

文章编号:1003-8701(2010)02-0014-03

百脉根试管苗对NaCl的敏感性检测

谭化¹,高明¹,于淑梅¹,韦正乙¹,李海云¹,刘艳芝^{1*},张东良²

(1. 吉林省农业科学院生物技术中心,长春 130033; 2. 吉林省抚松县农业局,吉林 抚松 134500)

摘要:各种植物对NaCl都具有一定的敏感性。本实验利用野生型百脉根组织培养再生苗为研究材料,在附加不同浓度NaCl的MS培养基上观察其生长及生根状态,确定百脉根试管苗对NaCl的临界耐受能力,目的是为筛选耐盐基因百脉根抗盐性植株提供实验依据,同时也可以初步检测所克隆基因的耐盐效果。实验结果:NaCl浓度为0.7%以上的处理,试管苗叶片发白,长势弱,不生根或根停止伸长变褐;NaCl浓度为0.7%(不包括0.7%)以下的处理中,试管苗叶片绿色,长势旺盛,根系较多,与对照(NaCl浓度为0)试管苗状态接近。

关键词:百脉根;NaCl浓度;生长及生根

中图分类号:S541+.6

文献标识码:A

Detection of NaCl Tolerance of *Lotus corniculatus* L. Regenerants

TAN Hua¹, GAO Ming¹, YU Shu-mei¹, WEI Zheng-yi¹, LI Hai-yun¹, LIU Yan-zhi^{1*}, ZHANG Dong-liang²

(1. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033;

2. Bureau of Agricultural of Fusong County Jilin Province, Jilin Fusong 134500, China)

Abstract: Most plants are sensitive to NaCl. In order to identify the NaCl tolerance of *Lotus corniculatus* L. regenerants in vitro, the growth and rooting of these regenerants cultured in the MS medium supplemented with different concentration NaCl were determined in the experiment. The results showed that plants grew slowly and could not rooting, their leaves turned white when NaCl concentration was above 0.7%. When NaCl concentration was below 0.7%, the plants grew as same as the control. This method could be used in identifying salt tolerance of transgenic plants.

Keywords: *Lotus corniculatus* L.; NaCl concentration; Growth and rooting

百脉根(*Lotus corniculatus* L.)属于豆科蝶形花亚科百脉根属,是一种优良牧草。自上世纪90年代初,由于百脉根花量大、自交结实、种子结实率高,较易得到稳定遗传后代,并且基因组测序已完成,国际上广泛将其作为豆科的模式植物进行研究。同时百脉根组织培养体系较为完善,转基因植株再生速度快,转化率高,目前被广泛用于新基因的功能鉴定。

耐盐性,指植物能耐受高浓度盐类环境而生长发育的性质。据报道,世界上有1/3的农田因含高的盐分,而导致农作物的生长不良甚至减产^[1],

因此国内外学者广泛开展了植物耐盐机理的研究,克隆了一些与植物耐盐性相关的基因,并通过转基因技术,获得了一批耐盐性提高的转基因植物^[2-7]。

但由于植物耐盐性是一个受多基因控制的复杂性状^[8],受植物种类、品种基因型和内部生理生化反应的影响,因此快速鉴定新基因是否具有耐盐功能是一个很重要的问题。本实验是通过向培养基中附加不同浓度NaCl,胁迫百脉根试管苗,从苗和根的生长状态初步确定百脉根对NaCl的耐受程度。实验结果可作为转基因植株耐盐性筛选依据,并初步验证所克隆基因的耐盐效果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为北方型百脉根种子(由吉林省农

收稿日期:2009-10-17;修回日期:2009-11-09

基金项目:本研究由抗逆聚合表达载体的构建及在模式中功能验证(20060548)项目资助

作者简介:谭化(1980-)技术员,主要从事模式植物转基因研究。

通讯作者:刘艳芝,副研究员,E-mail: liuyz_g@yahoo.com.cn

科院畜牧分院草地所提供)。

1.2 百脉根无菌苗的获得

百脉根成熟饱满种子,用 75%乙醇浸泡 2 min,0.1%升汞溶液消毒 20 min,无菌水冲洗 4 次,再用无菌水浸泡 24 h 后,置于放有湿润滤纸的培养皿中,光照培养 2 d 后,将发芽种子接种于 MS₀ (MS 基本培养基,不加激素,3%蔗糖,0.8%琼脂,pH 值 6.0)培养基,培养条件为 25~26℃,每日光照 12 h,光强 2 000 lx。

1.3 无菌苗子叶再生植株

7 d 左右取无菌苗子叶,顶端切去 1/3,近轴面向上接种于 L₂(MS + 6BA 0.1 mg/L + 3%蔗糖 + 0.8%琼脂,pH 值 6.0)培养基。2 周左右子叶基部可诱导出丛生芽,将约 10 cm 高的不定芽切下,转入无激素的 1/2MS 培养基诱导生根,1 周左右即可长出 1~3 条白色的幼根。

1.4 再生苗切段对 NaCl 的敏感性

将再生苗切成段(每段都必须有一个叶芽)接种于 MS₀ 培养基,扩繁再生苗用于不同浓度 NaCl 的敏感性实验。当再生苗扩繁到足够量,从每个再生苗顶部以下的第 3 个节间处切断,取上部苗(生长状态相对一致)接种于附加 NaCl 浓度为 0%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%的 MS₀ 培养基上,4 周后观察试管苗生根情况。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 百脉根无菌苗子叶再生植株

