

# NaN<sub>3</sub> 和紫外线复合诱变对苜蓿愈伤组织 在干旱和盐胁迫下生长的影响

李波, 林浩, 邬婷婷, 陈雪梅

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**以图牧2号苜蓿愈伤组织为材料, 对其进行不同浓度 NaN<sub>3</sub> 及紫外线诱变剂量和不同浓度 NaCl 及 PEG 胁迫处理, 观察愈伤组织生长状况, 以愈伤组织的存活率确定各处理的半致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 或剂量 (LD<sub>50</sub>) 和致死浓度 (LC<sub>100</sub>) 或剂量 (LD<sub>100</sub>), 并对愈伤组织进行脯氨酸、可溶性糖、丙二醛含量和 CAT 酶活性的测定。结果表明: 诱变和胁迫影响了苜蓿愈伤组织生长, 随 NaN<sub>3</sub> 浓度和紫外线诱变剂量的增加, 愈伤组织的存活率下降, NaN<sub>3</sub> 的 LC<sub>50</sub> 和 LC<sub>100</sub> 分别为  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在距离为 20 cm 时, 紫外线诱变 LD<sub>50</sub> 和 LD<sub>100</sub> 分别为 6, 8 min; 随 NaCl 和 PEG 选择压力的加大, 愈伤组织的存活率下降, NaCl 的 LC<sub>50</sub> 和 LC<sub>100</sub> 分别为 1.5% 和 2.0%, PEG 的 LC<sub>50</sub> 和 LC<sub>100</sub> 分别为 25% 和 30%。各诱变和胁迫处理比较, 经 NaN<sub>3</sub> 和紫外线复合诱变及 PEG 和 NaCl 双重选择压力处理愈伤组织存活率最低为 16%。NaN<sub>3</sub> 和紫外线复合诱变的愈伤组织脯氨酸、可溶性糖含量、CAT 酶活性增加, 丙二醛含量下降。诱变和逆境胁迫筛选的苜蓿愈伤组织, 可以提高苜蓿愈伤组织对盐旱的抵抗能力, 可为利用体细胞扩大苜蓿抗逆性变异来源提供基础。

**关键词:** 苜蓿愈伤组织; NaN<sub>3</sub> 和紫外线复合诱变; 盐胁迫; 干旱胁迫

**中图分类号:** S541<sup>+</sup>.1      **文献标志码:** A

## Effects of NaN<sub>3</sub> and ultraviolet combined mutation on the growth of alfalfa callus under salt and drought stress

LI Bo, LIN Hao, WU Ting-ting, CHEN Xue-mei

(College of Agriculture, Forestry and Life Sciences, Qiqihar University, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas, Heilongjiang, Qiqihar 161006, China)

**Abstract:** Alfalfa callus of Tumu No.2 was used as experimental material, callus was mutated with different concentrations of NaN<sub>3</sub> and different dose of UV, and treated with NaCl and PEG stress at different concentrations. The growth status of the callus was observed. The semi lethal (LC50) and lethal (LC100) concentration (dose) of each treatment was determined according to the survival rate of callus. The content of proline, soluble sugar, MDA and the activity of CAT in callus were assayed. The results showed that the growth of alfalfa callus was affected by mutation and stress. The survival rate of callus had declined with the increase of NaN<sub>3</sub> concentration and UV irradiation dose. The semi lethal and lethal concentrations of NaN<sub>3</sub> was 4.0 and  $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively. At the distance of 20 cm, the semi lethal and lethal doses of UV induced mutation was 6 and 8 min. The survival rate of callus declined with the concentration of NaCl and PEG increasing. The lethal and lethal concentrations of NaCl was 1.5% and 2% respectively. The lethal and lethal concentrations of PEG was 25% and 30% respectively. Compared with different mutation and stress treatments, the survival rate of callus was 16% treated by NaN<sub>3</sub> and UV combined mutagenesis and PEG and NaCl double stress treatment. The content of proline, soluble sugar, CAT enzyme increased and MDA content decreased in the callus under NaN<sub>3</sub> and UV combined mutagenesis. Screening of alfalfa callus by mutagenesis and stress could improve the salt and drought resistance. It provides the basis for using somatic cells to expand the resources of anti-stress variation in alfalfa.

