

14

S7P2.1170

毛白杨愈伤组织悬浮细胞耐盐性研究

Q74P.733

赵素然, 梁宇, 李德森, 王颖, 杜荣骞

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 把生长在全盐含量为 0.361‰ 的土壤中的毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.) 愈伤组织悬浮细胞培养在含不同浓度 NaCl 的液体培养基中, 定期测量各组的细胞密度, 根据生长曲线研究其耐盐性。结果显示, 与不加 NaCl 的液体培养基相比, 生长于含较低浓度 NaCl (2.7‰ 和 5.5‰) 液体培养基中的细胞生长较好, 而在含较高浓度 NaCl (8.2‰ 和 10.9‰) 的液体培养基中, 细胞生长受到较强抑制。

关键词: 毛白杨; 耐盐性; 愈伤组织; 悬浮细胞培养; 生长曲线

中图分类号: Q949.733.05 **文献标识码:** A

Investigation on salt tolerance of suspended cell of *Populus tomentosa* Carr.

ZHAO Su-ran, LIANG Yu, LI De-sen, WANG Ying, DU Rong-qian

(Life Science College, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The suspended cell of *Populus tomentosa* Carr. was cultivated in the medium containing NaCl of different concentration. The density of the cell was measured and the growth curve was studied. It shows that the cells cultivated in the medium with low concentration of NaCl (2.7‰ and 5.5‰) grow better than those grown in the medium without NaCl. When the cell was cultivated in the medium with NaCl of high concentration (8.2‰ and 10.9‰), the growth was inhibited obviously. The concentration of total salt in the area where the plants grew was 0.361‰.

Key words: *Populus tomentosa* Carr.; salt-tolerance; callus; suspended cell; growth curve

土壤的盐渍化会对植物造成极大的危害, 据统计, 全世界共有 38 000 万 hm^2 盐碱地, 在灌溉区还有 33 % 的次生盐渍化土壤^[1]。在我国 1 亿 hm^2 耕地中, 有十分之一为盐渍化土壤, 另外还有 0.2 亿 hm^2 的盐荒地。我国盐渍化土壤分布很广, 主要分布在华北、西北、东北西部以及从辽宁到广东的滨海地带。滨海地区的人口集中、工业发达, 但农业生产在很大程度上受

收稿日期: 1999-05-14

作者简介: 赵素然 (1954-), 女, 工程师, 南开大学生命科学学院遗传工程研究室。

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (编号: 983802511)

到土壤条件限制,同时也给绿化工作带来极大困难^[1]。在人口不断增长的今天,扩大耕地面积和提高单位面积的产量是关系到人类衣食的头等大事。提高人口聚集区的森林覆盖率,改善生态环境是保障人民身体健康的重要措施。因此,改良和利用大面积的盐渍化土壤,已成为当务之急。长期以来,国内外都投入了大量的人力和物力进行盐渍土的改良。多数运用工程措施,这些措施虽然取得了一定的成绩,但是也有一些不可克服的缺点,如费用昂贵、效果不能持久、消耗大量的淡水资源等。而运用生物学措施,研究植物耐盐性、筛选和培育耐盐植物就成了最优选择。我们以毛白杨为实验材料,应用悬浮细胞培养测定其愈伤组织在含不同浓度 NaCl 液体培养基中的生长状况,来研究细胞的耐盐性,以期对植物耐盐性的培育有所帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.) 幼茎,取自南开大学校园,在诱导培养基上诱导出愈伤组织。

1.2 培养基

1.2.1 诱导培养基 MS + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L, pH 5.8。

1.2.2 液体培养基 MS(不加琼脂)+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, pH 5.8。

1.2.3 盐胁迫液体培养基 MS(不加琼脂)+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+水解乳蛋白 0.5 g/L, pH 5.8, 每 L 分别加入 0.000 g, 3.000 g, 6.000 g, 9.000 g, 12.000 g NaCl, 配成 5 种盐胁迫培养基。

1.3 悬浮细胞培养

取愈伤组织 3 块(约 4 g)压碎后放入装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在水浴摇床上 25 °C 110 rpm 振荡暗培养 3 d。取出,静置 5 min,弃去下层大的组织块和细胞团,显微镜下观察,可见游离的细胞和较小的细胞团,即得到悬浮培养细胞。将此悬浮细胞置于水浴摇床上 25 °C 105 rpm 继续振荡暗培养 2 d,备用。

