

## 源于小孢子培养的大麦耐盐变异体获取

陆瑞菊<sup>1,2</sup>, 徐红卫<sup>1,2,\*</sup>, 陈志伟<sup>1,2</sup>, 何婷<sup>1,2</sup>, 杜志钊<sup>1,2</sup>, 高润红<sup>1,2</sup>, 王亦菲<sup>1,2</sup>, 邹磊<sup>1,2</sup>, 郭桂梅<sup>3</sup>, 卜姝明<sup>3</sup>, 刘成洪<sup>1,2,\*\*</sup>, 黄剑华<sup>1,2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106; <sup>2</sup>上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106; <sup>3</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306

**摘要:** 以大麦品种‘花30’作为供试材料, 比较了甲基磺酸乙酯(EMS)和平阳霉素处理小孢子, <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -射线辐照处理离体穗和干种子, 对300 mg·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫培养下游离小孢子的愈伤组织产量和愈伤组织在0.3% NaCl胁迫筛选下的绿苗产量的影响。结果表明, EMS处理离体小孢子和<sup>60</sup>Co  $\gamma$ -射线辐照干种子的愈伤组织产量和绿苗产量明显优于平阳霉素处理小孢子和<sup>60</sup>Co  $\gamma$ -射线辐照离体穗。以16份源于种子辐照处理的再生植株自交一代种子为供试材料, 比较了在0.3% NaCl胁迫下种子的发芽率和幼苗的成活率以及植株的分蘖数、株高和单株产量。结果表明, ‘花30’发芽率为0, 供试的16份耐盐变异体中, 有14份材料在NaCl胁迫下的发芽率优于‘花30’, 鉴定出4份耐盐性明显优于‘花30’的变异体材料。选择耐盐变异体作为供试材料, 测定了变异体中Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因*NHX1*、*NHX2*和*NHX3*和编码甜菜碱醛脱氢酶(BADH)的两个同工酶基因*BBD1*和*BBD2*的表达模式和表达量, 结果表明变异体耐盐性的提高与这些基因的表达量存在联系。

**关键词:** 大麦; 小孢子离体诱变和胁迫培养; 耐盐变异体; 单株产量; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白; 甜菜碱醛脱氢酶

## Screening of Variants Derived from Barley (*Hordeum vulgare* L.) Microspore Culture for Salt Tolerance

LU Rui-Ju<sup>1,2</sup>, XU Hong-Wei<sup>1,2,\*</sup>, CHEN Zhi-Wei<sup>1,2</sup>, HE Ting<sup>1,2</sup>, DU Zhi-Zhao<sup>1,2</sup>, GAO Run-Hong<sup>1,2</sup>, WANG Yi-Fei<sup>1,2</sup>, ZOU Lei<sup>1,2</sup>, GUO Gui-Mei<sup>3</sup>, BU Shu-Ming<sup>3</sup>, LIU Cheng-Hong<sup>1,2,\*\*</sup>, HUANG Jian-Hua<sup>1,2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; <sup>2</sup>Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China; <sup>3</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Using barley (*Hordeum vulgare*) variety ‘Hua 30’ as donor material, effects on callus yield under 300 mg·L<sup>-1</sup> NaCl stress and the green plantlet differentiated rate under 0.3% NaCl stress from the microspores treated with ethyl methane sulfonate (EMS) and bleomycin or the microspores from irradiated spikes and dry seeds were investigated. The results showed that callus yield and green plantlet from microspores with EMS treatment and microspore derived from irradiated dry seeds were obviously superior to the microspores treated by bleomycin and microspore derived from irradiated spikes. A series of indexes such as seed germination rate, seedling survival rate, plant tiller number, plant height and yield per plant were compared on seeds from 16 regenerated plants by seed irradiation under 0.3% NaCl stress. The germination rate of ‘Hua 30’ is 0, while that of 14 of the 16 salt tolerance mutants has an advantage over ‘Hua 30’, moreover, 4 materials were obviously better than ‘Hua 30’. Based on these salt tolerant mutants, the expression patterns and quantity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes (*NHX1*, *NHX2* and *NHX3*), and *BBD1* and *BBD2* encoding two betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) isozymes were measured. As a result, the improvement in salt tolerance of variants had corresponding relation with these genes.

**Key words:** barley; microspore *in vitro* mutation and stress culture; salt-tolerant variant; yield per plant; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter; betaine aldehyde dehydrogenase

人工诱发突变是获取变异体的有效途径之一, 是创造耐盐新种质和选育新品种的有效途径(李鹏等2008; Novak和Brunner 1992)。将植物组织培养技术应用于耐盐突变体筛选的优越性早已被论证并实现(Jain 2001), 尤其是随着花药培养技术的发

收稿 2012-09-24 修订 2012-11-05  
资助 大麦现代产业技术体系项目(CARS-05)和上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2009)第2-1号, 农青年科技2012(15)]。  
\* 并列第一作者。  
\*\* 通讯作者(E-mail: dainney@163.com; Tel: 021-62202965; E-mail: sw1@saas.sh.cn; Tel: 021-62201032)。

