

# 瓜叶菊耐热无性系离体筛选初步研究

于晓英<sup>1,2\*</sup>, 卢向阳<sup>2</sup>, 李 达<sup>1</sup>, 张宏志<sup>1</sup>, 姚 觉<sup>1</sup>, 陈翠林<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; <sup>2</sup> 湖南农业大学生物与发酵工程实验室, 长沙 410128)

**摘 要:** 以编号为 B<sub>1</sub>、N<sub>1</sub>、Z<sub>1</sub>的瓜叶菊增殖期的愈伤组织和丛生芽为材料, 用高温胁迫和羟脯氨酸 (HYP) 分别作为直接和间接选择压, 进行了瓜叶菊耐热无性系的离体筛选研究。结果表明: (1) 离体直接筛选的适宜选择压为 40 16 ~ 20 h, HYP间接筛选的适宜浓度为 30 mmol · L<sup>-1</sup>; (2) 经过直接选择、HYP与高温胁迫结合多次筛选获得了 Z<sub>1-1</sub>和 N<sub>1-2-1</sub>两个耐热无性系; (3) Z<sub>1-1</sub>与对照母株 Z<sub>1</sub>在叶片厚度、气孔指数、栅栏组织厚度/海绵组织厚度 (TPT/TST) 方面存在显著差异, 成年植株 Z<sub>1-1</sub>和 Z<sub>1</sub>在花的育性上也差异明显, Z<sub>1</sub>结实率 85%以上, 而 Z<sub>1-1</sub>在人工授粉的情况下结实率也仅 1.0%; N<sub>1-2-1</sub>和其对照母株 N<sub>1</sub>在形态和花的育性上没有明显差别; (4) 在 40 24 h胁迫后, Z<sub>1-1</sub>和 N<sub>1-2-1</sub>的热害指数、细胞丙二醛含量、电解质伤害性外漏率都低于其对照母株, 而 POD、SOD活性明显高于其对照母株。

**关键词:** 瓜叶菊; 耐热无性系; 离体筛选; 热胁迫

**中图分类号:** S 682 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0513-04

## A Preliminary Study on in Vitro Selection of Heat-tolerant Clonal Lines in *Senecio x hybridus*

YU Xiao-ying<sup>1,2\*</sup>, LU Xiang-yang<sup>2</sup>, LIDA<sup>1</sup>, ZHANG Hong-zhi<sup>1</sup>, YAO Jue<sup>1</sup>, and CHEN Cui-lin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>2</sup> Laboratory of Biochemistry and Fermentation Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Using high temperature and HYP as direct and indirect selection stress, *in vitro* selection of heat-tolerant clonal lines from tussock plantlets and callus of *senecio cruentus* was carried out. The results showed that: (1) 40 16 - 20 h and 30 mmol · L<sup>-1</sup> HYP were optimal direct and indirect selection stress pressure, respectively; (2) Two heat-tolerant clones (Z<sub>1-1</sub> and N<sub>1-2-1</sub>) were obtained by using high temperature direct selection, HYP and high temperature selection; (3) The regenerated plants of Z<sub>1-1</sub> were different significantly from their mother plants (Z<sub>1</sub>) in leaf thickness, TPT/TST and stomata index. The fruit setting rate of adult plant of Z<sub>1-1</sub> was only 1.0% after artificial pollination, and the fruit setting rate of Z<sub>1</sub> was over 85%, (4) After heat stress (40 24 h), the heat injury index, content of MDA and electrolyte leakage of the regenerated plants of Z<sub>1-1</sub> and N<sub>1-2-1</sub> were lower than their mother plants, but the activity of POD and SOD were higher than their mother plants (Z<sub>1</sub> and N<sub>1</sub>).

