

快中子辐射诱变和盐培养基选择红豆 草耐盐愈伤组织变异系的研究

谷祝平 郑国锴

(兰州大学细胞生物学研究室, 兰州)

用中子通量为 1.85×10^{11} — 1.56×10^{13} N/cm²的快中子辐射生长旺盛的红豆草愈伤组织, 然后转移至含30、40、50、60和70%海水的LS-1固体培养基上进行选择。选择得到的TS-9050、TS-1150和TS-1460三个耐盐变异系, 抗盐性有显著提高, 并在含70%的海水培养基上保持了分化为再生植株的能力。

关键词 快中子辐射; 抗盐愈伤组织变异系; 盐适性蛋白

利用电离辐射诱发变异并进行选择, 作为一种新的育种手段已广泛应用于农业生产, 并显示出巨大的经济效益。近年来, 利用植物组织培养及所产生的愈伤组织进行抗性变异系的诱导和选择, 进而进行特异蛋白质的分离和抗性基因的克隆, 已成为植物细胞工程和基因工程中十分活跃的新领域, 尤其是对于耐盐变异系的选择引起了不少学者的关注^[1]。但利用 γ 射线、快中子辐射技术诱发植物愈伤组织的耐盐变异系则还是一种新的尝试。

红豆草是一种在我国北方省(区)广泛种植的优良牧草, 但这些地区大面积盐碱荒漠地的存在限制了红豆草及其他优良牧草的种植。在组织培养过程中利用快中子辐射进行耐盐愈伤组织变异系的诱变和选择, 培育耐盐的红豆草品系, 对于促进这些地区农牧业生产的发展, 改善生态环境具有重要意义。本文将报道利用快中子辐射诱导和选择耐盐愈伤组织变异系的结果。

草 (*Onobrychis viciaefolia* Scop), 以幼茎茎段为外植体在LS-1固体培养基(LS基本培养基, 加1mg/L BA和1mg/L KT, 蔗糖浓度为3%)上诱导产生疏松愈伤组织, 并通过继代培养使愈伤组织大量增加^[2-5]。把愈伤组织切成2mm见方的小块, 置于直径为12cm塑料培养皿内的LS-1固体培养基上, 培养3—5天后用不同剂量的快中子辐射, 被辐射的17个培养皿, 中子通量从 1.85×10^{11} — 1.56×10^{13} N/cm²不等, 辐射后二周, 统计并计算每个培养皿中愈伤组织的成活率(成活的愈伤组织块数÷接种的愈伤组织总块数×100%), 并确定快中子辐射愈伤组织的半致死剂量。然后选取生长良好的愈伤组织, 转移到含有不同浓度人工海水的LS-1固体培养基上进行培养和选择, 选择培养基的人工海水浓度分别为30、40、50、60和70%。在上述人工海水培养基上培养4周后, 分别转移到同等浓度或更高浓度的

材料与方 法

供试品种为甘肃地区栽培的普通红豆

本文于1989年6月16日收到。

本研究为国家自然科学基金资助项目。

安五英参加了部分实验, 贾毓峻进行了快中子辐射处理, 特此致谢。

海水培养基上进行继代培养,以选择耐盐愈伤组织突变系。

实验结果

(一)不同剂量快中子辐射后红豆草愈伤组织的变化及成活率

经 1.56×10^{13} — 1.85×10^{11} N/cm²不同剂量快中子辐射后的愈伤组织,最初1—2天未发现明显的变化,3天之后,经高剂量辐射的愈伤组织大部分开始变为褐色,逐渐死亡,经低剂量辐射的愈伤组织,其中大部分继续生长增大,并保持绿色,少部分逐渐变褐死亡。15天后,成活率显示出明显的差异(表1)。实验表明,红豆草愈伤组织具有较强的抗辐射能力, 2.66×10^{11} N/cm²以下的中子通量对其影

表1 不同剂量快中子辐射后第15天愈伤组织成活率

Table 1 The frequency of sainfoin callus at the 15th day after radiation of fast neutron at different radiation dose