展,利用诱变与花药培养技术相结合的方法筛选出一大批耐盐变异体(陆瑞菊等2006;孙月芳等2006;王亦菲等2002)。小孢子群体是真正意义上的单倍体、单细胞群体,因而利用小孢子突变途径比传统突变途径(种子突变)具有明显的优势,不仅可以提高变异机率,实施早期筛选后增加了获得有益变异体的机率(顾宏辉等2003;黄剑华2003,2007),更可以快速获得目标性状纯合的再生植株,从而缩短育种年限。将诱变与小孢子培养这两种技术结合起来还可以避免嵌合体的发生,使隐性性状得以较早表现,加速纯合过程,从而大大提高变异频率和筛选效率(Das等2000)。由于受到小孢子培养技术的限制,大部分的研究集中在播种前用 $\gamma$ -射线处理种子,取花药进行培养获得变异体(Khan等2001;宣朴等2000);或以10~50 Gy的 $\gamma$ -射线辐照离体穗或花药,通过花药培养后获得再生植株(Chen等2001;孙月芳等2005)。以游离小孢子作为诱变对象的研究仅仅在油菜上有报道(谢艳平2008;石淑稳等2007;Barro等2002;和江明等2003)。大麦的小孢子培养技术较为成熟,且已证实供试品种的耐盐性在小孢子水平与植株水平上是一致的(陆瑞菊等2011),理论上利用这种一致性可以在短短的2年甚至1年时间内迅速获得纯合的、耐盐性状得到改良的变异体,这将大大加快大麦耐盐性改良的进程,培育出耐盐新品种。但目前还未见到利用大麦小孢子培养技术结合诱变技术,在游离后小孢子培养过程中进行离体诱变、NaCl胁迫培养及筛选耐盐变异体的报道。

大麦的耐盐性是一个多基因控制的数量性状,涉及多种耐盐基因和多种耐盐机理的协调作用。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白能够将土壤中过多的 $\text{Na}^+$ 运入液泡膜,对植物抵御盐分的胁迫起着重要作用。在棉花上有研究表明 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白基因在耐盐品系的表达量远远高于盐敏感的品系(Wu等2004)。甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)基因是参与甜菜碱合成的关键基因,在盐胁迫下,甜菜碱的积累可以使许多重要的酶类保持活性(袁金娥等2011)。因而植株体内 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白基因和甜菜碱醛脱氢酶基因的表达量可以作为植株耐盐性鉴定的指标。

大麦品种‘花30’是上海市农业科学院生物所

培育成的适合江浙沪地区种植的新品种,但它的耐盐性欠佳(陆瑞菊等2011)。本研究以‘花30’为供试材料,采用种子处理( $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线辐照干种子)、离体穗处理(低温预处理结束后用 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线辐照离体穗)和小孢子处理[小孢子游离后用甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)和平阳霉素浸泡],比较不同诱变时期和不同诱变剂处理后,小孢子在NaCl胁迫下诱导和分化的结果,并对获得的部分变异体材料进行初步的植株水平耐盐性鉴定和分子生物学分析,在短时间内获得了耐盐性高于原始品种‘花30’的变异体。

## 材料与方法

### 1 试验材料

供试材料为大田种植的大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种‘花30’,以及来自‘花30’的变异体。大田材料均种植于上海市农业科学院青浦试验场内。‘花30’干种子诱变于2010年11月进行,2011年4月取麦穗进行小孢子培养;离体穗和小孢子诱变于2011年4~5月进行,诱变结束后进行小孢子培养。获得的再生植株于2011年7月底移至昆明进行加代种植,按株系收获。耐盐性试验于2011~2012年大麦生长季节在上海市农业科学院塑料大棚内进行,以防止雨水淋溶,2012年5月收获后考种。

### 2 试验方法

#### 2.1 耐盐变异体获取

**2.1.1 小孢子的游离、离体诱变及培养** 从大田选取中部小花小孢子发育处于单核早期、中期的穗子,放入冰箱(5℃)冷藏15 d。接种时,穗子用饱和的漂白粉溶液消毒15 min,无菌水冲洗3~4次。每个试管接10个穗子,倒入15 mL提取液,用高速分散器超速旋切,用150目筛网过滤,滤液以100×g低速离心5 min,重复3次,收集小孢子。小孢子用添加了诱变剂的预处理液于25℃下黑暗预处理48 h。培养前将小孢子先用21%麦芽糖纯化,再用培养基洗涤1次,然后用培养基将小孢子密度调节至 $1.0 \times 10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>,取1 mL小孢子悬浮液接种于培养皿(35 mm×15 mm),Parafilm封口,25℃暗培养。

**2.1.2 小孢子提取液、预处理液及培养基** 以添加 $1.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ 和 $0.976 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  N-吗啡乙烷磺酸(MES)的6%甘露醇溶液作为提取液,提取液中添加不同

浓度的EMS或平阳霉素作为预处理液。小孢子诱导培养基中NaCl胁迫浓度参照陆瑞菊等(2011), 分化培养基中NaCl筛选浓度参照孙月芳等(2006)。诱导培养基以改良的N<sub>6</sub>培养基为基本培养基, 附加KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>、麦芽糖90 g·L<sup>-1</sup>和NaCl 300 mg·L<sup>-1</sup>。分化培养基以MS为基本培养基, 附加6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、KT 1.5 mg·L<sup>-1</sup>、NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>、麦芽糖 30 g·L<sup>-1</sup>和NaCl 3 g·L<sup>-1</sup>, 用6 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固化。提取液、预处理液及诱导培养基均过滤灭菌, 分化培养基用0.11 MPa、121 °C高温高压灭菌15 min。

**2.1.3 诱变处理** 小孢子处理时, 以剂量分别为1、3和5 mg·L<sup>-1</sup>的EMS和平阳霉素作为诱变剂, 小孢子提取后用含有诱变剂的提取液, 25 °C下黑暗处理48 h。处理结束后, 收集小孢子进行胁迫培养。穗子处理时, 在低温预处理结束后用<sup>60</sup>Co γ-射线辐照, 剂量率1 Gy·min<sup>-1</sup>, 剂量为5、10和15 Gy, 辐照结束后, 游离小孢子进行胁迫培养。种子处理时, 将播种前的干种子用<sup>60</sup>Co γ-射线辐照, 剂量率1 Gy·min<sup>-1</sup>, 剂量为400和500 Gy。取材后, 游离小孢子进行胁迫培养。