**Key words:** Alfalfa callus; NaN<sub>3</sub> and ultraviolet combined mutation; salt stress; drought stress

收稿日期: 2017-01-06

修回日期: 2017-02-17

基金项目: 黑龙江省应用技术研究与开发计划重大项目 (GA15B105-5); 齐齐哈尔市科学技术计划项目 (NYGG-201518); 齐齐哈尔大学 2017 年研究生创新科研项目 (YISCX2017-032X)

作者简介: 李波 (1962-), 女, 辽宁鞍山人, 教授, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: libo1962@163.com

苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是多年生的豆科类草本植物, 具有产量高、营养价值高的特性, 被世界公认为优质牧草之一<sup>[1]</sup>。由于近几年环境干旱和土地盐渍化的加剧, 导致紫花苜蓿的种植面积逐年减少, 严重威胁其产量, 因此, 亟待加强培育抗逆性强的苜蓿新品种, 以丰富我国匮乏的苜蓿种质资源。

植物耐盐和抗旱机制是错综复杂的, 耐盐和抗旱性状是受多基因控制的, 涉及多种生理代谢途径。为了获得抗逆性强的苜蓿新品种, 评价耐盐和抗旱突变材料生理生化功能上的差别, 采用理化诱变因素复合处理的方法开展耐逆紫花苜蓿研究, 以期获得优良农艺性状的新种质材料, 对紫花苜蓿耐盐和抗旱育种及生理机制研究有一定参考价值, 有利于丰富我国苜蓿的品种资源, 推动苜蓿产业化发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以图牧 2 号苜蓿无菌苗的下胚轴诱导出的愈伤组织为材料, 由齐齐哈尔大学植物组织培养研究室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的继代培养 将淡黄色、松嫩的愈伤组织切割成  $0.5\text{ cm}^3$  左右的小块, 转接到继代培养基中, 继代 2~3 次的愈伤组织即可作为诱变和胁迫的材料。继代培养基为  $\text{MS}+2,4\text{-D } 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+30\text{ g 蔗糖}+8.5\text{ g 琼脂}(\text{pH}=5.8)$ 。

1.2.2  $\text{NaN}_3$  和紫外线诱变半致死浓度 (剂量) 选择 用磷酸缓冲液 ( $\text{pH}=7.0, 0.2\text{ M}$ ) 配置浓度为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、 $5.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $5.5\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NaN}_3$  溶液, 将愈伤组织置于  $\text{NaN}_3$  溶液中, 低速摇床震荡 4 h 后无菌水冲洗 3 次, 愈伤组织转接在继代培养基, 每个梯度约 120 块愈伤组织 (每块约  $0.5\text{ cm}^3$ ),  $25^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 25 d。

选取 30 W 的紫外灯管, 以 20 cm 的距离和不同的照射时间 (2、3、4、5、6、7 min 和 8 min) 为紫外线的诱变剂量, 每个梯度处理约 90 块愈伤组织, 避光黑暗  $25^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 25 d。

1.2.3 NaCl 和 PEG 胁迫致死浓度的筛选 将愈伤组织切割成  $0.5\text{ cm}^3$  左右小块, 接种在含有不同浓度的 PEG-6000 液体培养基中, PEG 胁迫的浓度梯度为 0%、15%、20%、25% 和 30%, 每个梯度处理约 90 块愈伤组织,  $25^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养, 分别在 2、4、6、8 d 和 10 d 将其转接到 MS 固体培养基中培养。

将愈伤组织切割成  $0.5\text{ cm}^3$  左右小块, 转接至 NaCl 梯度培养基中 (NaCl 浓度为 0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0%), 每种盐浓度处理约 90 块愈伤组织,  $25^\circ\text{C}$

的恒温培养箱中培养 12 d。

1.2.4 复合诱变后愈伤组织的干旱、盐胁迫 将复合诱变处理后生长良好的愈伤组织转接在含 NaCl 和 PEG 的致死浓度培养基中, 分别胁迫处理 8 d 和 10 d, 存活的愈伤组织继代培养。继代两次后, 将 NaCl 处理的部分愈伤组织转入含 PEG 的致死培养基中, 进行胁迫处理 10 d, 存活的愈伤组织继代培养。

1.2.5 生理生化指标的测定 游离脯氨酸含量测定采用茚三酮法, 丙二醛 (MDA) 含量测定采用硫代巴比妥酸法, 可溶性糖含量的测定采用蒽酮法, 过氧化氢酶活性 (CAT) 测定采用紫外吸收法。