**Key words:** *Senecio x hybridus*; Heat-tolerant clonal lines; *In vitro* selection; Heat stress

瓜叶菊 (*Senecio x hybridus*) 生长适温为 10 ~ 18 ℃, 耐热性很差, 在我国大部分地区均不能安全度夏。作者在已建立的瓜叶菊离体培养和植株再生技术体系上 (于晓英等, 2004, 2005), 利用高温胁迫直接筛选、HYP (羟脯氨酸) 与高温胁迫结合等方法进行了耐热无性系离体筛选的研究, 获得了两个耐热性比其母株有很大提高的无性系, 并对其再生苗移栽后相关特征进行了初步鉴定。

收稿日期: 2006 - 10 - 30; 修回日期: 2007 - 03 - 07

\* E-mail: yuxiaoying1578@hunau.net

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从湖南农业大学园艺园林学院教学基地瓜叶菊品种‘喜庆’与‘小丑’混合授粉后获得的实生变异种质中选取有代表性的3个单株(来自同一母株,但花色不同,耐热性不同,这些性状都可以通过无性繁殖稳定遗传),分别编号为 $B_1$ 、 $N_1$ 、 $Z_1$ (其耐热性顺序为 $B_1 \cdot N_1 \cdot Z_1$ ),取其茎段、花梗、花托等器官为外植体,按于晓英等(2004, 2005)的方法获得离体培养物。然后用其处于增殖期的愈伤组织(切成约 $0.5\text{ cm}^2$ 的小块)和丛生芽(带3~5个小芽)进行耐热无性系的离体筛选。

### 1.2 胁迫压的选择

1.2.1 温度的选择 将处于增殖期的离体培养材料放在恒温光照培养箱中,温度设为30、35和40,光照 $2\,000\text{ lx}$ , $10\text{ h/d}$ ,设室温( $17 \pm 2$ )为对照。经不同时间高温处理后的材料再放于室温下进行恢复培养,21 d后统计存活率与增殖率,同时将能够恢复生长的进行继代培养。每个处理取10瓶,每瓶3~5个愈伤组织和丛生芽块,3次重复(光照条件,室温和处理重复数,下同)。

1.2.2 渗透胁迫浓度的选择 选择羟脯氨酸(HYP)作为渗透胁迫选择剂,将愈伤组织和丛生芽分别培养在含有0、10、20、30、40、50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HYP的A4培养基(于晓英等,2004, 2005)中。培养3周后,逐步去掉选择压,再培养21 d。

相对生长量(%) = (处理材料的终质量 - 始质量) / 处理材料的始质量  $\times 100$ ; 相对生长率(%) = (处理材料的相对生长量 / 未处理材料的相对生长量)  $\times 100$ 。材料没有完全变褐,仍有绿色或米黄色或乳白色的组织为存活。存活率(%) = 存活数 / 接种块数  $\times 100$ , 增殖率(%) = 增殖芽数 / 接种丛生芽数  $\times 100$ 。

### 1.3 耐热系的筛选

直接筛选: 将继代培养1周左右处于增殖期的胚性愈伤组织和丛生芽块在40 胁迫下培养20 h,然后恢复到室温培养21 d,选取存活的愈伤组织和丛生芽块用同样的方法再筛选2~3代。

HYP与温度胁迫结合筛选: 将继代培养1周左右处于增殖期的愈伤组织和丛生芽块接种到含有30  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HYP的培养基上,室温培养20 d。将能够恢复生长的材料转接到含有20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HYP的培养基室温培养1周,然后在40 胁迫下培养20 h,再将能够恢复生长的材料转到含有10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HYP的培养基上恢复生长。21 d后将能够增殖的材料在40 20 h胁迫下再复筛1~2代。

### 1.4 植株再生及移栽苗初步鉴定

将筛选存活下来的愈伤组织和丛生芽进行增殖和根的诱导(于晓英等,2004, 2005),使其形成完整植株,并将入选系在40 (24 h)胁迫,进一步进行耐热性鉴定。

将入选系及其对照母株生长健壮一致的再生苗移栽到装有相同基质的花盆中(各60株),在相同条件下进行栽培,30~40 d后检测气孔指数(刘艳菊和李承森,2000),热害指数(贾开志和陈贵林,2005),叶片细胞电解质伤害性外漏率和丙二醛含量(王惠群等,1996),过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性(陈立松和刘星辉,1997)。

## 2 结果与分析

### 2.1 选择压

2.1.1 胁迫温度及胁迫时间 几个材料的愈伤组织和丛生芽块的生长在30 10~98 h、35 10 h和40 8 h胁迫后受到的抑制作用很小,存活率均在90%以上,35 66 h和40 24 h胁迫后存活率急剧下降,35 94 h后,来自母株编号为 $B_1$ 和 $N_2$ 的材料存活率为0;40 8~24 h胁迫,存活率随着胁迫时间延长而快速下降。解除胁迫后,愈伤组织恢复能力明显低于丛生芽块,且热处理时间越