子叶接种于诱导培养基,3 d 外植体变厚、膨大,1 周即可见不定芽产生,最先出现不定芽的部位是子叶基部,随后子叶的边缘也产生不定芽。从产生不定芽的数量上看,子叶基部较边缘的分生能力强。不定芽产生后,可将整块外植体转入 MS₀ 培养基,避免不定芽及外植体出现玻璃化现象。3 周左右将 10 cm 高不定芽转入新的 MS₀ 培养基生长,当再生苗有 3 个以上节间时即可切段扩繁。

2.2 再生苗切段对不同 NaCl 浓度的敏感性反应

NaCl 浓度为 1.5%和 1.4%的处理中,再生苗切段在接种 2 d 即失水发黄,逐渐的叶片发白脱落,不生长也不生根;NaCl 浓度为 1.3%和 1.2%的处理中,再生苗切段并未立即出现反应,2 周时可见生长受到抑制,4 周时基部叶片发黄脱落,顶端叶片发白,再生苗切段略有生长,不生根;NaCl 浓度为 1.1%、1.0%和 0.9%的处理中,再生苗切段的表现相对一致,叶片发白,有生长势,不生根,随

着 NaCl 浓度的下降,叶片颜色逐渐加深;NaCl 浓度为 0.8%和 0.7%的处理,再生苗切段的生长势及叶片颜色都与对照(NaCl 浓度为 0%)接近,并且都有生根苗,不同的是 0.8%处理的苗,根的生长受到抑制,根由最初的白色逐渐变褐,最后停止生长,0.7%处理的苗根一直处于生长状态,只是生根的苗仅为 30%左右;NaCl 浓度为 0.6%、0.5%、0.4%和 0.2%的处理,再生苗切段的生长势及生根状况与对照区别很小,只是 0.6%处理苗生长势较弱一些,相反 0.5%和 0.4%处理苗的生长势较对照要好,只是根的数量较对照少一些(所有处理再生苗切段生长势及生根状况见图 1、图 2)。

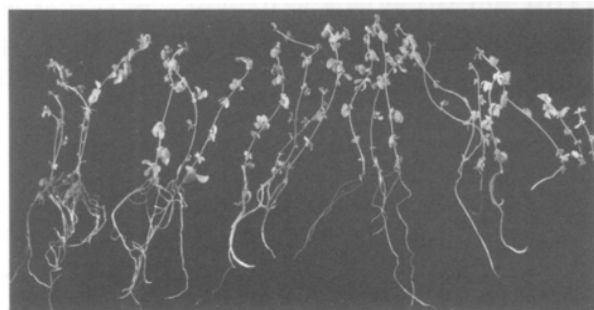


图 1 试管苗在附加 NaCl 浓度为 0%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%的 MS 培养基上生长及生根状态



图 2 试管苗在附加 NaCl 浓度为 0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%的 MS 培养基上生长及生根状态

3 讨论

各类植物之间的耐盐性存在着一定的差异。盐离子的积累也在某种程度上影响了植物的代谢过程,细胞的生理功能受到了不同程度的破坏,影响了植物的正常生长,因此通过培养基中附加不同浓度的 NaCl,可以获得植株对 NaCl 的临界抗性浓度。通过本实验,可以初步确定 0.9%的 NaCl 浓度,为实验中百脉根试管苗在培养基中生长的临界抗性浓度。这一结果对转基因过程中再生植株的进一步筛选有着一定的帮助。

植物转基因过程中,外植体在附加筛选剂的培养基中诱导、分化出大量的再生植株,这些植株需要经过 PCR 检测确定转基因植株费时长、成本高。利用本实验方法可以对获得的转基因再生植株进行初步筛选,能够在 NaCl 浓度大于 0.9% 培养基上正常生长的植株,在某种程度上可初步认为是转化成功植株,因为外源基因表达才能使植株的耐受能力大于 0.9%,这样可以剔除非转化和嵌合体植株,不仅减少了后期的分子检测工作量,同时结合 PCR 的结果使转基因植株得到进一步确认。

本研究方法在百脉根转化与耐盐相关的 BADH 和 CMO 基因实验中应用,改良转化率(PCR 阳性植株数 / 抗性植株总数)从原来 43.7% 提高到 88.6%。

参考文献:

- [1] 赵可夫,冯立田.中国盐生植物资源[M].北京:科学出版社,2001:32-43.
- [2] 黄绍兴,阎隆飞.高等植物对渗透胁迫的基因表达[J].农业生物技术学报,1995,3(3):1-6.
- [3] 刘凤华,郭岩,谷冬梅,等.转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J].遗传学报,1997,24(1):54-58.
- [4] Li Y X, Chang F Q, Guo B H, et al. Genetic Transformation of Watercress with a Gene Including for Betaine-aldehyde Dehydrogenase (BADH) [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(5): 480-484.
- [5] He P M, Zhang D B, Liang W Q, et al. Expression of Choline Oxidase Gene (codA) Enhances Salt Tolerance of the Tobacco [J]. Acta Biochimica Sinica, 2001, 33(5): 519-524.
- [6] Prosa. K VSK, Sharmila P, Kumar PA, et al. Bacterial CodA Gene Enhances Its Tolerance to Salt Stress [J]. Molecular Breeding, 2000, 6(5): 489-499.
- [7] 韦正乙,刘艳芝,王兴智,等. HAL1 基因转化百脉根(*Lotus cirniculatus*) 的初步研究 [J]. 吉林农业科学, 2007, 32(1): 17-18, 25.
- [8] Bohnert HJ, Jenson R. Metabolic Engineering for Increased Salt Tolerance- the Next Step [J]. AUST. Plant Physiol., 1996 (23): 661-667.