### 1.3 愈伤组织存活率和愈伤组织致死率的测定

愈伤组织存活率 (%) = 愈伤组织存活 (块) 数 / 接种愈伤组织总 (块) 数  $\times 100\%$

愈伤组织的致死率 (%) = 愈伤组织死亡 (块) 数 / 接种愈伤组织总 (块) 数  $\times 100\%$

### 1.4 数据处理与分析

利用统计分析软件 Excel 2003、SPSS 17.0 对所测定的各项生理指标的数据进行方差分析, 比较各项生理指标变化的差异及显著性。

## 2 结果与分析

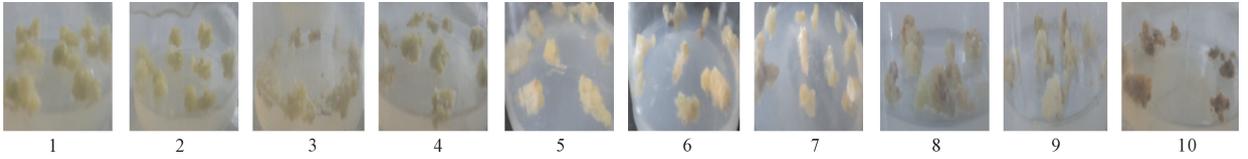
### 2.1 $\text{NaN}_3$ 和紫外线诱变对愈伤组织生长的影响

2.1.1  $\text{NaN}_3$  诱变  $\text{NaN}_3$  诱变 苜蓿愈伤组织对  $\text{NaN}_3$  诱变剂比较敏感, 经过不同浓度的  $\text{NaN}_3$  诱变后, 其生长受到显著的影响 (见图 1), 表现出随  $\text{NaN}_3$  浓度的增加, 愈伤组织受损伤程度加重, 其生活力明显降低, 愈伤组织色泽由淡黄色转变为黄褐色, 甚至为褐色。  $\text{NaN}_3$  浓度与愈伤组织存活率间呈负相关性 (见表 1), 在诱变后培养初期 (前 5 d) 愈伤组织无明显变化, 第 10 天左右随着  $\text{NaN}_3$  浓度的增加愈伤组织逐渐褐化死亡。培养至 25 d 时, 随着  $\text{NaN}_3$  诱变浓度的增加, 愈伤组织的致死率增加,  $4.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  处理组的致死率为 50.83%, 此浓度为  $\text{NaN}_3$  的  $\text{LG}_{50}$ ,  $\text{NaN}_3$  浓度为  $5.5\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组致死率为 95.83%, 此浓度为  $\text{NaN}_3$  的  $\text{LC}_{100}$ ,  $\text{LC}_{50}$  为愈伤组织死亡近一半的  $\text{NaN}_3$  浓度,  $\text{LC}_{100}$  为愈伤组织近全部死亡的  $\text{NaN}_3$  浓度。

2.1.2 紫外线诱变 苜蓿愈伤组织经过不同剂量紫外线诱变后, 其生长状态受到一定的影响 (见图 2), 表现出随紫外线剂量的增加, 愈伤组织存活率逐渐下降。在诱变初期 (前 5 d) 愈伤组织无明显变化, 第 10 天左右随着紫外线辐射剂量的增加愈伤组织逐渐褐化死亡 (见表 2), 随着培养时间的推移, 各诱变处理组死亡率提高。处理时间大于 6 min, 愈伤

组织表现为生活力明显降低,色泽由淡黄色转变为黄褐色,甚至成为褐色,存活率大大下降。紫外线辐射与愈伤组织存活率呈负相关,愈伤组织培养至 25 d 时,随着紫外线诱变剂量的增加,愈伤组织的致死率逐渐增加,6 min 处理组的致死率为 51.11%,此剂量为紫外线的  $\text{LC}_{50}$ ,8 min 处理组致死率达到 96.67%,此剂量为紫外线的  $\text{LD}_{100}$ 。

2.1.3 复合诱变下苜蓿愈伤组织生长状况 苜蓿愈伤组织经过复合诱变处理后,其生长状况受到明显的抑制,愈伤组织存活率降低(见图 3)。复合诱变处理前 6 d 愈伤组织颜色变淡,没有生长活力,培养至 15 d 左右,部分愈伤组织开始缓慢恢复生长(见图 4),20 d 时部分存活下来逐渐生长,当培养至 25 d 时,愈伤组织颜色逐渐转为淡绿色,旺盛生长。



注:1~10 为  $\text{NaN}_3$  浓度为 0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、 $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的愈伤组织。