1.3.1 转移至盐胁迫培养基中 取 5 只 250 mL 三角瓶,各加入 100 mL 盐胁迫培养基及 10 mL 悬浮培养细胞,摇匀。得到 0.0%、2.7%、5.5%、8.2% 和 10.9% 5 种盐胁迫培养细胞。

1.3.2 分装培养 将上述每瓶盐胁迫悬浮培养细胞分装到 10 个小培养瓶中,每瓶 10 mL,剩余的作细胞密度测定。标记好每一培养瓶,置于水浴摇床中 25 °C, 105 rpm 暗培养。每 3 d 从每一盐浓度中取 1 瓶,测定其细胞密度。

1.3.3 细胞密度的测定 取 1 瓶待测悬浮培养细胞,摇匀。用滴管取 9 滴细胞悬浮液,滴于比色板上,再加 1 滴 2.5% 纤维素酶和果胶酶的混合酶液,25 °C 解离细胞 10~15 min,用血球计数板测其细胞密度。每一样品测 3 次,重复取样 2 次,以这 6 个值的平均数作为该悬浮培养细胞的细胞密度。

细胞密度按下式计算:

$$\begin{aligned} \text{细胞密度 (个/mL)} &= 9/5 \times (\text{5 个中格细胞总数}) \times 10^4 \times 10/9 \\ &= (\text{5 个中格细胞总数}) \times 2 \times 10^4 \end{aligned}$$

1.4 土壤样品的采集和分析

在毛白杨生长地取土样。用小铁铲取表层(0~0.5 cm)土,用开口式土壤采样器(土钻)取0.5~15 cm、15~25 cm、25~35 cm、35~45 cm、45~60 cm深度的土壤样品,风干。挑去风干后土样中的沙砾和植物残体,粉碎过筛。用重量法测各层土壤全盐量^[2]。

2 实验结果

2.1 细胞生长曲线

每3 d记录1次在不同浓度NaCl培养液中,毛白杨愈伤组织悬浮细胞的密度(见表1)。用4次多项式拟合上述5条曲线,结果见图1。得回归方程如下:

$$Y_1(\text{不含 NaCl})=5.9747+1.6428X-0.2771X^2+0.0139X^3-0.0002X^4;$$

$$Y_2(\text{含 } 2.7\% \text{ NaCl})=5.2759+3.3183X-0.3613X^2+0.0137X^3-0.0002X^4;$$

$$Y_3(\text{含 } 5.5\% \text{ NaCl})=5.5241+1.8681X-0.2798X^2+0.0140X^3-0.0002X^4;$$

$$Y_4(\text{含 } 8.2\% \text{ NaCl})=4.9005+0.6517X-0.1412X^2+0.0077X^3-0.0001X^4;$$

$$Y_5(\text{含 } 10.9\% \text{ NaCl})=5.3765-0.8683X+0.0735X^2-0.0025X^3+0.0000X^4.$$

上述5条曲线的最大值如下:

曲线1:当生长到第4.1655 d时有最大值,此时的细胞数量为895.42个;曲线2:当生长到第6.9984 d时有最大值,此时的细胞数量为1501.92个;曲线3:当生长到第5.1023 d时有最大值,此时的细胞数量为949.56个;曲线4:当生长到第3.0669 d时有最大值,此时的细胞数量为578.44个;曲线5:当生长到第0.0000 d时有最大值,此时的细胞数量为537.65个。

从以上结果可以看出,在不含NaCl的培养基中,虽然细胞能很快达到最大值,但细胞生长情况并不是最好的。在上述5种培养基中,含2.7%NaCl的培养基

中细胞生长情况最好。由图1可以看出,从开始培养起,它的生长势就很强劲,一直高于同期其它培养基中的细胞。生长到第7 d时达到最大值,细胞个数为1502个/mL。其次为含5.5%NaCl培养基中的细胞。它的各个时期的生长势仍高于不含NaCl的培养基中的细胞,当其生长到第5 d时,细胞数量达到最大值,细胞数量为950个/mL。不含NaCl培养基中的细胞生长到第4 d时,细胞数量就不再增加,只有895个/mL。含8.2%和10.9%NaCl的培养基中,细胞生长在整个培养期都受到强抑制,特别是在含10.9%NaCl的培养基中,接种后细胞数量急剧下降,虽然在培养12 d以后略有增长,但终未达到接种时的细胞量。

