

# 常夏石竹抗盐突变体的筛选

王长泉<sup>1</sup> 宋 恒<sup>1</sup> 王希峰<sup>2</sup> 王 凤<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 山东省淄博市淄博学院基建处, 淄博 255000; <sup>2</sup> 山东省淄博市张店区园林局, 淄博 255000)

摘 要: 利用常夏石竹的离体叶片诱导分化不定芽, 以 MS+ BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 培养基不定芽分化率最高。用 γ 射线作诱变剂, 对离体叶片产生的不定芽进行了耐盐筛选, 得到耐 0.5%、0.7% 和 1.0% NaCl 的变异株系, 并对变异株系进行了初步鉴定。

关键词: 石竹; 离体培养; γ 射线; 耐盐筛选

中图分类号: S681.5; S 603 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 05 0469 03

## 1 目的、材料与方法

在细胞或组织水平上进行抗盐突变体的筛选是值得开拓的新领域<sup>[1,2]</sup>。常夏石竹 (*Dianthus plumarius*) 抗旱、耐寒, 四季常绿, 花期长, 是北方地区冷地型草坪理想品种。为了进一步拓广其适应范围, 我们致力于抗盐常夏石竹的研究工作。

取常夏石竹试管苗的叶片, 接种于 MS 附加不同浓度 BA、NAA 的培养基上, 每种培养基 10 瓶, 每瓶接种 3 片叶。培养基含蔗糖 30 mg·L<sup>-1</sup>, 琼脂 6.5 mg·L<sup>-1</sup>, 培养光照强度为 1500 lx, 光照时间 16 h·d<sup>-1</sup>, 室温 (25±2) °C。将叶片分化的不定芽转入附加不同浓度 IBA 的 MS 培养基上生根, 培养条件同上。

将 γ 射线处理后的常夏石竹试管苗的叶片接种于含不同浓度 NaCl 的 MS 培养基上, 诱导不定芽的分化, 连续选择 6 次, 能够生存下来的植株初步确定为耐盐突变体。将初选的耐盐突变体的离体叶片转入不含 NaCl 的培养基上, 培养 1 个月后转入含相应浓度 NaCl 的培养基上, 观察耐盐稳定性, 稳定的植株即为变异株。取变异株的叶片, 测定其可溶性糖 (蒽酮比色法)、游离氨基酸 (氰氨酸盐法)、脯氨酸 (水合茚三酮法)、K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 含量 (火焰光度法)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽的分化及植株再生

常夏石竹的叶片接种培养 15 d 后, 切口处长出少量淡绿色愈伤组织, 以后陆续有不定芽分化。从表 1 看出, 不同浓度 BA 和 NAA 对分化率的影响差异显著, 以 BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 处理不定芽分化率最高。

不定芽移入生根培养基中半月后可见根的发生。不同培养基对生根的影响不同, 含 IBA 0.2~0.4 mg·L<sup>-1</sup> 的生根率高且根大, 茎基部愈伤组织较少, 茎叶生长正常; IBA 超过 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 时茎基部愈伤组织较多, 初生根畸形, 生长弯曲。

### 2.2 耐盐突变体的筛选与鉴定

2.2.1 NaCl 对常夏石竹叶片不定芽分化的影响 将叶片接种在 MS+ BA 2 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 并含不同浓度 NaCl 的培养基上, 诱导不定芽分化。由表 2 看出, 当 NaCl 浓度达到 0.3% 时显著抑制不定芽分化; 当 NaCl 达到 0.5% 时, 极显著地抑制不定芽分化, 因

此选 0.5% NaCl 作为耐盐筛选的最低临界值；当 NaCl 浓度超过 1% 时不定芽分化率极低，可将其作为最高临界值。

表 1 BA 和 NAA 对常夏石竹叶片不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of NAA and BA on induction of adventitious bud				
BA (mg· L <sup>-1</sup> )	NAA (mg· L <sup>-1</sup> )	接种叶数 No. of treated leaves	分化叶数 No. of regeneration leaves	分化百分数 Percentage of regeneration (%)
0	0	30	0	0
	0.1	30	0	0
	0.2	30	0	0
	0.5	30	0	0
0.5	0	30	0	0
	0.1	30	4	13.3
	0.2	30	14	46.6
	0.5	30	7	23.3
1.0	0	30	0	0
	0.1	30	13	43.3
	0.2	30	18	60.0
	0.5	30	10	33.3
2.0	0	30	0	0
	0.1	30	10	33.3
	0.2	30	25	83.3
	0.5	30	12	40.0
4.0	0	30	0	0
	0.1	30	3	10.0
	0.2	30	6	20.0
	0.5	30	5	16.6

注：数据用双因素方差分析法分析达 1% 显著水平。  
Note: The data in table were analyzed with double factor variance method, differences are significant at 1% level.

表 2 NaCl 浓度对常夏石竹叶片不定芽分化的影响

Table 2 Effect of NaCl concentration on adventitious bud regeneration			
NaCl (%)	处理叶数 No. of treated leaves	分化叶数 No. of regeneration leaves	分 化 率 Percentage of regeneration (%)
对照 Control	90	75	83.3 a
0.1	90	66	73.3 a
0.3	90	42	46.6 b
0.5	90	15	16.6 c
1.0	90	3	3.3 d

注：数据用 Duncan 新复极差法测验，相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异达 5% 显著水平。下同。  
Note: The data were tested with Duncan LSR, the same letters indicate differences are unnotable, different lerrers mean differences are significant at 5% level. The same below.