样品编号 No. of sample	距放射源中心距离 Distance from center of radioactive source (cm)	快中子辐射剂量 Radiation dose of fast neutron (N/cm ²)	愈伤组织成活率 The frequency of sainfoin callus (%)
1	3.20	1.56×10^{13}	40.6 ± 3.1
2	4.84	6.83×10^{12}	53.6 ± 6.3
3	6.48	3.81×10^{12}	59.5 ± 5.7
4	8.12	2.43×10^{12}	61.8 ± 5.4
5	9.76	1.68×10^{12}	63.5 ± 4.9
6	11.40	1.23×10^{12}	64.8 ± 6.0
7	13.04	9.41×10^{11}	62.8 ± 7.3
8	14.68	7.46×10^{11}	71.8 ± 6.2
9	16.32	6.01×10^{11}	76.8 ± 7.1
10	17.96	4.96×10^{11}	72.1 ± 4.5
11	19.60	4.16×10^{11}	85.2 ± 6.6
12	21.24	3.55×10^{11}	85.1 ± 7.8
13	22.88	3.06×10^{11}	87.1 ± 6.7
14	24.52	2.66×10^{11}	89.8 ± 7.4
15	26.12	2.34×10^{11}	89.6 ± 6.9
16	27.80	2.07×10^{11}	92.2 ± 4.7
17	29.44	1.85×10^{11}	94.3 ± 6.5

响较小,成活率约为90%以上,愈伤组织半致死剂量的范围约在 1.56×10^{13} — 3.81×10^{12} N/cm²之间。

(二)耐盐愈伤组织变异系的选择

经不同剂量快中子辐射的愈伤组织培养2周后,分别转入含30、40、50、60和70%的海水培养基中,经3周培养,发现转入的大部分愈伤组织块死亡或生长极慢,但有极少数愈伤组织块长势很好,生长速度快,形成直径达10—15mm的绿色团块,然后选取这种愈伤组织切成直径约2mm的小块转入含相同浓度海水的培养基中培养和选择。用这种方法选择了5个耐盐愈伤组织变异系,其选择来源及过程如表2所示。

实验表明,选择愈伤组织变异系的快中子合适辐射剂量为 7.46×10^{11} — 2.66×10^{11} N/cm²。当把经半致死剂量(1.56×10^{13} — 3.81×10^{12} N/cm²)辐射并培养2周后的愈伤组织转入30—70%海水的培养基上,经3周培养后发现愈伤组织90%以上死亡,少数存活的愈伤组织块生长极缓慢。经低剂量(2.34×10^{11} — 1.85×10^{11} N/cm²)辐射的愈伤组织,转入30—70%海水培养基后,其生长率及存活率与未经快中子辐射的愈伤组织无明显差异,很少发生耐盐变异。对于选择耐盐变异系来说,选择培养基的海水浓度以40—60%较为合适,浓度在40%以下,就失去了选择的意义,例如,TS-8030变异系,虽然30%海水培养基选择后有21.4%的愈伤组织存活,但当转入60%的海水培养基后,生长率很低,比对照略高。而当选择培养基的海水浓度为70%时,愈伤组织就很难存活下来。

经过选择的耐盐愈伤组织变异系TS-8040, TS-9050, TS-1150, TS-1460,在60%海水培养基上进行耐盐性检验,测定

表 2 耐盐愈伤组织变异系的选择

Table 2 The selection of salt-tolerant variant callus line

耐盐愈伤组织变异系 Variant line of salt-tolerant callus	辐 射 剂 量 Radiation dose (N/cm ²)	选择培养基海水浓度 Concentration of ASW in selection medium (%)	供选择愈伤组织块数 Nos. of callus for selection	被选择耐盐组织块数 Nos. of selected callus
TS-8030	7.46×10^{11}	30	28	6
TS-8040	7.46×10^{11}	40	26	1
TS-9050	6.01×10^{11}	50	26	2
TS-1150	4.16×10^{11}	50	29	3
TS-1460	2.66×10^{11}	60	29	1
—	4.16×10^{11}	70	27	0