长, 恢复能力越差, 相对生长率越低, 新芽分化越迟, 数目越少。结果表明, 40 选择压力较大, 使材料到半致死的时间比较短, 避免了因胁迫压低、培养时间长而出现的生理适应。认为 40 16~20 h是瓜叶菊耐热变异无性系离体筛选的适宜温度和时间。

2.1.2 HYP浓度 试验中几个材料的愈伤组织和丛生芽块在含有 10 mmol·L<sup>-1</sup>和 20 mmol·L<sup>-1</sup> HYP的培养基中培养 3周后仍有较高的存活率, 相对生长率也比较高 (47.8%); HYP 30 mmol·L<sup>-1</sup>时存活率 41.5%; HYP 40 mmol·L<sup>-1</sup>时大部分材料发生褐化, 存活率仅为 16.1%, 在 50 mmol·L<sup>-1</sup> HYP中培养 1周后, 大量的材料出现褐化, 3周后存活率均为 0。为了提高筛选的效率, 又要维持一定数量的选择群体, 认为 HYP 30 mmol·L<sup>-1</sup>是适宜的离体筛选浓度。

## 2.2 瓜叶菊耐热无性系的获得

2.2.1 直接筛选获得 3个材料的愈伤组织和丛生芽经过 40 20 h胁迫 3次筛选后, 只有 Z<sub>1-1-1</sub>的丛生芽块和愈伤组织各有 1个存活, 分别编号为 Z<sub>1-1-1</sub>、Z<sub>1-1-2</sub>, N<sub>1</sub>的愈伤组织有 1块存活, 编号为 N<sub>1-1-1</sub>。

2.2.2 HYP与温度胁迫结合筛选获得 经过 HYP与温度胁迫结合进行第 3次筛选时, 来自 B<sub>1</sub>母株的材料已全部变褐死亡, 来自 Z<sub>1</sub>的丛生芽和愈伤组织还有小部分存活。到第 4次筛选时, Z<sub>1</sub>的愈伤组织还有 1块存活, 编号为 Z<sub>1-2-1</sub>, N<sub>1</sub>的愈伤组织有 2块存活, 分别编号为 N<sub>1-2-1</sub>、N<sub>1-2-2</sub>。

2.2.3 初选系植株再生及耐热性比较 将 Z<sub>1-1-1</sub>、Z<sub>1-1-2</sub>、Z<sub>1-2-1</sub>、N<sub>1-1-1</sub>、N<sub>1-2-1</sub>、N<sub>1-2-2</sub>按照于晓英等 (2004, 2005) 的方法进行增殖及芽的分化和根的诱导培养, 在培养过程中 N<sub>1-1-1</sub>、Z<sub>1-1-2</sub>没有获得再生植株。

将获得的 Z<sub>1-1-1</sub>、Z<sub>1-2-1</sub>、N<sub>1-2-1</sub>、N<sub>1-2-2</sub>再生植株进一步在 40 温度下持续热胁迫 24 h, 然后恢复到室温培养 20 d, 结果发现 Z<sub>1-1-1</sub>的存活率高达 63.3%, N<sub>1-2-1</sub>的存活率可达 40%, 而 Z<sub>1-2-1</sub>及 N<sub>1-2-2</sub>和它们的母株 Z<sub>1</sub>和 N<sub>1</sub>已全部受伤致死。初步确定 Z<sub>1-1-1</sub>和 N<sub>1-2-1</sub>为耐热入选系。

## 2.3 耐热无性系的初步鉴定

2.3.1 性状比较 将长根后的试管苗移栽到花盆中, 培养 30~60 d后 (2005年 8月) 发现 Z<sub>1-1-1</sub>和 N<sub>1-2-1</sub>能较好地忍耐当地 7~8月高温。