2.2 土壤全盐量

各层土壤含全盐量,如图2所示。60 cm土层全盐量加权平均为0.361%。

表1 含不同浓度NaCl培养液中的细胞密度($\times 10^4$ 个/mL)

Table 1 Cell density in medium with NaCl of different concentration ($\times 10^4$ 个/mL)

培养天数(d) The number of day to cultivate	NaCl 浓度 concentration (%)				
	0.0	2.7	5.5	8.2	10.9
3	11.67	13.67	10.33	5.33	4.67
6	6.33	13.00	9.33	5.67	1.00
9	6.67	14.33	6.00	4.67	2.00
12	5.67	16.00	9.00	2.00	2.00
15	4.33	9.67	6.67	2.67	2.67
18	3.33	7.67	6.67	3.00	2.00
21	5.67	9.33	8.00	3.33	2.00
24	5.33	7.67	8.67	4.67	3.00
27	5.00	6.67	10.00	4.67	2.33
30	5.00	6.33	8.33	5.00	2.67

3 讨 论

植物对盐的耐受能力与许多因素有关,而且植物在漫长的演化过程中盐生植物可以通过以下几种方式来适应环境中的盐胁迫^[1]:泌盐植物通过盐腺细胞将过多的盐分排出体外;稀盐植物通过组织肉质化稀释盐分;拒盐植物主要依靠对盐的不透性适应盐渍化环境。非盐生植物也可通过生理性适应在较低盐浓度条件下生长。虽然植物整株的耐盐性与单个细胞的耐盐性并不完全一致,但不管是那种方式的适应,在细胞水平上都应有所体现。因此,通过组织培养的方法研究愈伤组织在含盐培养基上的耐盐性,已成为研究耐盐机理和选育耐盐植物的基本手段之一。

周荣仁等^[4,5]用逐步增加 NaCl 浓度的方法,筛选出烟草 (*Nicotiana glauca*) 耐盐愈伤组织变异体,能耐 2% NaCl,但仅属于生理性适应,将耐盐愈伤组织移入无盐培养基后,其耐盐性逐渐退化。从耐 2% NaCl 的愈伤组织中再生出的植株后代再没表现出耐盐性。Croughan 等^[6]将苜蓿 (*Medicago sativa*) 子叶置于修改的 blaydes 培养基中,形成愈伤组织,然后接种愈伤组织进行液体培养,再将单细胞和小细胞团接种到含 1% NaCl 培养基中,每 5~6 周转一次培养基,共计 8 个月后培养出一个耐盐的细胞系。此耐盐系在含 1.0% NaCl 的培养基中生长量为非选择系的 4 倍。而且,耐盐系在无盐条件下生长很差,需要一定浓度的 NaCl 才能正常生长。

然而,也有许多人通过逐步提高盐浓度的方法获得可稳定遗传的植株。赵瑞堂等人^[7]将小麦花药培养愈伤组织以 0.1%、0.3% 和 0.5% 的梯度逐步增加盐浓度筛选法获得可稳定遗传的耐盐花培株系,其变异率约为 1/4。Dix^[8]对辣椒的研究也得到类似结果。

一些木本植物也可通过该途径获得耐盐突变体。王兴军等人^[9]运用逐步提高盐浓度的方法获得木槿耐盐愈伤组织,由愈伤组织再生的植株继续保持其耐盐性。张望东等^[10]利用不断提高群众杨悬浮细胞培养基中的 NaCl 浓度获得耐盐体细胞突变体。

毛白杨属轻耐盐碱植物,能在含盐 0.3% 以下的土壤中生长^[2]。本实验材料的树龄已达 10 a 以上,长期生长在盐胁迫的环境中。与生长在甜土中的同龄植株相比,植株较矮,胸径

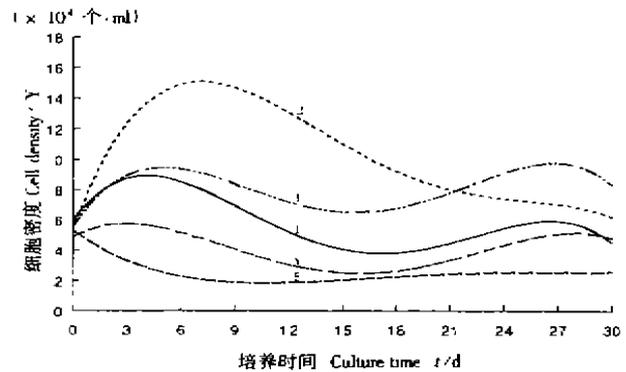


图 1 杨树悬浮细胞在不同 NaCl 浓度下的生长曲线
Fig. 1 The chromosome numbers and karyotype of *Callistephus chinensis*
1-0.0%; 2-2.7%; 3-5.5%; 4-8.2%; 5-10.9%.

