

园艺植物耐盐细胞突变体的筛选和鉴定

阮先乐*, 王红星, 陈龙, 张杰

周口师范学院生命科学系, 河南周口 466000

Selection and Identification of Horticultural Plant Mutant with Salt-Tolerant Ability

RUAN Xian-Le*, WANG Hong-Xing, CHEN Long, ZHANG Jie

Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466000, China

摘要: 本文介绍了园艺植物耐盐细胞突变体获得途径及其耐盐性鉴定的研究进展。

关键词: 园艺植物; 细胞; 耐盐突变体

自 Nabors 和 Dykes (1985)首次成功地从烟草细胞系筛选出耐盐突变体再生植株以后, 采用组织和细胞培养技术得到的植物耐盐突变体越来越多, 其中包括许多园艺植物, 如番茄(陈火英等 2002)、枸杞(毛桂莲和许兴 2005)、杜鹃(王长泉和宋恒 2003)、常夏石竹(王长泉等 2001)、大蒜(张恩让和程智慧 2003)、甘薯(李爱贤等 2002a)和马铃薯(李娟等 2004)等。这对于充分利用盐碱地, 提高作物产量和改善作物品质, 保证国家粮食和生态环境安全有重大作用。

1 园艺植物耐盐细胞的筛选

1.1 筛选材料的选择 亲本材料的选用是否得当决定了耐盐细胞筛选的成败。首先应该考虑选用优良的、仅有个别缺点需要改进的基因型。还必须注意材料的染色体倍数性水平和培养细胞的再生能力(郭勇等 2004)。如果亲本细胞系不能再生植株, 从其中筛选出来的变异细胞系也就不能再生植株(刘庆昌和吴国良 2005)。因此在选择材料时应该避免使用那些不具有再生能力或再生能力不强的细胞系。

用来进行筛选的细胞, 其培养方式主要分为4种: 愈伤组织培养(Ben-Hayyim和Kochba 1983; Ben-Hayyim等 1985)、细胞悬浮培养(Splegel-Roy和Ben-Hayyim 1985)、细胞固体培养和原生质体培养。

与其他3种选择系统相比, 因为培养技术比较简单, 愈伤组织培养具有明显的优点, 但也存在以下缺点: (1)同一愈伤组织中不是所有的细胞都能均匀的受到选择压的作用, 因而会导致选择上的困难; (2)同一愈伤组织中, 细胞之间易产生互馈作用, 有

可能逃脱选择压的作用, 从而导致嵌合体的产生, 增加选择难度。

小细胞团悬浮培养是一种比较好的培养方式。由于小细胞团外面的细胞与里面的细胞所处的环境条件差别不是很大, 有利于细胞突变体的选择。

原生质体培养是最好的培养方式, 不但细胞可以均匀受到诱变剂处理和选择压处理, 而且其再生植株大部分来自单细胞, 形成嵌合体的几率较小。但是, 有些园艺植物利用原生质体培养再生植株比较困难, 因此限制了该培养方式的应用。

1.2 筛选方法的选择 可以通过诱发突变和施加选择压2种方法来获得植物耐盐细胞。

1.2.1 诱发突变 诱变是获得优良植物细胞的有效方法之一。诱变剂一般分为物理诱变剂和化学诱变剂2大类。

物理诱变剂主要包括 γ 射线、 β 射线、X射线等。据统计, 各种作物通过 γ 射线辐射诱变育成的新品种占诱变育成品种总数的79.6% (李爱贤等 2002b)。韩元凤(2004)在甘薯耐盐细胞突变体的选择中, 用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照‘栗子香’和‘徐薯18’的胚性悬浮细胞。郭勇等(2004)用不同剂量的快中子辐射红豆草愈伤组织, 从中筛选出3个耐盐愈伤组织系, 经过选择, 从40%~70%的人工海水培养基中分化出再生植株。

常用的优良化学诱变剂主要有甲基磺酸乙酯(ethylmethane sulphonate, EMS)、硫酸二乙酯

收稿 2009-08-19 修定 2009-09-30

* 通讯作者(E-mail: ruanxianle@126.com; Tel: 0394-8178257)。

(diethyl sulfate, DES)、乙烯亚胺(ethyleneimine, EI)和叠氮化钠(NaN_3) (安学丽等2003)。其中EMS是目前在作物育种中应用最广、效果最好的诱变剂之一。采用EMS处理,显性突变体相对较多,点突变频率高,染色体畸变相对较少(吴金平等2005)。García-Agustín和Primo-Millo(1995)利用EMS处理柑桔,从中筛选出耐盐细胞突变体,并获得增长快和叶子损坏小的突变体。

