛含量的变化

2.2.4 盐碱胁迫下脯氨酸含量的变化 盐碱胁迫不仅会改变植株的形态性状,还会使脯氨酸的含量等一些生理生化性状发生改变,在受到逆境条件刺激时,植物体内会积累大量的脯氨酸。愈伤组织受到盐碱胁迫后体

内蛋白质分解会变快,脯氨酸累积量增多。由图 4 可知,盐胁迫下卫星搭载组高于对照组 2.13 mg/g,碱胁迫下卫星搭载组高于对照组 2.27 mg/g。方差分析表明,盐碱胁迫下卫星搭载的苜蓿愈伤组织中的脯氨酸含量与对照相比差异都达到了极显著的水平($P<0.01$)。可见,卫星搭载组和对对照组相比,其抗盐碱性更强。

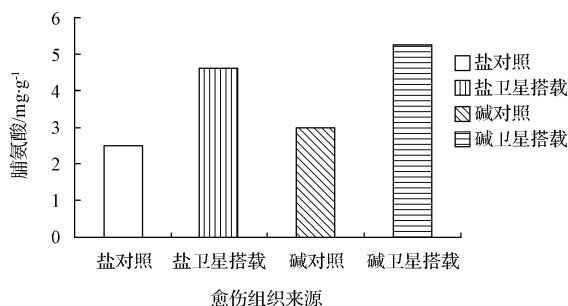


图 4 盐碱胁迫下愈伤组织脯氨酸含量的变化

2.2.5 盐碱胁迫下相对电导率的变化 相对电导率是衡量细胞膜通透性的重要指标,细胞膜透性的大小可间接的用组织的相对电导率来衡量,其值越大,表示电解质的渗漏量越多,细胞膜受伤害程度越重,细胞膜完整性遭到破坏的程度就越大。由图 5 可知,盐胁迫下卫星搭载组低于对照组 6.3%,碱胁迫下卫星搭载组低于对照组 7.6%。方差分析表明,盐碱胁迫下卫星搭载的苜蓿

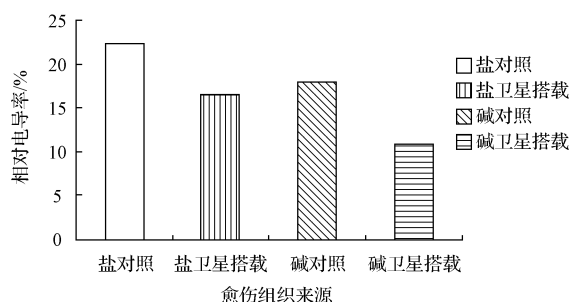


图 5 盐碱胁迫下愈伤组织相对电导率的变化

愈伤组织中的相对电导率与对照相比差异都达到了极显著的水平($P<0.01$)。可见,卫星搭载组与对照组相比有较强的抗盐碱性。

2.3 苜蓿愈伤组织对盐碱抗性的比较

由表 2 可知,过氧化物酶活性碱胁迫比盐胁迫多 $6.22 \Delta_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,可溶性糖含量碱胁迫比盐胁迫多 1.80 mmol/L,脯氨酸含量碱胁迫比盐胁迫多 0.63 mg/g,丙二醛含量碱胁迫比盐胁迫少 $1.23 \mu\text{mol/g}$,相对电导率碱胁迫比盐胁迫少 5.6%。综上所述,卫星搭载苜蓿愈伤组织的抗碱性强于抗盐性,更适合在碱含量高的地区生长。

表 2 卫星搭载愈伤组织对盐碱抗性的比较

	POD 活性 / $\Delta_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	可溶性糖含量 /mmol · L ⁻¹	丙二醛含量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	脯氨酸含量 /mg · g ⁻¹	相对电导 率/%
盐	39.27	6.26	2.93	4.62	16.0
碱	45.49	8.06	1.70	5.25	10.4

3 结论

苜蓿愈伤组织对 NaCl 的半致死浓度为 1.2%,对 NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 的半致死浓度为 0.4 mmol/L。对卫星搭载苜蓿愈伤组织进行盐碱胁迫,搭载的苜蓿愈伤组织显著提高了过氧化物酶活性、可溶性糖含量和脯氨酸含量;而丙二醛含量和相对电导率显著降低。可见,卫星搭载提高了苜蓿愈伤组织对盐碱的抵抗能力。

参考文献

- [1] 杨宝灵,姜健,封德全. 紫花苜蓿耐盐突变体筛选[J]. 大连民族学院学报,2006(3):40-43.
- [2] 李红,李波,赵洪波. 诱变处理苜蓿愈伤组织抗碱性的研究[J]. 草业科学,2009,26(7):32-35.
- [3] 黄远新,谭娟,黄玉兰,等. 紫花苜蓿离体叶片愈伤组织诱导的研究[J]. 草业与畜牧,2008,6(2):1-3.
- [4] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [5] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,1990:90-95.

Alfalfa Leaf Callus on Space Flight Induction and Response on Saline-alkali Stress

LI Hong¹, LI Bo², WANG Ye², WANG Chen², YANG Wei-guang¹, YANG Zhao¹

(1. Farming Research Institute of Heilongjiang, Qiqihar, Heilongjiang 161000; 2. School of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Taking alfalfa leaves on space flight as materials, the callus was induced. The half lethal concentration and lethal concentration of alfalfa callus under different concentrations of saline and alkali stress were studied, and 5 physiological and biochemical indexes under different saline-alkali stress were studied. The results showed that the half lethal and lethal concentration of alfalfa callus under NaCl stress were 1.2% and 1.8 mmol/L. The half lethal and lethal concentration of alfalfa callus under NaHCO₃ and Na₂CO₃ stress were 0.4% and 1.0 mmol/L. The Alfalfa callus on space flight improved POD activity, soluble sugar and proline content, decreased the MDA content and relative conductivity, and the difference was significant. Space flight could improve saline alkali resistance of alfalfa callus, and alkali resistance was higher than that of salt resistance.

Key words: alfalfa; callus; space flight; saline-alkali stress; physiological and biochemical indexes