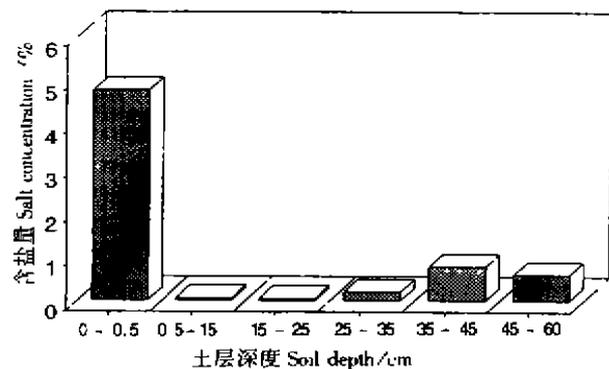


图 2 各层土壤全盐量
Fig. 2 The concentration of total salt on each layer

较小,虽能生长,显然生长受到抑制。从细胞生长状况看,植株已经适应于有盐环境。因此,悬浮培养细胞在含 2.7‰和 5.5‰NaCl 培养基中的生长状况反而好于无盐培养基中的细胞。当把适应于低盐的细胞转入高盐环境中之后,如图 1 中的曲线 3 和曲线 4,开始时尚有少量细胞增殖,形成第一个峰。由于盐离子的毒害作用,随之,细胞生长受到强烈抑制。其中少数适应高盐环境的细胞大量增殖后,形成第二个峰。进一步提高了这些细胞对盐的耐受性。

由本研究结果可以看出,通过盐胁迫作用,提高植物耐盐性,不仅在细胞水平上作用明显,在整株水平上也是很明显的。以多年生长在含盐 0.3%左右土壤中的毛白杨为外质体,诱导出耐盐愈伤组织,以及愈伤组织耐盐性的进一步提高,给我们提出一种新的思路:与用种子繁殖的物种不同,对于营养繁殖的树种,可在细胞水平上通过盐胁迫提高其耐盐性,不管这种耐盐性是遗传的还是生理的。将分化出的再生植株种植在盐土中,以保持其耐盐性,通过营养体进行繁殖,使这种耐盐特性一代代传递下去,以这种方法获得绿化树种,可以说是一种简捷有效的途径。

参考文献:

- [1] 赵可夫. 植物抗盐生理 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993
- [2] 全国盐碱土绿化开发协作组编辑委员会. 盐碱土造林绿化与综合开发文 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992
- [3] 于天仁、王振权. 土壤分析化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1988
- [4] 周荣仁、邵根福, 杨燮荣. 烟草悬浮细胞耐盐性的研究 [J]. 植物生理通讯, 1984, 5: 13~16
- [5] 周荣仁、杨燮荣、季玉鸣等. 烟草耐盐愈伤组织变异体对盐渍的适应性 [J]. 植物生理学报, 1993, 2: 188~194
- [6] Croughan T P, Stavarek S J, Rains D W. Selection of a NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells [J]. *Crop Sci.*, 1978, 18: 959~963
- [7] 赵瑞堂, 高书国、乔亚科等. 花药培养在小麦耐盐育种上的应用研究 [J]. 作物学报, 1995, 21 (2): 230~234
- [8] Dix P J, Pearce R S. Proline accumulation in NaCl-resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris* [J]. *Z Pflanzen physiol.* 1981, 102: 243~248
- [9] 王兴军, 姚敦义. 运用多步正选择系统筛选木槿耐盐突变体 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30 (1): 22~24
- [10] 张望东, 张绮纹. 群众杨悬浮细胞系的建立和耐盐体细胞变异体的初步筛选 [J]. 林业科学, 1994, 30 (5): 412~418