Notes: 1~10 was callus under  $\text{NaN}_3$  concentration of 0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0,  $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

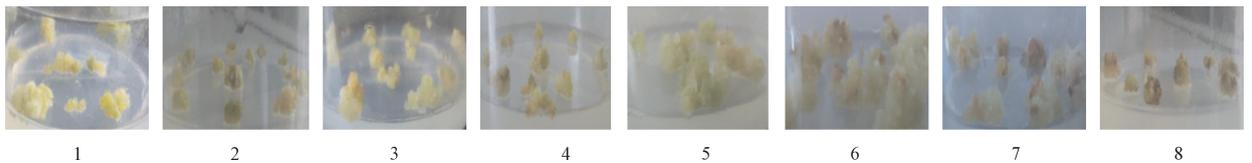
图 1 不同浓度  $\text{NaN}_3$  诱变苜蓿愈伤组织

Fig1 Alfalfa callus induced by different concentrations of  $\text{NaN}_3$

表 1  $\text{NaN}_3$  诱变苜蓿愈伤组织生长状况

Table 1 The growth status of alfalfa callus induced by  $\text{NaN}_3$  mutagenesis

$\text{NaN}_3$ 浓度/ $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ $\text{NaN}_3$ concentration	致死率/% Lethal rate	愈伤组织色泽 Callus colour	$\text{NaN}_3$ 浓度/ $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ $\text{NaN}_3$ concentration	致死率/% Lethal rate	愈伤组织色泽 Callus color
$0 \times 10^{-3}$	00.00	淡黄绿色 Light green yellow	$3.5 \times 10^{-3}$	37.5	淡黄色 Pale yellow
$1.5 \times 10^{-3}$	1.67	淡黄绿色 Light green yellow	$4.0 \times 10^{-3}$	50.83	黄褐色 Yellowish-brown
$2.0 \times 10^{-3}$	10.83	淡黄色 Pale yellow	$4.5 \times 10^{-3}$	66.67	黄褐色 Yellowish-brown
$2.5 \times 10^{-3}$	20.83	淡黄色 Pale yellow	$5.0 \times 10^{-3}$	81.67	褐色 Brown
$3.0 \times 10^{-3}$	26.67	淡黄色 Pale yellow	$5.5 \times 10^{-3}$	95.83	褐色 Brown



注:1~8 为紫外线照射不同时间(0,2,3,4,5,6,7 min 和 8 min)苜蓿愈伤组织。

Notes: 1~8 was callus of UV irradiation for different time( 0,2,3,4,5,6,7 min and 8 min).

图 2 紫外线辐射苜蓿愈伤组织

Fig 2 Alfalfa callus under ultraviolet radiation

表 2 紫外线辐射苜蓿愈伤组织生长状况

Table 2 Growth status of alfalfa callus after ultraviolet radiation

照射时间/min Irradiation time	致死率/% Lethal rate	愈伤组织色泽 Callus color	照射时间/min Irradiation time	致死率/% Lethal rate	愈伤组织色泽 Callus color
0	0.00	淡黄绿色 Light green yellow	5	43.33	黄褐色 Yellowish-brown
2	0.00	淡黄绿色 Light green yellow	6	51.11	黄褐色 Yellowish-brown
3	20.00	淡黄色 Pale yellow	7	76.67	褐色 Brown
4	27.78	淡黄色 Pale yellow	8	96.67	褐色 Brown