1.2.2 施加选择压 直接施加选择压进行选择,也能够筛选出耐盐细胞突变体。在耐盐细胞突变体的筛选中,一般用NaCl或海水作为选择压。还可用聚乙二醇(poly ethylene glycol, PEG)、羟脯氨酸(hydroxyproline, hyp)等作选择压,通过渗透调节能力的选择提高细胞的耐盐性,从而筛选出耐盐细胞突变体。程智慧等(2006)以马铃薯品种‘东农303’的茎段为外植体,直接在含NaCl的培养基上诱导耐盐突变体,结果得到可耐受0.8% NaCl的愈伤组织。

由于植物的耐盐性受多基因控制(Pastori和Foyer 2002),因此在选择时一般分步施加选择压。在低水平的选择压下有有的细胞会产生生理适应性,不利于耐盐突变细胞的选择;而为了获得稳定的耐盐同质突变体,又必须长期的对细胞进行选择,这样就产生了矛盾。因此,在选择突变体时的选择压浓度可根据以下原则来确定:如果需要选择对选择剂抗性比起始细胞高许多倍的突变体,可以直接用较高浓度的选择剂,这样可以缩小寻找的范围;如果需要中等程度抗性的突变体或估计只能找到这种突变体,那就选择较低浓度的选择剂(孙宁 2004)。

2 园艺植物细胞耐盐性的鉴定

2.1 愈伤组织和植株水平鉴定 检测筛选得到的耐盐愈伤组织和再生植株是否真正具有相应水平的耐盐性,最有效和直观的方法是进行生长胁迫试验。只有在一定盐胁迫下仍然具有较高相对生长量(relative growth, RG)的愈伤组织才可以认为是耐盐性愈伤组织。韦小敏等(2007)对玉米幼胚愈伤组织耐盐性的研究表明,在 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下,耐盐变异体愈伤组织平均生长量是0.530 g,与对照愈伤组织平均生长量0.289 g之间存在极显著差异。说明耐盐变异体在NaCl胁迫下能够维持较好的生长势,表现出较强的耐盐性。杜中军等(2002)对19种苹果砧木进行耐盐性测定的结果表明,在一定盐浓度下的相对生长量和盐害指数(salt-tolerance

index, SI)可以准确确定苹果砧木的耐盐力的高低,二者均可作为苹果砧木耐盐力的鉴定指标。

另外,植株形态也可作为植株耐盐性筛选和鉴定的指标,例如根部吸收水分的能力、气孔的开关、角质层的厚度、输导系统对不同离子吸收和运输的特性以及盐腺等特殊排盐结构等。这些特性不仅是高度分化细胞的功能,也是复杂有机体中植物器官之间的相互作用在整株水平上所表现出来的性能。一般以株高和生物产量作为植物耐盐性筛选和鉴定的形态指标。梁春波(2006)研究表明,马铃薯的株高和生物产量均随着盐浓度的升高而有所降低,但耐盐性好的材料下降幅度小,稳定性较高。且在高浓度盐分胁迫下,马铃薯株高和生物产量与耐盐系数的隶属函数之间的相关性均达到了极显著水平。说明以株高和生物产量作为马铃薯新型栽培种资源耐盐性初步鉴定和筛选的形态指标是可行的。

2.2 生理生化指标鉴定 目前对细胞耐盐性的研究主要集中于无机离子的积累、游离脯氨酸含量的变化和蛋白质(酶)的变化等方面。

在遗传背景基本相同的条件下产生的突变体,其耐盐性可能有很大的差异,采用不同突变体进行离子积累差异的研究,可提供很有价值的研究资料(赵宇玮 2001)。García-Agustín和Primo-Millo报道(1995),诱变筛选出的耐氯化钠柑桔植株(‘P6-2128’)叶中 Cl^- 和 Na^+ 浓度较低,生长好于初始无性系,叶损伤较少。此外,筛选出的植株在苗和根中积累较多的 Na^+ ,与此相伴的是 K^+ 浓度的降低。

脯氨酸含量是鉴定作物耐盐性的另一个生理生化指标。渗透调节是植物适应盐胁迫的最基本特征之一,为消除盐胁迫所造成的伤害,植物通常在细胞内主动积累一些小分子有机化合物和蛋白质类的保护剂来维持渗透平衡和体内水分,其中最明显的是脯氨酸的积累。一般认为,脯氨酸含量高的植株耐盐性强。李周岐等(1995)分析河北杨体细胞抗盐性变异系氨基酸组分的结果表明,7个抗盐性变异系的氨基酸代谢均发生显著变化,各变异系的变化程度和方式均不同。