从表 1可以看出, Z<sub>1-1-1</sub>和其母株 Z<sub>1</sub>叶片大小没有差别, 但叶基厚度、气孔指数、栅栏组织/海绵组织比值大于母株, 其栅栏组织不仅比母株厚, 而且排列也更整齐致密。正常栽培管理条件下, 进入花期后, 无性系 Z<sub>1-1-1</sub>和母株 Z<sub>1</sub>在花色、花径大小、开花时间方面没有差别。Z<sub>1</sub>母株进入盛花期时, 筒状花上有很多金黄色的花粉, 结实率 85%以上。而 Z<sub>1-1-1</sub>从始花到谢花期间, 一直未看到有花粉散出, 但剥开花药后可看到有花粉, 只是花粉的畸形率高达 40% (图 1), 给 Z<sub>1-1-1</sub>人工授予 Z<sub>1</sub>的花粉后, Z<sub>1-1-1</sub>的结实率也仅 1.0%。对于这一变异的机制有待进一步的研究。

N<sub>1-2-1</sub>和其母株 N<sub>1</sub>比较, 除了气孔指数高于母株外, 叶片大小, 叶柄长度、叶基厚度、栅栏组织/海绵组织比值与母株没有差别 (表 1)。正常栽培管理条件下进入花期后, N<sub>1-2-1</sub>的花器官发育情况 (开花时间、花色、花径大小、花的育性) 和其母株基本一致。

表 1 耐热无性系再生苗适温下的性状表现 (移栽后 30 d)

Table 1 Characteristics performance of heat-tolerant clonal lines under optimal temperature (transplanted after 30 d)

材料编号 Materials	叶尖厚度 Thickness of tip of leaf(mm)	叶基厚度 Thickness of leaf base (mm)	叶片长度 Length of leaf (cm)	叶片宽度 Width of leaf (cm)	栅栏组织/海绵组织 Thickness of palisade tissue/ Thickness of spongy tissue	气孔指数 Stomata index
Z <sub>1</sub>	0.31 ±0.21 a	1.47 ±0.40 a	4.47 ±0.56 a	4.37 ±0.58 a	0.24 ±0.23 a	0.10 ±0.11 a
Z <sub>1-1-1</sub>	0.46 ±0.25 b	1.87 ±0.54 b	4.38 ±0.48 a	4.30 ±0.53 a	0.38 ±0.27 b	0.18 ±0.15 b
N <sub>1</sub>	0.25 ±0.21 a	1.17 ±0.40 a	6.02 ±0.56 a	5.99 ±0.58 a	0.27 ±0.23 a	0.08 ±0.11 a
N <sub>1-2-1</sub>	0.25 ±0.25 a	1.19 ±0.54 a	5.90 ±0.48 a	6.00 ±0.53 a	0.28 ±0.27 a	0.13 ±0.15 b

注: 不同小写字母代表不同材料间存在  $P=0.05$  显著性差异。下同。

Note: The different letters are significantly different at 5% level. The same below.

2.3.2 耐热性比较 将正常培养 30 d 的移栽苗进行 40 24 h 的胁迫处理，解除热胁迫 7 d 后， $Z_{1-1-1}$  和  $N_{1-2-1}$  的热害指数、电解质伤害性外漏率和 MDA 含量显著低于其母株，说明其耐热性有所提高，在热胁迫后细胞膜过氧化程度较低，能保持较好的稳定性；细胞保护酶 SOD、POD 活性也明显高于其母株（表 2）；植株几乎看不到明显的伤害症状（图 2）。

表 2 40 24 h 胁迫后的热害指数、细胞膜稳定性和保护酶活性

Table 2 Heat injury index, heat stability of membrane and activity of POD and SOD after HS (40 24 h)

材料编号 Materials	热害指数 Heat injury index	电解质伤害性外漏率 Electrolyte leakage (%)	MDA ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ )	POD ( $\text{U} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ )	SOD ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ )
$Z_1$	0.82 $\pm$ 0.15 a	83.71 $\pm$ 2.57 a	1.22 $\pm$ 0.25 a	0.63 $\pm$ 0.28 a	210.30 $\pm$ 45.0 a
$Z_{1-1-1}$	0.16 $\pm$ 0.10 b	52.72 $\pm$ 2.16 b	0.66 $\pm$ 0.17 b	1.62 $\pm$ 0.22 b	378.60 $\pm$ 51.0 b
$N_1$	1.00 $\pm$ 0.16 a	94.50 $\pm$ 2.51 a	1.62 $\pm$ 0.22 a	0.53 $\pm$ 0.23 a	150.10 $\pm$ 37.0 a
$N_{1-2-1}$	0.33 $\pm$ 0.12 b	63.80 $\pm$ 2.12 b	0.89 $\pm$ 0.14 b	1.32 $\pm$ 0.20 b	301.50 $\pm$ 45.0 b