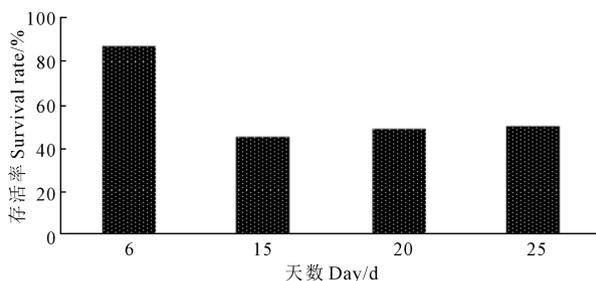


图 3 复合诱变愈伤组织的存活率

Fig.3 The survival rate of callus by hybrid mutagenesis

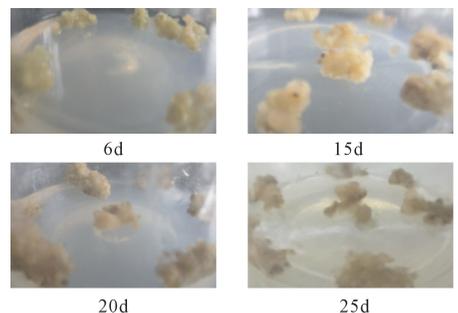


图 4 复合诱变苜蓿愈伤组织

Fig.4 Alfalfa callus by hybrid mutagenesis

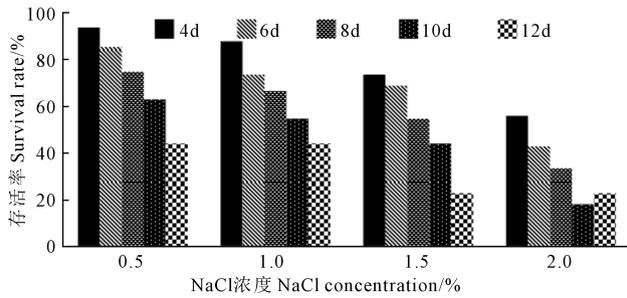
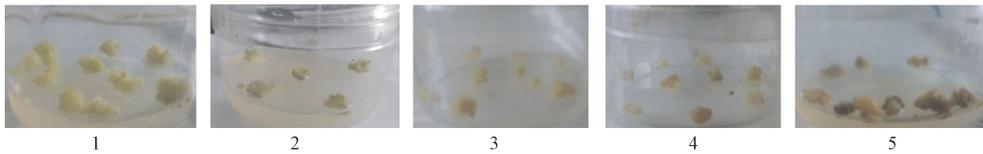


图 5 NaCl 胁迫下愈伤组织的存活率

Fig.5 The survival rate of callus under NaCl stress

### 2.2 NaCl 和 PEG 胁迫对愈伤组织存活率和生长状况的影响

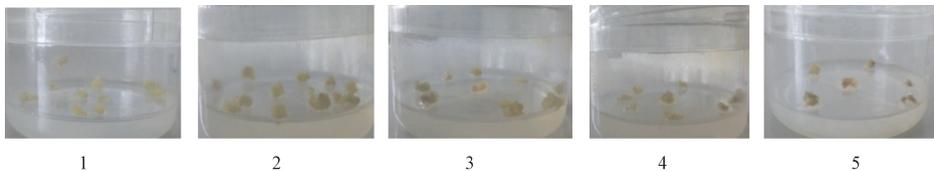
NaCl 胁迫下苜蓿愈伤组织存活率的变化见图 5,生长状况见图 6。随着盐浓度的增加和处理时间的增加苜蓿愈伤组织的存活率逐渐降低,在 NaCl 胁迫处理 10 d 和浓度为 1.0%时、8 d 和浓度 1.5%时,愈伤组织存活率分别为 53.96%、54.31%,均达到 NaCl 的  $LC_{50}$ ,在 NaCl 胁迫处理 12 d 和浓度为 2.0%



注:1~5 为 0,0.5%,1.0%,1.5%和 2%浓度 NaCl 处理的愈伤组织。  
 Note:1~5 was callus under NaCl concentration of 0,0.5%,1.0%,1.5% and 2%.

图 6 NaCl 胁迫下苜蓿的愈伤组织

Fig. 6 Alfalfa callus under NaCl stress



注:1~5 为 0,15%,20%,25%和 30%浓度 PEG 处理的愈伤组织。  
 Notes:1~5 was callus under PEG concentration of 0,15%,20%,25% and 30%.

图 7 PEG 胁迫下苜蓿的愈伤组织

Fig.7 Alfalfa callus under PEG stress

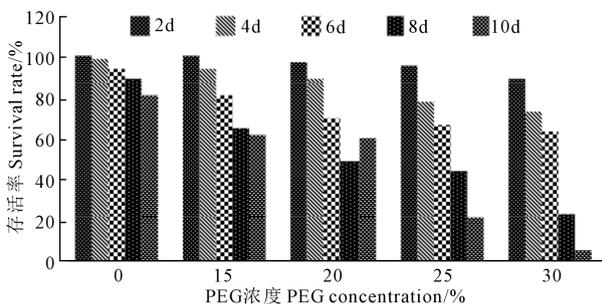


图 8 PEG 胁迫下愈伤组织的存活率

Fig.8 Survival rate of callus under PEG stress

时,愈伤组织存活率达到最低,为 17.45%,褐化率最高,此浓度为 NaCl 的  $LC_{100}$ 。

PEG 胁迫苜蓿愈伤组织生长状况见图 7,愈伤组织存活率的变化见图 8。随着 PEG 浓度的增加及处理天数的增加苜蓿愈伤组织的存活率逐渐降低,在 PEG 胁迫 6 d 和浓度为 25%时,存活率为 48.10%,此浓度为 PEG 的  $LC_{50}$ ,在 PEG 胁迫 10 d 和浓度为 30%时,其存活率最低,为 3.80%,此浓度为 PEG 的  $LC_{100}$ 。