前4周愈伤组织的生长率,并且与未选择愈伤组织以及未经快中子辐射,只在海水浓度逐渐增加的培养基上多次转移自然选择的耐盐愈伤组织进行比较。从图1中可以看出:

(1)与未经辐射及选择的愈伤组织相比,有4个耐盐愈伤组织变异系在60%海水培养基上的生长率大大提高,即具有较高的耐盐性。

(2)与未经辐射只用盐浓度梯度培养

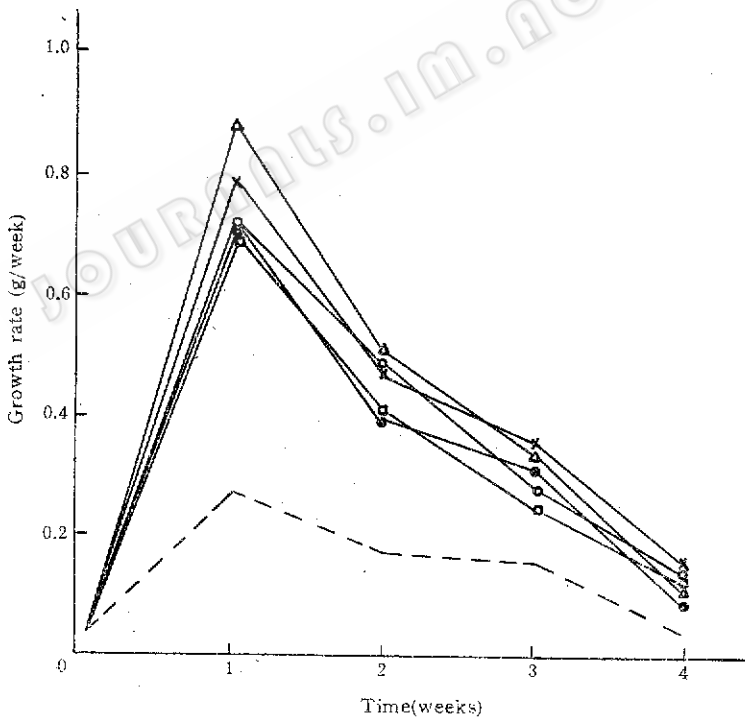


图 1 在60%海水培养基上耐盐愈伤组织变异系及对照的生长率
Fig.1 Growth rate of selected salt-tolerant callus and control on medium containing 60% artificial seawater

---- 对照(未选择愈伤组织) Control (non-selected callus)

• 含盐培养基自然选择愈伤组织 Natural selected callus by salt-containing medium
愈伤组织变异系 Variant callus line,

□ TS-8040 △ TS-9050 × TS-1150 • TS-1460

基自然选择的耐盐突变系比较,经辐射诱变选择的4个抗盐愈伤组织变异系中,有一个变异系的生长率曲线与自然选择变异系大致相仿,而其余3个变异系的生长率明显高于自然选择变异系,这说明对于选择耐盐变异系来说,使用快中子辐射诱变选择的方法比使用盐浓度梯度培养基自然选择的方法更为有效,所选择的耐盐愈伤组织变异系看来具有更高的耐盐性。

(3)经不同剂量快中子辐射及不同浓度海水培养基选择的耐盐愈伤组织变异系其耐盐性也有差异。经较高剂量($6.01 \times 10^{11} \text{N/cm}^2$)辐射及50%海水培养基选择的TS-9050系具有最高的耐盐性。但辐射剂量为 $7.46 \times 10^{11} \text{N/cm}^2$,只经30%海水培养基选择的TS-8030系其耐盐性最低,仅比对照略高一些。

(三)耐盐愈伤组织的分化和再生植株的形成

在40—70%海水培养基上经多次继代培养和选择的耐盐愈伤组织变异系,当分别转移到含40—70%海水的LS-2分化培养基(LS基本培养基添加1mg/L BA,蔗糖浓度下降为1.5%)上进行分化培养,30天后在这种愈伤组织中出现体细胞胚,50天左右便有完整的再生植株形成,表明经快中子辐射及在含40—70%海水培养基上多次继代和选择的耐盐愈伤组织变异系仍保持了分化能力,即使在70%的海水培养基上仍能形成完整植株。