## 2.2 耐盐变异体的温室鉴定

挑选大小均匀、籽粒饱满的种子播种于直径为30 cm的塑料盆钵中, 每盆播种6粒, 出苗后每盆定苗3株。每盆装土12.0 kg, 土壤中含有有机质34.5 g·kg<sup>-1</sup>、全氮2.42 g·kg<sup>-1</sup>、速效氮37.35 mg·kg<sup>-1</sup>, 每盆施30 g基肥。设对照和NaCl胁迫两个处理, 胁迫处理按每盆60.0 g加入NaCl (每100 g土含0.5 g NaCl)。于萌发期统计萌发率, 分蘖期统计分蘖数, 成熟时测定植株的株高和单株产量。

## 2.3 耐盐变异体的分子生物学鉴定

**2.3.1 材料处理** 种子用1% NaClO消毒30 min, 流水冲洗, 25 °C浸泡12 h后催芽, 露白后置于铺有双层滤纸的培养皿中生长, 待苗高5 cm左右, 挑选整齐一致的幼苗, 用海绵条固定在打孔的泡沫板上, 放入盛有蒸馏水的周转箱中, 培养温度为25 °C(白天)/22 °C(黑夜), 每天光照12 h, 7 d后浇灌营养液。营养液成分为1/2Hoagland营养液, 铁盐加倍, pH 6.0。培养10 d后进行盐胁迫处理, NaCl的浓度为300 mmol·L<sup>-1</sup>, 分别在胁迫0、12、24和48 h时取植株的地上部分, 液氮速冻后, 于-80 °C保存备用。

**2.3.2 荧光定量PCR分析** 采用Trizol Reagent (Invitrogen)提取总RNA, 按Trizol试剂盒说明书进行操作, 用ND-1000分光光度计(NanoDrop)检测RNA浓度和质量; 采用Invitrogen的qRT-PCR试剂盒合成cDNA, 按试剂盒说明书进行操作。根据GenBank中大麦Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因(3个)和甜菜碱醛脱氢酶基因(2个)序列, 运用Oligo6软件分别设计大麦NHX1 (AB089197.1)、NHX2 (AY247791.2)、NHX3 (DQ372061.1)、BBD1 (AB063179.1)、BBD2 (AB063178.1)以及Actin (AY145451.1)引物, 引物序列如表1所示, 由上海英骏生物技术有限公司合成。采用StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystem)进行荧光定量PCR, 反应试剂使用THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)。荧光定量PCR反应体系(20 μL)包括2×Mix 10 μL、引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各0.8 μL、样品cDNA (约50 ng·μL<sup>-1</sup>) 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL。荧光定量PCR反应程序为: 95 °C预变性10 min; 95 °C 15 s, 55或60 °C 30 s, 72 °C 10 s, 40个循环。

表1 荧光定量PCR中所用引物序列

Table 1 The primer sequences used in real-time PCR

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
NHX1	CCGCTTTCATTCTTATCCA	ATTACGATTTGCTGCCTCCA
NHX2	ATACTGCCGTGCGAGTTA	AGTCAGCAAGCCGAAAACCA
NHX3	ATGGTCTTCAGCGAGGAT	TCTTCACTTGAACCCTGC
BBD1	GGATAAACTGCTCGCAACCG	CGAAACCACTCCGCTTGT
BBD2	GTCGGTCTTCCATCAGGT	GACAAAGGAGCACCAGCTTC
Actin	AGCCACACTGTGCCAATTAT	CAGCGAGATCCAAACGAAGAA

## 2.4 数据处理

愈伤组织产量为25 °C下暗培养21 d时称取的

每皿愈伤组织重量; 绿苗产量为100 mg愈伤组织分化的绿苗株数。采用Microsoft Office Excel 2003



软件对数据进行统计分析。

## 实验结果

### 1 诱变剂及诱变方法对大麦小孢子培养和植株再生的影响

经过EMS处理后的小孢子在NaCl胁迫培养下

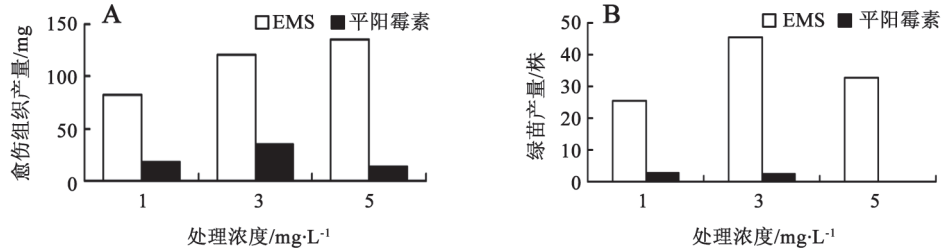


图1 EMS和平阳霉素处理后小孢子在NaCl胁迫下的愈伤组织产量和绿苗产量

Fig.1 Callus yield and green plantlet production under NaCl stress from the microspores treated with EMS and bleomycin

以<sup>60</sup>Co γ-射线辐照处理离体穗后分离小孢子,小孢子在NaCl胁迫下的愈伤组织产量较低,且随辐照剂量的增加而下降;愈伤组织在含NaCl的分化培养

基中的绿苗产量更低,只在5 Gy辐照剂量下获得绿苗。‘花30’干种子经过<sup>60</sup>Co γ-射线辐照处理后,小孢子在NaCl胁迫下愈伤组织产量和绿苗产量都较高(图2)。