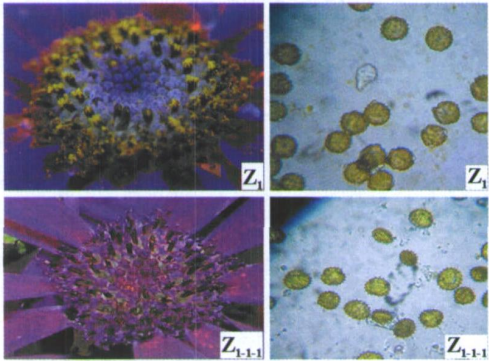


图 1  $Z_{1-1-1}$  和  $Z_1$  的花和花粉  
Fig 1 Flower and pollen of  $Z_{1-1-1}$  and  $Z_1$

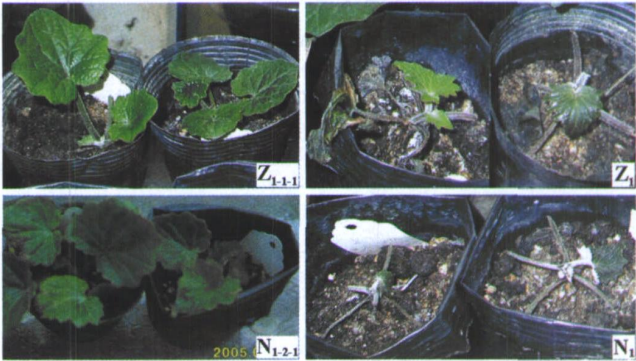


图 2 30 d 移栽苗的耐热性比较  
Fig 2 Comparison of heat tolerance among plantlets transplanted after 30 d (40 24 h)

References

Chen Li-song, Liu Xing-hui 1977. Kinds of identification index for plant heat resistance. Agricultural Research in the Arid Areas, 15 (4): 72 - 77. (in Chinese)

陈立松, 刘星辉. 1977. 植物抗热性鉴定指标的种类. 干旱地区农业研究, 15 (4): 72 - 77.

Jia Kai-zhi, Chen Gui-lin 2005. Tolerance of different eggplant varieties at seedling stage to high temperature stress. Chinese Journal of Ecology, 24 (1): 398 - 401. (in Chinese)

贾开志, 陈贵林. 2005. 高温胁迫下不同茄子品种幼苗耐热性研究. 生态学杂志, 24 (1): 398 - 401.

Liu Yan-ju, Li Cheng-sen 2000. On metasequoia in eocene age from Liaoning province of northeast China. Acta Botanica Sinica, 42 (8): 873 - 878. (in Chinese)

刘艳菊, 李承森. 2000. 中国辽宁省始新世水杉的研究. 植物学报, 42 (8): 873 - 878.

Wang Hui-qun, Sun Fu-zeng, Peng Ke-qin, Sun Zhi-ying 1996. Effects of submergence treatments on membrane lipid peroxidation and permeability of rice leaf. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 22 (3): 222 - 224. (in Chinese)

王惠群, 孙福增, 彭克勤, 孙志英. 1996. 淹水处理对水稻叶片膜脂过氧化作用及细胞透性的影响. 湖南农业大学学报, 22 (3): 222 - 224.

Yu Xiao-ying, Lu Xiang-yang, Long Yue-lin, He Shao-bo, Ren Xiang-li, Li Xiang-ting 2005. In vitro culture and plant regeneration of pedicel and receptacle of *Senecio x hybridus*. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 31 (4): 399 - 401. (in Chinese)

于晓英, 卢向阳, 龙岳林, 何少波, 任向丽, 李向婷. 2005. 瓜叶菊花梗和花托愈伤组织的诱导与植株再生研究. 湖南农业大学学报, 31 (4): 399 - 401.

Yu Xiao-ying, Lu Xiang-yang, Wu Tie-ming, Li Xiang-ting, Ren Xiang-li, Cao-hui 2004. In vitro culture and high frequency propagation of *Senecio x hybridus*. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 30 (5): 429 - 433. (in Chinese)

于晓英, 卢向阳, 吴铁明, 李向婷, 任向丽, 曹辉. 瓜叶菊的离体培养与快速繁殖. 湖南农业大学学报, 2004, 30 (5): 429 - 433.