讨 论

利用植物细胞培养和组织培养技术及诱变技术,诱导和选择细胞、愈伤组织变

异系的研究在水稻、烟草、苜蓿、红豆草、蕃茄等植物中已得到了耐盐愈伤组织或细胞变异系,并且在小麦、水稻、冰草和芋中得到了耐盐植株^[6-11]。我们利用盐梯度培养基自然选择法已选择出了红豆草耐盐愈伤组织变异系及耐盐再生植株(已另文报道)^[4]。

利用 γ 射线、快中子辐射植物种子,选育变异系在农业中已广泛应用,但辐射愈伤组织选择突变系的报道不多。我们的实验表明,利用快中子辐射诱导及海水培养基选择,能够有效地选择出耐盐变异系,用此法比盐浓度梯度海水培养基自然选择法大大缩短了选择时间,而且所选择的耐盐变异系具有较高的耐盐性。其抗盐性与快中子的辐射剂量有关,过高或过低的快中子通量都不利,在我们的实验中用中子通量为 $6.01 \times 10^{11} \text{N/cm}^2$ 的快中子辐射诱变得到了耐盐性最高的TS-9050变异系。

Ramagopa等在培养的耐盐细胞中都发现了分子量为26000或66000的盐适性蛋白,有的作者已测定出相应的mRNA含量的增高^[10]。植物细胞在选择胁迫条件下,胁迫性蛋白及其mRNA的大量产生被认为是由于在选择过程中抗性基因功能的扩增或基因表达调节的结果^[12]。有人已经成功地从矮牵牛中分离出了除莠剂抗性蛋白并进行了氨基酸顺序分析,并从由培养物制备的cDNA库中分离出了这种抗性基因,通过Ti双质粒pMON505成功地转入了矮牵牛植物,并使这种基因得到了表达^[13]。研究抗性的遗传机理方面的工作还有待进一步进行。

参 考 文 献

- [1] 周荣仁, 曲阜师院学报(植物抗盐生理专刊), pp.63—83, 1984.
 [2] 谷祝平, 郑国辑, 实验生物学报, 20(1):23—29, 1987.
 [3] 谷祝平, 郑国辑, 实验生物学报, 20(2):149—154, 1988.
 [4] 谷祝平, 郑国辑, 植物细胞工程应用基础研究进展, 学术期刊出版社, 1989.
 [5] Gu Zhuping: *Annals of Botany*, 60:309—313, 1987.
 [6] Crougham, T.P. et al.: *Crop Sci.*, 18:950—963, 1978.
 [7] Kingshry, R.W. and Epstein, E.: *Crop Sci.*, 24:310—315, 1984.
 [8] Kochba, J. et al.: *Z.Pflanzenphysiol.*, 106:111—118, 1982.
 [9] Nabors, M.W. et al.: *Z.Pflanzenphysiol.*, 97:13—17, 1980.
 [10] Wated, A.A. et al.: *Plant Physiol.*, 73(3):624—629, 1983.
 [11] McGuire, P.E. and J. Dvorak: *Crop Sci.*, 21:702—705, 1981.
 [12] Shan, D.M. et al.: *Science*, 233:478—481, 1986.
 [13] Horsch, R. et al.: *Plant Tissue and Cell Culture*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp.317—329, 1987.

Selection for Salt-tolerant Callus of Sainfoin by Radiation of Fast Neutron and Culture on Medium Containing Salt

Gu Zhuping Zheng Guochang

(Cell Biology Laboratory, Lanzhou University, Lanzhou)

Callus of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop) was radiated by fast neutron at 1.85×10^{11} — 1.56×10^{13} N/cm², and then was transferred on LS-1 solid medium containing 30%, 40%, 50%, 60% or 70% artificial seawater (ASW) and selected. Selected salt-tolerant callus lines TS-9050, TS-1150 and TS-1460 have higher salt-resistant than control and the potentiality of differentiation into whole plantlet on LS-2 solid medium containing 40—70% artificial seawater.

Key words

Fast neutron; salt-tolerant callus line; salt-adapted protein