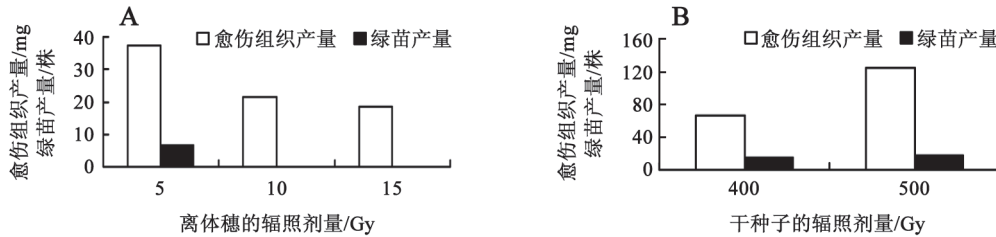


图2 离体穗和干种子经<sup>60</sup>Co γ-射线辐照处理后小孢子在NaCl胁迫下的愈伤组织产量和绿苗产量

Fig.2 Callus yield and green plantlet production under NaCl stress from the <sup>60</sup>Co γ-irradiated spikes and dry seeds

从图3可以看出,‘花30’的离体小孢子经EMS或平阳霉素处理48 h后,在300 mg·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下愈伤组织产量分别为123.71和26.96 mg,愈伤组织在含3 g·L<sup>-1</sup> NaCl的胁迫分化培养基上绿苗产量为35.51和2.23株;离体穗或干种子经<sup>60</sup>Co γ-射线辐照处理后,在300 mg·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下愈伤组织产量分别为23.28和109.68 mg,愈伤组织在含3 g·L<sup>-1</sup> NaCl的胁迫分化培养基上绿苗产量为1.95和17.14株。可见,<sup>60</sup>Co γ-射线辐照处理干种子和EMS诱变处理小孢子的效果要优于辐照处理离体穗和平阳霉素处理的。

从小孢子脱分化形成愈伤组织的产量来看,4种诱变处理后的小孢子均可以在NaCl胁迫下脱分

化形成愈伤组织,经平阳霉素处理后在NaCl胁迫下形成的愈伤组织产量明显低于EMS处理的,表明EMS处理小孢子可以获得比平阳霉素处理更多的耐盐愈伤组织。从愈伤组织分化形成绿苗产量分析,4种诱变处理后小孢子形成的愈伤组织都可以在NaCl胁迫下分化成苗,但是来源于不同诱变处理的愈伤组织其耐盐性存在明显的差异,离体穗<sup>60</sup>Co γ-射线诱变和小孢子平阳霉素诱变后形成的愈伤组织的耐盐性明显不如干种子<sup>60</sup>Co γ-射线诱变和小孢子EMS诱变的。

### 2 再生植株自交一代的耐盐性表现

起源于干种子<sup>60</sup>Co γ-射线诱变后获得再生植

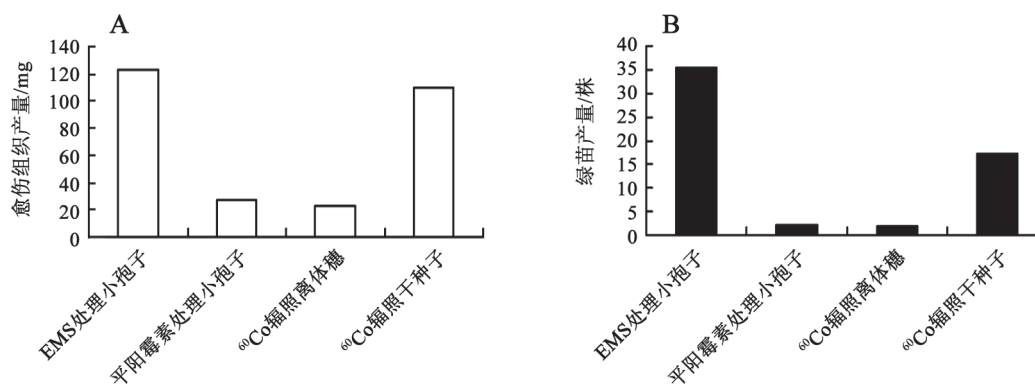


图3 诱变方法、诱变对象及胁迫压对诱变效果的影响

Fig.3 Effect on the mutagenic result from mutation method, targets and stress pressure

株形成的自交一代种子, 播种于温室, 观察其从种子萌发至成熟阶段的耐盐性表现。以0.5% NaCl作为胁迫压, 原始品种‘花30’种子的萌发率为0, 供试的16份株系中, 11份株系的萌发率大于或等于50%。然而, 盐胁迫对种子发芽后幼苗的生长产生明显的抑制作用, 14份萌发的株系中3份材料的幼

苗未能进一步生长, 其余材料中成活率大于或等于50%的有7份。盐胁迫对分蘖数、株高和单株产量也产生明显的抑制作用, 在11份株系中, 有6份材料的分蘖数和4份材料的株高与对照相比下降达显著水平, 只有1份材料(A7-6)的单株产量显著高于对照, 其余材料均低于对照(表2)。

表2 耐盐变异体温室鉴定结果

Table 2 The identification results of the salt-tolerant variants in the green house