### 2.3 复合诱变对干旱和盐胁迫下苜蓿愈伤组织存活率的影响

复合诱变和混合高盐及干旱胁迫下苜蓿愈伤组织生长状况见图 9,愈伤组织的存活率变化见图 10。经复合诱变的 PEG 胁迫、复合诱变的 NaCl 胁迫、复合诱变的 PEG 和 NaCl 胁迫处理后的苜蓿愈伤组织,随着培养时间的增加其存活率下降,直到 15~18 d 时生长状态趋于稳定,经复合诱变的 PEG 和 NaCl 处理下的愈伤组织存活率最低,为 16%。



注:1.复合诱变( $LC_{50}$ )+PEG( $LC_{100}$ );2.复合诱变( $LC_{50}$ )+NaCl( $LC_{100}$ );3.复合诱变( $LC_{50}$ )+PEG( $LC_{100}$ )+NaCl( $LC_{100}$ )。  
 Notes:1. hybrid induced( $LC_{50}$ )+PEG( $LC_{100}$ ); 2. hybrid induced( $LC_{50}$ )+NaCl( $LC_{100}$ ); 3. hybrid induced( $LC_{50}$ )+PEG( $LC_{100}$ )+NaCl( $LC_{100}$ ).

图 9 复合诱变及盐和干旱胁迫下苜蓿愈伤组织  
 Fig.9 Alfalfa callus under hybrid mutagenesis and stress of salt and drought

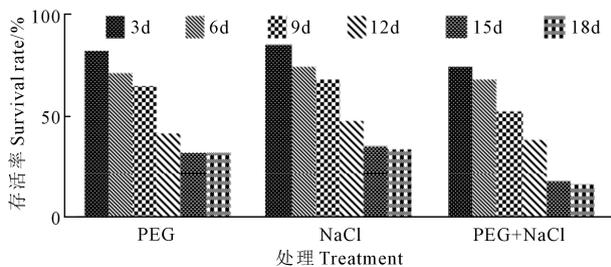


图10 复合诱变及盐和干旱胁迫下愈伤组织的存活率

Fig.10 Survival rate of callus under hybrid mutagenesis and stress of salt and drought

## 2.4 诱变和胁迫处理苜蓿愈伤组织的生理变化

经胁迫和诱变苜蓿愈伤组织的脯氨酸、可溶性糖、丙二醛的含量及CAT酶活性的变化见表3,胁迫和诱变处理与对照比较提高了脯氨酸、可溶性糖和CAT酶活性,降低了丙二醛的含量。 $\text{NaCl}$ 和PEG胁迫脯氨酸比对照增加了55.36%和41.88%,可溶性糖比对照增加了52.15%和37.12%,CAT酶活性比

对照增加了7.58%和5.77%,丙二醛含量比对照降低了30.66%和25.23%。在三种诱变处理中, $\text{NaN}_3$ 诱变后的脯氨酸、可溶性糖含量和CAT酶活性分别比对照增加了59.77%、77.91%和9.61%,丙二醛含量比对照降低了40.48%;紫外线诱变后的脯氨酸、可溶性糖含量和CAT酶活性分别比对照增加66.75%、105.83%和9.72%,丙二醛含量比对照降低了44.56%; $\text{NaN}_3$ +紫外线混合诱变后的脯氨酸、可溶性糖含量和CAT酶活性分别比对照增加155.31%、258.90%和21.14%,丙二醛含量比对照降低了64.20%。三种诱变方式中,混合诱变愈伤组织脯氨酸、可溶性糖及CAT酶活性均最高,丙二醛含量最低。在混合诱变中, $\text{NaCl}$ 、PEG和 $\text{NaCl}$ +PEG混合胁迫比较, $\text{NaCl}$ +PEG混合胁迫愈伤组织脯氨酸、可溶性糖及CAT酶活性均最高,丙二醛含量最低, $\text{NaN}_3$ +紫外线混合诱变处理提高了苜蓿愈伤组织对盐和干旱的抵抗能力。