酶是基因的产物,是DNA信息表达的结果,因此Maliaga(1976)认为,变异细胞中存在变异了的基因产物是突变的证据之一,可以作为突变体鉴定的一个手段。李玲和韩一凡(1990)对筛选出的杨树

耐盐突变体的叶片形态进行比较并测定了过氧化物酶同工酶, 结果表明, 耐盐突变体的叶形态有差异, 多数耐盐植物比不耐盐植物的过氧化物酶同工酶谱带多出1~6条带。韩元凤(2004)研究甘薯耐盐突变体植株的结果显示, 变异植株的酯酶同工酶谱带比不耐盐植株的变化更大。

另外, 植物受到盐胁迫时, 它的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、细胞膜透性和叶绿素含量也会发生变化。张兰(2002)研究苹果砧木组培苗耐盐性的结果表明, 植株受害指数越低、SOD酶活性越高、MDA含量越低、细胞膜透性越低, 植株耐盐性就越强。张俊莲等(2002)研究表明, 长时间高浓度盐胁迫处理, 马铃薯叶片中的叶绿素含量即显著的低于对照, 不同处理之间差异显著。许多研究也表明, 盐分胁迫能影响植物体内叶绿素a和叶绿素b的比值, 说明叶绿素a和叶绿素b的比值与植物耐盐性有关(杜军华等2000; 吴家梅等2003; 梁春波2006)。

2.3 分子标记技术鉴定 分子标记技术是通过遗传物质DNA序列的差异进行标记的, 它直接以DNA的形式表现, 在植物的各个组织和各个发育时期均可以检测到, 不受外界环境的影响, 数量极多, 遍及整个基因组。主要应用的标记技术有: 随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD)、简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)等。

3 结语

为更好地通过植物体细胞进行植物抗性育种, 在园艺植物耐盐细胞突变体的筛选和鉴定中, 还需要考虑以下几个问题。

3.1 愈伤组织水平上的耐盐性和再生植株的耐盐性并不完全一致 这2种水平上的差异有许多原因, 最主要的是高等植物的耐盐性涉及到许多生理因素, 如根部吸收水分的能力、气孔开关、角质层厚度、输导系统对不同离子的吸收和运输特性以及盐腺等特殊排盐结构等等。这些特征是植物器官之间相互作用在整株水平上表现出来的能力, 绝

不是一个细胞的功能。正是由于植物耐盐性是多性状的综合表现, 必然受多基因控制, 而基因表达的程度在细胞与植株2种水平上可能不会完全相同, 从而会导致2种水平的耐盐性表现不一致。但也有的植物在2种水平上的耐盐性是一致的, 那么这类作物就比较容易从细胞水平上筛选产生耐盐品系。此外, 耐盐性也可表现为对渗透压、对盐分总浓度和对专一离子致毒性的抗性(赵宇玮2001)。

3.2 耐盐系难以分化形成再生植株 由于经历了一段长时间的盐胁迫筛选, 以致耐盐愈伤组织或细胞系的分化能力严重丧失。即使有少数细胞分化, 也往往出现畸形植株, 移植入土壤后的成活率和结实率极低。所以采用细胞或组织培养筛选耐盐变异体时, 首先应建立能高频率分化的实验体系, 掌握长期保持分化的条件和技术, 同时要改进胁迫培养的程序, 以利培养物经长期筛选后仍然具有较高的分化形成再生植株的能力。

3.3 耐盐突变体与产量和品质有矛盾 突变体往往育性、产量和品质均下降。迄今为止, 人们对作物的许多经济性状的分子基础的了解甚少, 因此无法在细胞与组织培养中对这些性状进行筛选。