材料	发芽率%		胁迫下的 成活率/%	分蘖数/个		株高/cm		单株产量/g	
	对照	盐胁迫		对照	盐胁迫	对照	盐胁迫	对照	盐胁迫
‘花30’	100.0	0	—	8.8±2.3	—	36.5±3.9	—	5.9±2.4	—
A7-2	100.0	50.0	66.7	7.3±2.3	3.5±1.3*	33.5±3.0	27.3±3.8*	5.1±2.3	1.6±1.1*
A7-3	100.0	50.0	33.3	8.5±1.6	4.0±0*	33.5±2.7	35.5±2.1	4.2±0.8	1.5±1.1*
A7-6	83.3	66.7	25.0	6.0±1.7	7.5±0.7	38.0±2.3	39.0±1.4	3.9±1.2	5.2±0.1*
A7-7	91.7	75.0	33.3	7.8±3.3	3.0±3.5	31.8±5.4	27.0±12.1	4.8±2.4	1.9±2.7
A7-8	100.0	50.0	66.7	7.7±3.3	3.3±1.0*	33.2±3.1	32.8±2.9	4.4±1.9	1.1±0.3*
A7-9	100.0	91.7	100.0	7.0±1.7	3.2±1.3*	36.0±3.3	29.8±7.6	5.0±1.4	2.1±1.0*
A7-10	66.7	100.0	33.3	5.0±0.6	2.3±1.5*	42.5±2.9	28.0±7.9*	3.4±0.8	1.2±1.1*
A7-11	100.0	83.3	50.0	6.7±2.4	3.2±1.3*	38.2±1.2	28.4±4.5*	3.6±0.7	1.6±0.2*
A7-12	91.7	66.7	75.0	7.0±1.7	5.0±2.4	40.0±4.5	32.8±8.2	5.0±0.8	3.2±1.2*
A7-13	91.7	66.7	75.0	6.7±1.4	5.0±2.6	46.5±7.1	35.3±3.5*	5.7±1.7	2.1±1.3*
A7-14	100.0	16.7	100.0	8.2±2.0	2.5±2.1	38.8±5.0	27.0±9.9	5.8±1.9	1.5±1.6
A7-15	91.7	16.7	—	7.5±2.0	—	39.5±4.5	—	4.3±1.5	—
A7-16	100.0	50.0	—	4.7±1.4	—	46.8±4.3	—	3.2±1.7	—
A7-17	100.0	0	—	6.3±1.8	—	39.3±4.9	—	4.9±1.9	—
A7-18	66.7	0	—	5.7±2.4	—	40.2±8.1	—	3.6±1.2	—
A7-43	91.7	8.3	—	5.8±3.2	—	35.2±4.5	—	3.9±2.5	—

\*表示在0.05水平差异显著。

从单株产量与分蘖数、株高的相关性分析可以看出, 正常条件下单株产量与分蘖数显著正相关(表3), 盐胁迫条件下单株产量与分蘖数极

显著正相关、与株高显著正相关(表4), 表明盐胁迫下植株的分蘖数、株高对单株产量有较大影响。

表3 正常施肥条件下单株产量、分蘖数和株高间的相关系数

Table 3 Correlation coefficients among yield per plant, tiller number and plant height under normal condition

	单株产量	分蘖数
单株产量	—	
分蘖数	0.61*	—
株高	0.01	-0.56

\*表示在0.05水平差异显著。

综合分析可以看出, A7-9、A7-12和A7-13的耐盐性较好, 胁迫下的分蘖较多, 单株产量也较高; 尤其是A7-6的表现比较特殊, 盐胁迫下的萌发率

表4 盐胁迫下单株产量、分蘖数和株高间的相关系数

Table 4 Correlation coefficients among yield per plant, tiller number and plant height under salt stress

	单株产量	分蘖数
单株产量	—	
分蘖数	0.91**	—
株高	0.64*	0.86**

\*和\*\*分别表示在0.05和0.01水平差异显著和极显著。

和成活率不高, 但成活后植株在盐胁迫下的分蘖数和植株高度与对照相近, 特别是单株产量显著高于对照(图4)。



图4 再生植株自交1代的耐盐性表现

Fig.4 Salt-tolerant characters of selfing first-generation plants

A: '花30'苗期; B: A7-9苗期; C: A7-12苗期; D: A7-13苗期; E: A7-6抽穗期; F: A7-9抽穗期; G: A7-12抽穗期; H: A7-13抽穗期。



### 3 变异体的耐盐分子机制

#### 3.1 高盐胁迫下‘花30’与耐盐变异体地上部Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因的表达变化

从图5-A可以看出, 与‘花30’相比, A7-9和A7-13的基因表达模式相似, A7-9在整个胁迫处理期间的表达量远高于‘花30’; A7-10和的表达模式与‘花30’相比发生较大变化; A7-12在盐胁迫下*NHX1*基因的表达模式与‘花30’相似, 但表达增强。

从图5-B可以看出, 在6个材料中*NHX2*基因表达模式均是先降低后升高。‘花30’和A7-9在盐胁迫0~12 h表达量降低后稍有增强趋势; A7-10、A7-11、A7-12在24 h后表达量增强; A7-13在0~24 h表

达量先增强后下降, 24 h后表达量也有增强的趋势。

从图5-C可以看出, ‘花30’在盐胁迫0~48 h, *NHX3*基因的变化呈先下降后上升, 上升变化幅度不大, 表达量均低于变异体材料; A7-10、A7-11、A7-12表达变化模式与‘花30’相同; A7-9在24 h后表达量稍有下降, 但差异不显著; A7-13表达量一直呈增强趋势。