表3 诱变及干旱和盐胁迫下苜蓿愈伤组织的生理和生化指标的变化

Table 3 Changes of physiological and biochemical indexes under mutagenesis and stress

处理 Treatment	丙二醛 Malondialdehyde $/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	脯氨酸 Proline $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性糖 Soluble sugar $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	过氧化氢酶 Catalase $/(\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw} \cdot \text{min}^{-1})$
对照 Control	0.662 <sup>a</sup> ±0.030	134.99 <sup>a</sup> ±1.878	0.326 <sup>a</sup> ±0.01	58.56 <sup>d</sup> ±0.594
PEG(LC <sub>50</sub> )胁迫 PEG(LC <sub>50</sub> ) stress	0.49 <sup>b</sup> ±0.004	191.53 <sup>d</sup> ±1.151	0.447 <sup>fg</sup> ±0.01	61.94 <sup>c</sup> ±0.201
NaCl(LC <sub>50</sub> )胁迫 NaCl(LC <sub>50</sub> ) stress	0.459 <sup>c</sup> ±0.017	209.72 <sup>e</sup> ±1.718	0.496 <sup>f</sup> ±0.01	63.00 <sup>c</sup> ±0.252
$\text{NaN}_3$ (LC <sub>50</sub> )诱变 $\text{NaN}_3$ (LC <sub>50</sub> ) induction	0.394 <sup>d</sup> ±0.017	215.68 <sup>e</sup> ±1.312	0.580 <sup>e</sup> ±0.010	64.19 <sup>c</sup> ±0.095
紫外线(LD <sub>50</sub> )诱变 Ultraviolet radiation(LD <sub>50</sub> ) induction	0.367 <sup>e</sup> ±0.003	225.10 <sup>e</sup> ±1.718	0.671 <sup>e</sup> ±0.080	64.25 <sup>c</sup> ±1.263
$\text{NaN}_3$ (LC <sub>50</sub> )+紫外线(LD <sub>50</sub> )复合诱变 $\text{NaN}_3$ (LC <sub>50</sub> ) + ultraviolet radiation(LD <sub>50</sub> ) hybrid induced	0.237 <sup>f</sup> ±0.010	344.64 <sup>bc</sup> ±2.577	1.170 <sup>d</sup> ±0.010	70.94 <sup>bc</sup> ±0.144
复合诱变+PEG(LC <sub>100</sub> )胁迫 Hybridinduced+PEG(LC <sub>100</sub> ) stress	0.109 <sup>h</sup> ±0.002	374.07 <sup>bc</sup> ±5.728	1.876 <sup>c</sup> ±0.020	71.5 <sup>bc</sup> 0±0.144
复合诱变+NaCl(LC <sub>100</sub> )胁迫 Hybridinduced+NaCl(LC <sub>100</sub> ) stress	0.191 <sup>g</sup> ±0.003	354.56 <sup>b</sup> ±2.977	1.532 <sup>b</sup> ±0.010	72.56 <sup>b</sup> ±0.505
复合诱变+混合胁迫 Hybridinduced+mixed stress	0.036 <sup>i</sup> ±0.001	390.28 <sup>a</sup> ±2.976	2.337 <sup>a</sup> ±0.020	79.00 <sup>a</sup> ±0.172

注:不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ), and the same letters indicate no significant difference ( $P > 0.05$ ).

## 3 讨论

### 3.1 复合诱变效应

单一因素虽能引起某些植物性状的突变,但诱变效果还不够理想,诱变谱也比较单纯,为了提高诱变育种效果,理化因素复合诱变处理受到广泛关注。由于射线改变了生物膜的完整性和渗透性,从

而有助于化学诱变剂的吸收<sup>[4-6]</sup>。物理和化学因素的复合处理,可以产生累加效应,提高突变频率和诱变效果。多数试验证实了复合处理增加诱变效应的可能性。付凤玲等<sup>[8]</sup>用射线辐射和 $\text{NaN}_3$ 处理玉米愈伤组织,在含1.0% NaCl的高渗培养基上筛选,对再生植株系进行耐盐性鉴定。结果表明,20 Gy的辐射和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaN}_3$ 是较为适合玉米愈