总之, 植物耐盐细胞突变体的选择前景是诱人的, 它对盐碱土地的利用和国民经济的发展都是很重要的, 同时也可以丰富植物的育种资源。

参考文献

- 安学丽, 蔡一林, 王久光, 王国强, 孙海燕(2003). 化学诱变及其在农作物育种上应用. 核农学报, 17 (3): 239~242
- 陈火英, 张建华, 张晓宁(2002). 栽培番茄耐盐突变体的离体筛选. 上海交通大学学报, 20 (1): 1~6
- 程智慧, 李娟, 张国裕(2006). 利用马铃薯茎段离体筛选耐盐变异体. 园艺学报, 33 (3): 635~638
- 杜军华, 冯桂莲, 高榕(2000). 盐胁迫对蚕豆(*Vicia faba* L.)叶绿素a和b含量的影响. 青海师范大学学报(自然科学版), (4): 36~38
- 杜中军, 翟衡, 罗新书, 程述汉, 潘志勇(2002). 苹果砧木耐盐性鉴定及其指标判定. 果树学报, 19 (1): 4~7
- 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯(2004). 植物细胞培养技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 36
- 韩元凤(2004). 甘薯耐盐突变体的离体筛选及鉴定[学位论文]. 北京: 中国农业大学
- 李爱贤, 刘庆昌, 王玉萍, 翟红, 王淑芳, 刘保利(2002a). 甘薯耐旱耐盐突变体的离体筛选. 农业生物技术学报, 10 (1): 15~19
- 李爱贤, 张立明, 刘庆昌, 王庆美, 孙立荣(2002b). 甘薯辐射诱变育种研究进展. 莱阳农学院学报, 19 (4): 256~260
- 李娟, 程智慧, 张国裕(2004). 马铃薯耐盐突变体的离体筛选. 西北农林科技大学学报, 32 (8): 43~48

- 李玲, 韩一凡(1990). 杨树耐盐突变体筛选的研究. 林业科学, 26 (4): 359~362
- 李周岐, 邱明光, 杨秀平(1995). 河北杨体细胞抗盐性变异系氨基酸组分变异性分析. 陕西林业科技, (3): 7~10
- 梁春波(2006). 马铃薯新型栽培种轮回选择材料耐盐性研究[学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学
- 刘庆昌, 吴国良(2005). 植物细胞组织培养. 北京: 中国农业大学出版社, 302
- 毛桂莲, 许兴(2005). 枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析. 西北植物学报, 25 (2): 275~280
- 孙宁(2004). 苹果砧木耐盐突变体的筛选及其 RAPD 分析[学位论文]. 保定: 河北农业大学
- 王长泉, 宋恒(2003). 杜鹃抗盐突变体的筛选. 核农学报, 17 (3): 179~183
- 王长泉, 宋恒, 王希峰, 王凤(2001). 常夏石竹抗盐突变体的筛选. 园艺学报, 28 (5): 469~471
- 韦小敏, 何金环, 陈彦惠, 季良越(2007). 玉米耐盐愈伤组织变异体的筛选及耐盐性分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 35 (9): 73~78
- 吴家梅, 刘兆普, 陈铭达, 赵耕毛, 唐奇志(2003). 不同浓度的海水处理对库拉索芦荟叶绿素含量及其超微结构的影响. 南京农业大学学报, 26 (3): 113~116
- 吴金平, 顾玉成, 万进, 宋志红, 侯明生(2005). 魔芋抗软腐病突变体筛选的初步研究. 华中农业大学学报, 24 (5): 448~450
- 张恩让, 程智慧(2003). 大蒜耐盐愈伤组织变异系的选择研究. 西北植物学报, 23 (9): 1571~1576
- 张俊莲, 陈勇胜, 武季玲, 王蒂, 张国彬, 权冬玲(2002). 盐胁迫下马铃薯耐盐相关生理指标变化的研究. 中国马铃薯, 16 (6): 323~327
- 张兰(2002). 苹果砧木组培苗耐盐诱变及筛选技术研究[学位论文]. 保定: 河北农业大学
- 赵宇玮(2001). 小麦耐盐变异系和耐甘露醇变异系的离体筛选及生理生化特性分析[学位论文]. 西安: 西北大学
- Ben-Hayyim G, Kochba J (1983). Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*. Plant Physiol, 72: 685~690
- Ben-Hayyim G, Spiegel-Roy P, Neumann H (1985). Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt-tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. Plant Physiol, 78: 144~148
- García-Agustín P, Primo-Millo E (1995). Selection of a NaCl-tolerant *Citrus* plant. Plant Cell Rep, 14 (5): 314~318
- Maliaga P (1976). Isolation of mutants from cultured plant cell. In: Dudits D, Farkas GL, Maliga P (eds). Cell genetics in higher plants. California: Akademiai Kiado, 59~76
- Nabors MW, Dykes TA (1985). Tissue culture of cereal cultivars with increased salt, drought, and acid tolerance. In: International rice research institute (ed). Biotechnology in international agricultural research. Manila: International Rice Research Institute, 121~138
- Pastori GM, Foyer CH (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiol, 129: 460~468
- Spiegel-Roy P, Ben-Hayyim G (1985). Selection and breeding for salinity tolerance *in vitro*. Plant Soil, 89: 243~252