#### 3.2 高盐胁迫下‘花30’与耐盐变异体地上部甜菜碱醛脱氢酶基因的表达变化

从图6-A可以看出, 在盐胁迫下, A7-9、A7-10、A7-11中*BBD1*的表达变化模式与‘花30’中的

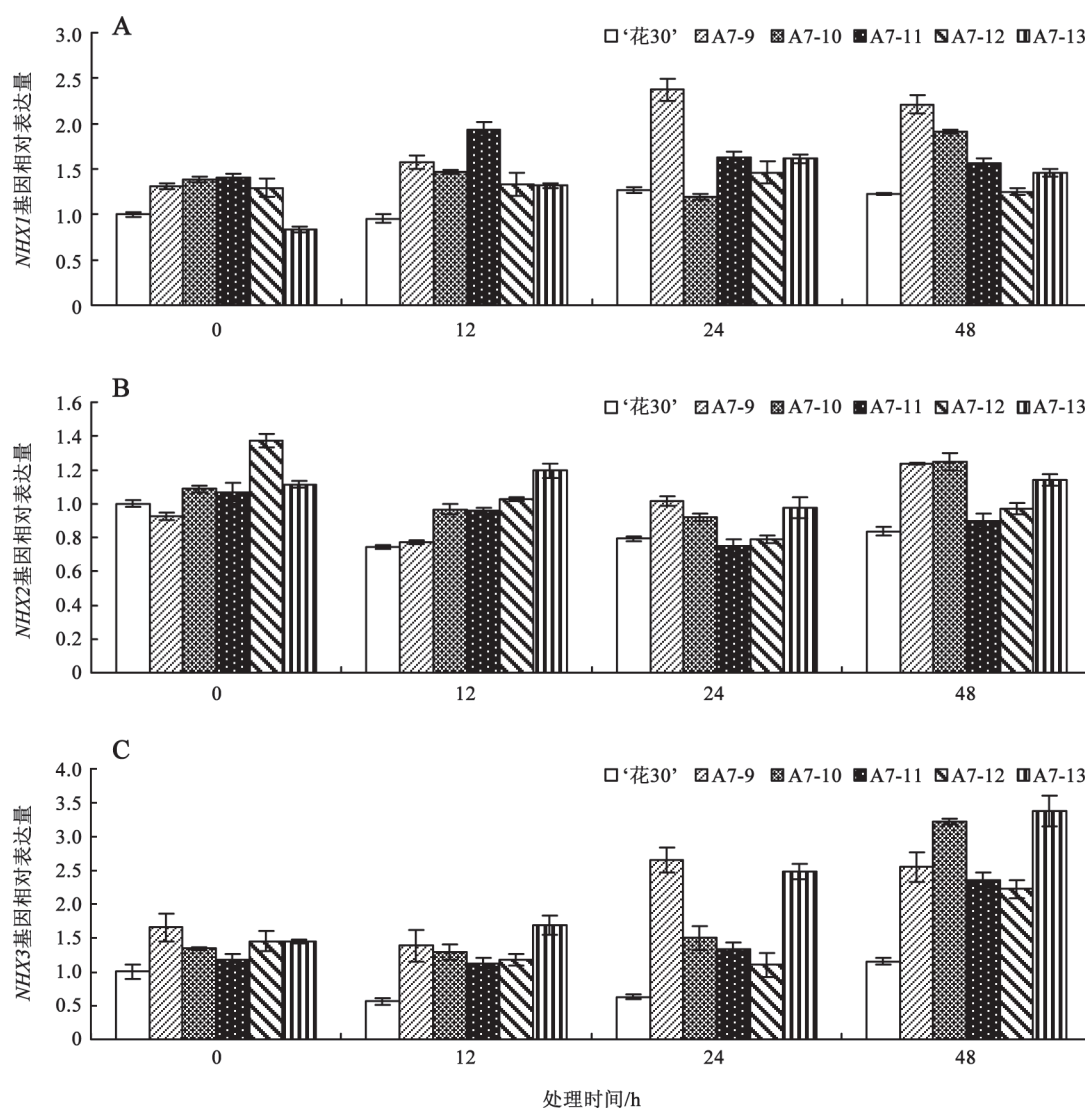


图5 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因在不同材料地上部中的表达变化  
Fig.5 Changes of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression in the aerial part of different materials

相同,但在盐胁迫48 h时的相对表达量显著高于‘花30’;A7-12中*BBD1*的表达变化模式与‘花30’差异较大,盐胁迫24 h时表达量低至‘花30’水平,48 h时高于‘花30’;A7-13中*BBD1*表达变化模式与‘花30’相似,但在盐胁迫前后的表达量均高于‘花30’。

从图6-B可以看出,在盐胁迫下,*BBD2*基因在‘花30’和耐盐变异体材料中表达变化模式基本相同,盐胁迫0~12 h表达量基本上没有变化,12 h以后急剧增强,除了A7-10(24 h)和A7-13(48 h),其余3个材料的相对表达量远高于对照‘花30’。