伤组织诱变的处理组配,22 个再生植株株系中有 5 个诱变株系的耐盐性高于未诱变对照。鹿巍<sup>[9]</sup>采用紫外线及化学诱变 EMS 的方法对小麦叶锈菌菌株 05-5-46 的单胞菌系进行诱变,得到的 4 株小麦叶锈菌突变菌株为新的致病类型。本研究发现不同的诱变处理方法,可以影响苜蓿愈伤组织的存活率,且在一定的  $\text{NaN}_3$  和紫外线诱变下,存活的愈伤组织增加其对  $\text{NaCl}$  和 PEG 的抵抗能力,说明紫外线和  $\text{NaN}_3$  复合诱变可提高苜蓿愈伤组织的诱变效应。

### 3.2 复合诱变对苜蓿愈伤组织生理和生化水平的影响

从脯氨酸、可溶性糖含量和 CAT 活性的变化来看,这三项指标变化情况一致,经复合诱变处理后,三项指标均有大幅度增加,说明理化复合诱变可以增强某些生理生化指标的含量,来提高机体的抵抗能力<sup>[10-11]</sup>。单一化学诱变处理或物理诱变使三项指标的含量均小幅上升,而丙二醛的含量经复合诱变处理含量的下降趋势也要高于单因素诱变,这说明理化复合诱变对苜蓿愈伤组织的影响较大,这可能与理化复合诱变的特性有关。

为了适应诱变后盐和干旱胁迫,植物体内存在的抗氧化酶系统包括过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等可以缓解因逆境带来的伤害<sup>[12]</sup>。CAT 酶是生物体内的主要抗氧化酶,它能促进细胞中过氧化氢的分解,减轻过氧化氢对细胞的损害,试验发现苜蓿愈伤组织经诱变胁迫处理后,特别是复合诱变+ $\text{NaCl}$ +PEG 处理苜蓿愈伤组织 CAT 活性大大提高。

复合诱变+PEG+ $\text{NaCl}$  处理均高于紫外线+ $\text{NaCl}$ +PEG 和  $\text{NaN}_3$ + $\text{NaCl}$ +PEG 处理,表明复合诱变苜蓿愈伤组织的抗性比单一因素诱变愈伤组织的抗性

强。理化复合诱变处理对苜蓿愈伤组织的影响较为复杂,但总体表现出理化复合诱变+PEG+ $\text{NaCl}$  处理对诱变起着主导性的作用,这说明理化复合诱变处理的诱变效果强于单因素诱变,能提高苜蓿愈伤组织的抗逆性,这可能与复合诱变处理的多方向性和不定向性有关。

### 参 考 文 献:

- [1] 安学丽,蔡一林.化学诱变及其在农作物育种上应用[J].核农学报,2003,17(3):239-242.
- [2] 杨兆民,张璐.辐射诱变技术在农业育种中的应用与探析[J].基因组学与应用生物学,2011,30(1):87-91.
- [3] 钮力亚,于亮,付晶,等.叠氮化钠在农作物育种中的应用.河北农业科学,2010,14(12):52-53.
- [4] 彭选明,易卫平,杨震,等.湖南水稻种质资源创制及辐射诱变育种应用成效[J].湖南农业科学,2015,(4):10-13.
- [5] 吴正景,张菊平,时灿辉,等.叠氮化钠诱变玉扇愈伤组织的研究[J].植物生理学通报,2010,46(12):1247-1250.
- [6] 卜婷,范小峰,刘丽琼,等.紫外辐射对矮牵牛愈伤组织增殖的影响[J].陇东学院学报,2013,24(5):49-52.
- [7] 李波,贾秀峰.紫外线诱变苜蓿愈伤组织抗旱性的研究[J].干旱地区农业研究,2005,23(6):103-105.
- [8] 付凤玲,李晚忱,荣廷昭,等.用  $\gamma$  射线和叠氮化钠诱变的玉米愈伤组织筛选耐旱和雄性不育材料[J].核农学报,2005,19(5):356-359.
- [9] 鹿巍.紫外线及 EMS 方法诱导小麦叶锈菌毒性突变研究[D].石家庄:河北农业大学,2007.
- [10] 毛桂莲,郑国琦,戴珍珍. $\text{NaCl}$  和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫对枸杞愈伤组织生理效应的影响[J].西北农业学报,2006,15(6):153-157.
- [11] Nagy Z, Guoth A, Nemeth E, et al. Metabolic indicators of drought stress Tolerance in wheat: glutaminesynthetase isoenzymes and Rubisco[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 6(7):48-54.
- [12] 阮先乐,王俊生,陈龙,等.甘薯愈伤组织对盐胁迫的生理反应研究[J].周口师范学院学报,2014,31(5):89-91.