表 3 不同剂量 γ 射线处理对叶片不定芽分化的影响

Table 3 Effect of γ rays dose on adventitions bud regeneration			
γ 射线剂量 γ rays dose (kR)	处理叶片数 No. of treated leaves	分化叶数 No. of regeneration leaves	分 化 率 Percentage of of regeneration (%)
对照 Control	90	75	83.3 a
3	90	71	78.8 a
5	90	49	54.4 b
10	90	31	34.4 c
15	90	13	14.4 d

2.2.2 γ 射线辐射处理对叶片不定芽分化的影响 用不同剂量 γ 射线辐射处理后，将常夏石竹叶片接种到 MS+ BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 的培养基诱导不定芽的分化，结果如表 3。方差分析表明照射剂量 5 kR 以上显著影响叶片不定芽的分化，10 kR 以上辐射处理的叶片开始时生长正常，但后来大部分逐渐坏死，因此我们选取 5 kR 做 γ 射线处理的适宜剂量。

2.2.3 耐盐突变体的筛选 取经 5 kR γ 射线处理后的常夏石竹试管苗的叶片移入 MS+ BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+ NaCl 0.5% 的培养基上作第一轮选择，选取生长良好的不定芽的叶片转移到含同样 NaCl 浓度的培养基上进行第二轮选择，依次进行到第六轮选择，选取生长良好的不定芽叶片转移到不含 NaCl 的培养基上，清除可能对选择剂“上瘾”的非抗性细胞，一个月后选取不定芽叶片转入含 0.5% NaCl 或不含 NaCl 的 MS+ BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 的培养基上诱导不定芽分化，再生植株为耐 0.5% NaCl 的变异体。

从 0.5% NaCl 选择第三轮开始，挑选生长良好的不定芽叶片，转入含 0.7% NaCl、1% NaCl 的培养基上作为第一轮选择，至第六轮止，选取生长良好的不定芽叶片，按上述 0.5% NaCl 选择处理方法移入不含 NaCl 的培养基上诱导不定芽分化，再生植株分别称耐 0.7% 和耐 1% NaCl 的变异体。将未经  $\gamma$  射线辐射处理的常夏石竹叶片按上述程序筛选得到耐 0.5%、0.7%、1.0% NaCl 变异体做对照。如表 4 所示，用  $\gamma$  射线作诱变剂比不用诱变剂明显提高了变异率，如耐 1.0% 变异率，对照为 0.44%， $\gamma$  射线处理为 2.22%。

2.2.4 耐盐变异株的鉴定 将对照和耐 0.5%、0.7%、1.0% NaCl 的变异株离体叶片移到不含 NaCl 的培养基上培养一个月后再移入含有相应含量 NaCl 的培养基，各变异体保持其不定芽的耐盐稳定性，而对照移入 0.5% NaCl 培养基 10 d 后便逐渐死亡。取耐不同浓度 NaCl 的不定芽叶片继代繁殖诱导不定芽，经耐盐鉴定仍保持其亲本的耐盐性，其遗传物质是否发生变化有待进一步检测。

由于耐 0.7% 和 1% NaCl 的变异株数极少，尚未进行快繁试验，故取耐 0.5% NaCl 植株进行测定，可溶性糖含量为  $75.23\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、游离氨基酸为  $744.83\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、脯氨酸为  $9\,352.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ， $\text{K}^{+}$  和  $\text{Na}^{+}$  分别为  $59\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $41.25\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，对照株分别为  $88.93\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $525.66\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $2\,383.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $33.25\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.708\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，可见变异株系比对照可溶性糖含量降低，游离氨基酸、脯氨酸， $\text{K}^{+}$  和  $\text{Na}^{+}$  含量升高。

参考文献:

- 1 徐乃瑜. 培养抗性植物的细胞/组织培养途径. 武汉植物研究, 1987, 5 (3): 34~ 36
- 2 魏坤峰. 中国盐碱土园林十大课题研究简报. 中国园林, 1999, (6): 72~ 73

Selection of Salt tolerance Variants from China Pink

Wang Changquan<sup>1</sup>, Song Heng<sup>1</sup>, Wang Xifeng<sup>2</sup>, and Wang Feng<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Basical Construction, Zibo University, Zibo 255000; <sup>2</sup>Landscape Architecture Managment Bureau, Zhangdian Distict, Zibo 255000)

**Abstract:** We induced adventitious buds from the leaves of China pink, MS+ BA  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  was the best medium for adventitious bud regeneration.  $\gamma$ -rays were used as mutagens to select salt tolerance variants from adventitious buds, the variants tolerated to 0.5%, 0.7%, 1% NaCl was established, preliminary identification was conducted on the variants.

**Key words:** China pink; In vitro;  $\gamma$  rays; Selection of salt tolerance.

表 4 不同 NaCl 浓度筛选对叶片不定芽变异率的影响

Table 4 Effect of NaCl concentration on adventitions				
bud variant frequency				
$\gamma$ 射线处理 $\gamma$ rays treatment	NaCl (%)	接种叶片数 No. of treated leaves	变异叶片数 No. of variant leaves	变异率 Variant frequency (%)
对照 Control	0.5	900	21	2.33
	0.7	900	10	1.11
	1.0	900	4	0.44
5 kR	0.5	900	31	3.44
	0.7	900	24	2.66
	1.0	900	20	2.22
方差分析 Variance analysis				* *