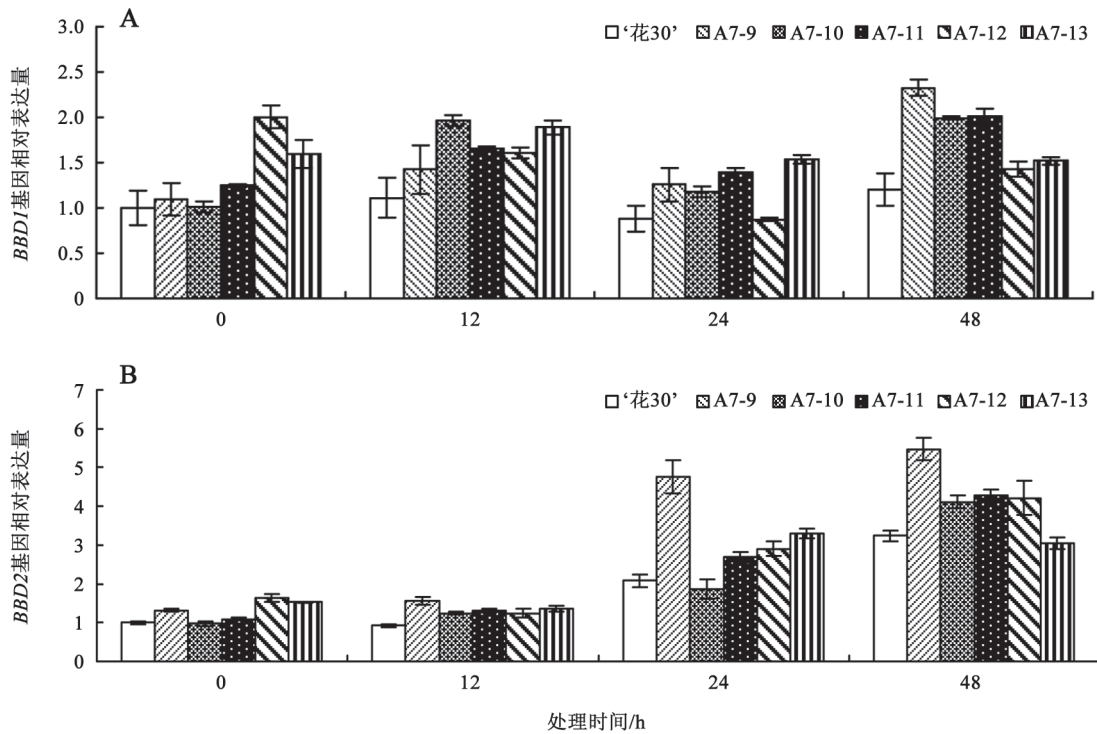


图6 甜菜碱醛脱氢酶基因在不同材料地上部中的表达变化

Fig. 6 Changes of betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in the aerial part of different materials

## 讨 论

利用单倍体技术诱导筛选变异体具有十分明显的优点,但也受到单倍体诱导技术的制约。获得变异体的数量不仅受诱变剂、诱变方法、胁迫压和筛选方法的影响,更受小孢子培养植株再生频率的影响,凡是影响小孢子培养植株高频再生的因子都会影响到获得变异体的数量。所以,单倍体诱变筛选体系必须建立在成熟的小孢子培养再生体系之上,而随着小孢子培养技术的不断成熟,单倍体诱变筛选技术会被应用于更多作物的育种工作上(Germana 2011)。

诱变处理影响小孢子在盐胁迫下的愈伤组织形成,不同诱变处理的影响存在较大差异。 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线辐照离体穗的愈伤组织产量明显低于 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -

射线辐照种子的处理,可能与离体穗辐照后小孢子活力受到影响有关(雷春等2004;许利彩等2009)。平阳霉素与EMS处理小孢子后愈伤组织产量存在差异,可能是小孢子活力和耐盐性小孢子数量不同所致。由小孢子的诱变效果可见,单倍体细胞水平的诱变可以产生耐盐性发生变异的含单套基因的存活细胞,经过染色体加倍后,突变基因和其他基因一次性纯合,其所携性状的遗传稳定性较好。在盐胁迫下形成的愈伤组织并进而分化的绿苗产量存在较大差异,可能的原因是由于愈伤组织分化成苗的潜力及愈伤组织的耐盐性不同。以种子诱变处理后的小孢子作为供试材料,经过盐胁迫培养,分化获得的再生植株,自交一代的种子在0.5%盐胁迫下的发芽率明显高于原始材料‘花30’,盐胁迫下植株的成活率、分蘖数、株高



和单株产量存在明显差异。表明本研究获得的变异体的耐盐性是可以遗传的。

大麦NHX1、NHX2、NHX3均是液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白, 具有将Na<sup>+</sup>在液泡内区隔化和将Na<sup>+</sup>排出细胞外的功能, 是植物抵御盐胁迫的关键因子, 与植物的耐盐性密切相关(钱永生和张晓琴2007; 陈观平等2006; 李妍2007)。Roslyakova (2007)研究表明, NHX1和NHX2在大麦叶中的表达变化不明显, NHX3基因在盐胁迫下, 在耐盐品种和盐敏感品种中数量上和动力上都有明显的增加。本研究中NHX3基因在耐盐材料中的表达均高于对照‘花30’, 结果与Roslyakova (2007)的一致, 推测NHX3基因可能在Na<sup>+</sup>区隔化中起主要作用, 而‘花30’在盐胁迫下叶片中NHX1和NHX2表达变化不明显, 而在耐盐材料A7-9和A7-10中, NHX1基因的表达发生了明显的变化。据此推测, NHX1基因可能在A7-9和A7-10的耐盐性上起一定的作用, 但导致NHX1基因表达模式变化的原因还需要进一步的研究; 这些结果同时也揭示了Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白在大麦的耐盐中起着重要作用。

盐胁迫能够诱导甘氨酸甜菜碱的积累, 这种积累和甜菜碱醛脱氢酶基因活性的增加相关, 而该基因活性伴随着其蛋白和mRNA水平的增加而增加(Ishitani等1995)。BBD1和BBD2基因是编码大麦甜菜碱醛脱氢酶的两个同工酶基因, 它们在mRNA表达模式上不同, 在叶片中, BBD2基因的表达随着盐胁迫时间的延长明显上升, 表达量远高于BBD1基因, 而BBD1基因在叶片中仅以低丰度表达, 说明BBD2基因在保护大麦免受盐胁迫而合成甘氨酸甜菜碱中起主要作用, 此结果与Nakamura等(2001)研究结果一致。Ishitani等(1995)认为在甘氨酸甜菜碱合成途径中基因表达量的改变调控或部分调控盐胁迫下大麦植株体内甘氨酸甜菜碱含量的累积。与对照‘花30’相比, 变异体中BBD2基因在mRNA水平上表达量的显著提高可能导致了甘氨酸甜菜碱含量的增加, 而甘氨酸甜菜碱的积累量与品种耐盐性呈正相关(Nakamura等1996), 说明甘氨酸甜菜碱参与了突变体植株对盐胁迫的调节。本研究获得的关于变异体耐盐性分子机制的研究结果表明, 耐盐性的提高与相关基因及其表达存在联系。

## 参考文献

- 陈观平, 王慧中, 施农农, 陈受宜(2006). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白与植物耐盐性关系研究进展. 中国生物工程杂志, 26 (5): 101~106
- 顾宏辉, 张冬青, 张国庆, 周伟军(2003). 油菜离体小孢子诱变育种研究进展. 浙江农业学报, 15 (5): 318~322
- 和江明, 王敬乔, 陈薇, 李根泽, 董云松, 寸守铄(2003). 用EMS诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究. 西南农业学报, 16 (2): 34~36
- 黄剑华(2003). 大麦细胞工程育种研究与展望. 见: 陆维忠, 郑企成编. 植物细胞工程与分子育种技术研究. 北京: 中国农业科学出版社, 74~87
- 黄剑华(2007). 小孢子和花药培养技术在作物定向遗传改良上的应用. 作物研究, (3): 167~169
- 雷春, 陈劲枫, 钱春桃, 张永兵, 宋慧(2004). 辐射花粉授粉和胚培养诱导产生黄瓜单倍体植株. 西北植物学报, 24 (9): 1739~1743
- 李鹏, 李新华, 张锋, 邱登林(2008). 植物辐射诱变的分子机理研究进展. 核农学报, 22 (5): 626~629
- 李妍(2007). 液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白研究进展. 安徽农学通报, 13 (5): 40~41
- 陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 王亦菲, 杜志钊, 高润红, 邹磊, 黄剑华, 陈佩度(2011). 两份大麦品种单倍体细胞与植株水平耐盐性的关系. 核农学报, 25 (2): 0226~0230
- 陆瑞菊, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅, 黄剑华(2006). 利用青菜单倍体茎尖筛选耐热变异体. 核农学报, 20 (5): 388~391
- 钱永生, 张晓勤(2007). 盐胁迫下植物Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白研究进展. 湖北农业科学, 46 (2): 314~319
- 石淑稳, 吴江生, 牛勤思(2007). 甘蓝型油菜小孢子离体诱变——紫外线对小孢子胚状体再生的影响. 核农学报, 21 (1): 17~19
- 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 黄剑华(2005). 大麦花药离体诱变及铝胁迫下的培养反应. 核农学报, 19 (2): 95~98
- 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 黄剑华(2006). NaCl胁迫对不同基因型大麦花药离体培养的影响. 核农学报, 20 (1): 19~22
- 王亦菲, 黄剑华, 陆瑞菊, 孙月芳, 周润梅, 周志疆, 谢祝捷, 刘成洪(2002). 利用油菜单倍体茎尖筛选抗菌抗病变异体. 核农学报, 16 (6): 355~359
- 谢艳平(2008). 甘蓝型油菜小孢子离体EMS诱变技术研究[学位论文]. 武汉: 华中农业大学
- 许利彩, 李海真, 沈火林, 葛志东(2009). 辐射花粉诱导西葫芦单倍体. 中国蔬菜, (22): 13~19
- 宣朴, 徐利远, 瞿世洪, 余桂容, 尹春蓉, 岳春芳(2000). 小麦单倍体辐射诱变育种技术研究. 核农学报, 14 (1): 17~20
- 袁金娥, 刘家娟, 先锐, 刘新春, 冯宗云(2011). 大麦耐盐性鉴定方法及耐盐机理研究进展. 大麦与谷类科学, (4): 11~14
- Barro F, Fernández-Escobar J, De la Vega M, Martín A (2002). Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. Euphytica, 129: 1~6
- Chen QF, Wang CL, Lu YM, Shen M, Afza R, Duren MV, Brunner H (2001). Anther culture in connection with induced mutations for

- rice improvement. *Euphytica*, 120 (3): 401~408
- Das A, Gosal SS, Sidhu JS, Dhaliwal HS (2000). Induction of mutations for heat tolerance in potato by using in vitro culture and radiation. *Euphytica*, 114 (3): 205~209
- Germana MA (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30 (5): 839~857
- Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 27: 307~315
- Jain SM (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118 (2): 153~166
- Khan AJ, Hassan S, Tariq M, Khan T (2001). Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica*, 120: 409~414
- Nakamura T, Nomura M, Mori H, Jagendorf AT, Ueda A, Takabe T (2001). An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol*, 42 (10): 1088~1092
- Nakamura T, Oski M, Ando M, Tadano T (1996). Differences in mechanisms of salt tolerance between rice and barley plants. *Soil Sci Plant Nutr*, 42 (2): 303~314
- Novak FJ, Brunner H (1992). Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bull*, 4: 25~33
- Roslyakova T (2007). A new isoform of putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter HvNHX3 in barley: expression and immunochemical localization under salt stress. Society for Experimental Biology Annual Meeting Glasgow, Scotland. *Comp Biochem Phys A*, 146: S264
- Wu CA, Yang GD, Meng QW, Zheng CC (2004). The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol*, 45 (5): 600~607